

CAPÍTULO I

1.1.- Introducción.

La recuperación o limpieza de contaminantes contenidos en suelos supone un tema que atrae la atención de técnicos que laboran en el área ambiental. Es sabido que la solución a la contaminación ambiental requiere una gran variedad de tecnologías entre ellas la biorrecuperación, bioventilación, Land farming, Fitoremediación, etc.,¹ que describen un concepto relativamente nuevo, aunque su aplicación se ha convertido en una tendencia de crecimiento acelerado en la gestión ambiental.

La contaminación ambiental por hidrocarburos es un problema creciente en los países productores de petróleo. El petróleo es un producto natural procedente de la conversión anaerobia de la materia orgánica sometida a presión y a temperatura elevada¹. El metabolismo de los hidrocarburos realizado por poblaciones naturales de microorganismos representa uno de los mecanismos principales mediante los cuales el petróleo, otros hidrocarburos y contaminantes son eliminados del medio ambiente.

Los derrames de petróleo generan impactos ambientales como la contaminación de aguas y suelos, daños a la vegetación y a la fauna así como efectos socio económicos y culturales de las comunidades involucradas, por estas razones la necesidad de implementar sistemas de gestión y tratamiento de contaminantes (crudo) tanto en el agua como en el suelo.

¹ (Mark Coiné, “Tecnicas de recuperación de suelos”, 2000).

1.2.- Objetivos:

1.2.1.- Objetivo General: Determinar si el coctel enzimático utilizado contribuye a la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo.

1.2.2.- Objetivos Específicos:

- Determinar rangos de concentración de coctel enzimático a utilizar para la biorremediación, a partir de un seguimiento inicial de microorganismos al 1% (peso) y 25% (peso) de coctel enzimático.
- Construir 4 biorreactores con, el 5% de suelo contaminado y diferentes concentraciones de enzima para determinar las condiciones ambientales del proceso de biorremediación con el coctel comercial.

1.3.- Antecedentes y Fundamentos Teóricos:

1.3.1.- Tratamientos de remediación de suelos.

1.3.1.1.- Fitorremediación.

La Fitorremediación es un proceso que tiene por objeto descontaminar suelos valiéndose de especies vegetales capaces de extraer, metabolizar y acumular las sustancias tóxicas presentes en dichos tierras². Para ello, suelen emplearse diferentes especies, con probada capacidad para realizar esa labor. Los autores de estas investigaciones destacan que, si bien existen diferentes estudios sobre Fitorremediación en distintas plantas, no se dispone de información sobre el uso para tales fines de variedades específicas por región.

² Claudia Mazzeo, "Tratamiento de suelos contaminados por medio de fitorremediación", 10-Oct-2002:

La descontaminación de suelos con la ayuda de especies vegetales aparece hoy como una nueva alternativa sobre la que se investiga a nivel mundial. Las investigaciones se enmarcan dentro de la comparación de la Fitorremediación versus métodos tradicionales. La fitorremediación es considerada en todo el mundo como una tecnología innovadora para el tratamiento de residuos tóxicos -sólidos o líquidos- con el objeto de recuperar suelos y aguas contaminadas. Si bien la factibilidad de su empleo aún está siendo evaluada desde diferentes perspectivas, los estudios de que se dispone coinciden en señalar que se trata de una técnica más limpia, simple, efectiva y aún de menor costo, en relación con los métodos físicoquímicos que se usan en la actualidad, tales como el reemplazo de suelos, la solidificación, el lavado o la incineración. Otra ventaja que ofrece la fitorremediación sobre los métodos tradicionales es que permite la eliminación selectiva de contaminantes y su recuperación para futuros usos².

Se usa especialmente para emplazamientos que hayan sido contaminados con metales, plaguicidas, solventes, explosivos, petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos y lixiviados en vertederos.

Sus características principales son:

- ❖ Es una técnica de limpieza pasiva, estéticamente agradable y dependiente de la energía solar.
- ❖ Se emplean en zonas no muy extensas y donde la contaminación no está a mucha profundidad.
- ❖ Es una técnica empleada para un amplio rango de contaminantes.

² Claudia Mazzeo, "Tratamiento de suelos contaminados por medio de fitorremediación", 10-Oct-2002:

Existen cuatro tipos de mecanismos relativos a las plantas, la fitovolatilización (remoción de contaminantes del suelo y su subsecuente liberación a la atmósfera); la fitoextracción (asimilación de contaminantes por la planta); fitodegradación (metabolismo de contaminantes por la planta); Rizodegradación (metabolismo microbiano de contaminantes en el suelo)³.

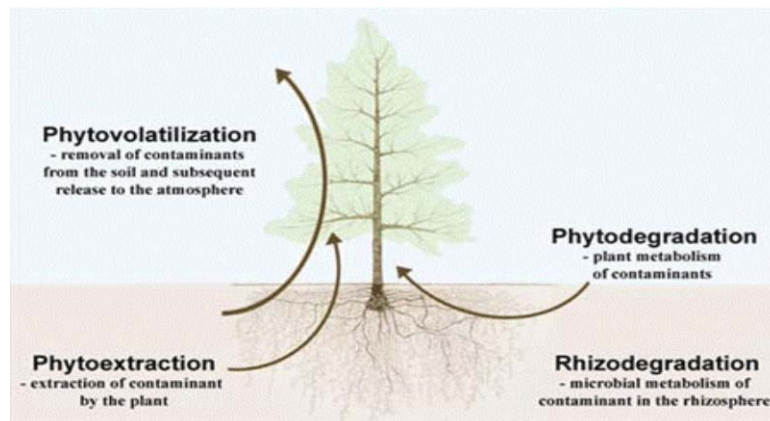


Grafico #1: Procesos de Fitoremediación³.

1.3.1.2.- Bioventilación.

Es una técnica aerobia que consiste en el uso de microorganismos para ayudar a que el oxígeno libre de la atmósfera ingrese al suelo y contribuya al proceso de degradación de los contaminantes.

1.3.1.3.- Tratamiento Enzimático.

La tecnología enzimática tiene como objetivo la superación de todos aquellos inconvenientes que parecen retrasar la aplicación de las enzimas en estos procesos a

³ www.miliarium.com/proyectos/suelos/descontaminaciónsuelos/tecnicasinsitu/tecnicasbiologicas/fitorremediacion.

escala industrial, las enzimas son proteínas cuya función biológica es catalizar las reacciones que suceden en las células. Esta área tiene aplicaciones desde tiempos remotos, como en fermentación, y actualmente es aplicada en industrias a diferentes niveles, pues implica la utilización de sistemas enzimáticos diversos que optimizan el procesamiento en la obtención de detergentes, aditivos alimenticios, productos químicos y farmacéuticos, etc. La tecnología enzimática se presenta como alternativa biotecnológica basada en que las industrias desarrollen productos de calidad homogénea, aprovechen óptimamente sus materias primas, aceleren sus procesos de producción, minimicen desperdicios y disminuyan el deterioro del medio ambiente.

Las enzimas son catalizadores de origen biológico que parecen cumplir muchos de los requisitos necesarios para impulsar la nueva industria química. Son catalizadores muy activos en medios acuosos y en condiciones no extremas de temperatura, presión, pH, etc. Son catalizadores muy específicos: pueden modificar un único sustrato en una mezcla de sustratos muy similares. Son catalizadores muy selectivos: pueden modificar un único enlace o un único grupo funcional en una molécula que tenga varias posiciones modificables¹⁸.

A pesar de esas excelentes propiedades catalíticas, las enzimas han ido evolucionando a través de los siglos para cumplir mejor las necesidades fisiológicas de los seres vivos y no para ser utilizadas en sistemas químicos industriales. Así, las enzimas son catalizadores solubles, generalmente muy inestables y que sufren inhibiciones por sustratos y productos. Además, las enzimas muchas veces no poseen todas las propiedades ideales (actividad, selectividad, etc.), cuando queremos que catalicen procesos distintos de los naturales (por síntesis en lugar de hidrólisis), sobre

¹⁸ P Gaseosa y J. Hube, tecnología de las enzimas, Editorial acribas. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990., Pag 3.

substratos no naturales, en condiciones experimentales no convencionales (en disolventes orgánicos no-tóxicos)¹⁸.

Las enzimas, adecuadamente administradas, potencian la acción de las técnicas tradicionales, reducen los tiempos de actuación requeridos, o aportan ventajas importantes sobre los métodos físicos o químicos tradicionales:

1. Al ser un producto con especificidad biológica para un tipo contaminante o conjunto de contaminantes, evita reacciones paralelas o secundarias no deseadas reduciendo al máximo el impacto negativo.
2. A las concentraciones de aplicación, las mezclas enzimáticas carecen de toxicidad. Como consecuencia, su potencial difusión por lixiviación o transporte por aguas subterráneas no supone tampoco riesgo para el consumo.

Las enzimas son obtenidas de organismos vivos naturales, que se cultivan en medios enriquecidos en los contaminantes sobre los que van a actuar. Esto asegura la máxima eficacia de la mezcla. Posteriormente, las enzimas son extraídas de los organismos una vez desarrollados estos, estabilizadas y concentradas para su conservación y transporte¹⁸.

El uso de enzimas tiene grandes aplicaciones a nivel mundial en: fermentación, curtición, fabricación de quesos, elaboración de pan, etc. A continuación algunas formas en las que se las puede encontrar:

- Proteinasas.- Son sustratos de proteínas, todas las proteínas excepto las queratinas. La hidrólisis es ordinariamente muy lenta. Las proteinazas desintegran

¹⁸ P Gaseosa y J. Hube, tecnología de las enzimas, Editorial acribas. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990., Pag 3.

péptidos sencillos, pero normalmente con mucha lentitud. Los productos superiores de la degradación de las proteínas son descompuestos rápidamente y sus aminoácidos pueden ser liberados por acción proteolítica¹⁸.

- Renina.- Se halla en el cuarto estómago de las terneras. Su acción proteolítica, si la tiene, es muy débil. Es un poderoso agente coagulador de la leche (pH óptimo aproximadamente 5.4) ¹⁸.
- Papaína.- Se halla en el látex del fruto verde de la papaya. Es típica de muchas enzimas vegetales como la ficina de la leche de higuerón, la asclepaína del vencetósigo y la bromelina del ananás. Una de sus características es su contenido de grupos SH, de que parece depender la actividad de la enzima. Por oxidación ligera se vuelve inactiva, pero es reactivada por agentes reductores, como la cisteína, HCN y otros, incluso los grupos SH en las proteínas que están siendo digeridas por las enzimas parcialmente activas. La papaína es relativamente resistente al calor, y empleada a temperaturas de 50°C a 60°C, es muy rápida la proteólisis. La enzima coagula fácilmente la leche. Los microorganismos vivos son atacados rara vez por las proteinazas, pero la papaína ataca ciertos parásitos intestinales (áscaris) vivos. Descompone la hipurilamida con desprendimiento de amoníaco¹⁸.

¹⁸ P Gaseosa y J. Hube, tecnología de las enzimas, Editorial acribas. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990., Pag 3.

- Carbohidrasas.- Descomponen residuos de azúcares de carbohidratos superiores¹⁸.
- Amilasa.- Se hallan en las glándulas salivales, el páncreas, hongos, bacterias y la malta, que las contienen en abundancia. Descomponen los almidones y el glucógeno en dextrinas y disocian lentamente las dextrinas en maltosa y cantidad mínima de glucosa. Destruyen la estructura en cadenas ramificada del almidón (amilopectina) y el glucógeno. Las fuentes de enzimas pueden ser de tipo vegetal, animal y microbiana. Las enzimas de tipo vegetal, se encuentran las amilases, carbohidrasas (las cuales descomponen residuos de azúcares de carbohidratos superiores)¹⁸.

La tecnología enzimática tiene múltiples aplicaciones, como fabricación de alimentos, los progresos que están realizando actualmente la ingeniería genética y la biotecnología permiten augurar el desarrollo cada vez mayor del uso de las enzimas.

1.4.- Componentes del Suelo.

El suelo está compuesto de diversas capas. A dichas capas se les llama horizontes y cada una se caracteriza por su composición abiótica y/o biótica⁴.

- Horizonte A: Aquí encontramos los minerales y la materia orgánica en distintos estados de descomposición. En esta capa se localiza el humus. El humus se define como el conjunto de residuos orgánicos, vegetales y animales que se

¹⁸ P Gaseosa y J. Hube, tecnología de las enzimas, Editorial acribas. S.A., Segunda Edición, Zaragoza España, 1990., Pag 3.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.html>

incorporan al suelo y cuya degradación es difícil de realizar por microorganismos. La importancia de éste, es que mejora la textura y estructura del suelo, aumentando así su capacidad de retener agua y reduciendo los cambios en el pH. Además sirve como reserva de materiales nutritivos en el suelo⁴.

- Horizonte B: En esta capa encontramos partículas finas y minerales.
- Horizonte C: Este se compone de materia mineral solamente.
- Horizonte D: Esta capa posee roca sólida bajo el suelo, es importante para la formación de acuíferos⁴.

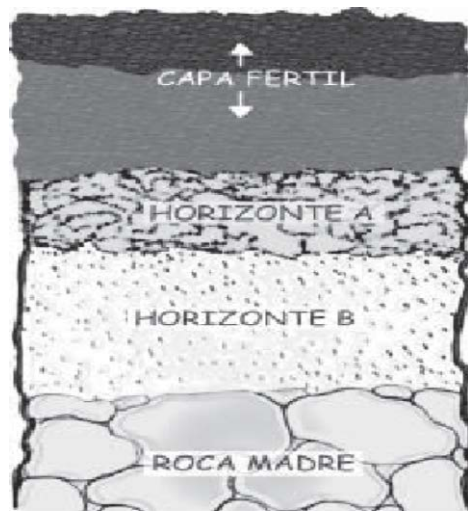


Gráfico #2: Horizontes o Capas del suelo⁴

Dentro de la fase sólida mineral se han de considerar las sustancias de carácter salino, más o menos solubles y que por tanto presentan una menor estabilidad que los silicatos, que son los constituyentes primordiales. Esta menor estabilidad y su fácil

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

intercambio con la fase líquida, que les permite, en ciertas ocasiones, incluso abandonar el suelo, nos mueve a considerarlos en un tercer apartado, separado del resto de los componentes minerales.

La fracción mineral del suelo deriva directamente del material original del mismo y está constituida por fragmentos de aquel unidos a sus productos de transformación, generados en el propio suelo. Ello hace que aparezcan partículas de diferentes tamaños, si bien solo aquellas que son inferiores a los 2 mm son las que se consideran como partículas edáficas⁴.

Al distribuir las partículas minerales del suelo por tamaños establecemos lo que se conoce como fracciones granulométricas.

Fracciones granulométricas: Conjunto de partículas edáficas cuyo diámetro, supuestas esféricas, está comprendido entre ciertos límites que les prestan unas características definidas. Su tamaño máximo es de 2 mm⁴.

Los fragmentos más gruesos se los conoce genéricamente como grava, si bien se utilizan otros términos para aquellas que superan un tamaño de unos 5 cm. A efectos analíticos, se establece un valor total para todas las partículas que superan el valor crítico de 2mm⁴.

Grava, piedra o pedregón: Partículas no edáficas. Su tamaño es superior a 2 mm con un límite superior de 15-20 cm. Están constituidas por fragmentos de roca sin

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

alterar o solo ligeramente alterados⁴. La fase sólida del suelo se presenta por su fracción granulométrica, de las siguientes formas:



Gráfico #3: Fase sólida Mineral del suelo⁴.

1.4.1.- Partículas edáficas.

Son una serie de fracciones definidas según su diámetro y que corresponden a tres tipos principales: arena, limo y arcilla. Dentro de la arena se definen diversos tipos según la clasificación seguida pero que podemos sintetizar como arena gruesa y fina. El criterio que se ha seguido es el tipo de material que predomina en ellas.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

Arena gruesa: Está constituida por fragmentos de la roca madre y, como ella, es polimineral. Su tamaño está comprendido entre 2 mm y 0.2 mm según la clasificación inicial propugnada por la Sociedad Internacional de Ciencia del Suelo (SICS). Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), se diferencian tres tamaños en ella⁴:

- **Arena muy gruesa:** Cuyo tamaño oscila entre 2 mm y 1 mm. Son fragmentos de roca sin alterar.
- **Arena gruesa:** De tamaño comprendido entre 1 mm y 0.5 mm. Usualmente presentan algún tipo de alteración superficial.
- **Arena media:** Su límite inferior está en 250 μ m (0.25 mm). Constituye un enlace entre esta fracción y la siguiente⁴.

El estudio de la arena gruesa se hace mediante el microscopio petrográfico previa inclusión en resina y obtención de una lámina delgada. Esta lámina se tiñe para poder observar sus diferentes formas.

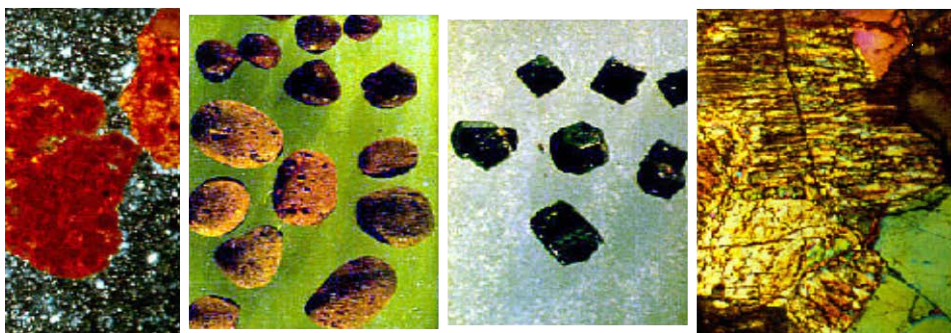


Gráfico #4: Partículas de arena vistas al microscopio petrográfico⁴.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

Arena fina: Está constituida por fragmentos de roca, generalmente, de carácter monomineral y con un nivel de alteración variable. En el caso de los minerales férricos es observable un alto grado de transformación en cuanto a su nivel de hidratación⁴. Su estudio se realiza mediante el microscopio petrográfico previa inclusión en bálsamo del Canadá, observándose el grano entero:

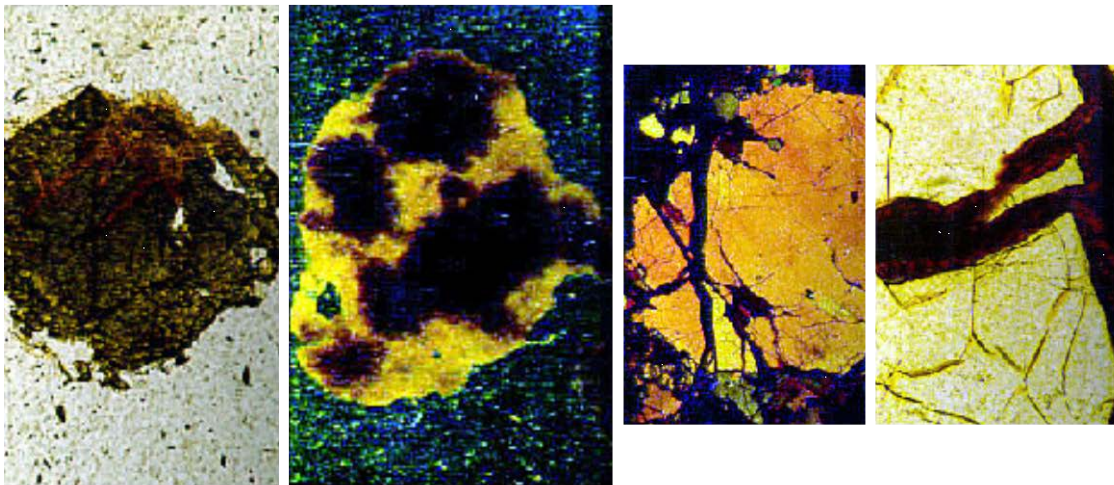


Gráfico #5: Arena fina vista al microscopio petrográfico⁴

1.4.2.- Limo.

Está constituido por materiales heredados o transformados pero no tienen carácter coloidal. El limo es una fracción donde las transformaciones son mayores y su composición mineralógica se parece a la de las arcillas. Son partículas monominerales en las que hay un alto contenido en filosilicatos de transformación o neoformación. Su

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

tamaño está comprendido entre 50 μm y 2 μm para el USDA y entre 20 μm y 2 μm para la SICS⁴.

En ocasiones, se establecen dos categorías conocidas como limo fino, que se corresponde con el tamaño establecido por la SICS y limo grueso, correspondiente a la fracción comprendida entre la anterior y el límite superior del USDA. Su estudio puede hacer mediante el microscopio petrográfico, pero, utilizando técnicas especiales como la del "contraste de fase" o del "contraste de interferencia". Lo más frecuente es utilizar la difracción de rayos X⁴.

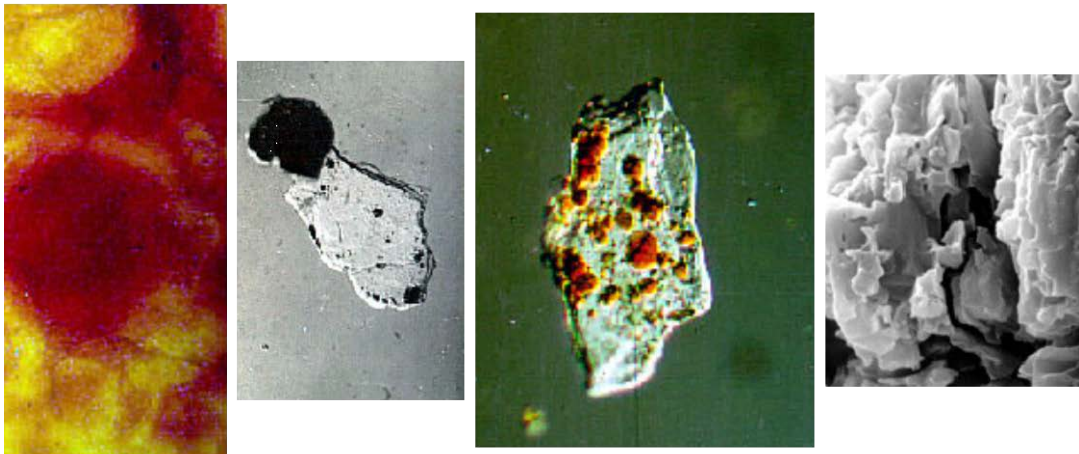


Gráfico #6:- Limo visto al microscopio Petrográfico⁴.

1.4.3.-Arcilla.

Son partículas de carácter coloidal y monomineral que se han formado en el suelo o han sufrido transformaciones, aunque en algunos casos pueden ser heredados del material original mediante una micro-división del mismo.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

El tamaño para los dos tipos de clasificación que hemos considerado es el mismo y corresponde a las partículas menores de 2 μm . En ocasiones se diferencia una arcilla fina con un tamaño inferior a 0.1 μm , muy útil para identificar procesos de movimiento de arcilla en el suelo, es el proceso que genera los horizontes conocidos como Bt⁴.

Su estudio se realiza principalmente mediante difracción de rayos X. En ocasiones puede complementar con la microscopía electrónica de transmisión o de barrido. En este caso es de especial utilidad el empleo simultáneo de análisis mediante energía dispersiva. Cualquiera que sea su tamaño, dentro de los componentes minerales del suelo podemos distinguir aquellos que proceden directamente del material original sin haber sufrido más que un proceso de división, conocidos como minerales primarios, o los que se han generado en el suelo y que constituyen lo que se conoce como complejo de alteración.

1.4.4.- Componentes orgánicos.

La materia orgánica del suelo procede de los restos de organismos caídos sobre su superficie, principalmente hojas y residuos de plantas. Este material recién incorporado es el que se conoce como "materia orgánica fresca" y su cantidad varía con el uso o vegetación que cubra al suelo.

La materia viva en el momento en que deja de serlo, comienza un proceso de descomposición o autólisis provocado por los propios sistemas enzimáticos del organismo muerto. Además sirve de alimento a numerosos individuos animales que habitan en la interfase entre el suelo y los detritus que lo cubren. En esta fauna

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

predominan artrópodos de diversas clases y gran número de larvas, sobre todo de insectos⁴.

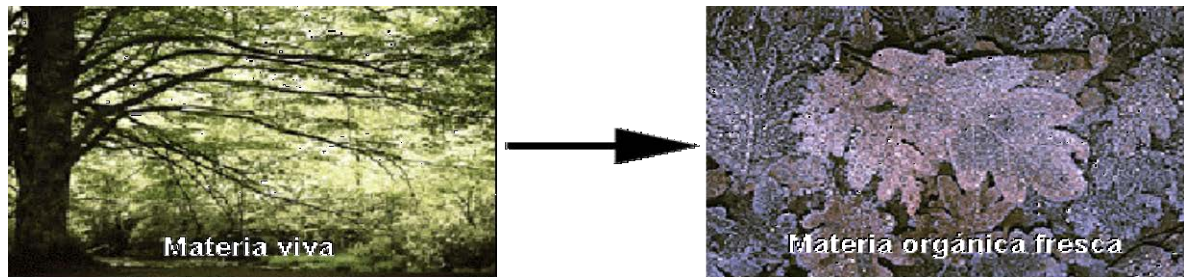


Gráfico #7: Cambio de materia I⁴.

El papel de esta fauna es doble, por una parte digieren los restos y los transforman dejando en su lugar sus excretas, en las que aparecen sustancias más sencillas mezcladas con microorganismos de su intestino y del propio suelo, que fueron ingeridos con los restos; de otra parte realizan una función de trituración que provoca un incremento notable de la superficie de los restos y que ayuda al ataque de los microorganismos de vida libre que habitan en la hojarasca o en las capas altas del suelo⁴.

Estos primeros fragmentos presentan una estructura vegetal reconocible hasta que se inicia el ataque de los hongos, que son los primeros microorganismos que se implantan sobre los restos vegetales, que luego son seguidos por los trituradores:

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>



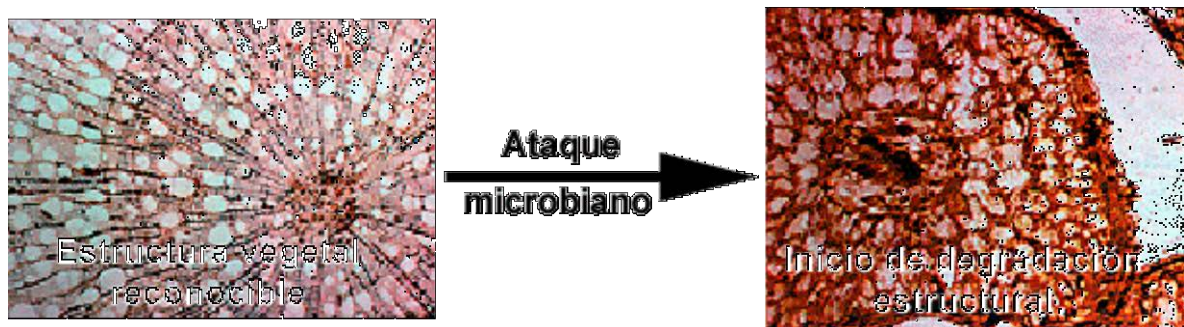
Gráfico #8: Degradador de materia orgánica⁴.

Los hongos son capaces de atacar y romper las moléculas de lignina que forman las paredes de los vasos y las de celulosa que forman parte de las membranas celulares, por el contrario, necesitan tomar el nitrógeno en forma mineral, por lo que han de hacerlo de la solución del suelo. Una vez rotas las paredes de los vasos y de las células, queda abierta la puerta a la acción bacteriana, cuyos individuos se nutren de las proteínas y de los azúcares principalmente.

Las bacterias liberan nitrógeno en forma amoniacal y, posteriormente, nítrica que permite la nutrición fúngica y el crecimiento de su población, iniciándose así una estrecha colaboración entre ambos tipos de organismos que termina favoreciendo a las plantas que habitan el suelo, al desaparecer la competencia por el nitrógeno; que hasta ese momento sufrían por parte de los hongos dependiendo de la cantidad de nitrógeno presente en la materia orgánica fresca que llega al suelo así será el posible enriquecimiento de éste en el elemento citado y la velocidad del proceso de transformación de los restos vegetales, por ello la relación C/N de los restos vegetales es

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

un factor decisivo en todo el proceso de transformación de la materia orgánica y que en su conjunto se conoce como "proceso de humificación"⁴.



*Gráfico #9: Degradación de materia orgánica*⁴.

A medida que avanza el proceso de humificación se va reduciendo el valor de la relación C/N del material resultante, dado que el carbono se consume en los procesos energéticos de los microorganismos y termina como dióxido de carbono, mientras que el nitrógeno se invierte en la producción de proteínas que llegan nuevamente al suelo al morir los microorganismos presentes en él.

Al final de esta primera etapa de descomposición, los restos vegetales van perdiendo su estructura inicial hasta acabar resultando irreconocible. Como apuntamos anteriormente, son muchos los grupos animales que intervienen en el proceso de trituración de los vegetales y todos ellos provocan una mezcla más o menos intensa con los microorganismos presentes. Algunos de ellos solo viven en la hojarasca o "mantillo", o a lo sumo en los primeros centímetros del suelo mineral; pero otros, como las lombrices, se desplazan en el suelo hasta alcanzar profundidades variables, según la

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

temperatura y, sobre todo, el estado de humedad, dado que poseen una cutícula permeable que les hace muy sensibles a la desecación.

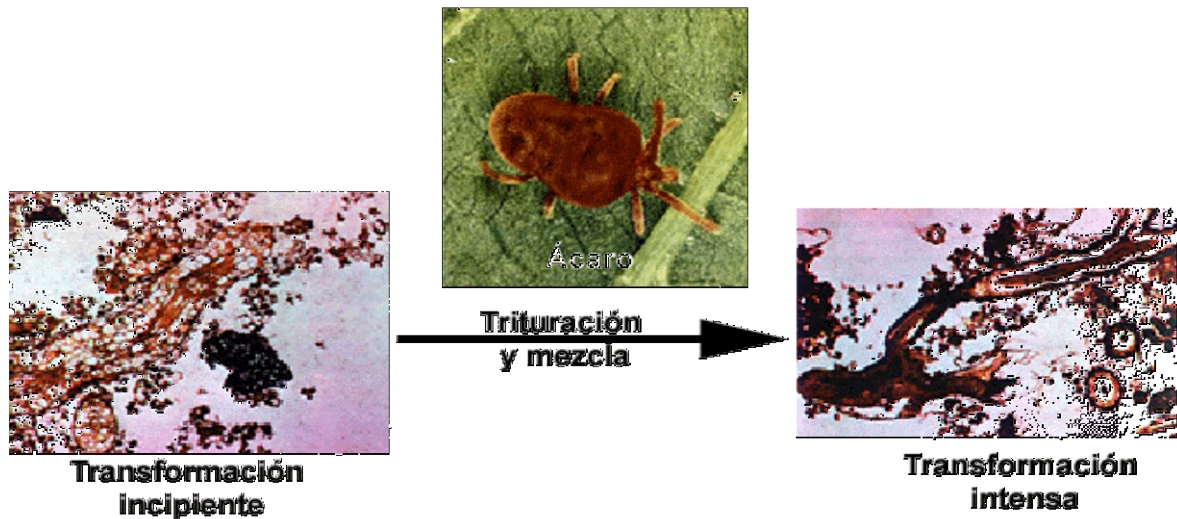


Gráfico #10: Degradador de materia orgánica II⁴.

Los pertenecientes a este segundo grupo, además del efecto triturador y mezclador de los primeros, ejercen una función de transporte de la materia orgánica, distribuyéndola en un mayor espacio y permitiendo una acción microbiana más intensa.

El horizonte A incrementa su espesor y el volumen de suelo afectado por la materia orgánica es netamente superior, lo que influye en los procesos de alteración mineral, sobre todo en los que conocemos como alteración bioquímica, que alcanza una mayor profundidad y permite que intervengan nuevos minerales procedentes del material original o de una neoformación previa⁴.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

En el caso de las lombrices se produce una modificación de la composición del suelo que ingieren con respecto al que excretan, modificando algunos parámetros que favorecen la acción microbiana y como consecuencia de ello una aceleración del proceso de humificación.

La materia orgánica no se acumula indefinidamente en el suelo sino que los procesos oxidativos, que dan lugar a las sustancias húmicas, continúan, así como la acción microbiana, que puede utilizar las sustancias húmicas formadas como sustrato nutritivo y provocar su descomposición y "mineralización", con lo que se cerraría el ciclo biogeoquímico de los elementos.



Gráfico #11: Lombrices en degradación de materia⁴.

⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>

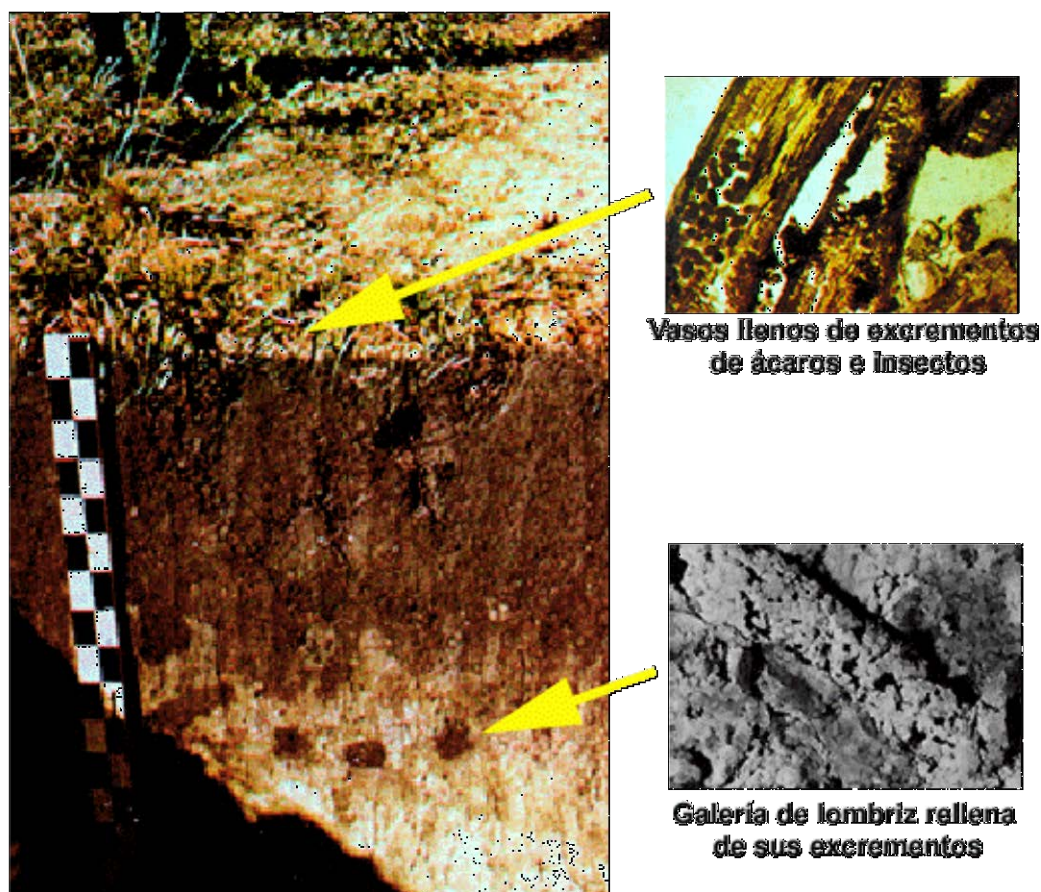


Gráfico #12: Efecto de lombrices en el suelo⁴.

1.5.- Parámetros a controlar en el proceso de biorremediación.

La aplicación de técnicas de biorremediación de suelos en escala exige un intenso monitoreo y control de variables operacionales. No todas ellas revisten la misma importancia. Sólo algunas resultan críticas para la obtención de resultados exitosos tales como: tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macro ambientales, presencia de inhibidores y biodisponibilidad⁵.

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

1.5.1.- Tipo y concentración de contaminante.

1.5.1.1- 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 facilidad⁶.

- Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan fácilmente, pero cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles para la degradación. De la misma forma, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados⁷.

- Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo. También se pueden degradar los compuestos aromáticos policlorados como los policlorobencenos cuya biodegradabilidad disminuye al aumentar el número de átomos de Cloro en la molécula⁶.

- Los compuestos nitrogenados y azufrados se degradan lentamente. Los compuestos más resistentes al ataque microbiano son las fibras sintéticas, aunque se están aislando microorganismos capaces de degradar estos compuestos⁵.

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

⁶ S. Ripp (2000) "Biorremediación de suelos".

⁷ Atlas.R; Bartha R, (Addison Wesley).(2002) Ecología microbiana y microbiología ambiental.

1.5.1.2.- 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 mueran⁸.

Se han registrado en ensayos de campo procesos biológicos a concentraciones de hasta 30 % de hidrocarburos, medidos por extracción sucesiva con solventes⁵. Por encima del 30 % se han observado casos donde la velocidad es muy baja pero no nula. En estos casos se ha utilizado la técnica de bioaumentación basada en incorporación de microorganismos adaptados a altas concentraciones. Se ha observado desarrollo de hongos a concentraciones superiores al 25 %, en donde estos crecen sobre el hidrocarburo o en las interfases suelo - hidrocarburo y en las grietas y fisuras que se encuentran en los trozos o grumos de contaminante. En este caso el ataque comienza desde la periferia al centro del aglomerado suelo-hidrocarburo, en forma similar al proceso de agotamiento de una pastilla de catalizador⁸.

Este fenómeno se acompaña por un aumento de la porosidad. En una segunda etapa el grumo se disgrega y aumenta su superficie específica con el consiguiente incremento de velocidad de reacción, que se ve acelerada cuando la concentración disminuye, ya que desaparecen los fenómenos de inhibición.

⁸ ((LaGrega et al, 1996). "Biorremediación y Bioprocesos")

1.5.2.- Antigüedad de la contaminación.

A medida que transcurre el tiempo después de un derrame se va modificando la composición del hidrocarburo por acción de los agentes ambientales. Primero se pierden los volátiles y después se produce la eliminación de parafinas, ya sea por evaporación, por actividad fotoquímica o actividad biológica; luego se eliminan otros componentes. Como resultado de ello el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar; por lo que la velocidad de reacción disminuye a medida que transcurre el tiempo⁵.

1.5.3.- 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). Cuando se trata de este último caso, el tratamiento biológico implica una compleja interacción de especies microbianas. La velocidad de crecimiento y la utilización de sustratos es generalmente superior en cultivos mixtos que en cultivos puros. En una mezcla de poblaciones los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos. Además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo y produciendo intercambio de material genético⁹.

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

⁹ (Tiedje et al, 1990, Leahy et al, 1989; Roberts, et al, 1989). "Transfers between plants and soil microorganisms".

Si bien la mayor parte de las sustancias orgánicas son degradables por vía biológica, existe una gran cantidad de compuestos que resisten la biodegradación (se los denomina recalcitrantes) o esta ocurre tan lentamente que hace ineficaz el tratamiento biológico en forma práctica. Sin embargo, se han logrado aislar microorganismos capaces de degradar compuestos considerados recalcitrantes, o de modificarlos químicamente de forma que permitan la acción degradadora de otros microorganismos⁸.

Para el caso del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 10³ a 10⁴ UFC/g de suelo (UFC: unidades formadoras de colonias) y de microorganismos heterótrofos totales de 10⁵ a 10⁶ UFC/g de suelo⁵. En ese caso no se necesita inocular organismos, pero en el caso de no tener los organismos suficientes se deberán inocular o estimular la población con la aplicación de nutrientes. (NPK; Nitrógeno, Fósforo, Potasio).

Los principales factores que afectan el desarrollo de microorganismos son el agua, la presencia suficiente de oxígeno en la atmósfera del suelo y la riqueza de nutrientes. Se suele admitir que entre un tercio y un medio de la materia orgánica del suelo proviene o forma parte de los microorganismos, el resto proviene de residuos no degradados de vegetales y animales.

1.5.3.1.- Inoculación.-

Es la práctica que implica aplicar microorganismos en los sistemas para producir transformaciones deseables como fijación de nutrientes, degradación más rápida o una

⁸ ((LaGrega et al, 1996). "Biorremediación y Bioprocesos")

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

mayor resistencia a enfermedades¹⁰. Este proceso incorpora microorganismos al suelo para realizar una función específica, como es la degradación de contaminantes. Los microorganismos pueden ser comerciales o preparados para un fin específico. La inoculación se usa cuando los microorganismos del suelo no pueden degradar el contaminante presente, o cuando se producen inhibición por presencia de sales o metales pesados o cuando no alcanzan la masa crítica necesaria. Como desventaja, los microorganismos inoculados pueden desplazar a los existentes en el suelo por competición y lograr poco efecto degradativo (detener el proceso) o bien pueden no adaptarse a las condiciones ambientales del lugar. También puede ocurrir que no puedan competir con los microorganismos locales y el efecto es nulo⁵.

1.5.4.- Nutrientes.

Los nutrientes son elementos necesarios para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de Carbono, Fósforo, Nitrógeno, Potasio y oligoelementos o elementos minoritarios (micro-nutrientes).

1.5.4.1.- Carbono.

La mayor parte del carbono orgánico en el suelo procede de las plantas. Este carbono representa los residuos de las plantas en la superficie del suelo y el carbono orgánico procedente de la descomposición de las raíces del suelo. El carbono vegetal puede clasificarse, en términos generales de la siguiente manera¹¹:

¹⁰ Sayler, G.S (1999). "Current opinion in biotechnology 11:286-289.

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

¹¹ FITZPATRICK, E.A. (1985) "Suelos. Su formación, clasificación y distribución". Ed. Trillas. Mexico

1. Carbohidratos (30% a 75% de peso en seco)
 - Celulosa (15% a 60%)
 - Hemicelulosa (10% a 30%)
 - Azúcares y almidones (1% a 5%)
2. Lignina (10% a 30% de peso en seco)
3. Compuestos con contenido de nitrógeno (1% a 15% de peso en seco)
 - Proteínas y aminoácidos
4. Ceras y pigmentos(1%)
5. Pectina (1%)
6. Otros (5% a 20% de peso en seco)
 - Grasas, Aceites, Ácidos orgánicos, Hidrocarburos.

Los valores varían, ya que, a medida que las plantas envejecen, el contenido de celulosa, hemicelulosa, y lignina aumentan, mientras que los azúcares, aminoácidos, proteínas, grasas y aceites simples disminuyen¹⁰.

La fuente de carbono principal en el caso de la biorremediación de suelos es el contaminante (Crudo), y proporciona el carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO₂, agua, enzimas) y microorganismos (debido a la reproducción de los mismos).

¹⁰ Sayler, G.S (1999). "Current opinion in biotechnology 11:286-289.

1.5.4.2 - Nitrógeno.

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. Dado que el nitrógeno es un componente principal de las proteínas, los ácidos nucleicos, las coenzimas, y muchos otros componentes celulares, la capacidad de la célula para asimilar el nitrógeno inorgánico es muy importante. Aunque el gas nitrógeno abunda en la atmósfera pocos microorganismos pueden reducir este gas y utilizarlo como fuente de nitrógeno; la mayoría de organismos tienen que incorporar en forma de Amoníaco o Nitratos¹⁰.

1.5.4.3 - Fósforo.

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.

¹⁰ Sayler, G.S (1999). "Current opinion in biotechnology 11:286-289.

El fósforo está presente en ácidos Nucleicos, proteínas, Fosfolípidos, ATP y coenzimas como el NADP. Las fuentes de fósforo más frecuentes son los ésteres de fosfato inorgánico y orgánico. El Fosfato inorgánico se incorpora mediante la formación de ATP por una de tres formas posibles: 1) Fotofosforilación, 2) Fosforilación oxidativa, y 3) Fosforilación a nivel de sustrato⁵.

Los microorganismos pueden obtener fosfatos orgánicos de su entorno en forma disuelta o particulada. Con mucha frecuencia, las fosfatasas hidrolizan ésteres de fosfato orgánico para liberar fosfato inorgánico. Las Bacterias gramnegativas tienen fosfatasas en el espacio periplásmico, situado entre la pared celular y la membrana plasmática, que permiten la captación del fosfato inmediatamente después de ser liberado. Por otro lado los protozoos pueden utilizar fosfatos orgánicos directamente después de ingerirlos o hidrolizarlos en lisosomas e incorporar el fosfato¹⁰.

1.5.4.4 - Potasio.

También es necesario disponer de potasio en concentraciones bajas. Normalmente los suelos poseen potasio en cantidades suficientes.

1.5.4.5 - Oligoelementos.

La fuente de oligoelementos constituye un conjunto variado de elementos como hierro, cobre, zinc, azufre, cobalto, manganeso, magnesio, calcio y otros compuestos

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

¹⁰ Sayler, G.S (1999). "Current opinion in biotechnology 11:286-289.

que dependen del tipo de microorganismo y del proceso que se realiza. Las concentraciones de los mismos son muy pequeñas (menos de 1 ppm en total)¹⁰.

Normalmente no se incorporan en los procesos de campo ya que el suelo provee estos elementos en cantidades suficientes aunque en algunos casos se han debido incorporar algunos gramos por hectárea para tratar algún contaminante muy específico y el suelo no poseía ese elemento.

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 a 100:2:0,2 según la técnica con que se mida 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 considerado⁵.

1.5.5.- Aireación

La presencia de oxígeno es importante para la degradación de hidrocarburos, ya que este proceso demanda de la presencia de organismos aeróbicos. En esta parte de la biorremediación es importante considerar el potencial redox de un suelo, que no es mas que la capacidad reductora u oxidativa del mismo. Esta característica guarda relación con la aireación (velocidad de difusión del O₂) y el pH, que también determinan la actividad microbiana. El agua influye en estos procesos al modificar la distribución de la atmósfera del suelo, y por ello la difusión del O₂⁵.

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

El potencial redox afecta a aquellos elementos que pueden existir en más de un estado de oxidación (por ejemplo C, N, S, Fe, Mn y Cu). Característica que debe considerarse antes de aplicar abonos u otras sustancias, ya que puede ocurrir que la forma a la que reviertan tras una oxidación o reducción no tenga la incidencia esperada⁵.

Por las consideraciones anteriores se debe identificar claramente el proceso que se quiere desarrollar, sea este aerobio o anaerobio. En el caso de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos puede ser necesaria una etapa anaerobia para realizar el proceso de degradación. En caso de otros tipos de contaminantes la forma más adecuada de degradarlos es la anaeróbica (caso de los PCB) seguida de una etapa aeróbica para degradar los productos parcialmente tratados en la etapa anterior⁵.

Cabe recalcar que en todos los procesos anaeróbicos la velocidad de degradación es más lenta que en el aeróbico. En los procesos de campo, la aireación se produce por remoción del suelo con herramientas agrícolas. Estos tratamientos responden de diferente manera de acuerdo a la frecuencia de remoción.

1.5.6.- pH.

El pH del suelo es un parámetro muy importante para el desarrollo de los microorganismos, encontrándose suelos en rangos de entre 5,5 y 8,5, siendo el pH óptimo para la mayoría de cultivos entre 6 y 7,5¹². Cuando el pH excede 8,5 o si es menor de 5,5 se debe disminuir o aumentar el mismo mediante adición de un buffer

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

¹² (www.soil-resource/kinds/ph.html).

(azufre, carbonato de calcio o hidróxido de calcio) al suelo. Cabe anotar que existen dos factores naturales que influyen en la acidez de los suelos y son:

❖ **Naturaleza de la roca madre.**

❖ **Clima de la región.-** Una pluviosidad abundante propicia suelos ácidos. La vegetación también influye en la acidez del suelo, aunque su efecto está condicionado por los factores mencionados, ya que determinan el tipo de flora presente. El equilibrio H^+/Ca^{++} es determinante para el pH del suelo, si se dan pérdidas de calcio generalmente habrá una acidificación. Estas pérdidas ocurren debido al arrastre por el agua y por las extracciones de las cosechas¹².

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. En estos casos es conveniente evaluar la posibilidad de trabajar a pH distintos de los óptimos para evitar efectos tóxicos. Se han registrado procesos de biodegradación de hidrocarburos a pH superior a 8⁵.

1.5.7.- Humedad.

La humedad es importante para el desarrollo de los microorganismos pues actúan como medios de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad aproximada del 70 %, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación, que depende de cada tipo de suelo. Un exceso de

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

¹² (www.soil-resource/kinds/ph.html).

humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide el desarrollo de los microorganismos¹³.

1.5.8.- Temperatura.

La temperatura influye en la velocidad de degradación, dependiendo del tipo de microorganismo disponible. Las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 ° C y 40 ° C. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando supera los 40 ° C se produce una disminución de la actividad microbiana, o bien se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas, como ocurre en los procesos de compostaje en donde se alcanzan temperaturas mayores a 45° C, (los microorganismos que trabajan a estas temperaturas se denominan termófilos). Durante el cambio de poblaciones se produce una disminución de la actividad microbiana. Se han registrado procesos de campo en donde la temperatura del suelo contaminado alcanzó 70 ° C, y se mantuvo la actividad degradadora⁵.

En el caso de bajas temperaturas del suelo (por debajo de 15 °C) se ha registrado actividad biológica (estos microorganismos se llaman criófilos). Las velocidades de degradación disminuyen pero no se detienen⁵.

¹³ (Morris Levin, Michael A. Gealt 1997) "Parametros ambientales"

⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>

1.5.9.- Presencia de metales y sales.

Los metales y sales en altas concentraciones intoxican a los microorganismos o actúan como biocidas. Entre estos se incluyen metales pesados, sodio en alta concentración, sales inorgánicas (NaCl, sulfatos, carbonatos, etc).

En general la presencia de sales y metales disminuye la velocidad de degradación en forma importante a menos que se disponga de microorganismos tolerantes en el lugar de tratamiento. En el caso de los metales se puede aumentar el pH del suelo 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. Se ha podido trabajar con altas concentraciones de metales tóxicos y con alta salinidad en distintas condiciones de trabajo, las velocidades de degradación han sido aceptables, ya que se trabajó con pH neutro o alcalino y se evitó la influencia de los metales tóxicos (disminuyó su disponibilidad). Los microorganismos no degradan contaminantes inorgánicos, sólo pueden alterar su forma química (por ejemplo los sulfuros insolubles transformarlos a sulfatos más solubles; o a la inversa) de manera que sean inmovilizados o eliminados del lugar mediante lixiviación de los compuestos solubles por el agua de lluvia o volatilización.

Algunos microorganismos fijan sobre su estructura celular metales en forma activa (metabólica) o pasiva (absorción y adsorción) reteniéndolos e impidiendo que migren. Esta característica es importante para los procesos de tratamiento biológico de aguas contaminadas con metales tóxicos.

1.6.- Biorremediación.

“La biorremediación es el proceso natural en el cual las bacterias convierten metabólicamente las sustancias orgánicas en agua y dióxido de carbono”. La biorremediación es definida por la Academia Americana Microbiología como “El uso de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos ambientales como resultado de la acumulación de desechos peligrosos”. Esta tecnología esta basada en el uso natural microorganismos naturalmente o manipulados a través de ingeniería genética para restaurar sitios contaminados y proteger el ambiente, debido a que las bacterias naturales no siempre son suficientes o adecuadas, la mayoría de los proyectos de biorremediación se benefician con el agregado de los productos como las enzimas¹⁴.

Utilizando métodos específicos, los investigadores separan diferentes cepas de bacterias que trabajan juntas en la degradación de contaminantes específicos. Debido a que las condiciones del lugar y los tipos de contaminación varían ampliamente, los productos agregados incluyen solamente microorganismos capaces de sobrevivir y prosperar en situaciones ambientalmente difíciles. Para la aplicación de este método el suelo contaminado es removido y aireado. Inmediatamente se adhieren nutrientes para estimular las bacterias naturales del suelo, algunas veces se colocan los dos: nutrientes y bacterias. Los contaminantes que pueden ser degradados por las bacterias con relativa facilidad son:

- Productos de petróleo: Gasolina, diesel, combustibles, benceno, tolueno, xileno, naftaleno.
- Compuestos aromáticos: benzo(a)pyrina, aceites.

¹⁴ www.porquebiotecnologia.com.ar

- Pesticidas: malatión:
- Compuestos de carbón: fenoles y cianhidricos, en carbón de hulla y desechos de coque.
- Solventes industriales: acetona
- Otros: éteres, alcoholes simples tales como metanoles, y otros contaminantes en agua subterránea, incluyendo metil etil cetona,, etilen glicol, un ingrediente en anticongelantes.
- Contaminantes parcialmente degradables.

Estos son elementos difíciles de degradar, o desechos combinados, algunos son tóxicos antes de la mezcla:

- Tricloro etileno:
- Percloroetileno
- Bifenilos policlorados

Metales pesados: no son biodegradables, pero las bacterias los concentran en ellas:

- Uranio
- Arsénico
- Cromo
- Plomo
- Cadmio
- Mercurio.
- Selenio

La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y este grado de alteración determina si se ha producido biodegradación o no. La biodegradación es la descomposición de un componente orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico produciendo dióxido de carbono, agua, y compuestos menos tóxicos asimilables por el ambiente. Los procesos biológicos se aplican frecuentemente al tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Se pueden aplicar técnicas in-situ (en el lugar donde se encuentra el suelo contaminado) o ex-situ (cuando el suelo se traslada a una instalación para su tratamiento)¹⁴.

El tratamiento ex-situ de suelos, sedimentos y otros sólidos contaminados con hidrocarburos se puede realizar en un variado número de procesos en fase sólida y en fase lodo. Los procesos en fase sólida son aquellos en donde el suelo se trata con un contenido de agua mínima. En el caso de los procesos en fase lodo se suspende el suelo en agua⁸.

Una ventaja de los procesos en fase sólida es que las bajas velocidades de transferencia de materia permiten trabajar a niveles de contaminación que serían tóxicos para los microorganismos si se realizaran en fase líquida. Por otro lado los sistemas sólidos son capaces de sustentar el crecimiento de microorganismos que no desarrollan bien en fase líquida (hongos) y producen complejos enzimáticos capaces de oxidar compuestos complejos¹⁵.

¹⁴ www.porquebiotecnologia.com.ar

⁸ (LaGrega et al, 1996). "Biorremediación y Bioprocesos"

¹⁵ (Cookson, 1995) "Biotecnología".

1.7.- Fuentes de Contaminación por Hidrocarburos en Suelos.

Cuando la producción de residuos supera la velocidad de eliminación por la naturaleza surge la contaminación; la que se agudiza en nuestro medio por la explotación petrolera. Sabemos que en el momento de producirse un derrame la extensión de la contaminación varía, y la cantidad de crudo derramado sobre una zona específica no es mínima, el crudo llega a penetrar varios centímetros en el suelo y la capacidad del suelo y la vegetación para asimilarlo es muy reducida, lo que produce la muerte de la vegetación y la consecuente esterilización del suelo.

Pero no solo un derrame es una fuente de contaminación por hidrocarburos, también existen otras fuentes de contaminación, como lo son: mal funcionamiento de equipos, goteos, fugas en tuberías y bombas, manejo de combustibles en estaciones de servicios, mecánicas, etc.

Todas la anteriores relacionadas al manejo de combustibles, sin embargo, prestaremos mas importancia a los derrames, que representan un impacto de mayor magnitud sobre los ecosistemas.

1.8.- Impactos producidos por la contaminación de suelos por hidrocarburos.

El Ecuador es un país dotado de diversidad de recursos, mucho más que otros países en el mundo. Para la conservación de estos recursos es necesario el establecimiento y aplicación de políticas sustentables. Uno de los recursos de mucha importancia es el suelo, que para el desarrollo de especies vegetales debe cumplir con

condiciones tanto físico-químicas como biológicas. Muchas de estas condiciones son alterables fácilmente por actividades naturales o antropogénicas.

Para este caso en particular, la contaminación de suelos producidos por la presencia de hidrocarburos van a alterar las condiciones físico-químicas y biológicas del suelo, dando características de incremento o disminución de organismo vivos en el suelo, aumentando o disminuyendo la cantidad de elementos tales como minerales, nutrientes, metales y otro tipo de complejos presentes en el suelo.

Para determinar de los principales Impactos Ambientales que se generan en un derrame de hidrocarburos, se debe realizar un diagnostico ambiental, contrastando la situación en la que las condiciones ambientales permanecen inalterables y los efectos que se han producido sobre esas condiciones ambientales, después del evento.

Los aspectos de singular importancia que se deben identificar para el diagnóstico ambiental son aquellos que afecten directa o indirectamente a los ecosistemas de la siguiente manera¹⁶:

- ✓ Alteración física y química de los hábitats naturales (las especies más resistentes toman los espacios dejados por otras especies desaparecidas).
- ✓ Efectos físicos en la flora y fauna, que pueden llegar a ser letales.
- ✓ La fauna puede verse afectada por varios factores: la persistencia de una mancha de crudo limita el paso de la luz y por tanto reduce la actividad fotosintética de

¹⁶ http://www.cetmar.org/documentacion/mareas_negras.htm#efectos

muchas plantas, si la mancha las cubre dificulta también su función reproductora y la fijación.

- ✓ Cambios de mayor o menor importancia, según el vertido, en las comunidades y organismos del área afectada.
- ✓ Cambios en los hábitos de poblaciones migratorias (aves o peces).
- ✓ Contaminación en especies de la cadena alimenticia humana, mamíferos, peces, moluscos. (Aunque sobrevivan pueden estar contaminados y por tanto ser perjudicial su consumo).
- ✓ Pérdida de zonas de caza y pesca.
- ✓ La transparencia que queda al limpiar las áreas marinas contaminadas se debe a la inexistencia de fauna y fitoplancton.
- ✓ Pérdida de parajes con valor natural, recreativo o vacacional.
- ✓ Mala imagen para los sectores dependientes del turismo.
- ✓ Suspensión temporal de las actividades industriales o de ocio.
- ✓ Problemas para la transportación, aislando a comunidades.

Identificados estos aspectos se tomaran las decisiones necesarias sobre el procedimiento de recuperación y mitigación de los posibles efectos.

1.9.- Sistemas de gestión en caso de derrames en suelos.

Precisamente por el impacto ambiental y económico que tienen y pueden acarrear los accidentes de derrames de hidrocarburos, no solo en suelo, sino también en aguas, es que la "Environmental Protection Agency" EPA, de los Estado Unidos, exige

en su país que se establezcan planes de emergencia ante la eventualidad de derrames de petróleo¹⁶.

En nuestro país, poco a poco se han venido implementando nuevos conceptos y tendencias orientadas a la prevención de eventos perjudiciales para el ambiente y la salud en el tema petrolero, todo esto con el propósito de establecer un patrón de actos coordinados entre organizaciones estatales, privadas y comunitarias que ofrezcan dirección, logística, y resultados positivos ante desastres de esta naturaleza.

El impacto y consecuencia de cada derrame nos permite evaluar las normativas, recursos, y niveles de efectividad de los programas.

Desde este punto de vista, lo que a todas luces puede constituir un desastre para el ambiente, ofrece la oportunidad de tomar lecciones que ayuden a mejorar y fortalecer el nivel de preparación ante la eventualidad de derrames mayores.

Las operaciones de limpieza de crudos en el suelo, así como el despliegue humano y los laboriosos y costosos trabajos para recuperar una zona que haya sido afectada, se describen no solo dentro del marco ecológico, sino también, económico, y social.

En ciertos casos, se puede recuperar hidrocarburos a partir del suelo contaminado. Esto por lo general requiere el lavado del material contaminado con un solvente adecuado para liberar los hidrocarburos. Se suele emplear el lavado con agua utilizando mangueras a baja presión en un foso temporal de almacenamiento, para

¹⁶ http://www.cetmar.org/documentacion/mareas_negras.htm#efectos

aflojar y desprender el hidrocarburo de los desechos contaminados. La mezcla de agua/hidrocarburo resultante puede entonces ser bombeada y separada por gravedad.

Este método está fuertemente orientado a la recuperación de los hidrocarburos, mas no a la regeneración de las zonas afectadas, pues la técnica en si utilizada es poco amigable al ambiente, es lento y está limitado al tratamiento de pequeñas áreas.

Con frecuencia, luego de un derrame las labores más inmediatas se enfocan generalmente a la contención del hidrocarburo, para evitar principalmente que se contamine otro recurso. Esto siempre y cuando las condiciones atmosféricas y características del evento lo permitan. Evitándose así, que el crudo alcance fuentes de agua superficial, subterráneas y zonas de especial interés. Por otra parte, para las zonas biológicamente productivas e importantes por su riqueza natural, las consideraciones de operación se pueden ver limitadas a la aplicación de un método que probablemente cause el menor impacto adicional.

Generalmente, para la limpieza de las zonas contaminadas es necesario la utilización de palas mecánicas y cuadrillas de personas, éstas últimas son la única posibilidad en aquellas zonas arenosas, y sensibles en las que el acceso de vehículos implicarían un problema mayor.

1.10.- Legislación Ambiental Vigente respecto a Contaminación de Suelos.

De acuerdo al Decreto Ejecutivo 1215 emitido el 13 de febrero del 2001, en la presidencia del señor Dr. Gustavo Noboa Bejarano se decreta, expedir el siguiente reglamento ambiental para las operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador.

En el capítulo XIV correspondiente a límites máximos permisibles para identificación y remediación de suelos se describe que: “Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado dependen del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el respectivo Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental. De presentar los suelos naturales (no contaminados) del área concentraciones superiores a los límites establecidos, se pueden incrementar los valores del respectivo parámetro hasta este nivel, siempre que se haya comprobado este fenómeno estadísticamente a través de un monitoreo de suelos no perturbados ni influenciados en el mismo área.

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. Dependiendo de la tecnología de remediación aplicada, la frecuencia del monitoreo será mayor, conforme al Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental¹⁷.

“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”.

¹⁷ http://www.petroecuador-ninth-round.com/envirorule1_esp.html#ch3

Parámetro	Expresado en	Unidad ¹⁾	Uso Agrícola ²⁾	Uso industrial ³⁾	Ecosistemas Sensibles ⁴⁾
Hidrocarburos totales	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos(HAPs)	C	mg/Kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/Kg	<2	<10	<1
Niquel	Ni	mg/Kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/Kg	<100	<500	<80

Tabla #9.1.- Límites máximos permisibles de contaminación de suelos¹⁷.

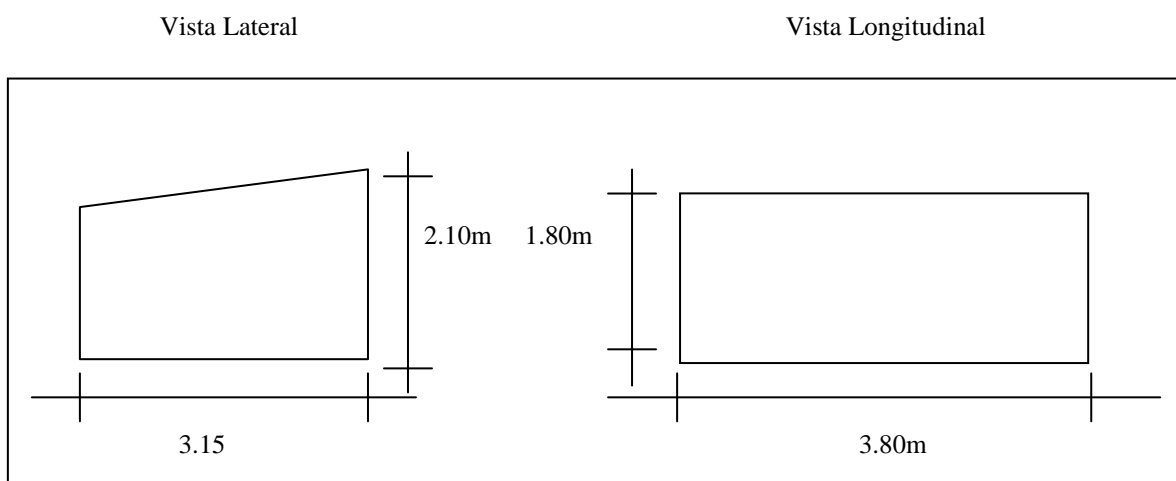
- 1) Expresado en base de sustancia seca (gravimétrico; 105°C, 24 horas).
- 2) Valores límites permisibles enfocados en la protección de suelos y cultivos.
- 3) Valores límites permisibles para sitios de uso industrial (construcciones, etc.).
- 4) Valores límites permisibles para la protección de ecosistemas sensibles tales como patrimonio Nacional de Áreas Naturales y otros identificados en el correspondiente Estudio Ambiental.

CAPÍTULO II

2.1.-Parte Experimental:

2.1.1.- Diseño y construcción de los Biorreactores.

Para la construcción de los reactores, y para proveer de las mejores condiciones ambientales al tratamiento, se construyó un invernadero de las siguientes dimensiones:



¹⁷ http://www.petroecuador-ninth-round.com/envirorule1_esp.html#ch3

Gráfico #13: Vista lateral y longitudinal del invernadero.

2.1.1.1.- Materiales.

- Madera.
- Plástico (Negro y transparente).
- Clavos
- Alambre
- Balanza
- Termómetros
- Palas
- Manguera

Se construyó 4 reactores de 40cm*120cm*23cm, para una capacidad de 110400cm³.

Cabe recalcar que la altura de tierra no sobrepasó los 10cm de altura.

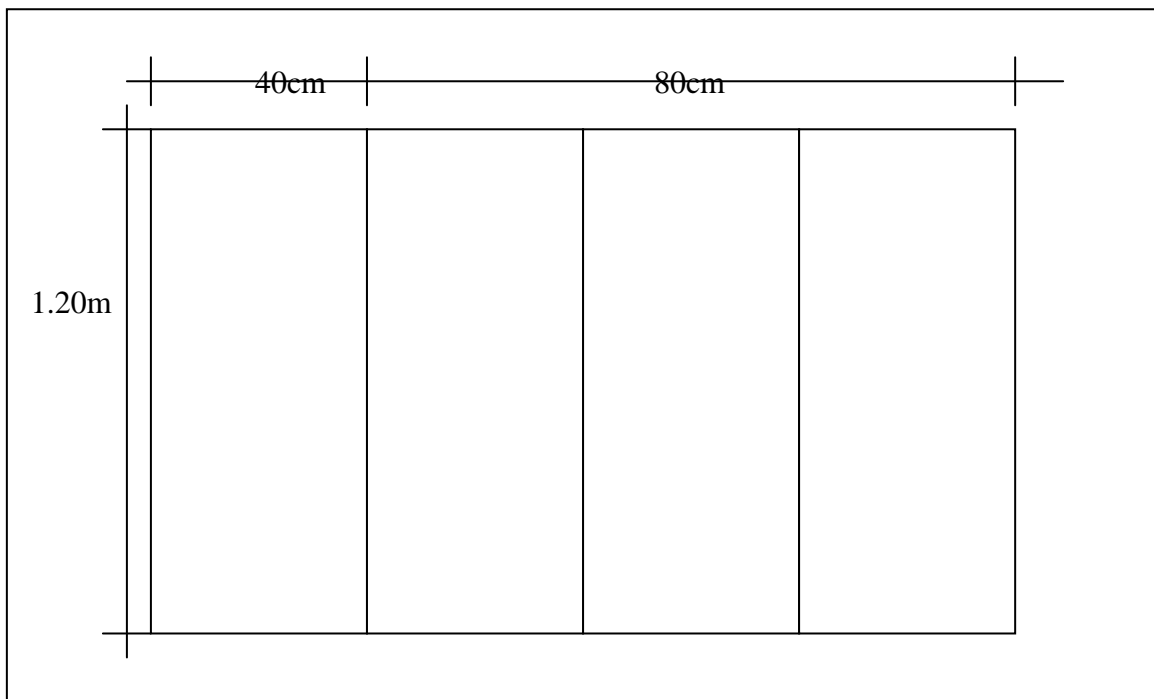


Gráfico #14: “Diseño de reactores” El material usado para las paredes fue plástico de color negro (Mayor retención de calor). La parte superior (Cubierta) constituida de plástico transparente que permite el paso de la luz.

2.2.- Descripción del Proceso de Remediación Realizado.

El proceso de biorremediación realizado consistió en:

1. Determinar el tipo de suelo a utilizar en el proceso.
2. Realizar un seguimiento microbiológico, que nos de una orientación respecto a la concentración a probar, utilizando dos rangos de concentración 1% (peso), y al 25% (peso), estos porcentajes son considerados por aspectos económicos básicamente.
3. De los resultados anteriores, analizamos la tendencia de crecimiento y probamos con tres valores: 0,25%; 0,5%; 1%; en peso de la enzima.
4. Caracterizar inicialmente al suelo en los siguientes aspectos:
 - Nutrientes Nitrógeno, Fósforo, Potasio.
 - Textura, pH, Humedad.
 - Metales Pesados
 - Microorganismos
5. Una vez caracterizados los suelos, se procedió a la colocación de hidrocarburo en 4 reactores al 5% en peso en cada uno, valor determinado como el doble del límite máximo permisible para contaminación de suelos.

6. Luego colocamos una dosis del cóctel enzimático en cada reactor, al 0.25%, 0.50%, 1%, en peso, manteniendo un reactor testigo o blanco (sin enzima). Estos valores de concentración, considerados como resultado del seguimiento microbiológico inicial (punto 3).
7. En un lapso de 4 meses se procedió con el análisis mensual de los siguientes parámetros:
 - Nutrientes (N,P,K).
 - Microbiológico
 - Temperatura y Humedad
 - TPHs
 - Metales Pesados (Níquel, Cadmio, Plomo).

Cabe recalcar que los parámetros de TPHs, y Metales pesados son los requeridos por el reglamento 1215 de operaciones hidrocarburíferas, para remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. (Ver tabla 9.1).

8. Posteriormente se discutieron y analizaron los resultados obtenidos.

2.3.- Caracterización del suelo contaminado con crudo.

La mayoría de las operaciones hidrocarburíferas del Ecuador están desarrolladas en la zona oriental, dándose aquí los mayores índices de contaminación al suelo producto de derrames. Por esto, la necesidad de buscar soluciones a la remediación de suelos con las características del suelo oriental. Los análisis de caracterización del suelo oriental, utilizado para la investigación, se realizaron en el INIAP y son los siguientes:

REPORTE FISICO - QUIMICO		
Fecha: 18/02/04		
NITROGENO	ppm	54
FOSFORO	ppm	7
AZUFRE	ppm	14
POTASIO	meq/100ml	0,26
CALCIO	meq/100ml	5,3
MAGNECIO	meq/100ml	0,89
ZINC	ppm	13,5
COBRE	ppm	13,5
HIERRO	ppm	794
MANGANESO	ppm	5,6
BARIO	ppm	0,6
pH	-----	6
CLASE TEXTURAL	-----	Franco
TIPO (arenoso)	%	47
TIPO (limo)	%	42
TIPO (arcilla)	%	11

Tabla 10.3: Suelo inicial sin hidrocarburo. (Anexo #2.1 No: 10.537)

2.4.- Descripción del coctel enzimático utilizado.

De acuerdo al fabricante, el coctel es un sistema de enzimas y bacterias formulado para controlar y limpiar las impurezas y contaminantes, que generan el transporte y utilización del petróleo y sus derivados, que ayudan a alcanzar las normativas EPA.

Este coctel posee los siguientes ingredientes:

- Glycine (enzima Orgánica)
- Quzyme(enzima Orgánica)
- Ácido Humico
- Sarsapogenin(Sistema de bacterias Orgánicas)
- Zymogen(enzima Orgánica)
- Zyme-Leaven(Enzima orgánica)
- Laminarin(Hormonas bacteriales)
- Spirostant(Humectante Orgánico)
- $C_{27}H_{44}O_3$
- Proenzyme(Penetrador Orgánico)

Hay que recalcar que la información referida a la concentración de utilización del producto es desconocida, el nombre y las concentraciones de los componentes que conforman el producto son propiedad intelectual del fabricante.

CAPÍTULO III

3.1.- Resultados.

Los resultados que a continuación se presentan corresponden a las mediciones hechas desde el inicio del proceso.

3.1.1.- Temperaturas.- Las temperaturas a continuación registradas fueron monitoreadas en cada reactor, tomando en cuenta las posibles horas a las que se podría obtenerse valores límites, es decir la temperatura mínima corresponde la madrugada, y las máximas consideradas al que se registran en el medio día.

REGISTRO DE TEMPERATURAS EN LOS DIFERENTES REACTORES												
	Reactor BLANCO			Reactor 0.25%			Reactor 0.5%			Reactor 1%		
	Minima	Maxima	Promedio	Minima	Maxima	Promedio	Minima	Maxima	Promedio	Minima	Maxima	Promedio
23/05/2004	15	32	23,5	16	28	22	14	33	23,5	15	30	22,5
27/05/2004	13	29	21	11	27	19	11	29	20	10	28	19
31/05/2004	14	35	24,5	14	29	21,5	14	37	25,5	15	35	25
07/06/2004	17	32	24,5	17	32	24,5	16	34	25	16	32	24
14/06/2004	14	29	21,5	14	33	23,5	12	29	20,5	12	27	19,5
11/07/2004	14	35	24,5	17	37	27	13	37	25	14	35	24,5
19/07/2004	15	37	26	15	37	26	14	39	26,5	14	38	26
28/07/2004	12	39	25,5	12	34	23	13	39	26	13	36	24,5
06/08/2004	15	39	27	15	38	26,5	15	37	26	15	40	27,5
09/08/2004	17	38	27,5	17	36	26,5	17	38	27,5	17	38	27,5
14/08/2004	17	35	26	18	35	26,5	18	35	26,5	16	35	25,5

Tabla # 3.1.1.- Lectura de Temperaturas Promedio por reactor.

3.1.2.- Humedad.- Los valores de humedad registrados corresponden a la diferencia de porcentaje en peso del suelo, antes y después de ser secado al ambiente.

FECHA	% DE HUMEDAD			
	BLANCO	0,25	0,5	1
23/05/2004	65	65	60	68
18/06/2004	56	60	55	65
02/07/2004	62	60	65	60
16/07/2004	68	58	67	63
02/08/2004	63	55	56	68
07/08/2004	60	60	61	62
14/08/2004	62	62	59	63

Tabla # 3.1.2.- Porcentaje de Humedad en cada reactor.

3.1.3.- Microbiológico.- Los resultados a continuación presentados corresponden a recuentos de bacterias mesófilas aerobias. En la tabla #11.3.1 se detallan los resultados del seguimiento inicial. En la tabla #11.3.2 se detallan los resultados del seguimiento posterior con varias concentraciones.

Seguimiento Microbiológico Inicial				
Unidades	Suelo	Suelo + crudo	Suelo + crudo+enzima (168 h)	Dosis Aplicada
ufc/g	63×10^4	13×10^5	31×10^7	1%(p)
ufc/g	63×10^4	13×10^5	43×10^7	25%(p)
ufc/g	63×10^4	13×10^5	12×10^6	Blanco

Tabla #3.1.3.1.- Conteos de organismos mesófilos aerobios (Ver Anexo #2.3 Inf No. 063).

Fecha	Conteo (ufc/gr)				
	Blanco	0.25	0.5	1	25
08/03/2004	$38 \cdot 10^3$	-----	-----	-----	-----
21/05/2004	$43 \cdot 10^6$	$18 \cdot 10^7$	$50 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^8$	$29 \cdot 10^7$
28/06/2004	$10 \cdot 10^7$	$29 \cdot 10^7$	$35 \cdot 10^7$	$27 \cdot 10^7$	-----
06/07/2004	$94 \cdot 10^6$	$15 \cdot 10^7$	$16 \cdot 10^7$	$68 \cdot 10^6$	$22 \cdot 10^6$
19/07/2004	$85 \cdot 10^6$	$33 \cdot 10^6$	$19 \cdot 10^7$	$81 \cdot 10^6$	-----
02/08/2004	$78 \cdot 10^6$	$30 \cdot 10^6$	$14 \cdot 10^7$	$18 \cdot 10^7$	$16 \cdot 10^7$

Tabla #3.1.3.2: Conteos de organismos mesófilos aerobios (Ver Anexo #2.3).

3.1.4.- Hidrocarburos Totales de Petróleo.- En la siguiente tabla se detallan los resultados obtenidos luego del tratamiento con el coctel enzimático. Cabe anotar que el dato inicial 50000(ppm) es el valor de concentración al 5% en peso.

Fecha	TPH(ppm)			
	Blanco	0.25	0.5	1
03/05/2004	50000	50000	50000	50000
23/05/2004	8072	5865	5347	4542
18/06/2004	8645	4397	6043	3057
02/07/2004	6844	3990	2857	2076
16/07/2004	6354	4107	2776	2117
02/08/2004	6050	4375	3255	2373

Tabla #3.1.4: Hidrocarburos Totales de petróleo (Ver Anexo #2.4).

3.1.5.- Nutrientes.- Los siguientes resultados corresponden al monitoreo de nutrientes realizado, semanalmente en cada reactor durante el proceso de biorremediación.

CARACTERIZACION DE NUTRIENTES (N,P,K)													
Fecha	Unidades	Blanco			0,25			0,5			1		
		Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Nitrógeno	Fósforo	Potasio
23-05-04	ppm	9800,00	18,00	58,65	10000,00	18,00	269,79	11000,00	18,00	355,81	12000,00	21,00	449,65
27-05-04	ppm	10300,00	27,00	164,22	11000,00	28,00	469,20	10800,00	25,00	430,10	12000,00	49,00	1094,80
31-05-04	ppm	10800	14	136,85	10500	9	281,52	8900	15	387,09	12900	15	430,1
07-06-04	ppm	10600	20	183,77	13400	19	508,3	10800	16	430,1	10800	25	586,5
14-06-04	ppm	10800	20	277,61	12200	18	547,4	11300	49	508,3	11300	19	508,3
11-07-04	ppm	10800	18	226,78	13200	33	625,6	11100	23	508,3	12000	24	586,5
19-07-04	ppm	6600	9	187,68	12200	15	586,5	9900	14	469,2	12000	21	586,5
28-07-04	ppm	11500	16	238,51	12700	19	480,93	11500	16,7	430,1	11300	13,2	410,55
06-08-04	ppm	10800	16	269,79	18700	26	555,22	11500	26	449,65	11300	27	598,23
12-08-04	ppm	11500	23	254,15	13400	36	602,14	12500	30	523,94	12000	29	539,58

Tabla #3.1.5.- Caracterización de Nutrientes (Ver anexo #2.1).

3.1.6.- Metales Pesados.- Los siguientes valores de concentración de metales corresponden al monitoreo en tres periodos del proceso de remediación por cuestiones económicas.

Fecha	Unidades	Blanco			0.25			0.5			1		
		Plomo	Cadmio	Niquel	Plomo	Cadmio	Niquel	Plomo	Cadmio	Niquel	Plomo	Cadmio	Niquel
23/05/2004	ppm	79.8	<5	448.7	89.8	5	533.9	84.7	5	528.4	79.9	5	474
23/07/2004	ppm	32.99	0.5	3.7	32.37	0.49	4.02	40.81	0.7	5.34	35.98	0.4	4.2
23/08/2004	ppm	48.97	0.5	4.7	41.99	0.6	5.2	44.99	0.6	5.9	42.99	0.5	5.4

Tabla #3.1.6.- Metales pesados (Ver Anexo #2.2).

3.1.7.- Potencial de Hidrógeno (pH).-

Fecha	pH Reactores			
	Blanco	0.25%	0.5%	1%
23/05/2004	5.5	5.7	5.7	5.7
27/05/2004	5.3	5.8	5.6	5.7
31/05/2004	5.6	5.5	5.6	5.6
07/06/2004	5.4	6.2	5.6	5.7
14/06/2004	5.5	5.0	5.7	5.5
11/07/2004	5.5	5.7	5.6	5.5
19/07/2004	5.4	5.4	5.7	5.6
28/07/2004	5.4	5.8	5.4	5.3
06/08/2004	5.5	4.7	5.5	5.5
12/08/2004	5.4	4.4	5.1	5.1

Tabla #3.1.7.- Potencial de Hidrógeno (Ver Anexo #2.1).

3.2.- Cálculos.

- A continuación se da una breve explicación del cálculo para cambio de unidades reportadas por el INIAP (potasio). La transformación de mEq/100ml a ppm.

$$1 \text{ mEq} = \text{mEq}/100\text{ml}$$

Ejemplo de cálculo:

$$\text{mEq} = \text{mg}/\text{Peso Eq.}$$

$$0,2 \text{ mEq}/100\text{ml de K (Dato INIAP)}$$

$$\text{mg} = \text{mEq} * \text{Peso Eq.}$$

$$\text{mg} = (0,2 * 39,1) = 7,82\text{mg}/100\text{ml}$$

$$\text{ppm} = \text{mg} * \text{L}$$

$$\text{ppm} = \text{mg}/\text{L} = 7,82 * 10 = 78,2\text{mg}/\text{L} = 78,2\text{ppm}$$

- A continuación se da una explicación del cálculo de la cantidad de crudo a colocar (5% peso) en los reactores.

$$\text{Cantidad de suelo utilizado por reactor} = 41 \text{ lb} = 18,63\text{Kg}$$

Se utilizó 5% en peso de Crudo.

$$1\text{Kg} = 1000\text{g} \quad 1000\text{g} * 0,05\% = 50\text{g}$$

$$1\text{g} = 1000\text{mg} \quad 1000\text{mg} * 50\text{g} = 50000\text{mg}/\text{Kg} \quad 5\% = 50000\text{ppm}$$

La cantidad de crudo a colocar en 41 lb va a ser:

5% = 50g/Kg esto es $50g \times 18,63Kg = 931,5g$ de crudo en 18,63Kg de suelo.

La densidad del crudo va a depender del grado API, sin embargo se tomará como $0,9g/cm^3$ promedio.

$d = m/v$ $V = m/d$ $V = 931,5g / 0,9g/cm^3 = 1035cm^3 = 1,035L$ de crudo por reactor.

Las cantidades de coctel enzimático utilizado fueron 0,25%(P); 0,5%(P); 1%(P) (Porcentaje en peso):

1% = 10g/Kg esto es $10g \times 18,63Kg = 186,3g$ de coctel en 18,63Kg de suelo.

Para 0,25%(P); 0,5%(P) el cálculo procede igual al ejemplo anterior.

3.3.- Gráficos de resultados.-

Los análisis correspondientes a los parámetros de control fueron realizados en los laboratorios de La Universidad Politécnica Nacional, Universidad Central, Universidad Católica, e INIAP.

Los métodos utilizados para el análisis fueron los siguientes:

- **Microbiológico:** Recuento de bacterias mesófilas aerobias en placa a profundidad (Ensayo No. 14).
- **Nitrógeno:** Nitrógeno Total.
- **Fósforo:** Método Olsen modificado
- **Potasio:** Método Olsen modificado
- **TPHs:** Método gravimétrico.
- **Metales Pesados:** Absorción Atómica.

3.3.1.- Gráficos de Temperaturas *(Ver Tabla #3.1.1).*

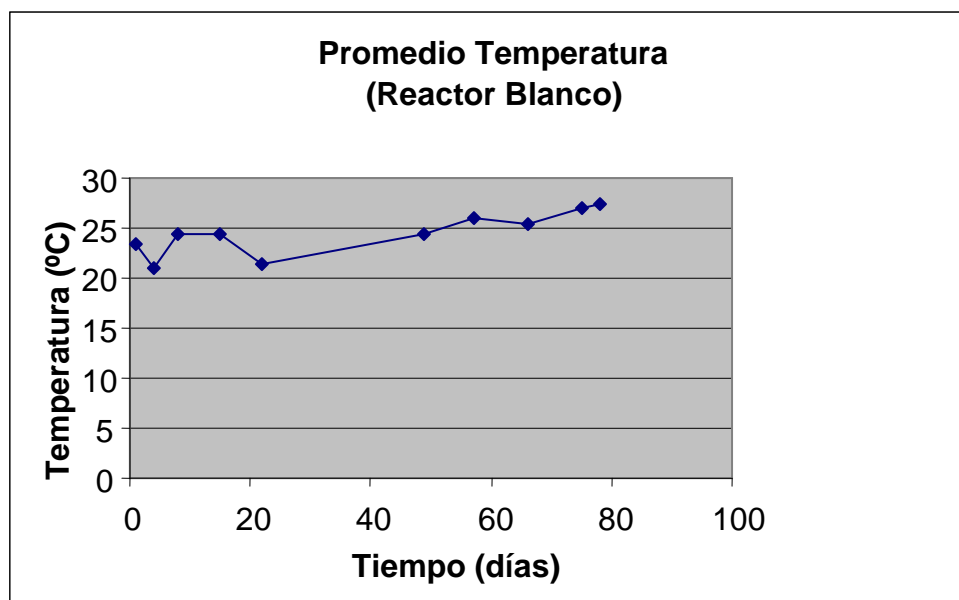


Gráfico # 3.3.1.1.- Variación de temperatura (Reactor Blanco)

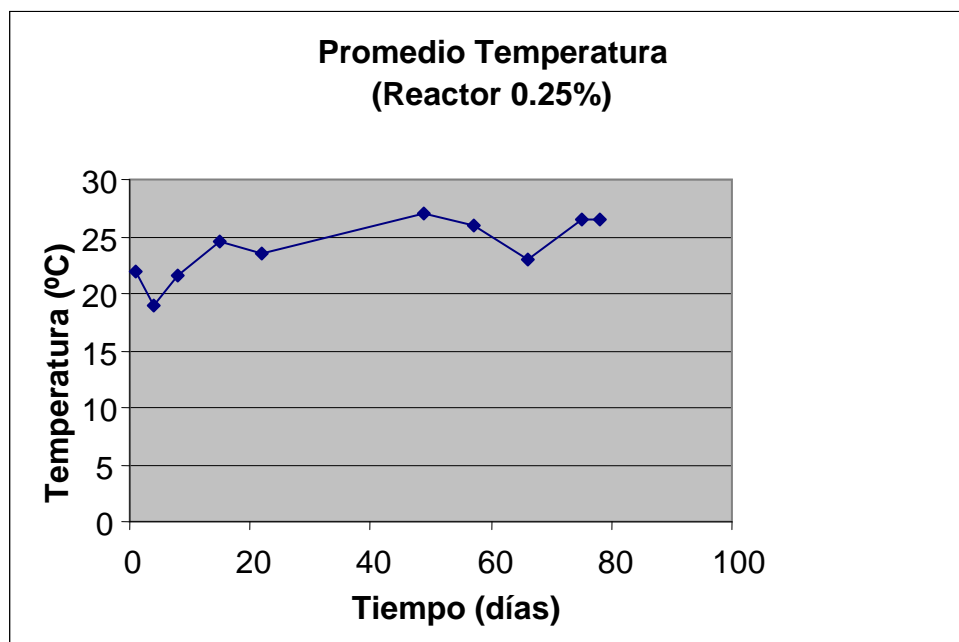


Gráfico # 3.3.1.2.- Variación de temperatura (Reactor 0.25%).

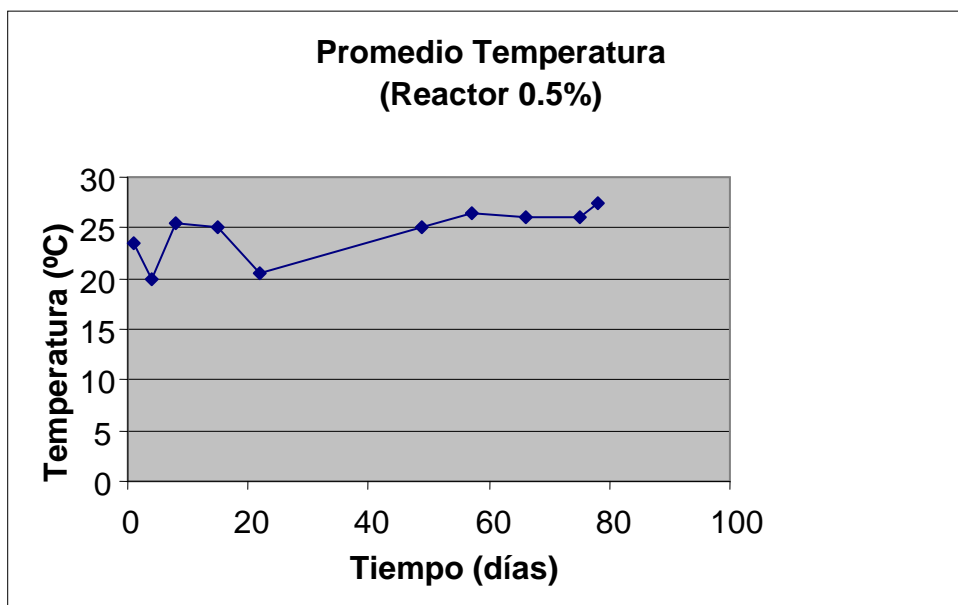


Gráfico # 3.3.1.3.- Variación de temperatura (Reactor 0.5%).

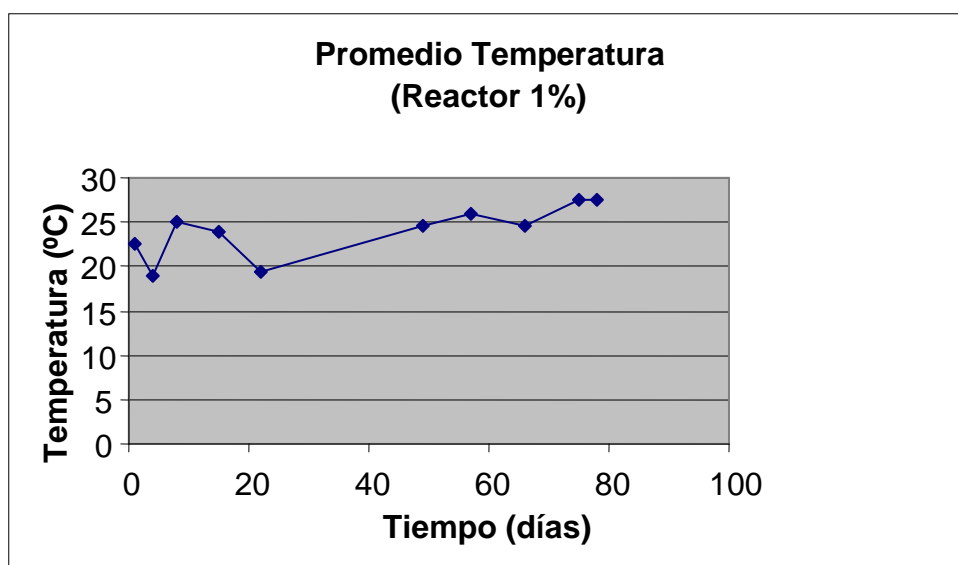


Gráfico # 3.3.1.4.- Variación de temperatura (Reactor 1%).

3.3.2.- Gráficos de Humedad (Ver Tabla # 3.1.2).

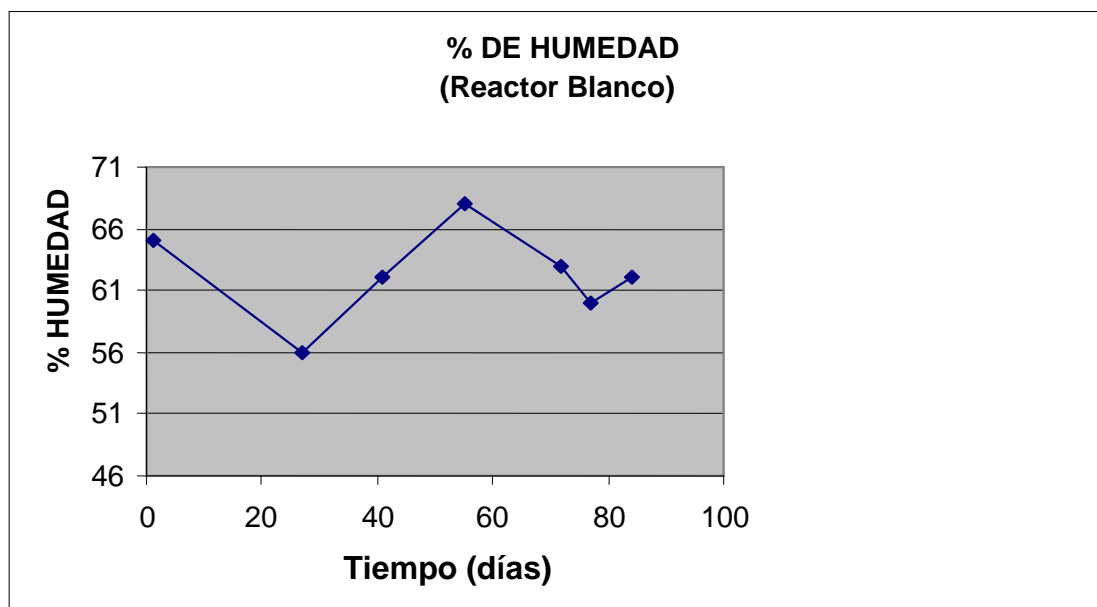


Gráfico # 3.3.2.1.- Variación de Humedad (Reactor Blanco).

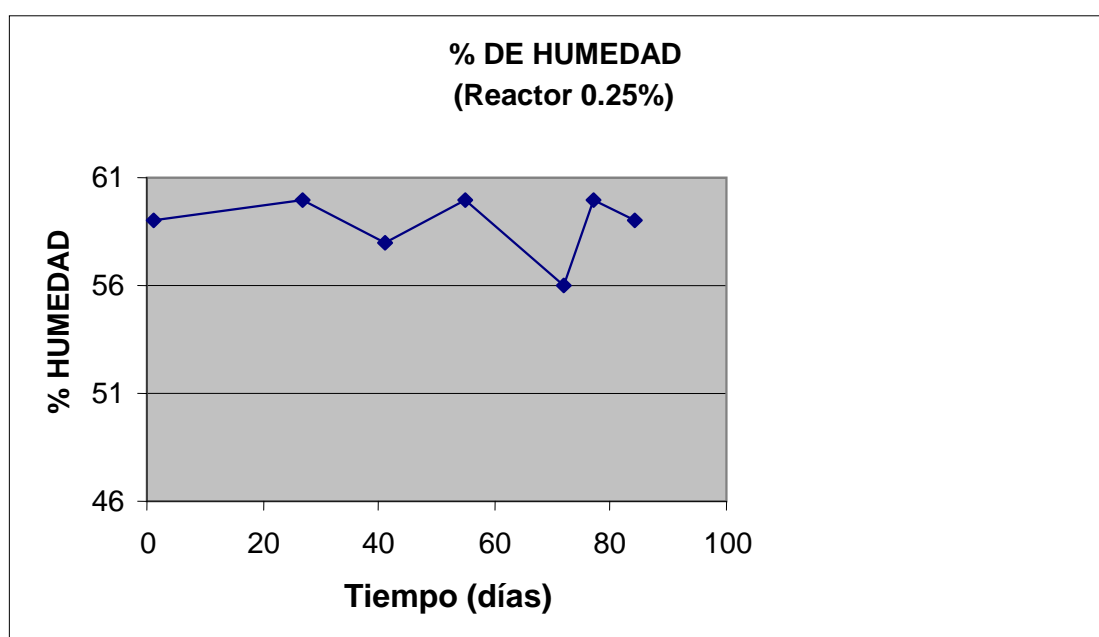


Gráfico # 3.3.2.2.- Variación de Humedad (Reactor 0.25%).

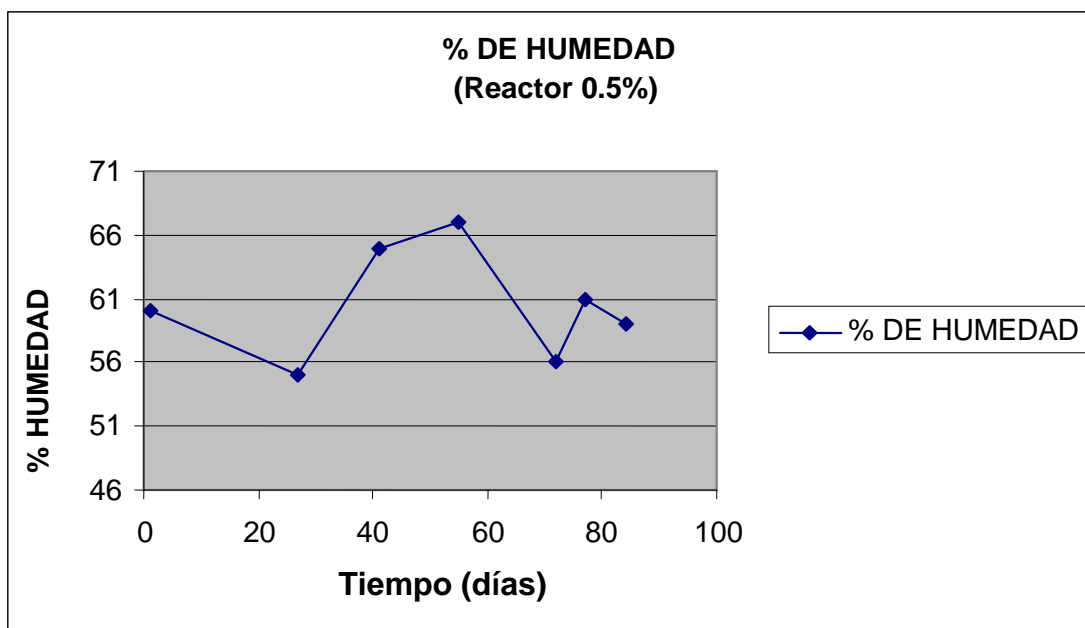


Gráfico # 3.3.2.3.- Variación de Humedad (Reactor 0.5%).

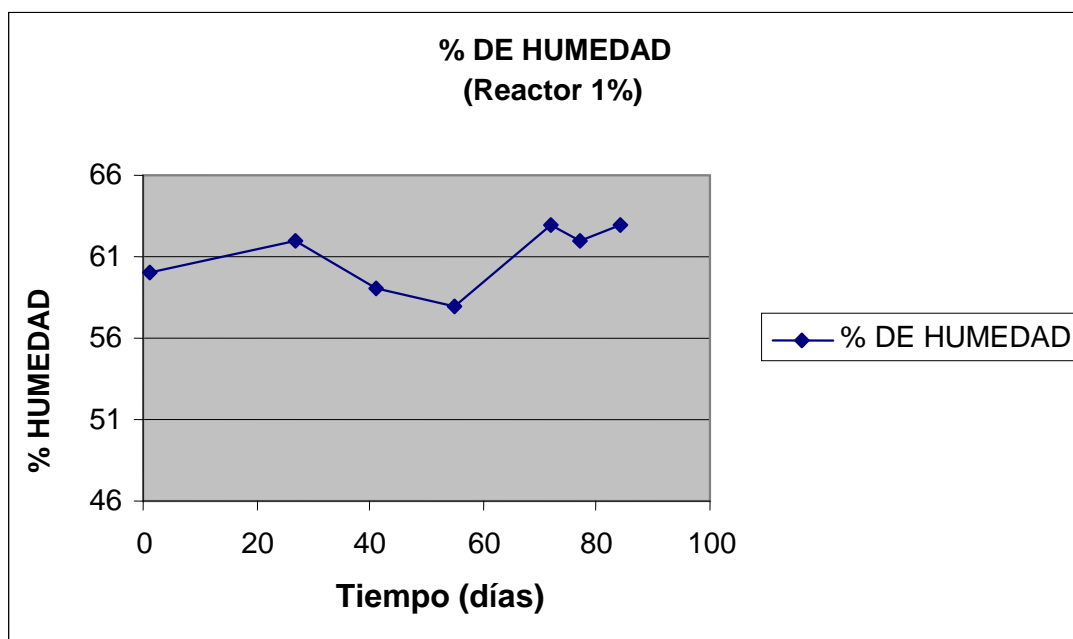


Gráfico # 3.3.2.4.- Variación de Humedad (Reactor 1%).

3.3.3.- Gráficos de Microorganismos (Ver Tablas # 3.1.3.1 y 3.1.3.2).

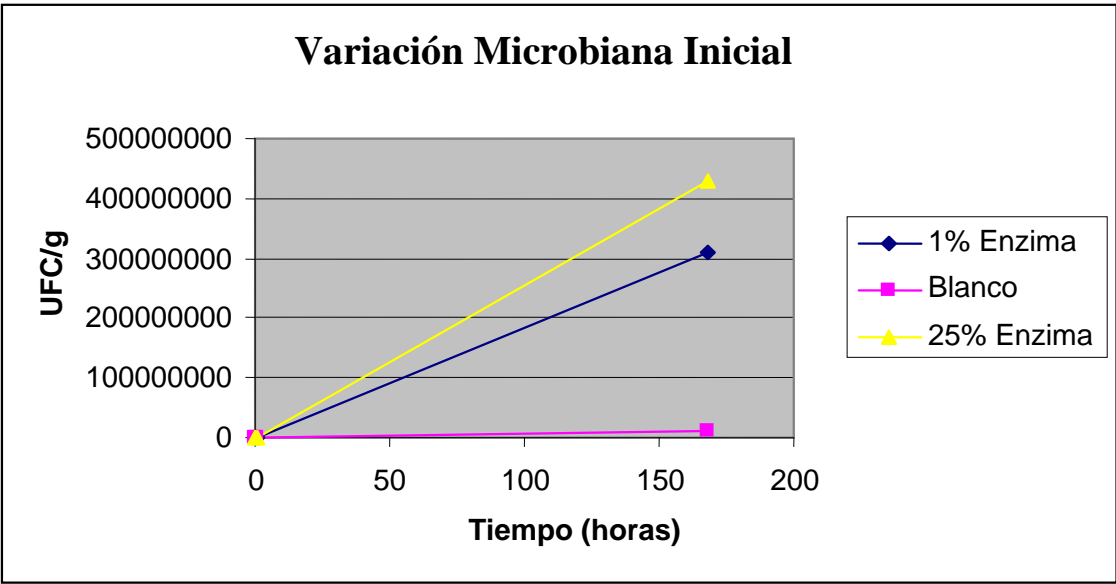


Gráfico # 3.3.3.1.- Variación Microbiana Inicial para tres rangos de enzima (1%; 25%; Blanco).

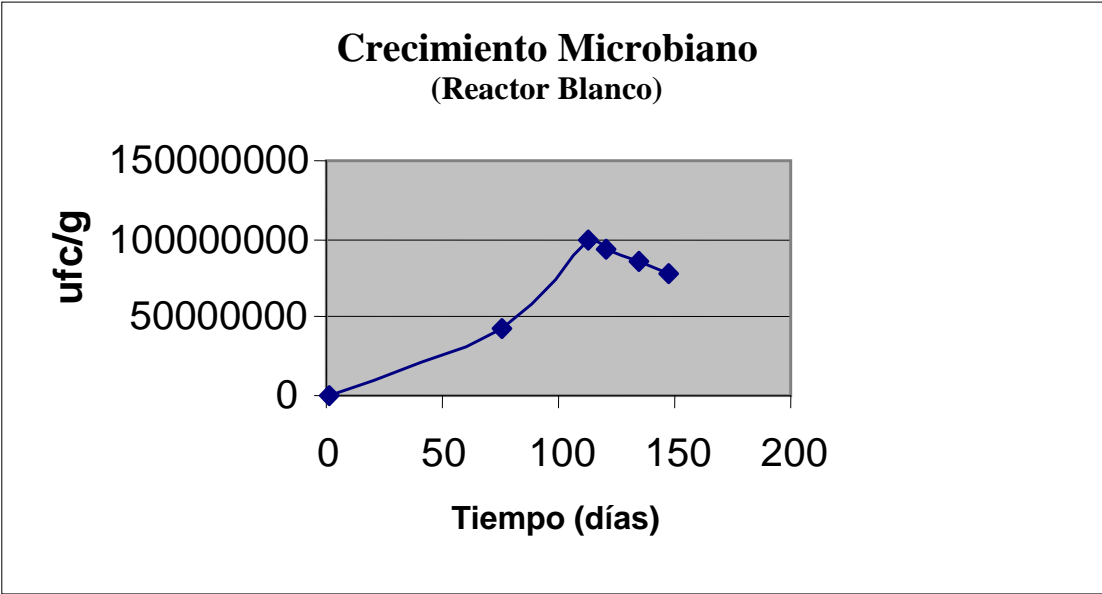


Gráfico # 3.3.3.2.- Variación Microbiana (Reactor Blanco).

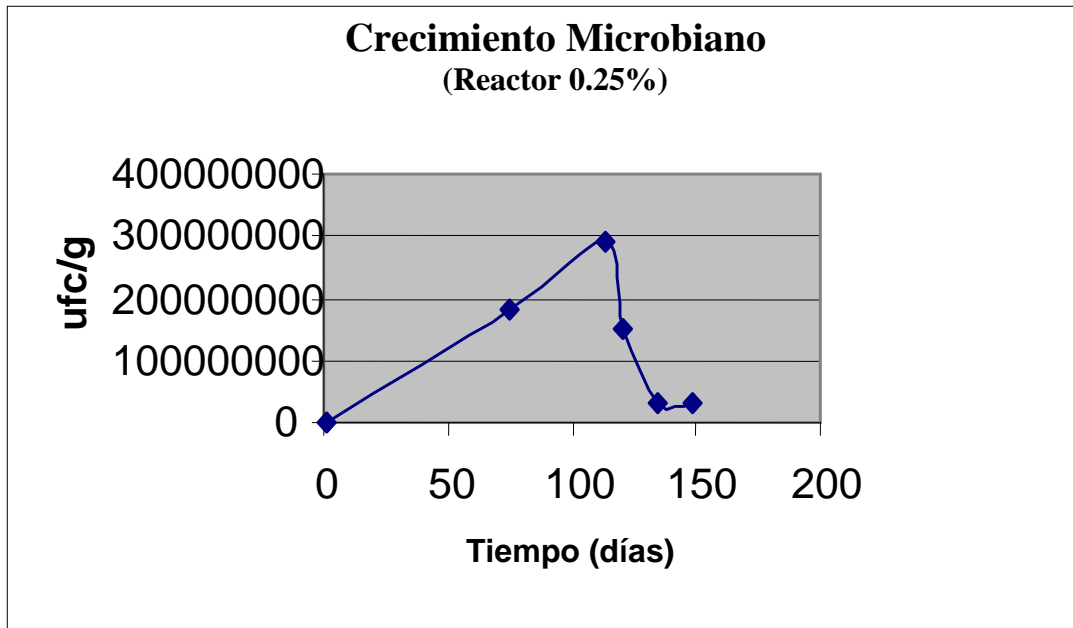


Gráfico # 3.3.3.3.- Variación Microbiana (Reactor 0.25%).

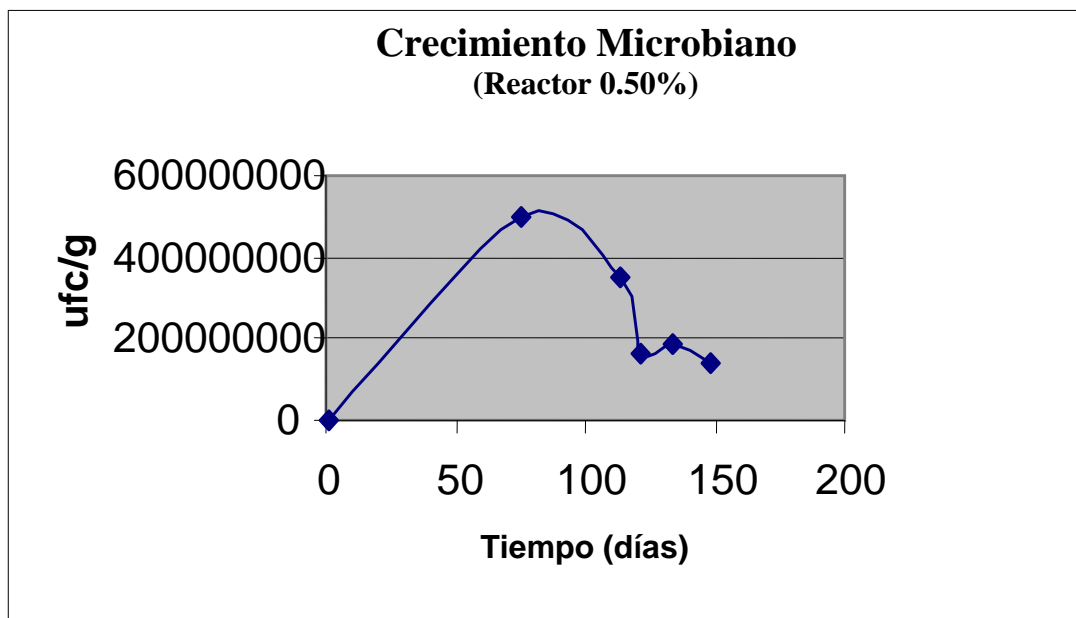


Gráfico # 3.3.3.4.- Variación Microbiana (Reactor 0.50%).

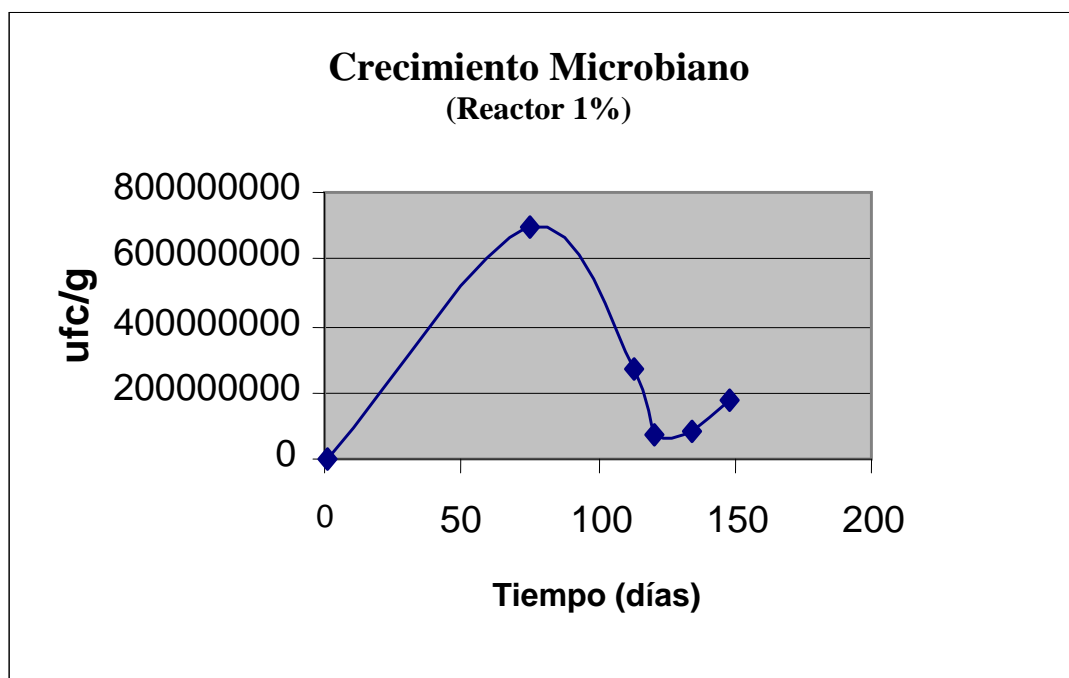


Gráfico # 3.3.3.5.- Variación Microbiana (Reactor 1%).

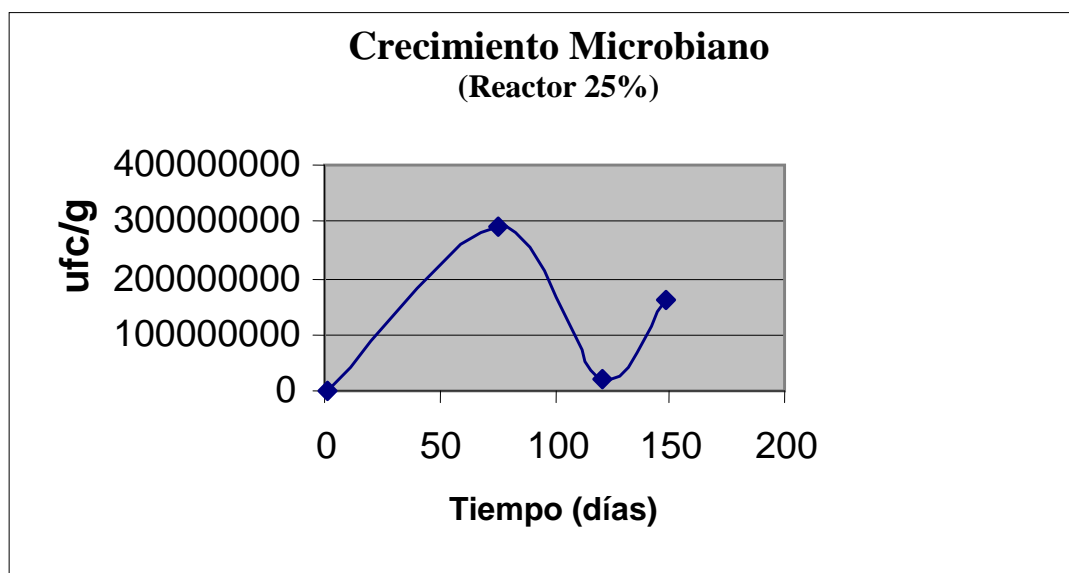


Gráfico # 3.3.3.6.- Variación Microbiana (Reactor 25%).

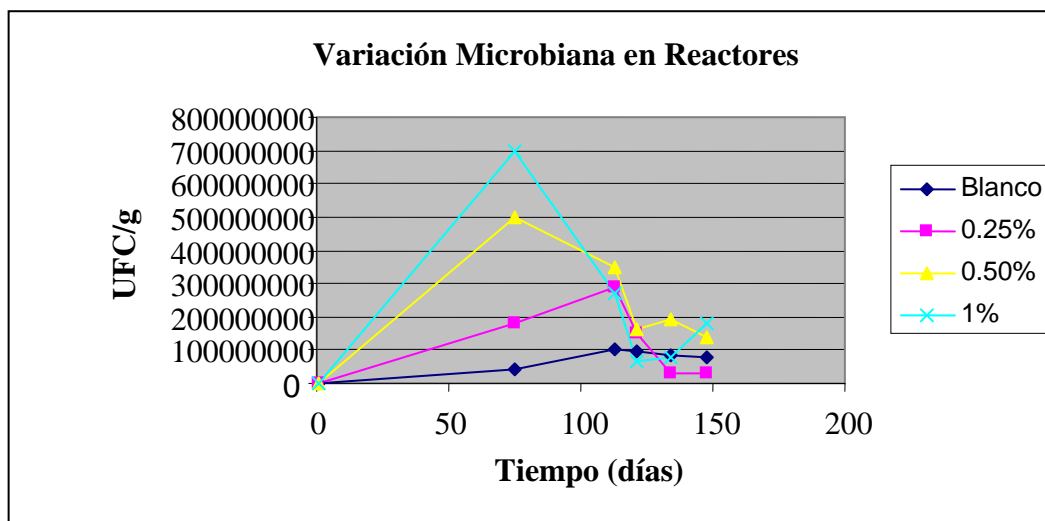


Gráfico # 3.3.3.7.- *Dispersión de datos de la variación Microbiana (Ver tabla # 3.1.3.2).*

3.3.4.- Gráficos de Nutrientes *(Ver tabla # 3.1.5).*

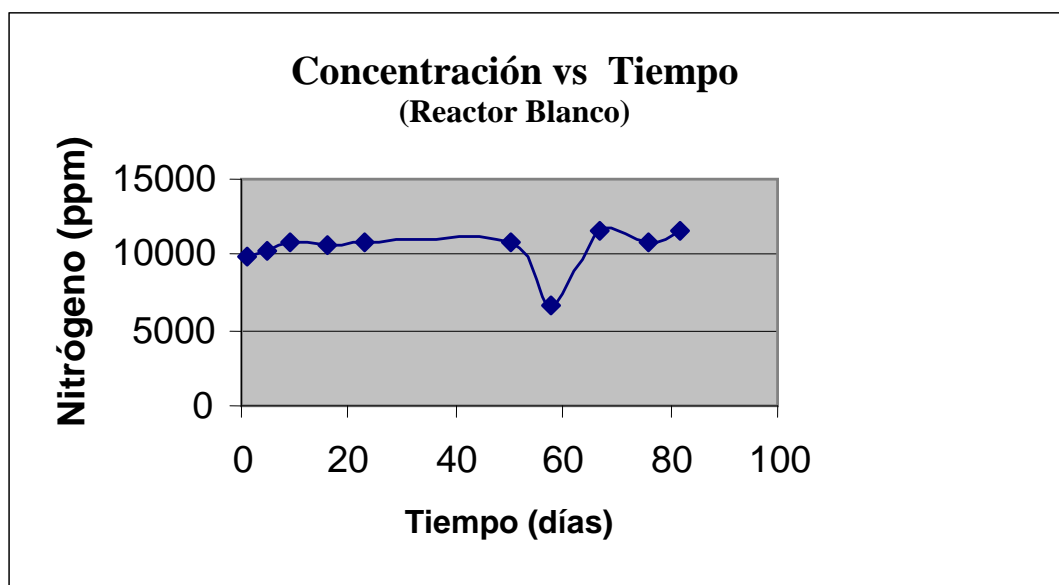


Gráfico # 3.3.4.1.- *Concentraciones de Nitrógeno.*

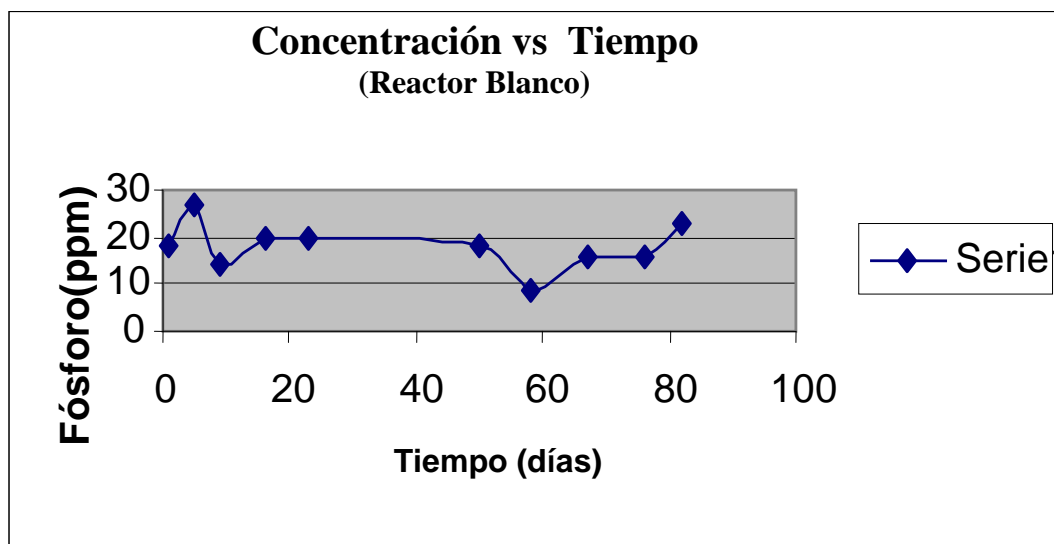


Gráfico # 3.3.4.2.- Concentraciones de Fósforo.

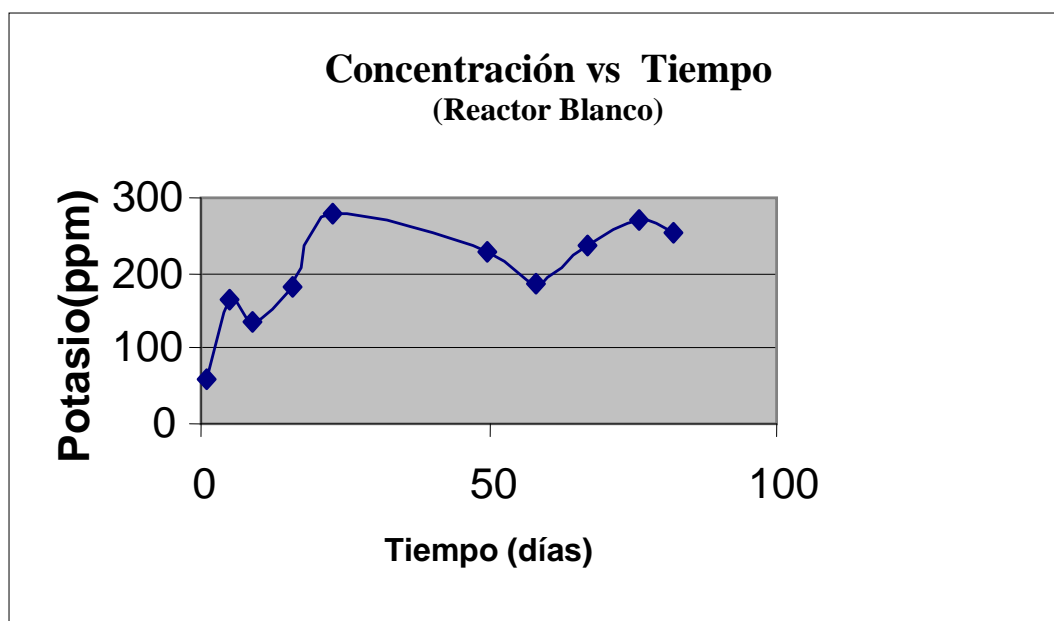


Gráfico # 3.3.4.3.- Concentraciones de Potasio.

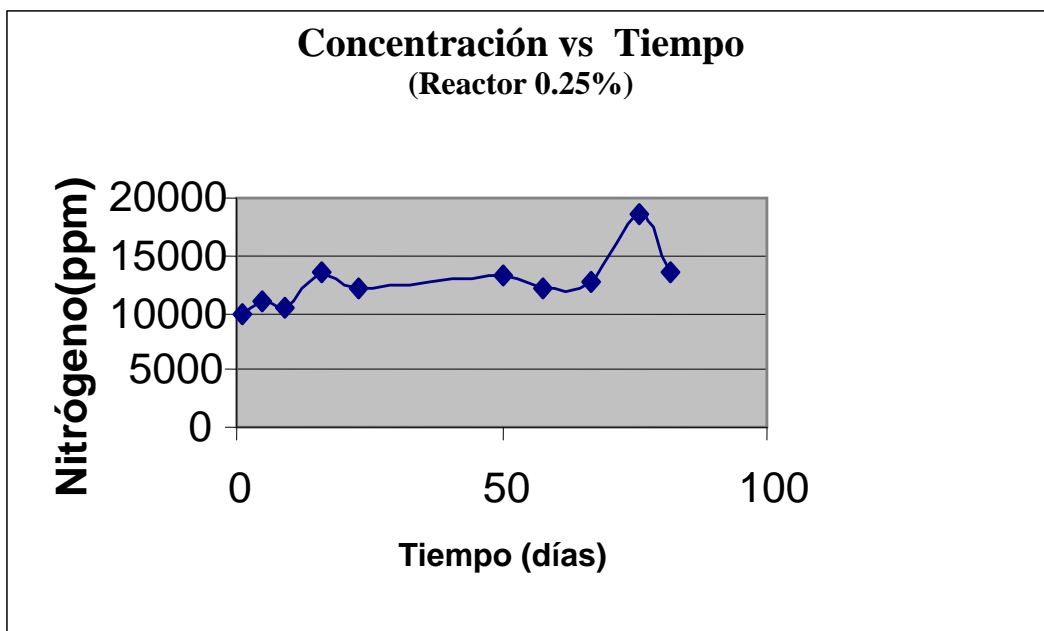


Gráfico # 3.3.4.4.- Concentraciones de Nitrógeno.

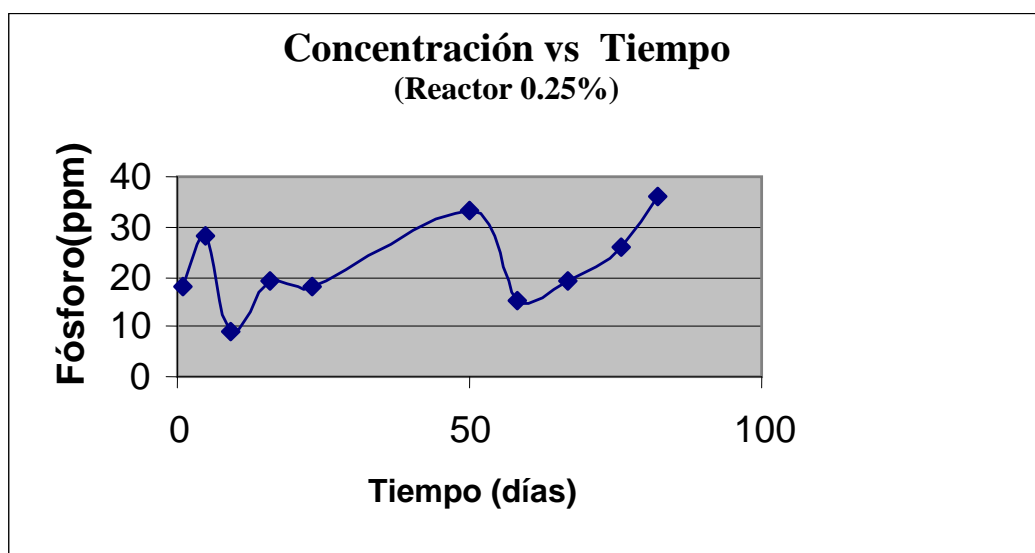


Gráfico # 3.3.4.5.- Concentraciones de Fósforo.

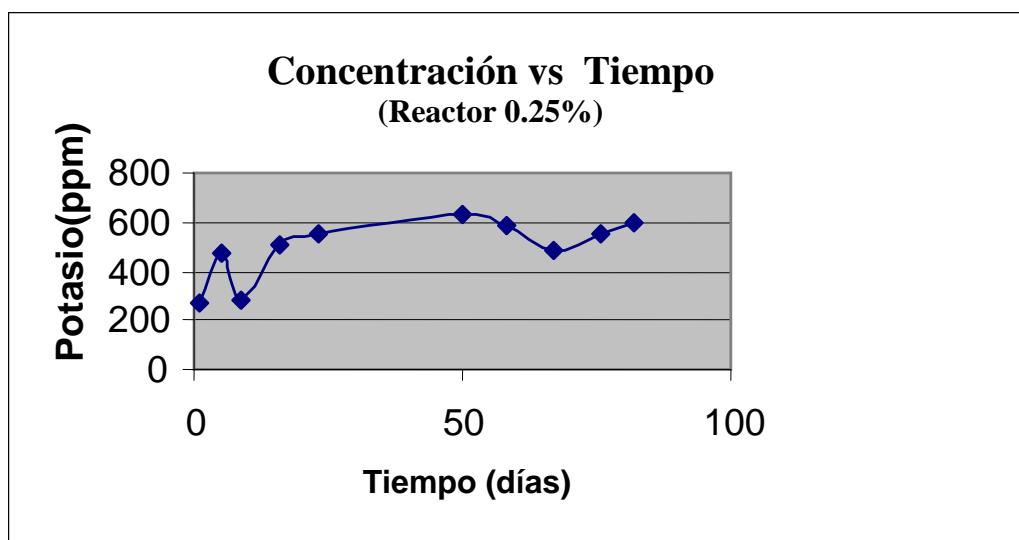


Gráfico # 3.3.4.6.- Concentraciones de Potasio

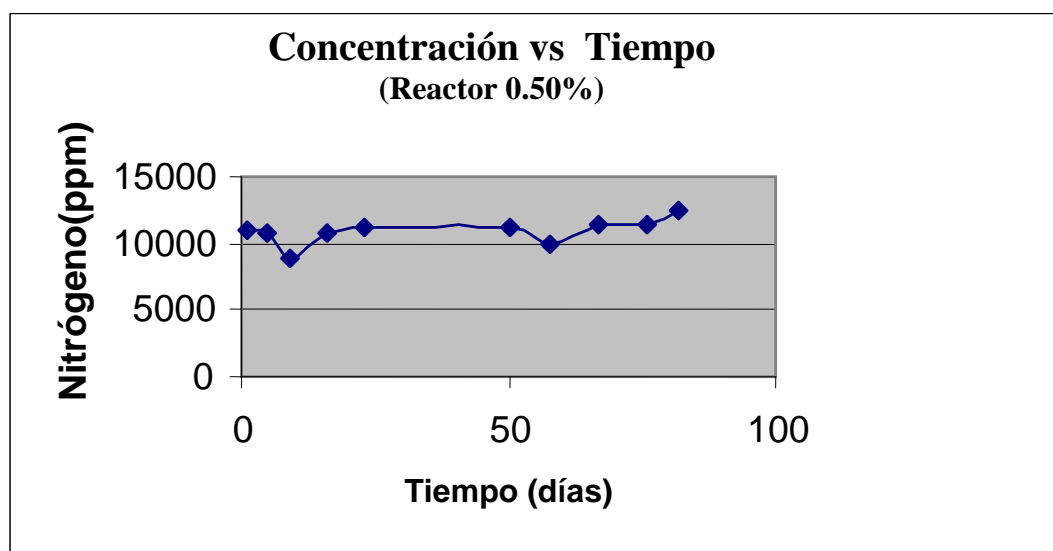


Gráfico # 3.3.4.7.- Concentraciones de Nitrógeno.

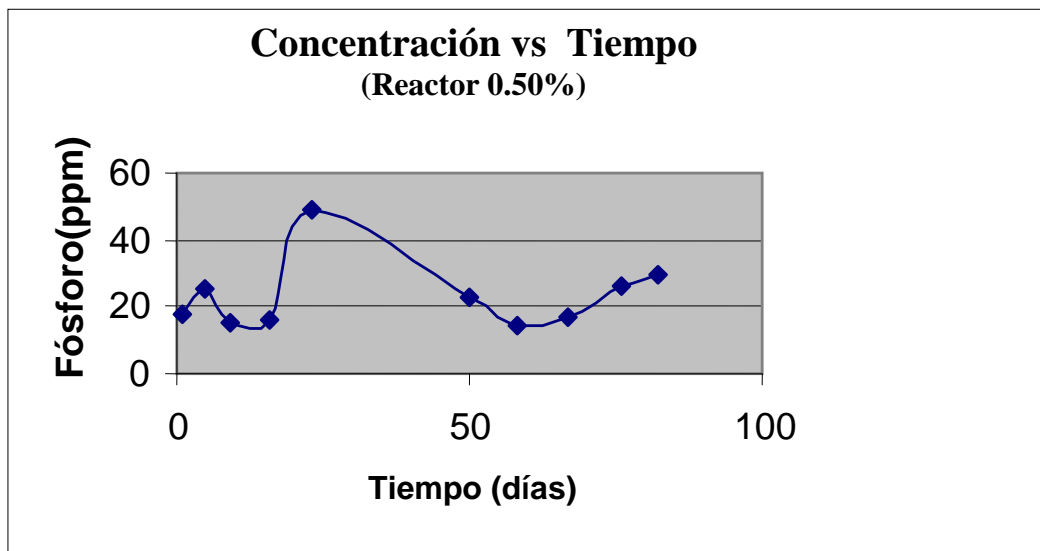


Gráfico # 3.3.4.8.- Concentraciones de Fósforo.

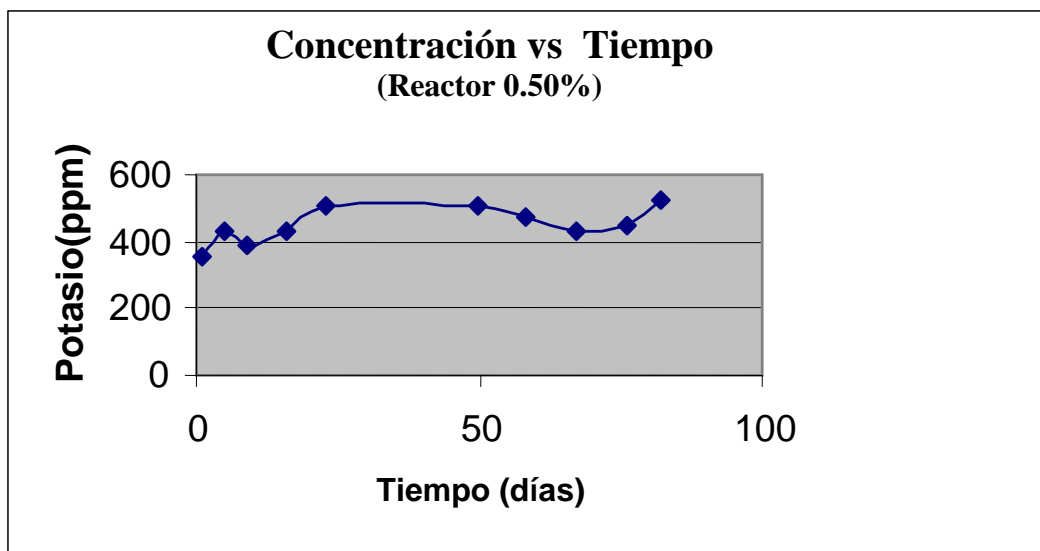


Gráfico # 3.3.4.9.- Concentraciones de Potasio.

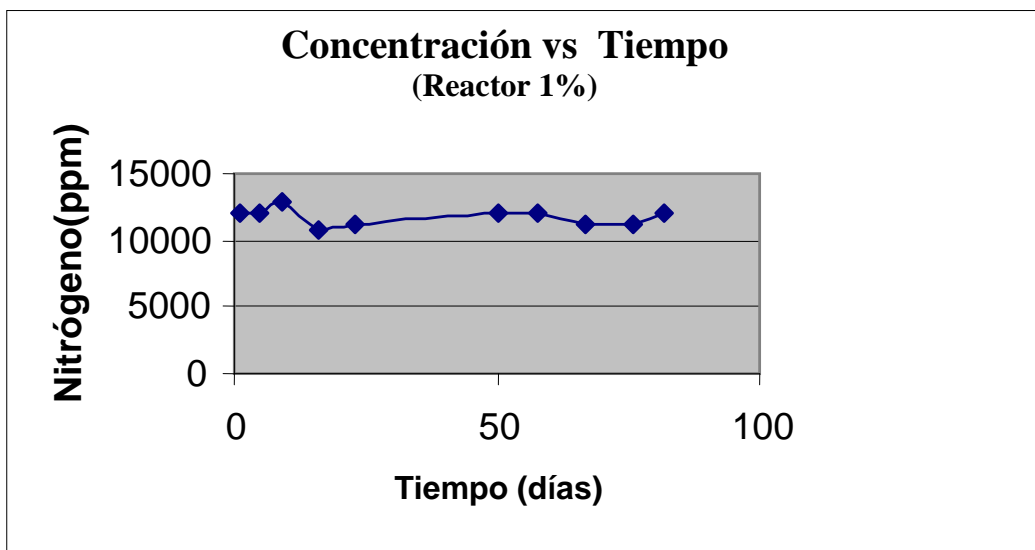


Gráfico # 3.3.4.10.- Concentraciones de Nitrógeno.

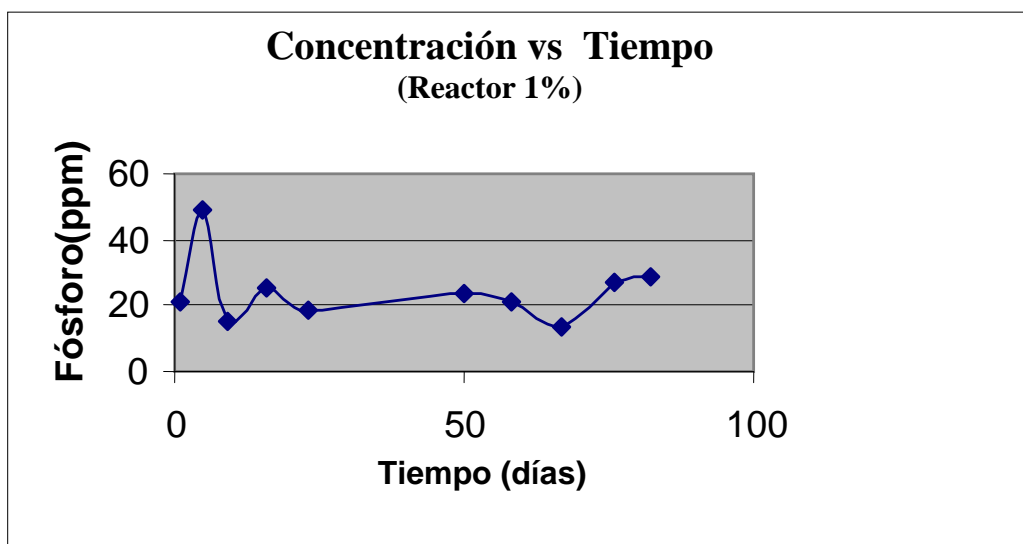


Gráfico # 3.3.4.11.- Concentraciones de Fósforo.

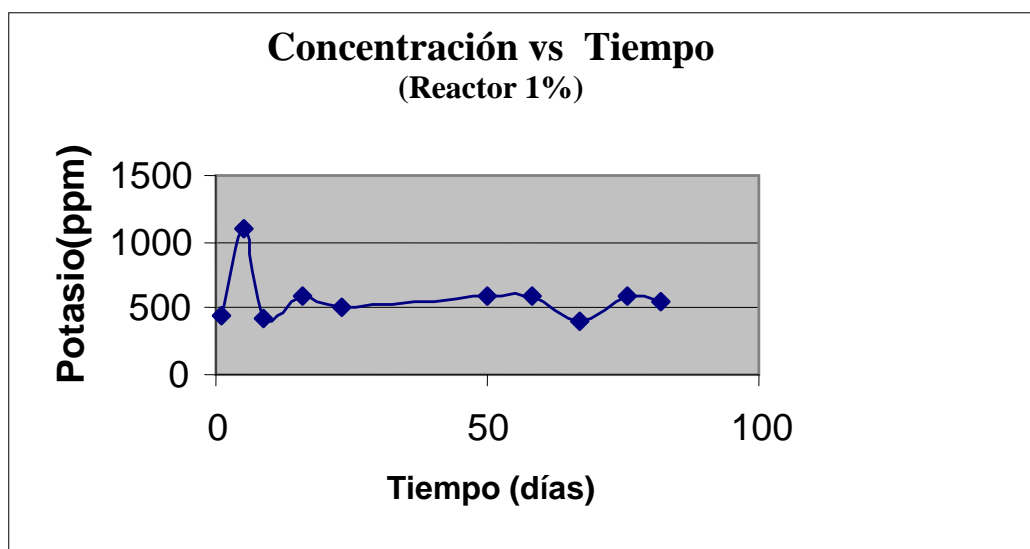


Gráfico # 3.3.4.12.- Concentraciones de Potasio.

3.3.5.- Gráficos de Hidrocarburos Totales (Ver tabla # 3.1.4).

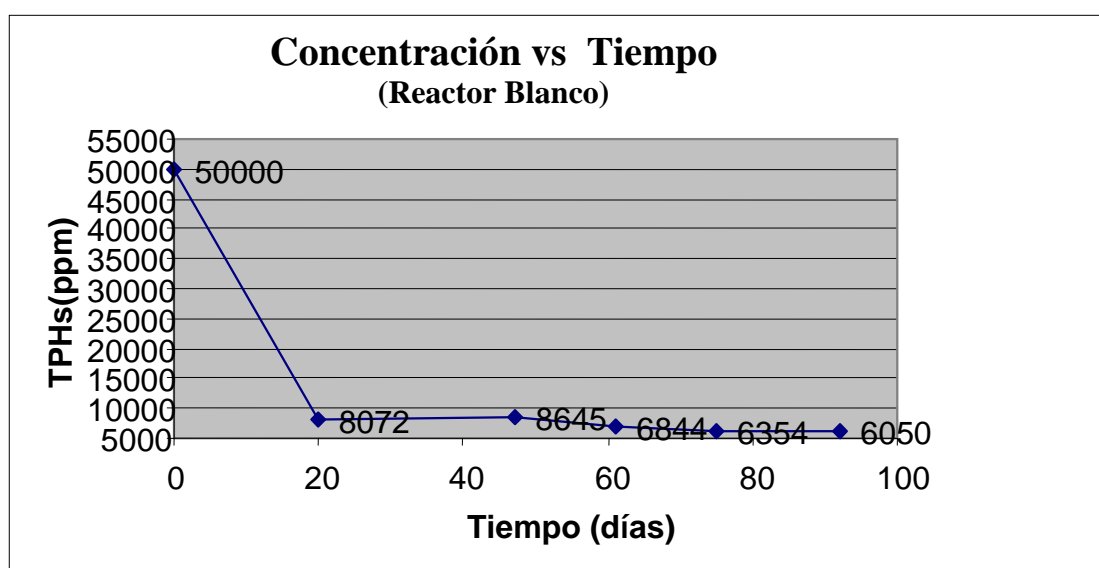


Gráfico # 3.3.5.1.- Hidrocarburos totales de petróleo.

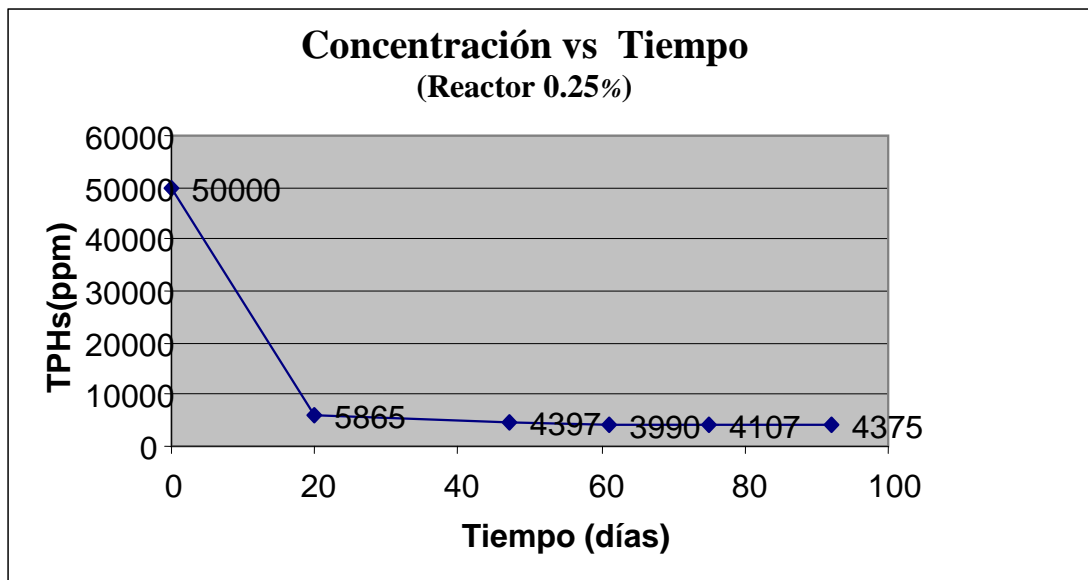


Gráfico # 3.3.5.2.- Hidrocarburos totales de petróleo.

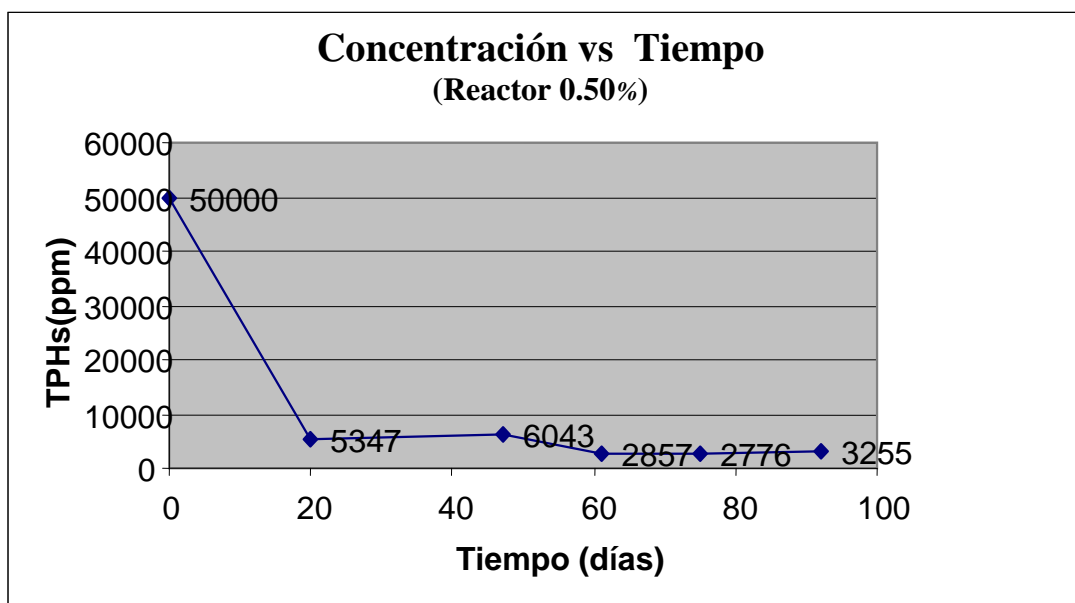


Gráfico # 3.3.5.3.- Hidrocarburos totales de petróleo.

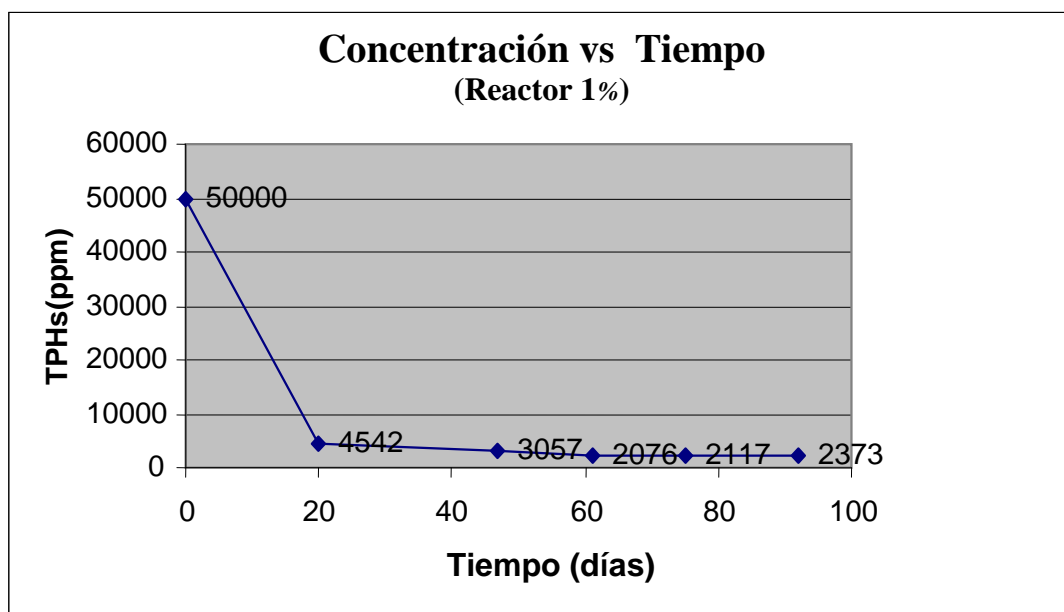


Gráfico # 3.3.5.4.- Hidrocarburos totales de petróleo

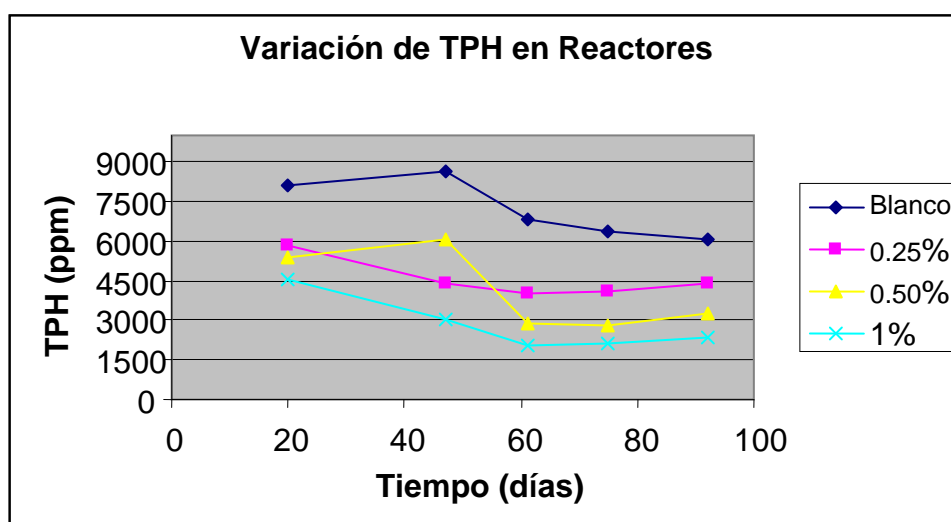


Gráfico # 3.3.5.5.-Dispersión de Valores de TPH.

3.3.6.- Metales Pesados (Ver tabla # 3.1.6).

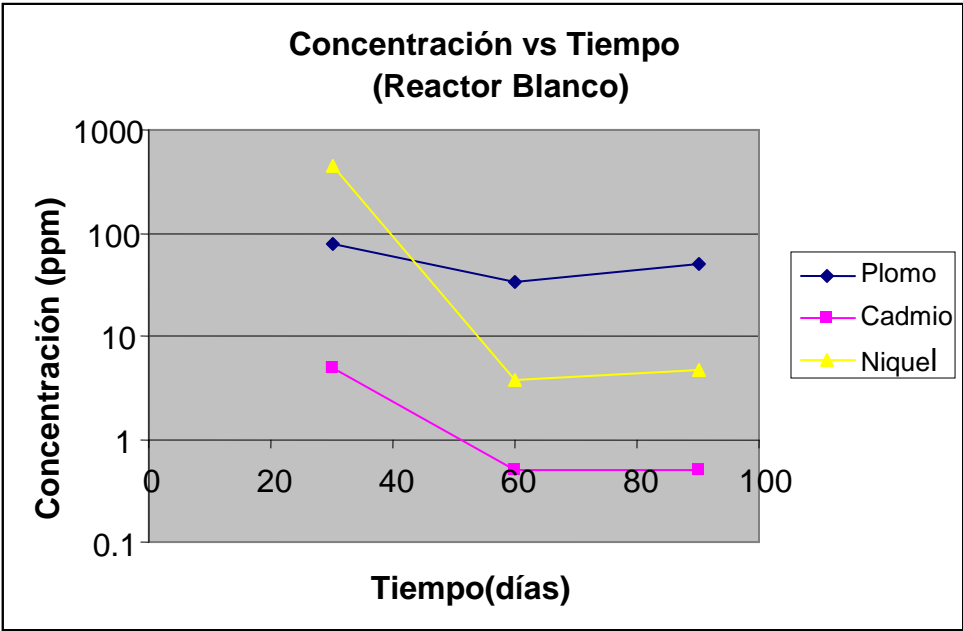


Gráfico # 3.3.6.1.-Metales Pesados (Reactor Blanco)

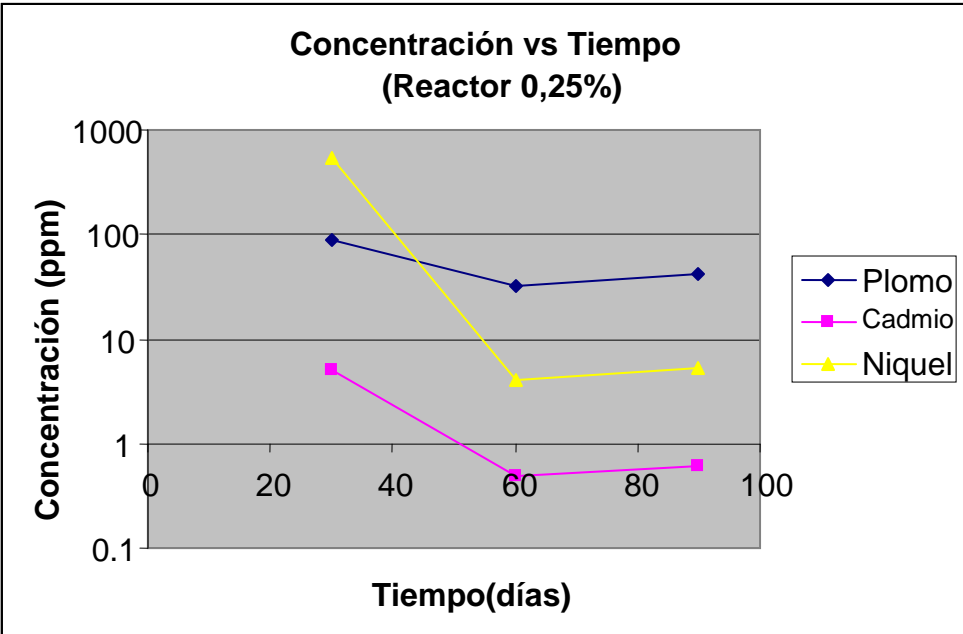


Gráfico # 3.3.6.2.-Metales Pesados (Reactor 0,25%)

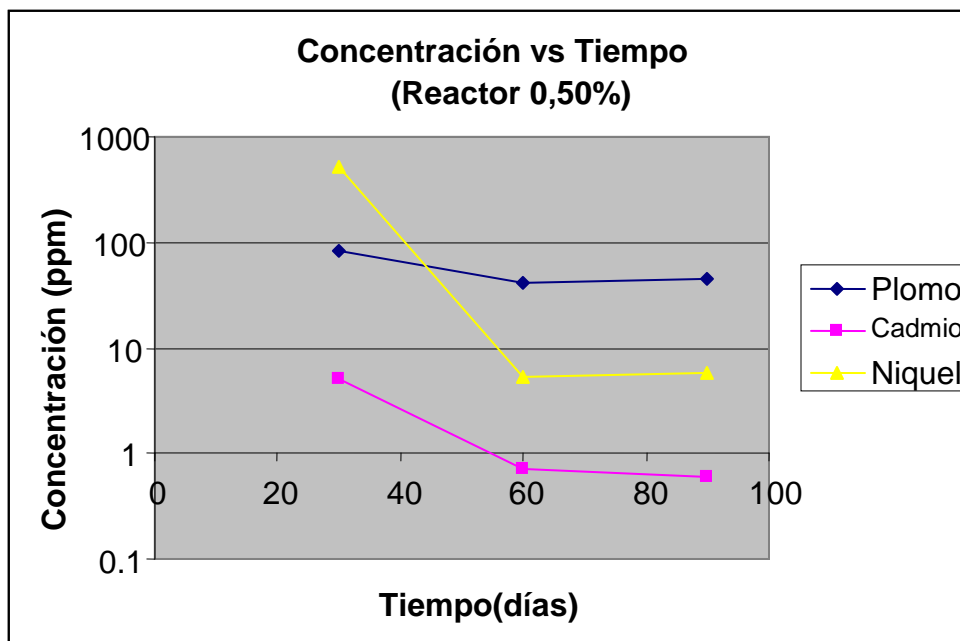


Gráfico # 3.3.6.3.-Metales Pesados (Reactor 0,50%)

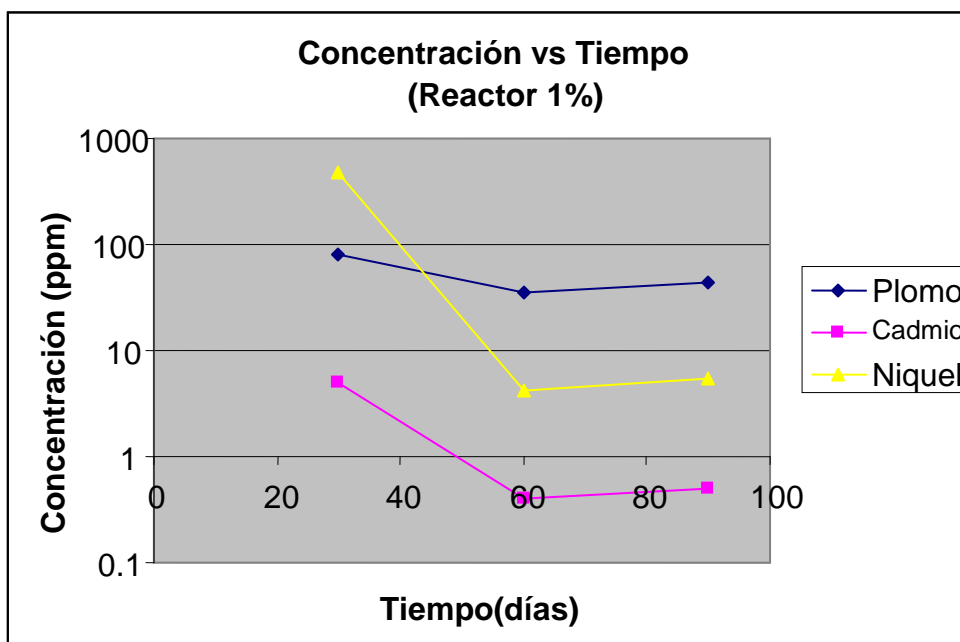


Gráfico # 3.3.6.4.-Metales Pesados (Reactor 1%)

3.3.7.- Potencial de Hidrógeno (pH) (Ver tabla # 3.1.7.).

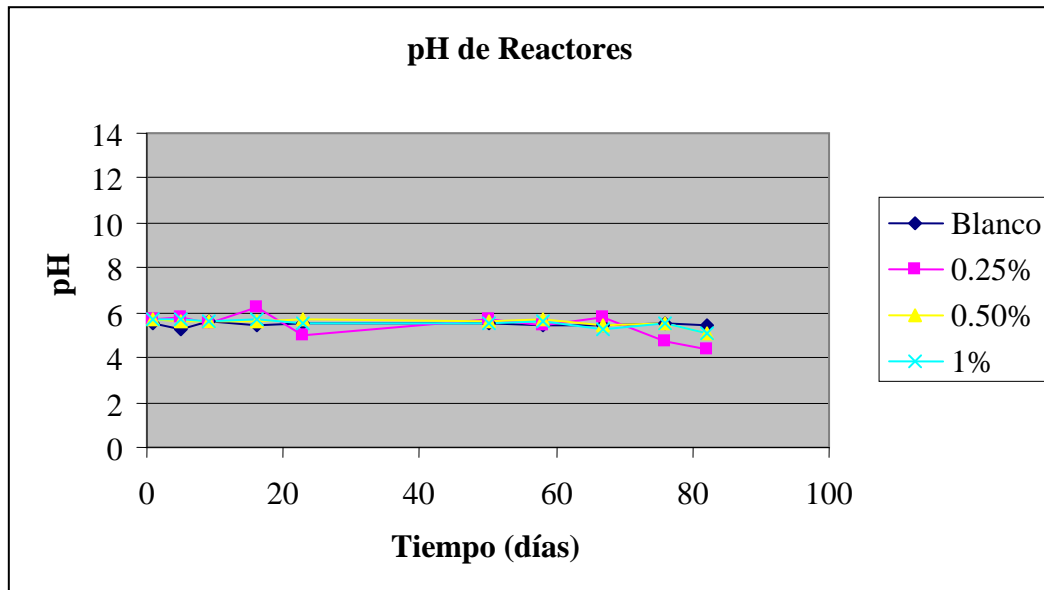


Gráfico # 3.3.7.- Comportamiento pH de los reactores.

4.1.- Análisis de Resultados.

- ✓ **Temperatura:** El comportamiento de la temperatura como se puede observar en las gráficas 3.3.1.1 hasta 3.3.1.4, tienen una tendencia de incremento, esto debido a la colocación de una cubierta plástica sobre los reactores para disminuir el enfriamiento de estos, y por la época del año en la que se realizó (Verano).
- ✓ **Humedad:** Mantener estable el porcentaje de humedad en todos los reactores es muy difícil, sin embargo se observa en los Gráficos # 3.3.2.1 y 3.3.2.3, que existe una variabilidad de un $\pm 25\%$, causado por la temperatura.

- ✓ **pH** : El pH como se puede observar en el Gráfico #3.3.7, se encuentra estable durante el proceso de biorremediación, hay que anotar que se halla en valores ligeramente ácidos, siendo este el valor originario o inicial al que el suelo se encontraba naturalmente.

- ✓ **Microorganismos**: El crecimiento microbiano en el seguimiento inicial (Ver tabla # 3.1.3.1), que se realizó en dos concentraciones 1% y 25%, nos dio resultados aproximados entre si. De los valores anteriormente determinados se estableció, por cuestiones económicas, probar el proceso de biorremediación con rangos próximos al 1%, esto es 0.25%; 0.50%, y 1%. Una de las explicaciones para el incremento acelerado de la población microbiana es el uso del sustrato enzimático, pues el producto posee hormonas bacteriales y humectantes orgánicos (Ver gráficos 3.3.3.7). En respuesta a la disminución de población, deducimos que el sustrato de alimento de los organismos, en este caso crudo, es consumido y limita el crecimiento de los mismos.

- ✓ **TPH**: La disminución de hidrocarburos puede ser producto de varios factores, entre ellos la volatilización de elementos, evaporación de agua presente en el crudo, y el efecto propio de degradación por parte de los microorganismos. Como se observa en los gráficos #3.3.5.1 hasta 3.3.5.4, la variación de hidrocarburos es brusca en los primeros veinte días.

- ✓ **Metales Pesados**: Según se observa en los gráficos #3.3.6.1 hasta 3.3.6.4, existe una disminución considerable de metales pesados comparando su estado inicial y final, luego del proceso de remediación. La concentración de elementos

plomo, Níquel, y cadmio disminuyen, tanto en el reactor blanco como en los demás reactores, lo que indica que el efecto de la enzima es relativamente mínimo en este aspecto.

4.2.- Conclusiones.

1. El proceso de biorremediación utilizado para degradar hidrocarburos, en esta investigación, presenta una mejoría en aspectos de degradación de hidrocarburos y disminución de metales pesados, comparando los reactores adicionados con enzima y el reactor blanco o patrón.
2. Los rangos de concentración de coctel enzimático utilizados para la biorremediación, a partir del seguimiento inicial, fueron 0.25%; 0.5%; y 1% en peso.
3. El efecto que tiene la variación de la temperatura se ve reflejado en el incremento o decremento poblacional de microorganismos.
4. La humedad es un factor crítico en el crecimiento de los organismos, pues es el aspecto que mas limita el crecimiento microbiano.
5. El crecimiento microbiano se ve claramente incrementado con la adición de las enzimas.

6. Los nutrientes son un factor importante en el proceso de biorremediación de suelos, a pesar de la escasa especificidad que se puede obtener respecto a los diferentes tipos de complejos o compuestos que son sintetizados por los microorganismos.
7. La presencia de metales pesados en el suelo no se ve disminuida en gran magnitud con la aplicación del cóctel enzimático, sin embargo existe una pequeña mejora en cuanto al elemento plomo.
8. Los hidrocarburos pesados de petróleo son más difíciles de sintetizar. Con el uso del coctel enzimático se promueve la degradación de estos.
9. Hay que recalcar que este es un primer paso en la determinación de la eficacia del producto, pues la falta de información limita mucho la realización de una prueba más exacta que nos de valores reales y no aproximados de trabajo de la enzima. Con estos resultados iniciales queda abierta la oportunidad de realizar investigaciones posteriores para determinar las concentraciones óptimas a colocar en suelos contaminados con crudo y biorremediarlos en el menor tiempo posible, permitiendo una disminución en la variabilidad de los resultados, que conlleven a la consecución de resultados cercanos a la realidad de la catálisis enzimática.

4.3.- Recomendaciones.

- Para determinar fielmente los rangos de trabajo del coctel enzimático es necesario realizar una investigación profunda que englobe aspectos como:
 - Caracterización específica de organismos presentes en el proceso de biorremediación.
 - Tipo de nutrientes (Nitritos, Nitratos, etc.) específicos, que requieren los organismos.
 - Diferentes variaciones de concentración de hidrocarburos utilizando como referencia el 1% de la enzima utilizada.
- Si se realiza un proceso de biorremediación en zonas de altas temperaturas, verificar diariamente que la humedad del suelo este en rangos aceptables (60%).
- Se recomienda el uso de una mascarilla el momento de la aplicación, pues el olor es bastante fuerte.

4.4.- Bibliografía.

- ¹ Mark Coiné, “Técnicas de recuperación de suelos”, 2000.
- ² Claudia Mazzeo, “Tratamiento de suelos contaminados por medio de fitorremediación”. 10-Oct-2002:
- ³ [www.miliarium.com/proyectos /suelos/ descontaminaciónsuelos/ tecnicasinsitu /tecnicasbiologicas / fitorremediacion](http://www.miliarium.com/proyectos/suelos/descontaminaciónsuelos/tecnicasinsitu/tecnicasbiologicas/fitorremediacion).
- ⁴ <http://ciencias.bc.inter.edu/yserrano/microsuelo.htm>
- ⁵ <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp>
- ⁶ S. Ripp "Field applications of genetically engineered", 2000.
microorganisms for bioremediation processes."
- ⁷ Atlas.R; Bartha R, Addison Wesley. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 2002.
- ⁸ LaGrega et al, 1996.”Biorremdiación y Bioprocesos”
- ⁹ Tiedje et al, 1990, Leahy at al, 1989; Roberts, et al, 1989. ”transfer between plants and soil microorganisms”.
- ¹⁰ Sayler, G.S. “Current opinion in biotechnology 11:286-289. 1999.
- ¹¹ Fitzpatrick, E. A. " Suelos. Su formación, clasificación y distribución".Ed. Trillas. México1985
- ¹² www.soil-resourse/kinds/ph.html.
- ¹³ Morris Levin, Michael A.Gealt “Parámetros ambientales” 1997.
- ¹⁴ www.porquebiotecnologia.com.ar
- ¹⁵ Cookson,.”Biotecnología”. 1995
- ¹⁶ http://www.cetmar.org/documentacion/mareas_negras.htm#efectos

¹⁷ http://www.petroecuador-ninth-round.com/enviornrule1_esp.html#ch3

¹⁸ P Gaseosa y J. Hube, “Tecnología de las enzimas”, Editorial acribas. S.A.,
Segunda Edición, Zaragoza España, 1990., Pag 3.