



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

Carrera de Ingeniería en Gestión Ambiental

**“Tratamiento de fondos de tanques de
petróleo usando el método de
biorremediación”**

Tesis previa a la obtención del
Título de Ingeniero en Gestión
Ambiental

Autor: Guido Humberto Abad Vásquez

Directora: Indira Black Solís

Loja – Ecuador
2008

Loja, febrero de 2008

Bióloga.
Indira Black Solís
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo denominado: **“Tratamiento de fondos de tanques de petróleo usando el método de biorremediación”**, realizado por el Egresado Guido Abad Vásquez; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto del aspecto de forma, como de contenido; por lo cual me permito autorizar su presentación.

Indira Black Solís
DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Las ideas, criterios, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidas en la presente investigación, son de exclusiva responsabilidad del autor.

Guido Abad Vásquez
170738163-6

AUTOR

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Guido Humberto Abad Vásquez, declaro conocer y aceptar la disposición del Art.67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja, que es u parte pertinente textualmente dice "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

Guido Humberto Abad Vásquez

DEDICATORIA

Con amor incondicional, dedico esta tesis a mi querida esposa Gladys Sofía a mis hijas Dianita, Andreita y a mi primer nieto Andrés, que me han motivado durante el transcurso de mis estudios y son fuente de inspiración en mi vida.

Además dedico este trabajo a mi queridísima UTPL, que me ha permitido conseguir una hermosa carrera y me ha inculcado los valores morales y éticos más altos en beneficio de la biodiversidad del Ecuador y el mundo.

Guido

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios y a la Santísima Virgen de las Lajas, por haberme guiado con su luz durante este largo y difícil camino.

Al mismo tiempo agradezco a mi familia, quienes me han brindado su tiempo y su cálido cariño para motivarme en aquellas largas jornadas de estudio.

A la Universidad Particular de Loja por permitirme hacer de mi sueño una realidad.

A mi Directora de Tesis la Blga. Indira Black Solís a quién tanto admiro y respeto, por escuchar mis inquietudes y saberlas resolver de la mejor manera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Certificación	II
Autoría	III
Cesión de Derechos	IV
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenidos	VII
Índice de cuadros	XI
Índice de figuras	XII
Índice de tablas	XIV
Resumen	XV

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	
2.1	Objetivos Generales	5
2.2	Objetivos Específicos	5
3.	HIPÓTESIS	6
4.	MARCO TEÓRICO	7
4.2	Métodos de biorremediación para suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos	8
4.2.1	Fundamento bioquímico de la Biodegradación	9
4.2.2	Necesidad de nutrientes	10
4.2.3	Potencial hidrógeno (pH) del suelo	10
4.2.4	Temperatura	11
4.2.5	Humedad	11
4.2.6	Estructura química del hidrocarburo	11
4.2.7	Factores que determinan la eficiencia de la técnica	12

4.2.7.1	Bioventing o inyección de aire	12
4.2.7.2	Biopilas	13
4.2.7.3	Atenuación natural	14
4.2.8	Diseño y aplicación de sistemas de biotratamiento	16
	Fase de investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento	17
	Análisis y elección de las medidas biocorrectivas	17
4.2.8.3	Diseño y evaluación del sistema	18
4.2.8.4	Evaluación de la viabilidad de la técnica	18
4.2.8.5	Evaluación del diseño	19
4.2.8.6	Evaluación del control y seguimiento	19
4.2.8.7	Análisis e interpretación de resultados	19
4.3	Remediación biológica	20
4.3.1	Biorremediación	20
4.3.1.1	Bioestimulación	21
4.3.1.2	Bioaireación	21
4.3.1.3	Bioaugmentación	21
4.3.1.4	Compostaje	21
4.3.1.5	Fitorremediación	21
4.3.1.6	Landfarming	22
4.3.2	Factores que influyen en la Biorremediación	22
4.3.2.1	El proceso de infiltración in-situ	22
4.4	Biorremediación de residuos de Petróleo	24
4.4.1	Diversidad microbiana en ambientes contaminados	25

4.4.2	Importancia del pool microbiano	27
4.5	Los Hidrocarburoclásticos	30
4.5.1	Tratamiento in situ	32
4.5.2	Potencial de biodegradación	33
4.5.3	Cultivo de microorganismos	33
4.5.4	Oxigenación	33
4.5.4.1	Oxigenación mecánica	33
4.5.4..2	Oxigenación natural	34
5	METODOLOGÍA	35
5.1	Descripción del sitio de trabajo	35
5.2	Análisis de laboratorio	37
5.3	Caracterización físico química del residuo de tanques	37
5.3.1	Finger print	37
5.3.2	Caracterización físico química del sustrato	39
5.3.3	Hidrocarburos totales del petróleo	40
5.3.4	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	40
5.3.5	Metales pesados	40
5.3.6	Población bacteriana	41
5.3.7	Potencial hidrógeno (pH)	41
5.3.8	Macronutrientes	41
5.4	Diseño experimental	42
5.5	Descripción de los Módulos para siembra	45
5.6	Descripción de los tipos de reactores	46
6	RESULTADOS	47
6.1	Descripción de tipos de Reactores	47
6.1.1	Reactor con techo a dos aguas plano y piscina horizontal	47

6.1.2	Reactor con techo semicircular	50
6.2	Caracterización físico-química original	54
6.3	Caracterización bacteriana	55
6.3.1	Respuesta de las bacterias a los contaminantes	57
6.4	Preparación de cubículos	59
6.5	Análisis de Resultados	63
6.5.1	Hidrocarburos totales	65
6.5.2	Metales pesados	67
6.5.3	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	69
6.5.4	Población Bacteriana	70
6.5.5	Macronutrientes	73
6.5.6	Temperatura	79
6.5.7	Potencial de hidrógeno (pH)	80
7	CONCLUSIONES	83
8.	RECOMENDACIONES	85
9.	BIBLIOGRAFIA	88
10.	ANEXOS	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1	Capacidad de biodegradación de los hidrocarburos	31
Cuadro No. 2	Caracterización de fondos de tanque, Sustratos y suelo	54
Cuadro No. 3	Caracterización de bacterias presentes en el Biol, suelo y plantas de aguas grises y negras	55
Cuadro No. 4	Variación del contenido de TPH en los blancos	64
Cuadro No. 5	Variación del contenido de TPH en las celdas de experimentación	65
Cuadro No. 6	Concentración de las colonias de bacterias en los tratamientos	71
Cuadro No. 7	Concentración de nitrógeno en los tratamientos	74
Cuadro No. 8	Concentración de potasio en los tratamientos	76
Cuadro No. 9	Concentración del fósforo en los tratamientos	78
Cuadro No. 10	Variación de la temperatura en los reactores y tratamientos	79
Cuadro No. 11	Variación del pH a lo largo del tiempo en los tratamientos y reactores	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Mapa de ubicación del relleno sanitario	36
Fig. 2	Disposición de las celdas en forma aleatoria	44
Fig. 3	Corte en planta de los módulos para siembra	46
Fig. 4	Plano del reactor con techo triangular y Corte de la piscina	48
Fig. 5	Vista interior y superficie de trabajo del reactor con techo triangular	50
Fig. 6	Vista interior y superficie de trabajo del reactor con techo semicircular	51
Fig. 7	Vista exterior lateral del reactor con techo semicircular	51
Fig. 8	Plano del reactor con techo semicircular y Corte de la piscina	52
Fig. 9	Vista interior y superficie de trabajo del reactor con techo semicircular	53
Fig. 10	<i>Pseudomona Aeruginosa</i>	58
Fig. 11	<i>Bacillus cereus</i>	58
Fig. 12	<i>Serratia Rubidae</i>	59
Fig. 13	Vista de los fondos de tanques colocados en Una piscina impermeabilizada antes de ser mezclados con los tratamientos	59
Fig. 14	Mezclado de los fondos de tanques con nutrientes y material absorbente	60
Fig. 15	Vista de las celdas de cultivo y disposición de los tratamientos BT1, BT2, BT3 y blanco, en reactores semicirculares	61

Fig. 16 Vista de las celdas de cultivo y disposición de los tratamientos AT1, AT2, AT3 y blanco, en los reactores con techo triangular, después de tres meses de haber iniciado el proceso

62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1	Exposición de las bacterias obtenidas en la Caracterización inicial a diferentes contaminantes para verificar las cepas más viables	57
Tabla No. 2	Variación del contenido de TPH en las celdas De tratamientos dispuestos en los dos tipos de Reactores, se muestran datos iniciales y finales	63
Tabla No. 3	Concentración de metales pesados en cada Tratamiento	67
Tabla No. 4	Variación de la población bacteriana en los Tratamientos	70
Tabla No. 5	Variación del nitrógeno en los tratamientos	73
Tabla No. 6	Variación del potasio en los tratamientos	75
Tabla No. 7	Variación del fósforo en los tratamientos	77
Tabla No. 8	Promedio mensual de la temperatura en los meses más calientes agosto y septiembre en los reactores y tratamientos	79
Tabla No. 9	Promedio mensual del potencial de hidrógeno	80

RESUMEN

Durante los 40 años de exploración y extracción de petróleo en el país, el problema de los fondos de tanques se han convertido en un problema crítico para las empresas petroleras, ya que es un residuo que no se puede disponer en el suelo, no se puede botar en el agua, no se puede reinyectar en arenas profundas, tienen alto contenido de hidrocarburos aromáticos, metales pesados y residuos de químicos. La alternativa más fácil por la cual optaron varias empresas entre ellas Texaco, fue almacenarlos en piscinas sin impermeabilización; quedando al final de la operación un pasivo ambiental inmenso, dispersos por la selva, contaminando el agua y el suelo de zonas pobladas.

La Ley de Hidrocarburos aparece sistematizada con parámetros para disposición de suelos contaminados en el Reglamento Sustitutivo expedido con el decreto ejecutivo 1215 publicado el 13 de febrero del 2003.

Este trabajo investigativo experimental realizado en el Bloque 15, pretende demostrar que los fondos de tanques pueden degradarse hasta alcanzar parámetros de legales, a través de una técnica de biorremediación. Para desarrollarlo se probó el método con seis tratamientos y tres replicas (AT1, BT1, AT2, BT2, AT3 y BT3):

A lo largo de seis meses de seguimiento se controló los factores físicos y biológicos en campo y en Quito con la asistencia de los laboratorios GRUNTEC y Q-MAX. Se analizaron: los nutrientes, la concentración de los contaminantes y la población bacteriana, también se aislaron las cepas de bacterias que generaron la biorremediación. Se comprobó que el tratamiento BT3 llevado a cabo en un reactor de techo circular fue el más efectivo.

1. INTRODUCCIÓN

En una industria petrolera típica, durante la fase de procesado del petróleo que consiste en separar el crudo, del agua de formación, gas y arena, mediante procesos físicos y químicos, se produce anualmente en un tanque con capacidad para 10000 barriles, unos 400 barriles de sedimentos, conocidos como fondos de tanques, que son el objetivo de nuestra problemática. Dpto. de Operaciones Bloque 15

Estos residuos por ser emulsiones son considerados en el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador como peligrosos, están catalogados con el código A4060 (Desechos de mezclas y emulsiones de aceite y agua o de hidrocarburos y agua), la ley ambiental propone como métodos de tratamiento:

Recuperación

Reutilización adecuada

Tratamiento

Las dos primeras alternativas no son viables en la práctica. No se puede rehusar o recuperar los residuos asentados en la base de los tanques petroleros porque son residuos emulsionados producto de retrolavado de tanques, líneas y separadores, contienen una gran cantidad de sólidos en suspensión, metales pesados y hidrocarburo degradado, bacterias, etc.; que si se reingresa al sistema taponarían los finos filtros que hay en el proceso de una planta petrolera, generando un proceso vicioso y repetitivo con los consecuentes incrementos en los costos por daños en las bombas y retrasos en los procesos.

La Empresa Estatal ha rehusado estos productos asentados en la base de los tanques, para mezclarlo con grava fina o lastre y luego disponer en las vías de acceso de las islas de producción y carreteras que conducen a la plantas, dando como resultado una gran cantidad de lixiviados con altos contenidos de hidrocarburos y metales pesados que al ser arrastrados por la lluvia, contaminan esteros, ríos, el suelo, vegetación y a los seres que usan, ingieren o viven en esta agua.

Teniendo este pasivo ambiental de la industria petrolera, el mismo que ha sido objeto de denuncias por parte de los pueblos indígenas y colonos de la amazonía. Sabiendo que han generado problemas de salud y afectación severa al medio biótico. Que ha generado demandas que han trascendido a nivel mundial, como es el ejemplo de los procesos judiciales que les son imputados a Texaco, empresa a la cual se le tramita indemnizaciones por más de un billón de dólares; como medida compensatoria por los daños causados a las personas y al agua primordialmente, al dejar abandonadas a la intemperie cientos de piscinas con fondos de tanques, sin impermeabilización y sin ningún tratamiento.

Siendo la producción de petróleo la principal fuente de ingresos para la nación, pero también el principal factor de contaminación por este tipo de residuos. El interés de este proyecto ha sido investigar un método alternativo de tratamiento para estos fondos de tanques, a través de un método de biorremediación de bajo costo económico y entrópico.

Los procesos que se plantean están enmarcados en parámetros de control rigurosos establecidos en el Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOH), promulgados en el Registro Oficial 1215 y los postulados de la ISO 14001 (Gestión Ambiental) y OHSAS 18001 (Gestión de la Salud Ocupacional y Seguridad Industrial).

Conveniencia: Servirá para tratar un pasivo ambiental altamente contaminante de la industria petrolera y degradarlo hasta un nivel que se pueda disponer al ambiente sin causar alteraciones o efectos adversos al medio.

Relevancia social: Desde hace 40 años estos residuos fueron colocados en agujeros hechos en la tierra, formando piscinas de 10 por 30 metros o más, en lugares no apropiados. Lo cual genera aún contaminación severa al suelo y niveles freáticos, afectando por tanto a los vecinos del área y al componente biótico que rodea estas piscinas.

Actualmente muchas empresas queman estos residuos en incineradores no apropiados o a cielo abierto generando una contaminación atmosférica importante y produciendo también contaminantes peligrosos como dioxenos y furanos, así como lluvias ácidas en la región.

La creación de este sistema de tratamiento no contaminante, usando productos orgánicos, degradables, energía renovable como es la solar, equilibrará el gasto entrópico y ayudará a resolver este problema. Pensando fundamentalmente en no afectar a los habitantes y la biodiversidad de la selva, en dar una alternativa sustentable a este negocio que produce ingentes recursos para el erario nacional

Implicaciones prácticas: resolver un problema continuo de la industria petrolera a un costo viable.

Valor teórico: Si el proceso es eficiente y eficaz se puede poner al servicio de toda la industria petrolera y además servirá para biorremediar suelos contaminados por derrames de petróleo, in situ.

Utilidad metodológica: Disponer de una alternativa de tratamiento ecológico, manteniendo un control técnico y sistemático de las variables contaminantes presentes en los residuos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

- Afinar un método para remediar mediante procesos Biológicos los residuos procedentes de los fondos de tanques de petróleo.
- Demostrar que el sustrato resultante de ésta biorremediación, puede ser utilizada para el desarrollo de especies vegetales.

2.2 Objetivos Específicos

- Diseñar infraestructura apropiada para el tratamiento biológico de residuos procedentes de los fondos de tanques de petróleo.
- Determinar si el porcentaje de hidrocarburos totales (TPH) disminuye con la adición de: bacterias fecales y absorbentes orgánicos "Spag-sorb, a más del incremento de temperatura; durante el proceso de biorremediación.
- Conocer la concentración de metales pesados y macronutrientes (establecidos en la tabla No. Seis del Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador), al inicio y al final del proceso de biorremediación.
- Conocer las bacterias que contribuyen significativamente durante el proceso de la biodegradación.
- Disminuir los parámetros de la tabla No. Seis del RAOH, hasta alcanzar los estándares establecidos para disposición de suelo contaminada en sitios de uso industrial.

3. HIPOTESIS

0 Los fondos de tanques de almacenamiento de petróleo reducen los parámetros establecidos en la tabla No. seis para suelos de uso industrial, del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOH) con la acción bacteriana.

1 Los fondos de tanques de almacenamiento de petróleo no reducen los parámetros establecido en la tabla No. seis, para suelos de uso industrial, del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOH) con la acción bacteriana.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Biorremediación

Consiste en la adición de bacterias y nutrientes como el N, P o K, a ambientes contaminados para producir una aceleración del proceso natural de biodegradación estimulando el crecimiento de microorganismos nativos.

La degradación de contaminantes a través de la biorremediación, es un proceso natural que no genera contaminación residual a otros medios como puede ser el caso de los tratamientos térmicos como la desorción térmica que pueden provocar la liberación de dioxinas, furanos y otros contaminantes peligrosos a la atmósfera, si la incineración es bajo los 400 grados Celsius. Criterios autor de la tesis G. Abad

Los suelos son sistemas dinámicos y complejos, dentro de los cuales se desarrollan numerosos procesos. En general, pueden clasificarse como químicos, físicos o biológicos, aunque no existe una división tajante entre ellos. Por ejemplo, se estima que la oxidación y la reducción son procesos químicos; sin embargo, suelen ser llevados a cabo por microorganismos. Algo semejante ocurre con la translocación de partículas minerales, ya sea en suspensión o en masa, por ciertos organismos, como sucede con la tierra. Bernard J Nebel – 1999

4.2 Métodos de biorremediación para suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos.

Las medidas biocorrectivas o los sistemas de biorremediación consisten principalmente en el uso de los microorganismos naturales (levaduras, hongos o bacterias) existentes en el medio para descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias de carácter menos tóxico o bien inocuas para el medio ambiente y la salud humana.

Las medidas biocorrectoras se llevan empleando en la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio, si se producen en condiciones aerobias (presencia de un medio oxidante), o bien de tipo anaerobio, en condiciones anaerobias (medio reductor). El presente artículo se centrará en tres tipos de medidas biocorrectoras de tipo aerobio: la ventilación forzada del aire en el suelo o bioventing, el compostaje de suelos o biopilas, y la biorrecuperación natural del suelo o atenuación natural.

Estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento.

Para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica remediativa, será necesario que existan en el medio unas condiciones físico-químicas óptimas.

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

En general se necesitará la existencia de determinadas poblaciones de microorganismos autóctonos capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente nutricional y de energía. Además será necesario un determinado número de aceptores de electrones que enzimáticamente oxide los carbonos procedentes de los hidrocarburos, así como unas condiciones adecuadas de pH, nutrientes, temperatura, humedad, textura y estructura del suelo, y concentración de los contaminantes.

El diseño de estos sistemas de tratamiento se llevará a cabo estableciendo varias etapas de trabajo:

4.2.1 Fundamento bioquímico de la biodegradación

Se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, Curtis y Barnes, 2001; se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

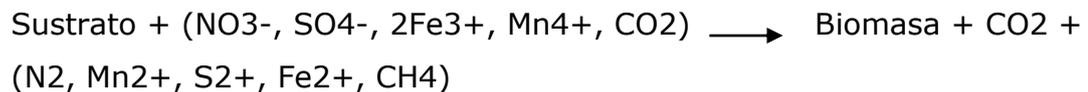
Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de

biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio.

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores:

4.2.2 Necesidad de nutrientes.- el metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización.

Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno; por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encontrasen en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

4.2.3 Potencial hidrógeno (pH) del suelo.- afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los

microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.

4.2.4 Temperatura.- generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.

4.2.5 Humedad.- los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo, El rango varía en función de la técnica.

4.2.6 Estructura química del hidrocarburo.- la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica

4.2.7 Factores que determinan la eficacia de la técnica

4.2.7.1 Bioventing o inyección de aire.

La técnica del bioventing es un tratamiento de biorrecuperación de tipo "in situ", debido a la aireación del suelo se va a favorecer la degradación de los hidrocarburos por dos motivos: por volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se van a estimular la actividad bacteriana. Los factores a tener en cuenta en la aplicación del bioventing o inyección de aire natural son:

Se degradarán más fácilmente las moléculas más pequeñas (hasta C20), siendo más fácilmente biodegradables los compuestos parafinados o de cadena lineal que los compuestos aromáticos. En general, son favorables los compuestos de alta volatilidad (presión de vapor mayor de 10 mm de Hg a 20°C).

Los suelos deben contener bajos contenidos en arcilla y ser lo más homogéneamente posible, con un valor de permeabilidad al aire adecuado ($> 10^{-10}$ cm²).

El principal problema es la biodisponibilidad de los microorganismos. Cuanto menor es la solubilidad de los contaminantes menor será la biodisponibilidad.

Los aportes de oxígeno deben ser suficientes, así como la existencia de fuentes de carbono, aceptores de electrones y energía suficientes.

No debe existir de producto libre en flotación sobre el nivel freático.

Deben existir unas condiciones óptimas de pH (6 y 8), de humedad (12-30% en peso), potencial redox mayor de -50 mV, temperatura entre 0 y 40 °C y los nutrientes del suelo en relación N: P de 10:1.

Necesidad de tiempos de actuación cortos (meses) y coste medio-alto.

4.2.7.2 Biopilas.- la técnica de biopilas es un tratamiento de biorrecuperación de tipo "ex situ" en condiciones no saturadas, consistente en la reducción de la concentración de contaminantes derivados del petróleo en suelos excavados mediante el uso de la biodegradación.

La técnica consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes.

Estas pilas de compost pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación.

En principio, las biopilas se pueden aplicar a la mayoría de los compuestos orgánicos, siendo más eficaz en los compuestos de carácter más ligero. Entre los factores que influyen en la aplicación de las biopilas destacan:

Los hidrocarburos deben ser no halogenados y deben encontrarse en el suelo en concentraciones menores a 50.000 ppm.

Dada la necesidad de excavación y posterior depósito del suelo contaminado, se requiere una superficie de trabajo relativamente grande cuyas dimensiones dependen del volumen de suelo a tratar

Necesidad de una densidad de poblaciones microbianas (>1.000 CFU/gramo de suelo), condiciones de humedad (40-85% de capacidad de campo), temperatura (10 y 45°C), textura (baja proporción de arcillas), pH del suelo adecuadas (6 y 8) y baja presencia de metales pesados (< 2.500 ppm).

La concentración de nutrientes en el suelo cuyo rango normal de C: N: P sea de 100:10:1. Que es la concentración del carbono, nitrógeno y fósforo en el humus, que es la materia orgánica que después de haberse depositado en el suelo como restos vegetales y animales, ha sufrido una transformación intensa en la que los compuestos químicos se descomponen de forma independiente, hasta que se llega a un producto más o menos resistente a las alteraciones posteriores.

Mariano Seoáñez Calvo- 1999.

El tiempo de actuación puede ser alto (meses a años) y el costo bajo.

4.2.7.3 Atenuación natural.- la atenuación natural, aunque no está considerada como una técnica de descontaminación propiamente dicha, está englobada dentro de las técnicas de remediación in situ de muy bajo coste. Su característica principal es la utilización de los procesos físico-químicos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio.

Estos procesos se conocen como procesos de biotransformación natural y son aquellos que van a reducir la concentración de los contaminantes y

entre los que se encuentran la dilución, dispersión, volatilización, adsorción, biodegradación y aquellas reacciones químicas que se producen en el suelo o en el agua y que contribuyen de alguna forma a la disminución de la contaminación. Eweis, 2000.

Esta técnica se aplica en aquellos casos en los que exista contaminación tanto en suelos como aguas subterráneas producida por hidrocarburos de tipo halogenado o no halogenado. Entre los factores que influyen en la eficacia y viabilidad de la atenuación natural destacan:

La exigencia de protección del área afectada y circundante y el riesgo de los potenciales receptores durante el tiempo que dura la atenuación.

La existencia de unas condiciones geológicas y geoquímicas favorables.

Las necesidades de reducción de la masa contaminante en un intervalo razonable de tiempo (meses a años), tanto en la superficie del suelo como en la zona más subsuperficial del mismo, así como de la calidad de las aguas subterráneas.

Confirmación de la existencia de los tipos y número de poblaciones de microorganismos que puedan biodegradar los contaminantes.

Producción y conservación en el medio de subproductos de caracteres persistentes o más tóxicos que los iniciales, durante y después de la atenuación natural.

No existencia de producto libre en flotación sobre el nivel freático.

Para condiciones aerobias la condición ambiental óptima de concentración de oxígeno disuelto en el agua debe ser superior a 0,5 mg/l.

La concentración de los compuestos utilizados como aceptores de electrones en condiciones anaerobias debe ser superior a 0,21 mg/l para nitratos, la de Fe^{3+} para que pueda ser reducido a Fe^{2+} debe ser superior a 21,8 mg/l y la de sulfatos mayor de 0,21 mg/l.

El potencial redox debe estar situado entre un rango de 400 y 800 mV.

Existencia de un coeficiente de retardo favorable para que se produzcan los fenómenos de sorción con suficiente eficacia.

Que se produzca una dilución suficiente para que la concentración se vea disminuida aguas abajo del foco contaminante.

La dispersión de los contaminantes aguas abajo del foco y en la dirección de flujo debe ser adecuada para que exista una mayor disponibilidad proporción entre los contaminantes y los aceptores de electrones.

4.2.8 Diseño y aplicación de sistemas de biotratamiento

El diseño de estos sistemas de tratamiento se llevará a cabo estableciendo varias etapas de trabajo:

- Investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento
- Análisis y elección de las medidas biocorrectivas
- Evaluación de la efectividad del sistema elegido
- Diseño y evaluación del sistema

- Evaluación del control y seguimiento
- Análisis e interpretación de resultados

4.2.8.1 Fase de investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento.

El primer paso para preparar el diseño de biotratamiento en el suelo es la realización de una completa investigación del medio, que incluye principalmente el estudio exhaustivo de la caracterización del emplazamiento y del tipo y concentración de la contaminación existente.

La caracterización del emplazamiento se llevará a cabo mediante el estudio del mismo detallando la volumetría del suelo a tratar, las condiciones geológicas e hidrogeológicas, analizando las características del suelo y sus propiedades (pH, granulometría, humedad, porosidad, etc.). La caracterización del contaminante se centrará en la investigación del tipo y concentración del mismo, así como la biodisponibilidad de los compuestos en el suelo (aceptores de electrones, metales pesados, nutrientes, etc.).

4.2.8.2 Análisis y elección de las medidas biocorrectivas

De la fase de investigación inicial, una vez identificadas las características del emplazamiento, del suelo y del contaminante, se podrá pasar al análisis y elección de las medidas biocorrectivas más adecuadas. Para ello será necesario:

- Identificar y cuantificar los contaminantes, definiendo sus propiedades físico-químicas más importantes.

- Identificación y clasificación de compuestos.
- Concentración en suelos y aguas subterráneas.
- Caracterización de la presión de vapor, densidad y grado de solubilidad.
- Conocer los factores que influyen en la transformación biológica de los contaminantes.
- Factores ambientales: tales como humedad, oxígeno disuelto, temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes.
- Factores microbiológicos: presencia de microorganismos y aclimatación de las poblaciones microbianas.
- Designar las medidas biocorrectivas.

En función de los factores anteriormente expuestos, se elegiría el sistema de biotratamiento más adecuado.

4.2.8.3 Diseño y evaluación del sistema

Para el diseño de un sistema de biorrecuperación es necesario establecer unas etapas de trabajo, en las cuales se determinan y evalúan los parámetros fundamentales necesarios para su eficacia.

Las etapas a seguir en el diseño de un sistema de biotratamiento son:

4.2.8.4 Evaluación de la viabilidad de la técnica

Se estudiarán los parámetros de evaluación que definen el sistema elegido, así como se evaluará las condiciones de biotratabilidad, los objetivos de limpieza exigidos y los costes de tratamiento necesarios.

4.2.8.5 Evaluación del diseño

Se estudiarán los factores que afectan la eficacia de la técnica y las posibles mejores o acondicionamientos a aplicar.

4.2.8.6 Evaluación del control y seguimiento

Para asegurar la correcta ejecución y un progreso adecuado del tratamiento se debe llevar a cabo un plan de control y seguimiento del sistema.

Para una correcta optimización se deberán controlar los siguientes puntos:

- Control de las condiciones de degradación y biodegradación
- Se registrará la variación de concentración de TPH, BTEX, COV's, CO2 desprendido y Oxígeno disuelto, variación de nutrientes (N, P, etc.)
- Control de los parámetros que afectan directamente en el funcionamiento del sistema

4.2.8.7 Análisis e interpretación de resultados

En esta última etapa se analizan los resultados obtenidos, haciendo un balance de los objetivos alcanzados y los marcados inicialmente. En este punto, si fuese necesario, se deberán proponer y estudiar aquellas mejoras o modificaciones necesarias para la optimización del sistema.

Las medidas biocorrectivas o los sistemas de biorremediación son técnicas de descontaminación suficientemente estudiadas y evaluadas, basados en los procesos de descontaminación. Es necesaria una investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento de forma

rigurosa para evaluar y elegir la medida biocorrectiva más adecuada y diseñar el sistema de manera óptima, así como es necesario llevar a cabo un control y seguimiento del mismo.

**Ensayo realizado por: Moroto Arroyo, M^a Esther y Rogel Quesada
GEOCISA. Div. Protección Ambiental de Suelos**

4.3 Remediación biológica

4.3.1 Biorremediación

La biorremediación es el proceso utilizado por el ser humano para detoxificar variados contaminantes en los diferentes ambientes –mares, estuarios, lagos, ríos y suelos– usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas de estos. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho. Afortunadamente la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar. A continuación se enumeran algunas, pero en general no hay una “fórmula secreta” que garantice el éxito de la biorremediación. Eweis, 2000

4.3.1.1 Bioestimulación

Como su nombre lo indica, consiste en estimular los microorganismos nativos del suelo adicionando nutrientes como nitrógeno o fósforo.

4.3.1.2 Bioaireación

Es una forma de estimulación realizada con gases, como por ejemplo oxígeno y metano, estos son adicionados de forma pasiva en el suelo para estimular la actividad microbiana.

4.3.1.3 Bioaugmentación

Es la inoculación de una alta concentración de microorganismos en el suelo contaminado para facilitar la biodegradación. Como se van a inocular, estos microorganismos deben ser seleccionados del suelo que se desea tratar.

4.3.1.4 Compostaje

Esta estrategia de biorremediación utiliza microorganismos aeróbicos y termófilos, formando pilas de material que deben ser mezcladas y humedecidas periódicamente para promover la actividad microbiana.

4.3.1.5 Fitorremediación

Es el uso de plantas para remover, contener o transformar un contaminante. Esta puede ser directa, donde las plantas actúan sobre el compuesto, o indirecta, donde estas se utilizan para estimular microorganismos en la rizosfera.

4.3.1.6 Landfarming

La técnica más usada para la biorremediación de los lodos contaminados con hidrocarburos y de otros desechos de la industria petrolera es la denominada landfarming. Se realiza trasladando los contaminantes a un suelo no contaminado, el cual ha sido preparado con anterioridad. Es allí donde tiene su génesis nuestro trabajo, que consiste en apoyar desde la microbiología una labor interdisciplinaria para remediar los pasivos ambientales que genera la empresa petrolera.

4.3.2 Factores que influyen en la biorremediación:

pH

Humedad

Agentes de separación

Población bacteriana

Oxigenación Infiltración/penetración de biomoléculas

Eweis, Ergas, 2000

4.3.2.1 El proceso de infiltración in-situ (Technology – Evaluation-Report –EPA) consiste en:

Realizar excavaciones para determinar la presencia y saturación de hidrocarburos

Determinar las vías naturales de elusión del contaminante.
Construcción de trampas de grasas y aceites con tres cámaras y desarenadores

Construcción de cámaras para albergar la solución de ramnolípidos, soforolípidos, fosfolípidos y lipoalcoholes

Esta mezcla de biosurfactantes catiónicos, aniónicos y moléculas anfipáticas tienen la función de:

- Bajar la tensión interfacial y disminuir las fuerzas capilares.
- Crear una microemulsión del tipo Winsor III que sea estable.
- Solubilizar las moléculas individuales para que formen miscelas o una simple fase de microemulsiones

Para determinar la ubicación de las trampas de grasas y aceites, como los sitios de saturación, se utilizan moléculas biológicas Biox. Posteriormente se realiza la biorremediación con bacterias.

Si se aplican detergentes químicos industriales, generalmente utilizados para lavar sitios contaminados con crudo, el suelo se transformará en un sustrato tóxico con partículas de difícil degradación e inerte, que evitaría el crecimiento de los microorganismos endémicos.

Los procesos de biorremediación In Situ por filtración/penetración trabajan de forma sinérgica, después del uso de los biosurfactantes, la cantidad de hidrocarburos disminuirá considerablemente. Posteriormente se añade el peróxido BIOX como compuesto de la reacción de IAKLA modificada por BIOX para las condiciones geográficas de nuestro país. El IAKLA reacciona con metales y forma radicales hidroxilos (OH) que en este medio son muy reactivos, y tienen la capacidad de reaccionar con los hidrocarburos para transformarlos y reducirlos, y de esta forma la molécula se encuentra lista o en capacidad de ser degradada por las bacterias.

Las dos reacciones más importantes producidas por la presencia de los hidroxilos para la degradación de los hidrocarburos son:

Adición:	$\text{OH} + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow (\text{OH})\text{C}_6\text{H}_6$
Substracción de Hidrógenos:	$\text{OH} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$

Debido a la indiscriminada naturaleza de los radicales hidroxilos al oxidar compuestos orgánicos, pueden ocurrir las siguientes reacciones:

Sustrato > intermediario A > Intermediario B > Intermediario C
Intermediario D > Intermediario E > CO₂

La cantidad de generador de radicales que se añade irá disminuyendo paulatinamente, ya que si se agrega más, producirá una disminución de COD, de tal manera que estos procesos deberán ser controlados diariamente con los protocolos de Biox.

Artículo: Ecuavital. BIOX, Biorremediación
maveiga2005@yahoo.com.mx
iaveiga@biorremediacion.org
maveiga@biorremediacion.org

4.4 Biorremediación de residuos de petróleo

Según la Compañía Colombiana de Petróleos, ECOPETROL, durante los últimos quince años el oleoducto Caño Limón- Coveñas ha sufrido más de novecientos atentados terroristas, hechos que han conducido al derramamiento de más de 450 millones de litros de petróleo en el medio ambiente.

El impacto ambiental por los derrames de crudo, ha dejado más de 2.600 kilómetros entre ríos y quebradas, y alrededor de 1.600 hectáreas de ciénagas afectadas. Sólo en 1998, subversivos del ELN ocasionaron el más grande derrame de crudo en aguas continentales del mundo, con un volumen superior a los 14'787.000 litros de petróleo, tragedia comparable con el accidente del buque petrolero Exxon Valdez, que vertió en las aguas de Alaska 42 millones de litros del crudo el 24 de marzo de 1989.

Dadas estas circunstancias los daños a las fuentes hídricas, suelos, aire, fauna y vegetación son prácticamente irremediables, pues los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo ha penetrado el ecosistema.

Sin embargo, no todos los lodos aceitosos son causados por atentados contra la infraestructura petrolera, también son resultado de la actividad de la broca durante la perforación en busca de yacimientos, la cual genera un lodo acompañado de hidrocarburo que se extrae hasta la superficie.

4.4.1 Diversidad microbiana en ambientes contaminados

Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos , que representan un uno por ciento (1%) de la población total de aproximadamente 10^4 a 10^6 células por gramo de suelo. También se han encontrado cianobacterias y algas capaces de degradar hidrocarburos. Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida.

Para evitar su contaminación y la de las aguas subterráneas con sustancias que puedan producirse durante el tratamiento. Para ello se efectúa el diseño del lugar donde se depositan los contaminantes, aislando el material de tratamiento del área no contaminada con una tela impermeable.

Para empezar el procedimiento, se hace una búsqueda y selección de bacterias nativas aisladas de las muestras de suelos que se encuentran contaminados, ya que estas tienen la capacidad catabólica para crecer bajo las condiciones físico-químicas y de estrés a las que están sometidas, y tendrán un mejor desempeño a la hora de la biorremediación. La búsqueda comienza en el procesamiento de una muestra de suelo mediante una serie de diluciones, tratando de obtener aquellos morfotipos cultivables; ya que una gran parte de los microorganismos del suelo no pueden ser recuperados en medios para el cultivo de microorganismos.

Además de una búsqueda general, se realiza una específica a través de medios selectivos y diferenciales, en la cual se pretende aislar ciertos morfotipos como las *Pseudomona sp.* y bacterias lactosa positivas – bacterias capaces de utilizar la lactosa, debido a su bien conocida actividad degradadora de hidrocarburos. Luego, estas diluciones son sembradas en diferentes medios de cultivo donde grandes familias de morfotipos se hacen presentes; éstas varían en densidad y diversidad.

La diversidad está determinada por los morfotipos recuperados que se diferencian según su morfología macroscópica, su aspecto físico, mientras que la densidad está determinada por el número total de individuos que pertenecen a un grupo con una morfología macroscópica común.

Estos datos de densidad y diversidad son de gran valor. Primero, porque nos indican acerca de la calidad microbiana del suelo, ya que un suelo que tiene gran número de morfotipos, es un suelo que tiene vida y por ende presenta una buena prospección para la biorremediación debido a su posible alta actividad microbiana. Segundo, porque aquellos morfotipos que se encuentren en mayor número serán seleccionados por su habilidad para sobrevivir en medios contaminados.

Ya seleccionados los morfotipos se conforma un consorcio o pool de microorganismos degradadores de hidrocarburos y, utilizando la estrategia de bioaumentación, se hace una producción a mayor escala y en proporciones estratégicas de estos. En esta producción debe tenerse en cuenta el volumen de suelo contaminado para biorremediar, la concentración del contaminante y las clases de morfotipos que se aislaron.

4.4.2 Importancia del pool microbiano

La formulación de un pool microbiano permite combinar y complementar sus funciones metabólicas para que colectivamente biodegraden un compuesto. En muchos casos algunos morfotipos sólo pueden realizar una parte de toda una cadena de reacciones químicas para llegar a compuestos que puedan ser fácilmente utilizados por los organismos del mismo consorcio u otros que estén presentes en el ambiente. Además, al estar en grupo los morfotipos pueden tolerar los cambios físico-químicos que se den en el ambiente durante el proceso de biorremediación. Cabe aclarar que se necesita un análisis más profundo para la identificación de los morfotipos que serán usados en la biorremediación, ya que alguno de estos puede ser patógeno para plantas, animales o el hombre por el proceso de bioaumentación. Sin embargo, partimos del principio que son morfotipos ambientales, los que inmediatamente se acabe su fuente de alimento bajan a un número que

no cause disturbio en el ambiente. Además se realiza una cuidadosa revisión de reportes de enfermedades de origen bacteriano en la zona.

El pool que se formuló es aplicado en el suelo contaminado por técnicos e ingenieros ambientales para dar inicio a la biorremediación. Durante el tratamiento se hace el monitoreo de las poblaciones microbianas, con el fin de determinar si la cantidad inicial de microorganismos aumenta o disminuye después de ser adicionado al suelo contaminado. Así mismo se realiza la determinación del porcentaje de hidrocarburos totales de hidrocarburos (TPH), con el fin de observar si hubo o no degradación.

Otros factores en la degradación de hidrocarburos la transformación de los compuestos orgánicos en el ambiente está influenciada por un número de factores que se pueden agrupar en aquellos que afectan el crecimiento y metabolismo de los microorganismos y aquellos que afectan al compuesto en sí mismo. La biodegradación de los hidrocarburos está asociada con el metabolismo y crecimiento microbiano, y por lo tanto cualquiera de los factores que afectan al crecimiento microbiano puede influenciar la degradación.

La degradación aeróbica de los hidrocarburos es considerablemente más rápida que el proceso anaeróbico, de modo que la oxigenación será necesaria para mantener las condiciones aeróbicas para una rápida degradación.

Un suelo con una estructura abierta favorecerá la transferencia de oxígeno y un suelo anegado de agua tendrá un efecto contrario. La temperatura afecta el crecimiento microbiano, así que a bajas temperaturas la curva de degradación aproximada de TPHs en una estación en tratamiento; será lenta. Así mismo el pH del suelo y la solubilidad del compuesto que debe ser degradado afectan el crecimiento bacteriano. La contaminación por

hidrocarburos también puede estar asociada con altos niveles de metales pesados, que pueden inhibir el crecimiento microbiano, dependiendo de la concentración y tipo de metales

Otro factor crucial es la accesibilidad del compuesto para su degradación en el interior del suelo, la cual está afectada por la estructura del mismo, su porosidad, composición y por la solubilidad del compuesto. Algunos compuestos pueden ser adsorbidos por arcillas y por lo tanto pueden ser invulnerables a la degradación. Para superar este problema se han añadido surfactantes a suelos contaminados con el objeto de mejorar la accesibilidad de los hidrocarburos. Los surfactantes son sustancias que contienen un segmento liposoluble –soluble en aceite–, y otro hidrosoluble –soluble en agua, lo cual permite solubilizar el hidrocarburo desde la arcilla. Por otra parte, la presencia de un gran número de microorganismos autóctonos en el suelo, capaces de degradar hidrocarburos será claramente una ventaja, porque evita la adición específica de microorganismos no autóctonos, que aunque degradadores, podrían no funcionar por no estar adaptados a las condiciones físico-químicas del lugar.

En general, en el proceso de landfarming se ha comprobado la eficiencia de un consorcio microbiano sobre la utilización de un solo morfotipo, debido a que los morfotipos al estar en grupo pueden tolerar mejor los cambios fisicoquímicos en el campo y sus actividades metabólicas pueden interactuar entre sí para la parcial o final biorremediación. Es necesario conocer las condiciones ambientales en las cuales se desea que los morfotipos trabajen, para así poder optimizar la biorremediación, cambiando los posibles parámetros físicos o químicos que puedan ir en contra de la actividad microbiana en el material a biorremediar o en el ambiente.

Por último hay que resaltar la importancia que tiene la selección de microorganismos autóctonos aislados del lugar para la biorremediación, debido a que estos morfotipos se encuentran mejor adaptados al contaminante; a diferencia de morfotipos foráneos, que aunque con una gran actividad biorremediadora, pueden no funcionar bajo las condiciones ambientales del lugar.

**Paola Andrea Vargas Gallego / René Ricardo Cuéllar /
Jenny Dussán**

Hipótesis/Apuntes Científicos Uniandinos No. 4 / Dic. 2004

4.5 Los Hidrocarburoclásticos:

Los llamados organismos hidrocarburoclásticos son bacterias y hongos capaces de degradar petróleo fisiológica y metabólicamente. Más de 100 especies de 30 géneros microbianos son capaces de usar hidrocarburos, como método de subsistencia. Los géneros de organismos hidrocarburoclásticos son: *Pseudomonas*, *Incordia*, *Vibrio*, *Candida*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acchromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mocur*, *Fusarium*, *Pinicillium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. La fracción del total de organismos que metabolizan hidrocarburos es altamente variable, 6 a 82% para hongos terrestres, 0.13 a 50% para bacterias de la tierra, y del 0.003% a 100% para bacterias marinas.

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

Las poblaciones dominantes en estas comunidades poseen características nutricionales relacionadas al contaminante y pueden ser también resistentes a muchas formas de estrés ambiental. Cuando la fuente de carbono es un substrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes. Los microorganismos utilizan estos compuestos a manera de un biofilm alrededor de la molécula del hidrocarburo, para posteriormente ingerirlo o romperlo en compuestos simples de carbono y oxígeno. Estos microorganismos usan la energía liberada para manejar los procesos termodinámicamente no espontáneos como la síntesis de componentes celulares.

Cuadro No.1 CAPACIDAD DE BIODEGRACION DE LOS HIDROCARBUROS

<p>Alta →</p>	<p>Fracción de los alcanos, incluye alcanos normales, alcanos ramificados (isoalcanos) y cicloalcanos (naptenos).</p>
<p>Intermedia →</p>	<p>Compuestos aromáticos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Dentro de los cuales están los monoaromáticos volátiles como el benceno, tolueno, xileno, etc., los naptenoaromáticos y compuestos aromáticos sulfurados como los tiopenos y benzotiopenos. Estos compuestos son los de mayor importancia debido a su toxicidad y tendencia a la bioacumulación.</p>
<p>Baja →</p>	<p>Fracción polar que son las resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) y asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas)</p>

Ecuavital. BIOX, Biorremediación, 2004

4.5.1 Tratamiento In situ

El proceso se realiza en la misma área que esta contaminada, se minimiza el riesgo de lixiviados y se trabaja a profundidades entre 20 y 35 cm. Los suelos contaminados por hidrocarburos y lodos son tratados con las matrices vegetales BIOX, con la finalidad de reducir la viscosidad y nivelar el pH del contaminante absorbido en la materia orgánica del suelo.

En el caso de tener un TPH sobre 70.000 ppm. es necesario tratar las tierras con Biosurfactantes BIOX, aislados en laboratorio a partir de organismos endémicos.

La variedad de polímeros BIOX, aportan fuentes de nitrógeno y fósforo indispensables para iniciar la bioestimulación de las poblaciones de microorganismos endémicos presentes en los suelos contaminados.

Cuantificación de la concentración de hidrocarburos de petróleo
El muestreo es aleatoria y/o sistemática y de manera compuesta a varias profundidades. Se determina pH, concentración de TPH, análisis cuantitativos de metales pesados, según consta en el Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, vigente (RAOH)

Esta cuantificación servirá para conocer el porcentaje de carbón aportado por el petróleo y la relación estequiométrica de crecimiento degradación de hidrocarburos

4.5.2 Potencial de biodegradación

Los hidrocarburos de petróleo son biodegradables únicamente si estos se encuentran biodisponibles. Eweis, Sarina, 2000. La mayoría de veces los contaminantes se hallan sorbidos en materia orgánica, lo que genera

grandes cúmulos (petróleo + ácidos húmicos, hidratos de carbono, etc.) inaccesibles a los microorganismos, por esta razón, los protocolos BIOX permiten que los hidrocarburos de petróleo sean desorbidos y se encuentren en solución para que de esta forma los microorganismos endémicos puedan captarlos en la interfase agua-aire y utilizados como fuente de energía.

Dependiendo del tipo de hidrocarburo, el tiempo de intemperización, el tipo de suelo la capacidad de biodegradación será diferente.

4.5.3 Cultivo de microorganismos

Una vez aplicado el protocolo BIOX para mejorar la desorción de los hidrocarburos, se realiza una resiembra de microorganismos endémicos, con la finalidad de aumentar la cantidad de los mismos en el suelo a tratar.

De las poblaciones de organismos que oxidan petróleo, se escogen las que producen enzimas oxigenasas y dioxigenasas, utilizando medios de cultivos específicos. Posteriormente estas bacterias son identificadas y guardadas en un banco de bacterias a 70 grados centígrados para usos posteriores.

4.5.4 Oxigenación

4.5.4.1 Oxigenación mecánica: Se aplica antes y durante el proceso. En la oxigenación mejorada se usan productos BIOX para aumentar el rendimiento, sustratos inmiscibles y se aplican procesos de aclimatación y desorción.

4.5.4.2 Oxigenación natural: Ocurre normalmente en los sistemas

aerobios de degradación, se potencializa cuando se utiliza los peróxidos y productos Biox para generar oxígeno molecular hasta concentraciones de 8 mM

Fuente: Ecuavital. BIOX, Biorremediación
maveiga2005@yahoo.com.mx
iaveiga@biorremediacion.org
maveiga@biorremediacion.org

5 METODOLOGÍA

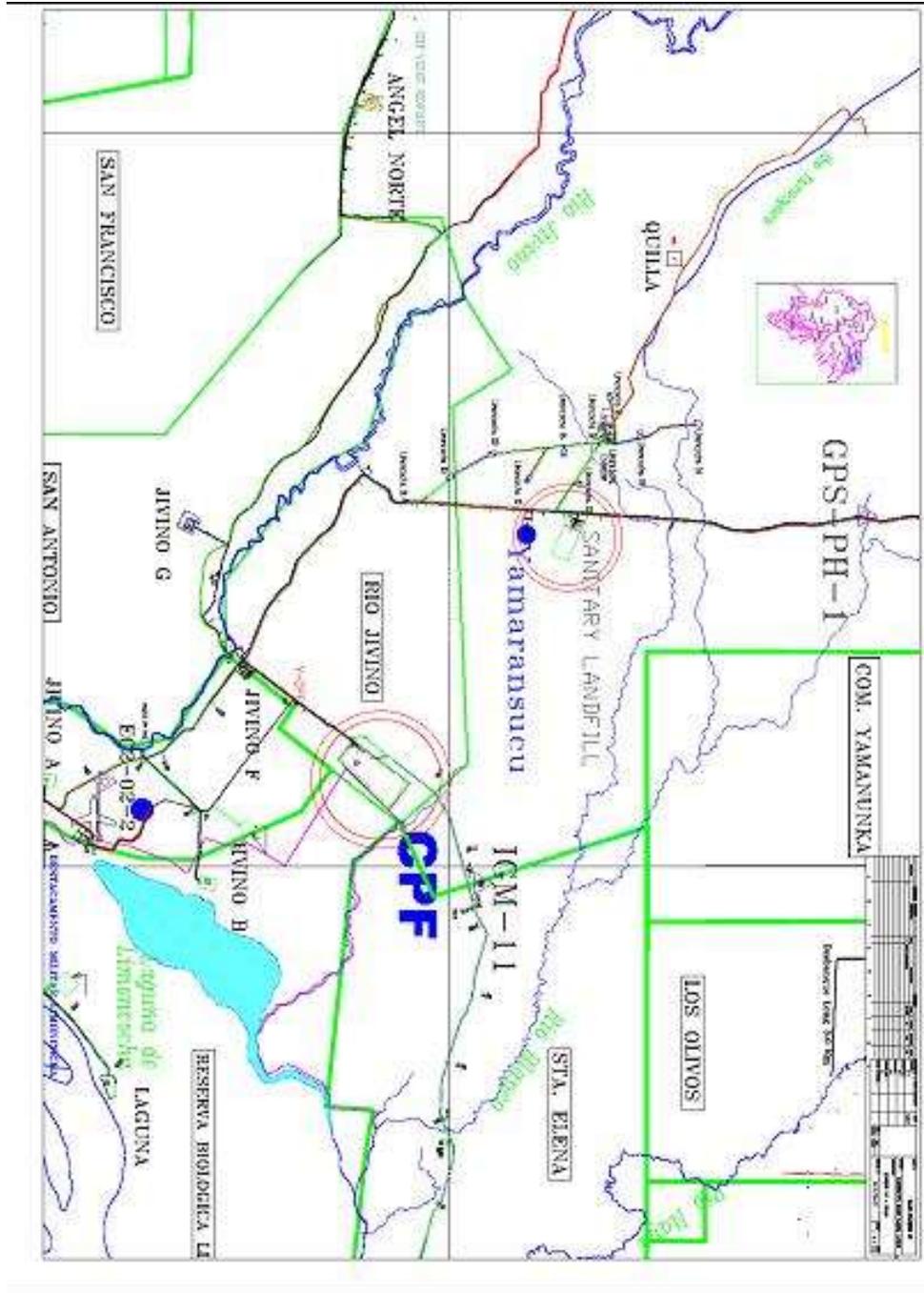
5.1 Descripción del sitio de trabajo

El método de Biorremediación para tratamiento de fondos de tanques de petróleo se realizó en el Relleno Sanitario del Complejo Indillana de la Unidad de Administración Temporal del Bloque 15 (campo operado anteriormente por Occidental Exploration and Production Co., (OXY)

Fig 1. Está ubicado en la Provincia de Sucumbíos, Cantón Shushufindi, parroquia Yamaramsuku de la Comunidad Shuar.

El presente trabajo de investigación se dividió en las siguientes etapas que se ejecutaron en forma simultánea, en el mini laboratorio montado en relleno sanitario, y el laboratorio de la ciudad de Quito.

Fig. 1 MAPA DE UBICACIÓN DEL RELLENO SANITARIO-UB15



- Simbología
-  Facilidades: CPF (Central facilidades de producción-Bloque 15)
 -  Áreas comunitarias y Ubicación de la Reserva Biológica Limoncocha
 - JIVINOS:** Nombres de las plataformas petroleras
 -  Laguna de Limoncocha
- Plano dibujado por : Hernán Martínez- Facilidades- UB15

5.2 Análisis de laboratorio

Se realizó seguimiento del proceso mediante análisis químicos, biológicos y físicos con la asistencia de dos laboratorios: GRUNTEC, entidad certificada por el Organismo de Acreditación del Ecuador (OAE), realizó los análisis determinados por la tabla No seis del RAOH y Q-MAX que realizó el seguimiento bacteriano.

5.3 Caracterización físico química del residuo de tanques

Inicialmente se efectuó un muestreo simple directo del residuo proveniente de los tanques de almacenamiento de crudo y de suelo nativo utilizado en el proceso. De estas muestras se analizó el contenido de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) y un estudio de huella digital (Finger Print), para clasificar al residuo dentro de un rango específico de hidrocarburos.

El muestreo compuesto requiere que se tomen muestras en diferentes sitios, se los mezcle y se obtenga una muestra representativa, para la caracterización inicial el producto está previamente mezclado y con una muestra simple se obtiene una muestra representativa. Corbitt, 2003.

5.3.1 Finger print. - Este análisis consiste en la interpretación del cromatograma obtenido a partir del análisis de muestras de suelo, agua o crudo en el cual se hace una interpretación cualitativa del hidrocarburo presente en las muestras. Con este análisis se puede determinar la contaminación o naturaleza del producto analizado determinado sus principales componentes como alcanos, iso-alcanos, compuestos parafínicos, etc. Observar resultados en (Cuadro No.2).

Fundamento científico para la caracterización del hidrocarburo :

Se lo realizó en el laboratorio Gruntec a través de un análisis de cromatografía gaseosa; es un procedimiento de análisis para separar, identificar y cuantificar los diferentes componentes de una mezcla

El sistema de columnas cromatográficas constituyen el corazón de todo cromatógrafo. Cada columna se diseña para aprovechar alguna propiedad de los diferentes componentes que resulte adecuada para generar distintas velocidades de avance para cada uno de ellos durante el recorrido de la columna.

En el caso de los hidrocarburos se suele usar la volatilidad como propiedad distintiva entre los diversos componentes. Para aprovechar esta propiedad se emplea una fase líquida estacionaria que queda retenida en la columna mientras el gas carrier circula por ella. Si esta fase estacionaria es no polar (siliconas, hidrocarburos de elevado peso molecular) la tendencia a disolverse en ella crece al bajar la volatilidad de los compuestos analizados. De este modo las moléculas de los componentes pesados permanecen más tiempo (en término medio) en la fase líquida que en el gas carrier que circula permanentemente. Debido a esta característica, las moléculas de los componentes menos volátiles avanzan más lentamente que las de los componentes más volátiles, a la misma temperatura.

En forma simplificada puede afirmarse que las columnas de este tipo actúan como sistemas de destilación de muy elevada eficiencia y los diferentes compuestos las recorren empleando tiempos que son proporcionales a sus respectivos puntos de ebullición.

El sistema de columnas cromatográficas está encerrado en un horno de temperatura variable para optimizar la velocidad a la que se producen los procesos de separación.

Gruntec uso el detector FID, que es un detector de muy alta sensibilidad sólo apto para hidrocarburos pues permite detectar los iones de Carbono que se forman durante la combustión a alta temperatura. Sumado a la muy alta sensibilidad, este detector presenta la característica de poseer un Factor de Respuesta (en masa) casi idéntico para todos los hidrocarburos: La misma masa de distintos componentes produce la misma intensidad de señal en el detector. Esta característica transforma al FID en un detector de mucha utilidad pues no es necesario conocer la fórmula de un componente para conocer su aporte a la masa total del sistema. Autores: M. Crotti, S. Bosco

5.3.2 Caracterización físico química del sustrato

Se realizó una caracterización inicial para conocer el sustrato y luego se hizo una muestra compuesta de cada uno de los tratamientos; luego fueron transportadas en un contenedor con las características necesarias para el mantenimiento de las mismas.

Para cubrir lo establecido en la tabla No. 6 del Reglamento Ambiental para las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador (RAOH), durante la investigación se analizaron:

- Hidrocarburos totales del petróleo
- Población bacteriana
- Potencial hidrógeno
- Nitrógeno
- Fósforo
- Potasio
- Metales pesados

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)

Estos parámetros fueron analizados: en el Laboratorio GRUNTEC en Quito, los metales pesados en el Laboratorio Gruntec de Canadá y la identificación y recuento bacteriano en el laboratorio Q-max de Quito

5.3.3 Hidrocarburos totales del petróleo.- Permite medir el total de hidrocarburos de petróleo solubles o recuperables en ciertos solventes, es sinónimo de hidrocarburos minerales. Fue analizado utilizando el método EPA – 8015 (GC-FID).

5.3.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.- constituye toda la fracción de hidrocarburos de alto peso molecular. Estos parámetros fueron analizados mediante el método EPA – 8270.

5.3.5 Metales pesados.- los metales controlados por el RAOH, considerados como peligrosos para el medio ambiente son: Cadmio, Níquel y Plomo, fueron analizados en cada una de las muestras provenientes de las parcelas de experimentación.

Se muestrearon únicamente en los meses de abril y agosto en consideración que en el primer muestreo éstos estuvieron bajo parámetros establecidos en el RAOH, en la tabla seis. Se realizó un segundo muestreo para verificar los datos en agosto verificándose que seguían bajo los límites permisibles, por la complejidad de estos análisis fueron enviados a realizar en el laboratorio de Gruntec en Canadá Se emplearon los siguientes métodos analíticos: Cd con EPA –7131 A, Ní con EPA- 7521 y Pb con EPA – 7421.

Además de lo establecido en la tabla No.6, se analizó:

5.3.6 Población bacteriana.- se contaron las unidades de formación de colonias por gramo (ufc/g), lo que constituye un indicador muy importante del desarrollo del proceso de biorremediación estrechamente relacionado con el resto de parámetros y que nos permite conocer la concentración de células bacterianas que se mantiene como degradadoras primarias en un proceso de biorremediación. Un valor establecido en la literatura universal por las diferentes investigaciones de campo establece que no debe ser menor a $1E+08$ ufc/g de suelo. El laboratorio externo Q-MAX uso el método de número más probable (NMP) para su determinación.

Se realizó el aislamiento e identificación de la flora bacteriana con capacidad metabólica para la degradación de hidrocarburos provenientes de tres posibles fuentes utilizadas en el proceso como son el sustrato (suelo nativo mezclado con el residuo de los tanques de almacenamiento de crudo), el biol (formulación bioactiva compuesta principalmente por macro y micro nutrientes) y de la biomasa (lodos activos provenientes de las plantas de tratamiento de las aguas negras y grises del campamento central UB15).

De las cepas aisladas e identificadas se seleccionó las mejores cepas degradadoras de hidrocarburos en función de su capacidad metabólica y adaptabilidad a diferentes derivados o fracciones de hidrocarburos

5.3.7 Potencial hidrógeno (pH).- es un indicador de un medio adecuado para la vida el cual debe estar entre 6.5 a 7.5.

5.3.8 Macro nutrientes.- Nitrógeno, Fósforo, Potasio

Los métodos analíticos usados fueron: N con EPA - 351.1, P con EPA - 6020 y K con EPA - 7610

5.4 Diseño experimental

El trabajo de investigación inicia con la homogenización de los fondos de tanques de petróleo colectados en los últimos 12 meses, se efectuó en una piscina de cemento armado hermética para evitar contaminar el suelo y nivel freático, por el volumen se utilizó una retroexcavadora provista de una cuchara de un metro cúbico de capacidad la cual remueve el sedimento homogenizándolo y aireándolo.

En esta piscina se incorporan el Biol. (mezcla de agregados orgánicos) más suelo natural, formando un sustrato semilíquido que será dispuesto luego en las celdas de los reactores.

La investigación consistió en probar tres tratamientos de biorremediación:

T1= [64% de fondos de tanques de petróleo (FTP) + 6% de Biol. + 2.5% de material absorbente + 21.5% de suelo nativo + 6% de lodos activados de la planta de tratamiento]

T2= [64% de fondos de tanques de petróleo (FTP) + 6% de Biol. + 24% de suelo nativo + 6% de lodos activados de la planta de tratamiento]

T3= [64% de fondos de tanques de petróleo (FTP) + 6% de Biol. + 27.5% de suelo nativo + 2.5 % material absorbente]

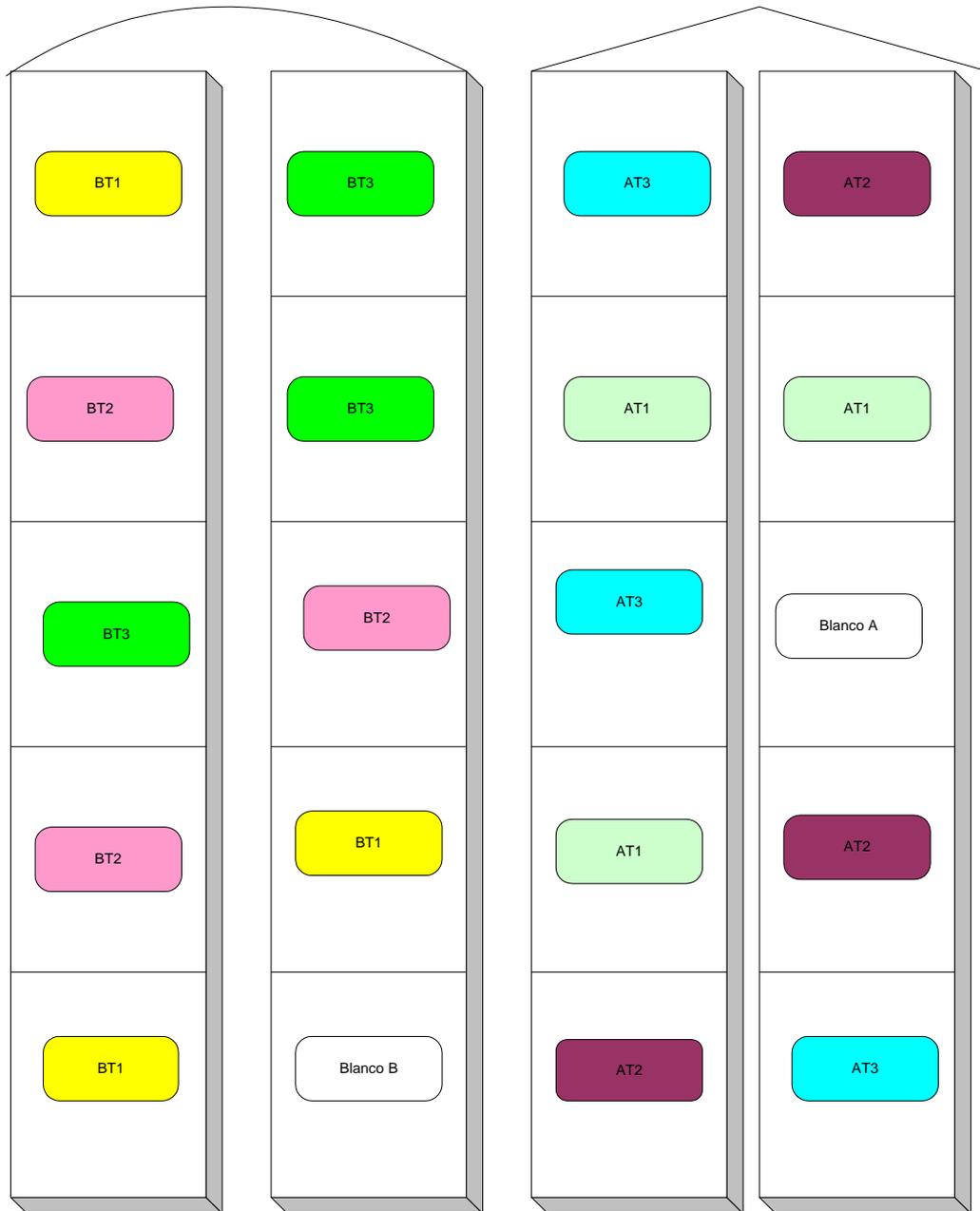
Los tratamientos **T4** y **T5**, son los testigos, que contenía únicamente el fondo de tanque sin ningún agregado, solo fue homogenizado; la variable

será exclusivamente la temperatura por el tipo de techo, bajo el cual estarán.

Para cada tratamiento **T1**, **T2** y **T3** se realizó seis réplicas que se ubicaron por sorteo en los cuatro reactores, para **T4** y **T5** se realizó una sola repetición y se los ubicó en tinajas uno en cada tipo de reactor (Diferente tipo de techo).

Por lo expuesto en el párrafo anterior disponíamos de 18 módulos de siembra y dos con los blancos. Por lo que esta investigación se realizó en 20 unidades experimentales.

Fig. 2 DISPOSICIÓN DE LAS CELDAS EN FORMA ALEATORIA, EN LOS REACTORES CON TECHOS CIRCULARES Y TRIANGULARES



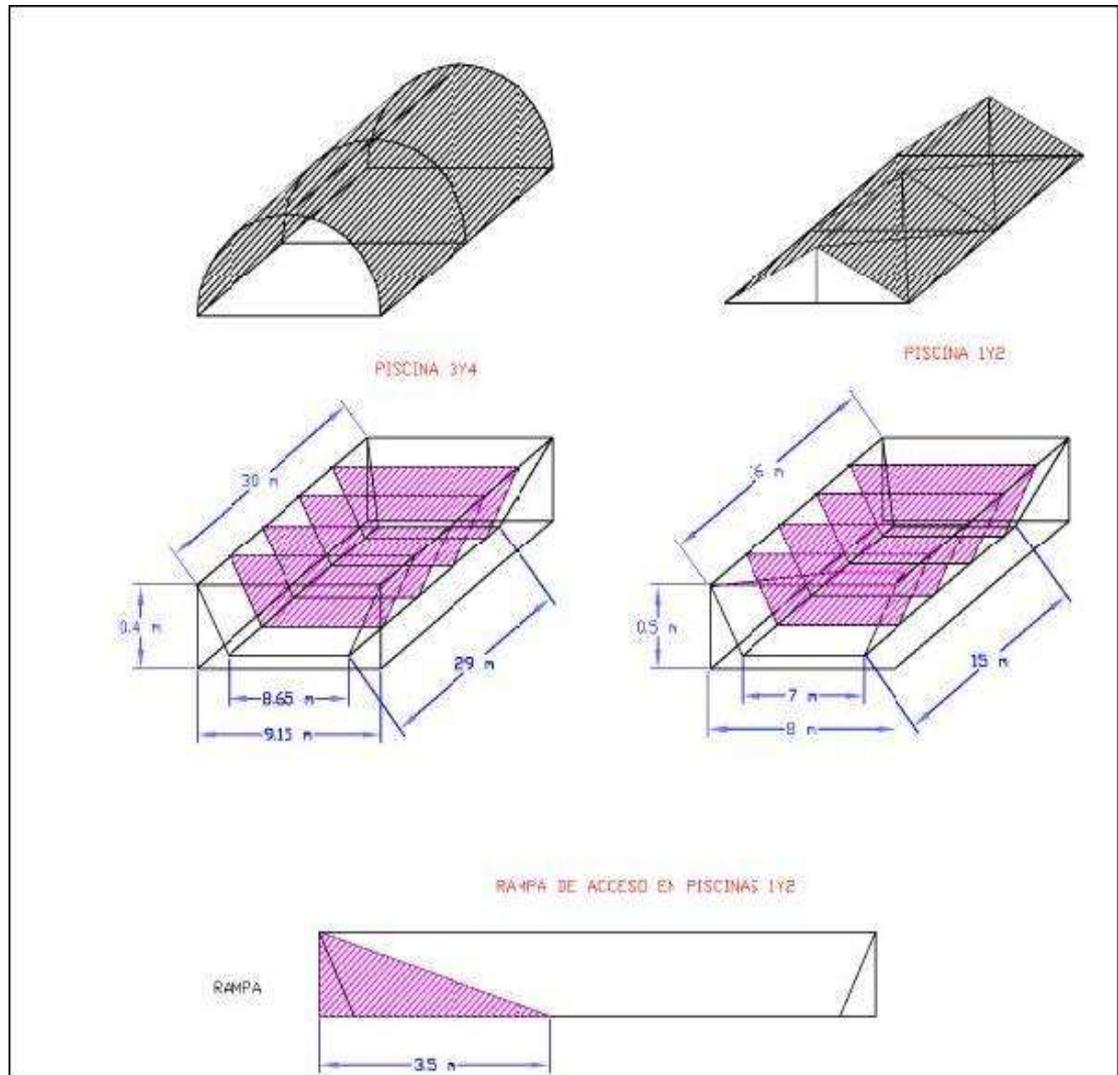
{(6 TRATAMIENTOS) (3 REPLICAS) + 2 BLANCOS }

Simbología Fig. 2	
	BT1 = Tratamiento uno colocado en reactor de techo semicircular
	BT2 = Tratamiento dos colocado en reactor de techo semicircular
	BT3 = Tratamiento tres colocado en reactor de techo semicircular
	AT1 = Tratamiento uno colocado en reactor de techo triangular
	AT2 = Tratamiento dos colocado en reactor de techo triangular
	AT3 = Tratamiento tres colocado en reactor de techo triangular

5.5 Descripción de los Módulos para siembra

Para mantener una absoluta independencia entre ellos con la finalidad de evitar que haya contacto entre los tratamientos y lixiviados de cada uno, se construyeron dentro de las cuatro piscinas pequeñas paredes divisorias usando bloque los mismos que se los sujetó con masilla de arena y cemento. Para lograr la hermeticidad indicada se recubrió las piscinas con plástico de alta densidad conocido en la industria petrolera como "lyner". Se puede observar lo indicado en la Fig.3

Fig 3 CORTE EN PLANTA DE LOS MÓDULOS PARA SIEMBRA Y SU HERMETICIDAD



Departamento de Protección ambiental UB15. Dibujo: Guido Abad

6. RESULTADOS

6.1 Descripción de los tipos de reactores

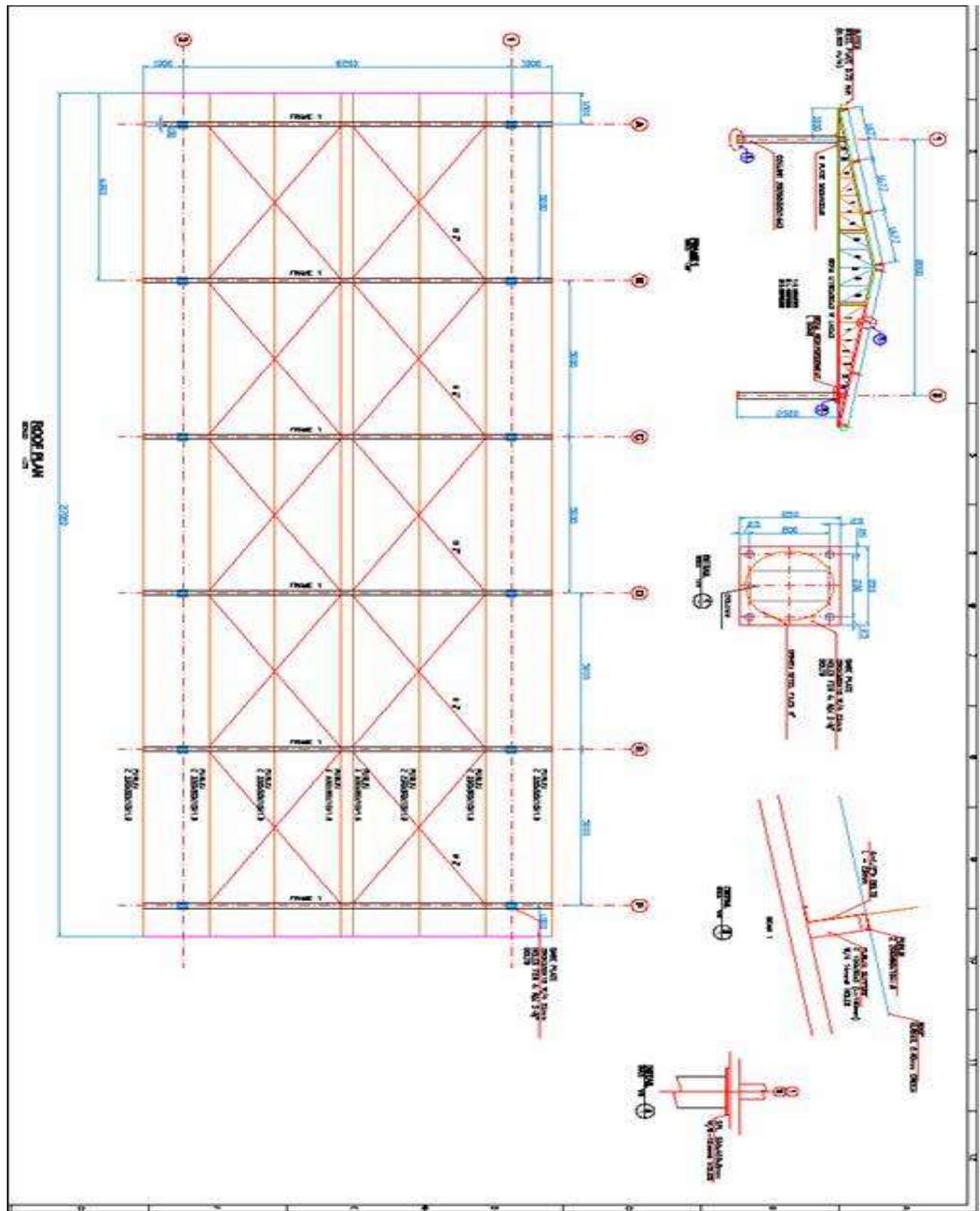
6.1.1 Reactor con techo a dos aguas plano y piscina horizontal.

Diseño del techo

Su estructura es metálica, soldada a pilotes de acero su estructura inferior termina en un monorriel nivelado donde se encaja la parte del techo modelo a dos aguas, el acople de la base con el techo se realiza mediante un juego de ruedas ubicadas a un metro de distancia, las cuales se asientan sobre el monorriel, lo cual le permite que el techo se desplace, abriéndose o cerrándose. Para conseguir el desplazamiento de la estructura del techo, la base debe tener el doble de largo que la misma, lo que permitirá una apertura total del techo. Para optimizar espacio la base piloteada y soldada llega hasta el final del segundo reactor que es exactamente igual al primero, con lo cual se permite la apertura de los techos indistintamente.

El techo es de estructura metálica liviana con translúcidos; para abrirlo o cerrarlo se utiliza un sistema de tecla de cadena.

Fig 4. PLANO DEL REACTOR CON TECHO TRIANGULAR Y CORTE DE LA PISCINA



Departamento de Facilidades. Diseño conceptual: Guido Abad, Cálculo empresa HARBERT

Superficie de trabajo

Para depositar el sustrato, el reactor tiene una base de cemento armado de 250 Kg/cm^2 , suficientemente resistente para soportar el peso de una retroexcavadora. Es nivelada y totalmente horizontal, tiene una profundidad de 0.50 metros, pero únicamente se llena el sustrato hasta los 0,30 metros para evitar reboses o desbordamiento, también este volumen libre nos permitió durante el proceso agregar agua y mantener húmedo el suelo, dando un margen de seguridad para evitar contaminación al suelo circundante, igualmente al final del proceso permite realizar una agregación de sólidos degradables o suelo nativo, para realizar el mejoramiento final previa la disposición al ambiente.

Con este diseño se construyeron dos piscinas con capacidad para 70 metros cúbicos cada una, las piscinas tienen las siguientes dimensiones:

Largo = 16 metros

Ancho = 9 metros

Profundidad = 0.5 metros

Volumen total = 72 m³

Volumen de trabajo efectivo = 43 m³

Fig. 5 VISTA INTERIOR Y SUPERFICIE DE TRABAJO DEL REACTOR CON TECHO TRIANGULAR



Fotografía: Guido Abad

6.1.2 Reactor con techo semicircular

Diseño del techo

Se realizó un diseño más liviano, con estructura de aluminio un metro más baja que la estructura citada anteriormente (Fig.: 6,7,8), en este nuevo diseño el techo es semicircular y llega hasta el piso, tiene ruedas que encajan entre dos paralelas metálicas, para la superficie de rodadura se empotró una lámina de metal que facilita el desplazamiento del techo . El techo estará recubierto con plástico de invernadero se demostró que con este diseño se incrementó la temperatura al interior del reactor y esta variable física, afecta positivamente al proceso de biorremediación.

Fig. 6 VISTA INTERIOR Y SUPERFICIE DE TRABAJO DEL REACTOR CON TECHO SEMICIRCULAR



Fotografía: Guido Abad

Fig. 7 VISTA EXTERIOR LATERAL DEL REACTOR CON TECHO SEMICIRCULAR



Fotografía: Guido Abad

Superficie de trabajo

Fig. 9 VISTA INTERIOR Y SUPERFICIE DE TRABAJO DEL REACTOR CON TECHO SEMCIRCULAR



Fotografía: Guido Abad

Es de cemento armado con una resistencia de 250 Kg. /cm². Se la diseñó con un desnivel del 5% para retirar el lixiviado percolado, lo cual mejora la biorremediación, para captar estos lixiviados en el extremo lateral a la que se orienta la caída de la loza se construyó una pared permeable con orificios que permiten el paso de líquidos los mismos que se conducen por una canaleta a una trampa cerrada de cemento que es un colector de lixiviados.

Con este diseño (Fig. 8) se construyeron dos piscinas con las siguientes dimensiones:

Largo = 31 m.

Ancho = 11 m.

Profundidad = 0.5 m.

Volumen total = 170 m³

Volumen de trabajo efectivo = 102 m³

6.2 Caracterización físico-química original

Cuadro No.2 CARACTERIZACIÓN DE FONDOS DE TANQUE, SUSTRATOS Y SUELO

MUESTRA	CODIGO	RESULTADO
FONDO DE TANQUE	FT001	La muestra presenta una contaminación con hidrocarburo en el rango del Diesel Range: este hidrocarburo es evidentemente joven, ya que sus picos de bajo peso molecular tiene una importante presencia y no se evidencia todavía oxidación o ataque microbiano
SUSTRATO 1	AT2-PTT PIT 2	Muestra de suelo muy contaminada con crudo en el rango de Diesel Range Organic. Es un crudo relativamente joven en donde sus cadenas de mediano peso molecular se encuentran en mayor proporción.
SUSTRATO 2	Blanco PIT 4	Crudo parafínico en el rango de Diesel Range Organics. El crudo está en proceso de degradación, ya que las cadenas del pristano y el phytano que son las cadenas de más difícil degradación se encuentran en una proporción mucho mayor al resto de cadenas
SUSTRATO 3	Blanco PIT 1	Crudo parafínico en el rango de Diesel Range Organics. El crudo está en proceso de degradación, ya que las cadenas del pristano y el phytano que son las cadenas de más difícil degradación se encuentran en una proporción mucho mayor al resto de cadenas
SUELO NATIVO	SN001	Se corrió inicialmente una prueba de TPH la cual no botó resultados de consideración que justifique correr un Finguer Print

Laboratorio GRUNTEC – ECUADOR , Ing. Santiago Cadena

6.3 Caracterización bacteriana

Cuadro No.3 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN EL BIOL, SUELO Y PLANTA DE AGUAS GRISES Y NEGRAS

CODIGO	NOMBRE	Procedencia
B 1,3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BIOL
B3	<i>Pseudomonas putida</i>	BIOL
B1	<i>Actinomices sp</i>	BIOL
B2,2	<i>Serratia rubidae</i>	BIOL
B2.1	<i>Pseudomonas cepacia</i>	BIOL
S1	<i>Hafnia alvei</i>	Suelo con hidrocarburo
S2	<i>Klebsiella pneunoniae</i>	Suelo con hidrocarburo
S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Suelo con hidrocarburo
S4	<i>Bacillus sp.</i>	Suelo con hidrocarburo
R2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Redfox
R1.2	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Redfox
R1,1	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	Redfox

Laboratorio Q-MAX-ECUADOR, Blgo. Mauricio Ruales

Se identificaron 12 cepas provenientes de las diferentes muestras procesadas y se las utilizó para la selección de las más resistentes frente a diferentes fracciones de hidrocarburo (Cuadro No.3).

Las muestras fueron sometidas a un enriquecimiento selectivo dirigido a la obtención de bacterias degradadoras de hidrocarburos, posteriormente se realizó el aislamiento e identificación de las cepas obtenidas a través de pruebas bioquímicas que permitieron la evaluación de sus características enzimáticas y metabólicas.

La selección de las mejores cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos consistió en efectuar pruebas de metabolismo y resistencia

a hidrocarburos, para esto se expuso a cada una de las cepas bacterianas aisladas e identificadas a diferentes fracciones de hidrocarburos con el fin de evaluar su capacidad metabólica y adaptabilidad frente a un toxico determinado.

Para la presente investigación se utilizaron compuestos que representan los siguientes grupos de hidrocarburos: alcanos, alquenos, aromáticos, aromáticos policíclicos, y además se utilizó el residuo de tanque de almacenamiento

Los cultivos bacterianos puros obtenidos se los sometió a diferentes concentraciones de un toxico específico y ayudados con un método estadístico probabilístico denominado Número Más Probable (NMP) se determinó la cantidad de células que se adaptaron al medio circundante y por lo tanto desarrollaron sistemas enzimáticos que les permitió metabolizar la sustancia toxica a la que fueron expuestas.

6.3.1 Respuesta de las bacterias a los contaminantes

Tabla No.1 EXPOSICIÓN DE LAS BACTERIAS OBTENIDAS EN LA CARACTERIZACIÓN INICIAL A DIFERENTES CONTAMINANTES PARA VERIFICAR LAS CEPAS MÁS VIABLES

CODIGO	NOMBRE BACTERIAS	NUMERO DE CÉLULAS VIABLES Test 1 con Hexano al 1% NMP/100 ml	NUMERO DE CÉLULAS VIABLES Test 2 con Aceite Mineral al 1% NMP/100 ML	NUMERO DE CÉLULAS VIABLES Test 3 con Fondo de tanque al 0,5% NMP/ 100 ml
B 1,3	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	300	>900	200
B3	<i>Pseudomona putida</i>	295	>900	180
B1	<i>Actinomises sp</i>	120	>900	60
B2,2	<i>Serratia rubidae</i>	300	>900	240
B2,1	<i>Pseudomona cepacia</i>	286	>900	164
S1	<i>Hafnia alvei</i>	50	>900	00
S2	<i>Klebsiella pneunoniae</i>	180	>900	80
S3	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	286	>900	220
S4	<i>Bacillus cereus</i>	300	>900	250
R2	<i>Klebsiella pneunoniae</i>	20	>900	10
R1,2	<i>Enterobacter aglomerans</i>	240	>900	120

Laboratorio Q-Max – Biol Mauricio Ruales

Como se puede desprender de la Tabla No. 1, de las cepas analizadas tres especies son las que presentaron la mejor resistencia a hexano y al fondo de tanque, estas son: *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidae*.

Es importante anotar que estas mismas cepas, exceptuando al *Bacillus cereus*. tienen una actividad emulsificante. Esta propiedad permite que el hidrocarburo se incorpore con mayor facilidad a la célula bacteriana a través de la pared celular. Laboratorio Q-MAX,2006

Fig. 10 *Pseudomona aeruginosa* (Cultivo en hagar)



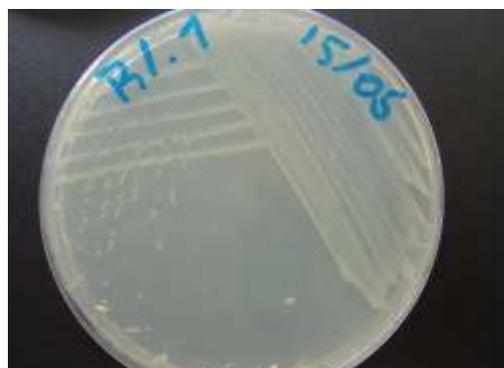
Laboratorio Q-MAX

Fig. 11 *Bacillus cereus* (Cultivo en hagar)



Laboratorio Q-MAX

Fig. 12 *Serratia rubidae*. (Cultivo en hagar)



Laboratorio Q-MAX

6.4 Preparación de los cubículos

Fig. 13 VISTA DE LOS FONDOS DE TANQUES COLOCADOS EN UNA PISCINA IMPERMEABILIZADA ANTES DE SER MEZCLADOS CON LOS TRATAMIENTOS, TIENEN 92,000 mg/KG de TPH



Fotografía: Guido Abad

Es el producto que fue sometido al proceso de biorremediación, como se observa en la fotografía es un hidrocarburo degradado que se decanta en los fondos de los tanques de almacenamiento de petróleo, está mezclado

con arena que viene de las formaciones hollin y T, M1 ubicadas en estratos rocosos a mas de tres km. de profundidad.

Fig. 14 MEZCLADO DE LOS FONDOS DE TANQUES CON NUTRIENTES Y MATERIAL ABSORBENTE



Fotografía: Guido Abad

En la fotografía anterior se puede ver el mezclado de material absorbente y encapsulante, comercialmente denominado spag sorb, con lo cual se ayuda a la agregación del hidrocarburo para facilitar la acción bacteriana. Este material al mezclarse con el suelo no permite que el hidrocarburo se lave con el agua.

Fig. 15 VISTA DE LAS CELDAS DE CULTIVO Y DISPOSICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS BT1, BT2, BT3 Y BLANCO, EN LOS REACTORES SEMICIRCULARES



Fotografía: Guido Abad

Cada celda de investigación se construyó de forma tal que son independientes entre si evitando que haya conexión de líquidos entre ellas, cada celda fue una de seis repeticiones de los tres tratamientos.

Fig. 16 VISTA DE LAS CELDAS DE CULTIVO Y DISPOSICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS AT1, AT2, AT3 Y BLANCO, EN LOS REACTORES CON TECHO TRIANGULAR, DESPUÉS DE TRES MESES DE HABER INICIADO EL PROCESO



Fotografía: Guido Abad

Todas las celdas de tratamiento fueron señalizadas para evitar confusiones durante el muestreo y seguimiento, cada uno fue tratado como un universo en si.

6.5 Análisis de Resultados

Se detalla en primera instancia los indicadores controlados por el RAOH (Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador), establecido en la tabla No.6 que indica los límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. La tabla establece analizar: Hidrocarburos totales, Hidrocarburos aromáticos policíclicos y los metales pesados cadmio, níquel y plomo. Siendo el relleno sanitario el lugar de su disposición final los parámetros alcanzar son los determinados para uso industrial.

6.5.1 Hidrocarburos totales (TPH)

Tabla No.2 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE TPH EN LAS CELDAS DE TRATAMIENTOS DISPUESTOS EN LOS DOS TIPOS DE REACTORES, SE MUESTRAN DATOS INICIALES Y FINALES

Promedio mensual de TPH expresado en mg/kg, determinado por el método EPA No. GC-FID								
	AT2	BT2	AT1	BT1	AT3	BT3	RAOH	BLANCO
ABR	23388	43944	26880	25667	65482	47491	4000	92721
MAY	91093	83951	69643	65184	99570	81793	4000	
JUN	58690	32603	28212	27862	63354	30404	4000	
JUL	53647	34833	32530	20396	109064	39530	4000	233057
AGO	29400	21699	17368	18391	54153	19851	4000	
SEP	28439	29588	18637	4346	42640	4019	4000	

Análisis de laboratorio realizados por GRUNTEC

Tabla realizada por Guido Abad

Fueron analizados durante seis meses, la tabla adjunta es el promedio mensual, analizado por el tipo de tratamiento, los registrados con AT

corresponden a las siembras dispuestas al azar en los invernaderos con el techo en forma triangular y los BT corresponden a las siembras colocadas en los invernaderos con techos semicirculares.

Cuadro No.4 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE TPH EN LOS BLANCOS, SE MUESTREO EN ABRIL Y JULIO , SE MUESTRAN DATOS INICIALES Y FINALES

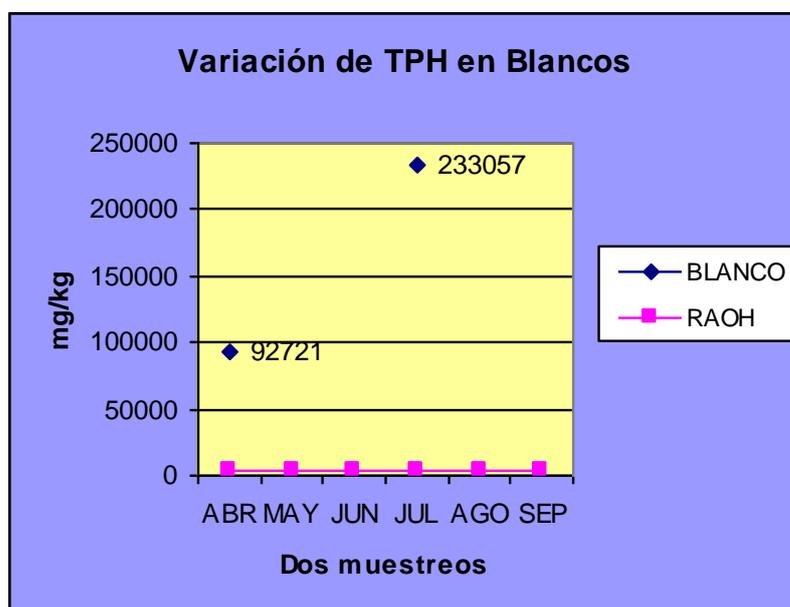
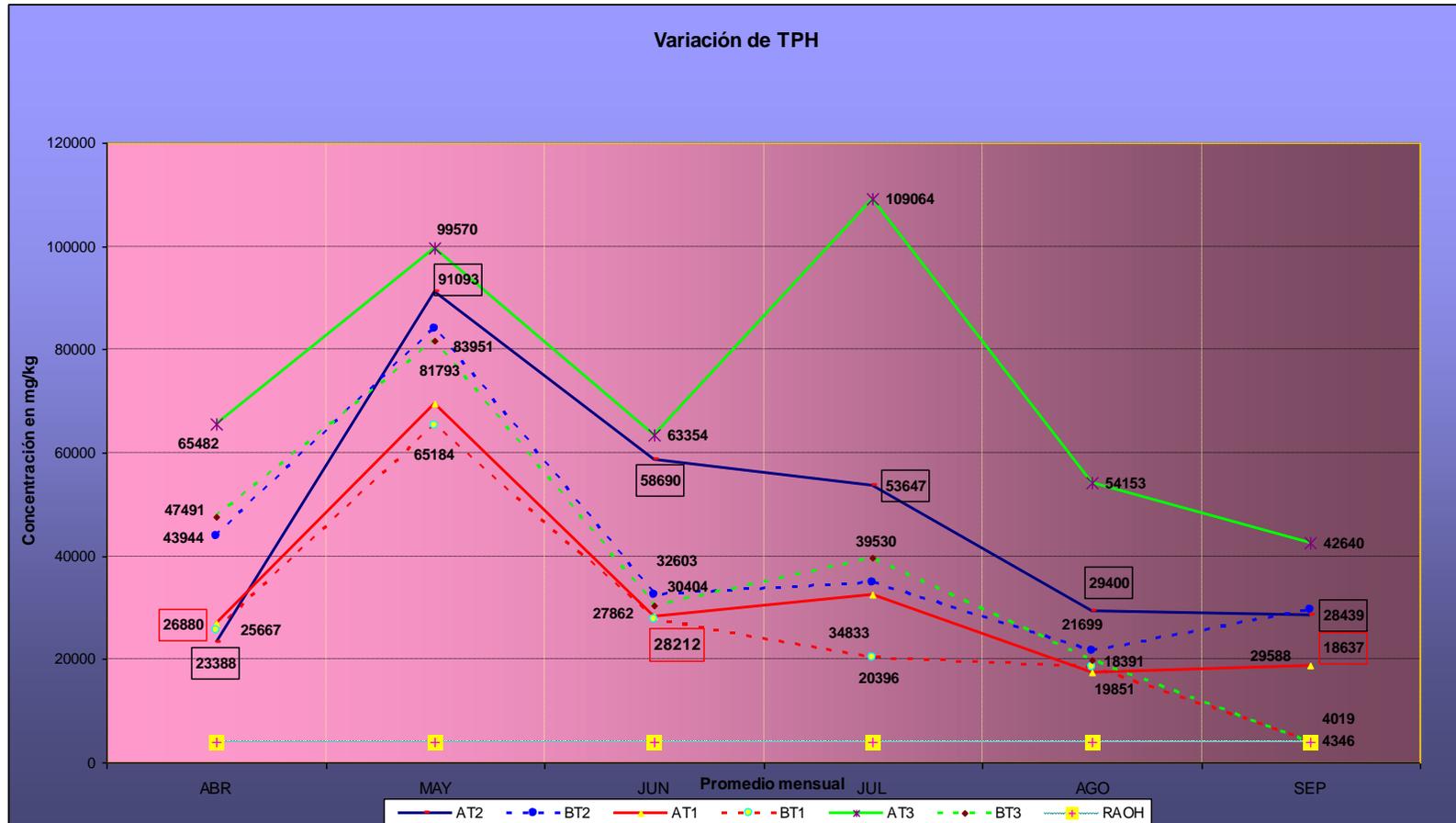


Gráfico realizado por Guido Abad

En los blancos el TPH se ha concentrado aún más que en los otros tratamientos, en consideración que el agua se ha evaporado y tenemos un crudo intemperizado, lo que demuestra la hipótesis que por si solo el fondo de tanque no se degrada.

Cuadro No.5 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE TPH EN LAS CELDAS DE EXPERIMENTACION, SE MUESTRAN DATOS INICIALES Y FINALES. EL TPH SE MIDE EN mg/kg Y A SIDO DETERMINADO POR EL MÉTODO EPA EPA No. GC-FID



Cuadro realizado por Guido Abad

Hidrocarburos Totales (TPH): Permite medir el total de hidrocarburos de petróleo solubles o recuperables en ciertos solventes, es sinónimo de hidrocarburos minerales.

En el mes de abril el muestreo se realizó en un sedimento con más de un 80% de humedad lo cual explica los valores bajos.

En el mes de mayo se observa el valor real del TPH en consideración a que por efecto de los invernaderos se produjo una evaporación agresiva dejando el suelo básicamente con la humedad de campo, excepto en los blancos que se mantienen en fase semilíquida.

Durante el proceso se tomó la decisión de tamizar el suelo a mediados de junio, para lo cual se uso medios mecánicos manuales, se cernió el suelo en cada celda, retirando piedras, trozos madera, raíces y pedazos de tela absorbente está ultima se usa para limpiar los tanques. Las piedras, maderas y raíces son parte del suelo nativo usado como agregado a los tratamientos, el mismo debido al volumen es extraído con retroexcavadora y es difícil discriminar el contenido, que al mezclarse con los fondos de tanques en un volumen que los triplica, se contaminan y absorben hidrocarburos los cuales se impregnan y no se degradan, al oxigenar y humedecer el suelo liberan hidrocarburos contaminando nuevamente el suelo en proceso de tratamiento. Al aplicar esta medida, se puede ver en los análisis realizados a fines de junio una disminución en los niveles de TPH, tendencia que se incrementa en los meses de Julio, agosto y septiembre.

Se observa que las celdas BT1 y BT3 dispuestos en los reactores con techos circulares están muy próximos a los límites permisibles para suelo

industrial, según lo establecido por el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador (RAOH).

El TPH ha sido usado por las bacterias y pseudomonas presentes en el biol y lodos activados de las plantas de tratamiento, como fuente de carbono, lo cual ha permitido que la bacteria asimile el hidrocarburo.

Los análisis de laboratorio fueron realizados por GRUNTEC el mismo que es acreditado por el Organismo de Acreditación del Ecuador (OAE), los técnicos aplicaron el método: EPA 8015 (GC-FID) para la determinación.

6.5.2 Metales pesados

Tabla No. 3 CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN CADA TRATAMIENTO SE MUESTRA DATO INICIAL Y FINAL

Metales pesados normados por el RAOH						
	Cd <10 mg/kg		Ni <100 mg/Kg		Pb < 500 mg/kg	
	ABRIL	AGOS	ABRIL	AGOS	ABRIL	AGOS
AT1	0,99	0,8	39,73	48	121,93	155
BT1	0,99	1	38,77	44,5	121,77	161,5
AT2	0,99	0,75	34,53	52	71,17	190,5
BT2	0,99	0,65	40,47	53	97,90	140
AT3	0,99	0,795	39,50	72	83,87	59
BT3	0,99	0,6	40,30	44,5	77,70	100
RAOH	9,99	9,99	99,99	99,99	499,99	499,99

Análisis de laboratorio realizados por GRUNTEC – CANADA

Tabla realizada por Guido Abad

Siendo los metales pesados altamente tóxicos, con capacidad de biocumularse y afectar severamente los órganos blancos como el cerebro, corazón riñón, la sangre, afectan a la reproducción, considerados por el IARC (International Agency for Research on Cancer) y OSHA (Occupational Safety and Health Administration), como cancerígenos para el hombre, afectan a las poblaciones más sensibles como los niños, madres embarazadas, lactantes y personas con disfunciones orgánicas.

Habiendo gran probabilidad que en los fondos de tanques estén presentes estos metales tóxicos se analizó su concentración.

Además estos metales son controlados por el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, Decreto 1215.

Por lo expuesto se determinó el cumplimiento de los parámetros de los metales establecidos en dicho estándar: Cadmio, Níquel y Plomo.

En el primer muestreo realizado en abril, se determinó que los valores estaban bajo los límites permisibles, sin embargo se realizó un análisis de reconfirmación en el mes de julio, lo que nos confirmó que los sedimentos depositados en las parcelas de experimentación cumplen con los parámetros para disposición a la intemperie, en suelo industrial

El laboratorio externo GRUNTEC envió a su casa matriz, un laboratorio certificado en Canadá para su respectivo análisis, se utilizaron los métodos EPA: 7131A para Cd, 7521 para Ni y 7421 para Pb.

6.5.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)

Constituye toda la fracción de hidrocarburos de alto peso molecular, muy difíciles de degradar, muchos de ellos considerados cancerígenos por la Asociación Americana que estudia la causalidad de cáncer por exposición a químicos, (IARC) .

El Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador establece como valor límite menos de cinco mg/kg no indica cuales deben ser analizados. En el estudio se analizó: flouranteno, Benzo (b) flouranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno, Indeno (1, 2,3-c,d) pireno y Benzo (g,h,i) perileno.

En el mes de abril se determinó que todas las celdas cumplen con parámetros, ninguno de los HAP's, llegó a más de 1.2 mg/Kg y se reconfirmó en un segundo muestreo realizado en el mes de julio, determinándose valores máximos de 1.5 mg/kg., los resultados nos indican que están bajo el límite permisible para descargas al ambiente, en suelos industriales; como es el caso del relleno sanitario del Bloque 15.

El laboratorio externo utilizó el método EPA 8270 para su determinación.

A parte de lo establecido en la ley se determinó los siguientes parámetros que generan y ayudaron al proceso de biorremediación:

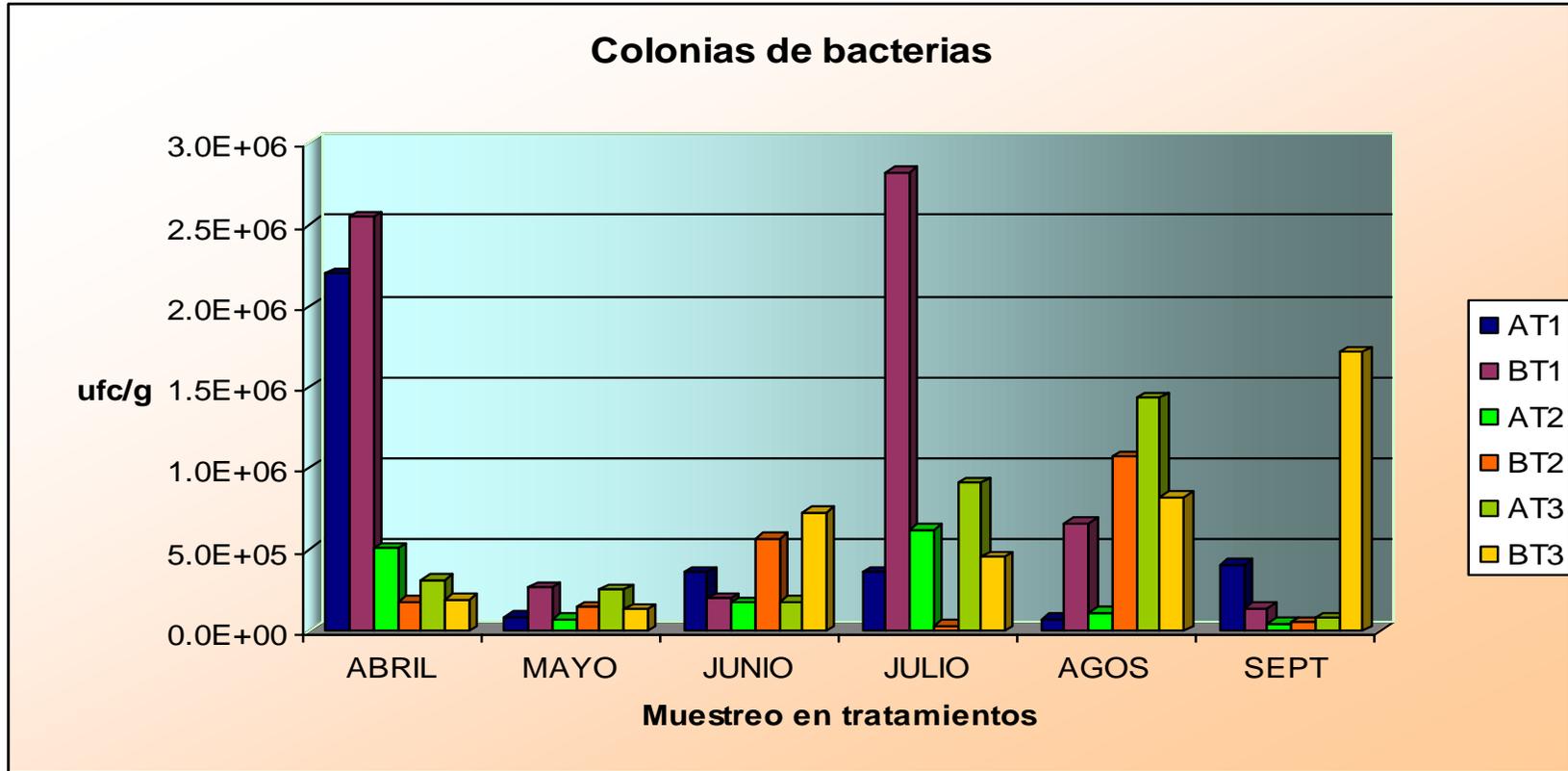
6.5.4 Población Bacteriana

Tabla No. 4 VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN LOS TRATAMIENTOS

Expresada en unidades de formación de colonias por gramo ufc/g Método de conteo placa por vertido						
	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOS	SEPT
AT1	2,2E+06	8,5E+04	3,6E+05	3,6E+05	7,4E+04	4,1E+05
BT1	2,5E+06	2,6E+05	2,0E+05	2,8E+06	6,6E+05	1,4E+05
AT2	5,0E+05	7,5E+04	1,7E+05	6,2E+05	1,1E+05	4,7E+04
BT2	1,8E+05	1,5E+05	5,7E+05	3,0E+04	1,1E+06	5,0E+04
AT3	3,1E+05	2,5E+05	1,8E+05	9,1E+05	1,4E+06	8,0E+04
BT3	1,9E+05	1,3E+05	7,3E+05	4,6E+05	8,2E+05	1,7E+06

Análisis realizado por el laboratorio Q-MAX – Blgo. Mauricio Ruales
Tabla realizada por Guido Abad

Cuadro No. 6 CONCENTRACIÓN DE LAS COLONIAS BACTERIANAS EN LOS TRATAMIENTOS
Método de conteo Placa por vertido



Cuadro realizado por Guido Abad

Análisis.- Las bacterias oscilaron entre un rango de 100.000 y tres millones de unidades de formación de colonias por gramo (ufc/gr). Notándose un descenso en junio y julio, a medida que el rango del TPH se elevó el pH disminuyó.

En el mes de julio tuvimos que mejorar la población bacteriana, colocando lodos activados de las plantas de tratamiento y una cantidad de cuatro litros por celda de biol, el biol no se pudo colocar en cantidad mayor pese a saber que en ella habitan la *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidaea*, debido a que el biol contiene melaza y ello no permite que las bacterias sobrevivientes del lecho consuman el hidrocarburo, sino que consuman el carbono más asimilable presente en la glucosa.

En el mes de agosto se observa un considerable incremento de bacterias en el tratamiento 3 siendo diez veces más en AT3; esto obedece a que en este mes se tamizó el suelo en proceso de remediación, retirado impurezas que estaban concentrando hidrocarburo y generando compactación en el suelo, que permitió que haya una mejor aireación y disgregación del suelo con lo que se mejoró la humedad del suelo y las condiciones de vida en general.

El conteo de bacterias lo realizó el laboratorio Q-MAX, utilizó el método Placa por vertido. Este método consiste en pipetear un volumen conocido (0.1 - 1.0 ml) en el medio de cultivo fundido previamente y enfriado hasta aproximadamente 40 grados Celsius; después de mezclado se vierte rápidamente en una caja Petri y se incuba. Laboratorio Q-MAX

6.5.5 Macronutrientes

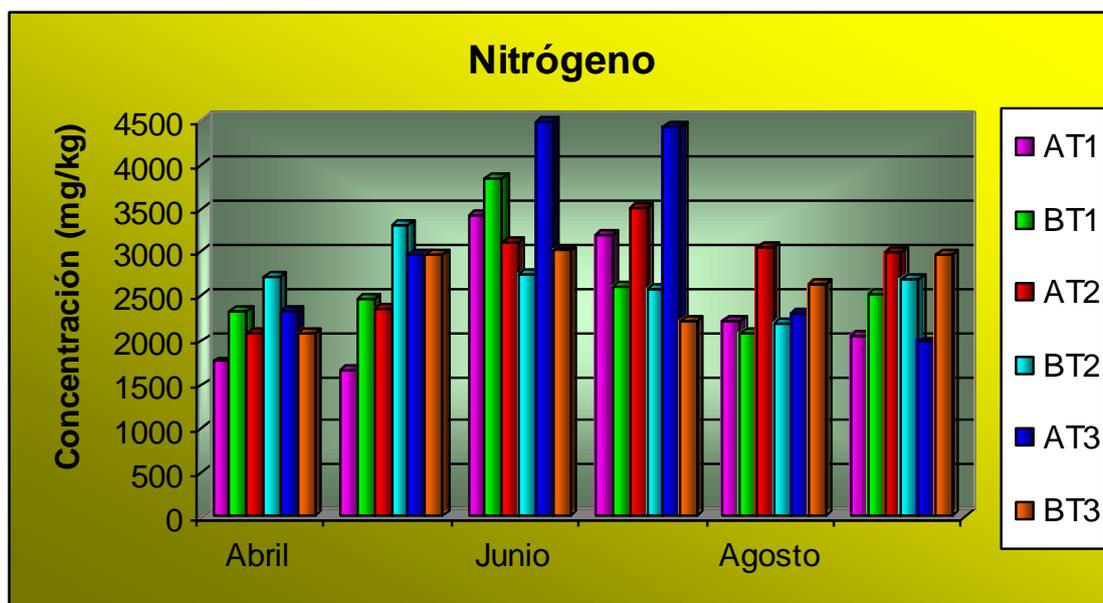
Tabla No. 5 VARIACIÓN DEL NITRÓGENO EN LOS TRATAMIENTOS, ESTÁ EXPRESADO EN mg/kg

	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOST	SEPT
AT1	1760	1662	3419	3204	2229	2052
BT1	2326	2479	3851	2607	2083	2520
AT2	2084	2367	3122	3521	3073	3016
BT2	2717	3321	2746	2589	2196	2707
AT3	2339	2970	4486	4428	2304	1983
BT3	2082	2989	3022	2230	2642	2981

Análisis realizados por GRUNTEC – Ing. Santiago Cadena – EPA 351.1

Tabla realizada por Guido Abad

Cuadro No. 7 CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN LOS TRATAMIENTOS



Cuadro estadístico realizado por Guido Abad

Análisis.- El nitrógeno es un componente mayoritario de proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Curtis y Barnes, 2000; por ello su importancia como macronutriente. En nuestro estudio observamos que en los meses de abril en el tratamiento BT2 empieza en forma natural con 2717 mg/kg, siguiendo en importancia el AT3 y BT1; a fines del mes de abril se adicionó nitrógeno como parte del fertilizante conocido comercialmente como 10-30-10 (N,P,K), en una proporción de un kilogramos por cada 10 m³ de suelo en proceso de biorremediación, se adicionó a todos los tratamientos para mejorar la composición del suelo, observando una mejor asimilación en el tratamiento BT2 que alcanza los 3321 mg/kg de suelo siguiendo el AT3 y BT3, debido a la dilución de los gránulos de fertilizante por la humectación continua y la mezcla del suelo durante la oxigenación así como el agregado de cascarilla de arroz, que se

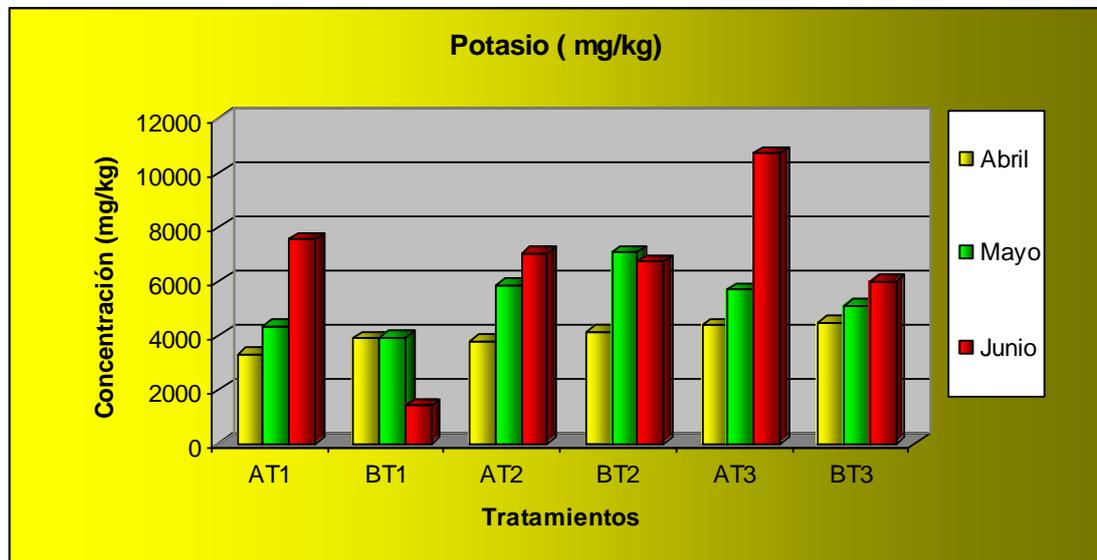
realizó a mediados de junio; se observa un incremento notable en todas las celdas de los tratamientos siendo muy notoria en los AT3 que están sembrados en los reactores con techos triangulares, coinciden con una baja viabilidad bacteriana que se puede observar en el cuadro No 6, en los meses de agosto y septiembre hay una declinación en la concentración en todos los tratamientos debido probablemente al intenso metabolismo de las bacterias presentes en la biorremediación y al apareamiento de detritívoros, en consideración que el TPH ha disminuido de concentración en los suelos como se puede observar en el cuadro No. 5.

Tabla No. 6 VARIACIÓN DEL POTASIO EN LOS TRATAMIENTOS, ESTÁ EXPRESADO EN mg/kg

	ABRIL	MAYO	JUNIO
AT1	3325	4336	7541
BT1	3902	3923	1424
AT2	3785	5866	7019
BT2	4148	7058	6714
AT3	4385	5701	10714
BT3	4467	5106	5990

Análisis realizados por GRUNTEC – Ing. Santiago Cadena – EPA 7610
 Tabla realizada por Guido Abad

Cuadro No. 8 CONCENTRACIÓN DE POTASIO EN LOS TRATAMIENTOS



Cuadro estadístico realizado por Guido Abad

El Potasio es un activador de muchas enzimas en las células, y su presencia en los suelos es muy importante para el futuro uso de las plantas en las cuales actúa en el potencial hídrico y mantenimiento del balance iónico, Curtis y Barnes 2000; allí radica la importancia de éste macronutriente en suelos contaminados. En el estudio realizado se determinó que naturalmente la concentración en suelos contaminados con hidrocarburos el potasio es pobre, en el tratamiento T3 hay un promedio de 4425 mg/kg debido a que el tratamiento T3 tiene un agregado de suelo nativo en un 27.5%, superior en un 6 % a los tratamientos T1 y 3.5 % al T2. A fines del mes de abril se adicionó al boleó NPK (10-30-10) a razón de un kilogramo por cada 10 m³ de suelo en tratamiento.

En los meses de mayo y junio se han fijado en el suelo con la ayuda de la cascarilla de arroz que sirvió para estabilizar el suelo, mantener la humedad y permitió una buena oxigenación.

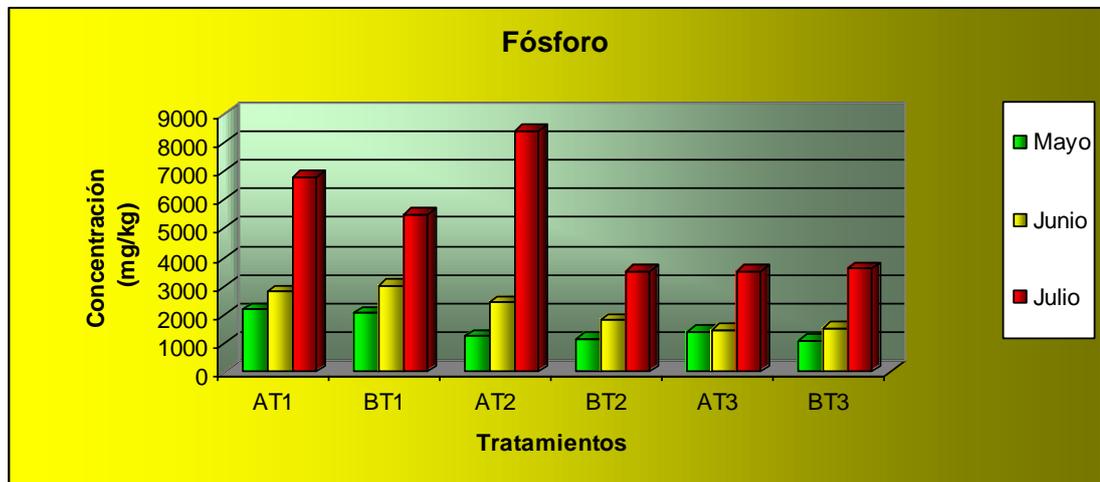
Se observa una excelente concentración en los tratamientos T3 y T1 donde inicialmente se colocó material absorbente (spag-sorb- nombre comercial).

Tabla No. 7 VARIACIÓN DEL FÓSFORO EN LOS TRATAMIENTOS, ESTÁ EXPRESADO EN mg/kg

ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO
AT1	2165	2784	6800
BT1	2046	3017	5500
AT2	1254	2417	8400
BT2	1158	1814	3500
AT3	1400	1475	3600
BT3	1097	1532	3600

Análisis de laboratorio realizados por GRUNTEC – Ing. Santiago Cadena
Cuadro estadístico realizado por Guido Abad

Cuadro No. 9 CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO EN LOS TRATAMIENTOS



Cuadro estadístico realizado por Guido Abad

El fósforo acontece en la naturaleza en forma de fosfatos orgánicos o inorgánicos y es requerido por la célula para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. Curtis y Barnes 2000.

En los resultados de los análisis se observa que en los meses de mayo y junio los valores fueron pobres no sobrepasan los 3020 mg/kg, la asimilación del suelo es más lenta que el Nitrógeno y potasio, como dijimos anteriormente se adicionó al boleó NPK a mediados de junio, el producto viene en presentación de gránulos y la dilución debió ser menor para este macronutriente, en el mes de julio se ha distribuido en el suelo, habiendo una mayor concentración en los tratamientos T1 y T2 que están en los reactores de techo triangular donde hemos visto que la temperatura y por ende la evaporación son en menor intensidad que en los reactores de techo semicircular.

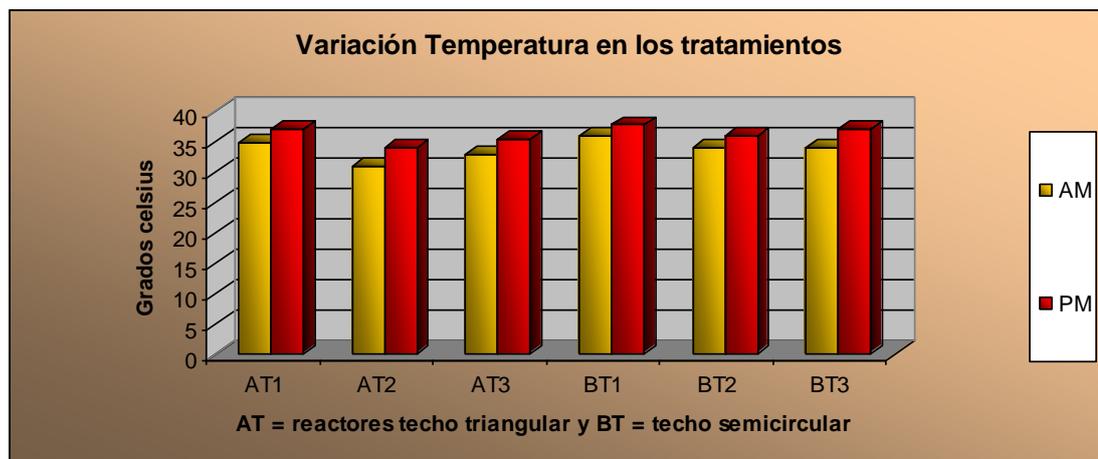
6.5.6 Temperatura

Tabla No. 8 PROMEDIO MENSUAL DE LA TEMPERATURA EN LOS MESES MÁS CALIENTES AGOSTO Y SEPTIEMBRE, EN LOS REACTORES Y TRATAMIENTOS

	AT1	AT2	AT3	BT1	BT2	BT3
AM	35	31	33	36	34	34
PM	37	34	36	38	36	37

Ing. Ambientales del campo Indillana – UB15

Cuadro No. 10 VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA EN LOS REACTORES Y TRATAMIENTOS



Cuadro estadístico realizado por Guido Abad

La temperatura es un factor fundamental en la biorremediación porque de ella depende la viabilidad de las bacterias, Moroto y Rogel - 2005

El promedio en los meses más calientes de la amazonía nos indica que la temperatura en los reactores de techo semicircular donde estaban depositados los tratamientos BT1, BT2 y BT3 presentan un promedio de 34.6 grados Celsius en la mañana y de 37 grados Celsius en la tarde, siendo muy óptima para la vida de las bacterias mesófilas, en los

reactores de techo triangular el promedio matutino fue de 33 grados Celsius y en la tarde el promedio fue de 35.6 grados Celsius. El hecho que la temperatura promedio de la tarde sea mayor en los reactores de techo semicircular hace que la temperatura del suelo disminuya más lentamente en la noche permitiendo que la actividad microbiana y bacteriológica sea más estable. En general vemos que la temperatura en los reactores de techo semicircular se mantiene más estable y hay menos pérdidas de calor en las diferentes celdas de tratamiento.

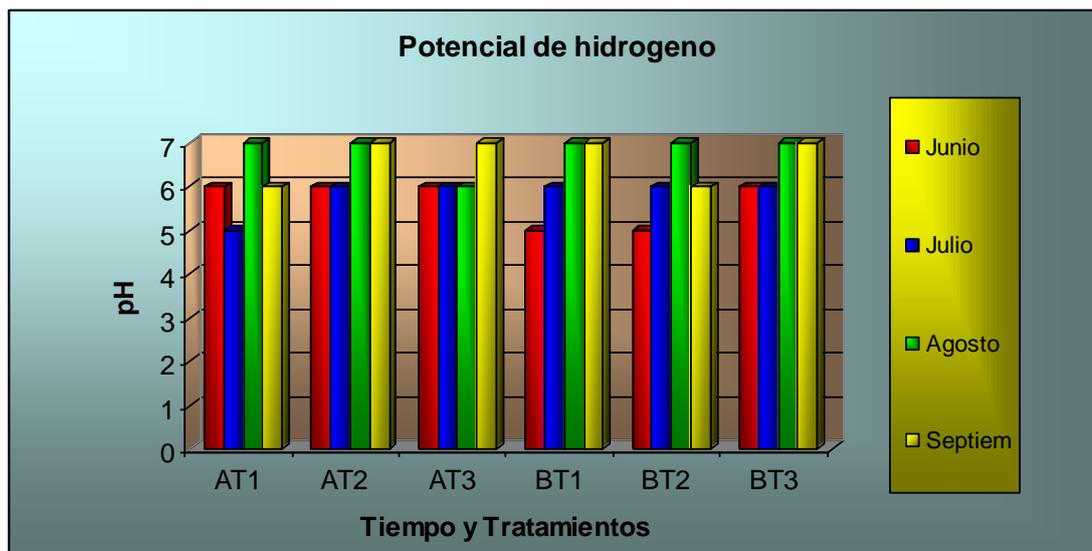
5.5.7 Potencial de hidrógeno (pH)

Tabla No. 9 PROMEDIO MENSUAL DEL POTENCIAL DE HIDRÓGENO

	AT1	AT2	AT3	BT1	BT2	BT3
8-Jun	6	6	6	5	5	6
12-Jul	5	6	6	6	6	6
28-Aug	7	7	6	7	7	7
23-Sep	6	7	7	7	6	7

Ing. Ambientales del campo Indillana – UB15

Cuadro No. 11 VARIACIÓN DEL pH A LO LARGO DEL TIEMPO EN LOS TRATAMIENTOS Y REACTORES



Cuadro realizado por Guido Abad

El pH del suelo puede afectar significativamente la actividad microbiana. El crecimiento de muchos microorganismos normalmente es máximo dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8, aunque algunos hongos tienen regiones de crecimiento óptimo a niveles de pH menores a 5.

En el mes de junio se determinó que el potencial de hidrógeno estaba muy bajo seis especialmente en los reactores con techos semicirculares, por lo cual se tomó la decisión a inicios del mes de julio de estabilizar el pH usando cal agrícola, la cual fue rociada al boleó y luego removida, se notó una mejora en los meses de agosto y septiembre, justamente en los meses que el hidrocarburo estaba siendo consumido se observó que tiene una relación directa con la vida bacteriana

Condiciones altamente ácidas o alcalinas generalmente inhiben la actividad microbiológica y muchas bacterias se benefician de las

condiciones neutras. Sin embargo hemos podido determinar experimentalmente que las cepas de: *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidae* se desarrollan con normalidad en rangos que oscilan entre 5.5 y 7.42. Lo manifiesto porque la degradación del hidrocarburo no se ha detenido.

7. CONCLUSIONES

Se ha podido demostrar que la acción bacteriana ha generado la disminución progresiva de la concentración de hidrocarburos en el suelo, estas bacterias fueron determinadas mediante aislamiento de muestras obtenidas del biol y de los lodos activados obtenidos de las plantas de tratamiento, siendo el tratamiento T3 dispuesto en el techo semicircular el más efectivo.

El proceso culminó demostrando la tendencia de la disminución progresiva del TPH que es el factor contaminante más crítico y que impide la vida vegetal, por experiencias en procesos anteriores, cuando el TPH alcanza los 6000 mg/kg la vida vegetal es posible, sobre todo gramíneas y plantas C4.

Se ha podido determinar que la temperatura se mantiene más estable en los reactores de techo semicircular, además el descenso de TPH es más uniforme en los techos circulares que en los triangulares; son más livianos; el pH se ha mantenido más estable. Por lo que tengo que concluir que los reactores con techo semicircular son los ideales.

La temperatura ideal para la supervivencia de bacterias es de 10 a 40 grados Celsius, en los techos semicirculares se ha podido alcanzar un promedio de 29 grados Celsius y por ende el control de la temperatura ha sido un factor determinante para acelerar la biorremediación.

Agregar material absorbente al proceso permite que el hidrocarburo se aglutine y evita que se genere lixiviados, por ser un material celulósico da más volumen al sustrato y mejora la aireación.

Se ha comprobado mediante análisis de laboratorio que las bacterias descomponen el hidrocarburo del sustrato y lo usan como fuente de carbono, en el estudio se aisló las bacterias degradadoras y fueron identificadas como *Pseudomona aeruginosa*, *Serratia rubidae* y *Basillus cereus*.

Los fondos de tanques desde el inicio tuvieron niveles bajos de hidrocarburos aromáticos policíclicos al igual que los metales pesados, los cuales se mantuvieron estables durante el proceso.

Las macronutrientes se han mantenido en niveles óptimos y son indispensables para la digestión bacteriana.

El mejor tratamiento es: T3= [64% de fondos de tanques de petróleo (FTP) + 6% de Biol. + 2.5% de material absorbente + 27.5% de suelo nativo]; dispuesto en un reactor de techo redondo es el efectivo.

8. RECOMENDACIONES

En el proceso debemos usar suelo proveniente de compostaje, ya que tiene un pH neutro, en relación al suelo nativo que es muy ácido y tiene una alta composición de arcillas que atrapan los micronutrientes del suelo.

Después del tercer mes que el sedimento está seco hay que tamizar el producto para retirar impurezas y poder disgregar el suelo haciéndolo más manejable y suelto, permite una oxigenación y humectación más uniformes.

Para abaratar el costo en la construcción de los reactores se puede reemplazar las estructuras de aluminio por zechas plegables de tubo metálico galvanizado.

El laboratorio que hace la medición de TPH debe utilizar el método EPA 8015 GC-FID) que es un cromatografía líquida y no usar el método EPA 8440/418.1 que consiste en usar infrarrojos, estos últimos miden toda materia orgánica asumiendo valores alterados.

Se debe mantener la humedad de campo en forma estricta después del segundo mes para mantener la viabilidad bacteriana.

El Biol tiene como componente melaza, hay que adicionarlo únicamente al inicio del proceso, si rociamos en forma repetida el mismo, estamos agregando cadenas de carbonos lineales, los cuales son asimilados con mayor facilidad por las bacterias degradadoras las cuales dejan de consumir el hidrocarburo.

Durante los dos primeros meses en los cuales se genera una agresiva evaporación de hidrocarburos livianos, los techos deben estar herméticos y no requieren irrigación por que hay gran cantidad de agua en el sedimento.

Durante los dos primeros meses en la fase de evaporación, si tenemos que ingresar al interior de los reactores se debe hacerlo vistiendo traje impermeable completo que incluye botas, guantes de nitrilo y máscaras con filtros para vapores, debido a que estos componentes volátiles son peligrosos para la salud.

La lectura del pH debe hacerse en campo una vez por semana a fin de controlarlo y mantener un rango entre 6.5 y 7.5.

Determinadas las bacterias degradadoras: *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus Sp* y *Serratia rubidae* el paso siguiente es bioaumentarlas en un caldo de cultivo en donde se les condicione a usar el hidrocarburo como fuente de carbono.

El método de biorremediación experimental ha demostrado que la acción bacteriana descompone en forma efectiva los hidrocarburos presentes en el sustrato, como producto final hemos tenido agua y materia orgánica. La degradación generada por las bacterias *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Serratia rubidae* ha transcurrido en un tiempos corto de seis meses estimándose un proceso final de ocho meses, el precio del tratamiento es de 70 dólares el metro cúbico muy competitivo si lo comparamos con los 400 dólares que cobran las incineradoras. Los riesgos asociados a derrames en el proceso de biorremediación, tratadas en piscinas herméticas como las utilizadas en la experimentación son cero

versus el potencial de transportarlas del sitio de origen hasta las facilidades de incineración.

La entropía usada en la biorremediación es la natural en relación a la alta cantidad de energía que se usa en la incineración.

Las emisiones atmosféricas y la probable generación de dioxenos y furanos esta presente en la incineración a diferencia de emisiones mínimas en el proceso de biorremediación. Con lo cual queda comprobada que la hipótesis alterna es verdadera.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Babor Joseph, Ibarz José, (1983). Química General Moderna. Ed. Marín. Sexta edición.
- Corbitt, Robert, 2003. Manual de Referencia de la Ingeniería Ambiental. Ed. Mc Graw Hill. Primera edición.
- Curtis, Helena, Barnes, N. Sue. (2001). Biología. Ed. Médica Panamericana Buenos Aires. Sexta edición.
- Eweis, Juana, Ergas, Sarina. (2000). Principios de biorrecuperación. Ed. Mc Graw Hill. Primera edición.
- Hickman Cleveland, Roberts Larry, Larson Allan, (2001). Principios Integrales de Zoología. Ed. Mc Graw Hill. Undécima edición.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 2001
- La Enciclopedia del estudiante, (2006). Ciencias de la Vida. Ed. Santilla Primera Edición.
- Labrega A. et al. (1996).Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Ed. Mc Graw Hill.
- Levin L, Gealt M. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicación. Ed. Mc Graw Hill. (1997)

- Moroto Arroyo M^a Esther, Rogel Quesada (1999). Div. Protección Ambiental de Suelos
- Nebel Bernard, Wright Richard. Ciencias Ambientales. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Sexta edición 1999
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration) 2001
- Reglamento Sustitutivo al Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador, (2003).
- Seoáñez Mariano. (1999) Contaminación del suelo, Estudios, tratamiento y gestión. Ed. Mundi prensa
- Thechnology – Evaluation-Report –EPA. (1998)
- Vargas Paola, Cuellar Rene, Dussán Jenny. (1999) Biorremediación de residuos de petróleo.
-
- Ecuavital. BIOX, Biorremediación, maveiga2005@yahoo.com.mx

10. ANEXOS

ANALISIS LABORATORIO DE GRUNTEC Y Q-MAX