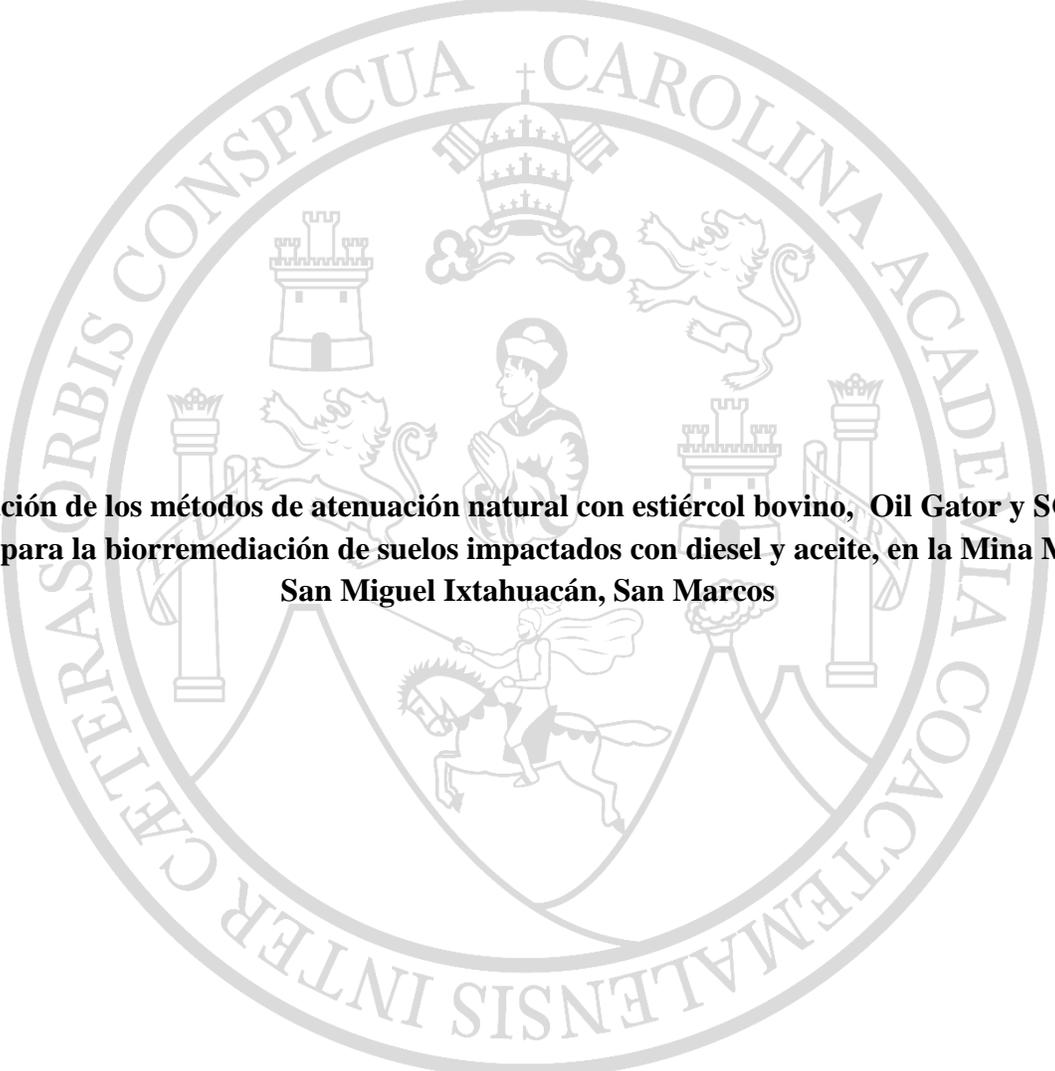


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Evaluación de los métodos de atenuación natural con estiércol bovino, Oil Gator y SCD Bio Klean para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite, en la Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos**

Jackelyn Paola Tol Urizar

Julia Mirelia Cali Arriaga

**QUÍMICAS BIÓLOGAS**

**Guatemala, Julio de 2015**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Evaluación de los métodos de atenuación natural con estiércol bovino, Oil Gator y SCD Bio Klean para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite, en la Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos**

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

**PRESENTADO POR**  
Jackelyn Paola Tol Urizar  
Julia Mirelia Cali Arriaga

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE**  
**QUÍMICAS BIÓLOGAS**

**Guatemala, Julio de 2015**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por darnos la fortaleza, perseverancia y sabiduría para culminar una de las metas de nuestra vida profesional, a Él sea la Gloria.

### **A NUESTROS PADRES**

Por su amor incondicional, apoyo y comprensión brindando desde siempre, han sido pilares importantes en nuestras vidas.

### **A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Por el conocimiento y enseñanzas brindadas que han sido cimiento en nuestra formación académica y profesional.

### **A LA Dra. KARIN HERRERA, Lic. ISMAEL MANCILLA, Licda. ROSARIO HERNÁNDEZ, M.A. MARÍA EUGENIA PAREDES, Ing. GESER GONZÁLEZ Y Lic. FEDERICO NAVE.**

Por su indispensable apoyo, asesoría y orientación para el desarrollo de esta investigación.

### **A LA EMPRESA MINA MARLÍN, MONTAN EXPLORADORA DE GUATEMALA S.A.**

Por proporcionar el apoyo logístico necesario para el desarrollo de la investigación.

## Índice

<b>I.    Ámbito de investigación</b>	<b>1</b>
<b>II.   Resumen</b>	<b>2-3</b>
<b>III.  Antecedentes</b>	<b>4-32</b>
A. El suelo	4
B. Hidrocarburos	10
C. Gestión de riesgo ambiental	14
D. Métodos de remediación para suelos impactados	17
E. Determinación de la concentración de hidrocarburos totales (TPH, Total Petroleum Hydrocarbons, por sus siglas en inglés)	28
F. Plan de manejo del suelo impactado con hidrocarburos	29
G. Estudios realizados	30
<b>IV.  Justificación</b>	<b>33</b>
<b>V.    Objetivos</b>	<b>34</b>
A. Objetivo General	34
B. Objetivos Específicos	34
<b>VI.  Hipótesis</b>	<b>35</b>
<b>VII. Materiales y métodos</b>	<b>36-47</b>
A. Universo de trabajo	36
B. Muestra	36
C. Recursos	36
D. Materiales	37
E. Metodología	39
F. Diseño Experimental	45

<b>VIII.</b>	<b>Resultados</b>	<b>48-52</b>
<b>IX.</b>	<b>Discusión de resultados</b>	<b>53-58</b>
<b>X.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>XI.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>60</b>
<b>XII.</b>	<b>Referencias</b>	<b>67</b>
<b>XIII.</b>	<b>Anexos</b>	<b>68-75</b>

## **I.   Ámbito de la investigación**

Esta investigación se realizó dentro de la Mina Marlin, en el municipio de San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. Se evaluó la capacidad y efectividad de tres métodos de biorremediación, uno de atenuación natural con estiércol bovino, dos de uso comercial de nombre Oil Gator y Bio Klean en suelos impactados con diesel y aceite, a través del metabolismo de los tres consorcios bacterianos. Se comprobó por medio de la eliminación o disminución de la concentración de hidrocarburos de totales de petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) en el suelo y se determinó cuál de los tres métodos se adapta más a las características y necesidades del terreno que se desea recuperar.

## II. Resumen

Las características y propiedades útiles del suelo pueden verse afectadas a causa del derrame de hidrocarburos derivados del petróleo, por esta razón surgen diversas metodologías que permiten la eliminación de los hidrocarburos, a través del metabolismo bacteriano, en donde los microorganismos utilizan los hidrocarburos como fuente de energía; este proceso se conoce como biorremediación. Este estudio tuvo por objeto la evaluación de los métodos atenuación natural (AN) con estiércol bovino, Oli Gator (OG) y SCD Bio Klean (BK) para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.

Para las cuatro repeticiones de cada método se seleccionó una matriz de 0.039 m<sup>3</sup> de suelo, procedente del lugar, y se impactó con diesel y aceite hasta alcanzar una concentración de 5000 partes por millón (ppm) de hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés). Luego se aplicaron los tres tratamientos a sus respectivas repeticiones y se adicionó agua hasta observar la inundación del suelo, a cada repetición de le determinó temperatura (<sup>0</sup>T) en grados Celsius (<sup>0</sup>C), porcentaje de humedad (%H), potencial de hidrógeno (pH) y TPH en ppm cada 30 días durante un período de 120 días.

Se encontró que los valores obtenidos de <sup>0</sup>T y pH estuvieron dentro de los rangos ideales para el crecimiento bacteriano en los tres tratamientos; por otro lado las determinaciones del %H no presentaron un comportamiento definido, particularmente AN y BK en el día 90, sus determinaciones se ubicaron fuera de los porcentajes considerados como ideales. En la determinación de TPH, todos los métodos redujeron la concentración de hidrocarburos en el suelo al menos 29.25 %.

Se analizó el comportamiento de la disminución de TPH, a través de una regresión cúbica para cada método, por medio del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y se evaluó la eficiencia de la ecuación de regresión al compara la dispersión de los puntos, el valor de  $r^2$  para los tres tratamientos fue menor a uno, por esta razón el comportamiento de los métodos se ajustan a la regresión cúbica. También se hizo uso de la prueba t de Student la cual permitió evaluar la equivalencia entre los métodos, sin embargo al comparar los métodos por pares a través de dicha prueba, se concluye que los métodos no son comparables entre sí, y esto es debido a que cada uno tienen un mecanismo de acción diferente al llevar a cabo el proceso de biorremediación.

En búsqueda de seleccionar un método para la biorremediación en Mina Marlin, y tomando en cuenta que los tres métodos no son comparables entre sí, la recomendación para la selección de dicho tratamiento, se basó en las características del mismo y su adaptación a las condiciones y requerimientos del lugar, una buena opción es OG quien además de disminuir la concentración de TPH, consta de un único componente y no necesitó de un procedimiento engorroso para su aplicación en el suelo, en comparación con los requerimientos de AN y BK.

### **III. Antecedentes**

Una de las inquietudes ambientales más importantes en la actualidad es la recuperación de ecosistemas terrestres y acuáticos del impacto ocasionado por los hidrocarburos derivados del petróleo. En el caso del suelo, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de derrame de hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar impactado, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana e infiltración de hidrocarburos en los cuerpos de agua subterráneos. Además del impacto ambiental, se pueden generar impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Pardo, Perdomo, Benavides, 2004).

En los ecosistemas terrestres, el suelo representa el medio físico que sustenta la vida de diversas especies, tanto animales como vegetales. La materia orgánica e inorgánica del suelo permite la coexistencia de una gran cantidad de microorganismos que se adaptan a sus características físicas y químicas, aún cuando estas sean variables. Los microorganismos tienen una gran importancia ecológica en los ecosistemas terrestres, pues cumplen la función de descomponer sustancias orgánicas de desecho en sus componentes básicos, los cuales se metabolizan junto con los nutrientes obtenidos del suelo, para generar nueva biomasa y llevar a cabo sus funciones vitales. Los hidrocarburos derivados del petróleo son compuestos intermedios, entre altamente biodegradables y difícilmente biodegradables (Pardo y otros, 2004).

Hoy en día, a nivel mundial se cuenta con diversas técnicas biológicas con el fin de proporcionar alternativas de recuperación de suelo, aire y agua, en las zonas impactadas. La biorremediación es un proceso de recuperación que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos, inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos (Benavides, Quintero, Guevara, Cáceres, Gutiérrez, Miranda, 2006).

#### **A. El suelo**

El término suelo se refiere al material suelto de la superficie de la tierra. Los suelos proporcionan soporte físico y nutriente para el crecimiento de las plantas y los microorganismos.

Los suelos fértiles son aquellos que dan lugar a una abundante producción de alimentos y fibra. Existe una gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos) que casi siempre está presente en los suelos, aunque las densidades de población de las mismas varían ampliamente. La superficie de los gránulos de un suelo constituye el lugar donde se producen la mayoría de las reacciones bioquímicas pertenecientes al ciclo de la materia orgánica, el nitrógeno y otros minerales, a la meteorización de las rocas, a la toma de nutrientes por parte de las plantas y es el medio filtrante del agua (Alexander, 1991).

## **1. Composición del suelo**

El suelo es un recurso natural definido generalmente como la capa superior de la corteza terrestre. Se clasifica en distintos tipos de acuerdo al porcentaje de cada uno de los componentes. Es una mezcla compleja de materiales inorgánicos (arcilla, limo, y arena), materia orgánica en descomposición, agua, aire y organismos vivos. Los procesos naturales que dan lugar a la formación de diversos tipos de suelos son la disgregación química y mecánica de la roca sólida, el aumento de sedimentos depositados por la erosión, e interacciones de sedimentos y materiales intemperizados, con diversas formas de vida. El suelo posee propiedades físicas y químicas que ayudan a establecer un ambiente adecuado para los componentes biológicos (Tyler, 1994).

## **2. Propiedades del suelo**

Las propiedades físicas más importantes son la textura, la porosidad, la estructura, la humedad, el color y la densidad. La textura representa el porcentaje en que se encuentran los elementos que constituyen el suelo: arena gruesa, arena media, arena fina, limo, arcilla. Se dice que un suelo tiene una buena textura cuando la proporción de los elementos que lo constituyen le dan la posibilidad de ser un soporte capaz de favorecer la fijación del sistema radicular de las plantas y su nutrición. La porosidad está determinada por el espacio poroso. Dentro del espacio poroso se pueden distinguir macroporos y microporos. Los primeros no retienen el agua contra la fuerza de la gravedad, y por lo tanto son los responsables del drenaje y la aireación del suelo, constituyendo además, el principal espacio en el que se desarrollan las raíces. Los segundos son los que retienen agua, parte de la cual es disponible para las plantas (Eweis, Ergas, Chang, Schroeder, 1999).

La estructura es el arreglo de las partículas del suelo. Se debe entender por partículas, no solo las que fueron definidas como fracciones granulométricas (arena, arcilla y limo), sino también los agregados o elementos estructurales que se forman por la agregación de las fracciones granulométricas. La humedad es establecida por las fuerzas de retención del agua (adhesión y cohesión), estas fuerzas combinadas se presentan en gran cantidad originando que partículas de agua de considerable espesor sean mantenidas en la superficie de las partículas del suelo. La humedad está clasificada por los tipos de agua que contenga el suelo, los cuales pueden ser: el agua de adhesión y el agua de cohesión (Rucks, García, Kaplán, Ponce de León, Hill, 2004).

El color está estipulado por el contenido de materia orgánica, el drenaje y la aireación del suelo, posee tres propiedades principales: el matiz, el valor y la croma. El matiz es el espectro dominante o color, el valor es la relativa blancura o negrura, la cantidad reflejada de luz (brillantés), y la croma es la pureza del color, esta aumenta cuando decrece el gris (intensidad). La densidad del suelo es la relación de la masa de las partículas de suelo seco con el volumen combinado de las partículas y los poros (Rucks y otros, 2004).

Las propiedades químicas del suelo más importantes son: la capacidad de intercambio catiónico, el potencial de hidrógeno (pH) y la conductividad. La capacidad de intercambio catiónico es la cantidad total de cationes intercambiables adsorbidos por unidad de peso del suelo, los cationes cambiables influyen en la estructura, actividad biológica, régimen hídrico y reacciones en el suelo. Los cationes cambiables son:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Al}^{3+}$  (Rucks, y otros, 2004).

El pH es la medida de la concentración de iones de hidrógeno  $[\text{H}^+]$ . Un suelo puede ser ácido, neutro o alcalino, según su valor pH. El pH tiene una gran influencia en la disponibilidad de nutrientes y la presencia de microorganismos y plantas en el suelo. Cada microorganismo para su desarrollo necesita suelos con un pH específico, la mayoría de las bacterias tienen preferencia por suelos moderadamente ácidos o ligeramente alcalinos. El pH del suelo se ve afectado por las fuentes de acidez (ácidos de la materia orgánica, ácidos solubles por actividad biológica y agrícola y ácidos de los minerales), y fuentes de alcalinidad (bases a partir de los cationes

cambiables). La conductividad del suelo se refiere a la cantidad de sales que contiene. La relación suelo/agua tiene influencia sobre la composición de las sales (HANNA Instruments, n.d.).

### **3. Composición biológica**

El suelo es un ecosistema que contiene una gran variedad de poblaciones microbianas, estos miembros representan muchos tipos fisiológicos. Las características químicas, físicas y biológicas de un suelo particular, así como la presencia de crecimiento de plantas influirán en el número y actividades de sus diversos componentes microbianos. Además, a causa de la naturaleza heterogénea del suelo varios tipos de microorganismos se encuentran en este. La comunidad microbiana en los suelos es importante por su relación con la fertilidad del suelo y con los ciclos biogeoquímicos de los elementos, además del uso potencial de los miembros específicos para aplicaciones ambientales e industriales (Fernández, Rojas, Roldán, Uribe, Reyes...Arce, 2006). El suelo es un ambiente que posee una gran variedad de microorganismos, como bacterias, hongos, algas, protozoos y virus (Pelczar, 1982).

Las bacterias tienen gran importancia biológica. Estos microorganismos, particularmente los actinomicetos y mixobacterias, son los habitantes más numerosos del suelo. Son esenciales en la descomposición y recirculación de nutrientes, como nitrógeno, oxígeno, carbono, fósforo, azufre y muchos oligoelementos (Solomon, Berg, Martin, 2001).

En el suelo se encuentran bacterias autótrofas, heterótrofas, mesófilas, termófilas y psicófilas; aeróbicas y anaeróbicas; degradadoras de celulosa y oxidantes del azufre; fijadoras de nitrógeno y degradadoras de proteínas, y otros tipos. Los géneros de actinomicetos predominantes de este grupo son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*. Estos organismos son causantes del olor característico mohoso, o de suelo recién arado. Son capaces de degradar muchas sustancias complejas y consecuentemente juegan un papel muy importante en la química del suelo. Los actinomicetos también son notables por su capacidad para sintetizar y excretar antibióticos. La presencia de sustancias antibióticas en el suelo se detectan en raras ocasiones, pero esto no excluye la posibilidad de que se encuentren activas en un microambiente (Pelczar, 1982).

Los hongos contribuyen en grado importante al equilibrio ecológico del planeta. Como las bacterias, la mayoría de ellos son saprótrofos o sapróbios, descomponedores que absorben nutrientes de desechos orgánicos y organismos muertos. Son capaces de degradar celulosa y lignina, de las paredes celulares vegetales (Solomon, y otros, 2001).

La mayoría de hongos se encuentran en medios terrestres, crecen sobre el suelo o la materia orgánica en descomposición y contribuyen notablemente a la mineralización de sustancias orgánicas. Un gran número de hongos establecen asociaciones con otros organismos, como parasitismo o mutualismo (Mandigan, Martinko, Parker, Sánchez, 2003).

Las algas constituyen un gran grupo de talofitas heterogéneas que contienen clorofila y se encuentran distribuidas universalmente. Son talofitas porque el cuerpo o talo carece de raíces, tallo y hojas verdaderas. El tallo puede ser unicelular o multicelular, pero en este último caso, raras veces se presenta una vaga diferenciación de tejidos. Las algas son principalmente acuáticas, pero también se encuentran creciendo en suelos húmedos, rocas y árboles, en el suelo se presentan tres grupos: *cianoficias*, *clorofíceas* y *crisofíceas*. Morfológicamente las algas del suelo pueden ser unicelulares o encontrarse en filamentos cortos, pero las cepas del suelo por lo general, son más pequeñas y con una estructura menos compleja que sus parientes acuáticas (Mandigan y otros, 2003).

El Phylum Protozoa incluye organismos primitivos unicelulares, cuyo tamaño va de algunos micrómetros hasta uno o más centímetros. Todas las especies terrestres son microscópicas y más pequeñas que sus parientes acuáticos. Los protozoos del suelo se clasifican con base a sus medios de locomoción, dividiéndose en tres grupos: *Mastigophora* o flagelados, que se mueven por medio flagelos, *Sarcodina* algunas veces llamados *Rhizopoda* o *Amiboides*, los cuales poseen pseudópodos y *Ciliophora* o cilidados, los cuales presentan cilios durante el estado activo de su vida. La mayoría depende de la materia orgánica preformada, con alimentación en forma sapróbica, obtienen sus nutrientes de sustancias solubles inorgánicas y orgánicas. Se conoce poco de la función de los protozoos en el suelo, pero su papel principal se basa en sus hábitos alimenticios y que regulan el tamaño de la comunidad bacteriana (Mandigan y otros, 2003).

#### **4. Función del suelo**

El suelo tiene seis funciones principales, tres de naturaleza ecológica y otras tres ligadas a las actividades humanas. Estas actividades no son necesariamente complementarias. Entre las funciones ecológicas están: la producción de biomasa (alimento, fibra y energía), ser reactor que filtra, regula y transforma la materia para proteger de la contaminación el ambiente, las aguas subterráneas y la cadena alimentaria así como ser hábitat biológico y reserva genética de muchas plantas, animales y organismos (COM, 2002, Blum, 1993).

Las funciones ligadas a las actividades humanas son: ser un medio físico que sirve de soporte para estructuras industriales y técnicas, así como actividades socioeconómicas tales como vivienda, desarrollo industrial, sistemas de transporte, recreo o ubicación de residuos. Al igual que es fuente de materias primas que proporciona agua, arcilla, arena grava, minerales. Y elemento de nuestra herencia cultural, que contiene restos paleontológicos y arqueológicos importantes para conservar la historia de la tierra y de la humanidad (Blum, 1993).

El suelo es un recurso natural muy importante, ya que desempeña varias funciones de acuerdo al lugar donde se encuentre: actúa como regulador del ciclo del agua y los ciclos biogeoquímicos, es el medio filtrante del agua que recarga el manto acuífero y, por lo tanto, su capa de protección, es el espacio para actividades agrícolas, ganaderas, forestales y recreativas; y alberga una gran cantidad de seres vivos (Saval, 1998). La condición de un suelo determina rigidez y la fuerza de sostenimiento, la facilidad para la penetración de las raíces, la aireación, la capacidad de drenaje, el almacenamiento de agua, la plasticidad, y la retención de nutrientes (Rucks y otros, 2004).

Las funciones del suelo se ven afectadas debido al impacto que generan algunas sustancias como los hidrocarburos, esto consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo como consecuencia de la acumulación de sustancias en unas concentraciones que superan el poder de amortiguación natural del suelo y que modifican sus propiedades. Esta acumulación se realiza generalmente como consecuencia de actividades humanas exógenas (Bernal, Clemente, Vázquez, Walker, 2007).

## **B. Hidrocarburos**

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que contienen diferentes combinaciones de carbono e hidrógeno, presentándose en la naturaleza como gases, líquidos, grasas y, a veces, sólidos (Sociedad nacional de minería, petróleo y energía, 2009). Son inmiscibles en agua, por lo que son conocidos como fase líquida no acuosa (NAPLs, Non-Aqueous Phase Liquids por sus siglas en inglés). Aquellos cuya densidad es menor a la del agua, son conocidos como fase líquida no acuosa de baja densidad (LNAPLs, Light Non-Aqueous Phase Liquids por sus siglas en inglés), flotan en los cuerpos de agua superficiales y en los mantos freáticos, estas capacidades se deben a que son una mezcla de varios compuestos químicos y a características como la viscosidad, solubilidad y volatilidad (Dragun, 1989).

La viscosidad de los hidrocarburos es la que determina su migración vertical hacia la profundidad del suelo, de manera que los productos más viscosos como petróleo crudo, combustóleo, aceites, grasas, lodos de perforación; permanecen en las capas superficiales del suelo, mientras que los combustibles destilados como gasolina, diesel, queroseno y turbosina, por su viscosidad menor a la del agua penetran inmediatamente al suelo donde varios factores contribuyen a su dispersión (Dragun, 1989).

La solubilidad de algunos hidrocarburos en agua, así como la volatilidad e interacciones con los compuestos del suelo, son también determinantes del proceso de dispersión. De esta forma, los hidrocarburos que impactan el suelo pueden encontrarse en forma líquida como producto libre, los volátiles entrarán en forma gaseosa en el espacio poroso, otros estarán adsorbidos en la fase sólida del suelo, mientras que otros estarán disueltos en la fase intersticial. Los hidrocarburos de alta viscosidad que permanecen sobre el suelo sufren cambios químicos por efecto de la radiación solar, la pérdida de humedad y acción de la naturaleza, los hidrocarburos que ha sufrido de estos cambios comúnmente se dice que están intemperados (Dragun, 1989).

### **1. Clasificación de los hidrocarburos derivados del petróleo**

Pueden subdividirse en los siguientes grupos que se distinguen entre sí por la composición, propiedades y campos de aplicación: combustibles, aceites de petróleo, parafinas y cerasinas,

hidrocarburos aromáticos, betunes de petróleo, coque de petróleo, grasas plásticas y otros derivados del petróleo de uso distinto (Proskuriakov y Drabkin, 1984).

## **a. Combustibles**

A este grupo pertenecen los combustibles de carburador para motores (gasolina y diesel). Estos se preparan mezclando gasolinas de destilación directa, de craqueo térmico y catalítico y de reforming catalítico con productos de alquilación e isomerización y con refinados de la separación extractiva del benceno y tolueno (Proskuriakov y Drabkin, 1984).

### **1) Diesel**

Es un líquido de color blancuzco o verdoso, compuesto por parafinas y utilizado principalmente como combustible en los motores diesel y en la calefacción. Su poder calorífico es de 8.800 kcal/kg. Cuando es obtenido de la destilación del petróleo se denomina petrodiesel y cuando se obtiene a partir de aceites vegetales se denomina biodiesel. El diesel produce principalmente monóxido de carbono por combustión. Las propiedades del diesel incluyen la viscosidad, volatilidad y calidad de ignición (Parker, 2001).

Su capacidad de inflamación se mide con el índice de cetano, el cual es un índice convencional de la mayor o menor inflamabilidad de un gasoil para motores de combustión interna, tipo diesel. El número de cetano indica la rapidez con la que se inflama un combustible, este va desde cero a cien indicando la inflamabilidad de menor a mayor. El diesel utilizado en los vehículos tiene un índice cetano en torno a 50. El diesel es más denso y menos volátil que la gasolina, y las parafinas que contienen lo congelan a bajas temperaturas. Utilizando aditivos se consigue reducir la temperatura de congelación esto es muy importante en los vehículos. El diesel genera más energía por unidad de masa quemada que la gasolina (Parker, 2001).

El diesel que se emplean en los motores con encendido por compresión se dividen en: combustible para motores de altas revoluciones y combustibles para motores con revoluciones medias, siendo el primero utilizado para motores de tractores, automóviles, locomotoras y buques (Proskuriako y Drabkin, 1984).

## **b. Lubricantes**

Son sustancias viscosas que al ser introducidas entre dos superficies móviles reducen la fricción entre ellas, facilitan el movimiento y reducen el desgaste. Son necesarios para la lubricación hidrodinámica y son usados comúnmente en la industria, motores y como lubricantes de perforación. Los semisólidos se denominan grasas. Su composición puede ser mineral, vegetal o animal y frecuentemente son combinadas con lubricantes sólidos como el grafito, molibdeno o litio (Proskuriakov y Drabkin, 1984).

### **1) Aceites**

Están constituidos por moléculas hidrocarbonadas largas, de composición química compleja, aceites orgánicos y aceites minerales. Los aceites son fracciones viscosas de petróleo con alto punto de ebullición de las cuales se han eliminado las impurezas indeseables por depuración. El grupo más amplio de aceites lubricantes lo constituyen los aceites para motores de carburador de automóviles y motores diesel de tractores. Estos se clasifican de acuerdo con el método de su separación del petróleo (de destilación, residuales, mixtos); según el procedimiento de su depuración (lixiviados, de depuración ácido-alcalina, de depuración selectiva, de depuración adsorbtiva, entre otros), y según su campo de aplicación (lubricación). Los aceites se utilizan para asegurar el engrase líquido de diferentes máquinas y mecanismos, así como con otros fines industriales (Parker, 2001).

### **2. Importancia de los hidrocarburos**

En la industria se utilizan diariamente hidrocarburos en la explotación, procesamiento, almacenamiento, transporte, como combustibles y para la lubricación en vehículos. Lo anterior aumenta la posibilidad de impactar zonas industriales y rutas de transporte. El mayor porcentaje de productos que se impactan y se mezclan con el suelo son: petróleo crudo, gasolina, diesel, tolueno, aceites y grasas (Witteff y Reuben, 2003).

Mediante la aplicación de distintos procesos de transformación (refinación) de los hidrocarburos, se obtienen productos energéticos que son combustibles para el transporte, la industria, la agricultura, la generación de corriente eléctrica y uso doméstico, así como los productos especiales: lubricantes, asfaltos, grasas para vehículos y productos de uso industrial (Sociedad nacional de minería, petróleo y energía. 2009).

La mayor demanda de hidrocarburos es para la fabricación de los combustibles que se usan en los hogares, los automóviles y en las industrias. Los combustibles más usados son gasolinas, kerosene y diesel. Así mismo, la industria petroquímica hace uso de los elementos que se encuentran presentes en los hidrocarburos produciendo compuestos más elaborados que sirven de materia prima para las demás industrias. Entre estos productos está: plásticos, acrílicos, nylon, fibras sintéticas, guantes, pinturas, envases diversos, detergentes, cosméticos, insecticidas, adhesivos, colorantes, refrigerantes fertilizantes, llantas, entre otros (Sociedad nacional de minería, petróleo y energía, 2009).

### **3. Impacto de los hidrocarburos en el suelo**

Los hidrocarburos principalmente impactan la superficie del suelo, por esta razón, la presencia de estos es evidente a simple vista. Los eventos que ocurren en las superficies son consecuencia de actividades industriales, las cuales produjeron el impacto de los hidrocarburos durante la carga o descarga de vehículos, esto ocasiona que la baja viscosidad de los combustibles provoque su migración de manera vertical hacia la profundidad del subsuelo y a la larga puede alcanzar los mantos freáticos, aunque esto no siempre ocurre. Sin embargo, el uso de los hidrocarburos es de importancia energética para las actividades diarias de las industrias (Witteff, Reuben, 2003).

La cantidad vertida y la penetración de los hidrocarburos en el suelo modifican las características fisicoquímicas del mismo, tales como: temperatura, humedad, textura e intercambio gaseoso. Ocasionando una mayor toxicidad según la rapidez o lentitud del proceso. El impacto generado por los hidrocarburos contribuye al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente, esto genera consecuencias para la cadena alimenticia y por lo tanto para la salud humana ya que son un riesgo ambiental que debe ser considerado (Restrepo, 2002).

### **C. Gestión de riesgo ambiental**

La gestión de riesgo ambiental se basa en el estudio del riesgo debido a contaminantes presentes, por ejemplo, en el suelo. El riesgo se define como la probabilidad que una sustancia o situación produzca un efecto adverso para algún elemento sensible, a lo humano, ecológico o económico, bajo determinadas condiciones de contacto. Debido a las normativas de la limpieza de sitios contaminados en países desarrollados, se han desarrollado una serie de metodologías, propuestas principalmente por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA), para la correcta caracterización y definición del problema, así como las posibles tecnologías aplicables para su remediación (Zynda, 2000).

Según la definición de la EPA un sitio contaminado (brownfield en inglés), es aquella zona industrial cuya expansión, desarrollo o re-uso puede complicarse por la presencia verdadera o percibida de alguna sustancia peligrosa o algún contaminante. La gestión ambiental de un sitio incluye la recolección e interpretación de información histórica acerca de las actividades realizadas en ese lugar y los hidrocarburos que puedan estar presentes en el suelo (Zynda, 2000).

Parte de la gestión ambiental consiste en la definición de los contextos y términos que se involucran con el impacto que pueda generar una sustancia, también conocida como residuo. El término residuo tomó relevancia a mediados de los años setenta con la aparición de las iniciativas legislativas. Lo que hoy en día se considera como residuo, anteriormente eran denominados como residuos industriales especiales o residuos químicos. De por sí este término resulta ambiguo, y la característica principal de cualquier programa de regulación debería de ser la de concretar legalmente qué se puede considerar como residuo y qué no debería ser considerado como tal, tarea que puede conllevar grandes esfuerzos y diversidad de opiniones. La EPA tardó casi cuatro años en promulgar las primeras regulaciones que definieron los residuos tras la aprobación de la primera ley nacional de Estados Unidos sobre el tema, desde entonces se han realizado varias revisiones (La Grega, Buckingham, Evans, 1996).

Un residuo "... es un objeto sin empleo y ubicado permanentemente en un área". El empleo de la denominación residuo incluye sólidos, lodos, líquidos y gases envasados. Se puede

considerar que la forma del residuo carece de importancia a la hora de definir el impacto que genera. No obstante, puede considerarse un residuo de alto impacto que presente otras propiedades, como por ejemplo su potencial de combustión, inflamabilidad, reactividad, explosión, corrosión, irritación, infección o bioacumulación (La Grega, Buckingham, Evans, 1996).

#### **D. Métodos de remediación para suelos impactados**

Es de vital importancia que además de realizar la gestión ambiental del suelo impactado con hidrocarburos u otra sustancia que cause un cambio en las características útiles del suelo, se implemente una técnica que ayude a regenerar esas características útiles del suelo. Existen varios tipos de estas técnicas, la más usada es la remediación por métodos biológicos (Schmidt, 2000).

##### **1. Métodos biológicos**

El tratamiento biológico es la degradación del residuo por la acción de microorganismos. La degradación consiste en alterar la estructura molecular de los compuestos orgánicos y el grado de alteración determinado ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación se refiere a la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar. En la mineralización se produce la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y se incorpora el resto a las estructuras de los microorganismos. En conclusión, la biotransformación es una degradación parcial y la mineralización es una degradación completa. Se puede realizar el tratamiento biológico de casi todos los residuos orgánicos peligrosos porque todas las sustancias químicas orgánicas se degradan si se establecen, mantienen y controlan las poblaciones microbianas apropiadas (La Grega, Buckingham, Evans, 1996).

##### **a. Biorremediación de suelos impactados con hidrocarburos**

La biorremediación se basa en el uso de procesos biológicos que permiten a los microorganismos transformar componentes degradables en compuestos como el dióxido de carbono, agua y biomasa bacteriana, entre otros, favoreciendo así la detoxificación de un suelo

impactado por desechos, tal es el caso de hidrocarburos derivados del petróleo. La biorremediación es el proceso utilizado para detoxificar varios contaminantes en los diferentes ambientes (mares, estuarios, lagos, ríos y suelos), usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas. Además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho (Infante, 2001).

La biorremediación reduce el impacto de contaminación por hidrocarburos producto de derrames y promueve de esta manera la protección de la diversidad y fertilidad de los suelos; al igual que reduce la contaminación del espacio natural relacionando el manejo de los hidrocarburos (Sánchez y Rodríguez, 2002).

Los hidrocarburos de petróleo son compuestos que poseen un grado de biorremediación intermedio. Estos han penetrado a la biosfera a través de la filtración y erosión durante millones de años y han desarrollado rutas para su degradación (Evans y Fuchs, 1988).

La biorremediación de estos compuestos está afectada en gran medida por su estado físico y su toxicidad. Debido a que el petróleo es una mezcla compleja, su degradación se favorece por una población variada de microorganismos con amplia capacidad enzimática. Además, la degradación inicial de hidrocarburos frecuentemente requieren la acción de enzimas oxigenasas y esto depende de la presencia de oxígeno molecular. Por consiguiente, las condiciones aerobias son necesarias para romper inicialmente los hidrocarburos. En etapas posteriores, los nitratos y sulfatos pueden servir como aceptores terminales de electrones, pero el oxígeno es el que más se utiliza (Evans y Fuchs, 1988).

Los microorganismos dotados genéticamente para la degradación pueden utilizar su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta  $\text{CO}_2$ ) algunas familias de hidrocarburos, o simplemente, degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio. Este recorrido es catalizado por las enzimas microbianas a través de los diversos subproductos y se conoce como ruta de degradación. Los procesos suelen tener lugar

mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes (Sánchez y Rodríguez, 2002).

## **1) Bases químicas de la biorremediación**

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción con el fin de la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarbonados), que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo al hidrocarburo. Los aceptores más comunes utilizados por los microorganismos son oxígeno, nitratos, hierro (III), sulfatos y dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio. Sin embargo, si se utilizan sulfatos o dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Maroto y Rogel, 2000).

Ortiz (1998) afirma que las poblaciones microbianas que destruyen los compuestos orgánicos sintéticos están sujetas a una variedad de factores físicos, químicos y biológicos, que tienen influencia sobre su crecimiento y su actividad. Las características ambientales para su crecimiento, varían y estas diferencias tienen impacto sobre las poblaciones residentes, la proporción de transformaciones bioquímicas y la identidad y persistencia de los productos de la degradación (Baldizón, 2002).

## **2) Métodos de biorremediación**

La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al microorganismo que efectúe la degradación del compuesto extraño, estos compuestos en su mayoría sintéticos tienen estructuras moleculares o secuencias de enlaces químicos que no pueden ser reconocidos por los microorganismos, (Schwarzenbach, Gschwend, Imboden, 1993). Estos compuestos pueden ser metabolizados o resistentes a la biodegradación. Algunos ejemplos de compuestos resistentes a la biodegradación son: los anillos aromáticos altamente condensados, el polietileno, los plásticos, la

fracción de asfáltenos en el petróleo crudo (Huessemann, 1997). Las bacterias son la especie biológica comúnmente utilizada en la biorremediación, los compuestos resistentes a la degradación pueden mineralizarse por secuencias catabólicas complementarias, que se llevan a cabo entre múltiples especies microbianas, en donde la transformación inicial es por cometabolismo (Fritsche, 1985).

Además de las bacterias se han empleado hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (Benavides y otros, 2006). Los hongos basidiomicetos también han sido utilizados para biorremediar suelos por su especial capacidad para degradar compuestos xenobióticos del tipo de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se han reportado que 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 metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*), la cual absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en las vías digestivas (Baumgarten, 1999).

La biorremediación de suelos puede llevarse a cabo *in situ*, o bien, el material puede ser excavado y tratado *ex situ* (Baumgarten, 1999).

#### **a) Biorremediación *in situ***

En estos métodos se incluyen la bioaumentación; en donde se incorporan microorganismos especializados al sitio impactado con hidrocarburos con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de biorremediación. La bioestimulación, consiste en estimular a los microorganismos de un ambiente natural por medio del agregado de nutrientes, para así mejorar la eliminación de los hidrocarburos presentes en el suelo impactado, otros métodos son la fitorremediación y la atenuación natural (Van, Wang, Ledbetter, 1997). Entre los métodos *in situ* se pueden emplear:

##### **i. Fitorremediación**

La fitorremediación (*fito* del griego *phyto*, que significa planta), es el uso de plantas tolerantes para estimular la actividad microbiana de la rizósfera, con el fin de favorecer la

oxidación y degradación de los contaminantes orgánicos en el suelo. También se ha evaluado la posibilidad de la fitoextracción de los contaminantes mediante el uso de una especie acumuladora comercial que combina un crecimiento rápido, y una elevada acumulación de biomasa y metales pesados, la especie *Brassica juncea* conocida como mostaza india, ha sido utilizada con este fin, pues ha demostrado que acumula Zn y Pb (Bernal, Clemente, Vázquez y Walker, 2007).

## ii. **Atenuación natural**

Se puede denominar también biorremediación intrínseca, se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Sánchez y Rodríguez, 2002). La atenuación natural, aunque no está considerada como una técnica de descontaminación, está englobada dentro de las técnicas de remediación *in situ* de muy bajo costo. Su característica principal es la utilización de los procesos fisicoquímicos de la interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio. Esta técnica se aplica en aquellos casos en los que exista contaminación tanto en suelos como aguas subterráneas producida por hidrocarburos de tipo halogenado o no halogenado (Maroto y Rogel, 2000).

La atenuación natural consiste en la reducción de las concentraciones del hidrocarburo, en el ambiente con los procesos biológicos, los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, y sorción/disorción), y las reacciones químicas (intercambio catiónico, complicación, transformación abiótica) (Corona, Iturbide, 2005). Esta técnica ha probado que es efectiva para remediar suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), e hidrocarburos del petróleo como el diesel (Ferrera, Rojas-Avelizapa, Poggi-Varaldo, Alarcón y Cañizares-Villanueva, 2006).

La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las habilidades metabólicas de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante, la geoquímica y la hidrogeología en la zona. En relación con el oxígeno, y en un modelo muy simplificado, el proceso se define de la siguiente forma: en presencia de oxígeno (condiciones aerobias), los microorganismos convierten los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana (mineralización). Frente a la escasez de oxígeno (condiciones anaeróbicas), los microorganismos dependen de otros

aceptores de electrones disponibles (nitrato, sulfato, formas oxidadas de Fe o Mn), es una biodegradación anaerobia, cuyos mecanismos y significado se están comenzando a comprender. En condiciones ideales los contaminantes se transforman en compuestos químicos más simples, no peligrosos para los posibles receptores ni para el medio (Sánchez y Rodríguez, 2002).

Además de la propia recalcitrancia intrínseca de la molécula, hay numerosos factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado, como la carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno o fósforo), la ausencia de aceptores adecuados de electrones (generalmente oxígeno), la inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad, temperatura), ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes y la presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante. Si se aporta al medio alguno de los elementos de los que carece o bien se potencian los existentes, se favorece la eliminación del posible contaminante (Sánchez y Rodríguez, 2002).

La acción de las bacterias autóctonas reduce la concentración de hidrocarburos en los suelos contaminados. Estas bacterias están presentes en bioestimuladores de interés agronómico, como el estiércol bovino, siendo la bioestimulación de microorganismos autóctonos un método efectivo y de aplicabilidad en el campo, promueve el aumento del crecimiento y concentración de microorganismos capaces de utilizar los hidrocarburos como fuentes de carbono y energía, reduce la concentración de hidrocarburos; conjuntamente al estiércol bovino, se aplica abono 20-20-0. Este brinda las concentraciones necesarias de nitrógeno y fósforo para favorecer el crecimiento de los microorganismos, de la misma manera se debe mantener el 80 por ciento de humedad y aireación para promover las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos, ya que estas necesitan de oxígeno y agua para su óptimo crecimiento (Corona e Iturbide, 2005).

### **iii. Consorcios bacterianos de adquisición comercial**

Existen en el mercado productos comerciales que reúnen microorganismos con potencial biodegradador (Korda, 1997). Uno de estos métodos es el Oil Gator que consiste en una fibra de celulosa modificada químicamente que contiene todos los ingredientes necesarios (nitrógeno, azufre y fósforo), para mejorar la biodegradación de hidrocarburos por bacterias. Cuando se

activa mediante la humedad, las bacterias tienen las condiciones ideales para reproducirse y utilizar rápidamente el hidrocarburo disponible como fuente de energía. La capacidad de adhesión de Oil Gator actúa como un emulsificante físico, ya que rodea las moléculas de hidrocarburo con moléculas de agua en el medio para posteriormente encapsular el hidrocarburo y ponerlo a disposición de las bacterias como fuente de energía (Gator International, n.d.).

El SCD Bio Klean es un producto totalmente natural, el cual se basa en el uso de consorcio bacteriano, estos microorganismos tienen la capacidad para degradar los hidrocarburos presentes en el suelo en conjunto con un proceso de fermentación natural, que promueve el crecimiento de microorganismos beneficiosos naturalmente. Los microorganismos requieren de una fuente de carbono para el crecimiento celular y una fuente de energía para mantener las funciones metabólicas requeridas para su crecimiento. Las fuentes de carbono pueden provenir del contaminante, del carbono contenido en fertilizantes o aditivos y agentes de esponjamiento (“bulking agents”) como el aserrín. El proceso para la eliminación de hidrocarburos suele ser lento pero esto puede ser acelerado al agregarle melaza pues promueve el proceso de fermentación lo que aumenta la población bacteriana y por consecuencia el metabolismo de esta, promoviendo una mayor disminución de los hidrocarburos en el suelo (SCD Probiotic Technology, 2010).

#### b) **Biorremediación *ex situ***

Los procesos de tratamiento se llevan a cabo tras la excavación del medio contaminado, bien en simples biorreactores, en plantas de tratamiento, en biopilas, o sobre láminas impermeables (Atlas y Unterman, 1999).

#### i. **Biopilas**

Las biopilas se utilizan en biorremediación con condiciones no saturadas, hay una reducción de la concentración de contaminantes derivados del petróleo de suelos excavados mediante el uso de la biodegradación. Consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables formadas por suelos contaminados y materia orgánica, compost. Se aplica una aireación activa volteando la pila o pasiva por tubos de aireación. Se puede aplicar a la

mayoría de los compuestos orgánicos, es más eficaz con los ligeros. Entre los factores que influyen en la aplicación de esta técnica están: los hidrocarburos deben ser no halogenados, con concentraciones en suelo menores a 50 000 ppm, la superficie de trabajo necesaria es relativamente grande, se necesita una población microbiana mayor a 1000 UFC (unidades formadoras de colonias), por gramo de suelo (Benavides, Quintero y Ostos, 2006).

### **3) Factores que afectan la biorremediación**

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de los contaminantes está influenciada por los factores ambientales, factores de sustrato y factores microbiológicos. En los factores ambientales se incluyen humedad, aireación, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes. Dentro de las propiedades del sustrato que pueden afectar la biorremediación se incluyen toxicidad, concentración, solubilidad, volatilidad, separación de la fase sólida y estructura química. Entre los factores microbiológicos se encuentran la presencia de microorganismos con rutas para la degradación de los compuestos de interés, aclimatación de las poblaciones microbianas y factores ecológicos. Los factores que afectan al rendimiento de la biorremediación pueden clasificarse en tres grandes grupos: medioambientales, físicos y químicos. Al diseñar y poner en función un proceso de biorremediación, se deben considerar estos factores (Eweis y otros, 1999).

#### **a) Factores medioambientales**

Son necesarios al momento de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la biorremediación. Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, disponibilidad de nutrientes y humedad. Existen determinadas especies de microorganismos que poseen un rango óptimo dentro del cual crecen más rápidamente (Eweis y otros, 1999).

#### **i. Necesidad o disponibilidad de nutrientes y oxígeno**

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y

síntesis (Evans y Fuchs, 1988). Los nutrientes del suelo usados por los microorganismos para su metabolismo son el agua, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sodio, potasio, calcio, cloro, magnesio, hierro, fósforo, nitrógeno y azufre. Sin embargo, principalmente son requeridos el fósforo y el nitrógeno. Por lo general, suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficientes. Sin embargo, si estos no se encuentran en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1 necesarios para la biorremediación (Maroto y Rogel, 2000).

Ortiz (1998), describe que las bacterias heterotróficas necesitan para crecer una fuente de carbono, otros nutrientes y un aceptor final de electrones, el cual es el oxígeno para el caso de las aerobias. Adicionalmente, las bacterias llegan a necesitar micronutrientes en concentraciones traza y algunos factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas y otras moléculas orgánicas (Baldizón, 2002).

Los suelos contienen bajas concentraciones de materia orgánica oxidable. Aunque el carbono puede presentarse en concentraciones de uno por ciento o más, este se presenta en formas complejas, por lo que las bacterias pueden utilizarlo con lentitud. Típicamente, el suministro del resto de los nutrientes exceden los requerimientos de las bacterias, comparativamente con la disponibilidad de carbono, por lo que éste se convierte en el elemento limitante para su crecimiento (Baldizón, 2002).

No obstante, esta situación cambia cuando se introduce un contaminante en el suelo, ya que puede aumentar la demanda de otros nutrientes, como el nitrógeno o fósforo, así como la del aceptor de electrones, que se convierten en el factor limitante. La ausencia de estos disminuye la proporción de degradación del contaminante. Por lo tanto, para que un proceso de biorremediación tenga éxito, es importante vigilar la concentración de cada uno de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, así como la proporción de cada uno de ellos para asegurar la mineralización del impactante (Baldizón, 2002).

## ii. **Temperatura**

Las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45°C (condiciones mesófilas), decreciendo la biorremediación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C (Maroto y Rogel, 2000). Sin embargo, Del Alamo (1999), afirma que puede darse un proceso de biorremediación en zonas críticas a muy bajas o bien a altas temperaturas (por microorganismos termófilos (Baldizón, 2002).

La temperatura del suelo afecta la actividad microbiana y a las tasas de biorremediación. Aunque existe todo un espectro continuo entre los microorganismos, desde los que tienen su temperatura óptima a temperaturas muy bajas hasta los que tienen temperatura alta, se pueden distinguir cuatro grupos de microorganismos con relación a su temperatura óptima; psicrófilos, con temperaturas óptimas bajas; mesófilos, con temperaturas óptimas moderadas; termófilos, con altas temperaturas óptimas; e hipertermófilos, con temperaturas óptimas muy elevadas (Mandigan y otros, 2003). Generalmente las especies de bacterias crecen bien en intervalos de temperatura relativamente reducidos. Las bacterias mesófilas crecen desde los 15 hasta cerca de 45 °C, teniendo un intervalo de crecimiento óptimo entre 25 y 35°C, éste comprende la masa de bacterias del suelo. Las psicrófilas se desarrollan mejor a temperaturas por debajo de 20°C. Las termófilas crecen mejor a temperaturas entre 45 y 65°C (Evans y Fuchs, 1988).

Por regla general de cálculo aproximado, por cada 10°C de incremento en la temperatura la tasa de biorremediación incrementa alrededor del doble. Sin embargo, alguna baja en la temperatura óptima causa una disminución en la tasa de reacción. El incremento paralelo en la tasa de biorremediación con aumento de la temperatura se atribuye al incremento de la actividad microbiana, dando como resultado un aumento en la solubilidad del contaminante y una disminución de los contaminantes absorbidos en el suelo. En general, a temperaturas superiores a 40°C decrece la biorremediación debido a desnaturalización de enzimas y proteínas y a temperaturas aproximadas a 0°C se detienen esencialmente la biorremediación (Evans y Fuchs, 1988).

### **iii. Humedad**

Es importante conocer la humedad y mantenerla constante, ya que los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad, para su crecimiento. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo (Maroto y Rogel, 2000).

Millar (1987), asevera que los microorganismos necesitan de humedad para crecer, ya que se componen por más de un 80 por ciento de agua. Los nutrientes que se encuentran en el medio extracelular se encuentran disueltos en agua, lo cual facilita el paso a través de la membrana al interior de la misma. Las reacciones bioquímicas se realizan en medio acuoso. Ortiz (1998), describe que durante el proceso de biorremediación, si el contenido de agua es muy alto, será difícil que el oxígeno atmosférico penetre en el suelo. Por lo tanto, es importante mantener el contenido de humedad a un nivel adecuado, que de acuerdo a varios autores, es de 50 a 80 por ciento (Baldizón, 2002).

La humedad del suelo tiene gran influencia en la actividad microbiana. El agua sirve como medio de transporte a trazas de compuestos orgánicos y nutrientes, estos son movilizados hasta el interior de la célula y por el cual los productos metabolizados salen al exterior de la célula. El contenido de agua en el suelo influye en la aireación, en la solubilidad de los constituyentes del suelo y en el pH. La poca humedad en el suelo da como resultado zonas secas y, por lo tanto, poca actividad de los microorganismos. Sin embargo, demasiada humedad inhibe el intercambio de gases y da como resultado el desarrollo de zonas anaerobias y como consecuencia la eliminación de bacterias aerobias y aumento de anaerobias o anaerobias facultativas. La aireación y la humedad están directamente relacionadas porque el espacio del poro no llenado con agua es llenado con gas (Evans y Fuchs, 1988).

#### **b) Factores físicos**

El factor más importante es el tamaño de partícula, ya que está relacionado con la afinidad de los contaminantes por la fase sólida de la estructura intersticial afectando la presencia de las comunidades microbianas. Muchos de los contaminantes son absorbidos por partículas sólidas de

las fases del suelo y pueden acumularse en intersticios microscópicos para que las bacterias los colonicen. Debido a que los microorganismos toman los nutrientes de la fase líquida del suelo, la tasa de biorremediación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la adsorción. Asimismo, los hidrocarburos ligeros tienden a distribuirse principalmente en la fase gaseosa y la transferencia gas-líquido puede llegar a convertirse en el proceso limitante de la ya mencionada tasa (Evans y Fuchs, 1988).

El tamaño de la partícula proporciona la capacidad de drenaje al suelo, los que presentan mayor drenaje son los suelos arenosos por el mayor tamaño de partícula que poseen, aquellas de menor tamaño como las arcillas provocan condiciones pobres de drenaje, un buen drenaje en el suelo permite un mejor intercambio de nutrientes y metabolitos en la población bacteriana, por lo que influye directamente en el metabolismo de estas y por lo tanto en el proceso de biorremediación que estas realizan (Baldizón, 2002).

### **c) Factores químicos**

Arias (1990), afirma que el factor químico más importante es la estructura química del hidrocarburo, ya que esta afecta a sus propiedades químicas y su capacidad para ser biorremediado. La capacidad para ser biorremediado está relacionada con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes de los hidrocarburos. El pH también es un factor químico importante que afecta (Baldizón, 2002).

#### **i. Estructura química del hidrocarburo**

Los crudos de petróleo están formados por cuatro familias de compuestos o fracciones; hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos. La biodegradabilidad inherente de un hidrocarburo depende, en gran medida de su estructura molecular. Los parámetros que más van a afectar son halogenación, existencia de ramificaciones, baja solubilidad en el agua y carga atómica diferente (Maroto y Rogel, 2000). Los isoprenoides, y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo,

aumenta su peso molecular aumentando su resistencia a la biodegradación, (Prince, 2005). El diesel está formado por compuestos naftalénicos, parafinados y aromáticos, posee entre 10 a 22 carbonos, mientras que la grasa y el aceite tienen estructuras lineales, debido a esto son más fáciles de degradar que el diesel. Los hidrocarburos saturados son los más propensos a la oxidación y le siguen los hidrocarburos aromáticos (Whyte, 1997).

## **ii. Potencial de hidrógeno (pH) del suelo**

Afecta significativamente la actividad microbiana del suelo. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo, el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La disminución del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre (Maroto y Rogel, 2000).

Ortiz (1998), establece que en el curso de la biorremediación es necesario mantener el pH del suelo en un valor de 7, ya que las bacterias crecen rápidamente y son más resistentes a choques térmicos y condiciones de secado (Baldizón, 2002). Las condiciones altamente ácidas o alcalinas generalmente inhiben la actividad microbiana y muchas bacterias se benefician de las condiciones neutras. El pH del suelo también afecta la solubilidad del fósforo, un nutriente importante para los microorganismos, favorece su crecimiento y metabolismo ayudando al incremento de las poblaciones microbianas, por lo que una población microbiana abundante aumenta la efectividad del proceso de biorremediación, la solubilidad del fósforo se maximiza a niveles de pH de 6.5. Al incrementar el pH, los compuestos de calcio o los que contienen calcio/magnesio pueden ser adicionados al suelo. Este proceso es conocido como abonado con cal, los compuestos utilizados son óxido de calcio (limo), hidróxido de calcio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio y escorias de silicato de calcio (Evans y Fuchs, 1988).

## **4) Ventajas de la Biorremediación**

Las ventajas que tiene sobre los métodos fisicoquímicos tradicionales son: bajos costos de operación, los contaminantes son degradados o transformados, y normalmente no se requiere de un mínimo de tratamientos adicionales. La aplicación es amplia. Se puede aplicar sobre materia

sólida como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, entre otros, en estado líquido como en aguas superficiales, subterráneas y aguas residuales, en estado gaseoso en emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos (Van, Wang, Ledbetter, 1997).

Ortiz M., 1998, indica que el ecosistema del sitio contaminado prácticamente no se altera y no se generan desechos como producto del tratamiento, ya que los contaminantes son degradados, (Baldizon, 2002). Y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública (Llamas, Gallego, García, 2003). También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar; hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, BTEX, PAHs), hidrocarburos clorados (PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas), compuestos nitroaromáticos (TNT y otros), metales pesados, los cuales no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados y otros contaminantes como los compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, entre otros (Sánchez y Rodríguez, 2002).

Otra de las ventajas que aporta la constituye su objetivo, que consiste en la biodegradación y eliminación de contaminantes tóxicos, mientras que otras tecnologías tales como la aireación, adsorción sobre carbono activo granulado, solidificación/estabilización, lavado del terreno y eliminación en vertederos, únicamente trasladan los impactantes a un medio o ubicación diferente (Eweis y otros, 1999).

## **E. Determinación de la concentración de hidrocarburos totales (TPH)**

La determinación de la concentración de los hidrocarburos totales (TPH), es una herramienta para conocer la eficacia del proceso, se espera que con el uso de las técnicas de biorremediación se presente una disminución en la concentración de TPH, esto nos indica que el proceso es efectivo. Existen distintas metodologías propuestas por la EPA, para la determinación de la concentración de TPH en suelo, estas se dividen en dos procesos importantes, la extracción por solvente de los hidrocarburos totales y la cuantificación de los hidrocarburos presentes en la muestra de suelo, expresado en concentración de TPH en ppm (Fernández y otros, 2006). Existen varias formas de realizar este proceso, por métodos con protocolos bastante complejos y en la

actualidad ya se han desarrollado técnicas prácticas para realizar en análisis en el campo. Un ejemplo de estos métodos comerciales es el kit RemediAid™ (Chemestrics water analysis systems, n.d.).

Este kit se fundamenta en una combinación de la reacción de alquilación de Friedel–Crafts modificada y colorimetría. Esta es una reacción de un halogenuro de alquilo con un compuesto aromático en presencia de un halogenuro metálico, mientras que la reacción de alquilación de Friedel–Crafts común, se da entre halogenuro de alquilo y un compuesto aromático en presencia de un ácido de Lewis como catalizador. En este kit el diclorometano ejerce la función del halogenuro de alquilo y se utiliza como solvente para extraer el hidrocarburo presente en la muestra de suelo; y el cloruro de aluminio anhidro, se utiliza como los halogenuros metálicos, ya que es el más sensible de todos lo halogenuro metálicos y posee un porcentaje de recuperación de hidrocarburos más preciso. Se utiliza un exceso de diclorometano, lo que da como resultado un producto coloreado, que permanece en la fase líquida. Y luego a través de un espectrofotómetro, se determinó la concentración de TPH, en la muestra de suelo (Chemesestrics water analysis systems, n.d.).

#### **F. Plan de manejo del suelo impactado con hidrocarburos**

Las instituciones que realizan actividades industriales deben programar un plan de manejo que permita la recuperación de los suelos impactados con los hidrocarburos vertidos. Con este objetivo se necesita recolectar y depositar el suelo impactado con hidrocarburos en contenedores metálicos de color amarillo. En el caso de que la cantidad de tierra sea mayor a la capacidad del contenedor, la misma se debe trasladar directamente a una cancha de biorremediación (Anexo No.1). Toda la tierra impactada que sea llevada al área de biorremediación debe ser ingresada por medio del formato establecido (Anexo No.2).

Por ejemplo: la empresa minera Montana Exploradora de Guatemala cuenta con un plan de manejo aprobado por el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN). La aplicación del plan de manejo es llevado a cabo por el Departamento de Medio Ambiente de la Mina Marlin. Este plan aborda lo relacionado con la recuperación del suelo, este consiste en que el suelo impactado que se encuentra en los contenedores metálicos amarillos, debe ser recogido por el

personal de recolección del Departamento de Medio Ambiente y debe de ser trasladado a la cancha de biorremediación, la cual está dividida en dos partes, una para recepción y colocación del suelo impactado y la otra para realizar la biorremediación. Todo el suelo impactado que es trasladado a la cancha de biorremediación por el personal de recolección, así como el que sea llevado directamente, debe de ser colocado en el lugar destinado para este fin, no se debe colocar en ninguna otra parte, ni ser depositado en algún otro lugar de la mina.

El suelo impactado que se encuentra en el área de recepción es revisado por el personal de campo de Medio Ambiente, para separar piedras y objetos ajenos al suelo mismo, a la vez se deben de ubicar los grumos de grasa, los cuales deben ser separados para su destrucción por medio de incineración, ya sea en el incinerador, si es un volumen reducido o dentro de la grasa que es retirada por un contratista para darle este mismo tratamiento de destrucción. El suelo que esté listo para su tratamiento debe ser paleado hacia el área de biorremediación donde se le agregará una mezcla biológica (tratamiento biorremediador), correspondiente al tratamiento para la biorremediación del suelo impactado.

## **G. Estudios realizados**

La Degradación de 1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno) bis[4-clorobenceno] (DDT) por una cepa nativa de *Hygrophoropsis aurantiaca*, aislada por Bran MC., 1998, fue el primer estudio de este tipo realizado en Guatemala, el objetivo fue determinar la capacidad de un organismo nativo para degradar compuestos recalcitrantes como alternativa para la biorremediación. Se encontró que *H. aurantiaca* degradó el DDT en un porcentaje menor al 25 por ciento, durante los 14 días de incubación. En la última fase del estudio, se procedió a identificar los metabolitos formados, y el (*o-p'* –DDT) fue el único subproducto identificado de la biodegradación de DDT por *H. aurantiaca* esto demostró que *H. aurantiaca* es capaz de degradar moléculas complejas como el DDT por cometabolismo a través de un sistema lignolítico no específico, el cual, se concluyó puede ser de mucha utilidad para la recuperación de suelos contaminados (Baldizón, 2002).

En Venezuela, se utilizaron varias cepas bacterianas autóctonas y la aplicación de lodo estabilizado en la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo del Campo Moga del Estado Zulia. Las cepas bacterianas aisladas del suelo fueron probadas en su capacidad para

degradar diesel (factibilidad). Las cuatro cepas más eficientes integraron el cultivo mixto en un estudio de tratabilidad, donde se aplicó la técnica de compostaje utilizando lodos estabilizados en el suelo contaminado con petróleo, adicionando nitrógeno y fósforo como fertilizante, durante 150 días. Se analizó la concentración de TPH, fracciones de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), nitrógeno total por el método de Kjeldahl, fósforo total, metales pesados totales, microorganismo heterótrofos mesófilos, conductividad eléctrica, temperatura y pH. El lodo, el suelo y el lixiviado generados presentaron rangos permisibles de metales pesados totales, según la normativa ambiental vigente. Se presentaron diferencias significativas en los tratamientos para las variables heterótrofos mesófilos y degradación de TPH, obteniendo los mejores promedios en los tratamientos que contenían, además del lodo, 10 y 15 por ciento de cultivo mixto con densidad poblacional de  $27$  y  $19 \times 10^9$  UFC/ml y la degradación de TPH de 90 y 74 por ciento, respectivamente. En los tratamientos con lodo más 10 y 15 por ciento de cultivo mixto evidenciaron correlación positiva altamente significativa entre la degradación de TPH y el crecimiento bacteriano con el esponjante. Estos tratamientos presentaron la mayor remoción de las fracciones de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), demostrando la eficiencia de la tecnología empleada en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo (Araujo, Montilla, Cárdenas, Herrera, Angulo y Morillo, 2006).

En Colombia, se realizó la biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados, en las instalaciones de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Río Frío, Girón, Santander. Se evaluaron consorcios microbianos nativos, que posteriormente se adicionaron a las biopilas conformadas por lodos deshidratados provenientes del tratamiento primario de aguas residuales domésticas (usados como fuente de materia orgánica), lodos provenientes de lavaderos de carros y lodos de alcantarillado de la zona industrial de la ciudad de Bucaramanga (Colombia). Se aislaron, identificaron y conservaron cepas microbianas con capacidad degradadora de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter spp.*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus spp.* y *Nocardia spp.* Se hizo una serie de pruebas piloto donde se inoculó cada montaje con un consorcio bacteriano a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml de bacterias y microorganismos fúngicos como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml; se monitorearon parámetros de temperatura, pH, humedad y oxigenación. Se realizaron dos ensayos para verificar el comportamiento de dichos tratamientos; se analizó la

variable continua TPH en ppm mediante el método de modelos mixtos lineales en bloques aleatorios completos, que revelaron diferencias significativas entre la biopila control y las biopilas bajo prueba; se obtuvieron porcentajes de remoción hasta de 94 por ciento de TPH en 120 días y 84 por ciento en 40 días, lo que reflejó un efecto positivo en la utilización de los consorcios de microorganismos bajo prueba en la descontaminación de lodos de alcantarillado industrial y lodos de lavaderos de carros (Vásquez, Guerrero, Figueroa y Quintero, 2010).

Otro estudio importante realizado en México, fue la recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. Los resultados muestran el enorme potencial de los microorganismos del suelo, en el mejoramiento de la calidad del mismo, degradación e inmovilización de contaminantes, crecimiento y protección de las plantas frente a diferentes factores. Dentro de los métodos biológicos de recuperación de suelos impactados por metales pesados, metaloides y otros contaminantes, el uso de plantas y microorganismos rizosféricos representa una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales. Las tecnologías que consideran el uso de estos organismos son llamadas: fitorecuperación y biorecuperación, respectivamente. Se resumieron las principales alternativas biológicas que pueden usarse para la descontaminación y recuperación de suelos contaminados por metales pesados. Se hizo énfasis que el uso de plantas requiere considerar a sus microorganismos simbióticos mutualistas de la rizosfera (Gonzales, 2005).

#### **IV. Justificación**

Actualmente son de uso cotidiano los hidrocarburos derivados del petróleo ya que generan energía por medio de la combustión, como consecuencia se ha incrementado el riesgo de producir derrames y al suceder esto se ve afectado el medio ambiente. El suelo es uno de los mayores afectados, los derrames en el suelo tiene la característica de poseer un proceso de degradación lento o nulo de los hidrocarburos, debido a su composición química tienden a acumularse alterando así las características físicas, químicas y biológicas del suelo o en otro caso tienden a difundirse a través de las distintas capas de suelo hasta llegar a contaminar los mantos freáticos. Esta situación planteada hace necesaria la implementación de metodologías que ayuden al suelo y a su microbiota a utilizar estos compuestos como sustratos de una manera más rápida y efectiva.

Algunas empresas cuentan con protocolos para el manejo de derrames de hidrocarburos para evitar generar un impacto en el suelo, como es el caso de la Mina Marlin, ubicada en San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. Pero se necesitan nuevos procedimientos que ayuden a la agilización del proceso de biodegradación natural para aumentar la rapidez con la que se eliminan los hidrocarburos del suelo. Esto se puede lograr a través de la estimulación de crecimiento de microorganismo que se encargan del consumir los hidrocarburos, tal es el caso de los métodos planteado en la presente investigación: atenuación natural con estiércol bovino, o bien la incorporación al suelo de un consorcio bacteriano disponible comercialmente como Oil Gator y SCD Bio Klean.

La importancia de esta investigación radica en que permite evaluar la capacidad y efectividad de tres métodos de biorremediación para la eliminación o disminución de la concentración de hidrocarburos en el suelo. Y se determina, cual de los tres métodos se adapta de mejor manera a las características y necesidades del lugar, a través de este estudio se sienta un precedente para la implementación de la biorremediación en Guatemala, ya que esta tecnología es de joven aplicación en el país y motiva a seguir ampliando estos estudio con investigaciones posteriores, para reducir así el impacto generado por los derrames de hidrocarburos en el suelo, en nuestro país.

## **V. Objetivos**

### **A. Objetivo General**

Evaluar los métodos de Atenuación Natural con estiércol bovino, Oil Gator y SCD Bio Klean para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite, en la Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos

### **B. Objetivos Específicos**

- 1.** Comparar el tiempo y la adaptación a las condiciones de biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite, a través del uso de tres procedimientos.
- 2.** Evaluar de la efectividad de los dos métodos de biorremediación comparados entre sí, a través de la disminución en la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH, por sus siglas en inglés).
- 3.** Determinar el método con mayor efectividad y adaptación a las condiciones del lugar, en la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite.

## **VI. Hipótesis**

La disminución en la concentración de los hidrocarburos totales del petróleo TPH en el suelo se lleva a cabo en un menor tiempo por el método de Oil Gator en comparación con los métodos de Atenuación Natural y SCD Bio Klean.

## **VII. Materiales y métodos**

### **A. Universo de trabajo**

Suelo libre de hidrocarburos e interferentes, o con concentración inicial conocida de hidrocarburos en ppm de TPH, hidrocarburos derivados del petróleo: diesel y aceite. Para el método de Atenuación Natural un consorcio bacteriano autóctono mixto, no identificado, ni aislado, presente en el suelo a tratar estimulado por el estiércol bovino, y los consorcios bacterianos de adquisición comercial Oil Gator y SCD Bio Klean.

### **B. Muestra**

Trece recipientes con capacidad de 85 l o 0.039 m<sup>3</sup> de suelo libre de hidrocarburos y cualquier interferente con los métodos de biorremediación, impactado con 66 ml de diesel y 64 ml de aceite para automotor, para alcanzar una concentración inicial de 5000 ppm de TPH.

### **C. Recursos**

#### **1. Recursos humanos**

- Estudiantes:  
Bachiller Jackelyn Paola Tol Urizar  
M.E.P.U. Julia Mirelia Cali Arriaga
- Asesores:  
Dra. Karin Herrera.  
Lic. Ismael Mancilla

- Personal de Mina Marlin:
  - Lic. Gustavo Gómez, Gerente del Proyecto Cierre de Mina.
  - Lic. Ismael Mancilla, Superintendente del Departamento de Ambiente
  - Ing. Geser González, Jefe Departamento de Gestión de Residuos, Geoquímica y Calidad de Aire.

## **2. Recursos Físicos**

- Cancha de biorremediación del Departamento de Ambiente, Mina Marlín, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.
- Instalaciones administrativas y laboratorio del Departamento de Ambiente, Mina Marlín, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.
- Cabaña para tesis, Mina Marlín, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.
- Centro de Documentación y Biblioteca, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Centro de Documentación y Biblioteca, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca Central, Universidad de San Carlos de Guatemala.

## **D. Materiales**

### **1. Equipo y cristalería**

- RemediAid™ Starter kit para análisis de TPH (Total Petroleum Hydrocarbons, por sus siglas en inglés) de ocho pruebas
- Cuatro repuestos de RemediAid™ Starter kit de 16 pruebas
- Colorímetro SAM A-0310
- Cronómetro
- Sistema multi-sonda YSI 556 MPS

- Computadora ACER
- Impresora Canon iP 2700
- Vortex
- Tubos de ensayo para reacción
- Tubos de extracción con florisil
- Balanza analítica
- Espátula
- Nueve recipientes plásticos con capacidad de 85 l
- Un tonel con capacidad de 250 l
- Un tubo PVC con agujeros a lo largo del tubo
- Termómetro para suelo
- Beacker de 250 ml
- Papel filtro
- Marcador indeleble
- Pala
- Mezcladora LIDER-I
- Guantes
- Mascarilla
- Casco de seguridad
- Chaleco de seguridad
- Zapatos de seguridad
- Lentes de seguridad
- Bata

## **2. Reactivos**

- 0.039 m<sup>3</sup> de suelo libre de hidrocarburos e interferentes para cada recipiente
- 66 ml de diesel (comercial) para cada recipiente
- 64 ml de aceite lubricante (comercial) para cada recipiente
- 68 l de estiércol bovino
- 4.5 l de abono 20-20-0

- 530.00 g Oil Gator para cada recipiente
- 700 ml de SCD Bio Klean™ para cada recipiente
- 1.5 l de melaza
- Agua destilada
- Sulfato de sodio anhidro
- Diclorometano
- Florisil
- Cloruro de aluminio

## **E. Metodología**

### **1. Preparación del suelo**

Se prepararon cuatro recipientes para cada una de las metodologías; limpios y secos; con capacidad de 85 l, se ubicaron en la cancha de biorremediación. Se extrajo una matriz de suelo representativo del lugar, se homogenizó y se retiraron las piedras de mayor tamaño. Se colocó en cada recipiente 0.039 m<sup>3</sup> de suelo libre de hidrocarburos o con concentración conocida de hidrocarburos en ppm de TPH. Se agregaron 66 ml de diesel y 64 ml de aceite para automotor en cada recipiente, se mezcló hasta obtener una muestra homogénea y alcanzar una concentración inicial de 5000 ppm de TPH.

### **2. Preparación de la muestra de suelo control**

Se preparó un recipiente limpio y seco, con capacidad de 85 l, ubicado en la cancha de biorremediación. Se extrajo una matriz de suelo representativo del lugar, se homogenizó y se retiraron las piedras de mayor tamaño. Se colocó en el recipiente 0.039 m<sup>3</sup> de suelo libre de hidrocarburos o con concentración conocida de hidrocarburos en ppm de TPH.

### **3. Método de atenuación natural con estiércol bovino**

#### **a. Preparación de la mezcla biológica**

En un tonel con capacidad de 250 l, se agregaron 68 l de estiércol bovino y 4.5 l de abono 20-20-00. Se vertió agua hasta 20 cm antes del borde del tonel y se mezcló constantemente, para asegurar que el nivel de agua fuera el adecuado, evitando la formación de burbujas de aire que cambiara el nivel de agua. Esta mezcla se agitó dos veces por día, durante dos semanas, la agitación se realizó con tubos de PVC con agujeros a lo largo del mismo para evitar que parte de la mezcla se quedara en el interior, luego de estas dos semanas la mezcla biológica estuvo lista para ser utilizada.

#### **b. Mezcla con muestra de suelo**

El suelo con hidrocarburos, previamente preparado con la concentración inicial de 5000 ppm de TPH. En su respectivo recipiente se le agregó la mezcla biológica, hasta que se incorporó con el suelo, formado un lodo suelto, fácil de batir manualmente, se dejó en reposo hasta que se formó una capa de agua no mayor a 3 cm sobre la superficie de lodo.

#### **c. Determinación de TPH**

Se realizó la medición de la concentración de hidrocarburos en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días, verificando la reducción en la concentración de hidrocarburos.

### **4. Método Oil Gator**

#### **a. Mezcla con muestra de suelo**

El suelo con hidrocarburos, previamente preparado con la concentración inicial de 5000 ppm de TPH. En su respectivo recipiente se le agregó 530 g del consorcio bacteriano de Oli Gator, se mezcló hasta que el suelo estuvo seco al tacto o de apariencia normal. Luego de mezclar, se

humedeció el suelo hasta observar el agua sobrepasar la superficie del suelo o a nivel de inundación, equivalente al 75 por ciento de humedad, se mantuvo constante este nivel de agua, durante todo el proceso (Gator International, n.d.).

#### **b. Determinación TPH**

Se realizó la medición de la concentración de hidrocarburos en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días, verificando la reducción en la concentración de hidrocarburos.

### **5. Método SCD Bio Klean**

#### **a. Mezcla con la muestra de suelo**

El suelo con hidrocarburos, previamente preparado con la concentración inicial de 5000 ppm de TPH. En su respectivo recipiente se le agregaron 700 ml de SCD Bio Klean™ y se mezcló con 1.5 l de melaza. A esta mezcla se le agregó entre 1 y 3 l de agua, la cantidad de agua dependió del grado de hidratación del suelo.

#### **b. Determinación de TPH**

Se realizó la medición de la concentración de hidrocarburos en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días, verificando la reducción en la concentración de hidrocarburos.

### **6. Parámetro que deben ser controlados en el proceso**

#### **a. Humedad**

Fue necesario alcanzar entre el 75 al 80 por ciento de humedad lo que es equivalente a observar el nivel del agua sobre la superficie del suelo o inundación del suelo, para los métodos de Oil Gator y SCD Bio Klean. En el método de Atenuación Natural fue necesario mantener el nivel de la mezcla biológica 3 cm por encima del suelo. Esta condición se mantuvo constante

durante todo el proceso, principalmente porque el suelo estaba a la intemperie. Se determinó el parámetro en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días (Corona e Iturbide, 2005).

- **Procedimiento**

Se calculó la humedad del suelo a través del método gravimétrico, este determinó la cantidad de agua en el suelo. Se pesó 1 g de suelos sobre un papel filtro a peso constante (tarado), identificando la muestra, se colocó la muestra de suelo dentro del horno a 80 °C (+/- 5 °C) por 24 horas, se sacó la muestra del horno y puso dentro de un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, y se pesó nuevamente la muestra (con todo y papel). Se calcularon los porcentajes de humedad en el suelo por diferencia de pesos. % Humedad del suelo = (Peso inicial – Peso final)/ Peso final \* 100 (Fernández y otros 2006).

- b. Temperatura**

Las tres metodologías se realizaron a temperatura ambiente, ya que a temperaturas superiores de 48.8 °C durante periodos prolongados disminuye la velocidad del proceso de biorremediación y temperaturas por debajo de 4.4 °C reducen el crecimiento bacteriano. Se determinó el parámetro en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días (Araujo y otros, 2006).

- **Procedimiento**

Se seleccionó un punto fijo en el centro del recipiente para la determinación de la temperatura, se introdujo un termómetro para suelo, en el punto de muestreo a 5 cm de profundidad, esperando hasta que la medición se estabilizara y se registró la temperatura (Fernández y otros 2006).

- c. pH**

El pH del suelo en las tres metodologías se debía mantener en un intervalo de 4,5 a 9,5; para conseguir las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano y un mejor proceso de intercambio

catiónico del suelo. Se determinó el parámetro en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días (Araujo y otros, 2006).

- **Procedimiento**

Se determinó a través del método potenciométrico. Pesando 5 g de suelo en un beacker de 250 ml, se agregó 50 ml de agua destilada, agitando por 3 minutos, se dejó reposar. Se decantó al tubo para transporte del Sistema multi-sonda YSI 556 MPS, antes de la determinación de pH se calibró el Sistema multi-sonda YSI 556 MPS con la solución de pH 7, se midió el pH con el Sistema multi-sonda YSI 556 MPS se introdujo el sensor para determinar el pH dentro del tubo para transporte, se registró el resultado obtenido (Fernández y otros, 2006).

**d. Aireación**

Está determinada por la mezcla de las muestras, con el propósito de oxigenar el medio para beneficio del crecimiento del consorcio bacteriano (Corona e Iturbide, 2005). Para el método de atenuación natural se realizó dos veces por día, para Oil Gator solo fue necesario realizarlo al inicio del proceso y para el método de SCD Bio Klean se realizó cada diez días.

- **Procedimiento**

Se aireó homogéneamente el suelo a través de mezclar de la muestra de manera uniforme.

**7. Determinación de la concentración de hidrocarburos totales (TPH), con el kit RemediAid™.**

Esto se realizó en cada una de las muestras para cada tratamiento, así como al suelo control, en intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 días. Abarcó tres pasos principales: una extracción por solvente, la separación del sobrenadante y desarrollo y medición del color. Se calibró el colorímetro con el blanco, incluido en el kit, hasta alcanzar una absorbancia de 0.00. Se empleó la pendiente y valores de intersección de las curvas de calibración adecuadas, incluidas en la

prueba de procedimiento en el inserto, para los diferentes hidrocarburos derivados del petróleo (Chemestrics water analysis systems, n.d.).

#### **a. Procedimiento**

Se pesó 1 g de suelo en el tubo de reacción que contiene 3g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar la humedad de la muestra. Si la muestra poseía exceso de humedad, como los lodos, se le agregó 4 g más de sulfato de sodio anhidro, se agitó hasta quedar homogénea. Se agregaron 20 ml de diclorometano, al tubo de la reacción que contenía el suelo seco, se tapó y agitó vigorosamente el tubo de reacción por tres minutos, se dejó sedimentar la muestra por dos minutos y se extrajo el sobrenadante, este contenía los hidrocarburos de interés en solución. Se decantó el sobrenadante en un tubo de limpieza, que contiene florisil (silicato de magnesio activo, se utiliza para eliminar hidrocarburos polares presentes en su fuente natural, como la materia orgánica y la turbidez del extracto), se tapó y agitó vigorosamente por un minuto y se dejó reposar por 2 minutos, se removió el tapón del tubo de limpieza (color verde) y se reemplazó por el tapón blanco con un pequeño agujero en el centro, se unió la ampolla, que contiene el cloruro de aluminio con el tip, se introdujo dentro del agujero del tapón blanco y se rompió suavemente la punta de la ampolla dentro del tip, para que por efecto del vacío se llenara la ampolla con la solución de hidrocarburos, se extrajo la ampolla del tip y se tapó con un pequeño tapón de silicón, se dejó reposar por un periodo de diez minutos, invirtiéndolo periódicamente. Se insertó la ampolla dentro del compartimiento del colorímetro y se leyó la absorbancia, se calculó la concentración de hidrocarburos (Chemestrics water analysis systems, n.d.).

#### **b. Cálculos**

Para calcular la concentración de TPH en la muestra de suelo, se utilizó la ecuación, el inserto proporcionó los valores para la pendiente de cada hidrocarburo. Se usó el valor de absorbancia obtenido de la lectura de la muestra en el colorímetro. A las absorbancias obtenidas de las muestras se les restó el valor de la absorbancia de la muestra control (suelo sin hidrocarburos), eliminando así el efecto coloreado que pueda producir el suelo.

- **Ecuación**

$$\text{mg TPH/ kg suelo} = [(A*S) - I] * 20$$

**A** = absorbancia

**S** = pendiente específica para los hidrocarburos

**I** = intercepto específico para los hidrocarburos

**20** = relación entre el volumen de la extracción y el peso de la muestra de suelo (20/1)

**c. Interferentes**

Se presentó una respuesta elevada en concentraciones del cinco por ciento peso-peso, para el éter puro metil-tert-butílico (MTBE); tetracloroetano (PCE), disolvente de Stoddard; y 1,2,4-triclorobenceno y para el suelo enriquecido con ácidos húmicos. Por el contenido de humedad mayor del 16 por ciento, presenta un aumento en el 8 por ciento de los resultados de TPH (Chemestrics water analysis systems, n.d.).

**F. Diseño Experimental**

- 1. Matriz:** un estándar para todos los ensayos (libre de hidrocarburos y cualquier interferente con los métodos). Si el suelo presenta un valor en la concentración de TPH se debe realizar la determinación de la concentración de TPH para tomarlo en cuenta en la cantidad agregada del hidrocarburo al suelo, esta matriz estará en estos recipientes durante los 120 días que durará el estudio.
- 2. Unidad experimental:** Trece recipientes individuales con capacidad de 85 l, para la mezcla de los dos hidrocarburos, diesel y aceite. Cuatro para cada método y uno para el control.

### 3. Variables

- Concentración de TPH para los hidrocarburos: diesel y aceite (mixta)
- Tiempo: cada 30 días por 120 días (una determinación por recipiente).
- Tres métodos de biorremediación: atenuación natural, Oil Gator y SCD Bio Klean.

### 4. Control del proceso

- Humedad
- Temperatura
- pH
- Aireación

### 5. Análisis

Análisis de tres modelos de regresión (ecuación polinómica de tercer orden), evaluando concentración de TPH vs. tiempo, por medio del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y error estándar, el  $r^2$  mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra a los valores observados, si los valores están próximos a la recta se espera un valor grande del coeficiente, lo cual indica que aproximadamente el 99% de la variación total en los valores de la concentración de TPH es explicada por la regresión. A diferencia de lo anterior, si los valores están ampliamente dispersos en torno a la recta de regresión, se supone que el coeficiente será pequeño, y esto indica que menos del 50% de la variación total en la concentración de TPH es explicado por la regresión. El valor máximo que puede tomar  $r^2$  es uno, un resultado que se obtiene cuando toda la variación en los valores es explicada por la regresión y el valor mínimo es cero, y este resultado se obtiene cuando ninguna de las variaciones es explicada por la regresión (Daniel, 1998).

Luego se realizó una prueba de hipótesis para comparar (por pares de métodos) los coeficientes y determinar si los modelos son equivalentes o comparables, por medio de t de Student. En donde  $\beta$  es cualquier comparación de los coeficientes por pares de tratamientos con

respecto al tiempo, por ejemplo:  $\beta_0$  compara dos tratamientos del día 0 al día 30,  $\beta_1$  los compara del día 30 al día 60,  $\beta_2$  los compara del día 60 al día 90 y  $\beta_3$  los compara del día 90 al día 120. El análisis de varianza de la regresión, para todas las comparaciones tiene un valor “p”  $<0.0001$ , y este se refiere a que la probabilidad de error es mínima al comparar dos o más grupos, cuando aseguramos que ambos son diferentes. Por esta razón cuanto menor sea el valor “p”, menor es la probabilidad de error (Daniel, 1998).

## 6. Prueba de hipótesis

MA: Método A= atenuación natural con estiércol bovino

MB: Método B=Oil Gator

MC: Método C=SCD Bio Klean

$H_0: \beta_i = \beta_j$

Donde  $\beta$  es cualquiera de los coeficientes de los métodos comparando los métodos por pares agrupados como i y j

$H_a: \beta_{MA} < \beta_{MB}$

$H_a: \beta_{MA} < \beta_{MC}$

$H_a: \beta_{MB} < \beta_{MC}$

Numero de réplicas: cuatro réplicas con un límite de confianza al 95% para cada método, a cada repetición se le determinó la concentración de TPH.

## VIII. Resultados

El objetivo del presente estudio fue evaluar los métodos de atenuación natural (AN) con estiércol bovino, Oil Gator (OG) y SCD Bio Klean (BK) para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite, a través de la disminución en la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) en partes por millón. Para dicho propósito se hizo uso de parámetros físicos y químicos, en la determinación y control de condiciones medioambientales propiciándose de esta manera el proceso de biorremediación de una forma efectiva. Los parámetros a evaluar fueron; temperatura ( $^{\circ}$ T) en grados Celsius ( $^{\circ}$ C), potencial de hidrógeno (pH), porcentaje de humedad (%H) y TPH en ppm.

Para la determinación de la  $^{\circ}$ T (Tabla No.1), se observó que los promedios obtenidos se encuentran dentro de los valores ideales en cuanto a crecimiento bacteriano, los cuales están comprendidos desde  $15^{\circ}$ C hasta  $45^{\circ}$ C. Tomando en cuenta que todas las metodologías fueron evaluadas bajo las mismas condiciones, el valor máximo de  $^{\circ}$ T fue  $22.57^{\circ}$ C en el día 0 para AN; y el valor mínimo de  $^{\circ}$ T fue de  $14.5$  en el día 120 para la misma metodología. Sin embargo, es importante notar que el comportamiento de todas las determinaciones fue la disminución gradual con respecto al tiempo.

**Tabla No. 1: Promedios de la temperatura en cinco mediciones durante un período de 120 días, para tres métodos de biorremediación.**

Métodos	Temperatura ( $^{\circ}$ C)									
	Día 0		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120	
	$\bar{x}^1$	$\pm SD^2$	$\bar{x}$	$\pm SD$						
<b>AN<sup>3</sup></b>	22.57	1.25	20.50	1.00	16.50	1.00	16.50	1.00	14.50	0.57
<b>OG<sup>4</sup></b>	22.32	2.23	20.75	0.95	17.00	1.15	16.75	0.50	15.00	0.00
<b>BK<sup>5</sup></b>	20.72	0.17	20.75	0.95	17.00	1.15	16.75	0.50	15.50	0.57

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Promedio, 2: Desviación estándar, 3: Atenuación natural, 4: Oil Gator y 5: Bio Klean

En la determinación del pH (Tabla No. 2), debe de tomarse en cuenta que el rango ideal para un adecuado metabolismo bacteriano está comprendido entre 6 y 8, las determinaciones obtenidas se encontraron dentro de dicho rango, a excepción de AN en el día 30 el cual presentó

un valor de 8.06, OG en día 0 con un valor de 6.05 y BK que presentó valores por debajo del rango ideal en todas las determinaciones. .

**Tabla No. 2: Promedios del potencial de hidrógeno en cinco mediciones durante un período de 120 días, para tres métodos de biorremediación.**

Métodos	Potencial de hidrógeno (pH)									
	Día 0		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120	
	$\bar{x}^1$	$\pm SD^2$	$\bar{x}$	$\pm SD$						
<b>AN</b> <sup>3</sup>	6.99	0.12	8.06	0.20	7.37	0.40	7.22	0.04	7.33	0.08
<b>OG</b> <sup>4</sup>	6.05	0.13	7.91	0.08	7.55	0.22	7.31	0.18	7.03	0.10
<b>BK</b> <sup>5</sup>	5.97	0.21	5.45	0.24	5.56	0.27	5.69	0.34	5.64	0.35

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Promedio, 2: Desviación estándar, 3: Atenuación natural, 4: Oil Gator y 5: Bio Klean.

Los promedios de las determinaciones del porcentaje de humedad (Tabla No. 3) fueron variados, oscilaron desde un 51.84% hasta 94.74%. Algunos de estos valores se ubicaron dentro de los porcentajes ideales que van desde el 50% al 80%. Sin embargo, en los tres métodos se observó la variación constante en cada una de las determinaciones durante el período de tiempo establecido, por lo que este parámetro no mostró un patrón específico de comportamiento.

**Tabla No. 3: Promedios del porcentaje de humedad en cinco mediciones durante un período de 120 días, para tres métodos de biorremediación**

Métodos	Porcentaje de humedad (%H)									
	Día 0		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120	
	$\bar{x}^1$	$\pm SD^2$	$\bar{x}$	$\pm SD$						
<b>AN</b> <sup>3</sup>	70.85	8.57	79.40	8.97	67.44	7.21	94.00	10.82	71.13	4.67
<b>OG</b> <sup>4</sup>	61.66	6.02	65.33	10.58	51.84	8.89	77.56	11.33	65.70	1.29
<b>BK</b> <sup>5</sup>	80.84	14.35	75.15	14.02	69.94	29.63	94.74	18.36	67.61	13.89

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Promedio, 2: Desviación estándar, 3: Atenuación natural, 4: Oil Gator y 5: Bio Klean.

Se partió de una concentración inicial de TPH en ppm diferente para cada método (Tabla No. 4) pese a esto la concentración de cada método fue disminuyendo de forma gradual en

función del tiempo, a excepción del aumento que se observó en OG de 3621.38 a 3812.84 ppm y en BK de 3133.73 a 3278.27 ppm ambos del día 30 al 60. A pesar que OG inició con la mayor concentración de TPH presentó mayor disminución en dicho parámetro, durante todo el período.

**Tabla No. 4: Promedios de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo TPH en partes por millón (ppm) en cinco mediciones durante un período de 120 días, para tres métodos de biorremediación.**

Métodos	ppm de TPH									
	Día 0		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120	
	$\bar{x}^1$	$\pm SD^2$	$\bar{x}$	$\pm SD$						
<b>AN</b> <sup>3</sup>	5474.02	774.21	4111.48	211.02	4009.47	464.67	3273.46	474.35	2190.19	106.18
<b>OG</b> <sup>4</sup>	8189.32	1977.53	3621.38	579.23	3812.84	425.61	3422.03	580.34	2680.31	354.02
<b>BK</b> <sup>5</sup>	3487.39	791.89	3133.73	622.54	3278.27	193.38	2726.05	313.86	2373.17	231.11

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Promedio, 2: Desviación estándar, 3: Atenuación natural, 4: Oil Gator y 5: Bio Klean.

La concentración de TPH presentó un comportamiento descendente para las tres metodologías; el cual fue expresado como porcentaje de reducción total (Tabla No.5)

**Tabla No.5: Porcentaje de reducción total en la concentración de TPH en un período de 120 días, para tres métodos de biorremediación.**

Métodos	Reducción total (%)
<b>AN</b> <sup>1</sup>	59.75
<b>OG</b> <sup>2</sup>	66.75
<b>BK</b> <sup>3</sup>	29.25

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Atenuación natural, 2: Oil Gator y 3: Bio Klean.

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) permitió evaluar la eficiencia de la ecuación de regresión para cada uno de los métodos, dado que los valores de  $r^2$  son menores a uno (Tabla No.6), el modelo que mejor se ajusta es la regresión cúbica o ecuación polinómica de tercer orden. De igual forma, el error estándar permitió comparar la dispersión de los puntos en torno a la regresión y ya que estos valores no poseen un comportamiento lineal, presentan mayor dispersión.

**Tabla No. 6: Comparación del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y error estándar.**

Método	$r^2$	Error estándar
AN <sup>1</sup>	0.866	471.720
OG <sup>2</sup>	0.820	1013.750
BK <sup>3</sup>	0.486	441.666

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Atenuación natural, 2: Oil Gator y 3: Bio Klean.

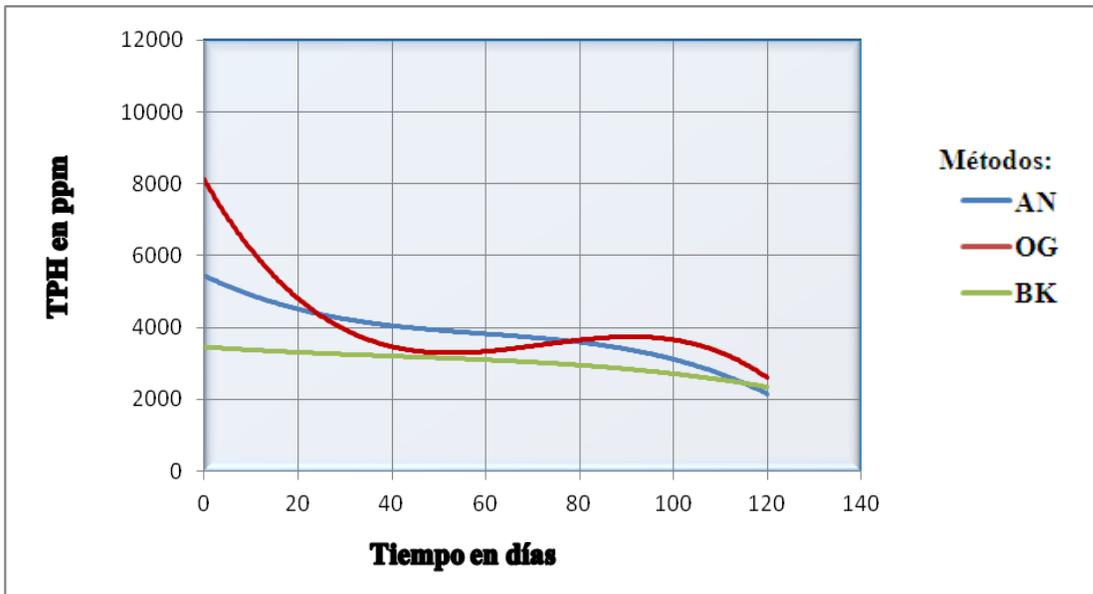
La prueba de hipótesis para comparar los coeficientes de determinación por pares de métodos a través de T de Student (Tabla No.7) determinó si los modelos son equivalentes; en donde  $\beta$  es cualquier comparación de los coeficientes por pares. Todos los coeficientes presentaron diferencias significativas entre sí, con excepción de  $\beta_2$  para AN-BK, pero este resultado no es relevante para el estudio, ya que esto solo se presentó en una comparación y la probabilidad del porcentaje de error es baja.

**Tabla No. 7: Prueba de hipótesis para comparar por pares de métodos los coeficientes de determinación por medio de T de Student.**

Comparación	Coefficientes de determinación	Diferencia	<sup>5</sup> Valor p
AN <sup>1</sup> – OG <sup>2</sup>	<sup>4</sup> $\beta_0$	-2666.841	<0.0001
	$\beta_1$	164.43	<0.0001
	$\beta_2$	-2.513	<0.0001
	$\beta_3$	0.155	<0.0001
AN – BK <sup>3</sup>	$\beta_0$	1985.346	<0.0001
	$\beta_1$	-53.07	0.0088
	$\beta_2$	0.776	0.0638
	$\beta_3$	0.0059	0.0054
OG - BK	$\beta_0$	4652.187	<0.0001
	$\beta_1$	-215.5	<0.0001
	$\beta_2$	3.289	<0.0001
	$\beta_3$	0.1609	<0.0001

**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Atenuación natural, 2: Oil Gator , 3: Bio Klean y 4:  $\beta$  cualquier comparación de los coeficientes por pares. 5: Diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

**Grafica No. 1: Comparación del comportamiento de los tres métodos con respecto a la disminución de TPH en ppm.**



**Fuente:** datos experimentales obtenidos en Mina Marlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos. 1: Atenuación natural, 2: Oil Gator , 3: Bio Klean.

La grafica No. 1 muestra el comportamiento de los tres métodos evaluados con respecto a la disminución en la concentración de TPH en ppm, concluyéndose que ninguno de los tres son equivalentes entre sí. Particularmente en el caso de BK la concentración inicial fue menor; observándose poco cambio a lo largo del periodo.

## IX. Discusión de resultados

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los métodos de atenuación natural (AN) con estiércol bovino, Oil Gator (OG) y SCD Bio Klean (BK) para la biorremediación de suelos impactados con diesel y aceite. El proceso de biorremediación del suelo se basa en el uso de procesos bioquímicos que permiten a los microorganismos degradar los hidrocarburos en compuestos simples como dióxido de carbono, agua y biomasa bacteriana, entre otros (Infante, 2001). Cada tratamiento promovió el proceso de biorremediación de forma particular; ya sea aumentando la población de microorganismos autóctonos en el medio, a través de la adición de nutrientes necesarios para la estimulación del crecimiento de los mismos, tal es el caso de AN (Sánchez y Rodríguez, 2002), o integrando al medio microorganismos que tengan la capacidad de consumir los hidrocarburos como sustrato de forma rápida, tal es el caso de OG y BK (Korda, 1997). Este proceso en el suelo impactado con diesel y aceite, debe llevar un control de distintas condiciones físicas y químicas; para proporcionar la condiciones adecuadas al medio y de esta forma asegurar que las reacciones bioquímicas sean realizadas por los microorganismos (Sánchez, 2002).

La evaluación de los tres métodos de biorremediación se determinó en gran medida por el comportamiento que presentaron las condiciones del medio. En la presente investigación se realizaron cinco determinaciones de la temperatura (T) en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), el potencial de hidrógeno (pH), el porcentaje de humedad (%H) y la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) en partes por millón (ppm), cada 30 días, durante un intervalo de cero a 120 días.

La temperatura afecta la actividad microbiana y la capacidad de biorremediación que poseen los microorganismos (Mandigan y otros, 2003) particularmente los géneros de actinomicetos como *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora* al igual que las mixobacterias (Solomon, Berg, Martin, 2001). Si las bacterias se encuentran a temperaturas superiores a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  la biorremediación decrece debido a la desnaturalización de las enzimas primordiales para el metabolismo bacteriano y a temperaturas inferiores a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  se inhibe el crecimiento y metabolismo de los mismos y por lo tanto, también el proceso de biorremediación (Maroto, 2000).

Las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (en condiciones mesófilas) (Maroto, 2000), la temperatura de los recipientes de prueba (Tabla No.1), muestra que los valores se mantuvieron dentro de los límites adecuados para la actividad de los microorganismos en todos los tratamientos evaluados. Además, están próximos entre sí en cada determinación. Se debe notar la disminución de la temperatura en los tres métodos a lo largo del período de evaluación, esto se debió a que los recipientes de prueba estuvieron expuestos al ambiente, ya que la intemperie es una de las condiciones en las que se encuentra la cancha de biorremediación de Mina Marlín; y es en esta ubicación donde posteriormente se implementará uno de los tres métodos evaluados. Por lo tanto, todo el material contenido en estos recipientes adoptó la temperatura ambiental del área. Además del efecto que ejerció el clima ya que la temperatura en el país disminuye durante el invierno del hemisferio norte, cuando la exposición del hemisferio a la energía del sol es menor; esta situación se presenta durante el invierno y hacia fin del año en el país, en los meses de julio a diciembre (MARN, 2007).

El pH afecta de manera considerable la actividad microbiana del suelo. El crecimiento y el metabolismo de la mayor parte de microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 4.5 y 9.5. Así mismo, el pH también afecta directamente la solubilidad del fósforo y el transporte de metales pesados en el suelo (Maroto, 2000). En la determinación del pH en el día cero (Tabla No. 2), los valores para cada tratamiento estuvieron en un rango de 5.97 a 6.99, a pesar que el suelo poseía las mismas características, esta variación se debió a los componentes y requerimientos de cada método en particular, en el caso de AN los componentes de la mezcla biológica los cuales son estiércol bovino y abono 20-20-00 esta denominación es debida a las proporciones de nitrógeno, fósforo y potasio presentes en el abono (Raxcaco, 2001). Por otra parte, para OG influyó el polímero de celulosa y el agua que se adicionó al medio y para BK la materia orgánica, pero de manera particular la fermentación producida por la adición de melaza (Julca y otros, 2006).

Los valores de las determinaciones de pH para los tres métodos están dentro del rango aceptado y presentaron tendencia a disminuir (Tabla No. 2) esto se debe a que la actividad metabólica de las bacterias ocasiona acidificación del medio, por la producción de ácidos

orgánicos y del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Araujo y otros, 2006). Estos resultados coinciden con los de LaGrega y otros (1996) quienes señalan que la acción de los microorganismos puede alterar los valores de pH, disminuyéndolo.

Las determinaciones del pH para AN y OG en el día 30 presentaron un ligero aumento (Tabla No. 2), en el caso de AN esto pudo ser debido al fósforo, ya que es un nutriente proveniente de la mezcla biológica y tienen características ácidas, esto proporcionó el pH ácido inicial al medio y al ser consumido por los microorganismos presentes se redujo la concentración y hubo un ligero aumento en el pH (Vargas y otros, 1981). En el caso de OG se pudo deber a la adición de agua para mantener el porcentaje de humedad en el medio. En las determinaciones posteriores el pH se mantuvo cercano a 7 lo cual ubica este valor dentro del ideal para el proceso de biorremediación (Vargas y otros, 2006).

El tratamiento BK en la determinación del día cero al día 120, presentó valores cercanos a cinco (Tabla No 2), esta diferencia en el pH con respecto a los otros dos métodos se debe a sus componentes particulares, la cantidad de materia orgánica proporcionada por el aserrín y la producción de ácidos orgánicos como resultado de la fermentación de la melaza, este proceso último puede alcanzar un valor de pH de 4.5 a 5.5 (Vargas y otros, 1981). Dado que los tres métodos durante todas las determinaciones en el período de tiempo establecido presentaron valores dentro del rango ideal de pH el proceso de biorremediación se vio favorecido.

El %H no presentó un comportamiento definido en los tres métodos (Tabla No. 3), más bien se observaron fluctuaciones en los valores, Baldizón (2002) afirma que los rangos de humedad adecuados para el metabolismo bacteriano son 50-80%. A pesar de la fluctuación en los valores de cada determinación, la mayoría de estos se encuentran dentro del rango, a excepción de las determinaciones del día 90 para los tratamientos AN y BK que presentaron un valor por encima del límite superior al rango adecuado, esto es debido a que en ciertos intervalos de tiempo según lo dicta los requerimientos de cada método es necesaria la adición de agua para contrarrestar la pérdida de humedad por exposición al ambiente. Por este motivo fue necesaria la adición de agua en el caso de BK y mezcla biológica para AN. Al restablecer el %H en los tratamientos se propició la actividad microbiana, puesto que el agua sirve como medio de transporte de trazas de

compuestos orgánicos y nutrientes, estos son movilizados hasta el interior de la célula y los productos metabolizados salen al exterior de la célula (Evans y Fuchs, 1988).

La concentración inicial de TPH calculada para cada método fue de 5000 ppm, sin embargo, los valores determinados en el día cero presentaron diferencia a lo calculado; estos fueron para AN: 5474.02 ppm, OG: 8189.32 ppm y BK: 3487.39 ppm, la variación en la concentración esperada y obtenida de TPH se debió al número de componentes presentes en cada tratamiento, la cantidad de material determinó la superficie de contacto entre los hidrocarburos, suelo y tratamiento, que aumenta o disminuye la movilización y dispersión de hidrocarburos, influenciando la concentración inicial de TPH. Tal es el caso de BK compuesto por el consorcio bacteriano, aserrín, melaza y agua, que proporcionó mayor superficie de contacto dando como resultado mayor movilización y dispersión de hidrocarburos, sumado a esto, el efecto de absorción de hidrocarburos ejercido por el aserrín, al ser un producto orgánico con alta capacidad de absorción oleofílica e hidrofóbica (Díaz, Rivas, Acosta, Miller, Romero... Laffita, 2013), provocando una menor concentración de TPH. Se registró el caso contrario para OG, que consta de un solo componente adicionado al suelo; la superficie de contacto, movilización y dispersión para los hidrocarburos fue menor, lo cual indujo una mayor concentración de TPH. Por lo que las diferencias en la concentración inicial de cada tratamiento no generó ningún efecto sobre la capacidad de biorremediación de cada uno, puesto que durante toda la evaluación estos presentaron disminución en la concentración de TPH (Tabla No. 4).

La concentración de TPH para OG presentó disminución del día 0 al 30, fue de 8189.32 ppm a 3621.38 ppm. Esto se puede relacionar con la temperatura, pH, %H y disponibilidad de nutrientes, al brindar las condiciones adecuadas a los microorganismos degradaron efectivamente los hidrocarburos. El día 60 para OG y BK se observó un leve aumento en la concentración de hidrocarburos, esto se debió a la humedad que actuó como interferente en la metodología de determinación de TPH, el ocho por ciento de las determinaciones en condiciones de elevada humedad produce un aumento en la concentración de hidrocarburos (Chemestrics water analysis systemes, n.d.). Sin embargo, en determinaciones posteriores se observó la disminución de TPH (Tabla No. 4), y los tres tratamientos alcanzaron concentraciones cercanas a 2000 ppm el día 120.

Si la reducción en la concentración de TPH, se visualiza como un porcentaje de reducción total (Tabla No. 5), es evidente que los tres tratamientos redujeron la concentración. Sin

embargo, OG obtuvo el mayor porcentaje de reducción (66.75%) por ser el tratamiento que inició con mayor concentración de hidrocarburos. A pesar de esto la disminución final de TPH fue la misma que en los otros tratamientos, además OG posee menos componentes al momento de su preparación, por lo que es menos laborioso al implementarse, considerándose así con mayor facilidad de aplicación al llevarse a cabo el proceso de biorremediación para obtener disminución en la concentración de hidrocarburos.

Se analizó el comportamiento en la disminución de TPH a través de una regresión cúbica (ecuación polinómica de tercer orden), esta se ajusta mejor al comportamiento mostrado por los métodos de biorremediación. Se tomó como variable dependiente la concentración de hidrocarburos y como variable independiente el tiempo de lectura para los tres métodos, AN, OG y BK. Para la selección de un modelo de regresión se utilizó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ya que este es una forma de evaluar la eficiencia de la ecuación de regresión al compara la dispersión de los puntos, en este caso la concentración de TPH en torno a la recta de regresión (Daniel, 1998).

Los coeficientes de determinación calculados para cada tratamiento evaluaron el ajuste de los mismos a la regresión cúbica (Tabla No. 6), para AN y OG están cercanos a 1, por lo que en mayor porcentaje se ajustan a la regresión, en el caso de BK tiene un valor de  $r^2$  menor, sin embargo, pese a este valor la regresión cúbica es la que mejor se ajusta para la representación del comportamiento de dicho tratamiento. En términos de dispersión, los valores del error estándar al ser elevados (Tabla No. 6) confirmaron que hay mayor dispersión porque no poseen un comportamiento lineal.

La prueba de hipótesis se realizó comparando los coeficientes de determinación por pares a través de t de Student, se observó que los métodos no son equivalentes, ni comparables entre si, a excepción de  $\beta_2$  en la comparación de AN-BK (Tabla No 7) quien presentó un resultado de 0.0638, lo cual indicó la ausencia de diferencia significativa con un valor  $p > 0.05$  y denota equivalencia, esto solo se presentó en una comparación, por lo que no brinda mayor relevancia y la probabilidad del porcentaje de error es de únicamente el 5%, reduciendo la posibilidad que el valor sea extraño en comparación a los demás (Daniel, 1998). En conclusión se rechazó la

hipótesis y los tratamientos no pueden ser comparados, pues cada uno posee un comportamiento diferente al realizar el proceso de biorremediación.

En la gráfica No. 1 se observa la disminución en la concentración de TPH para los tres tratamientos, cada uno poseen un comportamiento diferente al llevar a cabo el proceso de biorremediación, por esta razón los tratamientos no son comparables entre sí. BK mostró menor cambio en la concentración de hidrocarburos en el período de tiempo establecido, por que inició con la menor concentración de hidrocarburos, en el mismo período de tiempo OG mostró mayor cambio en la concentración de TPH por poseer la mayor concentración inicial de los tres tratamientos (Tabla No. 4).

Debido a que los tres métodos no son comparables entre sí, la recomendación para la selección de un tratamiento, se basó en las características del mismo y su adaptación a las condiciones del lugar, las cuales son: fácil elaboración, rápida aplicación y disminución de la concentración de hidrocarburos en el suelo. Una buena opción a implementar es OG, además de disminuir la concentración de TPH, consta de un único componente y no necesitó de un procedimiento engorroso para su aplicación en el suelo, en comparación con los requerimientos de AN que necesitó la preparación de mezcla biológica y BK la adición de aserrín, melaza y agua.

## **X. Conclusiones**

- A.** Los tres métodos evaluados en el estudio tienen comportamiento diferente al momento de llevar a cabo la biorremediación y no son comparables entre sí.
- B.** La estabilidad de los valores de temperatura ( $T^0$ ), potencial de hidrógeno (pH), porcentaje de humedad (%H) para los tres métodos se mantuvo dentro de los rangos de referencia y propició la actividad metabólica de los microorganismos y el proceso de biorremediación.
- C.** Los tres métodos evaluados presentaron reducción en la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en al menos 29.25 %.
- D.** El método OG es una buena opción a implementar, además de disminuir la concentración de TPH, consta de un único componente y no necesitó de un procedimiento engorroso para su aplicación en el suelo, cumpliendo así los requerimientos de Mina Marlin.

## **XI. Recomendaciones**

- A.** Establecer un período de tiempo menor a 30 días entre cada determinación de pH, aireación, porcentaje de humedad y temperatura, para obtener un mejor control en las condiciones, mantenerlas dentro de los rangos adecuados y disminuir las fluctuaciones en sus valores promoviendo así la biorremediación de forma eficaz y controlada.
  
- B.** Evaluar la implementación de la metodología para la determinación de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en partes por millón (ppm), considerando los interferentes que se pueden producir durante el proceso.
  
- C.** Establecer un valor mínimo en la concentración de TPH del suelo tratado según normativas ambientales, para concluir el proceso de biorremediación y dar uso adecuado al suelo tratado.
  
- D.** Continuar las investigaciones de métodos para la reducción de las concentraciones de TPH, con el fin de ampliar el campo de posibilidades en cuanto al mejor método de biorremediación.

## XII. Referencias bibliográficas

- Alexander, M. (1991). *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, Nueva York y Londres. vol. (162), p. 185-192
- Araujo, I. Montilla, C. Cárdenas, A. Herrera, M. Angulo, J. y Morillo, J. (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Asociación Interciencia*. vol. (31), p. 268-275.
- Atlas, R. Unterman, R. (1999). *Bioremediation. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2a. Edición, Washington D.C. p. 666-681
- Baldizón, M. (2002). *Degradación de 1,1'-(tricloroetilideno)bis[4-clorobenceno](DDT) por una cepa nativa de Hygrophoropsis aurabtiaca*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Bartsch, C. (2005). *Revolución del Motor*. (2ª. Edición). Ediciones Ceac. Barcelona, España. p. 12.
- Baumgarten, E. Nagel, M. Tischner, R. (1999). Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. (52), p. 281-284.
- Benavides, J. Quinteros, G. Guevara, A. Jaimes, D. Gutiérrez, S. Miranda, J. (2006). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. Programa de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. p. 82-90.
- Benavides, J. Quintero, G, Ostos, O. (2006). Aislamiento e identificación de diez Bacterias desnitrificantes a partir de un suelo Agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla. *Nova - Publicación Científica* . vol (4), p.50-54.

- Bernal, M. Clemente, R. Vázquez, S. Walker, D. (2007). Aplicaciones de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en aznalcólla. *Revista científica y técnicas de ecología y medio ambiente*. vol (16), p. 483-495.
- Blum, W. (1993). Soil Protection Concept of the Council of Europe and Integrated Soil Research. In *Soil and Environment* vol (1), p.37-47.
- Chemstrics water analysis systems.(n.d.). *RemediAid T.M. Total Petroleum Hydrocarbon test kit*. Calverton. USA. p. 2-10.
- COM (2002) *Towards a thematic strategy for soil protection*. Commission of the European Communities. Bruselas. p. 4.
- Corona, L. Iturbide, R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. vol (6), p.119 – 126.
- Díaz, M. Rivas, L. Acosta, J. Miller, S. Romero, R... Laffita, C. (2013). *Evaluación a escala de banco de materiales absorbentes para recogida de hidrocarburos en suelo*. IV congreso cubano de petróleo y gas –PETROGAS’2013-. Protección medio ambiental en la industria petrolera. La Habana Cuba. p. 3.
- Dragun, J. (1989). Recovery Techniques and Treatment Technologies for Petroleum and Petroleum Products in Soil and Groundwater. *Lewis Publishers*, vol (1), p. 211-217.
- Evans, W. Fuchs, G. (1988). *Anaerobic Degradation of aromatic Compounds*. *Annual Review of Microbiology*. Editorial Ornston, L.N., A. Balows y p. Baumann. Annual Reviews, Palo Alto, CA. p. 78,90,102.
- Eweis, J. Ergas, S. Chang, D. Schroeder, E. (1999). *Principios de Biorrecuperación (Biorremediación) tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. Mc Graw-Hill. España. p. 1-39, 93-97, 131-145.

- Fernández, L. Rojas, N. Roldán, T. Uribe, R. Reyes, R. ...Arce, J. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Secretaría del medio ambiente y recursos naturales. México. p. 19 – 30, 89 – 95.
- Ferrera. R. Rojas-Avelizapa, A. Poggi-Varaldo, S. Alarcón, A. y Cañizares-Villanueva, M. (2006). Procesos de biorremediación de suelos y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de microbiología*, vol (48), p.179-187.
- Fritsche, J. (1985). Nature and significance of Microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Bacteriology*. vol (25), p. 603-619.
- Gator International (n.d.). *Oil Gator. Application Protocol*. Recuperado de: <http://www.gatorinternational.com/oilapplication/>
- González, M. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *TERRA Latinoamericana*, vol. (23), p.29-37.
- HANNA Instruments (n.d.) *Manual de Análisis de Suelo Ciencia y Gestión del Suelo*. Recuperado de: [http://www.hannaarg.com/productos/Catalogo/Test-kits/Combi-agri/m\\_3896.pdf](http://www.hannaarg.com/productos/Catalogo/Test-kits/Combi-agri/m_3896.pdf).
- Huessemann M. (1997). Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils limitations in bioavailability or inherent recalcitrance. *Bioremediation Journal*. vol (1),p. 27-39.
- Hurst, C. Crawford, C. Garland, J. Lipson, D. (1997). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. U.S.A. p. 894.
- Infante, C. (2001). Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de intebios y biorize. *Interciencia*, vol (26), p. 504-507.

- Julca, A. Meneses, L. Blas, R. Bello, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia. vol. (24)*, p. 46 – 61.
- Korda, A. Santos, P. Tenente, A. Santos, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently. *Microbiol. Biotechnol. vol (48)*, p. 677-686.
- La Grega, D. Buckingham, R. Evans, J. (1996). *Gestión de residuos tóxicos, tratamiento, eliminación y recuperación de suelo*. Vol. I. Traductor: Garrido B. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España. p. 3-37.
- La Grega, D. Buckingham, R. Evans, J. (1996). *Gestión de residuos tóxicos, tratamiento, eliminación y recuperación de suelo*. Vol. II. Traductor: Garrido B. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España. p. 643-734.
- Llamas, J. Gallego, J. García, M. (2003). Estudio de la degradación del Fuel del Prestige vertido en varias playas de Muxía. *Geoquímica*. Madrid. p. 1-12
- Málaga, A. Aranzabe, E. (2004). Grasas lubricantes. Boletín mensual sobre lubricación y mantenimiento. *Wearcheck Ibérica. vol (5)*, p.1-5.
- Mandigan M. Martinko, L. Parker, H. Sánchez, N. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. (10ª. Edición). Traductor: Fernández, M. et al. Prentice Hall. Madrid. p 964 – 990.
- Ministerio de ambiente y recursos naturales (2007) Compilación y síntesis de los estudios de vulnerabilidad y adaptación al cambio climático. Programa Nacional de Cambio Climático PNCC. Guatemala. p. 3.

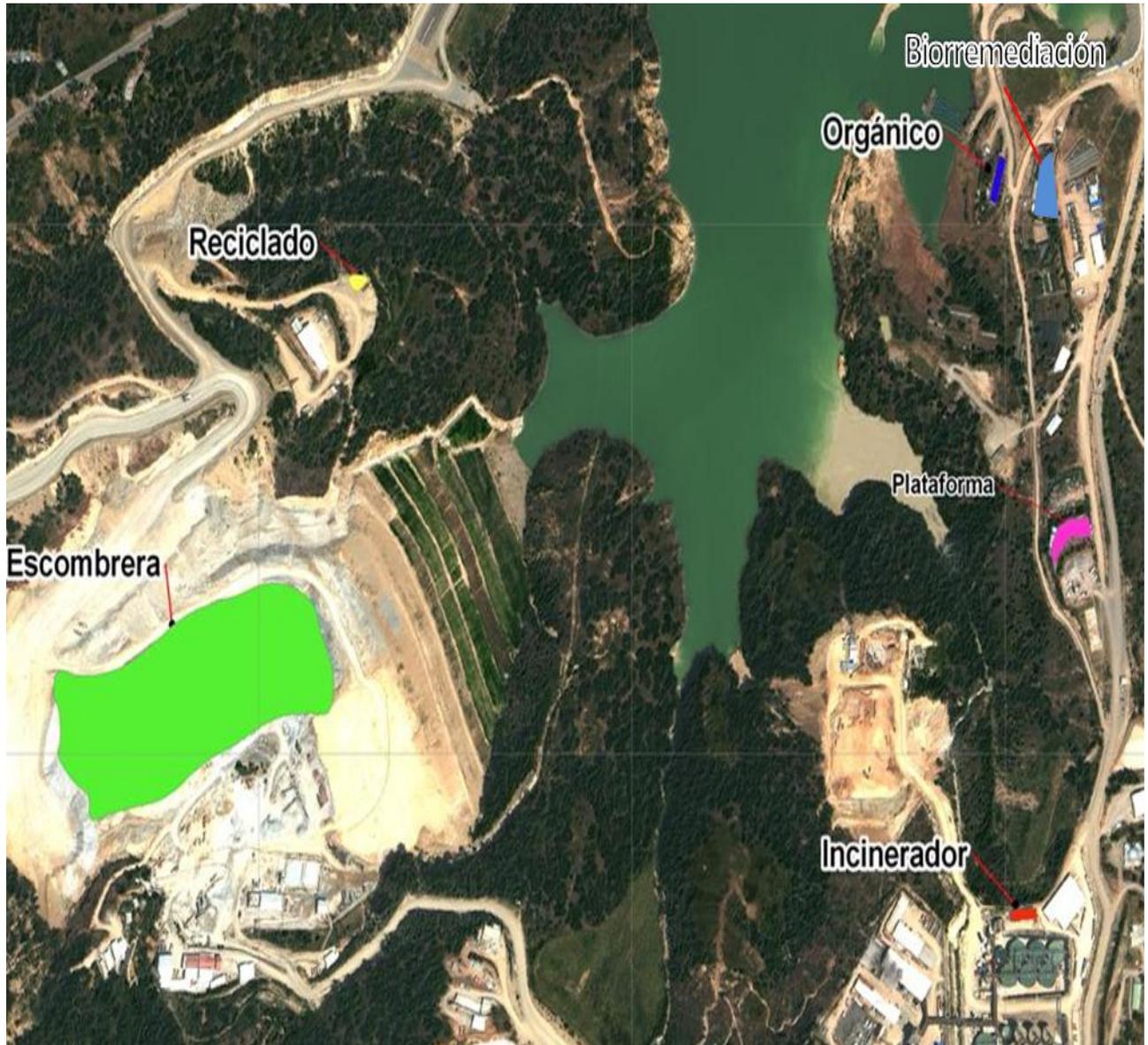
- Maroto, M, Quesada, J. (2000). Aplicación de sistemas de biorremediación se suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. GEOCOSA. Div. Protección Ambiental de Suelos, p. 297- 305.
- Otero, S. Mata, M. (2005). *La llamada Revolución Industrial*. (2ª. Edición). Editorial Texto. Universidad Católica Andres Bello, La Vega, Caracas. p. 128- 131.
- Pardo, J. Perdomo, M. Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. vol. (2), p.40-49.*
- Parker. A. (2001). *Contaminación por la industria*. (2da. Edición). Editorial Reverté S.A. Barcelona. p. 678 – 680.
- Pelczar. M. (1982). *Microbiología*. (2da. Edición), Editorial McGraw-Hill México S.A. de C.V. México D.F. p. 632 – 638.
- Prince, R. (2005). *Petroleum Microbiology*. American Society of Microbiology. Press, Washington DC. p. 317-336.
- Proskuriakov, V. Drabkin A. (1984). *Química del petróleo y del gas*. Editorial Mir Moscú. Moscú, URSS. p. 380 – 384.
- Raxcaco, F. (2001) *Evaluación de 5 proporciones de lombricompost con suelo y 4 dosis del fertilizante para la producción de plantas de café (Coffea arabica) en la etapa de almácigo, Chimaltenango* (Investigación de EPS), Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala. p. 16.
- Restrepo, R. (2002). *Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales*. Ecopetrol. Instituto Colombiano de Petróleo. Bogotá Colombia. p. 22.

- Rucks, L. García, F. Kaplán, A. Ponce de León, J. Hill, M. (2004). *Propiedades Físicas del Suelo*. Facultad de agronomía. Universidad de la República. Departamento de suelos y aguas. Montevideo, Uruguay. p. 2-4.
- Sánchez, J. Rodríguez, J. (2002). *Fundamentos y aspectos microbiológicos de la Biorremediación*. p. 12- 16.
- Saval, S. (1998). *Éxitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos*. Instituto de Ingeniería. Coordinación de bioprocesos ambientales, Universidad Nacional Autónoma de México. p 515.
- SCD Probiotic Tecnology (2010) *Application Protocol: Bio Klean*. Recuperado de: <http://www.scdprobiotics.com/SCD-Bio-Klean-p/a187-1.htm>
- Schmidt, W. (2000). *Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible*. Cooperación Técnica Alemana (GTZ). p. 6-8.
- Schwarzenbach R. Gschwend, P. Imboden, D. (1993). Biological transformations reactions. *Environmental Organic Chemistry. Wiley-Interscience Publication. vol.(1)*, p.491-494.
- Sociedad nacional de minería, petróleo y energía. (2009). Informe quincenal de la SNPE. Perú. p.1-3
- Solomon, E. Berg, L. Martin, D. (2001). *Biología*. (10a. Edición). Editorial McGraw-Hill. México S.A. de C.V. p. 993 – 1102.
- Tyler. G. (1994). *Ecología y Medio Ambiente*, 7ª. Edición, Editorial iberoamericana S.A. de C.V. México D.F. p. 338-344.
- Van, J. Loyd, T. Chetry, S. Liou, R. y Peck, J. (1997). *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. (3ª Edition) Technology Innovation Office, EPA. Recuperado de: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

- Vargas, R. Jiménez, C. Boschini, C. y Constenla, C. (1981). Estudio sobre cambios físicoquímicos durante la fermentación del pasto en microsilos de laboratorio con tres niveles de melaza. *Agronom. Costarr.* vol.(5), p. 121-125.
- Vásquez, M. Guerrero, J. Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. (12), p.141-157.
- Whyte L. Bourbonnière, L. Greer, C. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotropic *Pseudomonas* strain possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Bogotá. Colombia.* vol. (63), p. 3719-3723.
- Witteff, H. Reuben, B. (2003). *Productos Químicos Orgánicos Industriales*. Editorial Linmunas, México. p. 12 – 18.
- Zynda, T. (2000). *Gestión ambiental*. Michigan State University TAB Program. p. 9-11.

### XIII. Anexos

**Anexo No. 1:** Figura de Áreas de depósito de desechos. MinaMarlin, San Miguel Ixtahuacán, San Marcos.



**Anexo No. 2:** Formulario de reporte de derrames.



**REPORTE DE DERRAMES**

1. Los derrames (>30cm de diámetro) deben ser reportados a Medio Ambiente por escrito dentro de las siguientes 24 horas y ser limpiados inmediatamente.
2. Los derrames (<30cm de diámetro) deben ser limpiados inmediatamente.
3. El suelo impactado con hidrocarburos será dispuesto en la cancha de bioremediación.
4. El suelo impactado con otras sustancias se dispondrá de acuerdo a las instrucciones del Departamento de Medio Ambiente.

Fecha del reporte:	Hora del reporte:	Nombre del reportante:
<b>DETALLES DEL REPORTE</b>		
Fecha del derrame:	Hora del derrame:	
Sustancia derramada:	Cantidad derramada (gal o kgs):	
Proveniencia del derrame:	Lugar de ocurrencia:	
Descripción de cómo sucedió el derrame:		
Fue limpiado el derrame:		
Lugar de disposición final del material impactado:		
Descripción de la limpieza:		
Volumen o peso de suelo impactado recogido:		
Nombre y Firma de la persona que reporta		
<b>ACCIONES CORRECTIVAS</b>		
Tipo de acción correctiva		
<b>PARA USO DEL DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE (FAVOR DEJAR EN BLANCO)</b>		
Fecha:	Hora:	Reporte No.
Observaciones:		
Firma Recibido por:		

**Anexo No.3:** Determinación de condiciones (temperatura, pH y % de humedad) y TPH.

**Tabla No. 1** Comparación de temperatura (T) de cinco mediaciones utilizando tres métodos de biorremediación Atenuación Natural (AN), Oil Gator (OG) y Bio Klean (BK).

<b>Muestra</b>	<b>T inicial (°C)</b>	<b>T 1(°C)</b>	<b>T2 (°C)</b>	<b>T3 (°C)</b>	<b>T4 (°C)</b>
<b>Control</b>	24.7	20.0	18.0	17	15
<b>AN1</b>	21.4	20.0	18.0	17	15
<b>AN2</b>	21.6	20.0	16.0	17	14
<b>AN3</b>	23.5	20.0	16.0	15	14
<b>AN4</b>	23.8	22.0	16.0	17	15
<b>OG1</b>	24.0	22.0	18.0	17	15
<b>OG2</b>	24.5	20.0	16.0	17	15
<b>OG3</b>	20.4	20.0	16.0	17	15
<b>OG4</b>	20.4	21.0	18.0	16	15
<b>BK1</b>	20.5	22.0	18.0	17	15
<b>BK2</b>	20.7	21.0	16.0	16	16
<b>BK3</b>	20.8	20.0	18.0	17	15
<b>BK4</b>	20.9	20.0	16.0	17	16

**Fuente:** datos experimentales del estudio

**Tabla No. 2** Comparación de potencial de hidrógeno (pH) de cinco mediaciones utilizando tres métodos de biorremediación Atenuación Natural (AN), Oil Gator (OG) y Bio Klean (BK).

<b>Muestra</b>	<b>pH inicial</b>	<b>pH 1</b>	<b>pH 2</b>	<b>pH 3</b>	<b>pH 4</b>
<b>Control</b>	7.36	8.38	6.72	6.56	7.24
<b>AN1</b>	7.12	8.23	7.13	7.22	7.38
<b>AN2</b>	6.98	8.06	7.17	7.18	7.30
<b>AN3</b>	7.03	7.74	7.97	7.27	7.23
<b>AN4</b>	6.84	7.99	7.20	7.20	7.42
<b>OG1</b>	6.59	7.91	7.80	7.37	7.16
<b>OG2</b>	6.64	8.00	7.60	7.45	7.04
<b>OG3</b>	6.37	7.93	7.26	7.05	6.92
<b>OG4</b>	6.40	7.80	7.54	7.37	7.00
<b>BK1</b>	6.29	5.78	5.88	6.15	6.15
<b>BK2</b>	5.91	5.50	5.70	5.77	5.62
<b>BK3</b>	5.83	5.29	5.30	5.43	5.41
<b>BK4</b>	5.86	5.25	5.38	5.44	5.40

**Fuente:** datos experimentales de este estudio.

**Tabla No.3** Comparación del porcentaje de humedad (%H) en cinco mediaciones utilizando tres métodos de biorremediación Atenuación Natural (AN), Oil Gator (OG) y Bio Klean (BK).

<b>Muestra</b>	<b>%H inicial</b>	<b>%H 1</b>	<b>%H 2</b>	<b>%H 3</b>	<b>%H 4</b>
<b>Control</b>	24.39	25.92	26.25	55.38	47.82
<b>AN1</b>	71.18	85.71	61.76	96.22	73.33
<b>AN2</b>	60.93	82.14	60.93	87.27	65.57
<b>AN3</b>	81.81	66.12	71.62	108.33	76.27
<b>AN4</b>	69.49	83.63	75.45	84.21	69.35
<b>OG1</b>	53.85	79.66	52.11	70.49	66.66
<b>OG2</b>	66.13	54.55	44.59	66.12	65.57
<b>OG3</b>	66.66	65.57	64.28	82.75	66.66
<b>OG4</b>	60.00	61.54	46.37	90.90	63.93
<b>BK1</b>	77.58	72.88	41.02	91.22	69.35
<b>BK2</b>	71.66	58.46	47.94	72.58	50.00
<b>BK3</b>	72.13	76.67	92.45	98.14	83.92
<b>BK4</b>	102.00	92.59	98.36	117.02	67.18

**Fuente:** datos experimentales de este estudio.

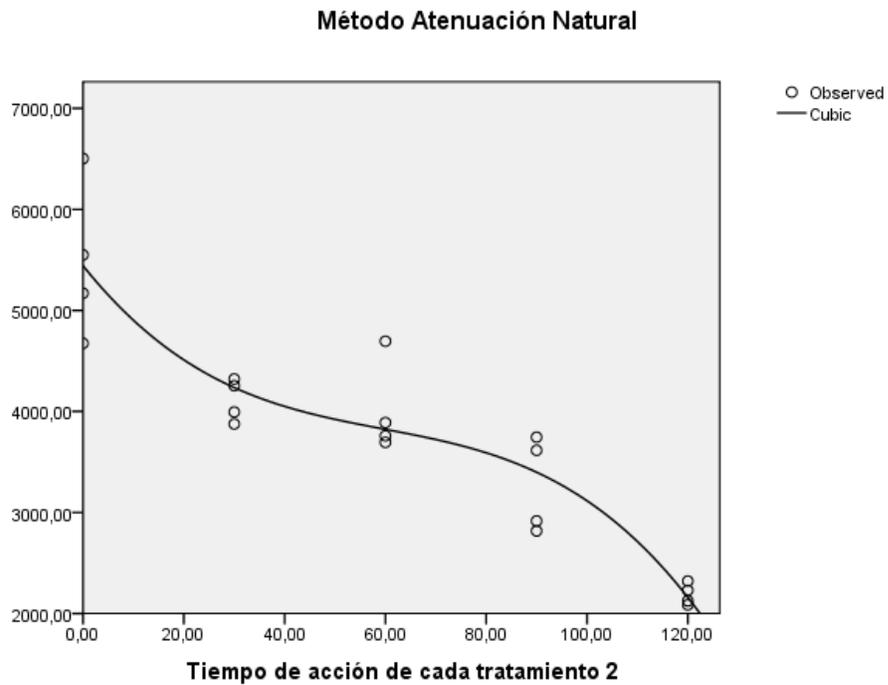
**Tabla No.4** Comparación de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo TPH en partes por millón (ppm), en cinco mediciones utilizando tres métodos de biorremediación Atenuación Natural (AN), Oil Gator (OG) y Bio Klean (BK).

<b>Muestra</b>	<b>TPH inicial (ppm)</b>	<b>TPH 1 (ppm)</b>	<b>TPH 2 (ppm)</b>	<b>TPH T3</b>	<b>TPH T4</b>
<b>Control</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>AN1</b>	6503.29	4255.25	4695.77	3614.82	2124.84
<b>AN2</b>	5549.17	3876.22	3758.59	2915.96	2229.40
<b>AN3</b>	4673.49	3993.85	3889.29	2817.55	2320.89
<b>AN4</b>	5170.15	4320.60	3694.23	3745.52	2085.63
<b>OG1</b>	8228.53	2909.14	3431.84	4242.17	3170.43
<b>OG2</b>	6464.08	4281.39	3523.32	3105.08	2556.15
<b>OG3</b>	10947.09	3823.94	3936.40	3405.70	2660.71
<b>OG4</b>	7117.58	3471.05	4359.81	2935.17	2333.95
<b>BK1</b>	2412.38	2608.43	3431.84	2882.90	2530.00
<b>BK2</b>	4163.77	3497.19	3457.98	3092.01	2373.17
<b>BK3</b>	3379.56	3235.79	3092.02	2477.72	2543.08
<b>BK4</b>	3993.85	3193.50	3131.23	2451.58	2046.42

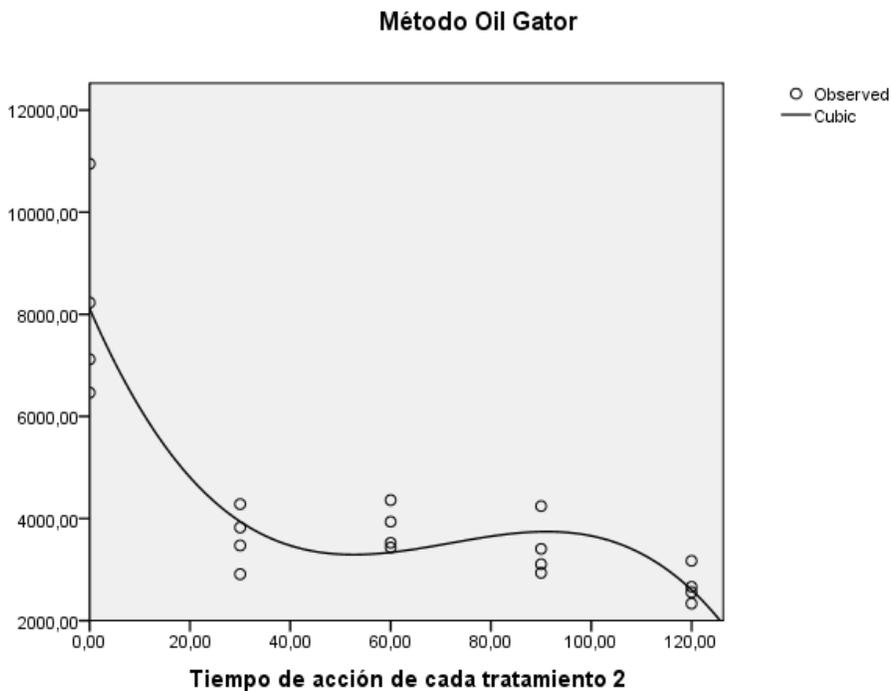
**Fuente:** datos experimentales de este estudio.

**Anexo No. 4:** Comportamiento de la concentración de TPH en los tres métodos.

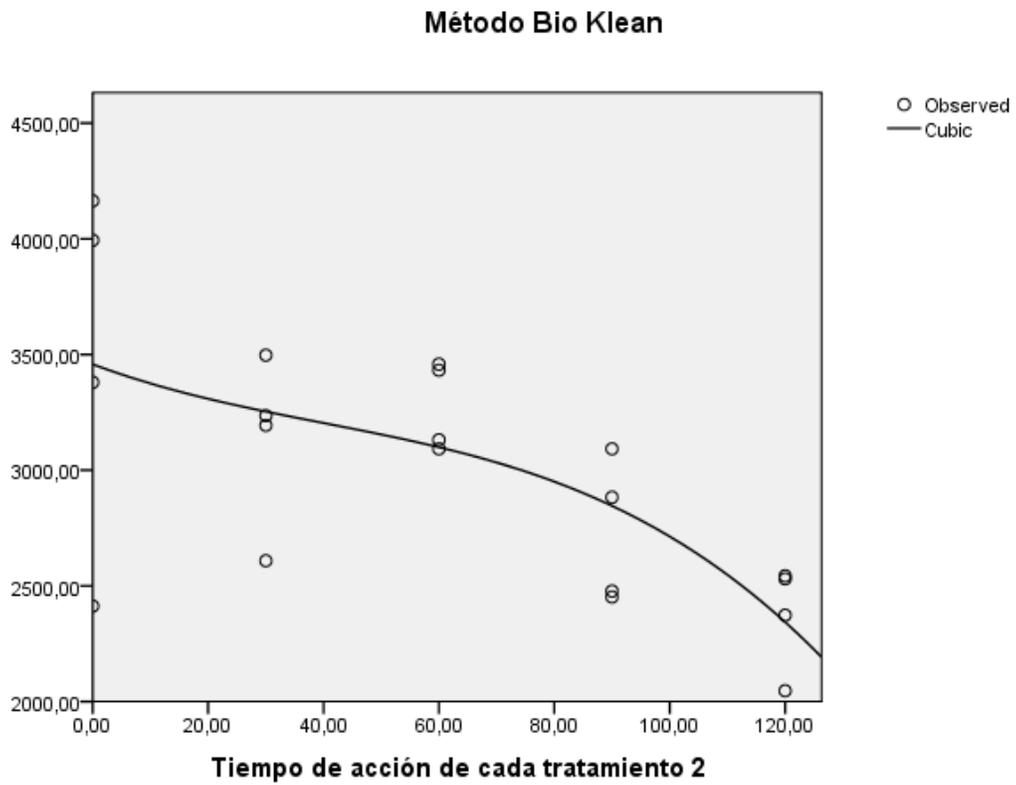
**Grafica No. 1** Comportamiento de la concentración de TPH para las cuatro réplicas del método de Atenuación Natural



**Grafica No. 2** Comportamiento de la concentración de TPH para las cuatro réplicas del método de Oil Gator.



**Grafica No. 3** Comportamiento de la concentración de TPH para las cuatro réplicas del método de Bio Klean.





Jackelyn Paola Tot Urizar  
**Autora**

---



Julia Mirelia Cali Arriaga  
**Autora**



Dra. Karin Herrera  
**Asesora**



Lic. Ismael Mancilla  
**Asesor**



Licda. Rosario Hernández  
**Revisora**



M.A. María Eugenia Paredes  
**Directora**



Dr. Rubén Velásquez  
**Decano**