



Universidad de San Carlos  
de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería  
Química



Universidad San Francisco Xavier de  
Chuquisaca  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Centro de Investigación en Biodiversidad y  
Recursos Naturales

**APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS,  
MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTÓCTONAS**

**Silvia Mayte Cedillo Gámez**

Asesorado por Inga. Hilda Piedad Palma Ramos  
y Licda. Miriam Liliana Velasco Caballero

Guatemala, julio de 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO XAVIER DE  
CHUQUISACA



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS,  
MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTÓCTONAS**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

**SILVIA MAYTE CEDILLO GÁMEZ**

ASESORADO POR INGA. HILDA PIEDAD PALMA RAMOS

Y LICDA. MIRIAM LILIANA VELASCO CABALLERO

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERA AMBIENTAL**

GUATEMALA, JULIO DE 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Inga Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Walter Rafael Véliz Muñoz
VOCAL V	Br. Sergio Alejandro Donis Soto
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
EXAMINADORA	Inga. María Alejandra Má Villatoro
EXAMINADOR	Ing. Nicolás de Jesús Guzmán Sáenz
EXAMINADOR	Ing. Carlos Vinicio Godínez Miranda
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

## HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS,  
MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTÓCTONAS**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 26 de abril de 2013.



**Silvia Mayte Cedillo Gámez**



**CERTIFICADO**

BIORENA CITE: 042/2012

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
 CENTRO DE INVESTIGACION EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES –  
 BIORENA**

Certifica:

Que la Universitaria **Silvia Mayte Cedillo Gámez** estudiante de la Carrera de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería perteneciente a la Universidad de San Carlos de Guatemala, realizó la Modalidad de Titulación de Tesis con el Tema “Aplicación de la Biorremediación en Suelos Contaminados con Hidrocarburos, Mediante Bioestimulación Y Bioaumentación de Cepas Bacterianas Autóctonas”, en el área Operativa de Desmontaje de Tanques de la Ex – Refinería Carlos Montenegro del Distrito Comercial Chuquisaca, trabajo realizado en los laboratorios del Campus de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad de San Francisco Xavier de Chuquisaca en la localidad de Yotala y mediante convenio recibió el apoyo de análisis químicos de Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos, Distrito Comercial Sud en los períodos comprendidos del 1 de mayo al 20 de septiembre del año 2012.

La Universitaria fue una de los estudiantes de intercambio del Programa PIMA (Programa de Intercambio y Movilidad Académica) patrocinado por la Junta de Andalucía.

Demostrando compromiso y responsabilidad en las tareas asignadas y durante el desarrollo del trabajo.

Es cuanto certificamos en honor a la verdad, para fines que convengan a la interesada.

Sucre, 20 de septiembre de 2012

Agr. Carlos Cáceres  
 DECANO FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS U.S.X.CH.



Lic. Miriam Velasco  
 DIRECTORA BIORENA  
 COORDINADORA RED PIMA SUCRE



Guatemala, 19 de marzo de 2013.

Ingeniero  
Víctor Manuel Monzón  
Director, Escuela de Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería  
USAC

Estimado Ingeniero Monzón:

Por medio de la presente me dirijo a usted para desearle éxitos en sus labores diarias.

El motivo de la presente es para informarle que he asesorado al estudiante **SILVIA MAYTE CEDILLO GÁMEZ**, con número de carnet **2007-15149**, en su trabajo de graduación que lleva por título **APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACION EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTOCTONAS**, cuya fase experimental se realizó en Bolivia.

Luego de haber propuesto correcciones y el estudiante haberlas realizado, **APRUEBO** este trabajo de graduación para que el mismo sea sometido a su consideración y posteriormente a una aprobación final.

Atentamente,

  
Ing. Hilda Piedad Palma  
ASESORA

**INGA. HILDA PALMA DE MARTINI**  
**COLEGIADO No. 453**



Guatemala, 10 de julio de 2013  
Ref. EI.Q.TG-IF.039.2013

Ingeniero  
**Víctor Manuel Monzón Valdez**  
DIRECTOR  
Escuela Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el Acta TG-020-2012-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

### INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Silvia Mayte Cedillo Gámez.**

Identificada con número de carné: **2007-15149.**

Previo a optar al título de **INGENIERA AMBIENTAL.**

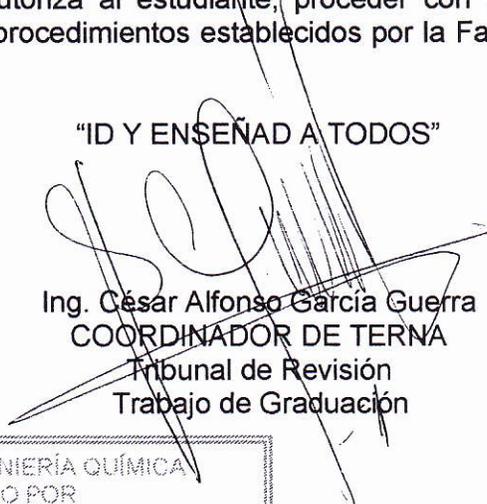
Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

#### APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTOCTONAS

El Trabajo de Graduación es asesorado por: **la Ingeniera Química Hilda Piedad Palma Ramos y la Licenciada Miriam Liliana Velasco Caballero.**

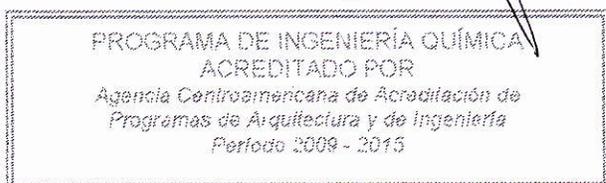
Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Ing. César Alfonso García Guerra  
COORDINADOR DE TERNA  
Tribunal de Revisión  
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



ACAAI

Agencia Centroamericana de Acreditación de  
Programas de Arquitectura y de Ingeniería



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Ref.EIQ.TG.211.2013

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **SILVIA MAYTE CEDILLO GÁMEZ** titulado: "**APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTÓCTONAS**". Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, julio 2013

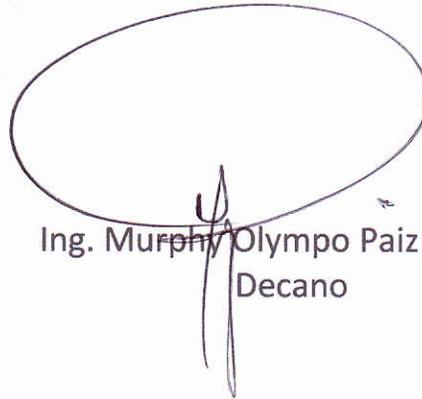
Cc: Archivo  
VMMV/ale



DTG. 519.2013.

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **APLICACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS AUTÓCTONAS**, presentado por la estudiante universitaria **Silvia Mayte Cedillo Gámez**, como parte de la política de Internacionalización y el Programa de Intercambio de Movilidad Académica de la Facultad de Ingeniería, con la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca, Bolivia, por tanto autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos  
Decano



Guatemala, 24 de julio de 2013.

/cc

## **ACTO QUE DEDICO A:**

**Dios y mamá María**

Por ser mi razón de ser y vivir.

**Mis padres**

Amarilis Gámez y Raúl Cedillo por su gran amor, comprensión, lucha incansable por mi superación y apoyo incondicional.

**Mis hermanas**

Evelin, Paola y Mariana Cedillo por ser mis amigas, mi ejemplo y apoyo en todo momento.

**Mi abuelo**

Maximino Gámez, porque sé que desde el cielo sonrío conmigo por este logro.

**Toda mi familia**

En especial a tía Delmi Gámez, tía Amabelis Gámez y Juan Barrio por todo su apoyo.

**Mis amigos**

Por los momentos compartidos, por formar parte importante de mi vida y por todo su cariño.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

**Catedráticos**

Por su instrucción durante mi formación profesional y por sus consejos.

**Pueblo de  
Guatemala**

Por brindarme la oportunidad de estudiar y prepararme profesionalmente.

**La Facultad de Ingeniería**

Señor Decano, Murphy Paiz  
Ing. Víctor Monzón

**Lic. Sandra Velasquez  
Lic. Miriam Velazco  
Ing. Fernando Rosas**

Por su aprecio y apoyo en la realización de mi trabajo de tesis.

**La Universidad de San Carlos de  
Guatemala**

**La Universidad San Francisco  
Xavier de Chuquisaca, Bolivia**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTADO DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IIX
RESUMEN	XI
OBJETIVOS	XIII
INTRODUCCIÓN	XV
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Biorremediación	3
2.2. Tecnologías de biorremediación	5
2.2.1. Bioventeo	5
2.2.1.1. Aplicaciones	5
2.2.1.2. Limitaciones	6
2.2.1.3. Costos y tiempos de remediación	6
2.2.2. Bioestimulación	6
2.2.1.4. Aplicaciones	6
2.2.1.5. Limitaciones	7
2.2.1.6. Costos y tiempos de remediación	7
2.2.3. Bioaumentación	7
2.2.3.1. Aplicaciones	8
2.2.3.2. Limitaciones	8
2.2.3.3. Costos y tiempos de remediación	8
2.2.4. Biolabranza	8

	2.2.4.1.	Aplicaciones	9
	2.2.4.2.	Limitaciones	9
2.3.		Fases en la aplicación de la biorremediación	9
	2.3.1.	Evaluación del sitio y muestreo	11
	2.3.2.	Determinación del nivel y características del contaminante	12
	2.3.3.	Estimación del potencial de biodegradación	13
	2.3.4.	Ensayos de factibilidad o tratabilidad	13
	2.3.5.	Estimación de número de bacterias en suelos	14
	2.3.6.	Diseño de la unidad básica de tratamiento	14
	2.3.7.	Ajuste del pH del suelo	15
	2.3.8.	Ajuste del contenido de humedad del suelo	15
	2.3.9.	Adición de fertilizantes	16
	2.3.10.	Adición de agentes	16
	2.3.11.	Remoción e irrigación	16
2.4.		Factores que condicionan la biodegradación de hidrocarburos	17
	2.4.1.	Condiciones del medio : pH, humedad y temperatura	17
	2.4.2.	Disponibilidad de oxígeno	18
	2.4.3.	Concentración de nutrientes	20
	2.4.4.	Población microbiana	22
	2.4.4.1.	Principales bacterias degradadoras de petróleo	23
3.		DISEÑO METODOLÓGICO	25
	3.1.	Variables	25
	3.1.1.	Tiempo de degradación	25
	3.1.2.	Humedad	25

3.1.3.	Potencial de hidrógeno	26
3.1.4.	Densidad poblacional de microorganismo	26
3.1.5.	Concentración de hidrocarburos totales	26
3.1.6.	Masa de sustrato	26
3.1.7.	Concentración de nutrientes	27
3.1.8.	Temperatura ambiente	27
3.1.9.	Presión atmosférica.	27
3.1.10.	Gravedad API 15.6 °C	27
3.1.11.	Gravedad específica a 15.6 °C	28
3.1.12.	Viscosidad a 100 °C	28
3.1.13.	Punto de inflamación	28
3.2.	Delimitación de campo de estudio	28
3.2.1.	Tipo de estudio y diseño general	29
3.2.2.	Universo de estudio, selección y tamaño de muestra, unidad de análisis y observación	29
3.3.	Recursos humanos disponibles	29
3.4.	Recursos materiales disponibles	31
3.5.	Técnica cualitativa y cuantitativa	31
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	32
3.6.2.	Elección del diseño experimental	33
3.6.2.1.	Mediciones en cada tratamiento	37
3.6.2.2.	Muestreo	37
3.6.2.2.1.	Campo	38
3.6.2.2.2.	Laboratorio	38
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de información	39
3.8.	Análisis estadístico	40
3.8.1.	Promedio estadístico	41

3.8.2.	Desviación estándar	41
3.8.4.	ANOVA de dos factores	42
3.8.4.1.	Hipótesis	42
3.8.4.2.	Supuestos	42
3.8.4.3.	Estadístico de contraste	43
3.8.4.4.	Suma de cuadrados	43
3.8.4.5.	Regla de decisión	45
4.	RESULTADOS	47
4.1.	Caracterización del suelo contaminado con petróleo	47
4.2.	Evolución de las variables de control durante 80 días de tratamiento	48
4.3.	Medición de la respuesta experimental	55
4.3.1.	Análisis estadístico de la respuesta experimental	60
4.3.1.1.	Análisis ANOVA de dos factores	61
4.3.1.2.	Análisis de comparación múltiple de medias	62
4.3.2.	Eficiencia de las respuestas experimentales de cada uno de los tratamientos en estudio	64
4.4.	Valores proyectados en la reducción de TPH	65
4.5.	Condiciones ambientales	67
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	69
	CONCLUSIONES	73
	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA	76
	APÉNDICES	81

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1.	Flujo de un proceso de biorremediación	10
2.	Caracterización de petróleo por tipo de compuestos	12
3.	Unidades de tratamiento	15
4.	Esquematzación de los tratamientos o cámara de remediación	35
5.	Toma de muestras de tratamientos en laboratorio	39
6.	Evolución de la humedad durante los 80 días de tratamiento	48
7.	Evolución del pH durante los 80 días de tratamiento	49
8.	Evolución de recuento de colonias en placa	50
9.	1er comparación de crecimiento bacteriano	51
10.	2da comparación de crecimiento bacteriano	53
11.	Concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	55
12.	1er comparación degradación de (HTP)	57
13.	2da comparación degradación de (HTP)	59
14.	Eficiencia de cada tratamiento en la degradación de HTP	64
15.	Proyección lineal de tratamiento 6	65
16.	Proyección polinomial de tratamiento 6	66

## TABLAS

I.	Cristalería, reactivos y equipo	31
II.	Unidades experimentales	34
III.	Caracterización del cultivo microbiológico	36
IV.	Caracterización de suelos contaminados, al inicio y al final de la investigación (toma de datos cada 20 días)	40
V.	Tabla análisis de varianza de dos factores	44
VI.	Caracterización del suelo contaminado	47
VII.	Análisis de varianza de TPH (anova de dos factores)	61
VIII.	Comparaciones múltiples de medias (tukey)	62
IX.	Condiciones ambientales región de Yotala	67

## LISTADO DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
<b>cm</b>	Centímetros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros cuadrados
<b>%</b>	Porcentaje
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias



## GLOSARIO

<b>Absorción</b>	Es la operación unitaria que consiste en la separación de uno o más componentes de una mezcla gaseosa con la ayuda de un solvente líquido con el cual forma solución.
<b>Aerobio</b>	Organismo que solo puede vivir en un medio con oxígeno, utilizando el mecanismo de respiración aerobio.
<b>Anaerobia</b>	Se aplica al organismo que vive y se desarrolla en ausencia del oxígeno.
<b>Autóctonas</b>	Que tiene su origen en el mismo lugar en el que vive o se encuentra.
<b>Autótrofos</b>	La nutrición autótrofa es la capacidad de ciertos organismos de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas, de manera que para su nutrición no necesitan de otros seres vivos.
<b><i>Ex situ</i></b>	Consiste en el mantenimiento de algunos componentes de la biodiversidad fuera de sus hábitats naturales.
<b>Factible</b>	Que puede ser hecho o realizado.

<b>Heterogéneo</b>	En química es aquel que está formado por dos o más fases.
<b>Homogeneización</b>	En química se denomina así a una operación intensiva de mezclado de diferentes fases insolubles (a veces con la inclusión de una sustancia tensoactiva) con el objeto de obtener una suspensión soluble o emulsión.
<b>Inóculo</b>	Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.
<b><i>In situ</i></b>	Es una expresión latina que significa en el sitio o en el lugar y que es generalmente utilizada para designar un fenómeno observado en el lugar, o una manipulación realizada en el lugar.
<b>Microflora</b>	Microflora del suelo. Tienen una tarea importante en la construcción del suelo, por medio de la desintegración de rocas, así como en el desarrollo ulterior de éste, especialmente en la construcción de suelos fértiles.
<b>Quelación</b>	Es una sustancia que forma complejos camiones de metales pesados.
<b>Solubilidad</b>	Es una medida de la capacidad de disolverse una determinada sustancia (solute) en un determinado medio (solvente).

## RESUMEN

En el trabajo de graduación realizado se evaluó la capacidad y se determinó la eficiencia de la bioaumentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas, para lograr la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos; las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, fueron extraídas de la antigua refinería REFISUR, en la ciudad de Sucre, Bolivia. La cual se encuentra en proceso de abandono, operada por la empresa Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos YPFB.

La biorremediación, como una tecnología, tiene un gran potencial en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía. Sin embargo, es necesario considerar los factores determinantes para un proceso de biorremediación, analizando las limitaciones de esta tecnología y compensarlas.

Por lo que se hace necesario destacar la importancia de elaborar un estudio de factibilidad a nivel laboratorio para optimizar las condiciones del tratamiento previo a ser aplicadas en el campo, en dicho estudio se analizó la eficiencia de un inóculo bacteriano en distintos tratamientos cada uno en concentraciones diferentes de adición de nutrientes, sustrato y suelo contaminado con hidrocarburos. Determinando la biorremediación del suelo en dichos tratamientos mediante la medición pH, humedad, recuento de colonias en placa y la eficiencia de los mismos mediante el análisis de hidrocarburos totales de petróleo mediante espectrofotómetro infrarrojo.

El procedimiento experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Francisco Xavier de Chuquisaca y el análisis de hidrocarburos totales de petróleo, mediante espectrofotómetro infrarrojo, se llevó a cabo en el Laboratorio de Yacimiento Petrolíferos Fiscales Bolivianos (YPFB).

# OBJETIVOS

## General

Evaluar el proceso de biorremediación, de suelos contaminados con hidrocarburos, por medio de bioaumentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas.

## Específicos

1. Preparar seis tratamientos de suelos contaminados, en condiciones diferentes de adición de cultivo microbiológico, sustrato y concentración de nutrientes, en condiciones *ex situ*.
2. Determinar las condiciones fisicoquímicas (pH, humedad y temperatura) del suelo contaminado, previo a la aplicación de los tratamientos y a los 20, 40, 60 y 80 días.
3. Averiguar la densidad poblacional de microorganismos, en cada tratamiento, por el método de recuento de colonias en placa; previo a la aplicación de los tratamientos y a los 20, 40, 60 y 80 días.
4. Medir la concentración de hidrocarburos totales de petróleo, por espectrofotómetro infrarrojo, previo a la aplicación de los tratamientos y a los 20, 40, 60 y 80 días.

5. Determinar el tratamiento más eficiente en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## INTRODUCCIÓN

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural. Es así, que esta investigación hace énfasis en el estudio de la eficiencia del inóculo microbiano, mediante cepas microbianas autóctonas; obtenidas de suelos saludables, combinadas con minerales y nutrientes, mejorando así su bioaceptabilidad y su capacidad metabólica, para la producción de un cultivo microbiano, capaz de degradar hidrocarburos en suelos crónicamente contaminados.

Si bien los procesos de degradación se dan de forma natural, la reducida cantidad de microorganismos hace que los tiempos de degradación sean demasiado largos, como para observar un resultado que pueda ser considerado como positivo. Sin embargo, existen técnicas de estimulación y aumento de degradación, denominadas en su conjunto biorremediación, capaces de reducir significativamente el tiempo de degradación del contaminante estimulando el crecimiento de la comunidad de microorganismos degradadores.

Por medio de seis tratamientos *ex situ* en diferentes condiciones de adición de cultivo microbiano, concentración de nutrientes y sustrato, se evaluó el comportamiento y la eficiencia de la bioaumentación y bioestimulación de microorganismos, en la degradación de Hidrocarburos, estableciendo así el tratamiento más eficiente para la biorremediación de suelos contaminados, con el fin de apuntar información confiable analizada en laboratorio que pueda utilizarse posteriormente, para un mejor manejo de la técnica de biorremediación de suelos aplicada en campo.



## 1. ANTECEDENTES

Las medidas biocorrectoras se llevan empleando en la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes. Este “uso” intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación.

Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares a la labranza y sus actores las compañías petrolíferas. Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos. “Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de burbujeo de oxígeno, hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados”.<sup>1</sup>

Diversos estudios sobre biorremediación de suelos han establecido que la adición de oxígeno y las concentraciones apropiadas de nutrientes como nitrógeno y fósforo, estimulan el crecimiento y el metabolismo microbiano, facilitando la degradación de los sustratos carbonados.

---

<sup>1</sup>Riser-Roberts. *Remediation of petroleum contaminated soils*. 1998. p. 28.

Actualmente no existen estudios de biorremediación realizados en esta refinería, por lo que el trabajo de investigación propuesto se realiza con intención de apuntar información real y confiable, para la posterior aplicación en campo de la tecnología de biorremediación en suelos crónicamente contaminados con derrames de hidrocarburos.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Biorremediación**

La biorremediación es el procedimiento de extracción, eliminado o neutralizado de contaminantes del suelo, agua o aire mediante la utilización de organismos vivos y sus particulares propiedades absorbentes, extractivas, degradadoras, purificadoras o transformadoras de los elementos contaminantes de los diferentes medios en sustancias no tóxicas o desactivadas, tales como metales pesados, hidrocarburos, plaguicidas organoclorados, materiales radiactivos, policlorobifenilos (PCBs) procedentes de transformadores eléctricos o efluentes lixiviados de vertederos sanitarios urbanos.

Los organismos citados pueden ser bacterias, hongos, o sus enzimas resultantes, así como vegetales seleccionados por sus capacidades de absorción por su sistema radicular, algas azules microscópicas y vegetales modificados producto de manipulación genética.

La biorremediación está basada en la capacidad que tienen estos microorganismos de crecer a partir de la utilización de sustancias recalcitrantes al medio ambiente. Algunos de ellos son capaces de degradar estos compuestos hasta dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inocuos al medio ambiente, los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales. Esta técnica permite tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación.

“Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de oxidoreducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales.”<sup>2</sup>

“La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), pesticidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).”<sup>3</sup>

La biorremediación es un método especialmente atractivo de restauración por varias razones:

- Es mucho menos costosa que las tecnologías alternativas.
- Es natural y normalmente no requiere el uso de agentes químicos.
- Transforma los contaminantes a productos no peligrosos, o los degrada completamente, en lugar de simplemente transferirlos a una fase diferente o a otra localidad.

---

<sup>2</sup> Eweis, J.B. *Biorremediation principles*. p. 296.

<sup>3</sup> Semple, K.T. *Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants*. p. 269.

## **2.2. Tecnologías de biorremediación**

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

### **2.2.1. Bioventeo**

“El Bioventeo es una tecnología relativamente nueva, cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores.”<sup>4</sup>

#### **2.2.1.1. Aplicaciones**

Se utiliza para tratar compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles (COS) o no volátiles. Además de favorecer la degradación de contaminantes adsorbidos, pueden degradarse COV, por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo. Se ha utilizado con éxito para remediar suelos contaminados con HTP, solventes no clorados, pesticidas y conservadores de la madera, entre algunos otros químicos.

---

<sup>4</sup> DEUREN, Van. *Remediation technologies screening matrix and reference guide*. p. 252.

### **2.2.1.2. Limitaciones**

Algunos factores que pueden limitar la efectividad del Bioventeo son: (i) el tipo y la concentración del contaminante, (ii) falta de nutrientes; (iii) bajo contenido de humedad y (iv) dificultad para alcanzar el flujo de aire necesario.

### **2.2.1.3. Costos y tiempos de remediación**

Es una tecnología en la que los tiempos de limpieza pueden variar desde algunos meses hasta varios años, y sus costos de operación varían entre 10 y 70 USD/m<sup>3</sup>. Esta tecnología no requiere de equipo caro, pero los costos pueden variar en función de la permeabilidad del suelo, espacio disponible, número de pozos y velocidad de bombeo.

## **2.2.2. Bioestimulación**

“La bioestimulación implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ*.”<sup>5</sup>

### **2.2.2.1. Aplicaciones**

Se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, COV, COS y pesticida. Estudios a escala piloto, han mostrado la biodegradación de suelos contaminados con desechos de municiones.

---

<sup>5</sup> DEUREN, Van. *Remediation technologies screening matrix and reference guide*. p. 243.

### **2.2.2.2. Limitaciones**

Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O<sub>2</sub>. Otros factores que pueden limitar su aplicación, incluyen: (i) que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano; (ii) incremento en la movilidad de los contaminantes; (iii) obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano

### **2.2.2.3. Costos y tiempos de remediación**

La limpieza de una pluma de contaminación, puede tomar varios años. Su costo oscila entre 30 y 100 USD/m<sup>3</sup>. La naturaleza y profundidad de los contaminantes y el uso de bioaumentación puede aumentar sus costos.

### **2.2.3. Bioaumentación**

“Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores.”<sup>6</sup>

---

<sup>6</sup> Riser-Roberts. *Remediation of petroleum contaminated soils*. p. 45.

#### **2.2.3.1. Aplicaciones**

Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, BPC, HTP y HAP. También se ha aplicado efectivamente para tratar desechos con concentraciones relativamente altas de metales.

#### **2.2.3.2. Limitaciones**

Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa.

#### **2.2.3.3. Costos y tiempos de remediación**

Es una tecnología que puede durar varios meses o años, y su utilización no implica mucho capital ni costos de operación.

#### **2.2.4. Biolabranza**

Durante el proceso de biolabranza, la superficie del suelo contaminado es tratada en el mismo sitio por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, aireación) se controlan para optimizar la velocidad de degradación y generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviados.

La diferencia entra la biolabranza y el composteo, es que en la biolabranza, se mezcla el suelo contaminado con suelo limpio, mientras que el composteo generalmente se realiza sobre el suelo.

#### **2.2.4.1. Aplicaciones**

Los contaminantes tratados con éxito por biolabranza, incluyen diesel, gasolinas, lodos aceitosos, PCP, creosota y coque, además de algunos pesticidas y HTP. Es una tecnología de gran escala, que se practica en los Estados Unidos de América, Canadá, Reino Unido, Holanda, Suiza, Dinamarca, Francia y Nueva Zelanda.

#### **2.2.4.2. Limitaciones**

La biolabranza debe manejarse con cuidado para prevenir la contaminación de acuíferos, superficies de agua, aire o en la cadena alimenticia. El mayor problema es la posibilidad de lixiviados de los contaminantes hacia el suelo y el agua. Otra limitante para su utilización, es que por la incorporación de suelo contaminado en suelo limpio, se genera un gran volumen de material contaminado. No es recomendable su uso para contaminantes diluidos, ni cuando todos los contaminantes son biodegradables.

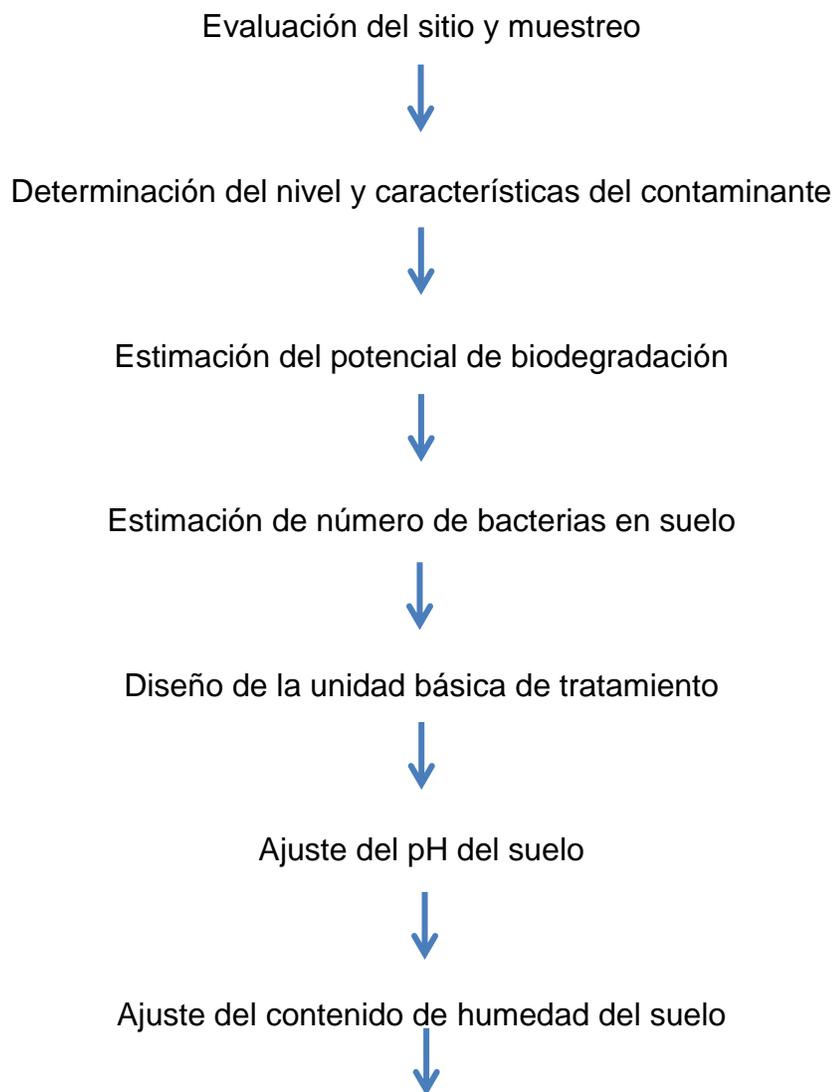
### **2.3. Fases en la aplicación de la biorremediación**

Cuando se plantea un caso de suelo contaminado se deben llevar a cabo una serie de etapas. A título de resumen deben cumplirse las siguientes etapas. En primer lugar se debe realizar una investigación exhaustiva del emplazamiento en relación con los contaminantes y en relación con el tipo de suelo.

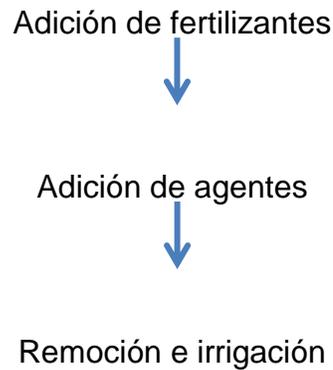
En segundo lugar, se deben realizar los ensayos de tratabilidad a nivel de laboratorio, seguidos si es factible de un ensayo piloto, para finalmente implantar la tecnología escogida en campo, que irá acompañada de un buen control de seguimiento.

A continuación se describen las fases que integran el proceso de biorremediación:

Figura 1. **Flujo de un proceso de biorremediación.**



Continuación de la figura 1.



Fuente: Dr. ERCOLI, Eduardo Carlos. Tratamientos Biológicos. En Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. p. 4.

### **2.3.1. Evaluación del sitio y muestreo**

Antes de iniciar las actividades de tratamiento en campo, la extensión de la contaminación global debe ser evaluada. Muestras representativas deberán ser tomadas del sitio siguiendo un procedimiento estadístico apropiado. El número de muestras colectadas y analizadas es dependiente generalmente del objetivo global del muestreo, de la heterogeneidad de distribución del contaminante en el sitio y del costo de muestreo y análisis.

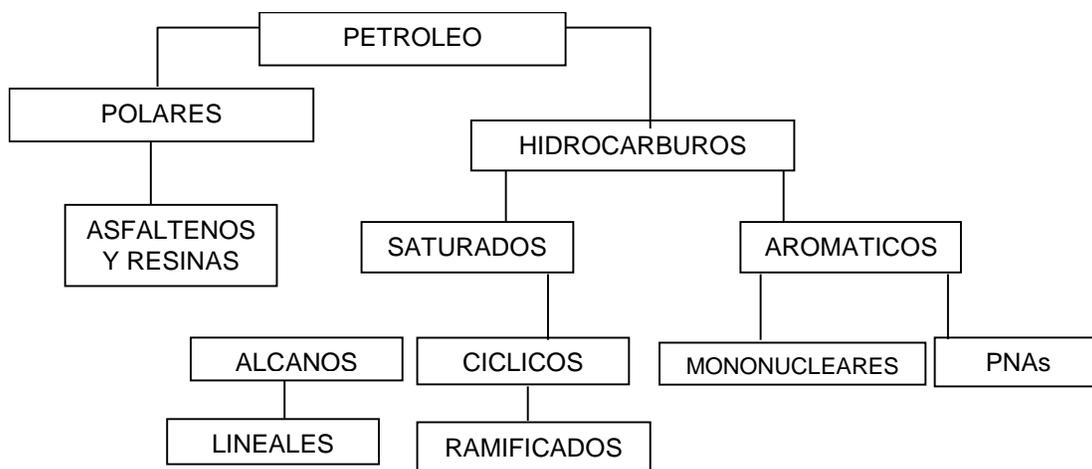
Existen varios procedimientos para selección de locaciones de muestreo. Un método es seleccionar locaciones aleatorias de muestreo. Otro es trabajar sobre una grilla hipotética cuadrada o rectangular sobre el sitio y tomar muestras sistemáticas del centro de cada cuadrado o rectángulo. Después de coleccionar las muestras con equipamiento adecuado, deben ser homogenizadas previo a seleccionar la muestra final de análisis.

### 2.3.2. Determinación del nivel y características del contaminante

Concentración de aceite y grasas (O&G) e hidrocarburos totales de petróleo (TPH) son requeridas para el diseño de un proceso de biorremediación de suelos. Grasas y aceites son determinados por extracción Soxhlet con freón y pesado del material extraído de acuerdo a Norma EPA 413.1. El extracto O&G es tratado con sílica gel para remover compuestos polares. TPH es determinado por Norma EPA 418.1.

El éxito de un proceso de remediación depende fundamentalmente de las características del contaminante. Los contaminantes de petróleo pueden ser clasificados del siguiente modo:

Figura 2. Caracterización de petróleo por tipo de compuestos



Fuente: Dr. ERCOLI, Eduardo Carlos. Tratamientos Biológicos. En Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. p. 5.

### **2.3.3. Estimación del potencial de biodegradación**

La factibilidad de un proceso de biorremediación de suelos para contaminantes de petróleo, puede ser evaluada a través de estudios de tratabilidad en laboratorio o por caracterización de los hidrocarburos del residuo combinado con la estimación del potencial de biorremediación basado en datos de biodegradabilidad de compuestos específicos.

### **2.3.4. Ensayos de factibilidad o tratabilidad**

Para llevar a cabo un tratamiento de biorremediación eficaz, se deben cumplir con los requisitos y se deben identificar con anterioridad los factores específicos que condicionan el proceso. Mediante la realización de experimentos a nivel de laboratorio, denominados ensayos de tratabilidad para cada emplazamiento, se podrán conocer las características microbiológicas, edafológicas y fisicoquímicas, así como la influencia de distintos parámetros (O<sub>2</sub>, nutrientes, etc.) antes de implementar cualquier tecnología de biorremediación.

Los ensayos de tratabilidad representan una parte muy pequeña de los costes totales de recuperación de cualquier emplazamiento y la información que pueden proporcionar es fundamental. Puede abaratar el coste final y lo que es más importante, aumentar las posibilidades de éxito. Por ello, es necesario no escatimar ni tiempo ni recursos en esta fase del proyecto.

El objetivo de los ensayos de tratabilidad es evaluar el nivel y la actividad de las poblaciones microbianas presentes, evaluar la biodegradabilidad de los contaminantes presentes por parte de las poblaciones microbianas autóctonas y finalmente encontrar aquellas condiciones medioambientales que permitan

optimizar la actividad metabólica de las poblaciones microbianas responsables de la eliminación de los contaminantes.

### **2.3.5. Estimación de número de bacterias en suelos**

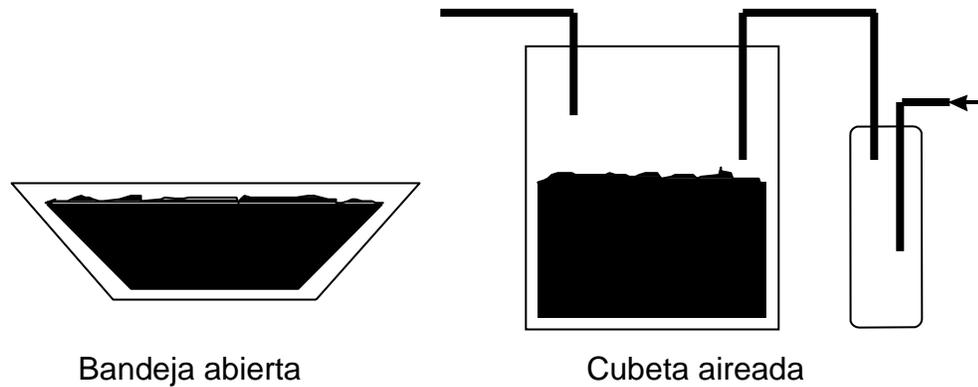
La mayor parte de los suelos contienen gran número de bacteria naturales o autóctonas (ej. 10<sup>6</sup> células por gramo de suelo) que son capaces de degradar hidrocarburos de petróleo. Existen algunas condiciones bajo las cuales la actividad microbiana puede ser inhibida. Por ejemplo, una alta concentración de sales o metales pesados pueden inhibir el crecimiento bacteriano, lo mismo que algunos compuestos orgánicos. Se ha observado también que una concentración en el nivel de hidrocarburos superior a 10 % puede inhibir crecimiento.

Para verificar que la población microbiana es adecuada se pueden utilizar test de cultivos, el más común de los cuales se utiliza para contar número total de bacterias heterotróficas en suelo, mediante unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

### **2.3.6. Diseño de la unidad básica de tratamiento**

Antes de comenzar el proceso de biodegradación, el suelo contaminado debe ser preparado para optimizar el proceso de tratamiento.

Figura 3. **Unidades de tratamiento**



Fuente: Dr. ERCOLI, Eduardo Carlos. Tratamientos Biológicos. En Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. p. 5.

### **2.3.7. Ajuste del pH del suelo**

El pH óptimo en un proceso de biorremediación se encuentra entre 6 y 8. Si el suelo es muy ácido o muy básico se debe corregir con incorporación de agentes correctores tales como arcilla o sulfato de aluminio.

### **2.3.8. Ajuste del contenido de humedad del suelo**

La biodegradación acontece bajo un amplio rango de condiciones de humedad. El suelo no debe estar ni muy seco ni muy húmedo. Un suelo muy seco reduce la actividad microbiana lo cual afecta la degradación. En un suelo muy húmedo la transferencia de oxígeno se ve limitada. La humedad óptima en un suelo depende fundamentalmente del tipo de suelo y puede ser estimada usando como criterio un valor correspondiente al 50-70 % de la capacidad de campo.

### **2.3.9. Adición de fertilizantes**

Los microorganismos requieren fuentes de nitrógeno y de fósforo para su desarrollo. Durante el proceso de biodegradación los microorganismos incorporan carbono desde la fuente contaminante juntamente con nitrógeno y fósforo del suelo, en su estructura celular. La relación C:N:P de la célula bacteria es aproximadamente 100:20:1. Las cantidades de nitrógeno y fósforo necesarios para estimular la biodegradación son menores que los requerimientos teóricos debido a que no todo el carbono proveniente de contaminante es incorporado a la biomasa (una fracción es convertida en CO<sub>2</sub>).

Existe un amplio rango de relaciones C:N:P reportadas en la literatura y diversas metodología para estimar la cantidad de fertilizante a agregar para estimular la biodegradación.

### **2.3.10. Adición de agentes**

En algunos casos se recomienda el uso de agentes de muy bajo costo que mejoren la capacidad de aireación del suelo, tales como restos de vegetales o aserrín. Además, la presencia de estos agentes incrementa la capacidad de drenaje del suelo.

### **2.3.11. Remoción e irrigación**

Una vez que el suelo a tratar ha sido acondicionado, esto es, ajuste de pH, contenido de agua y fertilización, debe ser arado e irrigado periódicamente para proveer un adecuado mezclado, aireación y control de humedad.

El arado se realiza hasta la profundidad de labranza de la herramienta (aproximadamente 25 centímetros) con intervalos de dos a cuatro semanas. El agua se incorpora según el criterio de humectación previamente indicado.

## **2.4. Factores que condicionan la biodegradación de hidrocarburos**

Son diversos los factores biológicos, químicos y físicos, que condicionan la biodegradación de hidrocarburos, con los cuales se debe tener un control riguroso, para alcanzar el éxito esperado. Dentro de los principales factores de control se encuentran el pH, humedad, temperatura, disponibilidad de oxígeno, concentración de nutrientes y población microbiana.

### **2.4.1. Condiciones del medio: pH, humedad y temperatura**

El pH del medio es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8 unidades, aunque el óptimo es pH neutro. La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción / absorción del contaminante e iones.

Las formas catiónicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$ ) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) son más solubles a pH alcalino. Para suelos, cuando el pH excede de 8 unidades se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre y si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato o hidróxido de calcio.

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante, el nivel óptimo de humedad

depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aerobia o anaerobia. El agua, al formar parte del protoplasma bacteriano, actúa como medio de transporte a través del cual los nutrientes y el oxígeno son movilizados hasta el interior de las células. Es conveniente mantener una humedad alrededor del 70 % de la capacidad de campo, ya que un exceso de la misma reduce la concentración de oxígeno en el suelo e impide el desarrollo adecuado de los microorganismos.

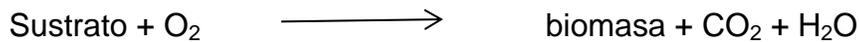
La temperatura influye en la velocidad de degradación, dependiendo del tipo de microorganismo. Comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C, (microorganismos mesófilos), aunque se han descrito algunos trabajos de biorremediación con microorganismos termofílicos extremos y psicrófilos. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Sin embargo cuando supera los 40 °C ocurre una disminución de la actividad microbiana por desnaturalización de los enzimas, o se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas.

#### **2.4.2. Disponibilidad de oxígeno**

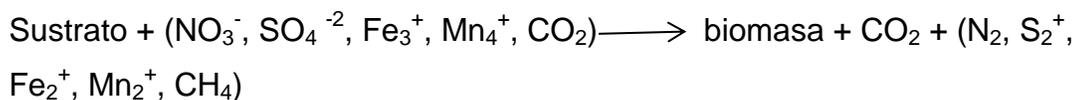
El fundamento bioquímico de la biodegradación son las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia el sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones. La vía más común de degradación es aerobia, no obstante la anaerobia puede tener lugar.

Los aceptores de electrones comúnmente utilizados por los microorganismos son oxígeno, nitrato, el hierro (III), el sulfato y el dióxido de

carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor final de electrones los procesos de biodegradación son de tipo aerobio.



Si se utiliza otro diferente del oxígeno, los procesos son de tipo anaerobio



Cuando se trata de la vía aerobia, es más común la oxidación a través de oxigenasas a intermediarios que se incorporan fácilmente al ciclo de Krebs, tal es el caso del catecol, el protocatecuato y el gentisato (anillos aromáticos) y ácidos grasos en el caso de cadenas lineales. La degradación anaerobia de compuestos aromáticos implica la reducción de los dobles enlaces del núcleo aromático.

El proceso ocurre en tres etapas: activación del sustrato (carboxilaciones, hidroxilaciones anaerobias o formación de tioésteres del correspondiente ácido aromático con el aceti-CoA); ataque enzimático (mediante reductasas) de los intermediarios activados y conversión de los compuestos no cíclicos (como resultado de la ruptura del anillo) en metabolitos centrales. Los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a CO<sub>2</sub> por cultivos puros de bacterias que realicen respiración anaerobia (ejemplo: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> para Pseudomonas) o por bacterias fototróficas.

### **2.4.3. Concentración de nutrientes**

El metabolismo exige fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo fundamentalmente. El carbono es el elemento más importante por su peso en la nutrición; y representa aproximadamente el 50 % de la masa seca de la célula. Los microorganismos son capaces de emplear desde las formas más oxidadas ( $\text{CO}_2$ ) hasta complejos polímeros de alto peso molecular, incluidas sustancias tóxicas y carcinógenas. Así, existen desde los organismos autótrofos que usan  $\text{CO}_2$  hasta los organismos heterótrofos que emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Es importante destacar que en la mayoría de los casos, los compuestos carbonados no sólo suministran el carbono para las estructuras celulares, también ellos son la fuente de energía metabólica, de este modo muchos organismos obtienen simultáneamente carbono y energía de la misma sustancia, otros necesitan una fuente de energía adicional a la fuente de carbono.

La fuente de nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas. El nitrógeno se requiere en grandes cantidades porque constituye cerca del 10 % de la masa seca de la célula (forma parte de proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de la pared celular de los microorganismos, etc.). Los microorganismos lo obtienen en forma natural como amonios, nitratos, nitritos, compuestos orgánicos que contienen nitrógeno molecular, además de estar presentes en la materia orgánica como grupos aminos.

La fuente preferente de nitrógeno es el amonio porque entra directamente al metabolismo y por tanto puede ser usado prácticamente por todos los microorganismos.

El nitrato también puede ser usado por algunos microorganismos pero puede en ocasiones retardar el crecimiento antes que se produzcan las enzimas necesarias para la reducción de los mismos. El nitrito es el producto de la reducción del nitrato y de la actividad metabólica de *Nitrosomonas* y otras 23 especies. Algunos microorganismos reducen éste a amonio o nitrógeno molecular.

En la biorremediación de ecosistemas terrestres, se ha demostrado que la utilización de la fuente nitrogenada es muy rápida. Los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades metabólicas y deben ser incorporados en fertilizantes agrícolas en forma de urea o sulfato de amonio y se ha utilizado nitrato.

La fuente de fósforo actúa en la formación de los compuestos energéticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación. El fósforo está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácido teicoico y en nucleótidos tales como ATP, GTP, NAD<sup>+</sup> y FAD, éste es suministrado generalmente, como fosfato. Las fuentes de fósforo más utilizadas en cultivos de bacterias son K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o mezclas de ellas.

La adición de fuentes de nitrógeno y fósforo inorgánicas, suele tener un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación del contaminante. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de carbono con una relación C:N:P 100:10:1, para la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos. En general la adición de fuentes inorgánicas de nitrógeno y fósforo es beneficiosa para los procesos de biodegradación.

#### **2.4.4. Población microbiana**

La población microbiana es el factor determinante para que ocurra el proceso de biodegradación. Se necesita una población microbiana adaptada, que posea las enzimas necesarias que catalicen las reacciones de degradación. Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios, que siempre es más eficiente que el cultivo puro. En los consorcios se establece una compleja interacción de las especies microbianas.

En una mezcla de poblaciones microbianas, los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos. Además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo y produciendo intercambio de material genético.

La adaptación o aclimatación de una comunidad microbiana a un contaminante dado, determina la rapidez con la que el compuesto puede ser transformado y/o mineralizado. Esta adaptación puede ocurrir por tres mecanismos:

- Inducción o depresión de enzimas específicas.
- Cambios genéticos que deriven en nuevas capacidades metabólicas.
- Enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar un compuesto de interés.

Estos mecanismos son ampliamente utilizados en la obtención de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos y xenobióticos complejos (HPAr, PCBs, pesticidas, etc.). El tipo de contaminación influye notablemente en las características de la comunidad microbiana.

#### **2.4.4.1. Principales bacterias degradadoras de petróleo**

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

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



### **3. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Variables**

Para lograr el cumplimiento de los objetivos y como resultado de la revisión bibliográfica de los métodos, para determinar los parámetros de la factibilidad de aplicar la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, se describen a continuación las variables que influyen en su determinación, así como las variables a medir para determinar la factibilidad del proyecto.

##### **3.1.1. Tiempo de degradación**

Se refiere al tiempo medido en días que se utilizaron para hacer las fases de tratamiento y análisis, las cuales se cumplían cada 20 días durante 4 periodos iguales, para hacer un total de 80 días de tratamiento, tiempo total que duro la fase experimental, para evaluar la factibilidad de los tratamientos en la degradación de suelos contaminados con hidrocarburos.

##### **3.1.1.1. Humedad**

La humedad se entiende por la cantidad de agua presente en el suelo, se determinó por desecamiento en la estufa a 100-105 °C hasta obtener un peso constante, esta variable se determinó cada 20 días en cada uno de los tratamientos, la dimensional de medición es el porcentaje de humedad.

### **3.1.1.2. Potencial de hidrógeno**

Se llevó a cabo la disolución del suelo contaminado en agua destilada y se determinó el pH mediante un potenciómetro, un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia y un dispositivo para compensar la temperatura. Este análisis se realizó cada 20 días de tratamiento.

### **3.1.1.3. Densidad poblacional de microorganismo**

Se determinó la densidad poblacional de microorganismo, mediante el método de recuento de colonias en placa. Disolución del suelo contaminado en agua peptonada (1:9), homogenización y siembra en el medio de cultivo e incubación a 44.5 °C por 2 días.

### **3.1.1.4. Concentración de hidrocarburos totales**

Se llevó a cabo mediante el análisis por espectrofotómetro infrarrojo. Se realizó la extracción mediante  $\text{CCl}_4$  y la remoción de sustancias polares en el extracto, para luego ingresar la muestra al espectrofotómetro infrarrojo y así obtener la concentración de hidrocarburos totales de petróleo en partes por millón (ppm).

### **3.1.1.5. Masa de sustrato**

La cantidad de sustrato a utilizar en cada tratamiento se determinó de acuerdo al porcentaje de consumo y desarrollo de los microorganismos y su capacidad de utilizar y degradar este sustrato.

#### **3.1.1.6. Concentración de nutrientes**

La concentración de nutrientes se aplicó sobre los tratamientos en concentraciones diferentes, con el objetivo de determinar las cantidades de nitrógeno y fósforo más eficientes y apropiados para el desarrollo de microorganismos y la degradación de hidrocarburos.

#### **3.1.1.7. Temperatura ambiente**

La temperatura ambiente influye en la capacidad de adaptación y desarrollo de los microorganismos. Esta se obtuvo diariamente en el lugar donde se llevó a cabo el experimento, mediante los datos reportados de una estación meteorológica ubicada en el lugar.

#### **3.1.1.8. Presión atmosférica**

El valor de la presión atmosférica también se obtuvo de los datos reportados por la estación meteorológica ubicada en el lugar del experimento.

#### **3.1.1.9. Gravedad API 15,6 °C**

La gravedad API se determinó mediante un análisis de las muestras iniciales del suelo contaminado con petróleo, previo a la aplicación de los tratamientos.

#### **3.1.1.10. Gravedad específica a 15,6 °C**

Mediante el análisis de laboratorio se determina la gravedad específica a 15,6 °C del suelo contaminado con el derrame de petróleo, previo a la aplicación de los tratamientos.

#### **3.1.1.11. Viscosidad a 100 °C**

Por medio del respectivo análisis de laboratorio se determinó la viscosidad a 100 °C del suelo contaminado con petróleo. Previo a la aplicación de cada uno de los tratamientos.

#### **3.1.1.12. Punto de inflamación**

Análisis llevado a cabo previo a la aplicación de los tratamientos, en las muestras de suelos contaminados con petróleo.

### **3.2. Delimitación de campo de estudio**

Los tratamientos de biorremediación *ex situ*, se llevaron a cabo durante un periodo total de 80 días de tratamiento, dentro de una cámara de biorremediación, instalada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco Xavier, en Yotala, Bolivia.

Las muestras de suelos contaminados fueron extraídas de la exrefinería Carlos Montenegro, administrada por la empresa Yacimientos Fiscales Petrolíferos Bolivianos, la cual se encuentra en periodo de desmantelación y abandono.

### **3.2.1. Tipo de estudio y diseño general**

La investigación se centró en la biorremediación, mediante la degradación de los hidrocarburos en suelos crónicamente contaminados, realizando esta investigación de forma experimental a través de la evaluación de 6 tratamientos diferentes y un blanco en estudio, los cuales permitieron determinar el tratamiento más eficiente en la degradación de HTP. Se realizó de manera longitudinal, es decir, se estudiaron las variables a lo largo de un tiempo total de 80 días, durante el cual se llevaron a cabo los análisis correspondientes de forma periódica cada 20 días.

### **3.2.2. Universo de estudio, selección y tamaño de muestra, unidad de análisis y observación**

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad San Francisco Xavier, Bolivia. El universo de estudio lo constituyeron los diferentes tratamientos y el blanco utilizados para evaluar la factibilidad del proceso de biorremediación. Para seleccionar el tamaño de la muestra, se partió del criterio de selección de Fisher, que indica que los recursos disponibles, fijan el tamaño máximo de muestra. Lo que delimita el tamaño de la muestra al número máximo de tratamientos posibles de evaluar y analizar.

### **3.3. Recursos humanos disponibles**

Realizador del trabajo de graduación: Silvia Mayte Cedillo Gámez; encargada del desarrollo de la investigación.

Asesora: Inga. Qca. Hilda Palma; encargada del asesoramiento y conducción del trabajo de investigación en Guatemala.

Coasesores:

Licda. Miriam Velasco; directora del Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Naturales (BIORENA); Responsable del coasesoramiento del trabajo de investigación en Sucre, Bolivia.

Ing. Qco. Fernando Rosas; gerente de proyectos, Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos YPFB, Sucre, Bolivia.

Facilitador: Ing. Qco. Nelson Solares; gerente de laboratorio, Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos YPFB, Cochabamba, Bolivia.

### 3.4. Recursos materiales disponibles

Se utilizaron los recursos disponibles en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de San Francisco Xavier, así mismo los recursos del laboratorio de la refinería Yacimientos Fiscales Petrolíferos Bolivianos (YPF).

Tabla I. **Cristalería, reactivos y equipo**

<b>Cristalería</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Equipo</b>
Balones de aforo	Abono orgánico	Agitador
Capsulas de porcelana	Agar nutritivo	Autoclave
Espátula	Agua destilada	Balanza de precisión
Embudos	Alcohol	Balanza
Frascos bacteriológicos 500ml	Bacto Agar	Cámara de flujo laminar
Matraces 125ml	Fertilizante 20-20-0	Computadora
Micropipeta 100 y 1000µl	Melaza (miel de caña)	Espectrofotómetro Infrarrojo
Mortero y pistilo	Potato Dextrose Agar	Hornilla
Papel filtro	Potato Dextrose Agar	Incubadora
Pipeta graduada 10ml	Suelo saludable	pH metro
Probetas 150ml	Suelo contaminado	Refrigerador
Puntas estériles	Tetracloruro de carbono	Secadora
Termómetro		
Tubos de ensayo		

Fuente: elaboración propia.

### **3.5. Técnica cualitativa y cuantitativa**

#### Técnica cuantitativa

El análisis cuantitativo se interesa en la determinación de cantidades de sustancia en particular, en una muestra o de algún proceso específico. En una investigación cuantitativa se recolectan y analizan datos cuantitativos sobre variables definidas.

La técnica cuantitativa en la presente investigación se desarrolló mediante la cuantificación experimental de las variables de factibilidad y tratabilidad del proceso de biorremediación, que determinaron la capacidad de degradación de HTP en suelos contaminados y el análisis de los datos obtenidos para la obtención de resultados, conclusiones y recomendaciones.

#### Técnica cualitativa

El trabajo de graduación realizado hace referencia a la utilización de la técnica cualitativa, ya que mediante la observación de los cambios de color, textura y olor en los suelos contaminados con hidrocarburos, al ser sometidos al proceso de biorremediación, se podía ir notando los cambios en la consistencia de los mismos y la mejoría por la degradación de los hidrocarburos de petróleo.

### **3.6. Recolección y ordenamiento de la información**

Los datos para evaluar del proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, por medio de bioaumentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas, se obtuvieron al medir en un semestre académico las variables mencionadas durante 80 días de tratamiento.

### **3.6.1. Elección del diseño experimental**

El estudio del proceso de biorremediación en esta investigación se realizó en tres fases:

- A. Caracterización del suelo contaminado y de la fuente de contaminación del suelo.
- B. Se desarrolló un estudio de factibilidad de la obtención y reproducción de cepas bacterianas autóctonas, aislando microorganismos benéficos autóctonos por medio de la lixiviación de suelos saludables, para la producción de un cultivo microbiológico, que será utilizado en la bioaugmentación en cada uno de los tratamientos y así evaluar el crecimiento bacteriano, asegurando el contenido de poblaciones microbianas, capaces de degradar los hidrocarburos presentes.
- C. Se llevó a cabo un estudio de tratabilidad, en el cual se prepararon seis diferentes tratamientos, con diferentes porcentajes de suelo contaminado, materia orgánica, cantidades diferentes de adición de cultivo bacteriológico y concentraciones de nutrientes, evaluando mediante una serie de análisis el tratamiento más eficiente en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTPs) en suelos crónicamente contaminados. los análisis fueron los siguientes:

En la muestras de suelo contaminado, previo a la aplicación de los tratamientos, se determinó la Gravedad API a 15,6 °C, Gravedad Especifica a 15,6 °C, Viscosidad a 100 °C, Punto de inflamación (C.O.C), Densidad poblacional de microorganismos y Concentración de HTP.

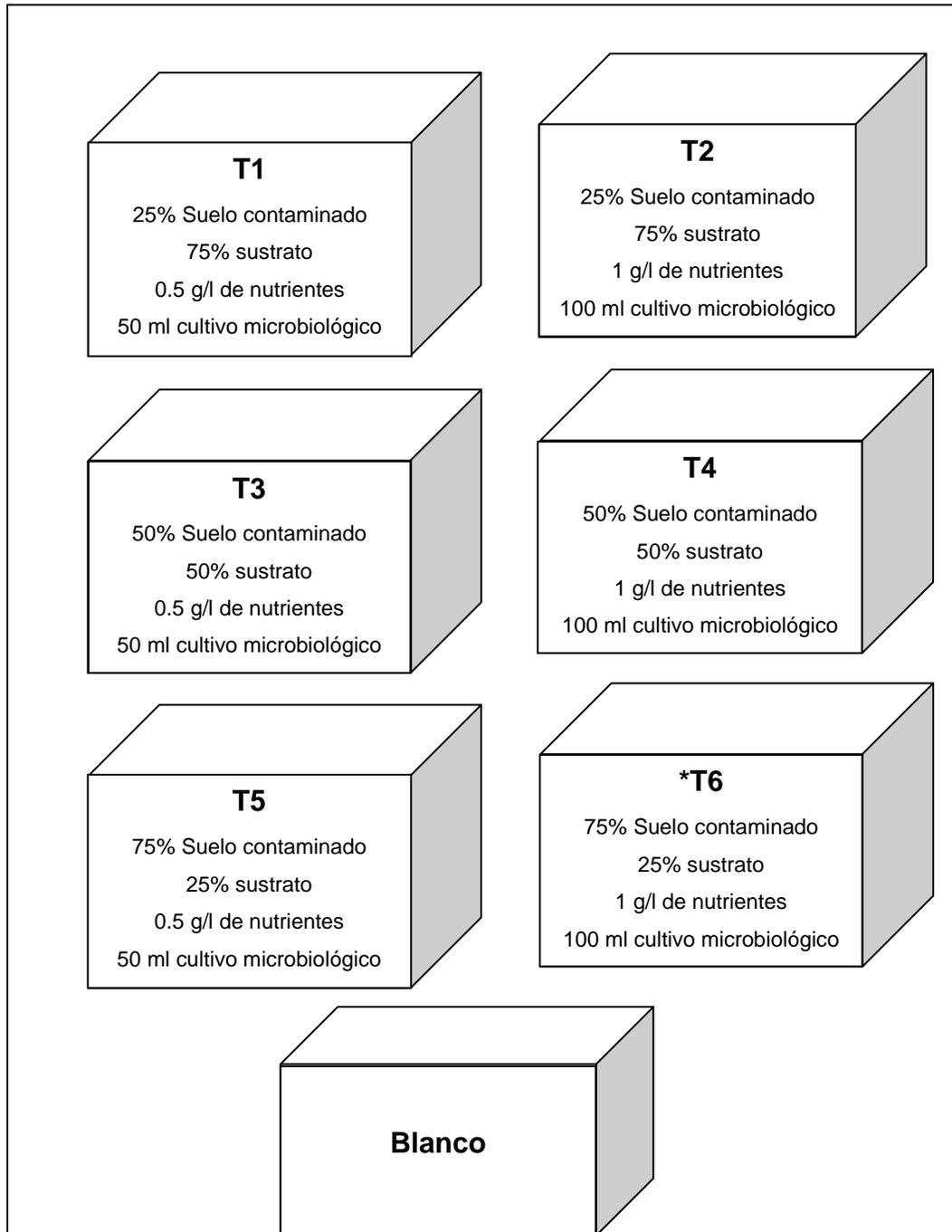
Posteriormente de la aplicación del cultivo microbiológico, nutrientes y aireación, se realizaran las pruebas de potencial de hidrógeno (pH), porcentaje de humedad, temperatura, recuento de colonias en placa e hidrocarburos totales de petróleo a los 20, 40, 60 y 80 días de tratamiento, evaluando así la degradación de los hidrocarburos totales y el desarrollo de los microorganismos en el tiempo, para así establecer el tratamiento más eficiente en la degradación de hidrocarburos totales.

Tabla II. **Unidades experimentales**

BANDEJA Tratamiento	SUELO CONTAMINADO	SUSTRATO	CULTIVO MICRO.	Nutriente (g/l)		
				0.5	1	Sin nutriente
T1	A	B	$W_i$	$X_i$	---	
T2	A	B	$W_i$	---	$Y_i$	
T3	A	B	$W_i$	$X_i$	---	
T4	A	B	$W_i$	---	$Y_i$	
T5	A	B	$W_i$	$X_i$	---	
T6	A	B	$W_i$	---	$Y_i$	
T7	A		---	---	---	$Z_i$

Fuente: elaboración propia.

Figura 4. **Esquematación de los tratamientos o cámara de remediación**



\* Tratamiento más eficiente

Fuente: elaboración propia.

Se trabajó con 2 concentraciones diferentes de nutrientes lo que permitirá evaluar y comparar el efecto de la concentración de fósforo y nitrógeno sobre el crecimiento de bacterias y la degradación de hidrocarburos.

Se aplicaron dos concentraciones diferentes de cultivo microbiológico, para evaluar la factibilidad de la adición adecuada del mismo, a modo de buscar la mayor eficiencia en su capacidad de degradar los hidrocarburos.

Tabla III. **Caracterización del cultivo microbiológico**

<b>ANALISIS</b>	<b>RESULT ADO</b>	<b>MÉTODO</b>
RECuento MOHOS Y LEVADURAS UFC/G	114,000 LEV	1FDA/CFSAN-BAM, <i>ONLINE</i> , JAN 2001, CHAP.18
COLIFORMES UFC/G	<10	1FDA/CFSAN-BAM, <i>ONLINE</i> , SEPT 2002, CHAP. 4
ESCHERICHIA COLI UFC/G	<10	1FDA/CFSAN-BAM, <i>ONLINE</i> , SEPT 2002, CHAP. 4
SALMONELLA SPP /25G	AUSENCIA	1FDA/CFSAN-BAM, <i>ONLINE</i> . 8TH. EDITION 1995, CHAP. 5

Fuente: Laboratorio de Microbiología.

### **3.6.1.1. Mediciones en cada tratamiento**

En cada uno de los tratamientos se realizaron las siguientes pruebas, a los 0, 20, 40, 60 y 80 días de tratamiento:

- A. Potencial de hidrógeno (pH), según el método APHA/AWWA/WEF Standard Methods No. 4500-HB
- B. Porcentaje de humedad (%H), determinado por desecamiento en secador a 100-105 °C hasta temperatura constante.
- C. Temperatura (°C), según el método APHA/AWWA/WEF Standard Methods No. B 2550.
- D. Determinación de la densidad poblacional de microorganismos, mediante el método de recuento de colonias en placas. Con referencia al método INEN 15295, 1990.
- E. Concentración de hidrocarburos totales, mediante espectrofotómetro infrarrojo. Con referencia en los métodos EPA 413.1; 1661 (SGT-HEM) y ASTM D3921-96

### **3.6.1.2. Muestreo**

Se llevó un muestreo en campo y cuatro muestreos en laboratorio, mediante el muestreo de campo se obtuvo el suelo contaminado que sería sometido al tratamiento y los cuatro muestreos en laboratorio, se llevaron a cabo a los 0, 20, 40, 60 y 80 días de tratamiento de dichos suelos, para llevar a cabo los respectivos análisis de laboratorio.

#### **3.6.1.2.1. Campo**

El muestreo de campo que se realizó en la presente investigación tuvo como objetivo primordial el obtener una muestra representativa de la cantidad de suelos contaminados que se disponen en la exrefinería Carlos Montenegro.

Para ellos se delimitó una área de 300 metros cuadrados en la cual se procedió a realizar un muestreo al azar en donde se recolectaron submuestras (10) a una profundidad de 20 centímetros, las mismas fueron mezcladas en fundas plásticas impermeables formando así una muestra compuesta (25 kilogramos), para poder luego ser enviadas al laboratorio para su respectivo análisis.

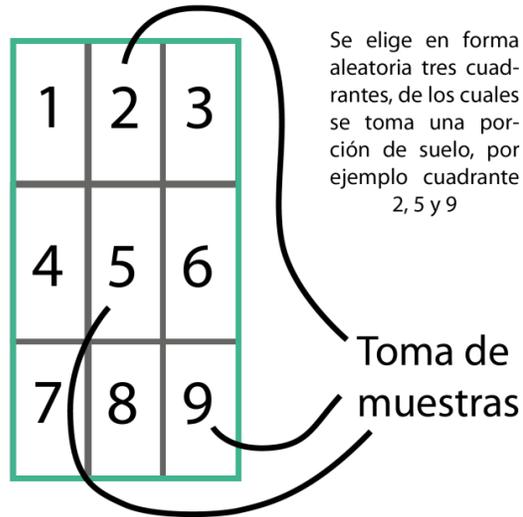
Se escogió este tipo de muestreo debido a la composición heterogénea que representan estos tipos de suelos, ya que no se pudo precisar grupos en iguales condiciones o separarlos por estratos.

#### **3.6.1.2.2. Laboratorio**

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

Figura 5. **Toma de muestras de tratamientos en laboratorio**

Esquematación toma de muestras de tratamientos



Fuente: elaboración propia.

### 3.7. **Tabulación, ordenamiento y procesamiento de información**

La tabulación de los datos obtenidos se realizó por cada uno de los tratamientos, en cada fase de muestreo, tabulando la información de potencial de hidrógeno (pH), porcentaje de humedad, temperatura, recuento de colonias en placa y concentración de hidrocarburos totales de petróleo.

Los resultados obtenidos se ordenaron en tablas, para realizar los cálculos respectivos y poder analizar los mismos.

Tabla IV. **Caracterización de suelos contaminados, al inicio y al final de la investigación (toma de datos cada 20 días)**

Parámetro	Expresado en	Unidad	Valor	Referencia
Temperatura	Grados Celsius	°C		14-45
Potencial de hidrogeno	Ph	[H]		6-8
Humedad	%H	%		70%
Aerobios Mesófilos	Unidades formadoras de colonias.	UFC/g		≥ 106
Hidrocarburos totales de petróleo	TPH	ppm		
	<b>Condición</b>			
Olor				
Color				
Textura				

Fuente: elaboración propia.

### 3.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando como herramienta diversas variables estadísticas, estas variables presentaban la información para análisis de medias, desviaciones y rangos de incertidumbre.

### 3.8.1. Promedio estadístico

El promedio ( $\bar{a}$ ), permitirá obtener un dato representativo para cada variable en cada medición, de esta forma se tomara en cuenta las posibles variaciones aleatorias junto con la desviación estándar:

$$\bar{a} = \frac{\sum_i^n a_i}{n} = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}$$

Donde:

$\bar{a}$  = valor Promedio

$a_i$  = valor  $i$

$n$  = número de datos

### 3.8.2. Desviación estándar

La desviación estándar ( $S_a$ ), permitirá cuantificar la dispersión de los valores para una misma medición respecto al valor promedio, lo cual representará el error aleatorio causado por diversos factores:

$$S_a = \sqrt{\frac{\sum_i^n |\bar{a} - a_i|}{n - 1}}$$

Donde:

$\bar{a}$  = valor Promedio

$a_i$  = valor  $i$

$n$  = número de datos

$S_a$  = desviación estándar de la variable  $a$

### 3.8.3. ANOVA de dos factores

El análisis de la varianza se basa en la descomposición de la variabilidad total en dos partes, una parte debida a la variabilidad entre las distintas poblaciones o tratamientos (variabilidad entre grupos o variabilidad explicada por el diseño) y otra parte que puede considerarse como la variabilidad intrínseca de las observaciones (variabilidad dentro de los grupos o residual).

#### 3.8.3.1. Hipótesis

$H_0(A): \mu_{1+} = \mu_{2+} = \dots = \mu_{J+}$  Las  $J$  medias poblacionales correspondientes a los  $J$  niveles del factor A son iguales.

$H_0(B): \mu_{+1} = \mu_{+2} = \dots = \mu_{+K}$  Las  $K$  medias poblacionales correspondientes a los  $K$  niveles del factor B son iguales.

$H_0(AB): \mu_{jk} - \mu_{j'k} = \mu_{j+} - \mu_{j'+}$  No hay efecto de interacción.

$H_1(A): \mu_{j+} \neq \mu_{j'+}$  El factor A influye o afecta a la VD.

$H_1(B): \mu_{+k} \neq \mu_{+k'}$  El factor B influye o afecta a la VD.

$H_1(AB): \mu_{jk} - \mu_{j'k} \neq \mu_{j+} - \mu_{j'+}$  Hay interacción.

#### 3.8.3.2. Supuestos

Independencia: las JK muestras de tamaño  $n$  son aleatorias e independientes

Normalidad: las JK poblaciones de donde se extraen las JK muestras son normales

Homocedasticidad: las JK poblaciones tienen, todas ellas, la misma varianza

### 3.8.3.3. Estadístico de contraste

$J$  : niveles del factor A

$K$  : niveles del factor B

$n$  : nº de observaciones en cada casilla

$N$  : nº total de observaciones ( $N=nJK$ )

$T_{j+}$  : Totales de cada nivel del factor A

$T_{+k}$  : Totales de cada nivel del factor B

$T_{jk}$  : Totales de cada casilla

$T$  : Total de la muestra

### 3.8.3.4. Suma de cuadrados

$$SCT = \sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}^2 - \frac{T^2}{N}$$

$$SCA = \frac{\sum_j T_{j+}^2}{nK} - \frac{T^2}{N}$$

$$SCB = \frac{\sum_k T_{+k}^2}{nJ} - \frac{T^2}{N}$$

$$SCAB = \frac{\sum_j \sum_k T_{jk}^2}{n} - \frac{\sum_j T_{j+}^2}{nK} - \frac{\sum_k T_{+k}^2}{nJ} + \frac{T^2}{N}$$

$$SCE = \sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}^2 - \frac{\sum_j \sum_k T_{jk}^2}{n}$$

$$SCT = SCA + SCB + SCAB + SCE$$

Tabla V. **Tabla análisis de varianza de dos factores**

Tabla resumen del ANOVA AB-EF- CA

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>g.l.</i>	<i>MC</i>	<i>F</i>
Factor A	SCA	$J - 1$	$\frac{SCA}{J-1}$	$F_A = \frac{MCA}{MCE}$
Factor B	SCB	$K - 1$	$\frac{SCB}{K-1}$	$F_B = \frac{MCB}{MCE}$
Interacción	SCAB	$(J - 1)(K - 1)$	$\frac{SCAB}{(J-1)(K-1)}$	$F_{AB} = \frac{MCAB}{MCE}$
Error	SCE	$N - JK$	$\frac{SCE}{N-JK}$	
Total	SCT	$N - 1$		

FA se distribuye según  $F_{J-1, N-JK}$ , luego la zona crítica es  $FA \geq 1-\alpha F_{J-1, N-JK}$   
 FB se distribuye según  $F_{K-1, N-JK}$ , luego la zona crítica es  $FB \geq 1-\alpha F_{K-1, N-JK}$   
 FAB se distribuye según  $F_{(J-1)(K-1), N-JK}$ , luego la zona crítica es  $FAB \geq 1-\alpha F_{(J-1)(K-1), N-JK}$

Fuente: departamento de estadística.

### **3.8.3.5. Regla de decisión**

- I. Rechazar  $H_0(A)$  si el estadístico  $FA$  cae en la zona crítica. Mantener  $H_0(A)$  en caso contrario.
- II. Rechazar  $H_0(B)$  si el estadístico  $FB$  cae en la zona crítica. Mantener  $H_0(B)$  en caso contrario.
- III. Rechazar  $H_0(AB)$  si  $FAB$  cae en la zona crítica. Mantener  $H_0(AB)$  en caso contrario.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos

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

Tabla VI. **Caracterización del suelo contaminado**

Parámetro	Unidad	Valor
Potencial de hidrógeno (pH)	---	5,20
Humedad	%	15,56
Aerobios Mesófilos	UFC/g	3,4X10 <sup>5</sup>
Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)	mg/kg	181,875,01
Gravedad API a 15.6 /15.6 °C	°API	27,8
Gravedad específica a 15.6 /15.6 °C	---	0,8883
Viscosidad a 100 °C	cSt	10,08
Punto de inflamación (C.O.C)	°C	183

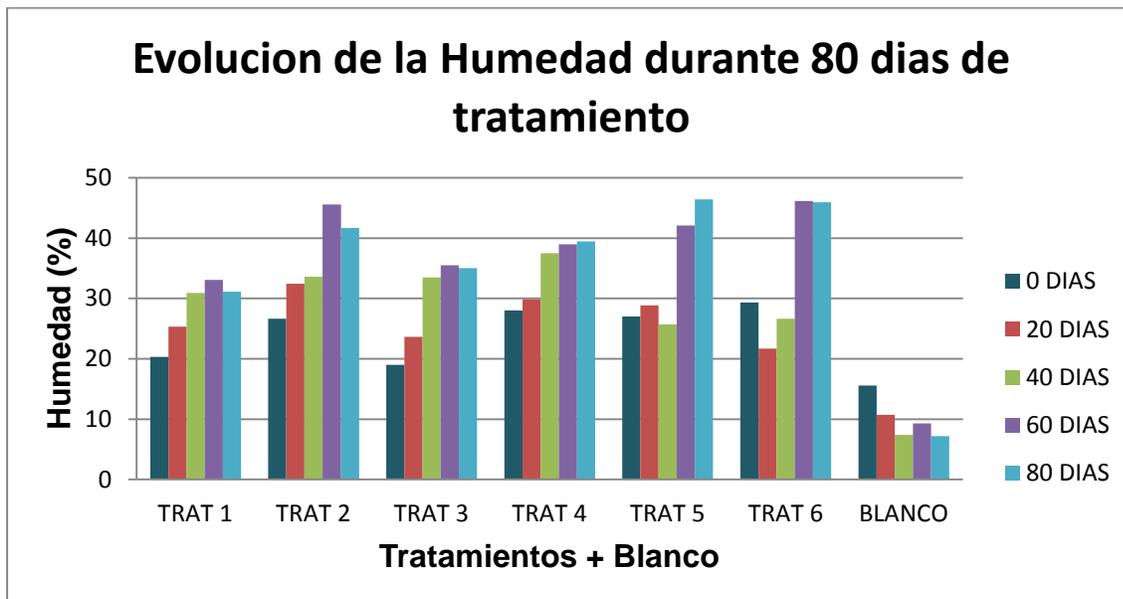
Fuente: elaboración propia.

El valor de hidrocarburos totales de petróleo descrito en la tabla VI, determina que dicho parámetro esta fuera de los límites permisibles según RAOHE para los suelos de uso industrial. Siendo la reducción de estos el objetivo de la aplicación del método de Biorremediación planteado en la presente investigación.

#### 4.2. Evolución de las variables de control durante 80 días de tratamiento

En las tablas X, XI y XII (apéndice 2) se muestran los valores medios de las variables de control, de cada uno de los tratamientos realizados durante los ochenta días del proceso de biorremediación. De estos datos se obtuvieron las figuras 6, 7 y 8.

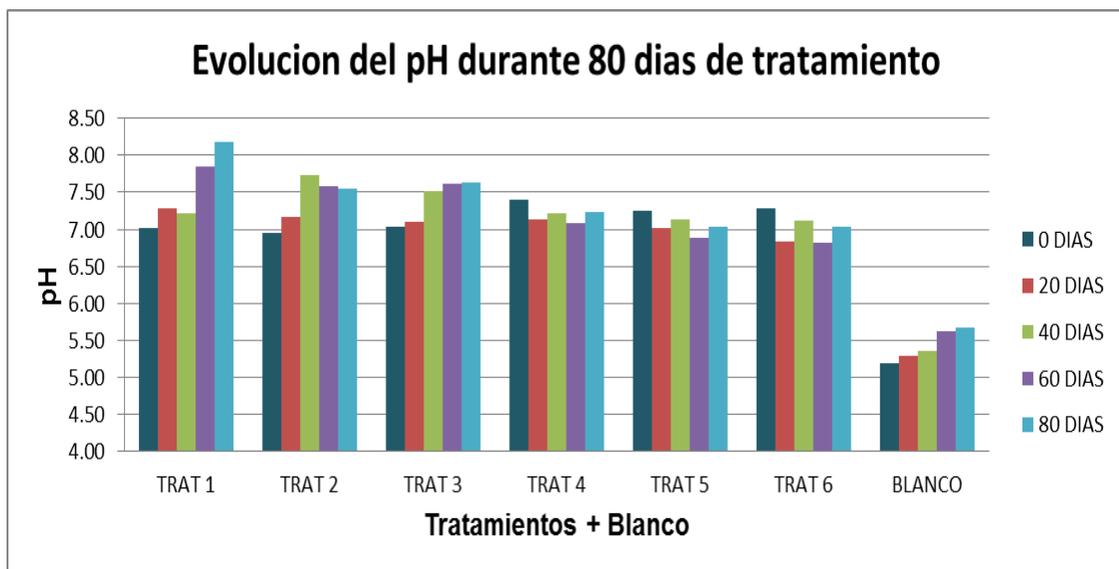
Figura 6. Evolución de la Humedad durante los 80 días de tratamiento



Fuente: elaboración propia.

Como se puede apreciar en la figura 6, la humedad de cada uno de los tratamientos ha ido aumentando, por la recuperación de la capacidad de absorción de las partículas de suelo contaminado; diariamente se agregó agua a los tratamientos, cinco días de la semana se agregó el nutriente disuelto en agua y dos días a la semana el inóculo bacteriano, preservando siempre la humedad dentro de cada tratamiento, lo que contribuye al desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos.

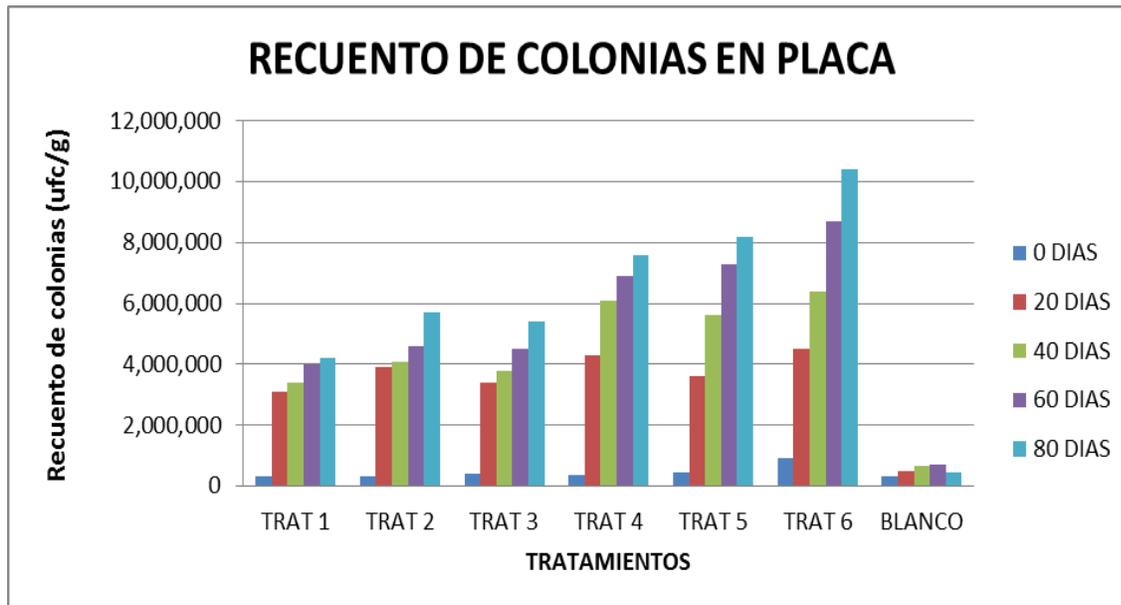
Figura 7. Evolución del pH durante los 80 días de tratamiento



Fuente: elaboración propia.

La figura 7 muestra el incremento del valor de pH pasando de un suelo ácido (5,2 caracterización inicial) a suelo ligeramente básico sobre pH 7 a partir de los 40 días de tratamiento con aproximaciones a la neutralidad, a excepción del blanco con un pH de 5,6.

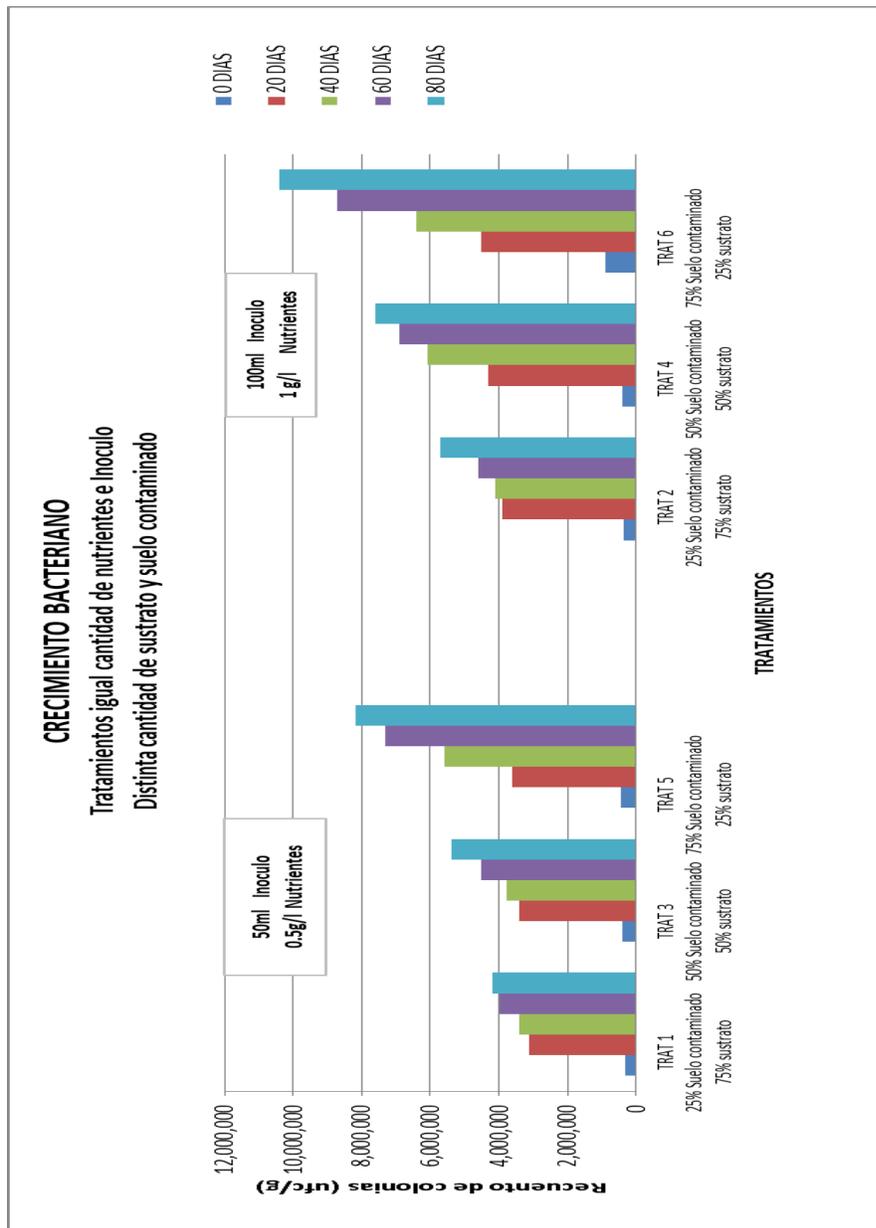
Figura 8. **Evolución del recuento de colonias en placa durante los 80 días de tratamiento**



Fuente: elaboración propia.

La figura 8, con referencia a tablas de datos originales, muestra el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, esto debido a la bioaumentación mediante la aplicación del inóculo bacteriano y a la bioestimulación mediante la aplicación de nutrientes (nitrógeno y fósforo), lo cual contribuye a mantener las condiciones de fuentes de energía y alimentación para el desarrollo de los microorganismos; los tratamientos que presentan mayor crecimiento microbiano son el T3, T5 y el T6 hasta los 80 días del proceso de biorremediación, siendo estos tratamientos en los que mejor se logró preservar las condiciones idóneas para el desarrollo de los microorganismos durante mayor tiempo.

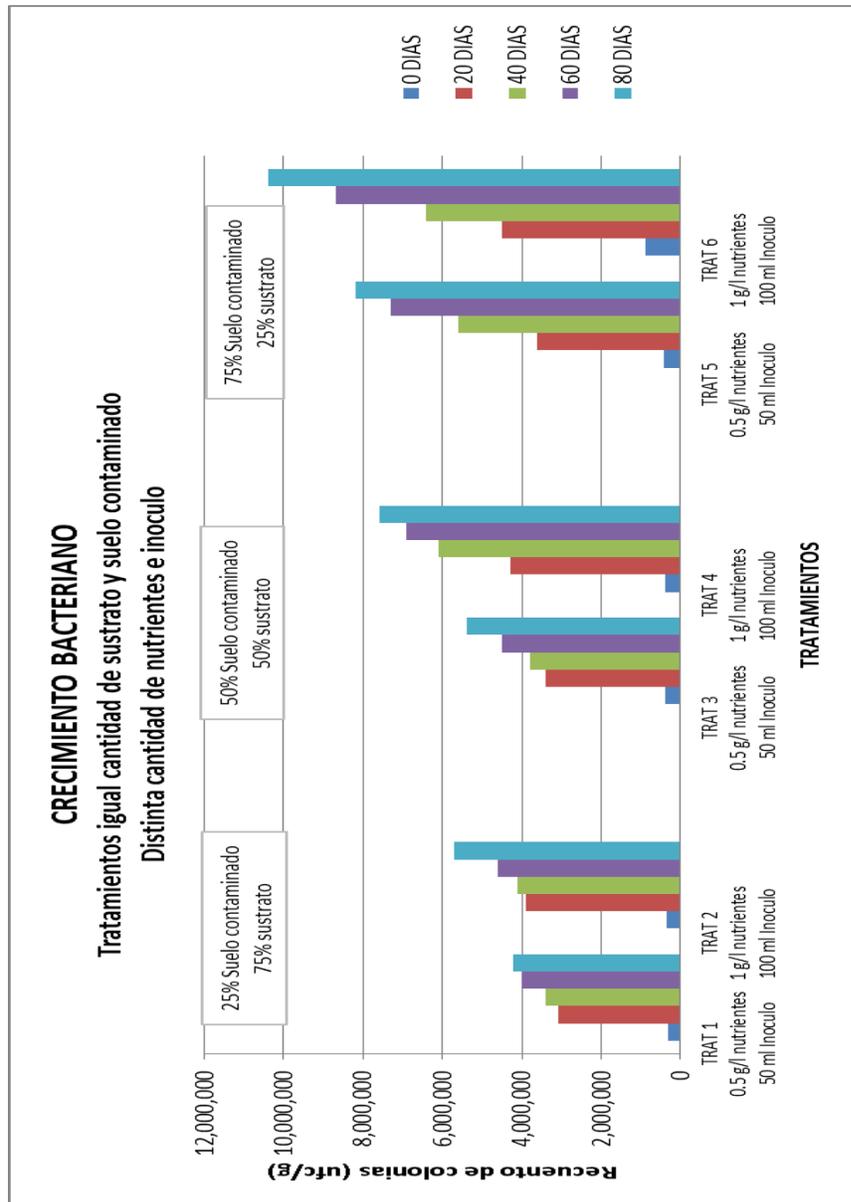
Figura 9. Comparación de crecimiento bacteriano en tratamientos igual cantidad de nutrientes e inóculo - Distinta cantidad de sustrato y suelo contaminado



Fuente: elaboración propia.

Según se observa en la figura 9, con referencia a la tabla de datos originales, el crecimiento bacteriano tuvo mejor adaptación y desarrollo en los tratamientos con un mayor contenido de suelo contaminado, concentración de nutrientes e inóculo bacteriano, siendo estas condiciones óptimas de desarrollo microbiológico.

Figura 10. Comparación de crecimiento bacteriano en tratamientos con igual cantidad de sustrato y suelo contaminado - Distinta cantidad de nutriente e inóculo



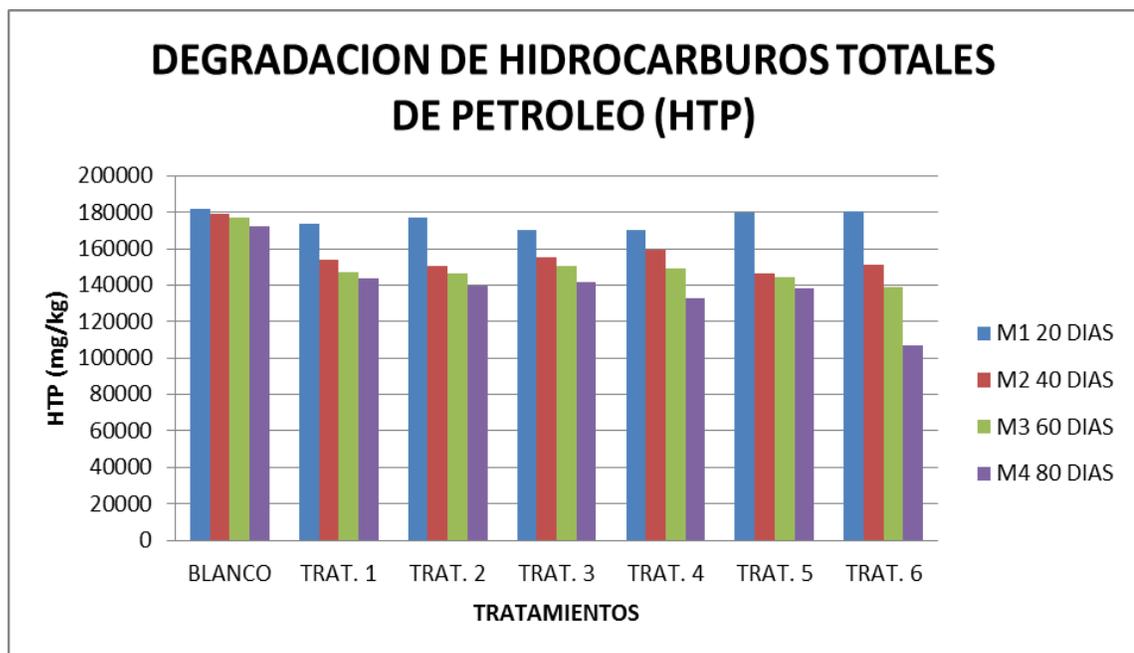
Fuente: elaboración propia.

Según se observa en la figura 10, con referencia en la tabla de datos originales, en los tratamientos con mayor concentración de suelo contaminado, se obtuvo mayor desarrollo bacteriano, esto debido a que la elevada concentración de hidrocarburos, provee a algunas bacterias como las *pseudomonas* de la concentración de carbono necesarias para su desarrollo, que también dependen en gran medida de la concentración de nutrientes.

### 4.3. Medición de la respuesta experimental

En la tabla XIII (apéndice 2) se muestran los valores medios de los Hidrocarburos totales de petróleo medidos en cada uno de los tratamientos realizados en la presente investigación, de los cuales se obtuvo la siguiente figura.

Figura 11. **Concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) durante los 80 días de tratamiento**



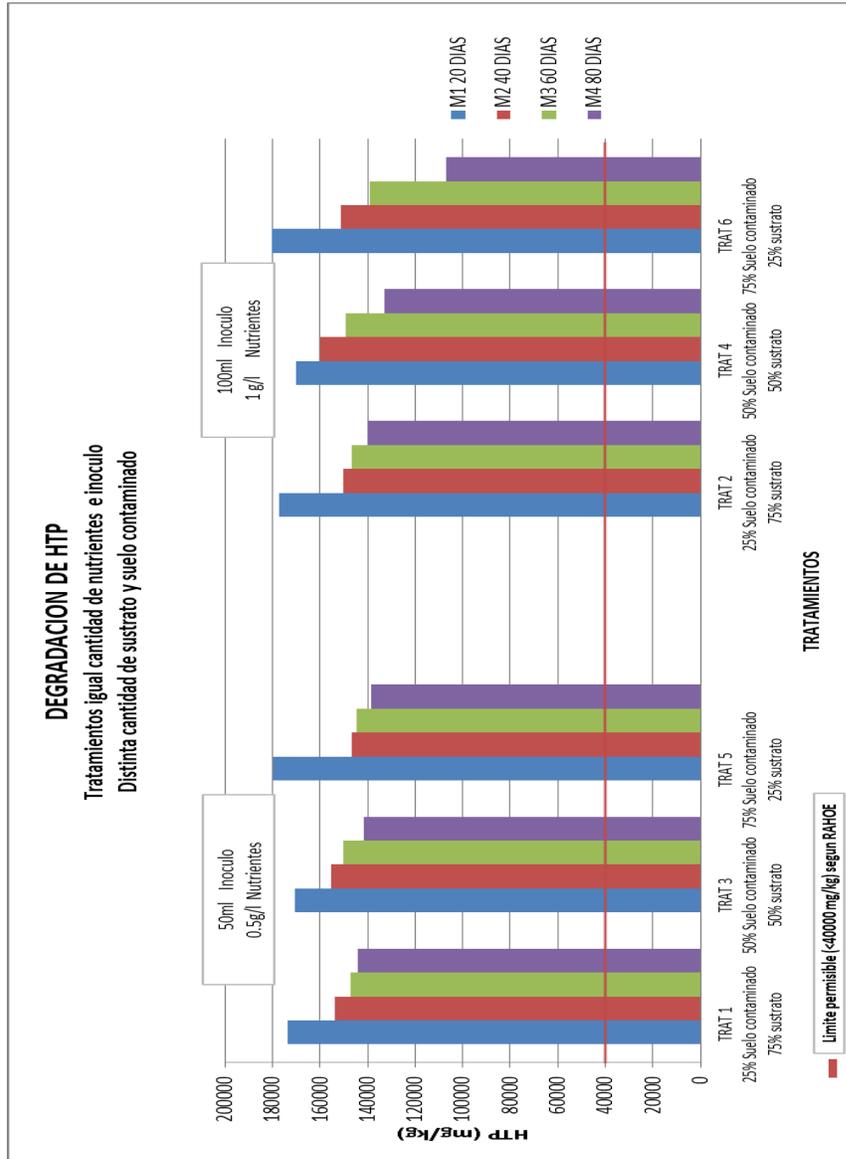
Fuente: elaboración propia.

Como se puede apreciar en la figura 5 la concentración de HTP fue descendiendo en mayor porcentaje en algunos tratamientos como lo son el tratamiento T4, T5 y T6 en comparación con los tratamientos T1, T2 y T3 en los cuales la degradación no fue de mucha relevancia.

El análisis de HTP se llevó a cabo mediante la preparación de las muestras con un secado a temperatura regulada para impedir la volatilización de los compuestos y una trituración, para luego llevar a cabo la extracción con Tetracloruro de Carbono, mediante agitación centrifugación y por ultimo medir la concentración por medio de espectrofotómetro infrarrojo.

Los porcentajes de degradación medidos cada 20 días durante todo el proceso de degradación se describen en la tabla XIII del apéndice 2.

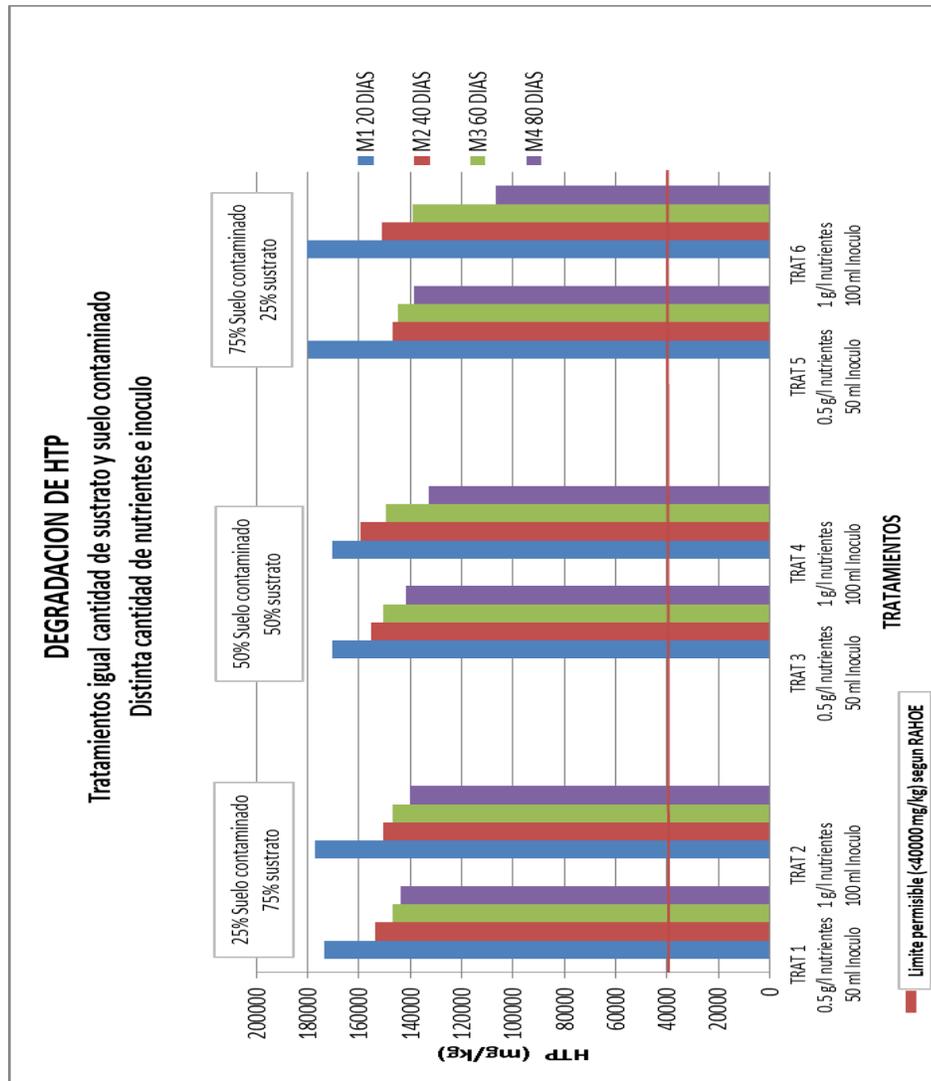
Figura 12. Comparación degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) igual cantidad de nutrientes e Inóculo - Distinta cantidad de sustrato y suelo contaminado



Fuente: elaboración propia.

Según la figura 12 con, con referencia a la tabla de datos originales, entre los tratamientos con igual cantidad de inóculo y nutrientes, los que presentan una mayor degradación de HTP son a los que se les aplicó mayor concentración de nutriente y mayor cantidad de inóculo bacteriano.

Figura 13. **Comparación degradación de hidrocarburos totales de petrolero (HTP) igual cantidad de sustrato y suelo contaminado - Distinta cantidad de nutriente e inóculo**



Fuente: elaboración propia.

Según la figura 13, con referencia a la tabla de datos originales, entre los tratamientos con igual cantidad de sustrato y suelo contaminado, los que tienen mayor concentración de nutrientes e inóculo son los que presentan mayor degradación de HTP a los 80 días de tratamiento.

#### **4.3.1. Análisis estadístico de la respuesta experimental**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos factores, el cual se corroboró con análisis de comparación múltiple de medias, con el fin de hacer evidente estadísticamente el tratamiento más eficiente.

Tabla VII. **Análisis de Varianza de HTP (ANOVA de dos factores)**

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
TRAT. 1	4	618470,187	154617,547	179436364
TRAT. 2	4	613960,621	153490,155	265210950
TRAT. 3	4	618010,579	154502,645	148276990
TRAT. 4	4	612238,442	153059,611	254259413
TRAT. 5	4	609872,813	152468,203	347606459
TRAT. 6	4	577440,708	144360,177	921260619
M1 20 DIAS	6	1051872,44	175312,074	19827559,1
M2 40 DIAS	6	917139,702	152856,617	19986738,4
M3 60 DIAS	6	877459,308	146243,218	16431485,2
M4 80 DIAS	6	803521,895	133920,316	188377562

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	300011352	5	60002270,4	0,97500685	0,46418705	2,90129454
Columnas	5425047019	3	1808349006	29,3847658	1,5866E-06	3,2873821
Error	923105368	15	61540357,9			
Total	6648163740	23				

Fuente: análisis de Excel.

A través de los datos obtenidos en ANOVA (tabla VIX), se obtuvo un factor Fisher (F), el cual es mayor comparado con los valores preestablecidos en tablas, a un valor de rechazo de 0,05; por lo que se debe rechazar la hipótesis nula, lo cual indica que existe una diferencia significativa entre los valores medios de HTP de cada uno de los tratamientos y los días establecidos para la biorremediación (80 días), por lo que es necesario realizar la prueba de TUKEY separando medias según rangos.

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey debe ser aplicada al obtener diferencia significativa en los valores medios determinado a través del análisis de varianza ANOVA.

Tabla VIII. **Comparaciones múltiples de medias (Tukey)**

TRATMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
TRA. 6	6	144360,177		
TRA. 5	6		152468,2032	
TRA. 4	6		153059,6106	153059,6106
TRA. 2	6		153490,1552	153490,1552
TRA. 3	6			154502,6446
TRA. 1	6			154617,5466

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

N. usa el tamaño muestral de la media armónica = 6

Fuente: análisis de Excel.

La tabla VIII se presenta la separación de medias entre los 6 diferentes tratamientos homogéneos, mediante la prueba de comparaciones múltiples de medias de TUKEY, teniendo tres subconjuntos ordenados alfabéticamente de manera ascendente de los valores medios de HTP. El tratamiento 6 presente en el subconjunto a presenta un valor de 144 360,1769 siendo este el promedio de los valores medios de HTP durante los 80 días de biorremediación. Siendo el valor más bajo de HTP, por ende el de mayor eficiencia y el que presenta la mayor diferencia significativa entre los demás valores registrados en la fase experimental.

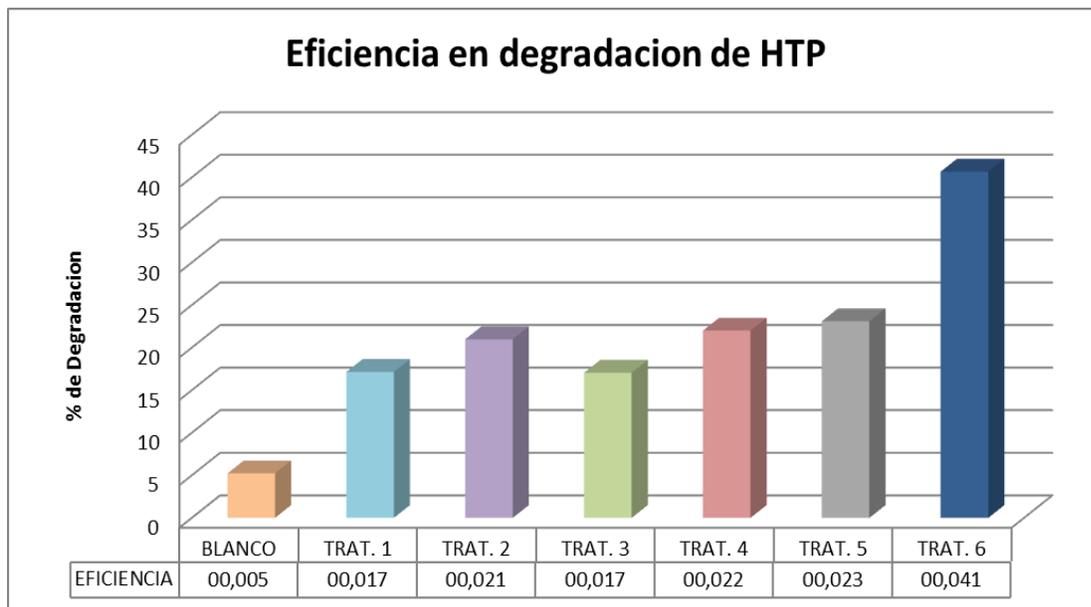
Los datos presentes en el subgrupo b que va desde 152 468,2032 al 153 490,1552 de los valores medios de HTP dentro de este rango se encuentra los tratamientos 5, 4 y 2 los cuales representan una insignificante diferencia estadística. Los valores mayores de medias de HTP son 153 059,6106 y 154 617,5466 que se encuentran en el grupo C. Los tratamientos homogéneos dentro de este grupo son el 3 y el 1 los cuales muestran la menor eficiencia en la biorremediación

Es así que al realizar la prueba de Tukey y separar las medias significativas podemos concluir que el tratamiento que se encuentra dentro del porcentaje de significación (99,20 %) en la disminución de HTP durante el proceso de biorremediación es el tratamiento 6 (1 500 g de suelo contaminado + 500 g de sustrato + 10 ml de inóculo bacteriano).

#### **4.3.2. Eficiencia de las respuestas experimentales de cada uno de los tratamientos en estudio**

En base a los valores obtenidos en la concentración inicial a los cero días y la concentración final a los ochenta días de tratamiento, se determinó la eficiencia de cada uno de los tratamientos en la reducción de hidrocarburos totales de petróleo, las cuales se representan en la siguiente figura.

Figura 14. **Eficiencia de cada tratamiento en la degradación de HTP**



Fuente: elaboración propia.

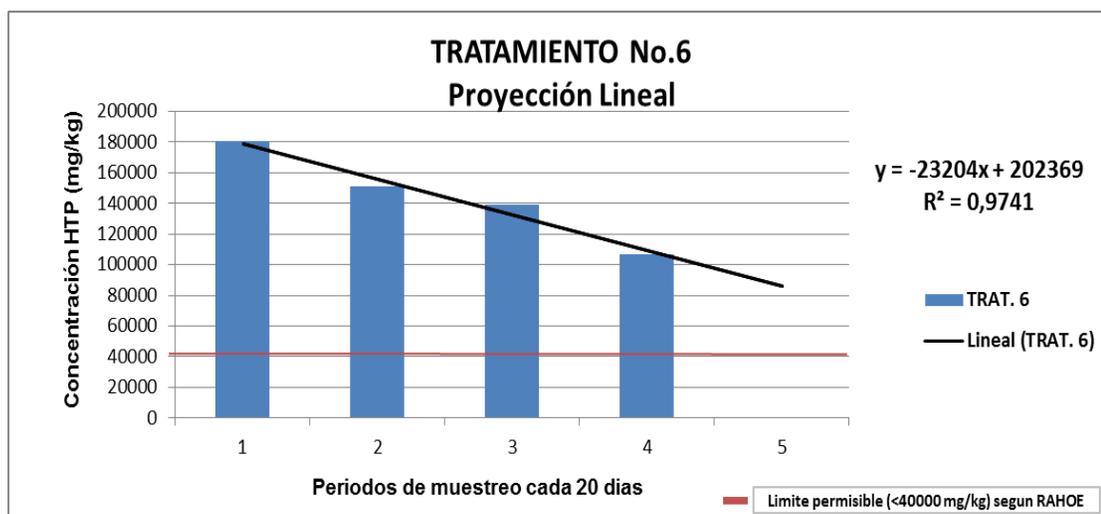
De acuerdo con la figura 10, se puede determinar que el tratamiento TRAT. 6 con un 40,6765 % es el experimento con mayor eficiencia en relación a los otros experimentos, este tratamiento muestra la mayor degradación en la concentración de HTP en los 80 días de tratamiento, lo que indica la eficacia de la aplicación de este, en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

#### 4.4. Valores proyectados en la reducción de HTP

Debido a que los resultado finales de hidrocarburos totales de petróleo evaluados durante los 80 días de tratamiento, están todavía por encima de los limites permisible para uso industrial del suelo según el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas, el cual estable un valor <40 000 mg/kg,

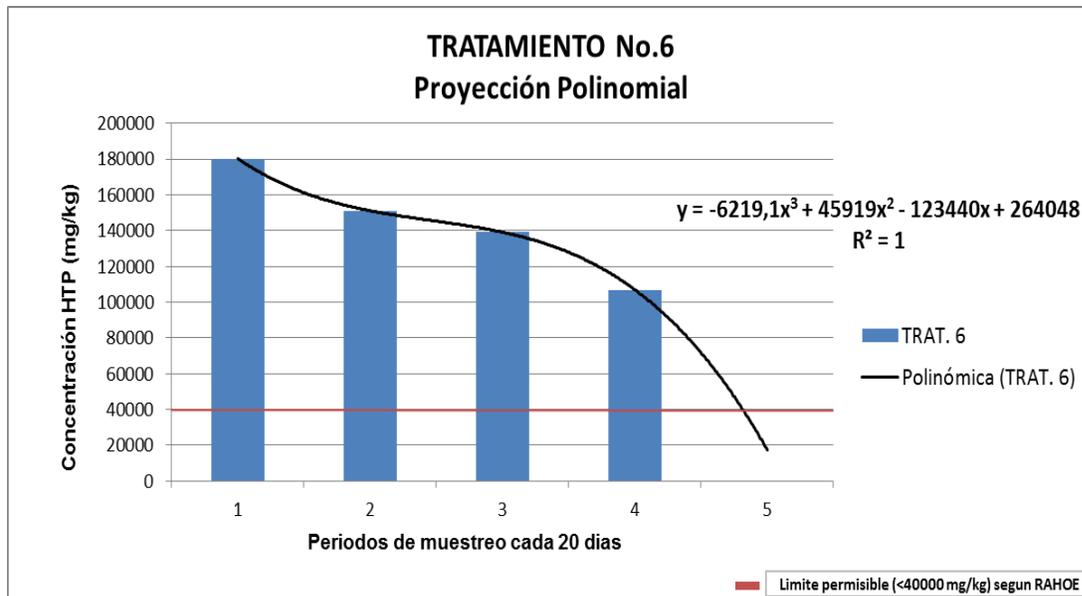
Se realizó la proyección de los valores de concentración de HTP para un periodo de 20 días más para el tratamiento 6, establecido como el más eficiente; hasta el cumplimiento del parámetro de seguridad para uso industrial, esta proyección se evaluó mediante una proyección lineal con un resultado de  $R^2 = 0,9741$  y mediante una proyección polinomial con un resultado de  $R^2 = 1$  con lo cual se estable una aproximación más exacta para la proyección polinomial, con la cual se determinó la ecuación que permitió establecer el valor aproximado de degradación de HTP proyectado.

Figura 15. Proyección lineal de tratamiento No. 6



Fuente: elaboración propia.

Figura 16. Proyección polinomial de tratamiento No. 6



Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la gráfica anterior la proyección polinomial es la que más se adecua a la tendencia de los datos anteriores, se estableció la ecuación igual a:

$$\text{HTP} = -6\,219,1x^3 + 45\,919x^2 - 123\,440x + 264\,048$$

Donde x queda establecida como la cantidad de días en tratamiento, la cual para una proyección de 100 días dio como resultado un valor de 17 435,50 mg/kg valor con el cual se alcanza a cumplir con el límite permisible, necesario para cumplir con la normativa de referencia.

#### 4.5. Condiciones climáticas

Según datos del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología de Bolivia, en la región de Yotala del departamento de Sucre, en donde se llevó a cabo la fase experimental de este proyecto, las condiciones ambientales durante los meses de abril a julio fueron las siguientes:

Tabla IX. **Condiciones climáticas de la región de Yotala**

Mes	Temperatura °c		Precipitación (mm)	Horas Sol	Velocidad Km/h	
	minima	maxima			Media	Maxima
<b>Abril</b>	5	27	12,5	8	2	6
<b>Mayo</b>	-3	29	1,6	9,4	2	8
<b>Junio</b>	-2	30	0,4	9	1	8
<b>Julio</b>	-5,3	30	0	9,3	2	8
<b>PROMEDIO</b>	<b>-1,325</b>	<b>29</b>	<b>3,625</b>	<b>8,925</b>	<b>1,75</b>	<b>7,5</b>

Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología de Bolivia.

Las marcadas diferencias de temperaturas durante los días de experimentación entre los meses de abril a julio, muestran la adaptación de los microorganismos presentes en el inoculo, a las adversas condiciones climáticas de la región ya que estas no impidieron su crecimiento ni su capacidad para la degradación.



## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Durante la presente investigación se evaluaron las diferentes variables, que determinan las condiciones del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, con el objetivo de hacer evidente el proceso de biorremediación, logrando alcanzar los parámetros de sanidad que caracterizan a un suelo sano, determinando mediante los diferentes análisis, el tratamiento más eficiente en la degradación de hidrocarburos de petróleo y por ende en la recuperación de los suelos contaminados, aplicando una metodología *ex situ* como estudio de factibilidad previo a una aplicación en campo.

Se presentan las gráficas del proceso de biorremediación a los 0, 20, 40, 60 y 80 días en cada uno de los tratamientos, mediante graficas de barras; las que permiten comparar la diferencia significativas entre un tratamiento y otro y cada uno de estos con el blanco o testigo, en cuanto a los parámetros de pH, humedad, recuento de colonias en placa e hidrocarburos totales de petróleo. Haciendo evidente la predominancia del tratamiento 6 como el tratamiento más eficiente en la degradación de HTP, el desarrollo microbiológico y en la estabilización de sus parámetros de sanidad.

Mediante el análisis estadístico de ANOVA de dos factores y una comparación de medias de Tukey, se determinaron las medias significativas al resto de los tratamientos en investigación. Siendo el tratamiento 6 el que presentó los resultados más eficientes en cuanto a la degradación de HTP con un 40,67% de eficiencia en 80 días de tratamiento, mientras que el tratamiento blanco alcanzó solamente un 5.22% de degradación de HTP durante el mismo tiempo.

En el tratamiento 6 calificado como el más eficiente, se aplicó el inóculo bacteriano y a estos microorganismos se les proporcionaron las condiciones óptimas tanto del medio (humedad, temperatura, pH, aireación y sustrato) como de nutrientes (fósforo y nitrógeno) y carbono presente en el suelo contaminado, como única fuente de energía, metabolizándolos y logrando así la completa degradación de HTP. Con un 75 % de suelo contaminado y un 25 % de sustrato, en este tratamiento se alcanzó un alto índice de degradación en un tiempo relativamente corto.

Al contrario del tratamiento blanco con un 100 % de suelo contaminado tal y como fue extraído del punto de muestreo y al cual no se le agregó nada durante todo el tiempo de tratamiento, evaluando así únicamente el potencial de degradación de los pocos microorganismos autóctonos presentes, sin recibir ningún estímulo; por lo que fue evidente el bajo índice de degradación.

Lo antes expuesto nos demuestra la importancia de la biorremediación, ya que mediante esta se logra reducir el tiempo de degradación de los suelos contaminados con hidrocarburos, siendo esto sumamente importante para garantizar la eficiencia de cualquier proyecto de descontaminación; los cuales por el contrario, al no ser sometidos a ningún proceso de biorremediación, tardarían demasiado tiempo en degradar los HTP presentes, siendo esto una fuente potencial de riesgo de contaminación latente a largo plazo, por su alto contenido de tóxicos.

Con relación al límite permisible establecido por el Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas, el cual es  $<40\ 000$  mg/kg para suelos de uso industrial; en comparación con los datos de degradación de HTP durante los 80 días de tratamiento, no se logró alcanzar dicho valor, por lo que se realizó una proyección polinomial, mediante la cual para una proyección de 100

días en el tratamiento 6 se obtuvo un valor de 17 435,50 mg/kg con el cual se alcanza a cumplir con el límite permisible, necesario para cumplir con la normativa de referencia.

Mediante los resultados obtenidos se hizo notable la capacidad de algunos microorganismos en la degradación de HTP, entre ellos se incluyen *Pseudomonas*, *Actinomicetes*, bacterias, levaduras y mohos; siendo necesario el uso combinado de especies degradadoras, debido a la mezcla compleja que representan las muestras de suelo contaminado extraídas de la refinería.

La eficiencia del proceso de biorremediación es notable en el lapso de tiempo establecido, esto se debe además de proveer las condiciones adecuadas de desarrollo, a que las cepas bacterianas del inóculo bacteriano aplicado son autóctonas, por ello están adaptadas a las condiciones del ambiente.



## CONCLUSIONES

1. Según los resultados obtenidos fue viable el desarrollo del presente proyecto de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante bioaumentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas.
2. El tratamiento más eficiente en el proceso de biorremediación, aplicado en suelos caracterizados como franco arcillosos y a una temperatura mínima de -1,33 °C y máxima de 29 °C, es el tratamiento 6 con un 75 % suelo contaminado, 25 % sustrato, 1 g/l de nutrientes, aireación y 100ml de inóculo bacteriano aplicado semanalmente.
3. En los tratamientos con mayor cantidad de suelo contaminado, se obtuvo mayor desarrollo bacteriano y por ende mayor degradación de HTP, esto debido a que la elevada concentración de hidrocarburos, provee a algunas bacterias como las *pseudomonas* de la concentración de carbono necesarias para su metabolismo, que también dependen en gran medida de la concentración de nutrientes
4. Los tratamientos con mayor concentración de nutrientes e inóculo presentaron mayor degradación de HTP, esto debido a que la concentración adecuada de nutrientes constituyen un factor limitante en la estimulación del metabolismo bacteriano, que como resultado acelerar el proceso de degradación de HTP.

5. El crecimiento bacteriano limita la degradación de HTP, ya que se obtuvo una concentración bacteriana inicial de 420 000 UFC/g y después de los 80 días de tratamiento se alcanzó 10 400 000 UFC/g (caracterización tratamiento 6) lo que determina que a mayor presencia de microorganismos hay mayor porcentaje de degradación de contaminante.
6. El uso de cepas bacterianas autóctonas hizo más eficiente el proceso de biorremediación, ya que los microorganismos adaptados a su medio original, alcanzan un mayor desarrollo en menos tiempo.
7. Los resultados obtenidos en la evaluación de la atenuación natural (blanco) reflejan que la degradación de hidrocarburos por esta técnica requieren de un tiempo de biorremediación mucho mayor, mediante el cual no es posible apreciar resultados positivos ya que al compararlo con los demás tratamientos, alcanzando una eficiencia únicamente del 5,22 % a los 80 días de tratamiento, mientras que durante este mismo tiempo, el tratamiento 6 alcanzó una eficiencia del 40,67 %.

## RECOMENDACIONES

1. Hacer siempre una prueba de biorremediación a nivel de laboratorio, antes de ser utilizada en campo. Ya que es la forma adecuada de asegurar la eficiencia y optimizar un proceso de biorremediación, evitando gastos innecesarios.
2. Es importante aplicar las concentraciones adecuadas de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en el suelo, ya que una aplicación deficiente limita la capacidad de desarrollo de los microorganismos y un excedente restringe su capacidad de degradar los contaminantes.
3. El contenido de humedad debe ser óptimo para el desarrollo de los microorganismos, ya que una excesiva humedad en el suelo restringe el movimiento del aire del subsuelo, reduciendo la disponibilidad de oxígeno.
4. La manipulación de las cepas bacterianas autóctonas, debe hacerse con todas las normas de seguridad e higiene establecidas en un laboratorio de microbiología, ya que los medios son altamente susceptibles a ser contaminados.
5. Es de suma importancia continuar investigando los diversos procesos de biorremediación, a manera de lograr la optimización de los mismos y contribuir a la disminución del riesgo ambiental y por ende a la salud que presentan sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos, los cuales son evidentes en países como Bolivia con abundante explotación petrolífera.

6. Es recomendable continuar con la aplicación en campo en referencia con la presente investigación de laboratorio y así evaluar la eficiencia y factibilidad del mismo ya en condiciones *in situ*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGGARWAL, P; MEANS, J; HINCHEE, R. *Formulation of nutrient solutions for in situ biodegradation*. 1991. p. 930
2. M, Alexander. *Biodegradation and biorremediation*. San Diego : Academic Press, 1994. p. 502.
3. ARAUJO VILCHEZ, Ismenia. *Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autoctonas*. Maracaibo, Venezuela : Centro de Investigaciones del Agua (CIA), 2002. p. 780
4. BAKER. *Natural Attenuation of Aromatic Hydrocarbons*. s.l. : Groundwater Monit, Rev 7, 1987. p. 170.
5. CONTANDRIOPOULOS, A.P. *Preparar un proyecto de investigación*. Barcelona, España: SG Editores, 1991. p. 560.
6. FONTÚRBEL F. *Sinópsis de los estudios de biorremediación de petróleo realizados en suelos del lago Titikaka*. La Paz : Estrategas K. Publicaciones Integrales, 2003. p. 325.
7. DEUREN, Van. *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. San Diego : Academic Press, 1994. p. 252.

8. VIÑAS, M; SABATÉ, J; GRIFOLL, M. Solanas. Ensayos de tratabilidad en recuperacion de suelos contaminados por tecnologias de la biorremediacion. En *Revista Técnica*. Mexico, D.F, 2001. p. 78-82. núm. 59.
9. ERCOLI, E.C. *Tratamientos biológicos de lodos de refineria*. s.l. : AIDIS, 2002. p.30.
10. EWEIS, J.B; et al. *Biorremediation principles*. España : McGrawHill International Editions, 1998. p. 296.
11. FEITKENHAUER, H; MULLER, R. *Degradation of polycyclic aromatic hidrocarbons and long chain alkanes al 60-70 c by thermus and Bacillus spp. Biodegradation*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 675.
12. FLATHMAN, P; JERGER, D; EXNER, J. *Bioremediation Field Experience*. s.l. : Lewis Publisher, 1995. p. 274
13. HAGGBLOM, M; VALO, R. *Biorremediation of chlorophenol wastes in microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. 1995. New York: Young, L. Y, Cerniglia, C. E. p. 568.
14. SEMPLE, K.T; REID, B.J; FEMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with organic pollutants. En *Environmental pollution*. Canadá, 2001. p. 422. núm. 112.
15. JAMISON, R; HUDSON, J. *Biodegradation of high octanogasoline in Groundwater Dev*. New York: Ind. Microbial, 1975. p. 521

16. KREINER, I. *Tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos*. 3a ed. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002. p. 345.
17. LA GREGA, M. D; BUCKINGHAM, P.L; EVANS, J.C. *Environmental Resources Management*. 2a ed. Canadá : McGrawHill, 2001. p. 184.
18. VARNAM A, Evans. *Environmental Microbiology*. Washington: ASM Press, 2003. p. 226.
19. MADIGAN, M; Matinko, J; PARKER, J. *Biología de los Microorganismos*. 13a ed. Madrid : Prentice Hall Iberia, 2004. p. 986.
20. MAIER, R; PEPPER, I; GERBA, C. *Microorganisms and Organic Pollutants in Environmental Microbiology*. Canadá : Academic Press, 2000. p. 418.
21. MARTÍN, A. *Biodegradation and Bioremediation*. New York : Academic Press, 1994. p. 562
22. MESA, Y; LUGO, G. *Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Utilizando Lodos Residuales Domésticos Tratados*. Zulia : Universidad del Zulia, 2001. p. 215
23. LEAHY, J. G; COLWELL, R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. En *Microbiological Reviews*, 1990. p. 305-315. núm. 54
24. MOAT, A.G; FOSTER, J.W. *Microbial Physiology*. 3a ed. New York : John Wiley, 1995. p. 286.

25. NUÑEZ, R. *Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos*. La Habana, Cuba. : Universidad de La Habana, 2003. p. 233
26. RISER, Roberts. *Remediation of Petroleum Contaminated Soils*. s.l. : Lewis Publishers, 1998. p. 542.
27. SCHLEGEL, H.G. *Microbiología General*. Barcelona : Omega, 1997. p. 654.
28. SEMPLE, K.T. *Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants*. New York : Academic Press, 2001. p. 269.
29. SILVA, L.C. *Diseño razonado de muestras y captación de datos para la investigación sanitaria*. Madrid : Diaz de Santos, 2000. p. 312
30. VAN DEUREN, J; Z. Wang; J. Ledbetter. Remediation Technologies Screening Matrix. [en línea] EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>. [Consultado el: 18 de febrero de 2013.]
31. WHITE, D. *The physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. New York : Oxford University Press, 1995. p. 416
32. YOUNG, L; CERNIGLIA, C. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York : Wiley and Liss, 1995. p. 629.
33. ZIMMERMANN, F.J. *Estadística para investigadores*. Bogotá D.C., Colombia : Escuela Colombiana de Ingeniería, 2004. p. 547

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1.           **Fotografías**

Fotografía 1. **Toma de muestras en puntos de derrame**



Fuente: Ex refinería Carlos Montenegro, Sucre, Bolivia.

Fotografía 2. **Preparación de sustrato**



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 3 y 4. **Suelo contaminado (Blanco) y suelo en tratamiento**



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 5 y 6. Tratamientos dentro de cámara de biorremediación



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 7 y 8. Recuento de colonias en placa y cultivo de bacterias



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 9 y 10. *Pseudomona*, bacterias más eficientes en la degradación de hidrocarburos y adición de inóculo bacteriano - nutriente



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 11 y 12. **Análisis de porcentaje de humedad y análisis de pH**



Fuente: Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Fotografía 13 y 14. **Secado y homogenización de muestras previo a análisis de HTP con espectrofotómetro infrarrojo**



Fuente: Laboratorio de YPFB Refinación S.A. Cochabamba, Bolivia.

Fotografía 15 y 16. **Filtración y sedimentación de muestras con tetracloruro de carbono, previo a análisis**



Fuente: Laboratorio de YPFB Refinación S.A. Cochabamba, Bolivia.

Fotografía 17. Lectura de HTP por espectrofotómetro infrarrojo



Fuente: Laboratorio de YPFB Refinación S.A. Cochabamba, Bolivia.

## APÉNDICE 2. Tablas de datos originales

### Valores de porcentaje de humedad promedio

TIEMPO	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	BLANCO
0 DIAS	20,330	26,660	19,000	28,000	27,000	29,330	15,560
20 DIAS	25,320	32,460	23,660	29,860	28,850	21,660	10,730
40 DIAS	30,890	33,600	33,480	37,480	25,710	26,640	7,410
60 DIAS	33,056	45,584	35,504	38,948	42,095	46,124	9,303
80 DIAS	31,109	41,665	34,994	39,446	46,392	45,922	7,214

### Valores de pH promedio

TIEMPO	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	BLANCO
0 DIAS	7,02	6,95	7,04	7,40	7,25	7,29	5,20
20 DIAS	7,29	7,16	7,10	7,13	7,02	6,84	5,29
40 DIAS	7,22	7,73	7,52	7,21	7,14	7,11	5,36
60 DIAS	7,85	7,58	7,61	7,08	6,88	6,82	5,63
80 DIAS	8,18	7,56	7,64	7,23	7,03	7,03	5,68

**Valores de recuento de colonias en placa promedio**

TIEMPO	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	BLANCO
0 DIAS	300 000	340 000	400 000	380 000	440 000	420 000	340 000
20 DIAS	3 100 000	3 900 000	3 400 000	4 300 000	3 600 000	4 500 000	470 000
40 DIAS	3 400 000	4 100 000	3 780 000	6 100 000	5 600 000	6 400 000	650 000
60 DIAS	4 000 000	4 600 000	4 500 000	6 900 000	7 300 000	8 700 000	720 000
80 DIAS	4 200 000	5 700 000	5 400 000	7 600 000	8 200 000	10 400 000	450 000

**Comparación de crecimiento bacteriano en tratamientos igual cantidad de nutrientes e inóculo - Distinta cantidad de sustrato y suelo contaminado**

	25% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	75% Suelo contaminado
	75% sustrato	50% sustrato	25% sustrato
	1 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes
	100 ml Inoculo	100 ml Inoculo	100 ml Inoculo
	TRAT 2	TRAT 4	TRAT 6
	340 000	380 000	420 000
	3 900 000	4 300 000	4 500 000
	4 100 000	6 100 000	6 400 000
	4 600 000	6 900 000	8 700 000
	5 700 000	7 600 000	10 400 000

	25% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	75% Suelo contaminado
	75% sustrato	50% sustrato	25% sustrato
	0,5 g/l nutrientes	0,5 g/l nutrientes	0,5 g/l nutrientes
	50 ml Inoculo	50 ml Inoculo	50 ml Inoculo
	TRAT 1	TRAT 3	TRAT 5
	300 000	400 000	440 000
	3 100 000	3 400 000	3 600 000
	3 400 000	3 780 000	5 600 000
	4 000 000	4 500 000	7 300 000
	4 200 000	5 400 000	8 200 000

TIEMPO	TRAT 1	TRAT 3	TRAT 5
0 DIAS	300 000	400 000	440 000
20 DIAS	3 100 000	3 400 000	3 600 000
40 DIAS	3 400 000	3 780 000	5 600 000
60 DIAS	4 000 000	4 500 000	7 300 000
80 DIAS	4 200 000	5 400 000	8 200 000

**Comparación de crecimiento bacteriano en tratamientos con igual cantidad de sustrato y suelo contaminado - Distinta cantidad de nutriente e inóculo**

TIEMPO	25% Suelo contaminado			50% Suelo contaminado			75% Suelo contaminado		
	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6			
0 DIAS	300 000	340 000	400 000	380 000	440 000	420 000			
20 DIAS	3 100 000	3 900 000	3 400 000	4 300 000	3 600 000	4 500 000			
40 DIAS	3 400 000	4 100 000	3 780 000	6 100 000	5 600 000	6 400 000			
60 DIAS	4 000 000	4 600 000	4 500 000	6 900 000	7 300 000	8 700 000			
80 DIAS	4 200 000	5 700 000	5 400 000	7 600 000	8 200 000	10 400 000			

**Valores de hidrocarburos totales promedio, análisis por  
espectrofotometría infrarroja**

TIEMPO	BLANCO	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4	TRAT. 5	TRAT. 6
M1 20 DIAS	181 875,01	173 769,68	177 035,60	170 579,46	170 276,66	179 904,10	180 306,93
M2 40 DIAS	168 981,65	153 687,52	150 362,12	155 477,28	159 692,16	146 831,24	151 089,38
M3 60 DIAS	167 270,29	147 025,90	146 674,43	150 451,34	149 440,20	144 787,34	139 080,09
M4 80 DIAS	166 378,10	143 987,08	139 888,46	141 502,50	132 829,42	138 350,13	106 964,31

**Comparación degradación de Hidrocarburos Totales de Petr6leo (HTP)  
igual cantidad de nutrientes e Inoculo - Distinta cantidad de sustrato y  
suelo contaminado**

	25% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	75% Suelo contaminado
	75% sustrato	50% sustrato	25% sustrato
	1 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes
	100 ml Inoculo	100 ml Inoculo	100 ml Inoculo
	<b>TRAT 2</b>	<b>TRAT 4</b>	<b>TRAT 6</b>
<b>M1 20</b> <b>DIAS</b>	177 035,6039	170 276,6624	180 306,9316
<b>M2 40</b> <b>DIAS</b>	150 362,1171	159 692,16	151 089,3792
<b>M3 60</b> <b>DIAS</b>	146 674,4385	149 440,1974	139 080,0918
<b>M4 80</b> <b>DIAS</b>	1398 88,4612	132 829,4227	106 964,3052

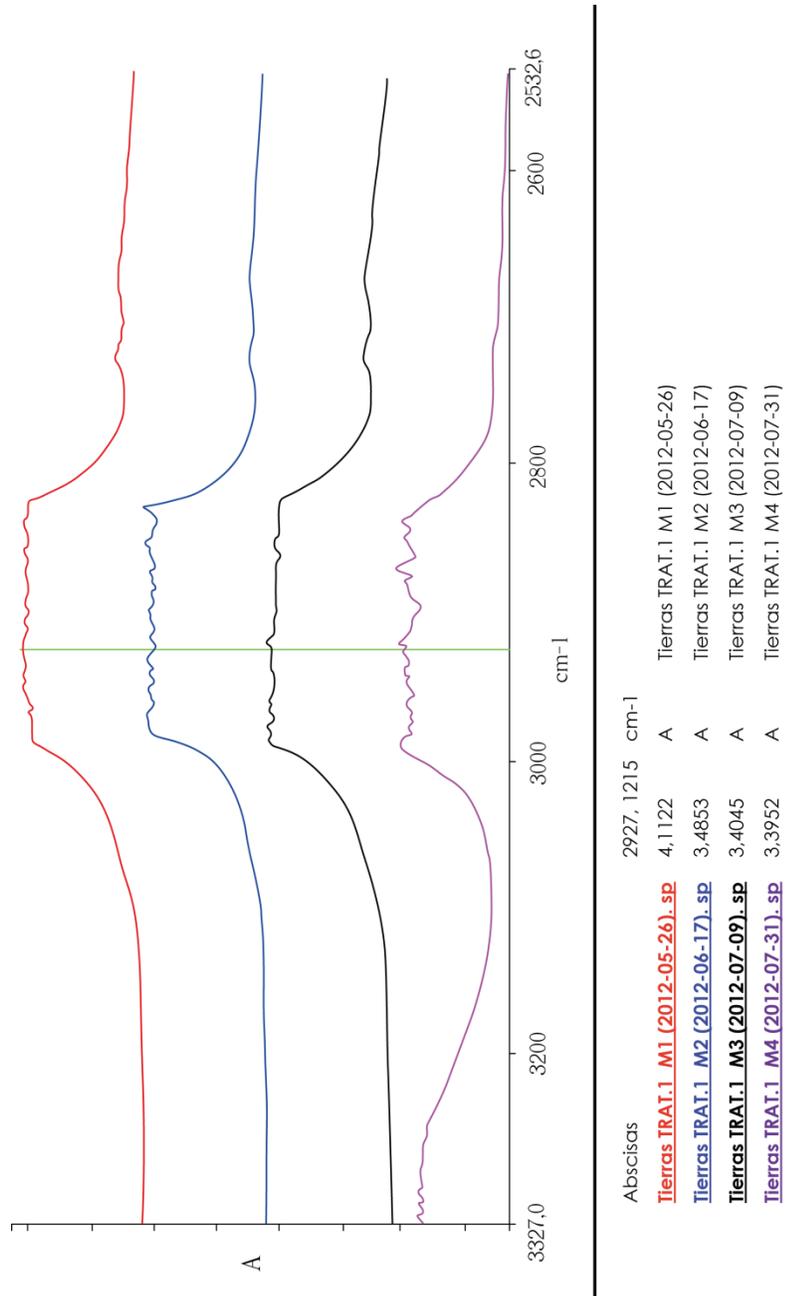
	25% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	75% Suelo contaminado
	75% sustrato	50% sustrato	25% sustrato
	0,5 g/l nutrientes	0,5 g/l nutrientes	0,5 g/l nutrientes
	50 ml Inoculo	50 ml Inoculo	50 ml Inoculo
	<b>TRAT 1</b>	<b>TRAT 3</b>	<b>TRAT 5</b>
<b>M1 20</b> <b>DIAS</b>	173 769,6834	170 579,463	179 904,0987
<b>M2 40</b> <b>DIAS</b>	153 687,5163	155 477,284	146 831,246
<b>M3 60</b> <b>DIAS</b>	147 025,9035	150 451,3351	144 787,3421
<b>M4 80</b> <b>DIAS</b>	143 987,0834	141 502,4965	138 350,1261

**Comparación degradación de Hidrocarburos Totales de Petrolero (HTP)  
 igual cantidad de sustrato y suelo contaminado - Distinta cantidad de  
 nutriente e inóculo**

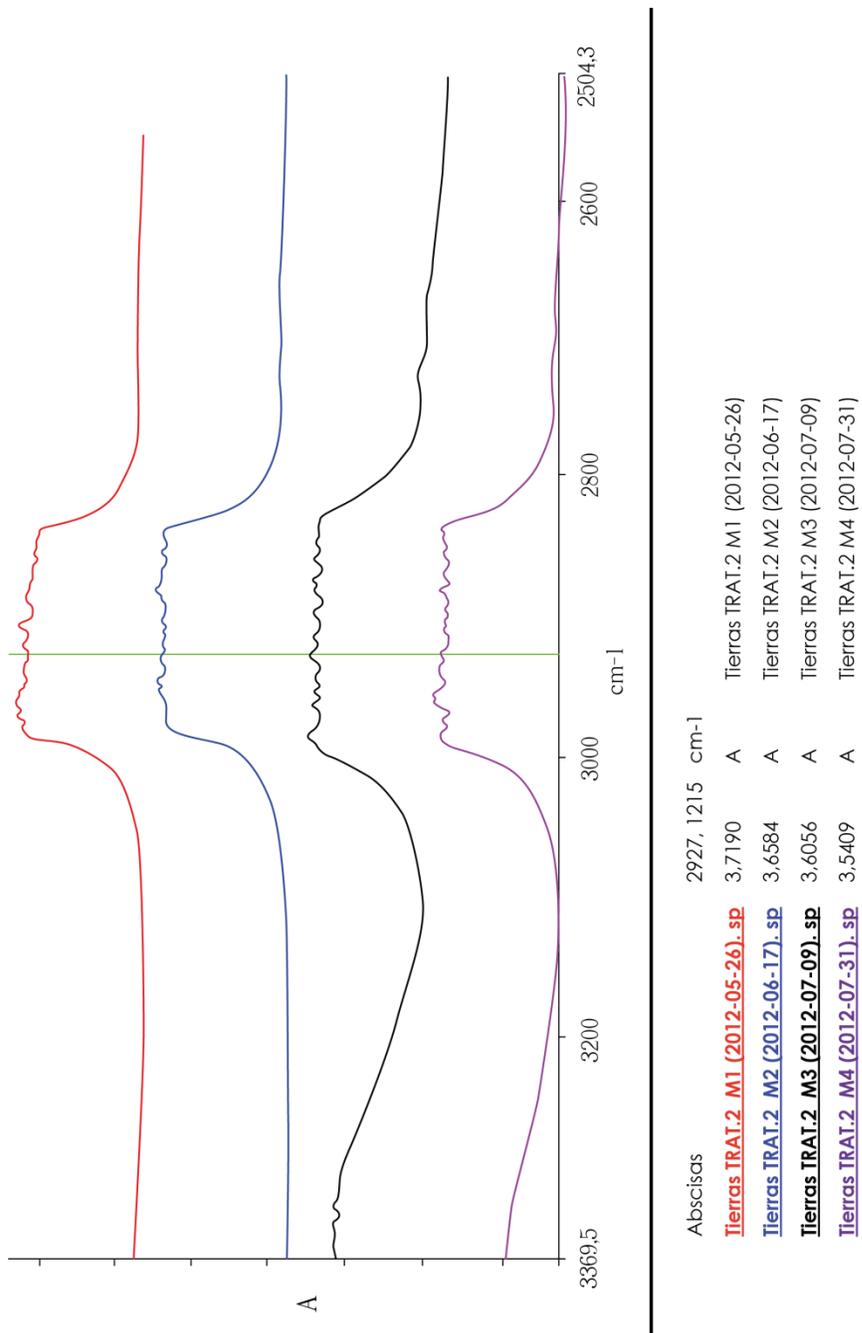
	25% Suelo contaminado	25% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	50% Suelo contaminado	75% Suelo contaminado
	75% sustrato	75% sustrato	50% sustrato	50% sustrato	25% sustrato
	0,5 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes	0,5 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes	1 g/l nutrientes
	50 ml Inoculo	100 ml Inoculo	50 ml Inoculo	100 ml Inoculo	100 ml Inoculo
	<b>TRAT 1</b>	<b>TRAT 2</b>	<b>TRAT 3</b>	<b>TRAT 4</b>	<b>TRAT 6</b>
<b>TIEMPO</b>					
<b>M1 20</b>					
<b>DIAS</b>	173 769,6834	177 035,6039	170 579,463	170 276,6624	180 306,9316
<b>M2 40</b>					
<b>DIAS</b>	153 687,5163	150 362,1171	155 477,284	159 692,16	151 089,3792
<b>M3 60</b>					
<b>DIAS</b>	147 025,9035	146 674,4385	150 451,3351	149 440,1974	139 080,0918
<b>M4 80</b>					
<b>DIAS</b>	143 987,0834	139 888,4612	141 502,4965	132 829,4227	106 964,3052

### APÉNDICE 3. Espectro fotogramas de análisis de hidrocarburos totales de petróleo

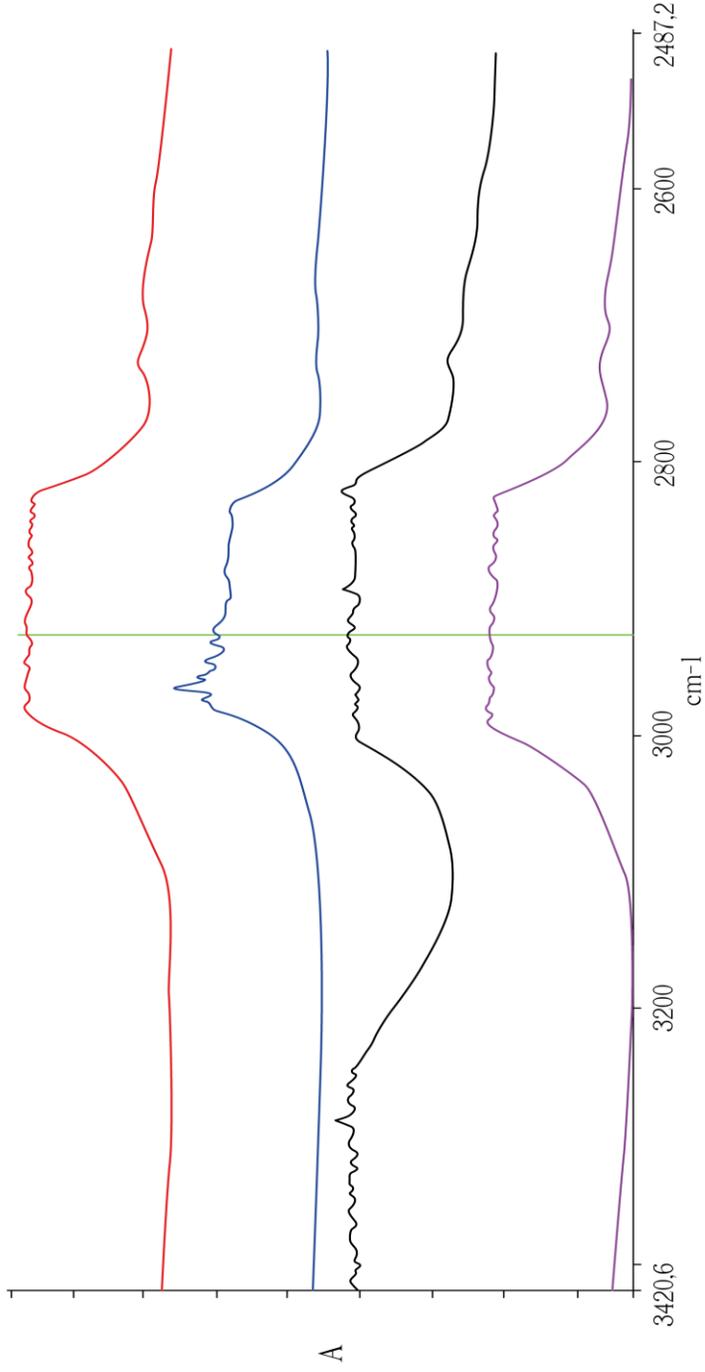
Espectro fotograma del tratamiento 1 de los 4 muestreos



## Espectro fotograma del Tratamiento 2 de los 4 muestreos

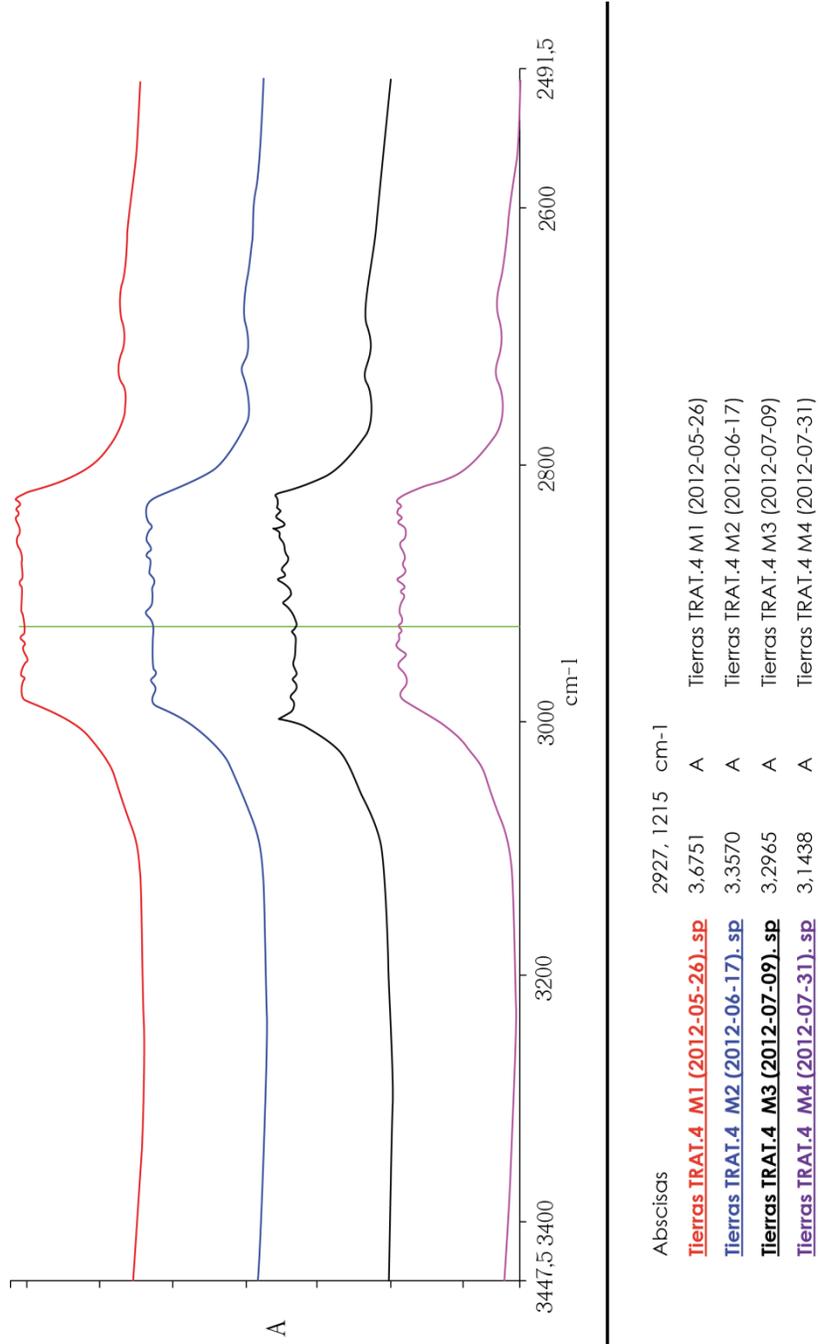


## Espectro fotograma del tratamiento 3 de los 4 muestreos

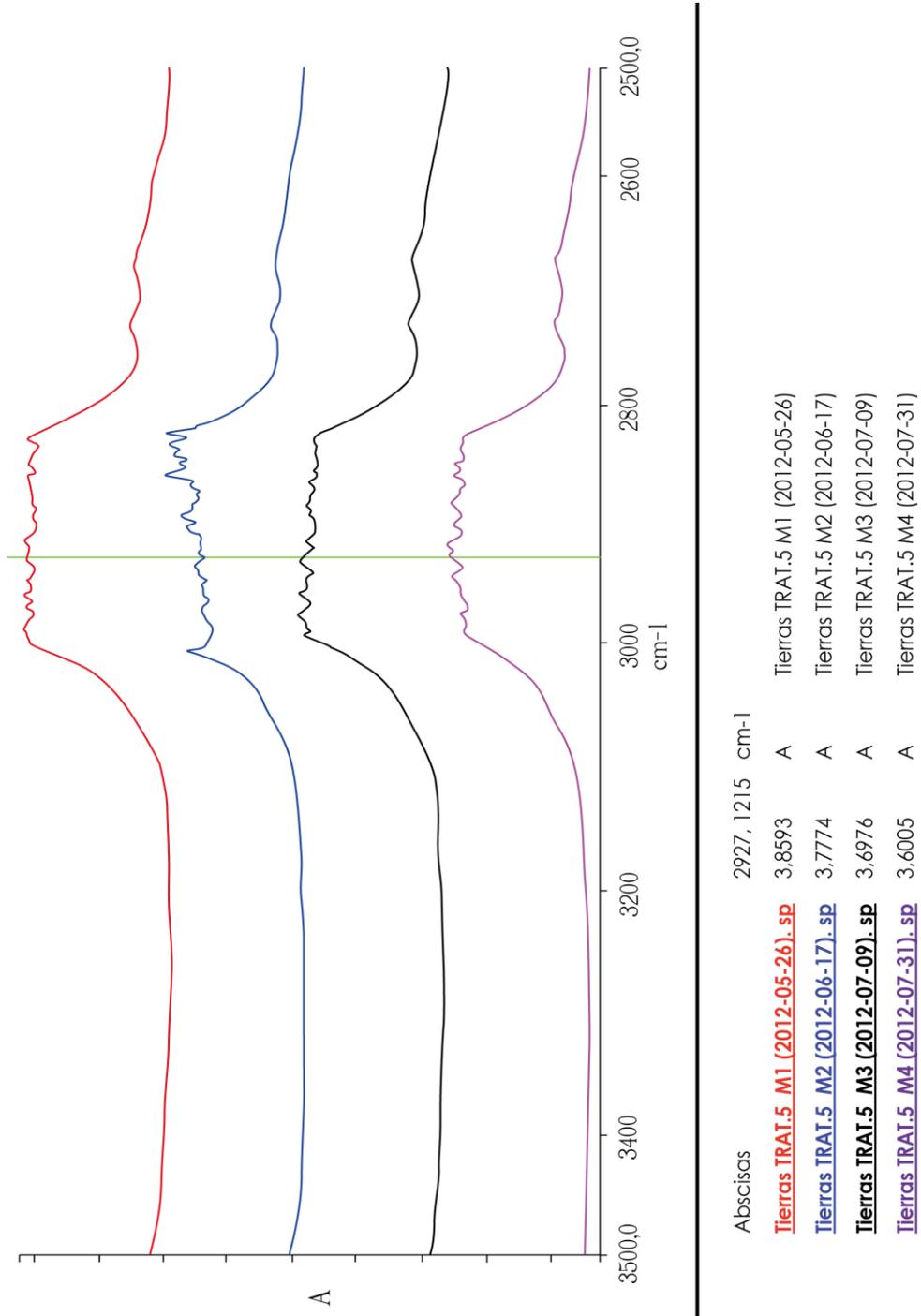


Abscisas	2927, 1215	cm-1
<a href="#">Tierras TRAT.3 M1 (2012-05-26).sp</a>	3,6171	A
<a href="#">Tierras TRAT.3 M2 (2012-06-17).sp</a>	3,5405	A
<a href="#">Tierras TRAT.3 M3 (2012-07-09).sp</a>	3,4353	A
<a href="#">Tierras TRAT.3 M4 (2012-07-31).sp</a>	3,3470	A

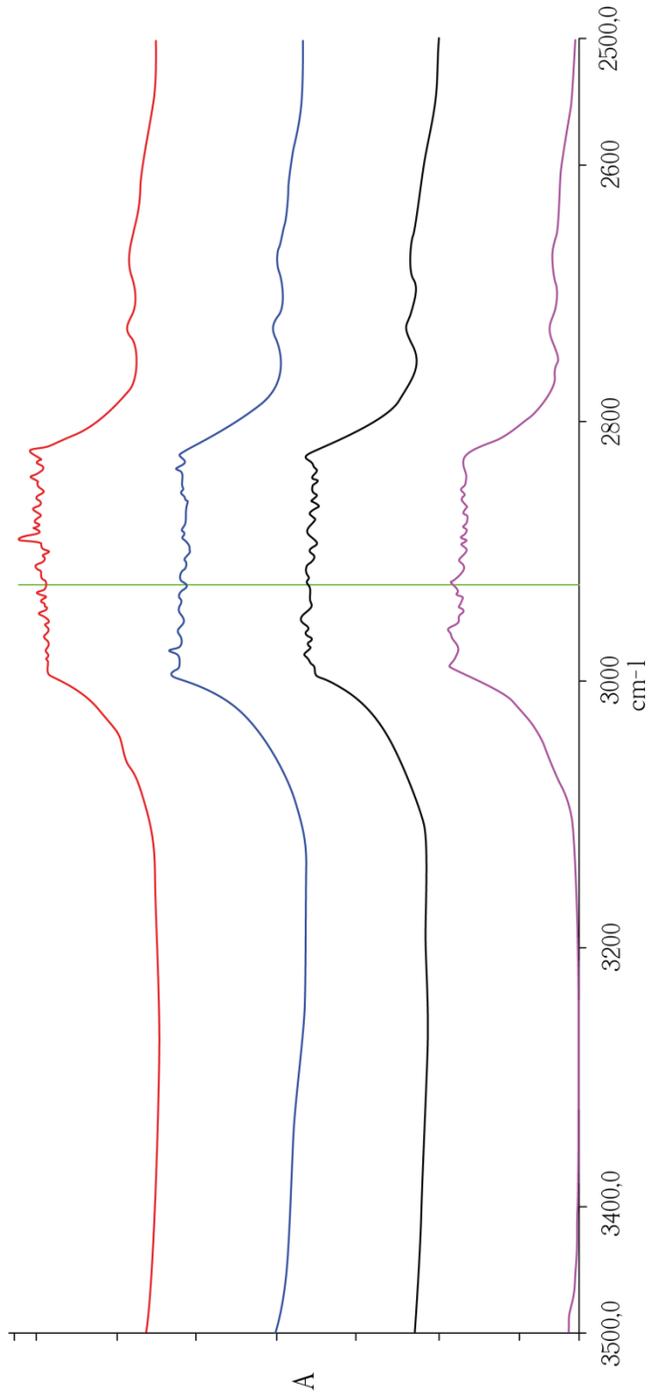
## Espectro fotograma del tratamiento 4 de los 4 muestreos



## Espectro fotograma del Tratamiento 5 de los 4 muestreos

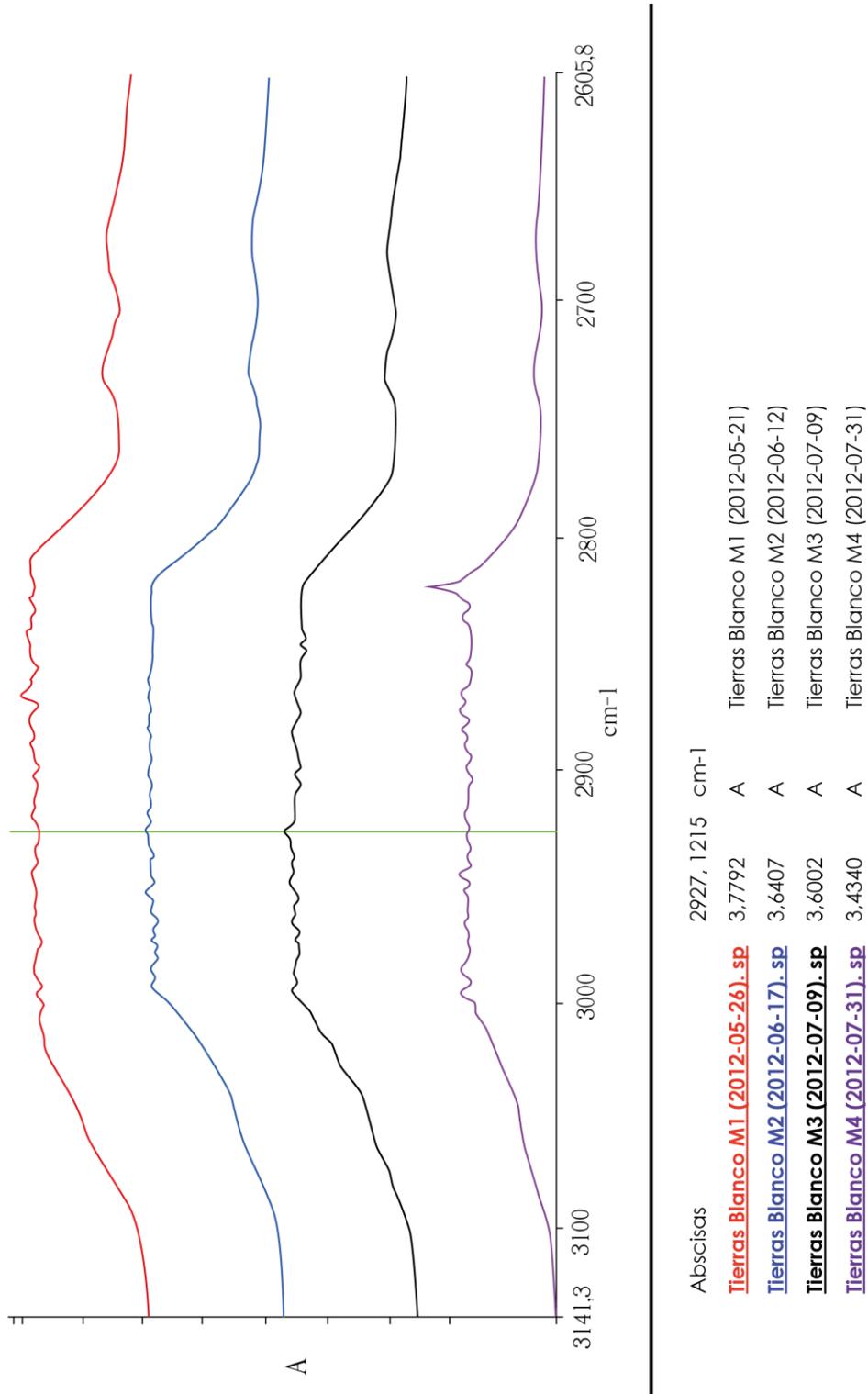


## Espectro fotograma del tratamiento 6 de los 4 muestreos



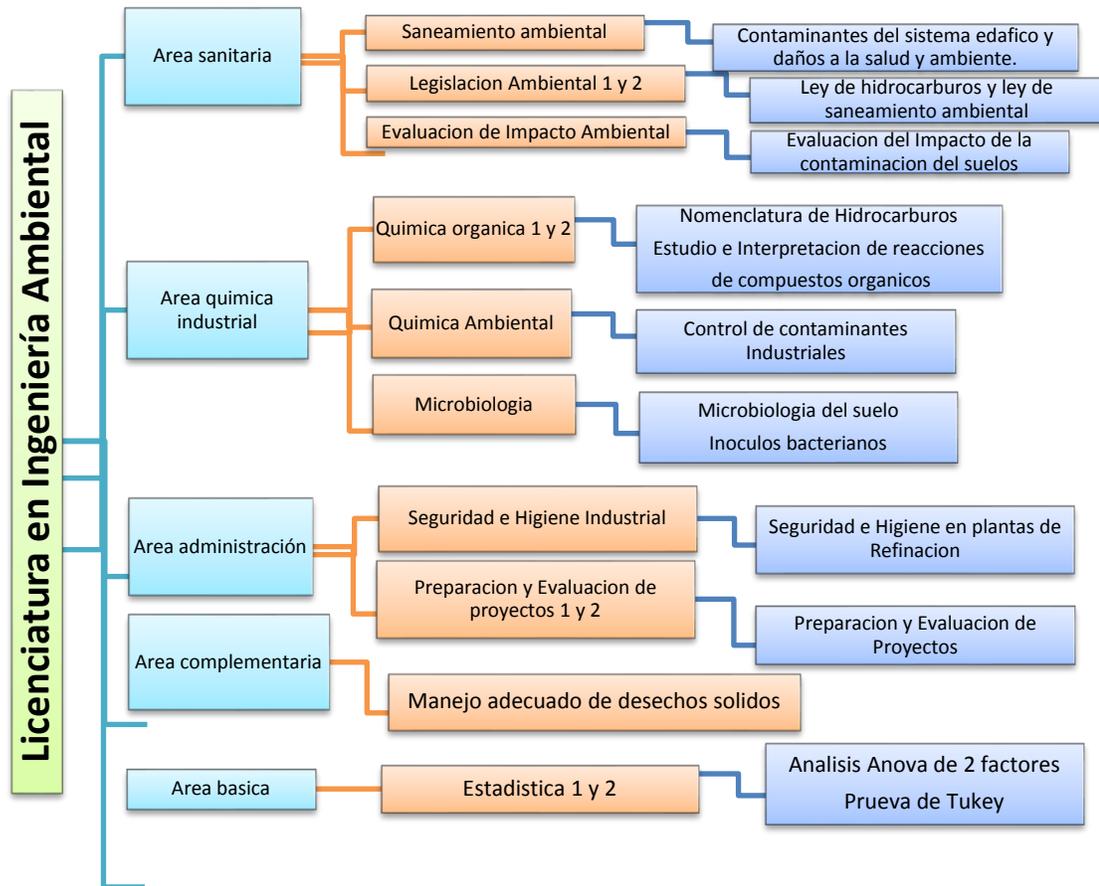
Abscisas	2927, 1215	cm-1
<a href="#">Tierras TRAT.6 M1 (2012-05-26).sp</a>	3,7337	A
<a href="#">Tierras TRAT.6 M2 (2012-06-17).sp</a>	3,7187	A
<a href="#">Tierras TRAT.6 M3 (2012-07-09).sp</a>	3,4962	A
<a href="#">Tierras TRAT.6 M4 (2012-07-31).sp</a>	3,4024	A

## Espectro fotograma del tratamiento blanco de los 4 muestreos



## APÉNDICE 4.

## Requisitos Académicos



## APÉNDICE 5. Árbol de problemas

