

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“ESTUDIO DE INÓCULOS BACTERIANOS COMO  
BIORREMEDIADORES DE SUELOS CONTAMINADOS  
CON PETRÓLEO”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA  
AMBIENTAL**

**AUTOR:**

**JUAN GABRIEL ESCORZA NÚÑEZ**

**RIOBAMBA-ECUADOR**

**2007**

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Dra. Nancy Veloz Directora de Tesis, por la confianza depositada en mi persona y por su valiosa colaboración en el desarrollo del presente trabajo.*

*Al Dr. Iván Ramos y al Dr. Luís Guevara distinguidos miembros del tribunal, quienes con su apoyo han permitido el progreso de esta investigación.*

*Al Dr. Roberto Erazo Director del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, por su buen consejo y apreciable contribución.*

*Al personal del LAB-CESTTA de la Facultad de Ciencias por el incondicional apoyo prestado durante toda la fase experimental. “gracias amigos”*

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a mi Madre Anita, quién con su comprensión, paciencia y cariño me ha enseñado a salir adelante a pesar de la adversidad, a mi Padre Víctor por ser mi referente de vida, a mis hermanos Hugo y Víctor por apoyarme siempre y confiar en mí durante toda mi carrera.*

NOMBRE	FIRMA	FECHA
<b>Dr. Edmundo Caluña</b> DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS	-----	-----
<b>Dr. Robert Cazar</b> DIRECTOR DE LA ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS	-----	-----
<b>Dra. Nancy Veloz</b> DIRECTORA DE TESIS	-----	-----
<b>Dr. Iván Ramos</b> MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
<b>Dr. Luís Guevara</b> MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
<b>Sr. Carlos E. Rodríguez C.</b> DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
<b>NOTA DE TESIS ESCRITA</b>	-----	-----

Yo, **JUAN GABRIEL ESCORZA NÚÑEZ**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**.

---

**JUAN GABRIEL ESCORZA NÚÑEZ**

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>° C</b>	Grados Centígrados
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>DINAPA</b>	Dirección Nacional de Protección Ambiental
<b>EPA</b>	U.S. Environmental Protection Agency
<b>g</b>	Gramo
<b>g/ml</b>	Gramo por milímetro
<b>g/cm<sup>3</sup></b>	Gramo por centímetro cúbico
<b>HAP's</b>	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<b>INEN</b>	Instituto Ecuatoriano de Normalización
<b>mg/Kg</b>	Miligramo por kilogramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>min.</b>	Minuto
<b>mph</b>	Metros por hora
<b>Ni</b>	Níquel
<b>Pb</b>	Plomo
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RAOHE</b>	Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador
<b>SPA</b>	Subsecretaría de Protección Ambiental
<b>TPH</b>	Hidrocarburos Totales

## INDICE GENERAL

### INTRODUCCIÓN

### CAPÍTULO I :

1	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	18
1.1	<b>Petróleo</b> .....	18
1.1.1	Generalidades.....	18
1.1.2	Formación.....	19
1.1.3	Características Químicas.....	20
1.1.4	Contaminantes.....	21
1.1.4.1	Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	21
1.1.4.2	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	22
1.1.4.3	Metales Pesados.....	24
1.1.4.3.1	Níquel.....	24
1.1.4.3.2	Cadmio.....	25
1.1.4.3.3	Plomo.....	26
1.2	<b>Suelo</b> .....	28
1.2.1	Microbiología del Suelo.....	28
1.2.2	Capacidad de Auto Depuración y las Propiedades del Suelo.....	30
1.3	<b>Acondicionadores</b> .....	32
1.3.1	Arena.....	32
1.3.2	Arrocillo.....	33
1.4	<b>Preparación y Propagación de Inóculos</b> .....	34
1.5	<b>Biorremediación</b> .....	36
1.5.1	Generalidades.....	36
1.5.2	Pruebas de Factibilidad.....	37
1.5.3	Clasificación.....	40
1.5.4	Técnicas.....	41

1.5.5	Ventajas y Desventajas.....	41
1.5.6	Límites Permisibles.....	42
1.6	<b>Bacterias</b> .....	44
1.6.1	Generalidades.....	44
1.6.2	Principales Bacterias Degradadoras de Petróleo.....	46

## **CAPÍTULO II :**

2	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	48
2.1	<b>Materiales</b> .....	48
2.1.1	Lugar Experimental.....	48
2.1.2	Materiales Experimentales.....	49
2.1.2.1	Suelo Contaminado con Petróleo.....	49
2.1.2.2	Sustratos.....	49
2.1.2.3	Cóctel Bacteriano.. ..	50
2.1.3	Materiales de Laboratorio.....	51
2.2	<b>Métodos</b> .....	52
2.2.1	Muestreo.....	52
2.2.1.1	Campo.....	52
2.2.1.2	Laboratorio.....	52
2.2.2	Métodos Analíticos.....	53
2.2.2.1	Determinación de Temperatura.....	53
2.2.2.2	Determinación de Humedad.....	53
2.2.2.3	Determinación de Aerobios Mesófilos.....	53
2.2.2.4	Determinación del Potencial de Hidrógeno.....	54
2.2.2.5	Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	54
2.2.2.6	Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos .....	55
2.2.2.7	Determinación de Níquel, Cadmio y Plomo.....	55
2.2.3	Metodología del Cultivo.....	56
2.2.3.1	Preparación de los Inóculos.....	56
2.2.3.2	Preparación de los Envases utilizados para la Siembra.....	57
2.2.3.3	Preparación de los sustratos para la siembra.....	57



2.2.3.4	Preparación del Biorreactor.....	58
2.3	<b>Diseño Experimental.....</b>	<b>59</b>
2.3.1	Metodología.....	59
2.3.1.1	Tipo de Diseño.....	59
2.3.1.2	Modelo Matemático.....	60
2.3.1.3	Tratamientos.....	61
2.3.1.4	VARIABLES DE CONTROL.....	62
2.3.1.5	Respuestas Experimentales.....	62
2.3.1.6	Codificación de los Tratamientos y Respuestas a Medir.....	62
2.3.1.7	Análisis de Datos.....	66

### **CAPÍTULO III :**

3	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
3.1	Caracterización del Suelo Contaminado con Petróleo.....	67
3.2	Evolución de las Variables de Control.....	68
3.3	Medición de las Respuestas Experimentales.....	71
3.3.1	Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	71
3.3.2	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	74
3.3.3	Níquel.....	78
3.3.4	Cadmio.....	81
3.3.5	Plomo.....	84
3.4	Eficiencia de las Respuestas Experimentales de cada uno de los Tratamientos en Estudio.....	87
3.5	Viabilidad Económica de la Investigación.....	93

### **CAPÍTULO IV :**

4	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>97</b>
4.1	Conclusiones.....	97
4.2	Recomendaciones.....	99

**RESUMEN**

**SUMMARY**

**BIBLIOGRAFIA**

**ANEXOS**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I</b>	Principales HAP`s que causan Contaminación Ambiental.	23
<b>Tabla II</b>	Impactos Ambientales del Petróleo.....	27
<b>Tabla III</b>	Composición Química y Valores Energéticos del Arrocillo (crudo) por 100 gramos.....	33
	Límites Permisibles para la Identificación y Remediación de Suelos	
<b>Tabla IV</b>	Contaminados en todas las fases de la Industria  Hidrocarburífera, incluidas las Estaciones de Servicio...	43
<b>Tabla V</b>	Propiedades del Cóctel Bacteriano.....	50
<b>Tabla VI</b>	Materiales, Equipos y Reactivos utilizados.....	51
<b>Tabla VII</b>	Variables de Control.....	62
<b>Tabla VIII</b>	Respuestas a Medir.....	63
<b>Tabla IX</b>	Codificación de los Tratamientos y Respuestas a Medir...	63
<b>Tabla X</b>	Codificación de las respuestas a medir.....	64
	Representación Generalizada de las Respuestas Experimentales en	
<b>Tabla XI</b>	un Diseño de Bloques.....	65
<b>Tabla XII</b>	Fórmulas para ANOVA de dos factores.....	66
<b>Tabla XIII</b>	Caracterización del Suelo Contaminado.....	67
<b>Tabla XIV</b>	Análisis de Varianza de los TPH.....	72
<b>Tabla XV</b>	Análisis de Datos según Prueba de Tukey para los TPH...	73
<b>Tabla XVI</b>	Análisis de Varianza de los HAP´s.....	76
<b>Tabla XVII</b>	Análisis de Datos según Prueba de Tukey para los HAP´s	76

<b>Tabla XVIII</b>	Análisis de Varianza del Níquel.....	79
<b>Tabla XIX</b>	Análisis de Datos según Prueba de Tukey para el níquel	80
<b>Tabla XX</b>	Análisis de Varianza del Cadmio.....	82
<b>Tabla XXI</b>	Análisis de Datos según Prueba de Tukey para el Cadmio	83
<b>Tabla XXII</b>	Análisis de Varianza del Plomo	85
<b>Tabla XXIII</b>	Análisis de Datos según Prueba de Tukey del plomo.....	86
<b>Tabla XXIV</b>	Valores Proyectados del TPH.....	88
<b>Tabla XXV</b>	Costos de Mano de Obra Directa.....	93
<b>Tabla XXVI</b>	Costos de Materiales Directos.....	94
<b>Tabla XXVII</b>	Gastos de los Equipos utilizados en la Investigación.....	95
<b>Tabla XVIII</b>	Costos de los Reactivos.....	96
<b>Tabla XXIX</b>	Costo total de la Investigación.....	96

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura I</b>	Estructura Bacteriana.....	44
<b>Figura II</b>	Ciclo de Crecimiento Bacteriano.....	45
<b>Figura III</b>	Pseudomonas.....	47
<b>Figura IV</b>	Cámara de Remediación.....	48
<b>Figura V</b>	Piscina Externa-Refinería de Esmeraldas.....	49
<b>Figura VI</b>	Cóctel Bacteriano.....	50
<b>Figura VII</b>	Inóculos bacterianos.....	57
<b>Figura VIII</b>	Biorreactores.....	59
<b>Figura IX</b>	Esquematización de los Tratamientos o Biorreactores.....	61
<b>Figura X</b>	Evolución de la Humedad durante los seis meses	68
<b>Figura XI</b>	Evolución del pH durante los seis meses de Experimentación	69
<b>Figura XII</b>	Evolución de los Aerobios Mesófilos	70
<b>Figura XIII</b>	Crecimiento Microbiano.....	71
<b>Figura XIV</b>	Evolución de los TPH durante los meses de Experimentación	71
<b>Figura XV</b>	Evolución de los HAP's	75
<b>Figura XVI</b>	Evolución del Níquel durante la Experimentación	78
<b>Figura XVII</b>	Evolución del Cadmio durante la Experimentación	81
<b>Figura XVIII</b>	Evolución del Plomo durante la Experimentación.....	84
<b>Figura XIX</b>	Eficiencia del TPH de cada uno de los Experimentos en Estudio	87
<b>Figura XX</b>	Eficiencia del HAP's de cada uno de los Experimentos en Estudio	89
<b>Figura XXI</b>	Eficiencia del Níquel de cada uno de los Experimentos en Estudio	90
<b>Figura XXII</b>	Eficiencia del Cadmio de cada uno de los Experimentos en Estudio	91
<b>Figura XXIII</b>	Eficiencia del Plomo de cada uno de los Experimentos en Estudio	92
<b>Figura XXIV</b>	Suelo Contaminado vs Suelo Biorremediado.....	92

## INDICE DE ANEXOS

- ANEXO I** Hoja de datos de seguridad de materiales de Spartan Chemical Company
- ANEXO II** Composición del Caldo Nutritivo (medio de cultivo)
- ANEXO III** Composición de los Micronutrientes (medio de enriquecimiento)
- ANEXO IV** Condiciones Climatológicas de la Región
- ANEXO V** Valores Medios de las Variables de Control
- ANEXO VI** Valores Medios de las Respuestas Experimentales
- ANEXO VII** Fotografías de Análisis Realizados
- ANEXO VIII** Fotografías de Equipos Utilizados

## INTRODUCCIÓN

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos han generado a nivel mundial un grave problema de contaminación de suelos, es así que en Estados Unidos existen más de 34 mil sitios localizados con algún problema de contaminación del suelo, lo que se estima podrían costar aproximadamente mil millones de dólares rehabilitarlos. A su vez, en Alemania se ubican casi 50 mil sitios contaminados, en tanto que en el Ecuador, particularmente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, y Esmeraldas donde se ha concentrado los procesos de extracción, refinación, transporte y comercialización del petróleo son los lugares donde se registran más problemas de contaminación de suelos por hidrocarburos y que requieren técnicas de descontaminación como biorremediación (22).

Por tal razón el Estado ecuatoriano en los últimos años preocupado de la actual tendencia mundial de evitar, remediar y prevenir la contaminación, ha creado una Legislación Ambiental en materia Hidrocarburífera (Decreto No. 1215), la misma que consta de leyes, decretos, reglamentos y acuerdos que regulan todas las actividades de exploración, producción transporte, industrialización, comercio y almacenamiento del crudo y sus derivados (6).

Por otra parte nuestro país cuenta también con un Ministerio de Ambiente que tiene como objetivo la planificación y control de todas las actividades que puedan causar daño directo o indirecto al ambiente del territorio nacional.

En este sentido es que hoy en día las empresas estatal y privadas han hecho muchos esfuerzos por realizar proyectos basados en la Legislación Ambiental que permitan remediar estos problemas utilizando técnicas biológicas o denominadas de biorremediación que cuentan con la participación de algunos microorganismos que tienen la capacidad de usar a los hidrocarburos contaminantes como fuente de carbono y energía, es decir, para alimentarse, y que una vez aprovechados son desechados en forma de bióxido de carbono y agua, lo que se traduce en menores costos de inversión y con resultados y tiempos más alentadores (23).

Con estos preliminares la ESPOCH a través del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de la Facultad de Ciencias ha desarrollado un proyecto investigativo que esta enmarcado principalmente dentro de la “Biotecnología Ambiental”, en el aspecto de utilizar microorganismos para el tratamiento y control de la contaminación.

Es así que esta investigación hace énfasis en el estudio de inóculos microbianos (cócteles mixtos) en muestras de suelos contaminado con petróleo (provenientes de la Refinería Estatal Esmeraldas) combinadas con minerales y nutrientes, mejorando así su bioreceptibilidad y su capacidad metabólica permitiendo también aumentar la capacidad de oxigenación y mineralización de los hidrocarburos, para después ir evaluando el comportamiento y la selección de los microorganismos con el fin de apuntar información confiable que pueda utilizarse posteriormente para un mejor manejo de la técnica de remediación de suelos.

En la presente investigación se han planteado los siguientes objetivos:



GENERAL:

Estudiar inóculos bacterianos para biorremediar suelos contaminados con petróleo.

ESPECÍFICOS:

1. Realizar la caracterización del suelo contaminado con petróleo mediante análisis físico- químico y microbiológico.
2. Desarrollar los inóculos microbianos
3. Evaluar el grado de biorremediación del suelo en función de la concentración del inóculo y tiempo de degradación.
4. Determinar la viabilidad económica del proyecto para el proceso de biorremediación.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. PETRÓLEO

##### 1.1.1. Generalidades

El petróleo, es un líquido oleoso bituminoso de origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas. También recibe los nombres de petróleo crudo, crudo petrolífero o simplemente “crudo”. Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre, se emplea como combustible y es materia prima para la industria química. Las sociedades industriales modernas lo utilizan sobre todo para lograr un grado de movilidad por tierra, mar y aire. Además, el petróleo y sus derivados se emplean para fabricar medicinas, fertilizantes, productos alimenticios, objetos de plástico, materiales de construcción, pinturas, textiles y para generar electricidad.

En la actualidad, los distintos países dependen del petróleo y sus productos; la estructura física y la forma de vida de las aglomeraciones periféricas que rodean las grandes ciudades son posibles gracias a un suministro de petróleo relativamente abundante y barato. Sin embargo, en los últimos años ha descendido la disponibilidad mundial de esta materia, y su costo relativo ha aumentado (14).

### 1.1.2. Formación

El petróleo es el resultado de un complejo proceso físico-químico en el interior de la tierra, en el que, debido a la presión y las altas temperaturas, se produce la descomposición de enormes cantidades de materia orgánica que se convierten en aceite y gas. Esa materia orgánica está compuesta fundamentalmente por el fitoplancton y el zooplancton marino, al igual que por materia vegetal y animal, lo cual se depositó en el pasado en el fondo de los grandes lagos y en el lecho de los mares. Junto a esa materia orgánica se depositaron mantos sucesivos de arenas, arcillas, limo y otros sedimentos que arrastran los ríos y el viento, todo lo cual conformó lo que geológicamente se conoce como rocas o mantos sedimentarios, es decir, formaciones hechas de sedimentos. Entre esos mantos sedimentarios es donde se llevó a cabo el fenómeno natural que dio lugar a la creación del petróleo y el gas natural. Ese proceso de sedimentación y transformación es algo que ocurrió a lo largo de millones de años.

Entre los geólogos hay quienes ubican el inicio de todo ese proceso por la época de los dinosaurios y los cataclismos. Otros opinan que hoy se está formando de una manera similar el petróleo del mañana. En un comienzo los mantos sedimentarios se depositaron en sentido horizontal. Pero los movimientos y cambios violentos que han sacudido a la corteza terrestre variaron su conformación y, por consiguiente, los sitios donde se encuentra el petróleo. Es por esto que la geología identifica hoy varios tipos de estructuras subterráneas donde se pueden encontrar yacimientos de petróleo: anticlinales, fallas, domos salinos, etc.

En todo caso, el petróleo se encuentra ocupando los espacios de las rocas porosas, principalmente de rocas como areniscas y calizas. Es algo así como el agua que empapa

una esponja. En ningún caso hay lagos de petróleo. Por consiguiente, no es cierto que cuando se extrae el petróleo quedan enormes espacios vacíos en el interior de la tierra. Si tomamos el ejemplo de la esponja, cuando ésta se exprime vuelve a su contextura inicial. En el caso del petróleo, los poros que se van desocupando son llenados de inmediato por el mismo petróleo que no alcanza a extraerse y por agua subterránea (14).

### 1.1.3. Características Químicas

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

Las cadenas se conocen como compuestos alifáticos, y consisten en sucesiones de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) mientras que el resto de las valencias son ocupadas por hidrógenos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos. Los alquenos son conocidos como olefinas y son una fuente valiosa de reactantes para la industria sintética.

Los ciclos pueden ser saturados, donde varios carbonos se unen entre sí por medio de enlaces sencillos, o pueden ser aromáticos, donde algunos carbonos del ciclo están unidos por enlaces dobles. Los ciclos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo. Los

compuestos aromáticos son derivados del benceno, un anillo de seis carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces dobles alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre ellos o sustituidos con cadenas alifáticas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) o polinúcleo-aromáticos comprenden del 10 al 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas (20).

#### 1.1.4. Contaminantes

##### 1.1.4.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo

El término hidrocarburos totales de petróleo (TPH) se usa para describir a un grupo extenso de varios cientos de sustancias químicas derivadas originalmente del petróleo. En este sentido, los TPH son realmente una mezcla de sustancias químicas. Se les llama hidrocarburos porque casi todos los componentes están formados enteramente de hidrógeno y carbono. Los crudos de petróleo pueden tener diferentes cantidades de sustancias químicas; asimismo, los productos de petróleo también varían dependiendo del crudo de petróleo del que se produjeron. Algunos TPH son líquidos incoloros o de color claro que se evaporan fácilmente, mientras que otros son líquidos espesos de color oscuro o semisólidos que no se evaporan.

Los TPH que son liberados al suelo pueden moverse hacia el agua subterránea a través del suelo. Allí, los componentes individuales pueden separarse de la mezcla original dependiendo de las propiedades químicas de cada componente. Algunos de estos componentes se evaporarán al aire y otros se disolverán en el agua subterránea y se alejarán del área donde fueron liberados. Otros compuestos se adherirán a partículas

en el suelo y pueden permanecer en el suelo durante mucho tiempo, mientras que otros serán degradados por microorganismos en el suelo.

Muchos de estos productos tienen un olor característico a gasolina, kerosén o aceite. Debido al gran número de hidrocarburos involucrados, generalmente no es práctico medir cada uno de ellos. Sin embargo, es útil medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburos que se encuentran en una muestra de suelo, agua o aire.

La cantidad de TPH que se encuentra en una muestra sirve como indicador general del tipo de contaminación que existe en el sitio. Sin embargo, la cantidad de TPH que se mide suministra poca información acerca de como hidrocarburos de petróleo específicos pueden afectar a la gente, los animales y las plantas (25).

#### 1.1.4.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman durante la combustión incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y otras sustancias orgánicas como el tabaco.

Los HAP's se encuentran generalmente como mezclas complejas que contienen dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados. Los HAP's de bajo peso molecular son susceptibles de biorremediación, sin embargo, los de alto peso molecular son recalcitrantes a la degradación biológica.

La movilización de los HAP's en el medio ambiente depende de las propiedades de cada uno de ellos, como qué tan fácilmente se disuelven en el agua y qué tan fácilmente

se evaporan en el aire. Algunos HAP's se evaporan a la atmósfera desde las aguas de superficie, pero la mayoría se adhiere a partículas sólidas y se depositan en el fondo de ríos o lagos. En los suelos, es más probable que los HAP's se adhieran firmemente a las partículas. Algunos HAP's se evaporan al aire desde las superficies de los suelos y ciertos HAP's presentes en los suelos también contaminan las aguas subterráneas.

TABLA I. Principales HAP's que Causan Contaminación Ambiental

Número	Compuesto
1	Acenafteno
2	Acenaftileno
3	Antraceno
4	Benzo[a]antraceno
5	Benzo[a]pireno
6	Benzo[e]pireno
7	Benzo[b]fluoranteno
8	Benzo[g,h,i]perileno
10	Benzo[k]fluoranteno
11	Criseno
12	Dibenzo[a,h]antraceno
13	Fluoranteno
14	Fluoreno
15	Indeno[1,2,3-c,d]pireno
16	Fenantreno
17	Pireno

Los HAP's pueden degradarse en productos de larga duración al reaccionar con la luz solar y otras sustancias químicas presentes en el aire, generalmente durante un período que dura de días a semanas. La degradación en el suelo y en el agua toma generalmente entre semanas y meses y es causada principalmente por la acción de los microorganismos (24).

#### 1.1.4.3. Metales Pesados

Los Metales Pesados son aquellos elementos cuya densidad es igual o superior a 5 g/cm<sup>3</sup> cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos.

La presencia natural de metales en el suelo es en cantidad de trazas, es decir inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. El riesgo se produce cuando se acumulan en grandes cantidades en el suelo.

##### 1.1.4.3.1. Níquel

El níquel puro es un metal duro, blanco-plateado, que tiene propiedades que lo hacen muy deseable para combinarse con otros metales y formar mezclas llamadas aleaciones.

El níquel ocupa el lugar número 24 en la lista de elementos más abundantes. En el ambiente se encuentra principalmente combinado con oxígeno o azufre en forma de óxidos o sulfuros.

El centro de la tierra está compuesto de 6% de níquel. El níquel es liberado a la atmósfera por industrias que fabrican o usan níquel, aleaciones de níquel o compuestos de níquel. Estas industrias también pueden desechar níquel en aguas residuales.



El níquel también es liberado a la atmósfera por plantas de energía que queman petróleo o carbón y por incineradores de basura. Además el níquel que es emanado por las chimeneas de éstas industrias se adhieren a pequeñas partículas de polvo que se depositan en el suelo o son removidas del aire en la lluvia o la nieve.

Generalmente el níquel tarda días en ser removido del aire. Si el níquel se adhiere a partículas muy pequeñas, puede tardar más de un mes en depositarse en el suelo. El níquel también puede ser liberado en aguas residuales de industrias. Una gran cantidad de níquel liberada al ambiente termina en el suelo o en sedimento en donde se adhiere fuertemente a partículas que contienen hierro o manganeso. Las condiciones acídicas favorecen la movilización del níquel en el suelo y facilitan su filtración hacia el agua subterránea (26).

#### 1.1.4.3.2. Cadmio

El Cadmio es un metal raro y poco abundante. Se halla normalmente combinado con otros elementos, como oxígeno, cloro o azufre (sulfato y sulfito de cadmio). Su uso es bastante nuevo ya que antes de la segunda guerra mundial prácticamente no había demanda de este metal, y se asociaba a una impureza de zinc y plomo, con lo que era desechado, produciendo grandes áreas de contaminación alrededor de la industria del zinc y plomo. Actualmente se sigue relacionando la contaminación por cadmio con este tipo de industria, aunque también existen otras fuentes de emisión como la quema de combustibles fósiles, la incineración de basuras, la combustión de carbón y en la industria del acero.

La emisión de metales pesados al medio ambiente puede producir daños a nivel global, regional o local. En el caso del cadmio, se ha visto que la relación de contaminación es de regional a local (27).

#### 1.1.4.3.3. Plomo

El plomo es un metal pesado, de baja temperatura de fusión, de color gris-azulado que ocurre naturalmente en la corteza terrestre. Sin embargo, raramente se encuentra en la naturaleza en la forma de metal. Generalmente se encuentra combinado con otros dos o más elementos formando compuestos de plomo.

El plomo se encuentra en el ambiente en forma natural. Sin embargo, los niveles ambientales de plomo han aumentado más de mil veces durante los tres últimos siglos como consecuencia de la actividad humana.

El plomo puede entrar al ambiente a través de liberaciones desde minas de plomo, desde fábricas que manufacturan o usan plomo, aleaciones de plomo y compuestos de petróleo plomo.

Una vez que el plomo cae al suelo, se adhiere fuertemente a partículas en el suelo y permanece en la capa superior del suelo durante muchos años. Es por esta razón que los usos del plomo en el pasado, por ejemplo en la gasolina con plomo, pinturas y plaguicidas han tenido un impacto tan importante en la cantidad de plomo que se encuentra en el suelo (28).

TABLA II. Impactos Ambientales del Petróleo

Contaminante	Impactos
TPH (n-hexano)	Pueden afectar el sistema nervioso central. La ingestión de algunos productos de petróleo tales como gasolina y kerosén, produce irritación de la garganta y el estómago, depresión del sistema nervioso, dificultad para respirar y neumonía.
HAP's (Antraceno, Pireno, Fenantreno)	Son fuertemente irritantes de la piel. Pueden producir enrojecimientos, lesiones, cáncer de piel, de testículos y de pulmones.
Metales pesados (Ni, Cd, Pb, Hg)	Todos estos metales producen alto riesgo a la salud humana y tienen la capacidad de bioacumularse en seres vivos y entrar a formar parte de las cadenas de alimentos. Producen irritaciones de la piel, problemas reproductivos y cáncer.
Monóxido de carbono (CO)	Produce lesiones de corazón, músculos y cerebrales. Puede ser mortal en espacios cerrados.
Óxidos de Nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	Al unirse con el agua forma ácido nítrico que con los hidrocarburos no quemados aumentan el efecto invernadero, la lluvia ácida y causa problemas respiratorios.
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	Contribuye al efecto invernadero.

## 1.2. SUELO

### 1.2.1. Microbiología del Suelo

El suelo es un sistema abierto en el espacio y en el tiempo que evoluciona constantemente hasta alcanzar el equilibrio con las condiciones ambientales y a partir de ese momento tiende a permanecer estable.

La profundidad del suelo y sus propiedades físico-químicas varían de acuerdo con el lugar, pero en general el suelo tiene cinco componentes principales:

- Partículas minerales inorgánicas. Estas partículas, compuestas principalmente de aluminio, sílice y cantidades menores de otros minerales, varían en cuanto a tamaño desde arcillas muy pequeñas (0.002mm) hasta granos de arena y guijarros.
- Residuos orgánicos. Son restos vegetales y animales que forman el componente orgánico del suelo a través de diversas etapas de descomposición las cuales culminan en una sustancia estable conocida como humus. Los suelos orgánicos (que contienen principalmente residuos orgánicos) se encuentran en las turberas y pantanos.
- Agua. El agua es necesaria para la actividad microbiana. La cantidad de agua presente en el suelo depende de varios factores que incluyen la precipitación, la estructura del suelo y la población microbiana. El agua se encuentra en los poros que existen entre las partículas de los suelos saturados o absorbida en la superficie de las partículas en los suelos secos. Diversos nutrientes se disuelven en el agua y por tanto están disponibles para los microorganismos.

- Gases. Los gases, principalmente nitrógeno y oxígeno pero también dióxido de carbono (en particular cuando hay actividad biológica), ocupan los poros que no están llenos por agua. En los suelos saturados se disuelven pequeñas cantidades de gases en el agua.
- Sistemas biológicos. Los sistemas biológicos constituyen el quinto componente del suelo. Un gramo de suelo agrícola rico puede contener 2,500 millones de bacterias, 500,000 hongos, 50,000 algas y 30,000 protozoarios.

Las principales funciones de los sistemas biológicos son:

- La descomposición de la materia orgánica en materia inorgánica sencilla:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$  (mineralización).
- La síntesis de una nueva materia orgánica a partir de  $\text{CO}_2$ . (los microorganismos pueden utilizar fuentes de energía muy variada. Incluso, en zonas profundas de la Tierra, se puede utilizar el hidrógeno de las rocas basálticas, y producir metano).
- Sirven de nutrientes para otros organismos.
- Modifican sustancias para que sean utilizadas por otros organismos.
- Producen compuestos inhibitorios que pueden dificultar la supervivencia de otros organismos y de ellos mismos.

Los sustratos más complejos que normalmente pueden utilizar los microorganismos son:

- Almidón (glucosa)
- Celulosa (glucosa)
- Lignina (fenilpropano)

- Quitina (N-acetilglucosamina)
- Proteínas (aminoácidos)
- Hidrocarburos (alifáticos, cíclicos, aromáticos)
- Lípidos (glicerol, ácidos grasos, otros)
- Biomasa (otros microorganismos)

Los microorganismos que se encuentran más a menudo en un suelo son:

- Las *arqueobacterias* (metanógenas, hipertermófilas).
- Las bacterias Gram positivas con diferentes grados de ramificación constituyen una parte importante de la comunidad microbiana del suelo (*Corineformes* como *Arthrobacter*, *Nocardioformes* como *Nocardia*, *Actinomicetos* como *Streptomyces*). Desempeñan un papel importante en la degradación de los hidrocarburos, materiales vegetales viejos y el humus. *Streptomyces* produce un compuesto oloroso denominado geosmina que confiere al suelo su olor característico a tierra mojada.
- Las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, en niveles con mayor concentración de nutrientes (7).

#### 1.2.2. Capacidad de Auto Depuración y las Propiedades del Suelo

El suelo puede considerarse como un sistema depurador porque es capaz de degradar o inmovilizar los contaminantes.

El poder de amortiguamiento de un suelo representa la capacidad que tiene un suelo de inactivar los efectos negativos de los contaminantes. Esta beneficiosa acción se puede ejercer por varios mecanismos:

- Neutralización
- Degradación biótica
- Adsorción
- Insolubilización

La capacidad depuradora depende fundamentalmente de determinadas características de los horizontes superficiales:

- La actividad microbiológica. Que facilita la descomposición e inmovilización de los contaminantes.
- La arcilla y la materia orgánica. Que mediante reacciones físico-químicas adsorben a los contaminantes y permiten su inmovilización o liberación.
- La capacidad filtrante. Que va a regular la factibilidad de penetración de los contaminantes.

Estas acciones dependerán de determinadas propiedades del suelo que influyen en los mecanismos de auto depuración:

- Textura. Los suelos de textura arcillosa tienen una alta capacidad de auto depuración.
- Estructura. Los agentes contaminantes pueden provocar la destrucción de la estructura, por dispersión, si contienen altos contenidos en sodio.
- Porosidad y permeabilidad. Facilitan la circulación de los contaminantes en el suelo y pueden eliminar rápidamente los contaminantes y traspasarlos a los niveles freáticos.

- Capacidad de cambio iónico. Aumenta la capacidad de auto depuración al fijar los contaminantes sobre la superficie de las partículas.
- Salinidad. Los contaminantes pueden aumentar la salinidad y como consecuencia disminuir la estabilidad del suelo.
- pH. Los contaminantes pueden acidificar el suelo, por vertidos o por oxidación de sulfuros y óxidos nitrosos, con lo que aumenta la vulnerabilidad del suelo.
- Eh. El ambiente oxidante aumenta el poder auto depurador al facilitar la actividad microbiana de descomposición.
- Los gases del suelo. Ejercen también un importante papel, proporcionando el suficiente oxígeno para la actividad microbiana.

De cualquier forma, por muy favorables que sean las características del suelo, es evidente que la capacidad depuradora no es limitada. El suelo no puede asimilar, inmovilizar, inactivar y degradar todos los contaminantes que recibe y por ello en un determinado momento, cuando se superan unos determinados umbrales, puede transferir los contaminantes a otros medios e incorporarlos en las cadenas tróficas (23).

### 1.3. ACONDICIONADORES O SUSTRATOS

#### 1.3.1. Arena

La arena es un conjunto de partículas de rocas disgregadas de materias minerales en estado granular fino, que consta normalmente de cuarzo (sílice) con una pequeña proporción de mica, feldespato, magnetita y otros minerales resistentes. Su tamaño varía entre 0,063 y 2mm.



La arena es un constituyente muy importante de muchos suelos ya que debido a la proporción de sus partículas determina la retención de agua, la estructura del suelo y la disponibilidad de aire y nutrientes.

### 1.3.2. Arrocillo

El arrocillo o arroz quebrado pertenece a la familia de las Gramíneas (*Gramineae*), de la especie *Oryza sativa*.

TABLA III. Composición Química y Valores Energéticos del

Arrocillo (crudo) por 100 gramos.

Componente	Cantidad
Agua	12 %
Energía	363 Kcal.
Proteínas	6,7 g
Carbohidratos	80 g
Fibras	0,1 g
Calcio	24 mg
Fósforo	94 mg
Hierro	0,8 mg
Sodio	5 mg
Potasio	92 mg
Tiamina	0,07 mg
Riboflavina	0,03 mg
Niacina	1,6 mg

El arroz quebrado es un subproducto que se obtiene durante el proceso de la elaboración del arroz blanco y se ha convertido en un comestible muy utilizado en la alimentación de varios países del mundo debido a las diferentes propiedades nutricionales que este alimento contiene en su interior (17).

#### 1.4. PREPARACIÓN Y PROPAGACIÓN DE INÓCULOS

El punto de partida de cualquier biorreactor es un recipiente limpio que ha sido esterilizado y rellenado con el medio de cultivo estéril. Posteriormente, al reactor biológico se inocula con el microorganismo adecuado. El tamaño del inóculo generalmente es del orden del 1-10% del volumen total del medio, si es inferior a esta proporción puede existir un excesivo período de latencia.

Para evitar estos problemas, la propagación de inóculos se lleva a cabo en cuatro etapas:

- Etapa I Preservación del Inóculo. La preservación de las cepas de producción a lo largo de un período de tiempo es un requerimiento básico para la fermentación práctica. Los microorganismos pueden ser mantenidos viables fácilmente a través de un período de transferencia, pero lo que debe ser preservado es su capacidad de formar producto. Debe encontrarse un método óptimo de preservación para cada proceso, es decir para cada cepa. Entre las técnicas más utilizadas tenemos: Almacenamiento a baja temperatura (2-5°C), almacenamiento por congelación y liofilización.
- Etapa II Crecimiento del Inóculo. El cultivo preservado se reaviva inicialmente mediante crecimiento en un cultivo líquido o en medio sólido. Las condiciones utilizadas en el cultivo inicial (medio, temperatura de incubación, etc.) dependerán

del proceso específico. El sustrato para la producción de grandes cantidades de esporas es generalmente un material granular como miga de pan, arroz o cebada. Para obtener rendimientos óptimos no solo influye el número de células y esporas sino también el medio nutritivo utilizado para el inóculo, la temperatura de crecimiento y la edad del inóculo.

- Etapa III Precultivo en Biorreactores. A fin de obtener suficiente inóculo para el biorreactor de producción, deben realizarse precultivos en reactores biológicos más pequeños. Si un biorreactor de producción se inicia con muy poco inóculo, el crecimiento se retrasa.
- Etapa IV Biorreactor de Producción. Se puede tener dos procesos: fermentación discontinua y fermentación continua. Dependiendo de la fermentación se utilizan reactores de varios tamaños. Los parámetros más importantes a controlar en un biorreactor de producción son:
  - 1) Temperatura. La fermentación son llevadas a cabo en el rango mesófilo (20 a 45 °C) o en el termófilo (>45°C). Debe escogerse la temperatura apropiada para conseguir el máximo crecimiento por una parte y la formación óptima del producto por otra.
  - 2) Aireación. La velocidad de aireación es 0.25 – 1.0 volumen de aire<sup>7</sup> volumen de líquido minuto. La velocidad de aireación debe ser ajustada a la cantidad de O<sub>2</sub> que se requiere.
  - 3) Presión. A fin de minimizar el riesgo de contaminación se utiliza una sobre presión de 0,2-0.5 bar.

- 4) Agitación. En biorreactores industriales, a fin de poder ajustar la velocidad de agitación en el proceso es deseable la instalación de un sistema de movimiento continuo (15).

## 1.5. BIORREMEDIACIÓN

### 1.5.1. Generalidades

La Biorremediación es una técnica innovadora que se ha desarrollado en la década de los 80 y 90, la cual ha sido aplicada exitosamente en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Se caracterizan por ser una técnica de bajos costos de operación.

La Biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos contaminados en contraste a alternativas más costosa y de menor aceptación pública como la incineración. Los tratamientos biológicos de degradación en suelos pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son mejoradas

El tratamiento biológico de suelos contaminados involucra el uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares (21).

### 1.5.2. Pruebas de Factibilidad

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

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

1) La caracterización de las propiedades físico-químicas del material (suelo, lodo, sedimento) a tratar y del contaminante, que consiste en la determinación de varias propiedades importantes para la biorremediación, tales como:

- Tipo de hidrocarburos. Mejor con combustibles, lubricantes, petróleo crudo. Más difícil con aceite hidráulico, hidrocarburos muy viscosos, o hidrocarburos contaminados con otros compuestos (como metales, plaguicidas, etc.).
- Tipo de material. Mejor con materiales de textura mediana o franca, con alto contenido de materia orgánica. Más difícil con materiales muy arcillosos.
- pH. En zonas pantanosas, o en algunos suelos ácidos de la sabana (como los ferrosoles y acrisoles) se puede manejar un pH de 4 a 6 sin mucho problema si se utilizan bacterias nativas. En la mayoría de suelos un pH de 6 a 8 es más adecuado.
- Salinidad. Puede variar mucho. Si está en una zona de manglares debe de usar bacterias nativas, las cuales son adaptadas a las condiciones.
- Aireación. Es importante mantener condiciones aerobias debido a que las tasas de biodegradación en condiciones anóxicas son aproximadamente 50 a 100 veces

menores. Esto se logra utilizando un buen sistema de drenaje, y aireando el suelo frecuentemente.

- Lixiviados. Es importante tener un buen sistema para coleccionar los lixiviados de una celda (biorreactor). Estos se pueden usar para rehumedecer la celda, así conservando los nutrimentos y bacterias en ella.
- Techo. Es muy recomendable usar un techo sobre las celdas (biorreactores) en climas tropicales debido a las lluvias fuertes que pueden inundar una celda.
- Nutrimentos. Se necesita mantener las concentraciones de nutrimentos inorgánicos en el rango de aprox. 100 ppm N, >10 ppm P, y >1 ppm K. El empleo de fertilizantes agrícolas comunes frecuentemente cumple con esta necesidad.
- Temperatura. La biorremediación funciona en un rango de temperatura de aprox. 5 a 40 °C, pero es mejor en una temperatura de aprox. 30 a 35 grados, idóneo para climas tropicales.
- Bacterias nativas. Es probablemente también o mejor usar las bacterias nativas del sitio debido a que éstas ya están adaptadas a las condiciones particulares del sitio, y su desarrollo cuesta mucho menos que la compra de fórmulas comerciales de bacterias.
- Acondicionadores. Para mejorar el drenaje y mantenimiento de humedad en el biorreactor se puede agregar otros materiales como arena, paja, cáscara de nuez, arcillo, etc.
- Humedad. Es necesario mantener la humedad de un biorreactor en el rango de aprox. 50 a 75 % de la capacidad de campo del material a tratar (ya con su acondicionamiento).

2) La determinación del potencial de los microorganismos del sitio para descomponer los hidrocarburos.

El potencial de los microorganismos para la biodegradación se puede obtener de una manera rápida para sólo ver si existen bacterias en un estado activo, o de una manera más a fondo para determinar las condiciones óptimas de biorremediación y aproximar el tiempo requerido para sanear el sitio.

La prueba rápida se hace en fase líquida, agregando un poco de hidrocarburo a un medio que contiene nutrimentos inorgánicos en concentraciones abundantes. A esta mezcla se agrega un poco de suelo, o un filtrado de suelo del sitio y se coloca la mezcla en un agitador para airearla. Se mide el crecimiento de los microorganismos por espectrometría. Esto le ayuda a averiguar si existen bacterias en el sitio que son capaces de descomponer hidrocarburos, y si su crecimiento es relativamente rápido o lento. El estudio de biodegradación más intensivo trata de simular las condiciones de campo en laboratorio. En el caso de un tratamiento de suelos, normalmente se coloca el suelo con sus acondicionadores y nutrimentos (y a veces bacterias comerciales) en un contenedor, como una charola. Manualmente se mantienen las condiciones de aireación y humedad como se propone hacer en el campo, agregando agua cuando es necesario, y removiendo el suelo para airearlo periódicamente. Puede variar el manejo de varios contenedores para probar la eficiencia de diferentes tratamientos, incluyendo: diferentes concentraciones de nutrimentos, empleo de acondicionadores, como paja o arena, uso de un surfactante u otros productos como fórmulas comerciales de bacterias (si se cree que las bacterias nativas no tendrían una capacidad alta de biodegradación). De estas charolas se toman muestras periódicamente para determinar concentraciones de

hidrocarburos, reducción en toxicidad, y posiblemente otros parámetros, como nutrientes, pH y actividad microbiana.

Este segundo tipo de estudio más intensivo de biodegradación es más costoso y tardado, pero es una inversión en el proyecto que ayuda en optimizar el proceso, determinar cuáles son las mejores condiciones para la biodegradación de hidrocarburos en un sitio en particular, así como estimar la tasa de biodegradación y así el tiempo para terminar el proyecto a escala industrial (18).

### 1.5.3. Clasificación

La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos:

a) Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos y metales pesados. Un ejemplo de la fitorremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio. Por medio de estudios realizados se encontraron que el uso de esta especie lograba eliminar más de 8 mg/Kg de cadmio y 200 mg/Kg de zinc, representado estos valores el 43 y 7 por ciento de estos metales en un suelo agrícola, respectivamente.

b) Biorremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.

c) Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de



microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, *cianobacterias* y *actinomicetes* para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

#### 1.5.4. Técnicas

Las técnicas de biorremediación más utilizadas son:

- Intrínseca. El propio medio ambiente resuelve el problema si se dan las condiciones óptimas, aunque se controla el proceso por si se produjesen compuestos tóxicos secundarios.
- In-situ. Se acelera el proceso en el mismo medio modificando las condiciones ambientales (pH, nutrientes, humedad, temperatura, oxígeno, etc.), añadiendo nutrientes para multiplicar los organismos del lugar, o inoculando organismos más eficaces para el vertido concreto. La adición de nutrientes es la opción más económica y la que ofrece más posibilidades de éxito hoy día.
- Ex-situ. El contaminante se extrae y se degrada en otro sitio en condiciones controladas de laboratorio (22).

#### 1.5.5. Ventajas y Desventajas

Ventajas

- Cuando se usa correctamente no produce efectos adversos significativos.
- Ofrece una solución más simple y completa que las tecnologías mecánicas.

- Generalmente solo origina cambios físicos menores sobre el medio.
- Puede ser útil para retirar algunos de los compuestos tóxicos del petróleo.
- Menos costosa que otras tecnologías.

#### Desventajas

- Para muchos tipos de vertidos su efectividad no ha sido determinada.
- Tiempo necesario para actuación es largo.
- Su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado.
- Muy difícil su aplicación en el mar.
- Su implementación es específica para cada lugar contaminado.

#### 1.5.6. Límites Permisibles

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.

TABLA IV. Límites Permisibles para la Identificación y Remediación de Suelos Contaminados en todas las Fases de la Industria Hidrocarburífera, incluidas las Estaciones de Servicios.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas Sensibles
Hidrocarburos Totales	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	C	mg/Kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/Kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/Kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/Kg	<100	<500	<80

El monitoreo consistirá de una caracterización inicial del sitio y/o materiales a remediarse, un monitoreo de por lo menos un muestreo con los respectivos análisis cada seis meses, y una caracterización final una vez incluidos 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 Ambiental (6).

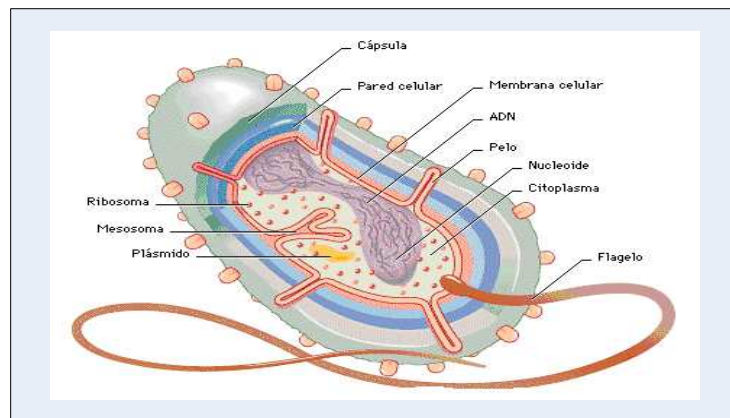
## 1.6. BACTERIAS

### 1.6.1. Generalidades

Las bacterias son organismos unicelulares y microscópicos (procarióticos), que carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla.

Las bacterias son muy pequeñas, entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  de longitud, y muy variables en cuanto al modo de obtener la energía y el alimento. Están en casi todos los ambientes: en el aire, el suelo y el agua, desde el hielo hasta las fuentes termales; incluso en las grietas hidrotermales de las profundidades de los fondos marinos pueden vivir bacterias metabolizadoras del azufre.

FIGURA I. Estructura Bacteriana



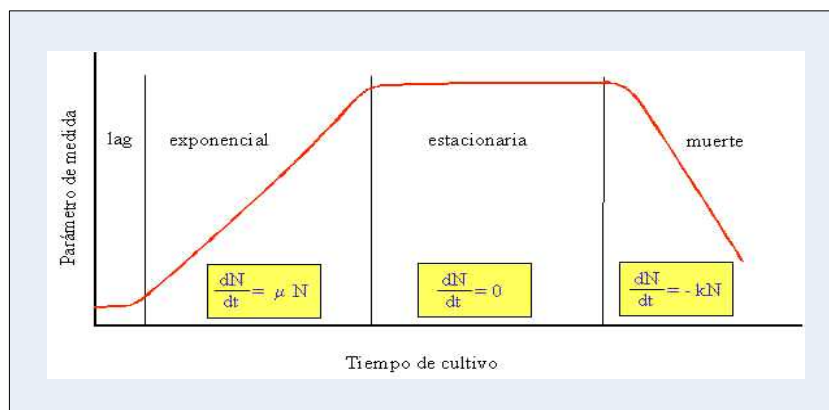
Las bacterias se suelen clasificar siguiendo varios criterios: por su forma, en cocos (esféricas), bacilos (forma de bastón), espiroquetas y espirilos (con forma espiral); según la estructura de la pared celular, por el comportamiento que presentan frente a la tinción de Gram (positivos y negativos); en función de que necesiten oxígeno para vivir o no (aerobias o anaerobias); según sus capacidades metabólicas o fermentadoras; por

su posibilidad de formar esporas resistentes cuando las condiciones son adversas, y en función de la identificación serológica de los componentes de su superficie y de sus ácidos nucleicos.

Las bacterias tienen un ciclo de crecimiento bastante acelerado en el cual se diferencian las siguientes fases:

- Fase lag o de adaptación. Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o logarítmica. En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.

FIGURA II. Ciclo de Crecimiento Bacteriano



- Fase estacionaria. En ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia

en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias. Los microorganismos entran en fase estacionaria, porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

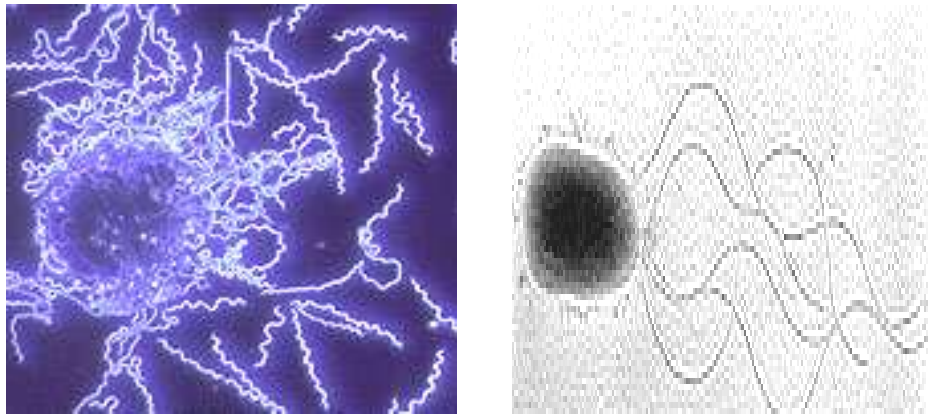
- Fase de muerte. Se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (2).

#### 1.6.2. Principales Bacterias Degradadoras de Petróleo

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo, siendo hasta el presente los géneros más utilizados: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Rhodotorula*.

Las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica.

FIGURA III. Pseudomonas



Además, aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más ó menos específicas de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua. En algunas ocasiones no es necesario llegar a la mineralización, sino que basta una oxidación para disminuir notablemente su toxicidad o aumentar su solubilidad en agua, incrementando su biodisponibilidad (16).

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. MATERIALES

##### 2.1.1. Lugar Experimental

Esta investigación se realizó en un espacio cerrado (cámara de remediación), ubicado detrás del Laboratorio del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (LAB-CESTTA) de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en condiciones controladas de humedad (60 - 80%) y temperatura (28 - 35 °C).

Figura IV. Cámara de Remediación





## 2.1.2. Materiales Experimentales

### 2.1.2.1. Suelo Contaminado con Petróleo

La muestra de suelo fue tomada de la piscina externa de la Refinería Estatal Esmeraldas ubicada a  $0^{\circ} 56' 13''$  N y  $79^{\circ} 4' 26''$  W en la Provincia de Esmeraldas.

Figura V. Piscina Externa-Refinería Estatal Esmeraldas



### 2.1.2.2. Acondicionadores o Sustratos

- Arena
- Arrocillo o arroz quebrado

### 2.1.2.3. Cóctel Bacteriano

Para la presente investigación se utilizó un cóctel bacteriano (CONSUME POW WASTE WATER TREATMENT) proporcionado por el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA).

Figura VI. Cóctel Bacteriano



TABLA V. Propiedades del Cóctel Bacteriano

Item	Parámetro	Contenido
1	Aspecto	Polvo granular
2	Color	Café
3	pH	6,5 a 9,0
5	Fosfatos	Libre
6	<i>Salmonella</i> , no tóxicas	Libre
7	Microorganismos	Varios

2.1.3. Materiales de Laboratorio

TABLA VI. Materiales, Reactivos y Equipos utilizados

Materiales	Reactivos	Equipos
Balones de aforo 100 mL	Acetonitrilo	Autoclave
Balones volumétricos 500mL	Agua destilada	Balanza de precisión
Cápsulas de porcelana	CaCl <sub>2</sub>	Cámara de flujo laminar
Espátula	Caldo nutritivo	Computadora
Frascos bacteriológicos 500 mL	CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	Detector de fluorescencia
Frascos estériles 100 mL	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Espectrofotómetro de absorción atómica
Guantes desechables	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ° HPLC	Estufa
Mascarilla	FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	Hach
Matraces 125mL	HClO <sub>4</sub> ° Analítico	Incubadora
Micropipeta 1000 µL	HNO <sub>3</sub> ° Analítico	Mufla
Mortero y pistilo	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	pH metro
Papel filtro	KCl	Refrigeradora
Pinza metálica	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Rotavapor
Pipeta graduada 10 mL	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Pipeta volumétrica 1mL	NaNO <sub>3</sub>	
Probeta 250 mL	MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	
Puntas estériles	MgSO <sub>4</sub> . 3 H <sub>2</sub> O	
Reverberos	Peptona	
Soxhlets 1000 mL	Petriefilm	
Termómetro	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	
Tubos bacteriológicos	Urea	
Vaso de precipitación 50 mL		
Vidrios reloj		

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Muestreo

#### 2.2.1.1. Campo

El muestreo de campo que se realizó en la presente investigación tuvo como objetivo primordial el obtener una muestra representativa de la cantidad de suelos contaminados que se disponen en la piscina externa de la Refinería Estatal Esmeraldas.

Para ello se delimito un área de 300 m<sup>2</sup> en la cual se procedió a realizar un muestreo al azar en donde se recolectaron submuestras (10) con un barreno a una profundidad de 20 cm, las mismas que fueron mezcladas en fundas plásticas impermeables formando así una muestra compuesta (25 Kg), para poder luego ser enviadas al laboratorio para su respectivo análisis.

Se escogió este tipo de muestreo debido a la composición heterogénea que presentan estos tipos de suelos ya que no se pudo precisar grupos en iguales condiciones o separarlos por estratos.

#### 2.2.1.2. Laboratorio

Para el muestreo de cada una de los tratamientos o biorreactores en el LAB-CESTTA, se procedió a colocar el suelo sobre una lona o plástico limpio, en la cual se hizo una homogenización del suelo para luego proceder a un cuarteo del suelo, el mismo que consiste en dividir a cada muestra en 4 partes iguales de las cuales se toma las dos partes diagonales para volver a repetir este mismo procedimiento, hasta obtener una muestra representativa de cada unidad experimental.

## 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 marcas cada 0.1°C sobre el tubo capilar y una capacidad térmica mínima que permite un equilibrado rápido.

1.2. Alternativa determinación con sensor de temperatura.

#### 2. Referencia:

APHA/AWWA/WEF Standard Methods N° B 2550

### 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 Aeróbios Mesófilos

#### 1. Principio:

Disolución del suelo contaminado en agua peptonada (1: 9), homogenización, siembra en el medio de cultivo (PETRIFILM) e incubación a 44.5°C por 2 días.

2. Referencias:

2.1. INEN 15295, 1990

2.2. ISO 4833, 2003

2.2.2.4. Determinación del Potencial Hidrógeno

1. Principio:

Disolución del suelo contaminado en agua destilada y determinación mediante un medidor de pH que consta de un potenciómetro, un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia y un dispositivo para compensar la temperatura, confiable y reproducible.

2. Referencia:

APHA/AWWA/WEF Standard Methods N° 4500-H<sup>+</sup>B

2.2.2.5. Determinación de Hidrocarburos Totales

1. Principio:

1.1. Extracción con cloruro de metileno, cromatografía de gases y determinación FID (GC/FID).

1.2. Extracción con freón, remoción de sustancias polares en el extracto y determinación por espectroscopía infrarrojo.

2. Referencias:

2.1. Publication N°. ECY 97-602 (Washington, Junio de 1997).

2.2. EPA 413.1; 1664 (SGT-HEM)

2.3. ASTM D3921-96

#### 2.2.2.6. Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

##### 1. Principio:

Extracción; determinación por cromatografía de gases (GC) o HPLC.

##### 2. Referencias:

EPA SW-846 Métodos 8100 o 8310

#### 2.2.2.7. Determinación de Níquel, Cadmio y Plomo

##### 1. Principio:

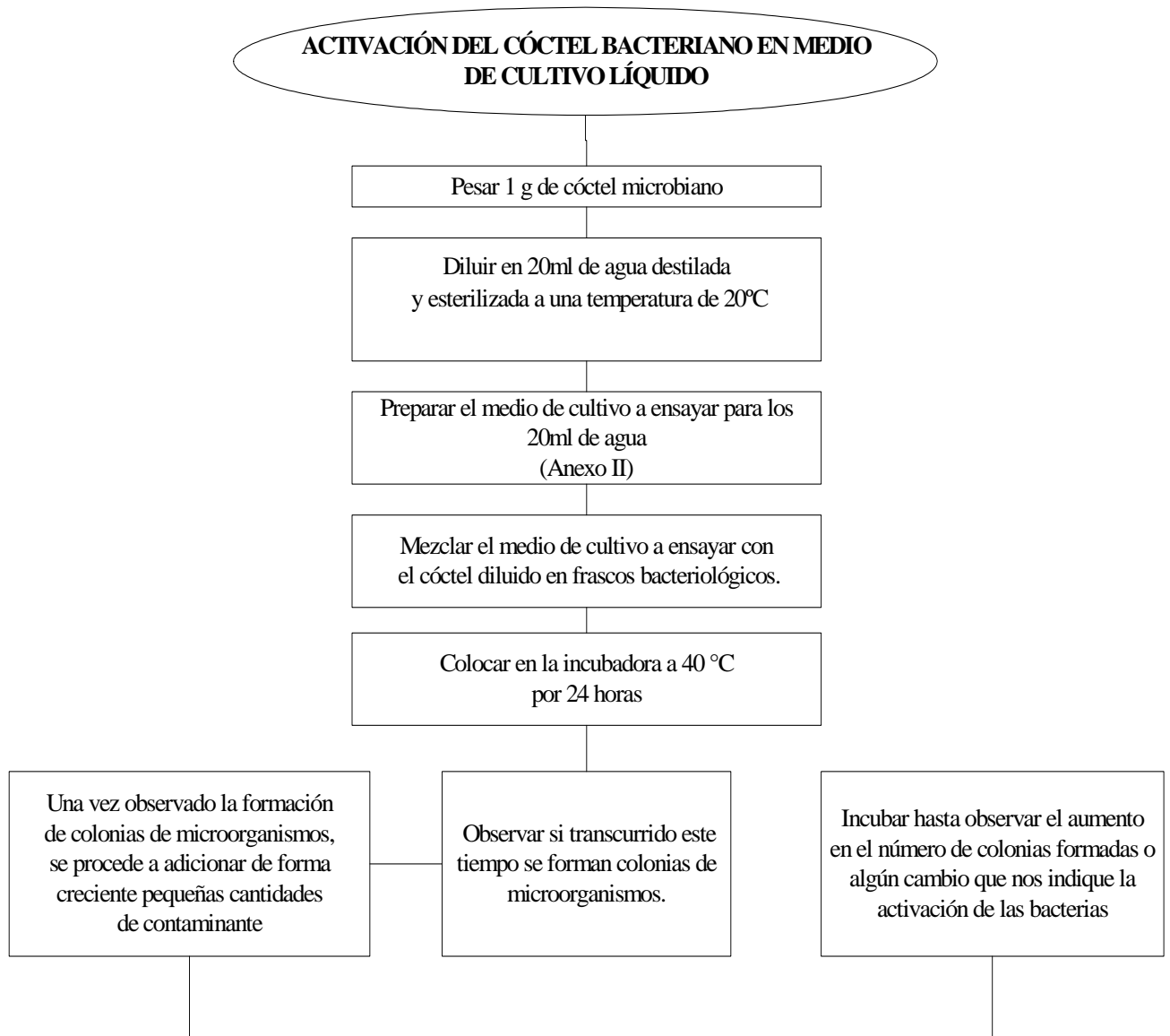
Digestión ácida de la muestra y determinación directa por espectroscopia de absorción atómica.

##### 2. Referencias:

EPA SW-846 Métodos 3050B, 7130, 7520, 7420

### 2.2.3. Metodología del Cultivo

#### 2.2.3.1. Preparación de Inóculos Bacterianos



Nota: Según Robert E. Hinchey y Catherine M. Vogel en su libro de "Microbial Processes for Bioremediation", manifiestan que, para conocer si los microorganismos son aptos para la biorremediación deben formar colonias en 24 a 48 horas de incubación con una concentración de contaminantes dado a una temperatura entre 40 a 60°C.



Figura VII. Inóculos Bacterianos



#### 2.2.3.2. Preparación de los envases utilizados para la siembra

- Se utilizaron canastillas de plástico con las siguientes dimensiones 27 cm de largo por 18 cm de ancho y 10 cm de alto. Además se utilizó frascos bacteriológicos de 500 ml.
- Las canastillas pasaron por un proceso de esterilización que consiste en un lavado previo con agua hirviendo por dos ocasiones y desinfectadas con etanol al 90 %.
- Mientras que los frascos bacteriológicos se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave.

#### 2.2.3.3. Preparación de los sustratos para la siembra

Para la presente investigación se utilizaron como sustratos la arena y arrocillo o arroz quebrado, los cuales fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- Se limpia y se eliminan cuerpos extraños de los sustratos
- En un autoclave se esterilizaron los sustratos por un tiempo aproximado de 20 minutos, este proceso se repitió por dos ocasiones.
- Posteriormente los sustratos son colocados en un mesón limpio a temperatura ambiente por unos 30 min. aproximadamente y están listos para su utilización.

#### 2.2.3.4. Preparación del Biorreactor

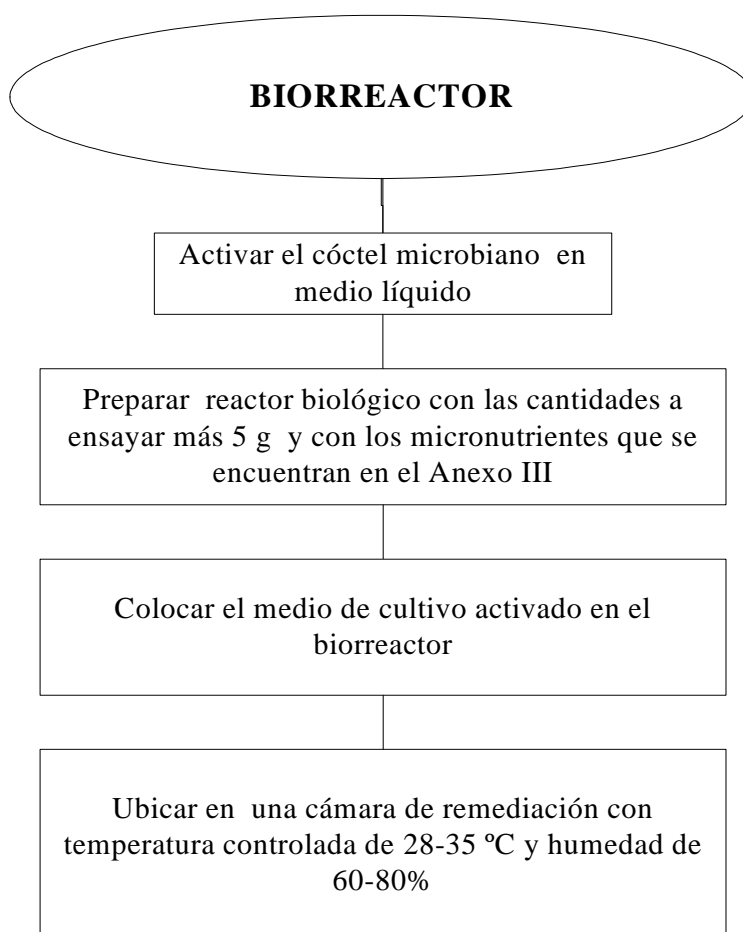


Figura VIII. Biorreactores



## 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.3.1. Metodología

#### 2.3.1.1. Tipo de Diseño

Para la presente investigación se utilizó un diseño unifactorial con bloques totalmente aleatorizados de efectos fijos. En vista de que se quiere resolver el contraste de la igualdad de los tratamientos, previo estudio de la influencia de los bloques (tiempo) y de las comparaciones múltiples de modo que obtengamos conclusiones sobre el experimento planteado. Además se quiere resolver las posibles interacciones bloque-tratamiento.

### 2.3.1.2. Modelo Matemático

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ijk}$$
$$i = 1, \dots, 6$$
$$j = 1, \dots, 9$$
$$k = 1, \dots, 3$$

Con las restricciones

$$\sum_{i=1}^3 \alpha_i = 0 \qquad \sum_{j=1}^4 \beta_j = 0$$
$$\forall i = 1, \dots, 6 \sum_{j=1}^4 (\alpha\beta)_{ij} = 0 \qquad \forall j = 1, \dots, 9 \sum_{i=1}^3 (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

Además  $e_{ijk} \approx N(0, \sigma)$  independientes.

$Y_{ij}$  → Tiempo de la muestra al que se le suministro el bloque i (tiempo) y el tratamiento j

$\alpha_i$  → Efecto medio adicional debido al bloque i (tiempo)

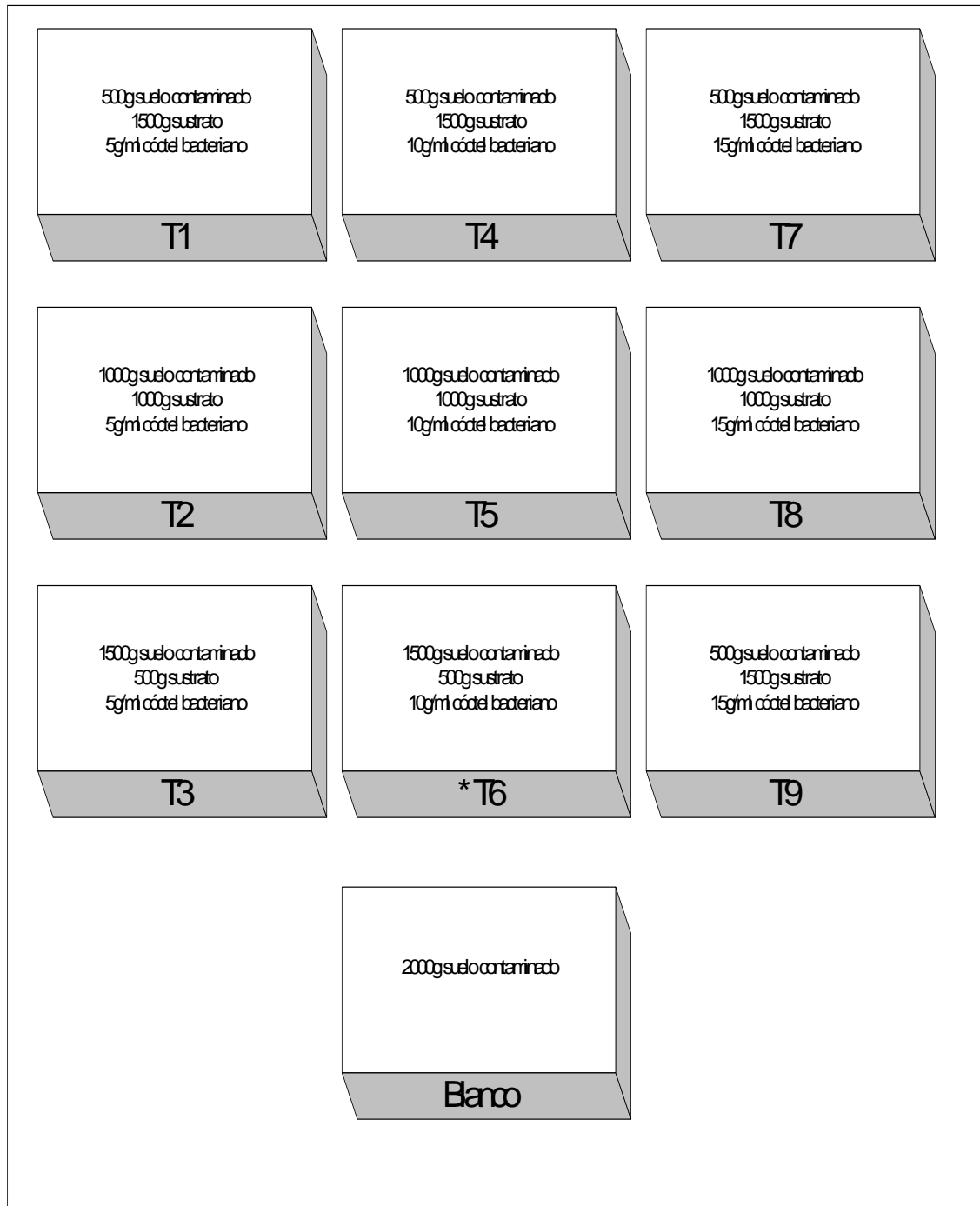
$\beta_j$  → Efecto medio adicional debido al tratamiento j

### 2.3.1.3. Tratamientos

Para la presente investigación se prepararon 9 Tratamientos o Biorreactores y un Blanco o Testigo (el cual me va a permitir comparar al final de la investigación la eficiencia con cada uno de los tratamientos).

Además se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento a excepción del blanco, con lo que se obtuvo 28 unidades experimentales (biorreactores), las mismas que se fueron aireando, y suministrando agua una vez al día durante toda la fase experimental (seis meses) con el propósito de mantener las condiciones aerobias y la humedad de cada una de las unidades experimentales.

FIGURA IX. Esquematización de los Tratamientos o Biorreactores



\* Mejor tratamiento

#### 2.3.1.4. Variables de Control

Las variables de control que se tomaron en cuenta durante toda la fase experimental (seis meses) se detallan a continuación en la tabla VII.

TABLA VII. Variables de Control

Parámetro	Unidad	Frecuencia
Temperatura	°c	1 cada día
Humedad	%	1 cada mes
Aerobios Mesófilos	UFC/g	1 cada mes
pH	+H	1 cada mes

#### 2.3.1.5. Parámetros o Respuestas Experimentales

Los parámetros a medir en cada una de las unidades experimentales durante todo el proceso de biorremediación (6 meses) se detallan a continuación en la tabla VIII, en vista de que estas respuestas o parámetros son los que nos van a permitir comparar con los que se encuentran en el RAOHE para ver si ha bajado o no los niveles de contaminación de los suelos afectados por petróleo.

#### 2.3.1.6. Codificación de los Tratamientos y Respuestas a medir

Como se ha visto, los tratamientos a considerar son 9, los cuales serán codificados como se indica en la tabla IX.

La tabla IX muestra además los parámetros a medir en cada una de las experiencias.

TABLA VIII. Parámetros a Medir

Parámetro	Unidad	Frecuencia
Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)	mg/Kg	1 cada mes
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	mg/Kg	1 cada mes
Metales Pesados (Ni, Cd, Pb)	mg/Kg	1 cada mes

TABLA IX. Codificación de los Tratamientos y Respuestas a Medir

Tiempo	Codificación	Tratamiento								
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>
<b>Marzo</b>	<b>Y<sub>1</sub></b>									
<b>Abril</b>	<b>Y<sub>2</sub></b>									
<b>Mayo</b>	<b>Y<sub>3</sub></b>									
<b>Junio</b>	<b>Y<sub>4</sub></b>									
<b>Julio</b>	<b>Y<sub>5</sub></b>									
<b>Agosto</b>	<b>Y<sub>6</sub></b>									

Los parámetros (réplicas) se han codificado del modo que se muestra en la tabla X.

TABLA X. Codificación de los Parámetros a Medir (réplicas)

Respuesta	Codificación
TPH	YX <sub>(1,2,3)</sub>
HAP's	YX <sub>(1,2,3)</sub>
Níquel	YX <sub>(1,2,3)</sub>
Cadmio	YX <sub>(1,2,3)</sub>
Plomo	YX <sub>(1,2,3)</sub>

En relación con el diseño experimental que corresponde, considerando que estamos en presencia de valorar comparativamente el efecto de 9 tratamientos que se estudian independientemente y por separados, el planteamiento que se utilizará consiste en una tabla de entrada doble con 9 tratamientos (3 réplicas en cada tratamiento) y las respuestas serán analizadas mediante un análisis de varianza.

La tabla XI muestra la estructura generalizada de las respuestas experimentales en un diseño de bloques.



TABLA XI. Representación Generalizada del Diseño de Bloques

TRATAM. \ BLOQUE	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	TOTAL BLOQ.	MEDIAS
MARZO	Y <sub>111</sub>	Y <sub>121</sub>	Y <sub>131</sub>	Y <sub>141</sub>	Y <sub>151</sub>	Y <sub>161</sub>	Y <sub>171</sub>	Y <sub>181</sub>	Y <sub>191</sub>	Y <sub>.1</sub>	$\hat{Y}_{.1}$
	Y <sub>112</sub>	Y <sub>122</sub>	Y <sub>132</sub>	Y <sub>142</sub>	Y <sub>152</sub>	Y <sub>162</sub>	Y <sub>172</sub>	Y <sub>182</sub>	Y <sub>192</sub>	Y <sub>.2</sub>	$\hat{Y}_{.2}$
	Y <sub>113</sub>	Y <sub>123</sub>	Y <sub>133</sub>	Y <sub>143</sub>	Y <sub>153</sub>	Y <sub>163</sub>	Y <sub>173</sub>	Y <sub>183</sub>	Y <sub>193</sub>	Y <sub>.3</sub>	$\hat{Y}_{.3}$
ABRIL	Y <sub>211</sub>	Y <sub>221</sub>	Y <sub>231</sub>	Y <sub>241</sub>	Y <sub>251</sub>	Y <sub>261</sub>	Y <sub>271</sub>	Y <sub>281</sub>	Y <sub>291</sub>	Y <sub>.4</sub>	$\hat{Y}_{.4}$
	Y <sub>212</sub>	Y <sub>222</sub>	Y <sub>232</sub>	Y <sub>242</sub>	Y <sub>252</sub>	Y <sub>262</sub>	Y <sub>272</sub>	Y <sub>282</sub>	Y <sub>292</sub>	Y <sub>.5</sub>	$\hat{Y}_{.5}$
	Y <sub>213</sub>	Y <sub>223</sub>	Y <sub>233</sub>	Y <sub>243</sub>	Y <sub>253</sub>	Y <sub>263</sub>	Y <sub>273</sub>	Y <sub>283</sub>	Y <sub>293</sub>	Y <sub>.6</sub>	$\hat{Y}_{.6}$
MAYO	Y <sub>311</sub>	Y <sub>321</sub>	Y <sub>331</sub>	Y <sub>341</sub>	Y <sub>351</sub>	Y <sub>361</sub>	Y <sub>371</sub>	Y <sub>381</sub>	Y <sub>391</sub>	Y <sub>.7</sub>	$\hat{Y}_{.7}$
	Y <sub>312</sub>	Y <sub>322</sub>	Y <sub>332</sub>	Y <sub>342</sub>	Y <sub>352</sub>	Y <sub>362</sub>	Y <sub>372</sub>	Y <sub>382</sub>	Y <sub>392</sub>	Y <sub>.8</sub>	$\hat{Y}_{.8}$
	Y <sub>313</sub>	Y <sub>323</sub>	Y <sub>333</sub>	Y <sub>343</sub>	Y <sub>353</sub>	Y <sub>363</sub>	Y <sub>373</sub>	Y <sub>383</sub>	Y <sub>393</sub>	Y <sub>.9</sub>	$\hat{Y}_{.9}$
JUNIO	Y <sub>411</sub>	Y <sub>421</sub>	Y <sub>431</sub>	Y <sub>441</sub>	Y <sub>451</sub>	Y <sub>461</sub>	Y <sub>471</sub>	Y <sub>481</sub>	Y <sub>491</sub>	Y <sub>.10</sub>	$\hat{Y}_{.10}$
	Y <sub>412</sub>	Y <sub>422</sub>	Y <sub>432</sub>	Y <sub>442</sub>	Y <sub>452</sub>	Y <sub>462</sub>	Y <sub>472</sub>	Y <sub>482</sub>	Y <sub>492</sub>	Y <sub>.11</sub>	$\hat{Y}_{.11}$
	Y <sub>413</sub>	Y <sub>423</sub>	Y <sub>433</sub>	Y <sub>443</sub>	Y <sub>453</sub>	Y <sub>463</sub>	Y <sub>473</sub>	Y <sub>483</sub>	Y <sub>493</sub>	Y <sub>.12</sub>	$\hat{Y}_{.12}$
JULIO	Y <sub>511</sub>	Y <sub>521</sub>	Y <sub>531</sub>	Y <sub>541</sub>	Y <sub>551</sub>	Y <sub>561</sub>	Y <sub>571</sub>	Y <sub>581</sub>	Y <sub>591</sub>	Y <sub>.13</sub>	$\hat{Y}_{.13}$
	Y <sub>512</sub>	Y <sub>522</sub>	Y <sub>532</sub>	Y <sub>542</sub>	Y <sub>552</sub>	Y <sub>562</sub>	Y <sub>572</sub>	Y <sub>582</sub>	Y <sub>592</sub>	Y <sub>.14</sub>	$\hat{Y}_{.14}$
	Y <sub>513</sub>	Y <sub>523</sub>	Y <sub>533</sub>	Y <sub>543</sub>	Y <sub>553</sub>	Y <sub>563</sub>	Y <sub>573</sub>	Y <sub>583</sub>	Y <sub>593</sub>	Y <sub>.15</sub>	$\hat{Y}_{.15}$
AGOSTO	Y <sub>611</sub>	Y <sub>621</sub>	Y <sub>631</sub>	Y <sub>641</sub>	Y <sub>651</sub>	Y <sub>661</sub>	Y <sub>671</sub>	Y <sub>681</sub>	Y <sub>691</sub>	Y <sub>.16</sub>	$\hat{Y}_{.16}$
	Y <sub>612</sub>	Y <sub>622</sub>	Y <sub>632</sub>	Y <sub>642</sub>	Y <sub>652</sub>	Y <sub>662</sub>	Y <sub>672</sub>	Y <sub>682</sub>	Y <sub>692</sub>	Y <sub>.17</sub>	$\hat{Y}_{.17}$
	Y <sub>613</sub>	Y <sub>623</sub>	Y <sub>633</sub>	Y <sub>643</sub>	Y <sub>653</sub>	Y <sub>663</sub>	Y <sub>673</sub>	Y <sub>683</sub>	Y <sub>693</sub>	Y <sub>.18</sub>	$\hat{Y}_{.18}$
TOTAL TRATAM.	Y <sub>1.</sub>	Y <sub>2.</sub>	Y <sub>3.</sub>	Y <sub>4.</sub>	Y <sub>5.</sub>	Y <sub>6.</sub>	Y <sub>7.</sub>	Y <sub>8.</sub>	Y <sub>9.</sub>		$\hat{Y}_{..}$
MEDIAS	$\hat{Y}_{.1}$	$\hat{Y}_{.2}$	$\hat{Y}_{.3}$	$\hat{Y}_{.4}$	$\hat{Y}_{.5}$	$\hat{Y}_{.6}$	$\hat{Y}_{.7}$	$\hat{Y}_{.8}$	$\hat{Y}_{.9}$		$\hat{Y}_{..}$

### 2.3.1.7. Análisis de Datos

Dentro del análisis de datos se ha realizado un análisis descriptivo, exploratorio y de forma, así como también de la variabilidad existente de las respuestas y las variables.

Se ha aplicado diseños estadísticos, en donde las unidades experimentales se seleccionaran en forma imparcial, así como los tratamientos asignados a estas, con el propósito de remover posibles sesgos sistemáticos. Dentro de estas técnicas tenemos el diseño unifactorial con bloques totalmente aleatorizados con efectos fijos.

Las fórmulas para el cálculo de la ANOVA, es decir para calcular la variación de las tres fuentes diferentes, o sea, entre tratamientos, entre bloques y error experimental, se dan en la tabla XII.

TABLA XII. Formulas para ANOVA de dos Factores

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados Medios	Razón Varianza
Tratamientos	$1/n(\sum_j Y_j^2) - ( Y_{..} ^2 / n*k)$	k-1	SCTr/(k-1)	CMTTr/CME
Bloques (Tiempo)	$1/k((\sum_i Y_i^2) - ( Y_{..} ^2 / n*k))$	n-1	SCB/(n-1)	
Error	SCT-SCTr-SCB	k(n-1)	SCE/(k-1)(n-1)	
Total	$(\sum_i \sum_j  Y_{ij} ^2) - ( Y_{..} ^2 / n*k)$	kn-1		

### CAPITULO III

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO

Cuando se realiza un estudio de biorremediación, se debe realizar como primera etapa la caracterización inicial de los suelos contaminados para conocer el grado de contaminación que existe en los mismos.

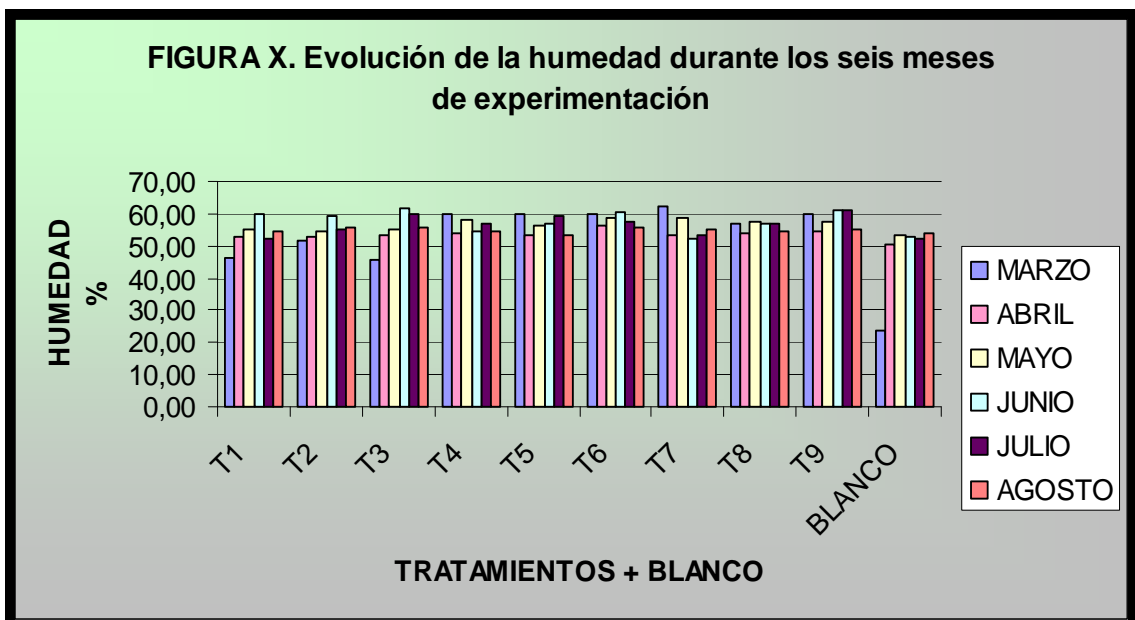
TABLA XIII. Caracterización del Suelo Contaminado

Parámetro	Expresado en	Unidad	Valor	Referencia
Potencial de Hidrógeno	pH	--	4,24	--
Humedad	--	%	21,17	--
Aerobios Mesófilos	--	UFC/g	6,0X10 <sup>6</sup>	--
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/kg	101600	<4000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	C	mg/kg	5,81	<5
Níquel	Ni	mg/Kg	75,25	<100
Cadmio	Cd	mg/kg	1,80	<10
Plomo	Pb	mg/kg	5,37	<500

De acuerdo a los valores obtenidos en la tabla XIII, se puede deducir que los parámetros que están fuera de los límites permisibles según el RAOHE para los suelos de uso industrial son los TPH y los HAP's. Debiendo anotar que, aunque la investigación se centro en la disminución o eliminación de los TPH y HAP's, en el transcurso de la misma no se descuido en ningún momento la contaminación de los metales pesados, puesto que podía suceder que al realizar un determinado tratamiento con el fin de disminuir los TPH y HAP's aumentasen en forma involuntaria las concentraciones de los metales pesados.

### 3.2. EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES DE CONTROL DURANTE TODA LA BIORREMEDIACIÓN

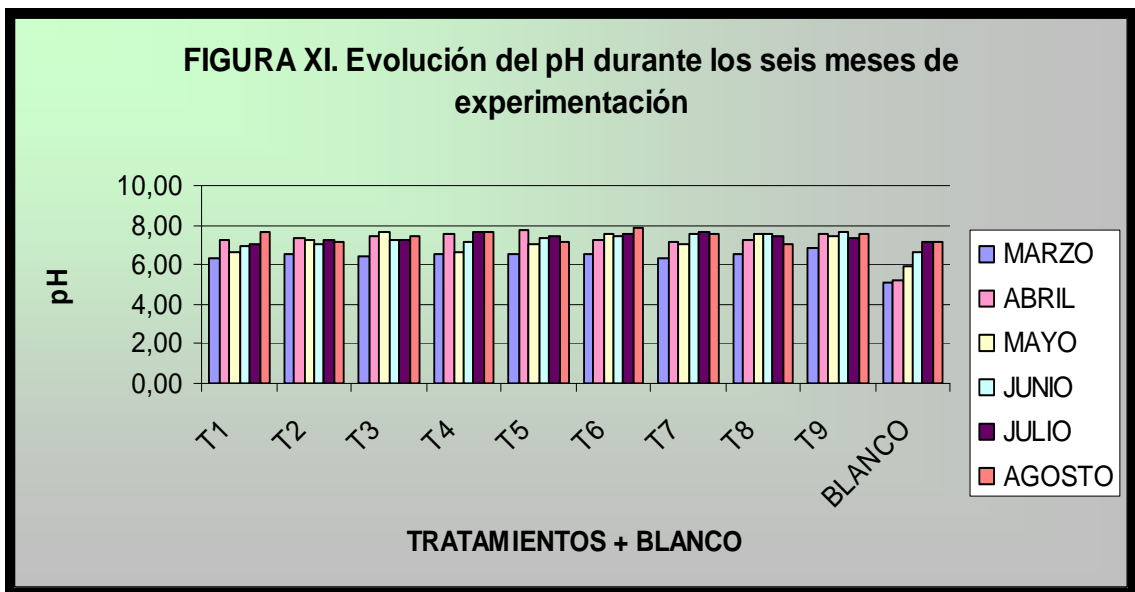
En las tablas XXX, XXXI y XXXII (Anexo V) se muestran los valores medios de las variables de control de cada uno de los tratamientos realizados en la presente investigación. De estos datos se obtuvieron las figuras X, XI y XII.



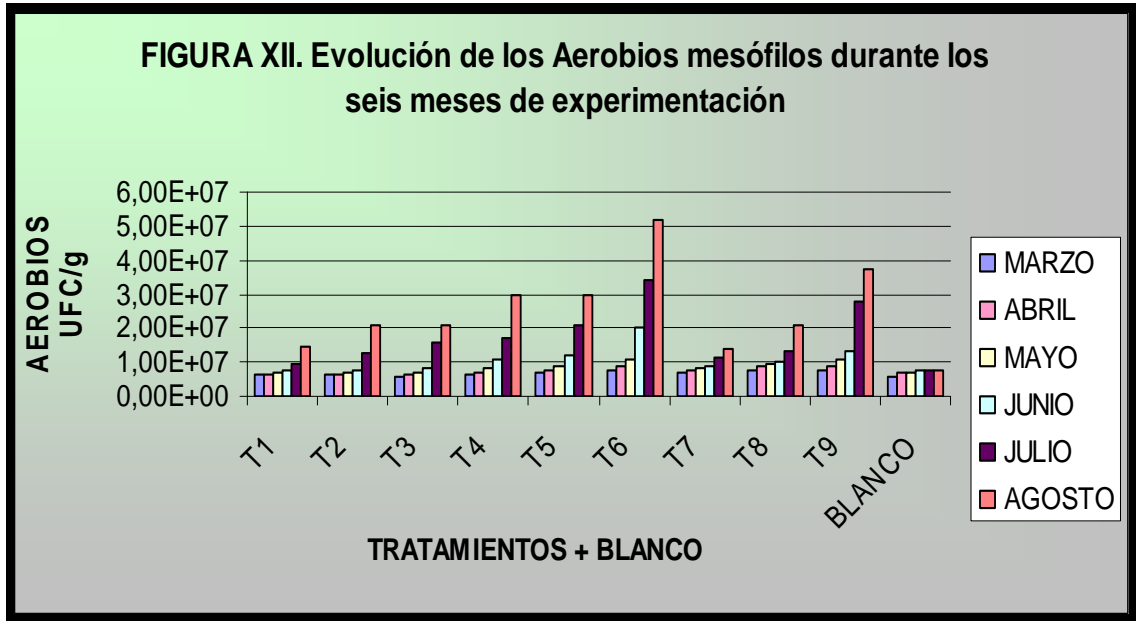
Como se puede apreciar en la figura X, las humedades de cada uno de los tratamientos e inclusive el blanco se mantuvieron constantes en un rango de 51 a 62% a partir del segundo mes (abril) hasta el último período de experimentación (agosto).

Cabe además destacar que para mantener este rango de humedades se tuvo que agregar agua todos los días que duraba la experimentación (seis meses).

La figura XI nos indica de cómo se ha incrementado el valor del pH pasando de un suelo ácido (4.24, caracterización inicial) a suelo ligeramente básico en un rango de 6.00 a 7.86 a partir de abril para todos los tratamientos a excepción del blanco que llegó a estar en este rango a partir del mes de mayo.



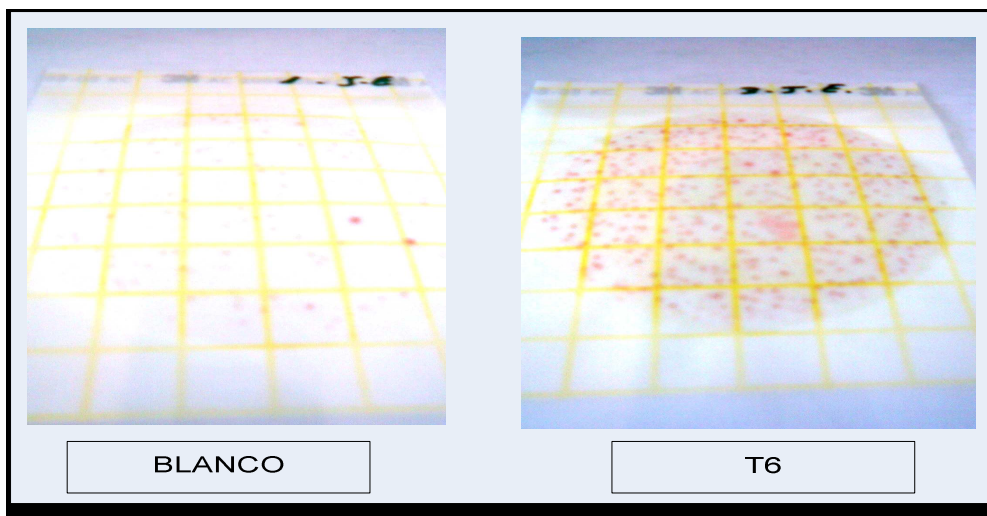
La figura XII nos muestra de cómo ha ido evolucionando el crecimiento bacteriano por cada tratamiento realizado, es así que podemos apreciar que los tratamientos que mayor crecimiento microbiano presentan son el T2, T3, T4, T5, T6, T8 y T9 en un rango de  $6.25E+06$  a  $5.20E+07$  UFC/g durante los seis meses de experimentación.



Por otro lado se puede apreciar que el blanco también ha tenido un crecimiento bacteriano, cuyo valor se contrasta con los tratamientos antes mencionado ya que a pasado de  $6.00E+06$  (caracterización inicial del suelo) a  $7.85E+06$  durante toda la investigación.

Además cabe destacar que para que se haya dado el crecimiento de los aerobios mesófilos en cada uno de los tratamientos al igual que en el blanco, fue necesario suministrar agua y airear continuamente todas las unidades experimentales, las cuales se encontraron en una cámara de remediación con temperatura ( $28-35^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (60-80%) controlada.

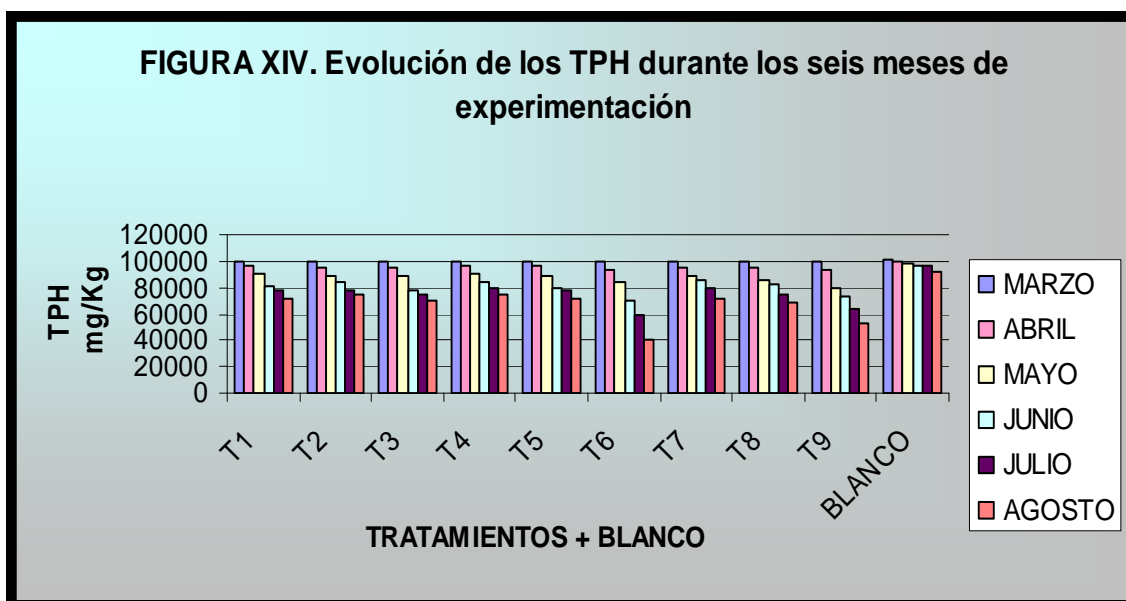
FIGURA XIII. Crecimiento Microbiano



### 3.3. MEDICIÓN DE LAS RESPUESTAS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo

En la tabla XXXIII (Anexo VI) se muestran los valores de los TPH (medios) de cada uno de los tratamientos realizados en la presente investigación. De estos datos se obtuvieron la figura XIV y las tablas XIV y XV.



La figura XIV nos indica la evolución del TPH de cada uno de los tratamientos al igual que el blanco durante los seis meses de experimentación, en los cuales se observa una considerable disminución de este contaminante a partir del cuarto mes (junio) en cada uno de los tratamientos a excepción del blanco, cuyo valor se mantiene constante durante toda la biorremediación.

De igual manera se puede apreciar también en la mencionada figura, que los tratamientos T6 y T9 son los experimentos más representativos, en vista de que han tenido mejores resultados en la disminución de los hidrocarburos totales de petróleo.

TABLA XIV. Análisis de Varianza de los TPH

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tiempo	7403501512,88	5	1480700302,57	73,34	0,00
Tratamiento	1069107639,66	8	133638454,95	6,62	0,00
Error	807505330,77	40	20187633,26		
Total	388242526686,00	54			

A través de los datos obtenidos del ANOVA (tabla XIV), tenemos un factor Fisher de 6.62 el cual al compararlo con los valores preestablecidos en tablas para una investigación con 8 grados de libertad nos indica que existe una variabilidad significativa entre los valores medios de los TPH de cada uno de los tratamientos y los meses de biorremediación (seis meses), por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY separando medias según rangos.



TABLA XV. Análisis de datos según prueba de TUKEY para los TPH

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		a	b	c
T6	6	74554,33a		
T9	6	76864,83a	76864,83b	
T8	6		84328,83b	84328,83c
T3	6		84783,33b	84783,33c
T5	6			85829,83c
T1	6			86444,16c
T2	6			86724,83c
T7	6			86746,83c
T4	6			87675,00c
Significación		0,992	0,085	0,929

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

N. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

En la tabla XV se presenta la separación de medias entre tratamientos homogéneos teniendo tres subconjuntos ordenados alfabéticamente de una manera ascendente del valor medio de los TPH. Los tratamientos presentes en el subconjunto a presentan valores homogéneos entre el 74554,33 y 7686,8 de los valores medios de TPH en los seis meses de biorremediación siendo los tratamientos T6 y T9 los que se encuentran en este grupo y hallando que el T6 es el valor más bajo registrado en la fase de experimentación. Los datos presentes en el subgrupo b que va desde el 76864,83 y 84783,33 de los valores medios de TPH, presenta un tratamiento que pertenece también al grupo a el cual se encuentra dentro del rango establecido por el subconjunto b dentro

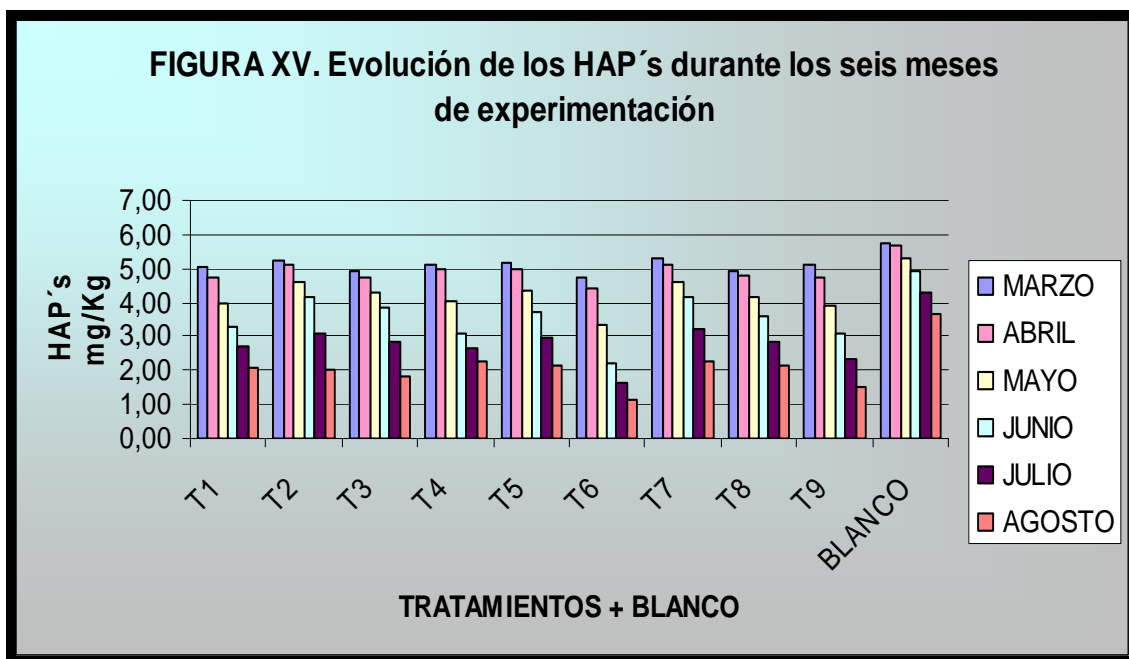
de este grupo están los tratamientos T9, T8 y T3, registrando un aumento reducido de los valores medios de TPH. Al continuar el análisis vamos ascendiendo al subconjunto que presenta un valor mayor de las medias de TPH, estando así en el grupo c valores entre 84328,83 y 87675,00. Los tratamientos homogéneos dentro de este grupo son T8, T3, T5, T1, T2, T7 Y T4, además se puede apreciar que existen dos tratamientos que pertenecen al grupo b los cuales se encuentran dentro del rango establecido por el subconjunto c.

Por otra parte se puede apreciar en la tabla XV que existe una variabilidad considerable entre los diferentes tratamiento que pertenecen al subconjunto a y c, presentando como valor mínimo 74554,33 a un valor máximo del grupo c de 87675,00 de TPH.

Es así que al realizar la prueba de Tuckey y separar las medias significativas diferentes podemos concluir que los tratamientos que se encuentran dentro del porcentaje de significación (99.20%) en la disminución de TPH durante un proceso de biorremediación son dos: el T6 (1500g suelo + 500g soporte + 15 g/ml cóctel bacteriano) y T9 (1500g suelo + 500g soporte + 15g/ml cóctel bacteriano).

### 3.3.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

En la tabla XXXIV (Anexo VI) se muestran los valores medios de los HAP`s de cada uno de los tratamientos realizados durante toda la biorremediación. De estos datos se obtuvieron la figura XV y las tablas XVI y XVII.



La figura XV nos indica la evolución de los HAP's de cada uno de los tratamientos al igual que el blanco durante toda la biorremediación, en los cuales se observa una considerable disminución de este contaminante a partir del tercer mes (mayo) en cada uno de los tratamientos a excepción del blanco, cuyo valor se mantiene constante durante toda la biorremediación.

Por otro lado se puede apreciar en la figura XV que nuevamente se vuelven a repetir los tratamientos T6 y T9, en vista de que han tenido mejores resultados en la disminución de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

TABLA XVI. Análisis de Varianza de los HAP's

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tiempo	67,68	5	13,53	290,76	0,00
Tratamiento	6,05	8	0,75	16,25	0,00
Error	1,86	40	0,04		
Total	811,01	54			

TABLA XVII. Análisis de medias según la prueba de TUKEY para HAP's

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		a	b	c	d
T6	6	2,91a			
T9	6		3,45b		
T1	6		3,64b	3,64c	
T4	6		3,67b	3,67c	
T3	6		3,73b	3,73c	3,73d
T8	6		3,74b	3,74c	3,74d
T5	6			3,89c	3,89d
T2	6			4,02c	4,02d
T7	6				4,12d
Significació n		1,000	0,343	0,094	0,083

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 N. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

A través de los datos obtenidos del análisis ANOVA (tabla XVI), tenemos un factor Fisher de 16,25 el cual al compararlo con los valores preestablecidos en tablas para una investigación con 8 grados de libertad nos indica que existe una variabilidad significativa entre los valores medios de los HAP`s de cada uno de los tratamientos y los meses de biorremediación, por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY separando medias según rangos.

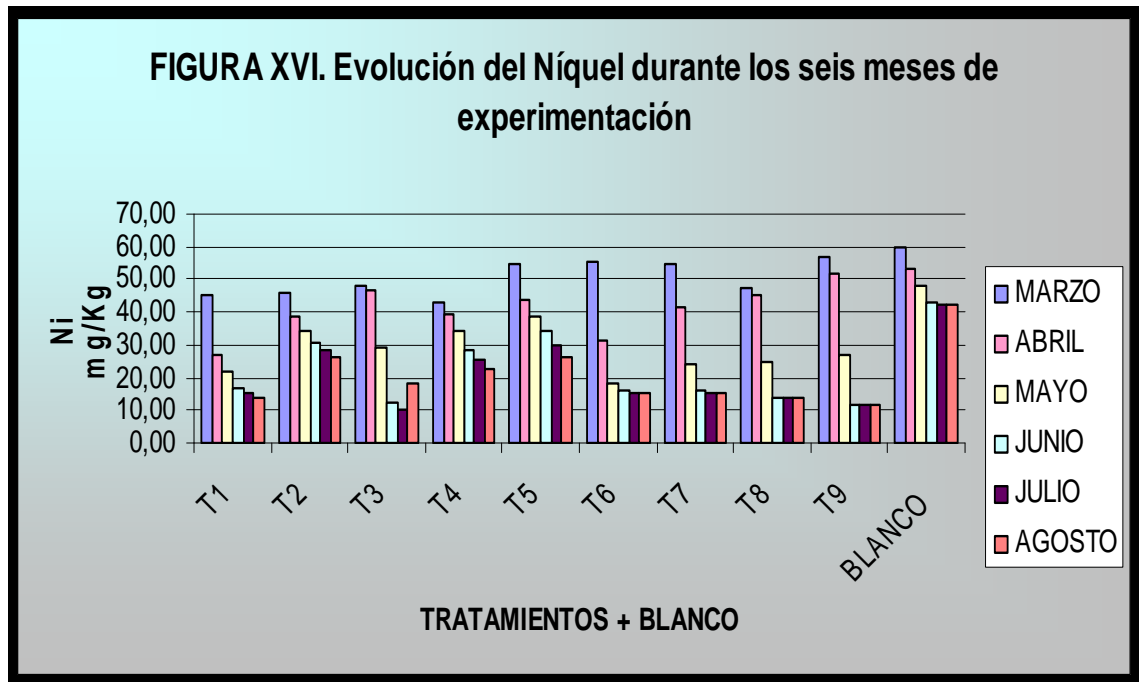
En la tabla XVII se presenta la separación de medias entre tratamientos homogéneos teniendo cuatro subconjuntos ordenados alfabéticamente de una manera ascendente del valor de HAP`s. En donde se puede apreciar que existe un subconjunto que marca una diferencia entre los demás subconjuntos el tratamiento T6 el cual pertenece al subconjunto a tiene el valor medio más bajo del análisis (2,91). Los tratamientos presentes en el subgrupo b que va desde el 3,45 y 3,74 de los valores medios de HAP`s y son T9, T1, T4, T3 y T8, registrando un aumento en los valores medios de HAP`s. Al continuar el análisis vamos ascendiendo al subconjunto que presenta un mayor valor medio de HAP`s, así en el subconjunto c presenta valores entre 3,64 y 4,02. Los tratamientos homogéneos dentro de este grupo son T1, T4, T3, T8, T5 y T2, además se puede apreciar que existen cuatro tratamientos que pertenecen al grupo b los cuales se encuentran dentro del rango establecido por el subconjunto c. Por último tenemos el subconjunto d los mismos que tienen valores medios entre 3,73 y 4,12, los tratamientos homogéneos dentro de este grupo son T3, T8, T5, T2 y T7, asimismo se puede apreciar que existen cuatro tratamientos que pertenecen al grupo c los cuales se encuentran dentro del rango establecido por el subconjunto d.

Por otra parte los tratamientos de los subconjunto a y d se presenta un valor mínimo de HAP's 2,91 a un valor máximo del grupo d 4,2, teniendo una variabilidad considerable entre los diferentes tratamientos que pertenecen a cada subconjunto.

Es así que al realizar la prueba de Tuckey y separar las medias significativas diferentes podemos decir que el tratamiento que se encuentran dentro del porcentaje de significación (100.00%) en la disminución de HAP's durante un proceso de biorremediación es el tratamiento T6, el cual contiene 1500g suelo + 500g soporte + 15 g/ml cóctel microbiano.

### 3.3.3. Níquel

En la tabla XXXV (Anexo VI) se muestran los valores medios del níquel de cada uno de los tratamientos realizados durante toda la biorremediación. De estos datos se obtuvieron la figura XVI y las tablas XVIII y XIX.



La figura XVI nos indica la evolución de níquel de cada uno de los tratamientos al igual que el blanco durante todos los meses de experimentación, en los cuales se observa una considerable disminución de este contaminante a partir del mes de junio en cada uno de los tratamientos a excepción del blanco, cuyo valor se mantiene constante durante toda la biorremediación.

Por otro parte se puede apreciar también en la misma figura, que los tratamientos T1, T6, T8 y T9 son los experimentos más representativos, en vista de que han tenido mejores resultados en la disminución del níquel.

TABLA XVIII. Análisis de Varianza para el Níquel

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tiempo	11059,55	5	2211,91	39,56	0,000
Tratamiento	1909,70	8	238,71	4,27	0,001
Error	2236,00	40	55,90		
Total	53968,77	54			

A través de los datos obtenidos del análisis ANOVA (tabla XVIII), tenemos un factor Fisher de 4,27 el cual al compararlo con los valores preestablecidos en tablas para una investigación con 8 grados de libertad nos indica que existe una variabilidad significativa entre los valores medios de níquel de cada uno de los tratamientos y los meses de experimentación, por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY.

TABLA XIX. Análisis de datos según la prueba de TUKEY

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		a	b
T6	6	20,18a	
T8	6	21,39a	
T7	6	22,90a	
T1	6	23,25a	
T9	6	23,49a	
T3	6	25,70a	25,70b
T4	6	32,24a	32,24b
T2	6	34,08a	34,08b
T5	6		37,87b
Significación		0,057	0,142

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 N. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

En la tabla XIX se presenta la separación de medias entre tratamientos homogéneos teniendo dos subconjuntos ordenados alfabéticamente de una manera ascendente del valor del níquel. En donde se puede apreciar que existe un subconjunto a que agrupa a ocho tratamientos que presentan valores homogéneos entre el 20,18 y 34,08 de níquel en los seis meses de biorremediación siendo los tratamientos T6, T8, T7, T1, T9, T3, T4, y T5 los que se encuentran en este grupo y hallando que el T6 (1000g suelo + 1000g soporte + 10g/ml cóctel microbiano) es el valor más bajo registrado en la fase de experimentación. Los datos presentes en el subgrupo b que va desde el 25,70 y 37,87 de níquel presenta tres tratamientos que pertenecen también al grupo a los cuales se

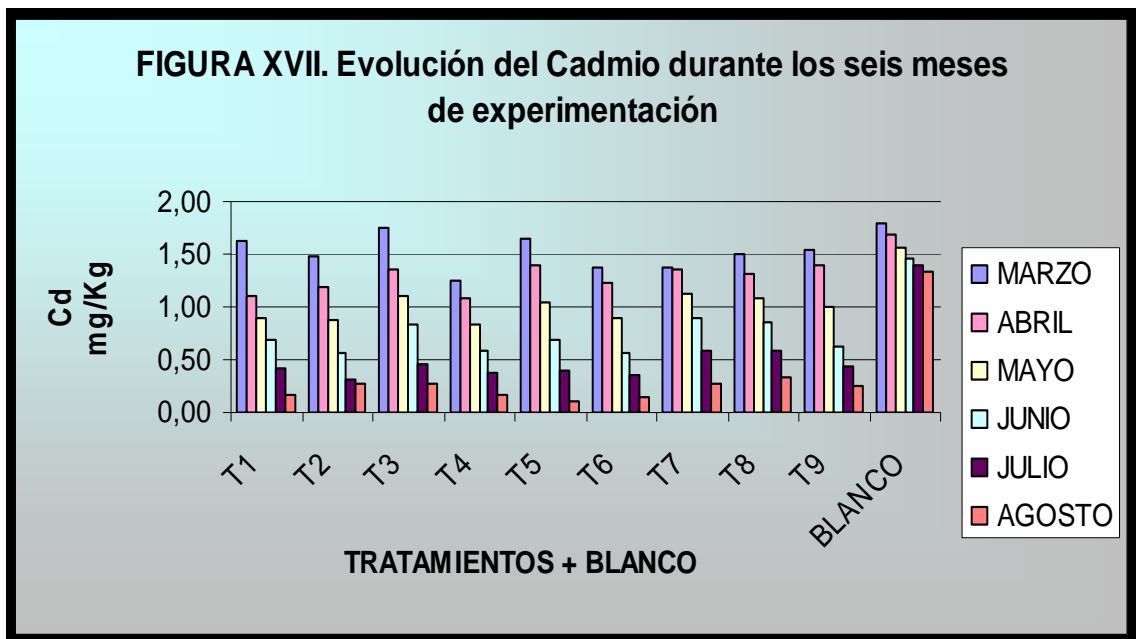


encuentra dentro del rango establecido por el subconjunto b dentro de este grupo están los tratamientos T3,T4, T2 y T5, registrando un aumento reducido del porcentaje de níquel.

Por otra parte los subconjuntos a y b presentan un valor mínimo de níquel 20,18 a un valor máximo del grupo b 37,87 teniendo una variabilidad considerable entre los diferentes tratamientos que pertenecen a cada subconjunto.

### 3.3.4. Cadmio

En la tabla XXXVI (Anexo VI) se muestran los valores medios del cadmio para cada uno de los tratamientos realizados durante toda la biorremediación. De estos valores se obtuvieron la figura XVII y las tablas XX y XI.



La figura XVII nos indica la evolución del cadmio por cada uno de los tratamientos al igual que el blanco durante los seis meses de experimentación, en los cuales se observa

una considerable disminución de este contaminante a partir del mes de julio en cada uno de los tratamientos a excepción del blanco, cuyo valor se mantiene constante durante toda la biorremediación.

Por otro lado se puede apreciar en la anterior figura, que los tratamientos T4, T5, y T6 son los experimentos más sobresalientes, en vista de que han tenido mejores resultados en la disminución del cadmio.

TABLA XX. Análisis de varianza del Cadmio

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significació n
Tiempo	11,40	5	2,28	296,38	0,00
Tratamiento	0,36	8	0,04	5,88	0,00
Error	0,30	40	0,008		
Total	50,66	54			

A través de los valores obtenidos de la tabla XX, se puede apreciar un factor de Fisher de 5,88, que al compararlo con los valores preestablecidos en tablas para una investigación con 8 grados de libertad nos indica que existe una variabilidad significativa entre los valores medios de cadmio de cada uno de los tratamientos y los meses de experimentación, por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY separando medias según rangos.

TABLA XXI. Análisis de datos según prueba de TUKEY

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
T4	6	0,71a		
T2	6	0,74a		
T6	6	0,76a	0,76b	
T1	6	0,81a	0,81b	0,81c
T9	6	0,87a	0,87b	0,87c
T5	6	0,87a	0,87b	0,87c
T3	6		0,92b	0,92c
T7	6			0,93c
T8	6			0,94c
Significación		0,066	0,057	0,219

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 N. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

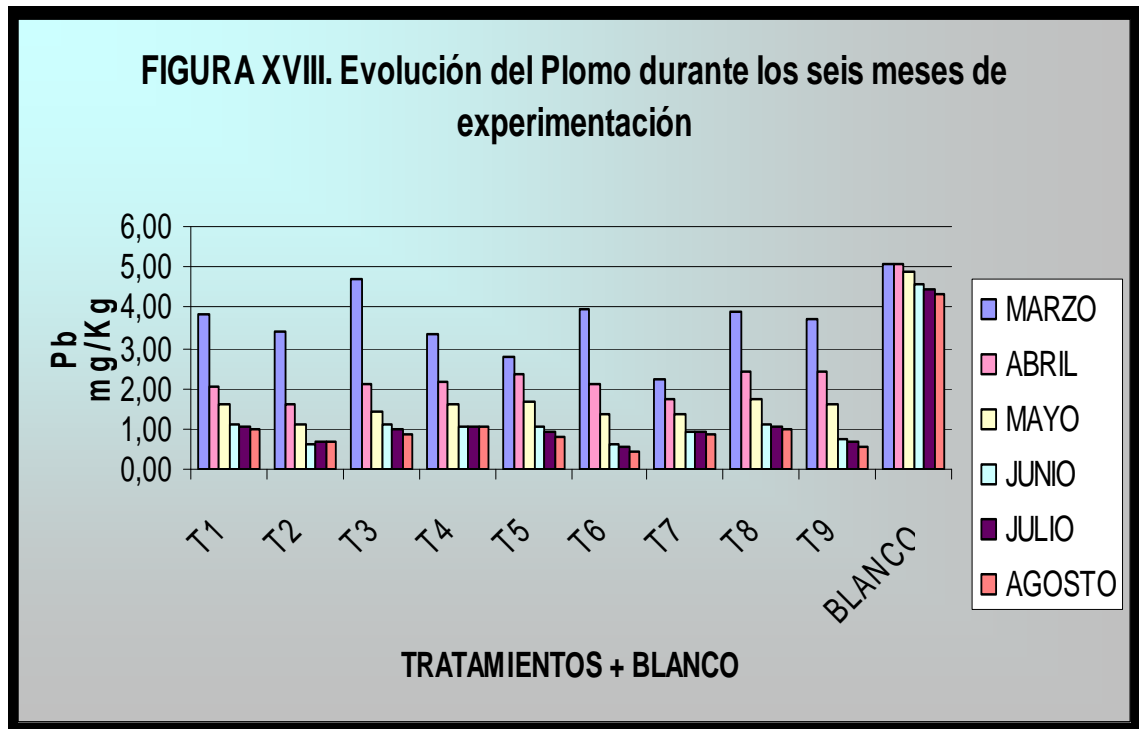
La tabla XXI presenta la separación de medias entre tratamientos homogéneos teniendo tres subconjuntos ordenados alfabéticamente de una manera ascendente del valor de cadmio. Los tratamientos presentes en el subconjunto a presentan valores homogéneos entre el 0.71 y 0.87 de cadmio en los seis meses de biorremediación siendo los tratamientos T4, T2, T6, T1, T9 y T5 los que se encuentran en este grupo y hallando que el T4 es el valor más bajo registrado en la fase de experimentación. Los datos presentes en el subgrupo b que va desde el 0,76 y 0,92 de cadmio presentan cuatro tratamientos que pertenece también al grupo a los cuales se encuentra dentro del rango establecido por el subconjunto b dentro de este grupo están los tratamientos T6, T1, T9, T5 y T3, registrando un aumento en el valor de cadmio. Al continuar el análisis vamos

ascendiendo al subconjunto que presenta un mayor valor de cadmio estando así en el grupo c valores entre 0,81 y 0,94. Los tratamientos homogéneos dentro de este grupo son T1, T9, T5, T3, T7 y T8, además se puede apreciar que existen cuatro tratamientos que pertenecen al grupo b los cuales se encuentran dentro del rango establecido por el subconjunto c.

Por otra parte los tratamientos de los subconjuntos a y c presenta valores medios, siendo el mínimo 0,71 y un máximo del grupo c 0,94 teniendo una variabilidad significativa entre los diferentes tratamientos que pertenecen a cada subconjunto.

### 3.3.5. Plomo

En la tabla XXXVII (Anexo VI) se muestran los valores medios del plomo de cada uno de los tratamientos realizados durante toda la biorremediación. De estos datos se obtuvieron la figura XVIII y las tablas XXII y XXIII.



La figura XVIII nos indica la evolución del plomo en cada uno de los tratamientos al igual que el blanco durante toda la biorremediación, en los cuales se observa una considerable disminución de este contaminante a partir del segundo mes (abril) en cada uno de los tratamientos a excepción del blanco, cuyo valor se mantiene constante durante toda la biorremediación.

TABLA XXII. Análisis de Varianza para el Plomo

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tiempo	50,75	5	10,15	95,37	0,000
Tratamiento	1,99	8	0,25	2,34	0,036
Error	4,25	40	0,10		
Total	199,24	54			

A través de los datos obtenidos del ANOVA (tabla XXII), tenemos un factor Fisher de 2,34 el cual al compararlo con los valores preestablecidos en tablas para una investigación con 8 grados de libertad nos indica que existe una variabilidad significativa entre los valores medios del plomo de cada uno de los tratamientos y los meses de biorremediación, por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY separando medias según rangos.

TABLA XXIII. Análisis de medias según la prueba de TUKEY

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		a
T7	6	1,32a
T2	6	1,34a
T6	6	1,50a
T5	6	1,59a
T9	6	1,61a
T4	6	1,69a
T1	6	1,77a
T3	6	1,86a
T8	6	1,87a
Significación		0,116

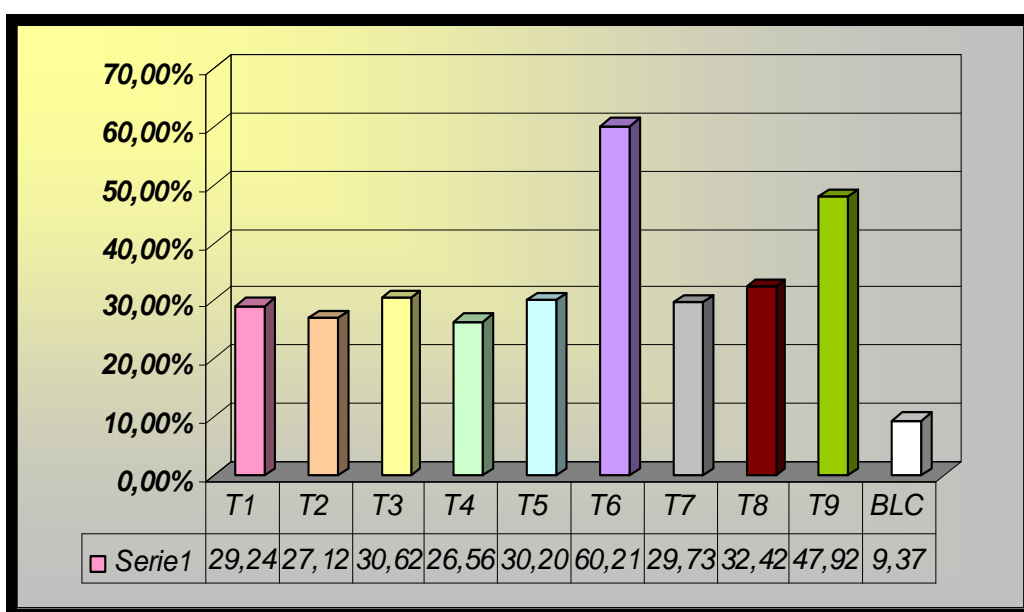
Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
N. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

En la tabla XXIII se presenta la separación de medias entre tratamientos homogéneos teniendo como único subconjunto a ordenado alfabéticamente de una manera ascendente de los valores medios del plomo, en donde se puede apreciar que existe un valor mínimo de plomo 1,32 y un valor máximo del grupo que es 1,87. Lo que nos quiere decir que no existe mucha variabilidad considerable entre los diferentes tratamientos que pertenecen a cada subconjunto.

### 3.4. EFICIENCIA DE LAS RESPUESTAS EXPERIMENTALES DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

En base a los valores obtenidos en la concentración inicial (caracterización del suelo) y concentración final (agosto) se ha podido determinar la eficiencia de cada una de los parámetros experimentales, las cuales se representan en las siguientes figuras: XIX, XX, XXI, XXII y XXIII.

FIGURA XIX Eficiencia del TPH de cada uno de los tratamientos en estudio



De acuerdo a la figura XIX se puede apreciar que los tratamientos T6 (60.21%) y T9 (47.92%) son los experimentos que mayor eficiencia tienen en relación a los otros experimentos en lo que tiene que ver con la descontaminación de los suelos afectados por hidrocarburos totales de petróleo.

Además cabe recalcar que los resultados finales de TPH están todavía por encima de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE (< 4000mg/Kg) en todos los experimentos.

Por este particular se ha realizado la proyección de los valores del TPH para seis meses más hasta el cumplimiento del parámetro, por medio del método de los mínimos cuadrados (regresión lineal).

TABLA XXIV. Valores Proyectados del TPH

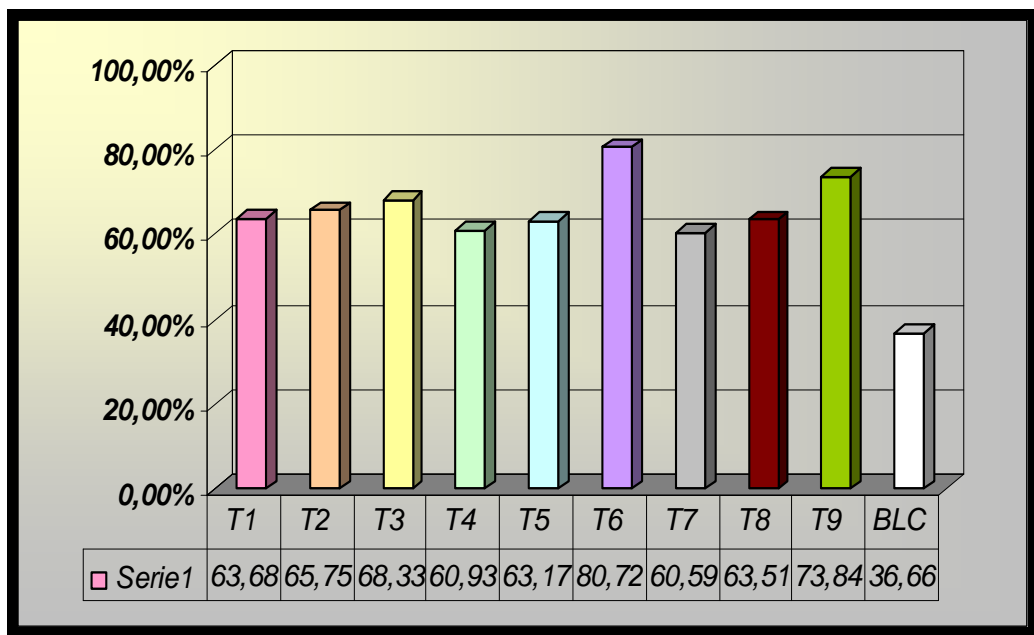
Tratamiento	BIORREMEDIACIÓN						
	Experimental (mg/Kg)	Proyectada (mg/Kg)					
		Ago-07	Sep-07	Oct-07	Nov-07	Dic-07	Ene-08
T1	71896	66135	60299	54462	48626	42760	36953
T2	74048	67883	62499	57116	51732	46349	40965
T3	70486	63057	56850	50642	44435	38228	32020
T4	74612	69225	64046	58798	53550	48032	43054
T5	70921	64407	58287	52166	46045	39924	33803
T6	40424	32909	21010	9111	-2788	-14687	-26586
T7	71396	67571	62093	56614	51135	45656	40177
T8	6862	62915	56797	50678	44560	38442	32323
T9	52915	44412	35140	25867	16595	7323	-1950
Blanco	92083	91581	89928	88274	86621	84968	83314



Como se puede apreciar en la tabla XXIV, el parámetro de TPH ingresa en los límites permisibles en el mes de diciembre del presente año con el tratamiento T6 (-2788 mg/Kg) y en el mes de febrero del 2008 con el experimento T9 (-1950 mg/Kg).

Por otra parte se puede determinar en la misma tabla XXIV que el blanco realizado todavía mantiene alta la cantidad de TPH, alcanzando un valor de 83317 mg/Kg al final del mes de febrero del 2008.

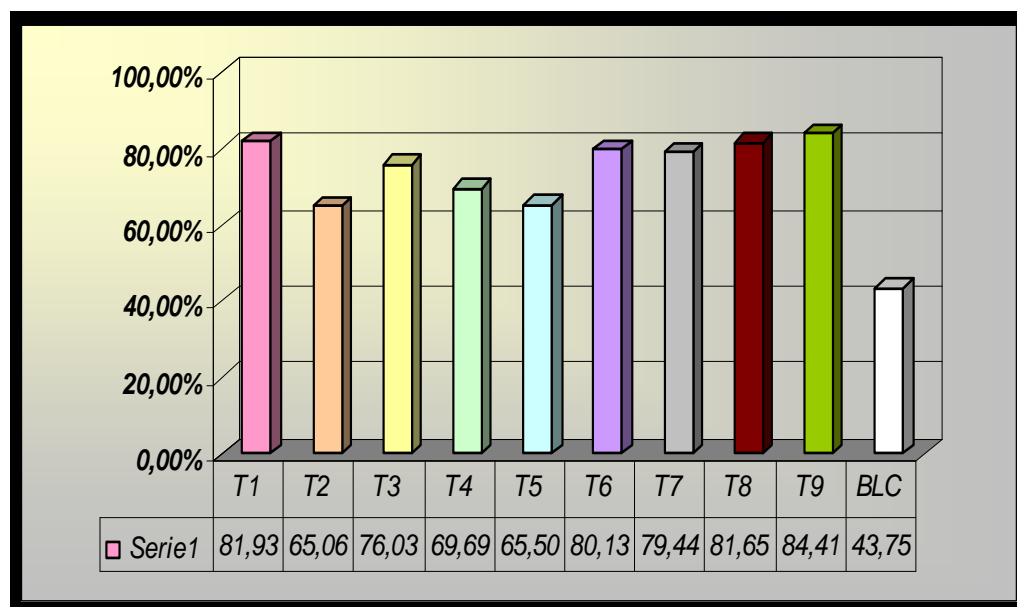
FIGURA XX. Eficiencia de los HAP's de cada uno de los tratamientos en estudio



De acuerdo a la tabla XX se puede apreciar que nuevamente se vuelven a repetir los tratamientos T6 (80.72%) y T9 (73.84%), experimentos que tienen una mayor eficiencia en relación a los otros experimentos en lo que tiene que ver con la descontaminación de los suelos afectados por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Asimismo cabe resaltar que los valores últimos de este contaminante están por debajo de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE (< 5mg/Kg) en todos los experimentos.

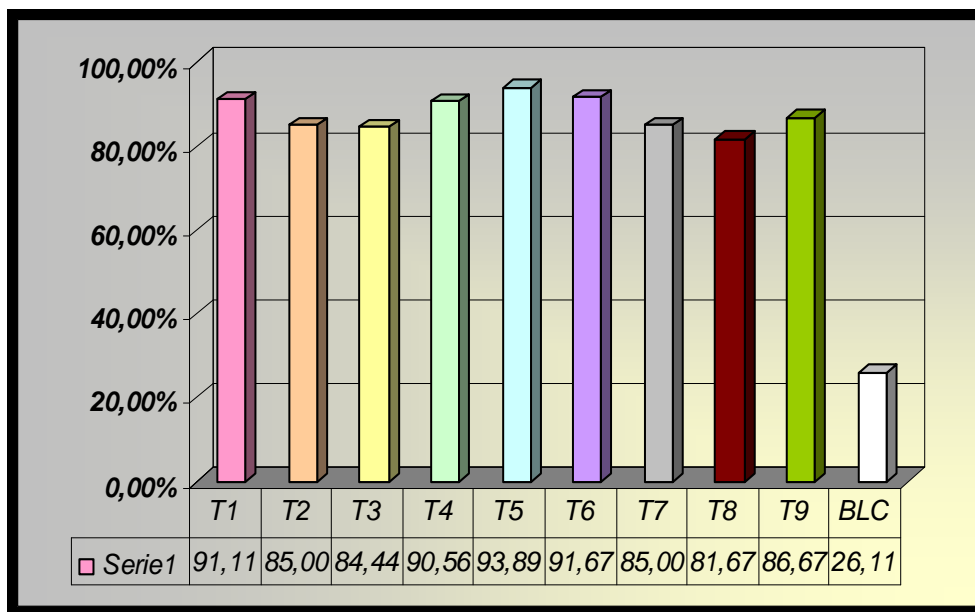
FIGURA XXI. Eficiencia del Níquel de cada uno de los tratamientos en estudio



En la figura XXI se puede apreciar que los tratamiento T9 (84.41%) y T1 (81.93%) son los biorreactores que tienen mayor eficiencia en relación a los otros experimentos. Además cabe decir que el tratamiento T6 (80.13%) también se mantiene entre los experimentos con alto índice de descontaminación de níquel en los suelos.

Por otro lado hay que destacar que los valores del níquel estaban siempre por debajo de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE (<100 mg/Kg) en todos los experimentos desde el principio de la investigación.

FIGURA XXII. Eficiencia del Cadmio de cada uno de los tratamientos en estudio



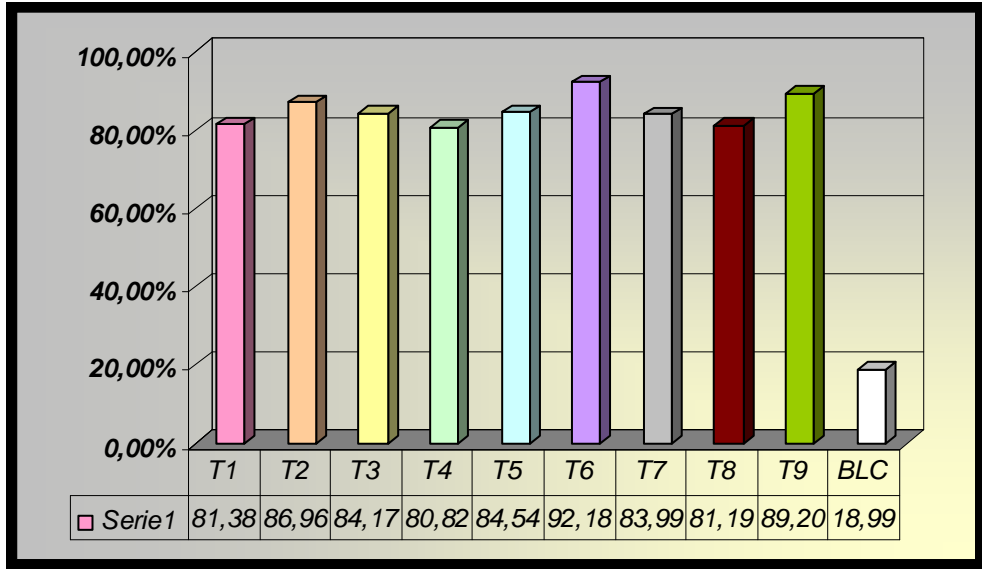
En la figura XXII se puede apreciar que los tratamientos T5 (93.89%) y T6 (91.67%) son los biorreactores que tienen mayor eficiencia en relación a los otros experimentos.

De igual manera cabe recalcar que los valores de este parámetro estaban por debajo de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE (<10mg/Kg) en todos los experimentos desde el principio de la investigación.

De acuerdo a la figura XXIII se puede apreciar que nuevamente se vuelven a repetir los tratamientos T6 (92.18%) y T9 (89.20%), experimentos que tienen una mayor eficiencia en relación a los otros experimentos en lo que tiene que ver con la descontaminación de los suelos afectados por plomo.

También vale mencionar que los valores de este contaminante se encontraban por debajo de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE (<500mg/Kg) en todos los experimentos desde el principio de la investigación.

FIGURA XXIII. Eficiencia del Plomo de cada uno de los tratamientos en estudio



En base a las eficiencias obtenidas en la presente investigación de los nueve tratamientos, se puede determinar que ha existido una mejora considerablemente en el proceso degradativo de los contaminantes (TPH, HAP's, Ni, Cd y Pb) mediante el empleo de cóctel microbiano, alcanzándose valores entre 60 - 94% de eficiencia. Con este análisis se acepta la *hipótesis planteada en el proyecto*.

FIGURA XXIV. Suelo contaminado vs Suelo Biorremediado



### 3.5. VIABILIDAD ECONÓMICA DE LA INVESTIGACIÓN

La viabilidad económica la estimamos a partir:

ESTIMACIÓN DEL COSTO TOTAL DE LA INVESTIGACIÓN = (A+B+C+D)

TABLA XXV. Costos de Mano Obra Directa

A : MANO DE OBRA DIRECTA					
Item	Denominación	Cantidad	Unidad	V.unit. (USD)	Subtotal (USD)
1	Servicio de Investigador en el Laboratorio	8	mes	80,00	640,00
2	Transporte del investigador	144	día	1,00	144,00
Total					784,00

TABLA XXVI. Costos de Materiales Directos

B: COSTOS DIRECTOS					
Item	Denominación	Cantidad	Unidad	V.unt (USD)	Subtotal (USD)
1	Suelo contaminado con petróleo proporcionado por la Refinería Estatal Esmeraldas	100	lb	--	--
2	Transporte del suelo al laboratorio de análisis	2	viaje	10,00	20,00
3	Cóctel bacteriano	2	lb	20,00	40,00
4	Arena	35	lb	0,05	1,75
5	Arrocillo	35	lb	0,20	7,00
TOTAL (USD)					68,75

TABLA XXVII. Gastos de Energía Consumido por los Equipos durante la Investigación

C : ENERGÍA				
Item	Denominación	Horas Empleadas	Energía Consumida (Kw)	Subtotal (USD)
1	Autoclave	6	40	4,80
2	Balanza de precisión	30	5	0,60
3	Cámara de flujo laminar	9	4	0,48
4	Computadora	320	55	6,60
5	HPLC	105	800	96,00
6	Espectrof. atómica	9	1300	156,00
7	Estufa	420	34	4,08
8	Foco	2160	80	9,60
9	Hach	18	50	6,00
10	Incubadora	288	20	2,40
11	Mufla	60	70	8,40
12	pH metro	6	2	0,24
13	Refrigeradora	1200	100	12,00
14	Reverberos	8640	700	84,00
15	Rotavapor	30	4	0,48
TOTAL (USD)				391,68

TABLA XXVIII. Costos de los Reactivos

D: REACTIVOS				
Ítem	Parámetro	Cantidad	V. Unit.	Subtotal
			(USD)	(USD)
1	Acetonitrilo	4	84,82	339,28
2	Cloruro metileno	3	47,02	141,06
3	Ciclo hexano	1	141,47	141,47
4	Petrifil	4	41,00	164,000
5	Acetileno	1	424,50	424,5
6	Acido nítrico	1	231,53	231,53
7	Acido perclórico	1	593,00	593,00
8	Caldo nutritivo	1	68,40	68,40
9	Peptona	1	115,00	115,00
TOTAL				2218,24

TABLA XXIX. Costo Total de la Investigación

A	784,00
B	68,75
C	391,68
D	2218,24
TOTAL	3462.67



## CAPITULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. CONCLUSIONES

1. El suelo contaminado de la piscina externa de la Refinería Estatal Esmeraldas, presentó dos parámetros que estaban fuera de los límites permisibles para uso industrial del suelo según el RAOHE y son: TPH (101600 mg/Kg) y HAP's (5.81 mg/Kg).
2. Se activo los inóculos bacterianos (cóctel mixto) en 48 horas a temperatura de 40°C, previo su incorporación en los respectivos biorreactores.
3. Se logró obtener nueve biorreactores empleando inóculos bacteriano, suelo contaminado de petróleo y utilizando como sustrato una mezcla de arena y arcillo a diferentes cantidades e incubando a 28-35°C por seis meses, obteniéndose una estabilidad del proceso alta, constituyéndose en una técnica biotecnológica atractiva para descontaminar el medio ambiente.
4. El crecimiento bacteriano es un factor importante para la descontaminación de suelos, ya que en base a los resultados obtenidos se pudo apreciar que partimos de 6.00E+06 UFC/g (caracterización inicial) y que durante los seis meses de experimentación se dio un aumento considerable en el número de microorganismos degradadores de petróleo el cual llego a 52.00E+07 (tratamiento T6), lo que nos

permite decir que a mayor presencia de microorganismos existe mayor grado de biorremediación de los contaminantes.

5. Los resultados obtenidos en la evaluación de la atenuación natural (blanco) reflejaron que la degradación de hidrocarburos por esta técnica requieren de un tiempo de biorremediación mayor al evaluado por los nueve diferentes tratamientos, alcanzando resultados de eficiencias de todos los contaminantes (TPH, HAP's, Cd, Pb y Ni) en los seis meses de 9,27 - 43.75% en contraste a las eficiencias de los diferentes tratamientos 60.21 - 92.18%.
  
6. El tratamiento que estadísticamente y por su eficiencia tuvo mejores resultados en la reducción de los contaminantes fue el tratamiento T6, en vista de que presentó al final de la investigación valores de: 40424 mg/Kg de TPH (60.21%), 1.12 mg/Kg de HAP's (80.72%), 14.95 mg/Kg de Níquel (80.13%), 0.15 mg/Kg de Cadmio (91.67%) y 0.42 mg/Kg de Plomo (92.18%).
  
7. Desde el punto de vista científico, tecnológico y económico, la presente investigación determinó la viabilidad del proyecto.

#### 4.2. RECOMENDACIONES

1. Hacer siempre una prueba de biorremediación a nivel de laboratorio antes de ser utilizada en campo.
2. Realizar investigaciones con otros soportes sólidos o líquidos.

## RESUMEN

La investigación tiene por objeto biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de una área de 300m<sup>2</sup> de la piscina Externa de la Refinería Estatal Esmeraldas, mediante la utilización de inóculos microbianos en una cámara de remediación a temperatura y humedad controlada, análisis que fueron realizados en el laboratorio del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se realizaron 10 tratamientos con tres repeticiones, en los cuales se variaron la concentración del inóculo (5, 10, 15 g/mL), cantidad de suelo (500, 1000, 1500 g) y cantidad de sustrato (500, 1000, 1500 g).

Se emplearon métodos físico-químicos (fotometría, gravimétricos, potenciométricos), microbiológicos y estadísticos (fisher, tukey, mínimos cuadrados), técnicas de extracción con cloruro de metileno, determinación por HPLC, absorción atómica, medio de cultivo líquido y determinación de aerobios mesófilos.

Del estudio, se concluye que el suelo contaminado utilizado tuvo dos parámetros (TPH - 101600 mg/Kg y HAP's - 5.81 mg/Kg) que estuvieron fuera de los límites permisibles según el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, los mismos que al ser tratados con los inóculos microbianos durante los seis meses de experimentación permitieron biorremediar significativamente, siendo el tratamiento T6 el que presentó una mayor eficiencia en la reducción de TPH 60%, HAP's 80.72%, Ni 80.13%, Cd 93.89% y Pb 92.18%. Proporcionando así información fiable para el futuro en lo que respecta a la técnica de remediación de suelos.

Se recomienda siempre realizar pruebas de biorremediación a nivel de laboratorio antes de ser utilizadas en campo, para evitar cualquier sorpresa.

## SUMMARY

This investigation deals with the bio-remedying of the soils polluted with hydrocarbons from a 300 m<sup>2</sup> area of microbial inocules in a remedy camera at a controlled temperature and humidity, analyses which were carried out in the Technical Service and Environmental Technology Transfer Center Lab. of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Ten treatments with three replications were carried out which the inocule concentration (5, 10, 15 g/mL), soil quantity (500, 1000, 1500 g) and substrate quantity (500, 1000, 1500 g) varied. Physical and chemical (photometry, gravimetric and potenciometric) microbiological and statistical (fisher, tukey, minimum squares) methods, methyl chloride extractions techniques, determination of HPLC, atomic absorption, liquid culture medium and mesophyll aerobe determination, were used.

From the study, it is conclude that the polluted soil had two parameters (TPH – 101600 mg/Kg and HAP's – 5.81 mg/Kg) which were outside the permissible limits according to the Environmental Regulations of he Operations Hidrocarburíferas to Ecuador which upon being treated with microbial inocules over a six-month experimentation allowed to remedy significantly, with the T6 treatment being the most efficient in the reduction of the TPH 60%, HAP's 80,72%, Ni 8,73%, Cd 93,89% and Pb 92,18%. This way, reliable information is provided for the future soil remedying technique.

It is recommended to carry out bioremedying test at a lab level before being used in the field to avoid any surprise.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA. AWWA. WPCF. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Madrid: Díaz de Santos, 1992. pp. 14-30.
2. ATLAS, R. BARTHA, R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4a ed. Madrid: Pearson Educación, 2002. pp. 677.
3. BOUL, S. HOLE, F. Génesis Clasificación de Suelos. 3ra. ed. México: Trillas, 1988. pp. 73-109.
4. CONESA, V. Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental. Madrid: Mundi Prensa, 1993. pp. 24-30
5. FUNDACIÓN NATURA. Potencial Impacto Ambiental de las Industrias en el Ecuador. Quito: Fundación Natura, 1991. pp. 112.
6. GESTIÓN AMBIENTAL HIDROCARBURÍFERA. Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador. Quito: Horizont 3000, 2001. pp. 51 y 112.
7. GLINN, H. HEINKE, G. Ingeniería Ambiental. 2da. ed. Madrid: Pearson Educación, 1999. pp. 271-273.
8. MANOBANDA, P. Tratamiento Alternativo de Descontaminación para Sedimentos de Hidrocarburos. Tesis de Ingeniero Químico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Ingeniería Química, Riobamba, 2004.
9. MONTOYA, D. La Biotecnología: Presente y Futuro en Colombia y América Latina. 2a ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1990. pp. 578.
10. MORRIS, L. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Madrid: Mc Graw- Hill, 1997, pp. 265 – 275.

11. SOCIEDAD ECUATORIANA DE MICROBIOLOGÍA. Microbiología. 2a. ed. Quito: Horizont 3000, 1995. pp. 345.
12. TREVAN, M. Biotecnología: Principios Biológicos. Zaragoza: Acribia, 1990. pp. 30-152.
13. VELOZ, N. Evaluación de los Fangos Activados de las Plantas Extractoras de Aceites de Palma para Uso como Bioabono, Tesis de Maestría en Biotecnología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba, 1999.
14. WUTHIER, P. El Petróleo. 2a. ed. Madrid: Cepsa, 1971. pp. 25-42
15. WULF, C. Biotecnología. Manual de Microbiológica Industrial. Zaragoza: Acribia, 1993. p.p. 116-118.

REFERENCIAS DE INTERNET

16. Alternativas para la Remediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos.  
[http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-338X2004012000002&lng=es&nrm=iso](http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-338X2004012000002&lng=es&nrm=iso)  
2006-05-14
17. Arroz Integral y Arroz Blanco  
<http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/arroz.htm>  
2007-05-15
18. Biorremediación de Suelos Contaminados con Petróleo.  
<http://www.monografias.com/trabajos25/biorremediacion-suelos/biorremediación-suelos.shtml>  
2006-04-2006
19. Fermentación  
<http://www.fermentación>  
2006-06-17
20. Microbiología del Petróleo y sus Derivados.  
[http://www.microbiologia.org/microbiosenlinea/CAPITULO\\_02/Capitulo02.pdf](http://www.microbiologia.org/microbiosenlinea/CAPITULO_02/Capitulo02.pdf)  
2006-05-16
21. Remediación de Ecosistemas.  
<http://www.monografias.com/trabajos25/remediacion-ecosistemas/remediación-ecosistemas.shtml>  
2006-05.21
22. Revista Científica y Técnica Ecológica y Medio Ambiente.  
<http://www.aeet.org/ecosistemas/032/informe1.htm>  
2006-05-12
23. Revista Informativa de Avances Biotecnológicos e Hipervínculos con Empresas, Libros y Revistas sobre Descontaminación de Residuos.  
<http://www.BioPlanet.com>  
2006-04-21



24. Resumen de Salud Pública - Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's).  
[http://www. ATSDR - Resumen de Salud Pública Hidrocarburos aromáticos po.htm](http://www.ATSDR-Resumen.de.Salud.Pública.Hidrocarburos.aromáticos.po.htm).  
2007-04-21
25. Resumen de Salud Pública - Hidrocarburos Totales (TPH).  
[http://www. ATSDR - Resumen de Salud Pública Hidrocarburos totales de pe.htm](http://www.ATSDR-Resumen.de.Salud.Pública.Hidrocarburos.totales.de.pe.htm)  
2007-04-21
26. Resumen de Salud Pública – Níquel.  
[http://www. ATSDR - Resumen de Salud Pública Níquel.htm.com](http://www.ATSDR-Resumen.de.Salud.Pública.Níquel.htm.com)  
2007-06-18
27. Resumen de Salud Pública – Cadmio.  
[http://www. ATSDR - Resumen de Salud Pública Cadmio.htm.com](http://www.ATSDR-Resumen.de.Salud.Pública.Cadmio.htm.com)  
2007-06-18
28. Resumen de Salud Pública – Plomo.  
[http://www. ATSDR - Resumen de Salud Pública Plomo.htm.com](http://www.ATSDR-Resumen.de.Salud.Pública.Plomo.htm.com)  
2007-06-18

ANEXO I

HOJA DE DATOS SOBRE SEGURIDAD DE MATERIALES

SPARTAN CHEMICAL COMPANY

**SECCIÓN I: IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO**

*Nombre del producto (tal como aparece en la etiqueta): CONSUME POW WASTEWATER TREATMENT.*

*Nombre del fabricante: Spartan Chemical Company, Inc.*

**SECCIÓN II: PELIGROS PARA LA SALUD**

*Efectos de exposición excesiva – condiciones que hay que evitar: Puede causar irritación a los ojos y a la piel con síntomas tales como dolor, rojez e hinchazón de la conjuntiva. Nocivo si es ingerido con síntomas tales como dolor, náusea, vómito y diarrea. La inhalación del polvo del producto puede causar irritación a las vías respiratorias.*

*No permita el contacto con los ojos o la piel. No lo ingiera. Evite respirar el polvo del producto. Evite contacto con heridas abiertas, piel cortada o membranas mucosas. Lávese bien después de manipular.*

*Procedimientos de emergencia y primeros auxilios:*

- Ojos: Lávese los ojos con agua durante un mínimo de 15 min. Quítese las lentillas de contacto. Consiga atención médica.*

- *Piel: Lávese la piel con abundante agua durante y jabón. Aplique un agente antiséptico de uso tópico a heridas abiertas o tez cortada. Consiga atención médica si la irritación persiste.*
- *Ingestión: No induzca el vómito. Beba uno o dos vasos de agua para diluir el producto. Consiga atención médica. No le dé nada por boca a una persona inconsciente.*
- *Inhalación: Traslade la persona al aire fresco. Consiga atención médica si la irritación persiste.*

### SECCIÓN III: PROCEDIMIENTOS EN CASO DE DERRAMES O FUGAS

*Pasos a seguir en caso que el material escape o se riegue: Puede eliminar pequeños derrames a la alcantarilla. Las cantidades mayores deben recogerse y trasladarse a recipientes adecuados para desecho.*

*Método de disponer de desechos: Deseche en conformidad con todas las leyes y reglamentos federales, estatales y locales.*

### SECCIÓN IV: INFORMACIÓN ESPECIAL SOBRE LA PROTECCIÓN

*Protección respiratoria: No requiere normalmente cuando existe una buena ventilación general.*

*Guantes protectivos: Guantes de goma u otro material impermeable.*

*Protectores de ojos: Lentes de seguridad o gafas*

*SECCIÓN V: PRECAUCIONES ESPECIALES*

*Precauciones para el manejo y almacenamiento: Almacene en un lugar fresco y seco fuera de la luz del sol directa. Mantenga el recipiente bien cerrado cuando no lo use. No contamine la comida o la alimentación. No lo congele ni caliente a más de 110<sup>0</sup>F.*

*Otras precauciones: Lávese bien después de manipular. Mantenga lejos del alcance de los niños.*

ANEXO II

COMPOSICIÓN DEL CALDO NUTRITIVO

(MEDIO DE CULTIVO)

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Extracto de res</i>	<i>3.0g</i>
<i>Peptona</i>	<i>5.0g</i>
<i>Cantidad a disolver</i>	<i>8g/l</i>

*Especificación del producto:*

- Ajustado y/o suplementado para satisfacer los criterios de rendimiento. Para uso en laboratorio pH final  $6.8 \pm 0.2$ .*
- Calentar frecuentemente por 1 minuto. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 minutos.*

ANEXO III

COMPOSICIÓN DE LOS MICRONUTRIENTES  
(MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO)

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	<i>0,1000g</i>
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>0,0500g</i>
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>0,0250g</i>
<i>KCL</i>	<i>0,0500g</i>
<i>MgSO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,0250g</i>
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	<i>0,0010g</i>
<i>FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,0010g</i>
<i>H<sub>3</sub>B<sub>3</sub>O<sub>3</sub></i>	<i>0,0150g</i>
<i>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,0025g</i>
<i>MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,0020g</i>
<i>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,0350g</i>

*Nota: Esta composición es por cada 100g de suelo contaminado con petróleo.*

ANEXO IV

CONDICIONES CLIMATOLÓGICAS DE LA REFINERÍA ESTATAL ESMERALDAS

<i>Parámetro</i>	<i>Medida</i>
<i>Temperatura máxima</i>	<i>40 °C</i>
<i>Temperatura mínima</i>	<i>25 °C</i>
<i>Velocidad del viento</i>	<i>3.5 m/s</i>
<i>Humedad Relativa</i>	<i>60 %</i>

ANEXO V

VALORES MEDIOS DE LAS VARIABLES DE CONTROL

TABLA XXX. HUMEDAD

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	46,47	52,99	55,31	59,99	52,25	54,48
T2	51,90	52,56	54,37	59,06	54,89	55,55
T3	45,95	53,57	55,36	61,46	59,80	55,53
T4	60,06	54,17	57,97	54,51	56,72	54,62
T5	60,07	53,66	56,56	56,71	59,26	53,14
T6	59,97	56,45	58,73	60,33	57,73	55,64
T7	62,01	53,31	58,56	52,16	53,39	55,18
T8	57,12	54,22	57,66	56,91	57,24	54,87
T9	60,13	54,75	57,65	61,16	61,32	55,27
BLANCO	23,87	50,62	53,34	52,67	52,17	54,13

TABLA XXXI. pH

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	6,32	7,28	6,62	6,97	6,99	7,70
T2	6,49	7,39	7,28	7,03	7,24	7,11
T3	6,42	7,45	7,63	7,29	7,21	7,42
T4	6,53	7,52	6,67	7,14	7,65	7,66
T5	6,49	7,71	7,03	7,38	7,45	7,13
T6	6,49	7,23	7,58	7,40	7,57	7,86
T7	6,33	7,14	6,99	7,54	7,66	7,59
T8	6,50	7,28	7,54	7,54	7,50	6,99
T9	6,87	7,54	7,43	7,70	7,39	7,60
BLANCO	5,10	5,19	5,90	6,60	7,15	7,18

TABLA XXXII. AEROBIOS MESÓFILOS

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	6,10E+06	6,30E+06	6,70E+06	7,45E+06	9,20E+06	1,45E+07
T2	6,25E+06	6,40E+06	7,00E+06	7,85E+06	1,25E+07	2,10E+07
T3	5,90E+06	6,30E+06	7,00E+06	8,30E+06	1,55E+07	2,10E+07
T4	6,50E+06	7,10E+06	8,00E+06	3,89E+07	1,70E+07	3,00E+07
T5	6,85E+06	7,85E+06	9,00E+06	1,20E+07	2,10E+07	3,00E+07
T6	7,30E+06	9,00E+06	1,10E+07	2,00E+07	3,40E+07	5,20E+07
T7	6,90E+06	7,50E+06	8,00E+06	9,00E+06	1,15E+07	1,40E+07
T8	7,75E+06	8,85E+06	9,45E+06	9,90E+06	1,30E+07	2,10E+07
T9	7,30E+06	8,80E+06	1,06E+07	1,30E+07	2,80E+07	3,70E+07
BLANCO	5,55E+06	6,65E+06	6,70E+06	7,40E+06	7,55E+06	7,85E+06



ANEXO VI

VALORES MEDIOS DE LAS RESPUESTAS EXPERIMENTALES

TABLA XXXIII. TPH

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	100455	96117	90280	81298	78619	71896
T2	99790	95667	89455	83712	77677	74048
T3	100045	94807	89523	78519	75320	70486
T4	100300	96254	90691	84221	79972	74612
T5	100335	96955	89183	79932	77653	70921
T6	99671	94078	84590	69551	59012	40424
T7	99685	95745	88194	85633	79828	71396
T8	99041	94953	85807	82055	75455	68662
T9	99044	92754	79699	73127	63650	52915
BLANCO	100989	100174	98111	96621	96226	92083

TABLA XXXIV. HAP's

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	5,07	4,72	4,00	3,29	2,70	2,11
T2	5,22	5,08	4,62	4,16	3,07	1,99
T3	4,94	4,73	4,27	3,82	2,83	1,84
T4	5,10	4,96	4,01	3,06	2,66	2,27
T5	5,18	4,99	4,37	3,75	2,94	2,14
T6	4,71	4,42	3,32	2,22	1,67	1,12
T7	5,31	5,09	4,63	4,17	3,23	2,29
T8	4,93	4,77	4,19	3,61	2,86	2,12
T9	5,09	4,75	3,93	3,12	2,32	1,52
BLANCO	5,77	5,66	5,29	4,92	4,30	3,68

TABLA XXXV. NÍQUEL

CÓDIGO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
T1	44,91	26,96	21,92	16,87	15,24	13,60
T2	46,02	38,44	34,57	30,70	28,50	26,29
T3	48,26	46,44	29,28	12,11	10,08	18,04
T4	43,00	39,22	33,97	28,72	25,77	22,81
T5	54,91	43,49	38,78	34,07	30,02	25,96
T6	55,41	31,01	18,44	15,87	15,41	14,95
T7	55,04	41,66	23,75	15,83	15,65	15,47
T8	47,27	45,00	24,48	13,95	13,88	13,81
T9	56,92	51,92	26,83	11,80	11,77	11,73
BLANCO	59,65	53,36	48,12	42,87	42,60	42,33

TABLA XXXVI. CADMIO

<i>CÓDIGO</i>	<i>MARZO</i>	<i>ABRIL</i>	<i>MAYO</i>	<i>JUNIO</i>	<i>JULIO</i>	<i>AGOSTO</i>
<i>T1</i>	1,62	1,10	0,90	0,68	0,42	0,16
<i>T2</i>	1,47	1,19	0,88	0,56	0,32	0,27
<i>T3</i>	1,74	1,36	1,10	0,83	0,46	0,28
<i>T4</i>	1,25	1,08	0,84	0,59	0,38	0,17
<i>T5</i>	1,64	1,39	1,04	0,69	0,40	0,11
<i>T6</i>	1,38	1,23	0,90	0,57	0,36	0,15
<i>T7</i>	1,38	1,36	1,13	0,90	0,59	0,27
<i>T8</i>	1,51	1,31	1,08	0,85	0,59	0,33
<i>T9</i>	1,54	1,40	1,01	0,62	0,43	0,24
<i>BLANCO</i>	1,80	1,69	1,57	1,45	1,39	1,33

TABLA XXXVII. PLOMO

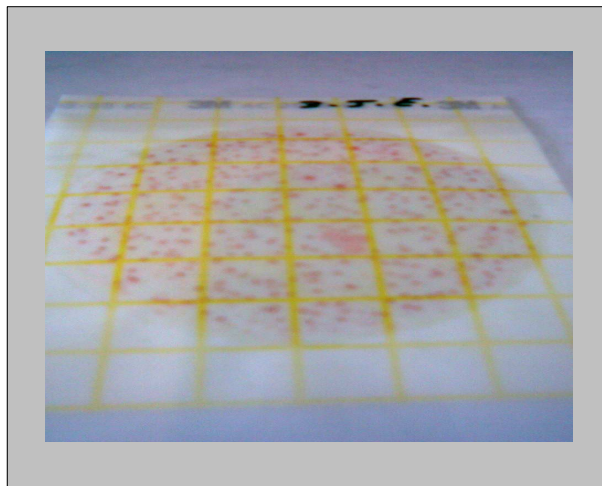
<i>CÓDIGO</i>	<i>MARZO</i>	<i>ABRIL</i>	<i>MAYO</i>	<i>JUNIO</i>	<i>JULIO</i>	<i>AGOSTO</i>
<i>T1</i>	3,86	2,06	1,58	1,10	1,05	1,00
<i>T2</i>	3,41	1,59	1,10	0,60	0,65	0,70
<i>T3</i>	4,72	2,08	1,42	1,14	1,00	0,85
<i>T4</i>	3,32	2,14	1,59	1,04	1,04	1,03
<i>T5</i>	2,79	2,33	1,68	1,03	0,93	0,83
<i>T6</i>	3,93	2,13	1,39	0,64	0,53	0,42
<i>T7</i>	2,20	1,73	1,34	0,94	0,9	0,86
<i>T8</i>	3,91	2,39	1,76	1,12	1,07	1,01
<i>T9</i>	3,74	2,42	1,58	0,73	0,66	0,58
<i>BLANCO</i>	5,08	5,07	4,89	4,58	4,47	4,35

ANEXO VII

ANÁLISIS REALIZADOS



*Fotografía N° 1. Preparación de diluciones para el análisis de aeróbios mesófilos*



*Fotografía N° 2. Recuento de aerobios mesófilos*

*ANEXO VIII*

*EQUIPOS UTILIZADOS*



*Fotografía N° 3. Incubadora*



*Fotografía N° 4. Autoclave*



*Fotografía N° 5. Cámara de flujo laminar*