



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO  
ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y  
BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR,  
PROVINCIA DE SUCUMBOS.**

**DIRECTOR: ING. RAFAEL VARGAS**

**CODIRECTOR: ING. PEDRO ROMERO**

**SANGOLQUÍ, ABRIL 2014**

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Edison Patricio Marcillo Tipán

**COORDINADOR DE CARRERA**

---

Dra. María Augusta Chavez, M.Sc.

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Ab. Carlos Orozco, M.Sc.

Sangolquí, 17 de abril de 2014

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. Edison Patricio Marcillo Tipán como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí 17 de abril de 2014

Fecha

\_\_\_\_\_  
Ing. Rafael Vargas

DIRECTOR

\_\_\_\_\_  
Ing. Pedro Romero

CODIRECTOR

**CERTIFICADO DEL BIOMETRISTA**

Sangolquí, 17 de Abril del 2014

Yo, Ing.-Mat. Pedro Romero Saker, en calidad de *Biometrista* de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, certifico que he constatado la presencia de la propuesta estadística del anteproyecto de grado elaborado por el Sr. estudiante EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN, titulado “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS.” y revisado por el Ing. Rafael Vargas que funge como Director y por Ing.-Mat. Pedro Romero Saker que funge como Codirector.

Atentamente,

---

Ing.- Mat. Pedro Romero Saker  
Docente Biometrista  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

prs.

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Sangolquí, 17 de Abril del 2014

Yo, EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN.

**Declaro que:**

El perfil de tesis de graduación “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS.” ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría. En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

---

EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN

1715898480

L00276388

0995685188 / 022334858

edionpmarcillo@gmail.com

## AUTORIZACIÓN

Yo, EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la institución la tesis de grado titulada: “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de abril de 2014

---

EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN  
1715898480  
L00276388  
0995685188 / 022334858  
edionpmarcillo@gmail.com

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mis padres quienes han sido el motor que me ha impulsado hasta culminar con existo esta etapa de mi vida.

A mis hermanos Luis y Elena quienes siempre han estado a mi lado.

Edison Patricio Marcillo Tipán.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios ya que en muchos momentos de mi vida decaí y me sentía sin fuerzas para culminar este trabajo.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE donde aprendí y me forme como persona y que fue la cuna de mi conocimiento.

A mis padres y mis hermanos Luis y Elena por su inmenso apoyo en cada época de mi vida.

Al Ing. Rafael Vargas quien por la confianza depositada en mi, su ayuda y entrega me permitieron seguir adelante con el trabajo, al Ing. Pedro Romero por su colaboración en este trabajo.

Al Ing Richard Aguirre y todo el personal de la empresa Respuestambiental quienes me dieron las herramientas para realizar el trabajo de campo.

A todos mis amig@s por su amistad durante toda la carrera en especial a la Ing. Fernanda Chico quien fue un apoyo fundamental en la realización de este trabajo.



## INDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	i
CERTIFICACIÓN .....	ii
CERTIFICADO DEL BIOMETRISTA.....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
INDICE DE CONTENIDOS .....	viii
LISTADO DE TABLAS.....	xi
LISTADO FIGURAS .....	xii
LISTADO DE GRÁFICOS .....	xiii
LISTADO DE ANEXOS .....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
1.1    Formulación del problema.....	1
1.2    Justificación del problema.....	2
1.3    Área de interés.....	4
1.3.1    Línea de Investigación.....	4
1.3.2    Sublíneas de Investigación.....	4
1.4    Objetivos de la investigación.....	4
1.4.1.    Objetivo General .....	4
1.4.2.    Objetivos Específicos .....	4
1.5    Marco teórico.....	5

1.5.1	Suelo .....	5
1.5.2.	Contaminación por hidrocarburos .....	8
1.5.3.	Biorremediación y tecnologías usadas .....	13
1.5.4.	Landfarming .....	19
1.5.5.	Bioestimulación.....	21
1.5.6.	Degradación enzimática .....	22
1.6	Hipótesis.....	25
CAPÍTULO II .....		26
2.1	Participantes.....	26
2.2	Zona de estudio.....	26
2.2.1.	Área de ensayo .....	27
2.2.2.	Características del terreno .....	27
2.3	Periodo de tiempo de la investigación.....	28
2.4	Procedimientos.....	29
2.4.1.	Materiales .....	29
2.4.2.	Métodos.....	30
2.5.	Diseño experimental.....	35
2.5.1.	Factores y tratamientos en estudio.....	35
2.5.2.	Diseño experimental usado en los ensayos .....	37
2.6.	Análisis de datos. ....	37
CAPÍTULO III.....		38
3.1	Ensayos de landfarm.....	38
3.1.1	Caracterización del suelo contaminado. ....	38
3.1.2	Bioestimulación .....	39
3.2	Variables de control.....	40
3.2.1	TPH.....	40

3.2.2	pH.....	48
3.2.3	Temperatura.....	50
3.2.4	Tiempo .....	51
3.3	Cinética de degradación .....	53
3.3.1	Determinación de Km. ....	53
3.3.2	Proyección según ecuaciones de cinética química.-.....	58
3.4	Rendimiento.....	61
3.4.1	Tasa de degradación .....	61
3.4.2	TPH.....	63
CAPITULO IV.....		65
DISCUSIÓN .....		65
CAPÍTULO V .....		72
CONCLUSIONES .....		72
CAPÍTULO VI.....		76
RECOMENDACIONES .....		76
CAPITULO VII .....		78
BIBLIOGRAFÍA .....		78

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Reacción acidez-alkalina.....	7
Tabla 2.	Valores permisibles de TPH en suelo. ....	12
Tabla 3.	Análisis de alternativas de biorremediación .....	15
Tabla 4.	Factor T: Fuentes de hidrocarburo usados en el ensayo de landfarm .....	35
Tabla 5.	Factor D: Dosis del inoculante enzimático. ....	35
Tabla 6.	Tratamientos resultantes de la combinación de los factores usados .....	36
Tabla 7.	Resultados de la caracterización inicial del suelo contaminado .....	39
Tabla 8.	Concentración de TPH (mg/kg) .....	41
Tabla 9.	Comparación Tukey contra el factor de contaminación. ....	43
Tabla 10.	Comparación Tukey contra la concentración de enzima. ....	45
Tabla 11.	Interacción entre variables de control para el proceso .....	47
Tabla 12.	Control de pH durante el proceso de biorremediación. ....	49
Tabla 13.	Control de temperatura durante el proceso de biorremediación .....	50
Tabla 14.	Análisis Tiempo / TPH. Prueba Tukey Alpha=0,05 .....	51
Tabla 15.	Concentración de TPH (mg/kg) .....	53
Tabla 16.	Logaritmo natural de la concentración de TPH (mg/kg) .....	54
Tabla 17.	Coefficiente de determinación $R^2$ , cinética de primer orden.....	55
Tabla 18.	Recíproco de la concentración de TPH (mg/kg) .....	57
Tabla 19.	Coefficiente de determinación $R^2$ , cinética de segundo orden.....	58
Tabla 20.	Valores de incumplimiento de legislación ambiental. ....	59
Tabla 21.	Días para cumplir con legislación ambiental .....	60
Tabla 22.	Tasa de degradación de TPH en función del tiempo. ....	62

**LISTADO FIGURAS**

Figura 1. Reacciones aerobia y anaerobia.....	14
Figura 2. Ruta habitual de degradación de los hidrocarburos aromáticos. ....	24
Figura 3. Metodología: (n)-Alkanes BIO-CRACKING.....	25
Figura 4. Distribución de las unidades experimentales en el área de ensayo .....	28
Figura 5. Dimensiones de cada una de las camas en el ensayo de landfarm. ....	32

## LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Variación de TPH durante el proceso de biorremediación. ....	42
Gráfico 2.	Análisis estadístico del TPH / Factor de contaminación. ....	44
Gráfico 3.	Análisis estadístico del TPH / Concentración de enzima. ....	46
Gráfico 4.	Análisis estadístico para la interacción de las variables de control. ....	47
Gráfico 5.	Variación del pH durante el proceso de biorremediación.....	50
Gráfico 6.	Variación de la temperatura durante el proceso de biorremediación.....	51
Gráfico 7.	Análisis estadístico en función de los tres meses del ensayo. ....	53
Gráfico 8.	Cinética de primer orden para diésel. ....	56
Gráfico 9.	Cinética de primer orden para bunker.....	56
Gráfico 10.	Cinética de primer orden para el factor diésel .....	60
Gráfico 11.	Tasa de degradación de TPH. ....	62
Gráfico 12.	Remoción de TPH en la muestra experimental.....	63
Gráfico 13.	Evaluación de rendimiento a los 90 días.....	64

**LISTADO DE ANEXOS**

<u>Anexo A</u> .....	80
Anexo B .....	81
Anexo C .....	82
Anexo D.....	86
Anexo E.....	87
Anexo F.....	88

## RESUMEN.

Los avances tecnológicos en el desarrollo de enzimas capaces de degradar muchos compuestos ha llevado a que se creen consorcios específicos para la degradación de distintos tipos de hidrocarburos ligadas a las condiciones de la parroquia el Reventador, además de establecer las condiciones apropiadas para que las enzimas tengan mayor grado de remoción de hidrocarburos. Se utilizaron diferentes tipos de concentraciones de enzima, volumen de hidrocarburo en el suelo. Para determinar la tasa de remoción de hidrocarburo en el suelo, se elaboraron curvas de cinética mediante las concentraciones iniciales y finales en función del tiempo. Los resultados de los análisis realizados muestran que las enzimas a una concentración de 20 ml de enzima trabajaron mejor para diésel y 40 ml de enzima para remoción de bunker, y que al ser utilizadas en hidrocarburo liviano como en diésel tiene mejores resultados, la eficiencia en la remoción de hidrocarburos pesados como el bunker si bien tuvo resultados favorables este no tuvo la capacidad de llegar a los límites permisibles en el tiempo previsto.

### **Palabras clave:**

1. Enzima
2. Cinética
3. Hidrocarburo
4. Concentración
5. Remoción



## ABSTRACT

Technological advances in the development of enzymes capable of degrading many compounds has led consortia are created specifically for the degradation of various types of hydrocarbons linked to the conditions of the Reventador parish, besides establishing the right conditions for the enzymes have greater hydrocarbon removal. We used different concentrations of enzyme types, volume of hydrocarbon in the soil. To determine the rate of removal of hydrocarbons in the soil, kinetic curves were drawn through initial and final concentrations versus time. The results of the analysis show that the enzyme at a concentration of 20 ml of enzyme worked better for diésel and 40 ml of enzyme for removal of bunker, and that when used in diésel hydrocarbon as light has better performance, efficiency in the removal of heavy hydrocarbons such as bunker had favorable results but this did not have the ability to reach the permissible limits on time.

### **Keywords:**

1. Enzyme
2. Kinetics
3. Hydrocarbon:
4. Concentration
5. Removal

## CAPÍTULO I

### EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS.

#### 1.1 Formulación del problema

En el desarrollo de la industria hidrocarburífera en el Ecuador se ha generado graves problemas ambientales, principalmente en las provincias de Sucumbíos, Orellana y Pastaza, en donde se llevan a cabo las operaciones de exploración, producción, refinamiento y transporte de crudo y sus derivados.

La utilización de tecnología obsoleta en la actividad hidrocarburífera sumado al poco nivel de control institucional ambiental ha conducido a que esta actividad se desarrolle de manera inadecuada, provocando una aceleración en los niveles de contaminación y en el número de derrames petroleros, cuyas causas han sido la utilización irresponsable de tecnología obsoleta y hábitos contaminantes irresponsables (Guaranda, 2012).

Según lo menciona Guaranda en el boletín ambiental de la Fundación Regional de Asesoría en Derechos Humanos (Guaranda, 2012), los derrames petroleros en diferentes partes del Ecuador han sido numerosos, generando pérdidas cuantiosas tanto en aspectos económicos como en bienes ambientales. En el 2003 hubo 138 derrames (2,8 semanales, en promedio), en el 2004 esa cifra llegó a 178 (3,7 semanales). En el 2005, bajó a 169 (3,5 por semana).

En el año 2008 hasta el mes de septiembre, según datos de Petroecuador, en el país se registraron 117 derrames de petróleo, lo que revela que un incidente de este tipo se produjo cada dos días, en promedio (Guaranda, 2012).

## **1.2 Justificación del problema**

La biorremediación actualmente utiliza distintos tipos de microorganismos, enzimas y plantas para lograr la remediación del medio contaminado, y aunque la biorremediación con enzimas es la menos utilizada en estos tiempos, tiene excelentes ventajas.

Según lo indica (Mulas, 2014), en su trabajo sobre fundamentos de biorremediación, las enzimas son estructuras bioquímicas las que aceleran cambios químicos, generando reacciones de transformación bioquímica con un gasto energético mínimo y con una alta velocidad de reacción. Las enzimas son producidas por células como resultado de los procesos que acompañan a la traducción de la información genética. Mediante el uso de técnicas de biología molecular, se puede inducir la producción de enzimas en sistemas bacterianos con características genéticas que permiten una expresión del gen enzimático en forma constante. Con esto se logra obtener un sistema productor de enzima a gran escala, proceso biotecnológico.

La degradación por acción de enzimática, tiene como principio agregar enzimas al lugar y/o sitio contaminado con la finalidad de degradar las sustancias nocivas o degradar los compuestos de hidrocarburos. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad y que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

La presente investigación estará enfocada a optimizar la técnica de biorremediación Landfarm, si bien es un proceso ya descrito lo que se desea realizar es una investigación que estandarice un procedimiento a condiciones de prueba piloto, llevando los conocimientos generados en laboratorio a condiciones reales de clima, pH, temperatura, humedad, geomorfología del suelo, cantidad de luz natural, consorcios bacterianos autóctonos (Araujo, 2004), con lo cual se pueda obtener resultados que repercutan en mejores técnicas de biorremediación, además esto ayudara al ambiente.

Además, los compuestos derivados del petróleo son compuestos nocivos para los seres humanos, son una amenaza tanto para la vida acuática como para la terrestre, pues su acumulación en diversos ambientes impide un normal desarrollo de organismos que viven en estos medios, causando alteraciones en el ecosistema (Annachhatre & Gheewala, 1996).

Existen varias técnicas que han sido usadas para remover Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) de suelos contaminados, entre ellos físicos, químicos y biológicos. Los procesos biológicos, como es la biodegradación, han recibido mayor atención debido a que son amigables con el ambiente (Agarry & Solomon, 2008).

La importancia de trabajar con un inóculo enzimático es que es biodegradable, además este permitirá catalizar las reacciones para que el TPH pueda ser reducido en menor tiempo, logrando que los tiempos de biorremediación sean más cortos y por ende menos costoso.

### **1.3 Área de interés**

Energía y Recursos Naturales

#### **1.3.1 Línea de Investigación**

Ambiente

#### **1.3.2 Sublíneas de Investigación**

Prevención y Remediación Ambiental

### **1.4 Objetivos de la investigación**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la eficiencia de un inóculo enzimático como acelerador del proceso de landfarm en biorremediación de suelo contaminado con diésel y búnker.

#### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar las condiciones físico-químicas del suelo antes de la contaminación, después de la contaminación y al final del proceso de biorremediación en niveles de macro y micro nutrientes.
- Optimizar la concentración de inóculo enzimático para obtener el mayor porcentaje de remoción de TPH en suelo contaminado.
- Evaluar la influencia de las condiciones ambientales pH y temperatura sobre un proceso de biorremediación.
- Determinar el orden cinético de degradación que cumple este proceso de biorremediación.

- Generar un escalado inverso que simule condiciones: físicas, químicas y biológicas en el suelo.

## **1.5 Marco teórico**

### **1.5.1 Suelo**

El término suelo se refiere al material suelto de la superficie de la tierra, formado por una agregación de minerales no consolidados, agua, aire, materia orgánica, inorgánica y organismos vivos. La fase mineral supone más del 50% de volumen total del suelo, conformada en su mayoría por SiO<sub>2</sub>, Al y Fe y en menor cuantía al Ca, Mg, K, Ti, Mn, Na, N, P y S. El agua y aire conjuntamente constituyen el volumen de poros que varía entre un 25 y 50%. (Eweis, 1999).

#### **1.5.1.1. Características físico-químicas y microbiológicas**

##### **a) Densidad**

Se puede referir al material sólido que compone el suelo y entonces se habla de densidad real, o a la densidad calculada considerando el espacio total ocupado por los componentes sólidos más el espacio poroso y se denomina densidad aparente. La densidad de los suelos superficiales son sustancialmente diferentes, oscilan entre 1,00 a 1,60 gr/ml; mientras que la densidad real de los sólidos en los suelos minerales oscila entre 2,60 y 2,70 g/ml (Buckman, 1985).

La cantidad de materia orgánica en un suelo afecta a la densidad, al pesar mucho menos que un volumen igual de sólidos de minerales (Buckman, 1985).

## **b) Porosidad**

La porosidad de los suelos habitualmente se determina de forma indirecta a partir del valor de la densidad aparente; en laboratorio se puede medir de forma directa utilizando un porómetro (FAO, 1997).

La densidad real normalmente se considera estándar para todos los suelos, y se le asigna un valor medio de 2,65 g/cm<sup>3</sup> (FAO, 1997).

El espacio poroso de un suelo está ocupado por aire y agua. Para la mayor parte de los suelos, la porosidad varía entre 25 y 50%, sin embargo en los suelos varía considerablemente debido a los cambios resultantes de procesos como la expansión, contracción, dispersión, compactación y fisura. Los suelos compactados presentan una porosidad baja (Buckman, 1985) (Eweis, 1999).

## **c) Humedad**

En general al agua del suelo se la ha clasificado en tres tipos: la gravitacional es la que se desplaza en sentido descendente bajo la influencia de la gravedad, está disponible para microorganismos y plantas, juega un papel muy importante en el transporte. El agua capilar es la que se encuentra retenida en los poros, está disponible para microorganismos. El agua osmótica es retenida por las partículas de arcilla y humus, esta no está disponible para los microorganismos ni las plantas (Eweis, 1999).

La capacidad de campo definida por (Veihmeyer & Hendrickson, 1949), como la cantidad de agua retenida en el suelo saturado, oscila entre 18 y 30% en peso en función del contenido de arcilla.

#### d) pH

Como indica (Benzina, 2001), el pH es el grado de alcalinidad o acidez del suelo, basada en la concentración de iones hidrogeno en solución. El valor de pH en la mayoría de los suelos se encuentra entre 4 y 8.

El balance hídrico de un suelo es decisivo para el pH. Según (Benzina, 2001), (Buckman, 1985), los suelos arcillosos tienden a acidificarse en los climas húmedos, debido al cambio iónico y a la lixiviación de cationes básicos.

Una acidez marcada es un síntoma de deficiencia de nutrientes. En suelos con pH menor a 6,5 se reduce la biodisponibilidad de P, Mg, Al, Ca, Mo, B. en suelos con pH mayores a 6,5 se reduce la disponibilidad de Cu, Mn, Zn, Fe, B (Suquilanda, 1996).

**Tabla 1.** Reacción acidez-alkalina

pH	Rangos
Muy fuertemente ácido	Menor a 4,5
Fuertemente ácido	4,6 a 5,5
Medianamente ácido	5,6 a 6
Ligeramente ácido	6,1 a 6,5
Neutro	6,6 a 7,3
Ligeramente alcalino	7,4 a 7,8
Moderadamente alcalino	7,9 a 8,4
Fuertemente alcalino	8,5 a 9
Muy fuertemente alcalino	Mayor a 9,1

**Fuente:** Tabla 4 del Libro VI, Anexo 2. TULAS.



#### **e) Materia orgánica**

La materia orgánica está constituida principalmente de dos grupos: material parcialmente descompuesto y el humus, el primero sujeto al ataque de los microorganismos y el segundo un producto coloidal que poseen una estructura compleja y resistente a transformaciones biológicas adicionalmente, material de color negro o pardo. La materia orgánica en el suelo oscila entre 3 y 6% como valor promedio (Buckman, 1985) (Eweis, 1999).

#### **f) Nutrientes**

Los nutrientes como indica (Suquilanda, 1996), se agrupan en macronutrientes primarios (N, P y K) y secundarios (Ca, Mg, y S) y micronutrientes o oligoelementos (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo, y Cl).

#### **g) Microorganismos.**

Los organismos vivos ocupan al menos un 1% del volumen total del suelo. Existe una gran cantidad de microorganismos en el suelo como bacterias, hongos, algas, actinomicetos y protozoos con diferentes densidades poblacionales. De acuerdo a las condiciones del suelo y la presencia abundante de nutrientes. El número de bacterias en la superficie de los suelos oscila entre  $10^7$  a  $10^{10}$  UFC/g de suelo (Eweis, 1999).

### **1.5.2. Contaminación por hidrocarburos**

Suelo contaminado es todo aquel cuyas características físicas, químicas y biológicas naturales, han sido alteradas debido a actividades antropogénicas y representa un riesgo para la salud humana o al medio ambiente (MAE, 2000).

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos principalmente por carbono e hidrogeno, con contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno y trazas de metales pesados.

La extracción, transporte y procesamiento del crudo, genera grandes volúmenes de desechos como ripios, lodos petrolizados, aguas de formación y petróleo crudo, constituidos básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar de manera natural por la complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminantes si no se manejan de manera adecuada (Eweis, 1999).

La contaminación se produce como consecuencia de accidentes durante la producción y transporte de petróleo; esta situación ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que la recuperación de terrenos y aguas contaminadas se ha convertido en una importante industria en todo el mundo (Levin & Lee, 1997).

La contaminación del suelo con hidrocarburo es dinámica, los componentes individuales pueden separarse de la mezcla original, así tenemos que algunos hidrocarburos como los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), se evaporan; otros hidrocarburos se solubilizan gracias a la polaridad de sus moléculas; otros compuestos se adsorben en la superficie de la fase solida del suelo por reacciones químicas o por fuerzas físicas, siendo la primera la que fija los contaminantes, esto limita el transporte y disminuye la biodisponibilidad para los microorganismos; mientras otros son degradados por microorganismo en el suelo y otros por

degradación química. Como resultado de estas transformaciones los hidrocarburos se enriquecen en compuestos pesados, más difíciles de degradar (Eweis, 1999).

Durante la primera mitad del siglo, se desarrollaron métodos sofisticados para el tratamiento de contaminantes, tales como los lechos bacterianos, lodos activados o la fermentación anaerobia (Eweis, 1999), y desde 1960, se han seguido incluyendo nuevos métodos de aplicación a los terrenos y procesos para la degradación de determinados tipos de compuestos bajo la categoría de procesos de tratamiento biológico (Ryan & Loehr, 1991).

#### **1.5.2.1. Contaminación del suelo por hidrocarburos en Ecuador**

Antes de 1993, las actividades de exploración y producción de hidrocarburos en el Ecuador, no tenían regulaciones ambientales. Durante este periodo estas actividades generaron lo que ahora se identifica como pasivos ambientales. Se registran numerosos derrames, operaciones accidentales, rotura de oleoductos, accidentes de auto tanque y piscinas para depósitos de residuos que en general fueron construidas alrededor de las instalaciones industriales (PEPDA, 2012).

En el sector de El Reventador, durante los últimos años se han dado casos de derrames productos de diversas circunstancias, es así que uno de los primeros desastres de estos fue el 5 de marzo de 1987 en donde el oleoducto SOTE fue destruido en varios puntos siendo la población de El Reventador una de las afectadas y en donde hasta el día de hoy se mantiene puntos de acumulación de petróleo, durante los últimos años derrames de combustibles (bunker y diésel), han afectado la misma población, la rotura del oleoducto de crudos pesado OCP también afecto a

esta población en el año 2009, en el 2013 un rotura del oleoducto SOTE genero un derrame viéndose afectada la parroquia El Reventador de manera directa.

#### **1.5.2.2. Comportamiento de los derrames de hidrocarburos en el suelo.**

Se considera que los derrames en el suelo son más fáciles de manejar y sus efectos son menores que en el agua debido a que en tierra el esparcimiento del petróleo y sus derivados es menor. Esto es relativo ya que el comportamiento de petróleo en tierra varía de acuerdo al tipo y naturaleza del suelo, la pendiente, tipo de vegetación y al tipo de crudo derramado (Petroleo, 2000).

La penetración de los hidrocarburos en el suelo depende de la textura, porosidad y estructura del suelo, ya que la filtración depende básicamente de la permeabilidad del mismo. La infiltración ocurre por los canales no capilares, o sea por los cuales el agua drena por gravedad hasta el nivel de las aguas freáticas. El crudo sigue la trayectoria de menor resistencia (Petroleo, 2000).

El volumen y la viscosidad de los hidrocarburos influyen en el comportamiento del derrame. Un petróleo crudo de baja viscosidad su puede infiltrar rápidamente en el suelo poroso seco, reduciendo de esta manera la tasa de esparcimiento sobre la superficie del suelo. Los crudos muy viscosos tienden a esparcirse aunque el movimiento puede ser muy lento (Petroleo, 2000).

#### **1.5.2.3. Legislación aplicable**

Con el fin de regular las actividades hidrocarburífera en el Ecuador que son susceptibles de producir impactos ambientales en el área de influencia directa, el gobierno expide según decreto ejecutivo N° 2982, publicado en el registro oficial N° 766 del 24 de agosto de 1995 el Reglamento Ambiental para las Operaciones

Hidrocarburífera en el Ecuador, dicho reglamento fue reformado según registro oficial 265 el 13 de febrero de 2001, tomando el nombre de Reglamento Sustituto Ambiental para las Operaciones Hidrocarburífera en el Ecuador, decreto N° 1215 RAOH, actualmente vigente, en el que se incluye normas técnicas ambientales, parámetros y límites permisibles, formatos, métodos y definiciones de los términos en la industria hidrocarburífera (MAE, Decreto ejecutivo 1215, 2001).

Los límites permisibles aplicables para suelos contaminados con hidrocarburos se encuentran en la tabla 6 del RAOH 1215, de acuerdo al uso posterior a darse al suelo remediado, enlistados en la siguiente tabla (MAE, Decreto ejecutivo 1215, 2001).

**Tabla 2.** Valores permisibles de TPH en suelo.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistema Sensible
Hidrocarburos Totales	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000

Fuente: Tabla 6 RAOH Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265 de 13-02-2001.

#### **1.5.2.4. Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)**

El término TPH se usa para describir a un grupo de sustancias químicas, derivadas de petróleo crudo. Debido a la cantidad de hidrocarburos involucrados, generalmente no es práctico medir cada uno de ellos, sin embargo, es útil medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburo que se encuentra en una muestra de suelo contaminado, que sirve como indicador general del tipo de contaminación del sitio (Petroecuador, 1999).

### **1.5.3. Biorremediación y tecnologías usadas**

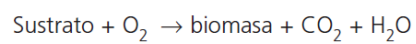
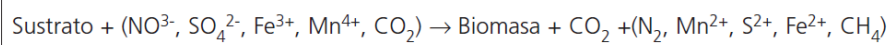
#### **1.5.3.1. Biorremediación**

La biorremediación es una tecnología que utiliza la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su toxicidad, proceso que puede mejorarse con la aplicación de diversas tecnologías como la adición de cultivos mixtos, compostaje y fertilización (Levin & Lee, 1997).

#### **1.5.3.2. Fundamento bioquímico de la biorremediación**

Según Eweis 1999., el fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, 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 (Figura 1)

**Degradación aerobia:****Degradación anaerobia:**

**Figura 1.** Reacciones aerobia y anaerobia.

1.5.3.3. Tecnologías usadas en biorremediación.

Tabla 3. Análisis de alternativas de biorremediación

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	ACTIVIDADES		VENTAJAS	DESVENTAJAS
		PRINCIPALES	COMPLEMENTARIAS		
<b>Bioventeo por Volteo Mecánico.</b>	TRATAMIENTO BIOLÓGICO POR INSERCIÓN DE AIRE INTERSTICIAL EN EL SUSTRATO PARA INCREMENTAR CONDICIONES AEROBIAS. VOLTEO MECÁNICO DEL SUELO CONTAMINADO.	Delimitación de área de intervención		Simple	Tasas de degradación lentas
		Preparación de sustrato.	Inserción de fertilizantes	No muy costoso en lo referente a la técnica	Altos periodos de incubación.
			Adecuación de drenajes y API		Uso de mayor área que original por limitaciones en espesor de la capa en zona de control
		Volteo Mecánico de sustrato contaminado	Volteo Manual	Uso de maquinaria menor (moto cultivadora)	Generación de fuentes de trabajo
	Imposibilidad práctica en zonas con pendientes moderadas e inclinadas				
<b>Bio Aumentación</b>	TRATAMIENTO BIOLÓGICO POR INOCULACIÓN DE NUTRIENTES Y ENZIMAS EN SUSTRATO CONTAMINADO. INTEGRACIÓN DEL SUELO COMO BIORREACTOR.	Delimitación de área de intervención		Relativamente moderado precio	Menores tasas de degradación
		Preparación de sitio	Análisis previo de concentraciones	Bajos riesgos de exposición	Control sobre parámetros ambientales
			Biotizado y balizado de puntos de aplicación.	En el caso de uso exclusivamente solo de nutrientes y enzimas se garantiza endemicidad del suelo. Respeta micro organismos propios del sitio.	Periodos de remediación mas largos. Desde 2 meses a 1 año.
		Aplicación de producto de remediación. Dosificación	Aspersión superficial	Recomendable para zonas de reinsertión al entorno natural. Apto para ser usado en Zonas protegidas	
Inoculación diferencial por profundidades					
	Sellado temporal de pozos				
<b>Lavado de suelos contaminados in situ</b>	DESATURACIÓN MECÁNICA POR APLICACIÓN DE SOLUCIONES DE PRODUCTOS SURFACTANTES PARA REMOCIÓN SECUNDARIA DE RESTOS DE HIDROCARBURO CON ENJUAGUE POSTERIOR.	Construcción de diques. Embalse.		Muy alta probabilidad de alcanzar niveles de concentración en parámetros permisibles.	Baja operatividad
		Consecución de Agua	Construcción de Captación Directa.		
			Carga, Transporte y reserva de agua.		
		Uso de agua en procesos de lavado	Bombeo y aplicación de agua de lavado	Bajo condiciones de poco caudal y presión se garantiza bajo impacto en general	Difícil selección del punto final de aplicación en caso de afectación visible por impregnación remanente
			Aplicación de productos químicos		
			Bombeo y aplicación de agua para enjuague		
		Manejo de sustrato intervenido	Utilización de fosas de sedimentación	Suficiente poder surfactante y degradabilidad del producto implica bajo impacto del suelo	Hermetismo de contratistas por celo profesional. Imposibilidad de aplicar criterios de control en productos.
Restitución de suelo lavado					
	Reconformación de Geoformas alteradas.				
Manejo de Residuos	Contención y recolección de Residuos		En suelos áridos y pedregosos, costo final de remediación menor	Poca o nula aceptación de autoridades de las entidades de control	
	Disposición de residuos				

CONTINUA →



TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	ACTIVIDADES		VENTAJAS	DESVENTAJAS
		PRINCIPALES	COMPLEMENTARIAS		
<b>Bioventeo por Volteo Mecánico.</b>	TRATAMIENTO BIOLÓGICO POR INSERCIÓN DE AIRE INTERSTICIAL EN EL SUSTRATO PARA INCREMENTAR CONDICIONES AEROBIAS. VOLTEO MECÁNICO DEL SUELO CONTAMINADO.	Delimitación de área de intervención		Simple	Tasas de degradación lentas
		Preparación de sustrato.	Inserción de fertilizantes	No muy costoso en lo referente a la técnica	Altos periodos de incubación.
			Adecuación de drenajes y API		Uso de mayor área que original por limitaciones en espesor de la capa en zona de control
		Volteo Mecánico de sustrato contaminado	Volteo Manual	Generación de fuentes de trabajo	Afectación a zonas diferentes a las originalmente afectadas por el evento.
Uso de maquinaria menor (moto cultivadora)	Imposibilidad práctica en zonas con pendientes moderadas e inclinadas				
<b>Bio Aumentación</b>	TRATAMIENTO BIOLÓGICO POR INOCULACIÓN DE NUTRIENTES Y ENZIMAS EN SUSTRATO CONTAMINADO. INTEGRACION DEL SUELO COMO BIORREACTOR.	Delimitación de área de intervención		Relativamente moderado precio	Menores tasas de degradación
		Preparación de sitio	Análisi previo de concentraciones	Bajos riesgos de exposición	Control sobre parámetros ambientales
			Etiquetado y balizado de puntos de aplicación.	En el caso de uso exclusivamente solo de nutrientes y enzimas se garantiza endemicidad del suelo. Respeta micro organismos propios del sitio.	Periodos de remediación mas largos. Desde 2 meses a 1 año.
		Aplicación de producto de remediación. Dosificación	Aspersión superficial	Recomendable para zonas de reinserción al entorno natural. Apto para ser usado en Zonas protegidas	
Inoculación diferencial por profundidades	Sellado temporal de pozos				
<b>Lavado de suelos contaminados in situ</b>	DESATURACIÓN MECANICA POR APLICACIÓN DE SOLUCIONES DE PRODUCTOS SURFACTANTES PARA REMOCION SECUNDARIA DE RESTOS DE HIDROCARBURO CON ENJUAGE POSTERIOR.	Consecución de Agua	Construcción de diques. Embalse.	Muy alta probabilidad de alcanzar niveles de concentración en parámetros permisibles.	Baja operatividad
			Construcción de Captación Directa.		Costo moderados
		Uso de agua en procesos de lavado	Bombeo y aplicación de agua de lavado	Bajo condiciones de poco caudal y presión se garantiza bajo impacto en general	Possible erosión masiva del suelo. Arrastre y desaparición del sustrato.
			Aplicación de productos quimicos		Difícil selección del punto final de aplicación en caso de afectación visible por impregnación remanente
			Bombeo y aplicación de agua para enjuage		
		Manejo de sustrato intervenido	Utilización de fosas de sedimentación	Suficiente poder surfactante y degradabilidad del producto implica bajo impacto del suelo	Hermetismo de contratistas por celo profesional. Imposibilidad de aplicar criterios de control en productos.
			Restitución de suelo lavado		
		Manejo de Residuos	Reconformación de Geofomas alteradas.		
Contención y recolección de Residuos	En suelos áridos y pedregosos, costo final de remediación menor		Poca o nula aceptación de autoridades de las entidades de control		
		Disposición de residuos			

CONTINUA →

<b>Lavado de riveras de rios in sitio</b>	DESATURACIÓN MECANICA POR APLICACIÓN DE SOLUCIONES DE SURFACTANTES PARA REMOCION SECUNDARIA DE RESTOS DE HIDROCARBURO. CONTEMPLA POSIBLE LAVADO A PRESIÓN DE MATERIAL PETERO CONTAMINADO. CONSIDERA ENGUAJE POSTERIOR.	Construcción de accesos	Simple  Generación de fuentes de trabajo  Muy alta probabilidad de alcanzar niveles de concentración en parámetros permisibles. Bajo condiciones de poco caudal y presión se garantiza bajo impacto en general  Suficiente poder surfactante y degradabilidad del producto implica bajo impacto del suelo  En suelos áridos y pedregosos, costo final de remediación menor	Riesgo laborales altos en zonas escarpadas  Percepción pobre de efectos en el lavado de rocas  Posibles efectos nocivos en aspectos biológicos ligados al uso de productos tóxicos o muy  Hermetismo de contratistas por celo profesional. Imposibilidad de aplicar criterios de control en  Imposibilidad práctica de obtener pureza visible (ausencia de coloración) por efecto de ligadura  Posibles complicaciones por rastros visibles de coloración en piedras. Caso critico para piedras
		Consecución de Agua		
		Construcción de diques. Embalse.		
		Construcción de Captación Directa.		
		Carga, Transporte y reserva de agua.		
		Uso de agua en procesos de lavado		
		Bombeo y aplicación de agua de lavado		
		Aplicación de productos quimicos		
		Bombeo y aplicación de agua para enjuage		
		Manejo de Residuos		
Contención y recolección de Residuos				
Disposición de residuos				

<b>Compostaje in situ</b>	ADECUACIÓN DEL TERRENO AFECTADO PARA COLOCACIÓN DEL MATERIAL CONTAMINADO EN PILAS O HILERAS, MEZCLÁNDOLO CON A GENTE ESPONJANTE (Aserrín, astillas de madera) PARA MANTENER VENTILACION Y EVITAR COMPACTACIÓN.	Construcción de accesos	Tasas de reacción moderadamente rápidas	Necesita agente de masas
		Construcción de Cubetos de Compostaje	No muy costosos	Requiere aireación
		Excavación de Cubetos	Auto calórico	Adición de nitrógeno
		Impermeabilización de Fondo y lados	Generación de fuentes de trabajo	Altos riesgos de exposición
		Adecuación de drenajes y API	Mantenimiento del sustrato propio del suelo en el lugar	Periodos de incubación muy altos de meses a años
		Manejo de material.	Ausencia de actividades de transporte de material.	Requiere de grandes cantidades de material de adhesión. Efectos asociados al uso de recursos
		Acopio de material esponjante.	No se exporta los efectos del evento.	Posible Lixiviación
		Tendido y Acomodo de material		
		Proceso de Compost.		
		Excavación selectiva de sustrato contaminado		
Mezcla e Inserción de material esponjante				
Manejo del Volteo por ciclos.				

CONTINUA

<b>Compostaje ex situ</b>	SELECCIÓN DE RESIDUOS VEGETALES LIGERAMENTE IMPREGNADOS. INCLUYE SU TRANSPORTE PARA COLOCACIÓN DEL MATERIAL CONTAMINADO EN PILAS O HILERAS, MEZCLÁNDOLO CON AGENTE ESPONJANTE (Aserrín, astillas de madera) PARA MANTENER VENTILACION Y EVITAR COMPACTACIÓN.	Construcción de Cubetos de Compostaje	Excavación de Cubetos	Tasas de reacción moderadamente rápidas	Necesita agente de masas
			Impermeabilización de Fondo y lados	No muy costosos	Requiere aireación
			Adecuación de drenajes y API	Auto calórico	Adición de nitrógeno
		Manejo de material.	Consecución y transporte de material de adición.		Altos riesgos de exposición
			Acopio de material esponjante.		Periodos de incubación muy altos de meses a años
			Excavación selectiva de sustrato contaminado		Posible Lixiviación
			Transporte de material contaminado		Afectación a zonas diferentes a las originalmente afectadas por el evento.
		Proceso de Compost.	Tendido y Acomodo de material		Requiere de grandes cantidades de material de adhesión. Efectos asociados al uso de recursos naturales
			Excavación selectiva de sustrato contaminado		Sustancial incremento de costos en transporte de material
			Mezcla e Inserción de material esponjante		
		Manejo del Volteo por ciclos.			

<b>Landfarming Ex situ</b>	INCORPORACIÓN CONTROLADA DEL MATERIAL CONTAMINADO EN LA PARTE SUPERIOR DEL SUELO CONJUNTAMENTE CON NUTRIENTES Y SISTEMAS MECANICOS DE VOLTEO	Construcción de Cubetos de Land Farm	Excavación de Cubetos	Simple	Tasas de degradación lentas
			Impermeabilización de Fondo y lados	No muy costoso en lo referente a la técnica	Largos periodos de incubación.
			Adecuación de drenajes y API	Aceptado sin dificultad	Afectación a zonas diferentes a las originalmente afectadas por el evento.
		Manejo de material.	Excavación selectiva de sustrato contaminado	Posible tratamiento paulatino de desechos.	Uso de mayor área que original debido a las limitaciones en el espesor de las capas de tratamiento.
			Transporte de material contaminado	Ausencia de efectos derivados.	
			Tendido y Acomodo de material		Incremento de costos asociados al uso de suelo.
		Proceso de Land Farm	Manejo del Volteo por ciclos.		Requiere permisos
					Sustancial incremento de costos en transporte de material

**Fuente:** Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, Version 4.0.

#### **1.5.4. Landfarming**

El landfarming o tratamiento superficial en tierra, es una técnica de remediación ex situ aerobia, cuya aplicación usual es la reducción de la concentración de TPH en suelos contaminados (EPA, 2012).

Los suelos contaminados son excavados y tratados en espacios abiertos, sobre la superficie revestida con geomembrana para evitar toda posibilidad de percolación de lixiviados. El drenaje se recolecta mediante tuberías perforadas y se trata por separado o se recircula. La eficacia del tratamiento es menor a medida que se incrementa el peso molecular de los contaminantes a ser degradados (Eweis, 1999).

##### **1.5.4.1. Biodegradación de los hidrocarburos.**

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan lo polaridad de un tóxico se lo denomina biotransformación. En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, al proceso se le denomina bioactivación. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo entonces pueden producir un daño que se manifieste en una respuesta tóxica (Atlas, 2002).

Los hidrocarburos son biodegradables en forma aerobia, sin embargo la tasas de biodegradación depende de la complejidad de la molécula, algunos hidrocarburos aromáticos pueden ser degradados en condiciones anaerobias. Cuando la fuente de carbono es un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes (Eweis, 1999), (Rittmann, 1996).

Los alcanos lineales son los hidrocarburos más biodegradables, a pesar de eso los alcanos con números de carbonos entre C5 y C6 son solventes que pueden romper la membrana lipídica de las bacterias, los hidrocarburos con C20 a C40 son cada vez más apolares por tanto insolubles en agua. La degradación se inicia con la acción de la enzima monooxigenasa en un proceso reversible en el que el hidrocarburo pasa a alcohol, este es fuertemente oxidado a aldehído y luego a su ácido graso luego se da una  $\beta$ -oxidación (Eweis, 1999).

Los ciclos alcanos son menos degradables que los isómeros de cadena lineal, pero más degradables que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), son más fácilmente degradados los cicloalcanos con cadena larga o con un grupo alquilo que uno no sustituido. Los cicloalcanos son degradados mediante el ataque de oxinas dando un alcohol cíclico el cual es deshidrogenado a una cetona, luego sufre un ataque en el grupo alquilo y se transforma en un ácido graso (Morris, 1997).

Los compuestos aromáticos más simples como los BTEX son compuestos solubles en agua. La degradación de las moléculas aromáticas involucra dos etapas de activación del anillo y rotura del anillo; la activación involucra la incorporación del oxígeno molecular dentro del anillo, con la ayuda de enzimas oxigenasas, la monooxigenasa que se encuentra en hongos y eucariotas, catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno para formar un grupo epóxido, a continuación las dioxigenasas, características de las bacterias, catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular, al mismo tiempo para formar un dihidrodiol, luego estos son oxidados a derivados dihidroxilados tales como el catecol, los cuales son precursores para romper el anillo. Los HAP's son hidrocarburos formados por dos o más anillos de benceno, en general un aumento del peso molecular y el número de

anillos en su estructura, producen un decremento de la solubilidad y volatilidad, estos hidrocarburos se degradan anillo por anillo, los HAP's de alto peso molecular resisten a la degradación microbiana mientras que los de bajo peso molecular no se encuentran (Morris, 1997).

Los asfaltos y resinas son compuestos de alto peso molecular, con estructuras complejas compuestas de cadenas de hidrocarburos, nitrógeno, azufre, oxígeno ligados a ramificaciones policíclicas aromáticas las cuales incluyen níquel y vanadio. Estos compuestos son recalcitrantes debido a su insolubilidad y resistencia a la degradación, esta última junto con su formación por medio de reacciones de condensación los toman acumuladores en el transcurso del tiempo (Morris, 1997).

#### **1.5.5. Bioestimulación**

La bioestimulación es la activación de los microorganismos autóctonos degradadores de hidrocarburos, mediante la adición de nutrientes y aceptores de electrones al entorno contaminado de acuerdo a sus deficiencias, conforme a la relación C/N/P/K 100/10/1/1, para acelerar la tasa de biodegradación (Rittmann, 1996).

Los microorganismos pueden disponer con facilidad de una parte pequeña de los nutrientes existente en la fracción mineral del suelo con la dificultad de ser un proceso muy lento. Los nutrientes son necesarios para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos principalmente los macronutrientes (C, N, P, K), y en menor cantidad micronutrientes (Eweis, 1999).

Los hidrocarburos en el suelo aumentan la cantidad de C disponible en el medio para la actividad metabólica de los microorganismos, si esto ocurre en lugares donde

la concentración de nutrientes inorgánicos como N y P es baja, producen relaciones C/N y C/P muy altas, de tal forma que su concentración es un factor limitante en la degradación microbiana de hidrocarburos, se puede ajustar a la porción C/N/P mediante la adición al medio de fertilizantes inorgánicos como la úrea – fosfato N – P – K, y sales de amonio y fosfato y sales de potasio. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol, de esta manera se puede acelerar el proceso de biodegradación (Pardo, 2004).

La úrea es un fertilizante nitrogenado inorgánico sólido, el ácido carbónico de la diamida, cuya fórmula química es  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$ , el aporte de nitrógeno de la úrea es del 46% P/P, su aplicación suele provocar acidificación, que puede ser contrarrestada con la aplicación de cal (Buckman, 1985).

El sulfato potásico es una sal utilizada como fertilizante que contiene 50% P/P ( $\text{K}_2\text{O}$ ). Tienen escasos o ningún efecto sobre el pH de suelo (Buckman, 1985).

#### **1.5.6. Degradación enzimática**

La degradación por acción de enzimática, tiene como principio agregar enzimas al lugar y/o sitio contaminado con la finalidad de degradar las sustancias nocivas o degradar los compuestos de hidrocarburos. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad y que son comercializadas por las empresas biotecnológicas (Buckman, 1985).

Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben ser posteriormente tratados.

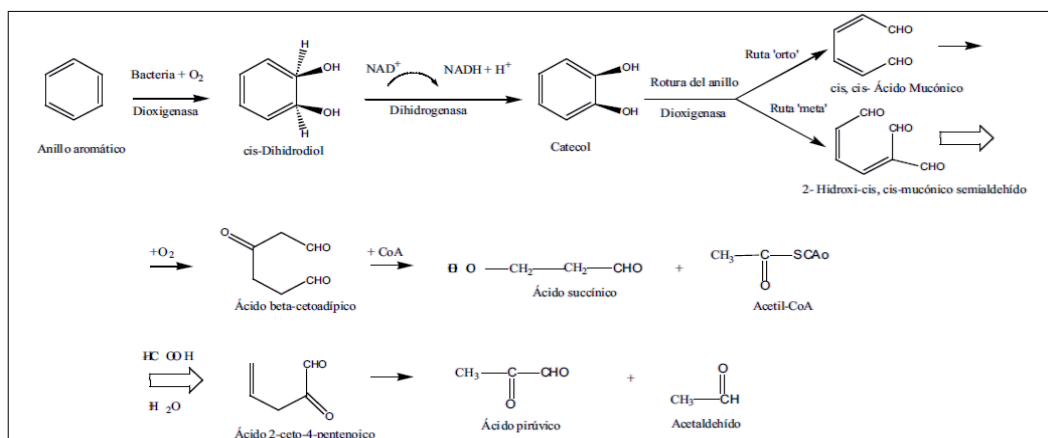
En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan los polímeros complejos, y luego terminar de degradarlos (romperlos), con el uso de microorganismos específicos. Un ejemplo lo constituyen las enzimas lipasas (que degradan lípidos) que se usan junto a cultivos bacterianos para eliminar los depósitos de grasa procedentes de las paredes de las tuberías que transportan los efluentes (Buckman, 1985).

Otras enzimas que rompen polímeros utilizados de forma similar son las celulasas, proteinasas y amilasas, que degradan celulosa, proteínas y almidón, respectivamente.

Además de hidrolizar estos polímeros, existen enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes. Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias (Eweis, 1999).

El recorrido, catalizado por las enzimas microbianas a través de los diversos subproductos, se conoce como ruta de degradación o “pathway” (Figura 1.2). En cualquier caso, los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes (Atlas, 2002) (Riser, 1996).





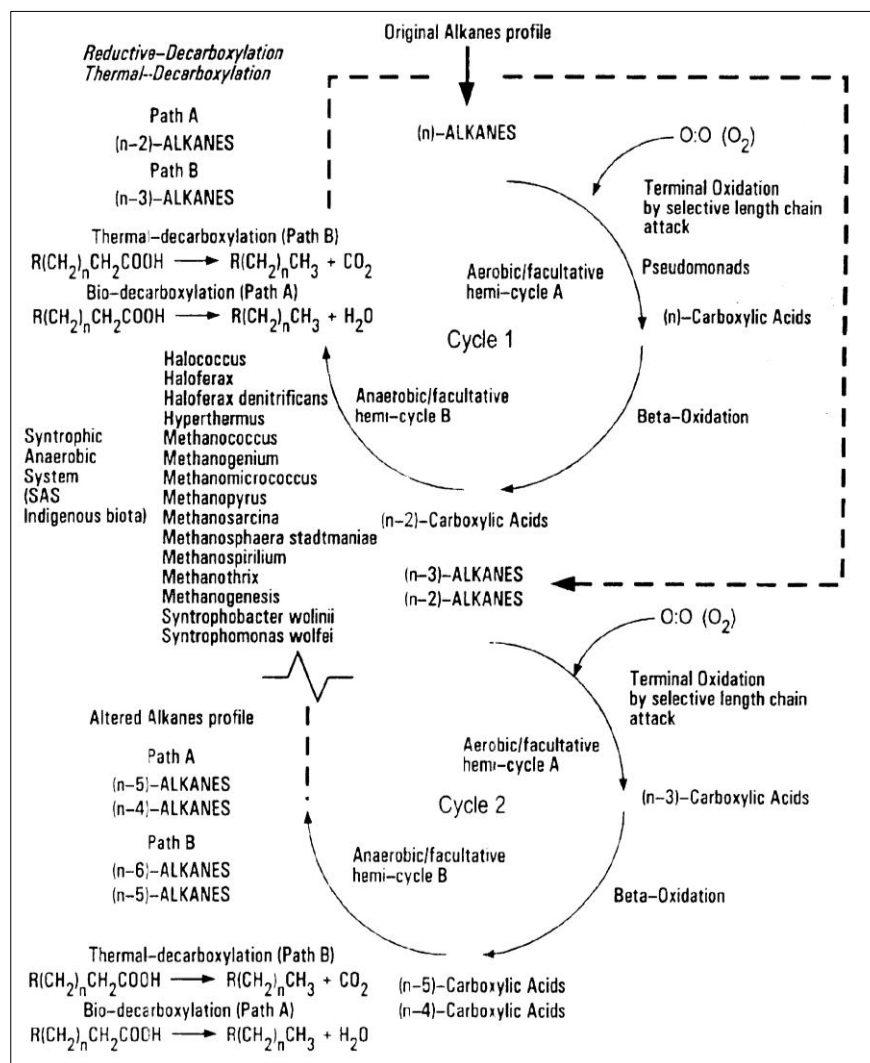
**Figura 2.** Ruta habitual de degradación de los hidrocarburos aromáticos

Fuente (Riser E, 1998; Atlas R., 2001).

#### 1.5.6.1. Inóculo enzimático.

El inóculo enzimático es un compuesto de nutrientes y enzimas completamente biodegradables, formulado para aumentar el comportamiento de las bacterias autóctonas propias del sustrato, intensificando el consumo del hidrocarburo introducido producto de derrames de hidrocarburos. El inóculo ha sido utilizado en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos además de ser un producto biodegradable y no causar efectos contra la flora y fauna ni daños al ecosistema.

Las rutas metabólicas que usa el inóculo se describen en la Figura.3



**Figura 3.** Metodología: (n)-Alkanes BIO-CRACKING by repetitive alternating carboxylation – decarboxylation cycle. Fuente. Microbial-Induced controllable cracking of normal and branched alkanes in oils. 2005.

### 1.6 Hipótesis

El tratamiento con inóculo enzimático a una concentración de 20 ml provoca mayor remoción de TPH en suelos contaminados con diésel y el tratamiento con inóculo enzimático, a una concentración de 40 ml, provoca mayor remoción de TPH en suelos contaminados con bunker.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Participantes

Ensayo de campo : Empresa de biorremediación Respuestambiental

Como director de tesis el Ing. Rafael Vargas, de igual manera se contó con el aporte del Ing. Pedro Romero, co-director de tesis.

El Ing. Richard Aguirre y Jaime Asqui en calidad de Directores de proyectos de biorremediación para el distrito amazónico de la empresa Respuestambiental.

El Sr. Luis Velastegui en su calidad de Supervisor de Campo proporcionó su colaboración durante la fase de monitoreo en campo.

#### 2.2 Zona de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el proyecto de biorremediación “El Reventador”, ubicado en la parroquia El Reventador, cuya ubicación se detalla a continuación:

Lugar : Proyecto de biorremediación “El Reventador”

Provincia : Sucumbíos

Cantón : Gonzalo Pizarro.

Parroquia : El Reventador

Sector : Km 78 de la Vía Quito – Lago Agrio.

Altitud : 1400 msnm

Este : 219582

Norte : 9996059

### **2.2.1. Área de ensayo**

Se utilizó una localización externa del proyecto de biorremediación El Reventador la cual fue destinada para la parte de landfarm.

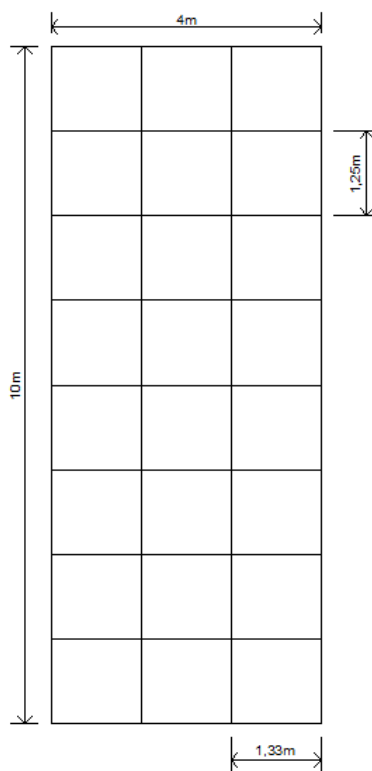
El ensayo de landfarm se lo realizó en un invernadero cuya superficie fue de 40m<sup>2</sup> el mismo que es destinado para procesos de biorremediación de suelos contaminados.

### **2.2.2. Características del terreno**

El lugar donde se realizó el ensayo corresponde a un área la cual fue destinada específicamente para el proyecto de tesis, el mismo cuenta con una recubrimiento de linner en el piso para evitar cualquier tipo de contacto del material contaminado con suelo natural (libre de contaminación), canaletas perimetrales para recolección de hidrocarburos que se conectan a una caja de recolección de lixiviados, para su almacenamiento y posterior manejo en gestores calificados, además de la colocación de material absorbente (aserrín) , en todo el contorno del invernadero como segunda medida de control para lixiviados.

El área total del invernadero destinado para el proyecto de tesis es de 40m<sup>2</sup>, se realizaron un total de 8 columnas de 10m de largo por 4m de ancho (Figura 4).

**Volumen en peso de cada unidad experimental:** 40 kg



**Figura 4.** Distribución de las unidades experimentales en el área de ensayo

### 2.3 Periodo de tiempo de la investigación

La investigación por ser parte de un conjunto de procesos biológicos y químicos en el cual el tiempo es un factor determinante, el mismo que determinara si se alcanzó los objetivos planteados por tal razón y bajo todos los contextos que implica una investigación, el proyecto tuvo un tiempo de duración de 9 meses.

Inicio : 19 de marzo de 2010

Finalización : 19 de Marzo de 2011

## **2.4 Procedimientos**

### **2.4.1. Materiales**

#### **2.4.1.1. Fase de campo**

##### **a) Landfarm**

- Palas
  
- Rótulos de madera
  
- Cámara de fotos
  
- Regaderas plásticas
  
- Fundas ziplock
  
- Etiquetas
  
- Carretillas
  
- Plásticos para invernadero
  
- Linner
  
- Estacas de madera
  
- Probetas
  
- Baldes

##### **Insumos**

- Suelo contaminado

- Inoculante enzimático de prueba
- Aserrín
- Fertilizante NPK 20:1:1
- Suelo libre de contaminación (natural)
- Agua destilada

### **Equipos e instrumentos**

- Potenciómetro
- Termómetro para compost Hawk (1°C)
- Balanza de campo

#### **2.4.1.2. Fase de laboratorio**

Todos estos análisis fueron desarrollados, según método estandarizado MESS-02 EPA 8440.418.1, en un laboratorio privado.

#### **2.4.2. Métodos**

##### **2.4.2.1. Fase de campo. Landfarming (Anexo A)**

###### **a) Preparación de los productos para proceso de contaminación artificial.**

**Suelo natural.**- Se tomó suelo natural propio de la zona y se procedió a tritularlo hasta obtener un suelo completamente homogéneo, conjuntamente se realizó una verificación para evitar que elementos extraños se encuentren en la matriz del mismo (Anexo B).

**Aserrín.-** Se procedió a verificar su buen estado, además de inspeccionar que no existan elementos extraños que puedan afectar las condiciones de los ensayos. El mismo fue colocado en relación 35% del peso total utilizado en cada unidad experimental como lo señala (Araujo, 2004).

**Fertilizante.-** La fertilización estuvo representada por NPK para generar un balance en relación 20:1:1 como lo indica (Samanez, 2008)

**b) Proceso de contaminación artificial.**

Se procedió a colocar 400 ml de diésel y 400 ml de bunker en muestras de suelo de 40 kg, para generar una contaminación artificial (Samanez, 2008).

**c) Elaboración de camas para biorremediación.**

- Se señaló con ayuda de estacas, las dimensiones de cada cama son 1,25m de ancho por 1,33m de largo (Figura 5).

- Se colocó 40 kg de suelo contaminado a lo largo de toda el área destinada para cada cama

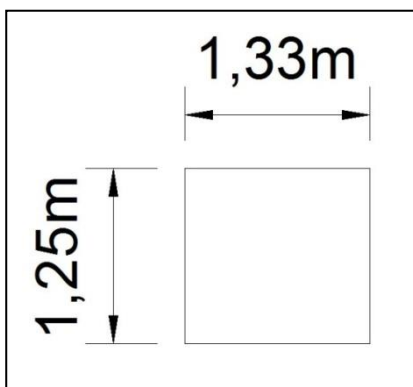
- Se colocó aserrín como material de soporte (Araujo, 2005).

- Se añadió una relación de 2 a 1 de suelo natural.

- Se añadió fertilizante para balancear el sistema (Samanez, 2008).

- Se humedeció la cama cada cuatro días para mantener el porcentaje requerido de 40-60% (Araujo, 2005).





**Figura 5.** Dimensiones de cada una de las camas en el ensayo de landfarm.

#### **d) Inoculación.**

Una vez construida las camas de landfarm, se colocaron banderines de identificación.

La ubicación de cada tratamiento fue sorteada.

Una vez definido el sitio de cada tratamiento se procedió a la inoculación de cada cama con la dosis adecuada así:

La dosificación fue calculada de acuerdo a lo establecido en las instrucciones de uso de Biocrak (Anexo C)

Se toma la relación a una concentración de TPH de 16000 ppm en suelo, la concentración recomendable de adición del inóculo es de 2560 gramos por toneladas métrica de suelo, el experimento al tomar un cantidad de suelo de 40 kg con una concentración media aproximada de 16000 ppm de TPH en el suelo, la dosificación calculada con 40% de pérdida por lixiviación es de 28 gramos de inóculo a una densidad de 0,98 g/ml, con la referencia se toma un valor del doble de concentración ideal, un valor de la mitad de concentración y un valor de 0 como muestra control:

- Concentración Alta 40 ml
- Concentración Media (Ideal) 20 ml
- Concentración Baja 10 ml
- Sin dosis (control) 0 ml

#### Primera dosificación

Dosis 1: 40 ml de inóculo enzimático + 40 ml de agua destilada

Dosis 1: 20 ml de inóculo enzimático + 20 ml de agua destilada

Dosis 1: 10 ml de inóculo enzimático + 10 ml de agua destilada

Dosis 1: 0 ml de inóculo enzimático + 0 ml de agua destilada

#### Segunda dosificación, 30 días después de iniciado el proceso

Dosis 2: 20 ml de inóculo enzimático + 20 ml de agua destilada

Dosis 2: 8 ml de inóculo enzimático + 8 ml de agua destilada

Dosis 2: 4 ml de inóculo enzimático + 4 ml de agua destilada

Dosis 2: 0 ml de inóculo enzimático + 0 ml de agua destilada

#### **e) Manejo del sistema.**

**Temperatura.-** se realizaron mediciones semanales de temperatura a las 12:00 AM con un termómetro para suelos (Marca Hawk, Rango 0°C – 100°C, Resolución 1°C).

**pH.-** Se usó la metodología citada en la tesis de (Benites, 2003). Se colocó en proporción 1:10 (gramos de suelo vs ml de agua destilada), así por el material

disponible se realizaron las mediciones con 5g de suelo con 50 ml de agua destilada, se agito y luego de 30 minutos se tomó la lectura con un potenciómetro digital (Hanna Instruments, Rango 0,0 – 14,0, Resolución 0.1).

**Control de aireación.-** Para todos los ensayos se realizó un volteo manual; con lo cual se mantuvo el contenido de oxígeno en cada unidad experimental; esto se lo realizó desde el inicio del ensayo hasta el fin del mismo.

#### **f) Muestreo (Anexo D).**

##### **Técnica de muestreo**

Para análisis químico (TPH)

1. Se tomó muestras de todas las camas presentes en el diseño experimental.
2. Se realizó un volteo y homogenizado de toda la muestra de suelo
3. De cada cama se tomó una muestra de 500g de suelo durante la toma de muestras se usó guantes quirúrgicos desechables para evitar contaminación entre muestras, estas fueron colocada en fundas ziplok.
4. Se repitió el mismo proceso para todas las muestras, teniendo en cuenta que las herramientas usadas fueron limpiadas con material absorbente para evitar que estas puedan tener trazas de combustible y que hayan quedado impregnadas lo cual puede generar falsos positivos.

##### **Transporte y almacenamiento de muestras**

Para el análisis fisicoquímico las muestras fueron transportadas en una caja hermética (cooler), entre 10-15°C. Las muestras llegaron al laboratorio a las siguientes 48 horas.

#### **2.4.2.2. Fase de laboratorio**

##### **Análisis químico**

Todos estos análisis fueron desarrollados, según métodos estandarizados, en un laboratorio privado, según metodología estandarizada en cada caso.

#### **2.5. Diseño experimental**

##### **2.5.1. Factores y tratamientos en estudio**

En el diseño multifactorial usado en el ensayo de landfarm se trabajó con dos factores en estudio. El factor T (Tabla 4) correspondiente a las fuentes de hidrocarburo y el factor D (Tabla 5) correspondiente a las dosis del inoculante enzimático.

**Tabla 4.** Factor T: Fuentes de hidrocarburo usados en el ensayo de landfarm

<b>FACTOR T</b>	<b>HIDROCARBURO</b>	<b>CODIFICACIÓN</b>
T1	Diesel	Di
T2	Bunker	Bk

**Tabla 5.** Factor D: Dosis del inoculante enzimático usado en el ensayo de landfarm.

FACTOR D	DOSIS	CODIFICACIÓN	ESPECIFICACIÓN
D1	Alta	Al	40ml Inoculante enzimático en 40 kg de suelo contaminado
D2	Media	Me	20ml Inoculante enzimático en 40 kg de suelo contaminado
D3	Baja	Ba	10ml Inoculante enzimático en 40 kg de suelo contaminado
D4	Sin dosis	Sd	SIN DOSIS

Para conocer la influencia de las dos fuente de contaminante sobre las dosis de inóculo aplicados se procedió a evaluar cada una de estas interacciones (Tabla 6) correspondientes en número a ocho tratamientos

**Tabla 6.** Tratamientos resultantes de la combinación de los factores usados en el ensayo de landfarm

N°	NOMENCLATURA	Inoculo Enzimático	Fuente de hidrocarburo
T1	T1D1	Alta	Diesel
T2	T1D2	Media	Diesel
T3	T1D3	Baja	Diesel
T4	T1D4	Sin dosis	Diesel
T5	T2D1	Alta	Bunker
T6	T2D2	Media	Bunker
T7	T3D3	Baja	Bunker
T8	T4D4	Sin dosis	Bunker

## **2.5.2. Diseño experimental usado en los ensayos**

### **2.5.2.1. *Diseño multifactorial***

Se usó un diseño multifactorial gracias a las características que este posee para realizar análisis de interacciones entre varios factores, para este caso dos factores T y D.

Para generar un diseño multifactorial más robusto se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento dando como resultado un diseño compuesto por 24 unidades experimentales (UE), la disposición de los tratamientos en el ensayo se puede ver en el anexo (Anexo E).

## **2.6. Análisis de datos.**

Los datos fueron cargados en el programa estadístico InfoStat y el análisis estadístico se realizó aplicando.

- Prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Ensayos de landfarm

El grado de descontaminación durante el proceso de biorremediación del suelo contaminado con diésel y bunker por la técnica de landfarming se evaluó mediante el monitoreo de las variables de respuesta y las variables control para cada uno de los tratamientos en cada unidad experimental se necesitó de 40 kg de suelo para cada uno de los tratamientos. Para realizar el proceso de contaminación del suelo se usó: suelo natural propio de la zona, fertilizante comercial, aserrín, diésel y bunker.

##### 3.1.1 Caracterización del suelo contaminado.

Los resultados de la caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos que se presentan en la tabla 7 muestran que la densidad real es de  $1600 \text{ kg/m}^3$  la cual es inferior para un suelo mineral de  $2700 \text{ kg/m}^3$ , lo cual está ligado a suelos arcillosos. El valor de 29% de porosidad del suelo evidencia un suelo compactado (Buckman, 1985).

El suelo contaminado con hidrocarburos presenta un pH de 5.6 por tanto es ligeramente ácido, este comportamiento es típico para suelo de climas húmedos, debido a que las precipitaciones son altas como para lixiviar las bases según Buckman (1985). Este valor se encuentra dentro del rango permitido para aplicar la técnica de landfarming según los parámetros establecidos en Ewis (1990). Quien además establece que la capacidad de campo para un suelo va de 18 a 30% en función del contenido de arcilla, por lo que el valor de 29,5% en el suelo

caracterizado es un valor que está dentro de parámetros aunque en el límite para un suelo arcilloso.

Los valores reportados en la caracterización inicial son muy elevados y están sobre los 23000 ppm de TPH muy lejos de los parámetros máximos permitidos por la legislación ecuatoriana RAOH 1215 de 2500 ppm de TPH para suelo de uso agrícola.

**Tabla 7.** Resultados de la caracterización inicial del suelo contaminado con hidrocarburos

Parámetro	Unidades	Resultado
Densidad real	kg/m <sup>3</sup>	1600
Capacidad de campo	%	29,5
Textura	---	Arcillosa
pH	---	5,6
TPH	mg/kg	23000
N	%	0,11
P	%	870
K	%	343,2

### 3.1.2 Bioestimulación

Según los resultados de macronutrientes NPK que se realizó se evidenció que existía un ligero desbalance de acuerdo con la relación NPK 20:1:1 necesaria para llevar a cabo el tratamiento biológico por landfarming, para acelerar la tasa de degradación de los hidrocarburos por acción de las bacterias en conjunto con el inóculo enzimático. Rittmann 2001. Por tanto el incremento se efectuó para el nitrógeno con urea y el potasio con sulfato de potasio; en cuanto al excedente de



fósforo, al considerar que a mayores contenidos se incrementa la degradación, se trabajó a esas condiciones

### **3.2 Variables de control**

El grado de descontaminación durante el proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburo por la técnica de landfarming se evaluó mediante el monitoreo de las variables respuesta y variables de control para cada uno de los tratamientos expuestos en esta investigación.

#### **3.2.1 TPH**

Como se evidencia en la tabla 8, a los 0 días la contaminación en todos los tratamiento esta sobre los límites permisibles en la legislación ambiental ecuatoriana RAOH 1215 la cual da un límite máximo de 2500 mg/kg de TPH. Siendo que la biodisponibilidad de los hidrocarburos se reduce al incrementar las fracciones más pesadas de los hidrocarburos, según se establece en Eweis (1999) el suelo con esta carga es más difícil de remediar.

A los 15 días de empezado el proceso de biorremediación se ve disminución apoyando la hipótesis que el inóculo enzimático acelera este proceso, según reporte Gutiérrez (2008) una disminución de 1000 ppm se da en un periodo de 1 mes para este caso se ha podido evidenciar una aceleración, la adición del coctel enzimático y la bioestimulación que se utilizaron están dando los resultados esperados en el primer mes se ha producido un reducción en la cantidad de TPH del 18,3% en el diésel y del 14% en el bunker.

Para el tiempo de 30 días se evidencia una mayor tasa de reducción siendo el diésel el que lleva un mayor porcentaje frente al bunker visto de manera global.

Para el tiempo de 45 días se mantiene un ligera estabilidad siendo el primer mes el que presento una disminución más marcada, basado en proceso similares Aguirre (2009) reporta que en el primer mes la enzima produce una reducción de hasta el 50% de TPH en el suelo, con los resultados obtenidos se comprueba que se dio una marcada diferencia pero no se obtuvo una reducción del 50% la reducción al primer mes fue de un 30,5% al proceso global de lo cual el diésel presenta un 35,3% mientras el bunker 25,7% de reducción de TPH.

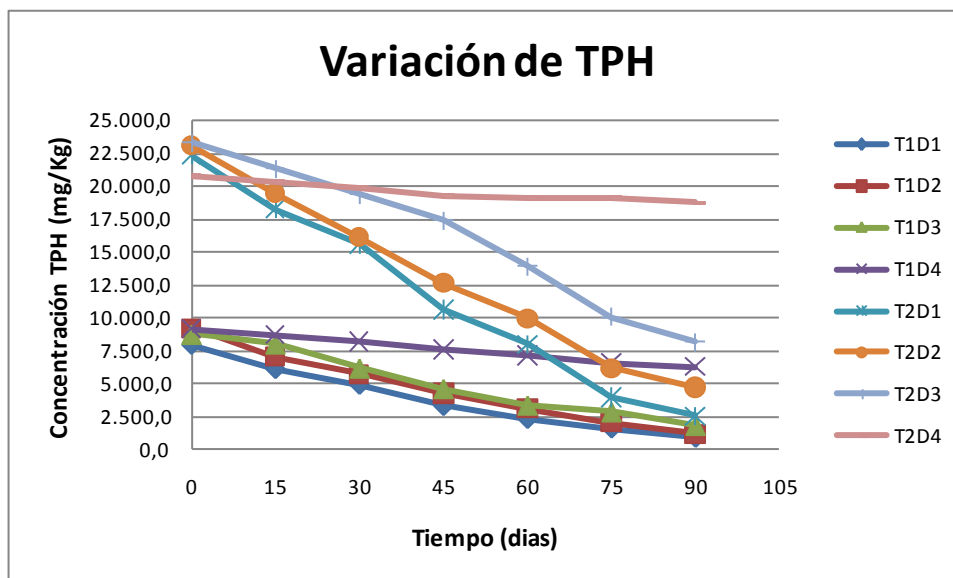
Para los siguientes meses se muestra la tendencia a la baja en cada uno de los resultados de TPH siendo el factor diésel el que tiene mayor capacidad de ser degradado frente al bunker.

Los resultados se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Concentración de TPH (mg/kg)

TRATAMIENTOS		TPH (mg/Kg) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	7.976,7	6.130,0	4.930,0	3.315,7	2.329,0	1.606,7	897,3
Diesel 20ml	T1D2	9.246,7	7.077,7	5.717,7	4.252,7	3.096,0	2.046,7	1.170,7
Diesel 10ml	T1D3	8.762,0	8.023,3	6.184,0	4.622,7	3.356,7	2.841,7	1.806,0
Testigo Diesel	T1D4	9.165,0	8.739,7	8.218,0	7.604,7	7.153,3	6.585,3	6.300,0
Bunker 40ml	T2D1	22.410,7	18.266,3	15.666,7	10.646,7	7.993,3	3.982,0	2.551,0
Bunker 20ml	T2D2	23.161,7	19.480,0	16.173,0	12.649,3	9.973,3	6.216,0	4.744,3
Bunker 10ml	T2D3	23.373,3	21.361,0	19.426,0	17.432,0	13.931,3	10.091,3	8.162,0
Testigo bunker	T2D4	20.853,0	20.369,7	19.937,3	19.291,3	19.192,7	19.101,0	18.772,7

La variación del TPH en función del tiempo se muestra en el siguiente gráfico.



**Gráfico 1.** Variación de TPH durante el proceso de biorremediación.

#### **Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Tukey con un  $\text{Alpha}=0,05\%$  de confianza y tomando en cuenta los resultados del TPH, el factor de contaminación y la concentración del inóculo enzimático, los resultados se presentan en la tabla 9

El análisis estadístico se realizó en los noventa días realizando una comparación entre el factor de contaminación, la concentración de enzima y la concentración de TPH, como se observa en la tabla 9 a los 90 días de empezado el ensayo existe una diferencia estadística marcada, mostrando que el proceso de biorremediación es muy diferente entre diésel y bunker.

Se anota que el tratamiento donde se utilizó diésel como factor de contaminación y una concentración de 40 ml de enzima tuvieron los mejores resultados, dentro de

este grupo se observa que todos los tratamientos que utilizaron dosis altas obtuvieron excelentes resultados.

Es importante mencionar que aun cuando el diésel es menos complicado de remediar la enzima produjo una aceleración marcada en los tratamientos donde el factor de contaminación fue el bunker en dosis altas este acelero el proceso siendo más eficiente que el landfarm sin enzima en diésel a los noventa días.

Las concentraciones medias mostraron disminución significativa. Es posible adelantar que entre mayor cantidad de enzima el porcentaje de remediación aumente, basados en el ítem de tasa de degradación (ver Tabla 22), donde se expone los porcentajes de disminución en función de las concentraciones durante todo el periodo del ensayo.

Las concentración de 10 ml de enzima en bunker, el blanco en la enzima y el blanco en diésel mostraron los resultados más bajos del presente ensayo.

#### **TPH / Factor de contaminación.**

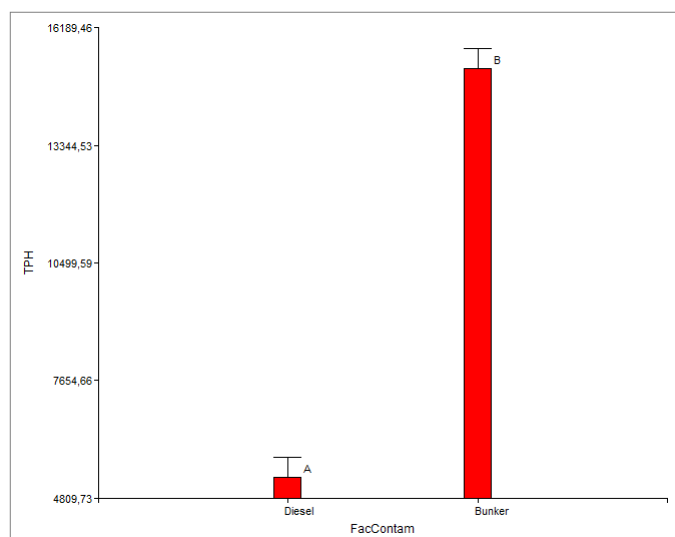
Se realizó un primer análisis tomando como base las concentraciones de TPH comparadas con el factor de contaminación

**Tabla 9.** Comparación Tukey para TPH en la biorremediación contra el factor de contaminación.

Factor de contaminación	Concentración media de TPH (mg/Kg)	Comparación de tratamientos
Diesel	5326,99	A
Bunker	15186,04	B

El análisis demuestra que las concentraciones medias del TPH son estadísticamente significativas sobre los factores de contaminación, tal es el caso que los valores reportados muestran concentraciones medias con más de 10000 ppm de TPH de diferencia.

Para el caso del diésel se observa un valor menor de concentración, muy diferente de la concentración de TPH para el caso del bunker donde sus concentraciones son muy elevadas, lo que demuestra que el proceso en bunker no ha dado los resultados esperados.



**Gráfico 2.** Análisis estadístico del TPH / Factor de contaminación.

**TPH / Concentración de enzima**

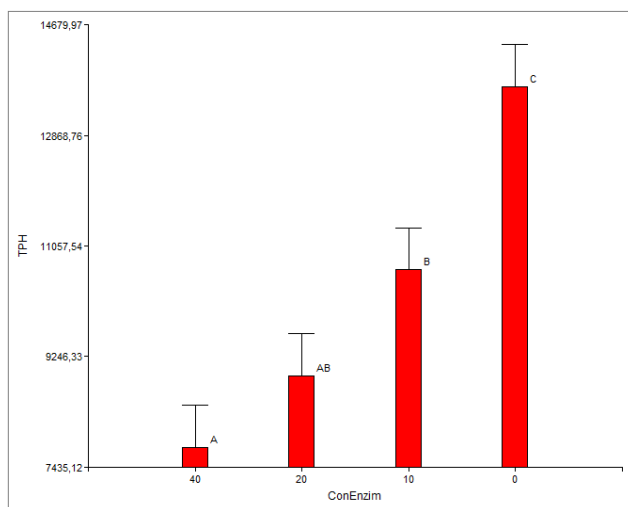
Comparación de TPH con la concentración de enzima y como esta es evaluada además de su interacción y forma de funcionamiento durante todo el proceso de landfarm.

**Tabla 10.** Comparación Tukey para TPH en la biorremediación contra la concentración de enzima.

Concentración de enzima	Concentración media de TPH (mg/Kg)	Comparación de tratamientos
40	7764,43	A
20	8928,98	A B
10	10669,42	B
0	13663,12	C

Un primer análisis muestra que se obtiene una tendencia a medida que aumenta la concentración de enzima la concentración de TPH disminuye en función del tiempo, esta tendencia está claramente marcada como se observa en la tabla 8.

Esta relación inversamente proporcional servirá para realizar las conclusiones más contundentes del caso ya que es un hallazgo que compromete la hipótesis planteada.



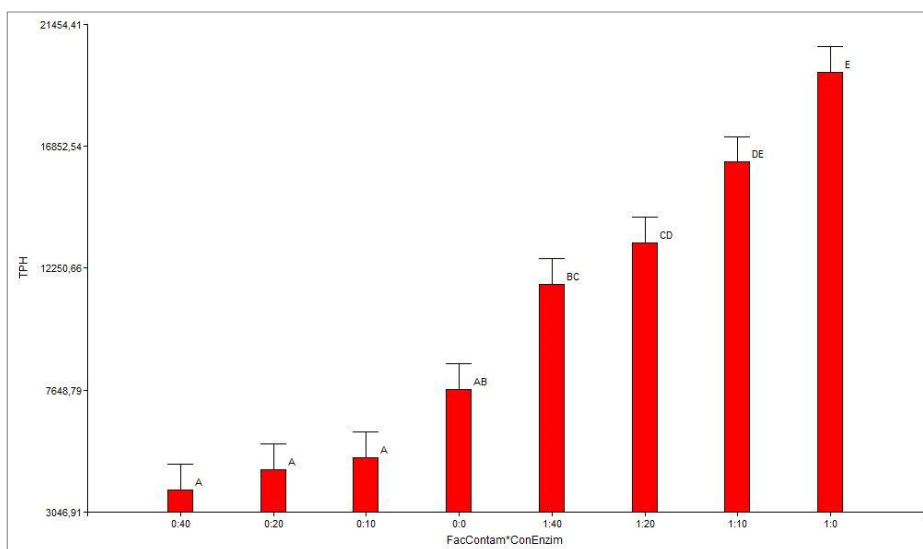
**Gráfico 3.** Análisis estadístico del TPH / Concentración de enzima.

#### **TPH / Interacción Factor de contaminación – Concentración de enzima**

Para mayor contraste de los resultados se realizó una interacción de las variables en donde se mantiene al TPH como factor primario siendo la interacción entre el factor de contaminación y la concentración de enzima durante los 90 días que duro el proceso obteniendo los siguientes resultados que se presentan en la tabla 11

**Tabla 11.** Interacción entre variables de control para el proceso de biorremediación.

Factor de contaminación	Concentración de enzima	Concentración media de TPH (mg/Kg)	Comparación de tratamientos
Diesel	40	3883,62	A
Diesel	20	4658,29	A
Diesel	10	5085,19	A B
Diesel	0	7680,86	A B C
Bunker	40	11645,24	C D
Bunker	20	13199,67	D
Bunker	10	16253,86	E
Bunker	0	19645,38	E



**Gráfico 4.** Análisis estadístico para la interacción de las variables de control.

El análisis de las interacciones que se realizó muestra resultados contundentes, se muestra que el factor de contaminación diésel con la concentración de enzima más alta a los 90 días de iniciado el proceso muestra la mayor disminución de TPH, todos los resultados obtenidos del factor T1 poseen la misma tendencia y están representados en el grupo A incluso el blanco, muy diferente situación del factor de



contaminación T2 que muestra claras diferencia agrupando a cada concentración en un grupo diferente BC, CD, DE y F.

Los grupos presentados mantienen inter relación entre ellos con expresión del blanco que mantiene una clara diferencia de los demás, la concentración media en este es de 19645,38 ppm de TPH muy lejos del límite permisible de 2500 ppm de TPH.

La adición de la segunda dosis a los 60 días al parecer tuvo un impacto directo en la generación de estas marcadas agrupaciones.

### **3.2.2 pH**

El control que se realizó cada 15 días al momento que se realiza la aireación, se procedía a tomar una muestra de suelo y mediante la metodología presentada se realizaba la medición del pH.

Se puede observar que los valores al tiempo 0 tienden a ser un poco ácidos, situación que se la puede considerar normal ya que el pH del suelo tiene estas características.

A los 15 días de iniciado la biorremediación el pH se ajusta a valores que van casi en su totalidad al valor neutro.

A los 30 y 45 días presenta una homogeneidad en los valores todos tendiendo al valor neutro. Esta diferencia de pH se debe posiblemente al incremento de la capacidad tampón en el suelo, inducido por la aplicación de nutrientes en el suelo. Suquilanda (1996).

Los resultados presentados a los 60 días consideran un variación donde el pH se vuelve ligeramente ácido, esta acidificación producto de la adición de la segunda aplicación de fertilizante que tiende a bajar el pH de los suelos. Buckman (1985). Se procedió a neutralizar esta situación con la adición de cal en solución, durante dos días, para estabilizar el sistema.

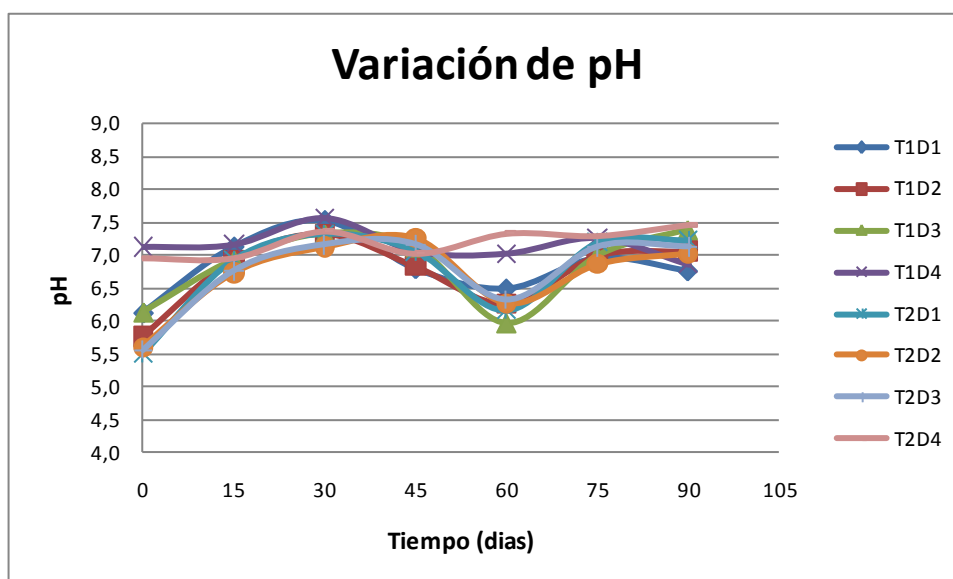
A partir del día 60 el resto de días presentaron datos homogéneos con variación muy leves una vez con valores de pH que estaban en valores neutros el proceso de remediación se mantuvo estable.

Los resultados del pH se muestran en la tabla 12

**Tabla 12.** Control de pH durante el proceso de biorremediación.

TRATAMIENTOS		pH (U pH) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	6,1	7,1	7,5	6,8	6,5	7,0	6,8
Diesel 20ml	T1D2	5,8	6,9	7,3	6,8	6,3	7,0	7,1
Diesel 10ml	T1D3	6,1	6,9	7,3	7,1	6,0	7,0	7,4
Testigo Diesel	T1D4	7,1	7,2	7,6	7,1	7,0	7,3	6,9
Bunker 40ml	T2D1	5,5	6,9	7,3	7,1	6,2	7,2	7,2
Bunker 20ml	T2D2	5,6	6,7	7,1	7,3	6,3	6,9	7,0
Bunker 10ml	T2D3	5,6	6,8	7,2	7,2	6,3	7,1	7,1
Testigo bunker	T2D4	7,0	7,0	7,4	7,0	7,3	7,3	7,5

La variación de pH en función del tiempo se muestra en el gráfico 5.



**Gráfico 5.** Variación del pH durante el proceso de biorremediación

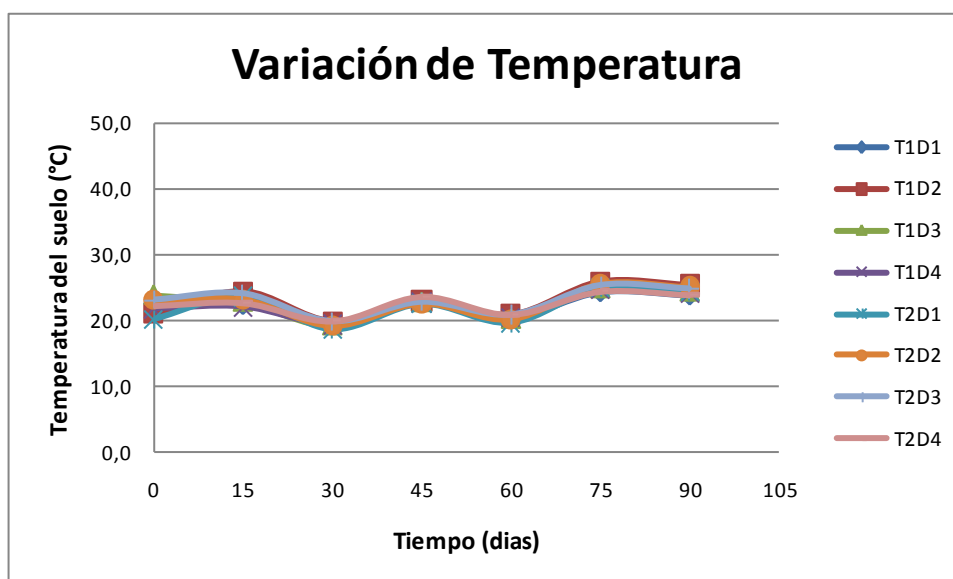
### 3.2.3 Temperatura

Los resultados de la temperatura se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Control de temperatura durante el proceso de biorremediación

TRATAMIENTOS		Temperatura (°C) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	22,8	22,6	19,5	23,1	20,5	24,5	24,0
Diesel 20ml	T1D2	21,1	24,5	20,0	23,2	21,0	26,0	25,5
Diesel 10ml	T1D3	24,0	22,9	19,3	22,8	20,3	24,9	24,4
Testigo Diesel	T1D4	21,9	22,1	19,5	22,8	20,5	24,8	24,3
Bunker 40ml	T2D1	20,3	23,8	18,8	22,6	19,8	25,0	24,5
Bunker 20ml	T2D2	23,2	23,4	19,3	22,8	20,3	25,8	25,3
Bunker 10ml	T2D3	23,2	24,2	20,0	22,9	21,0	25,4	24,9
Testigo bunker	T2D4	22,4	22,8	20,0	23,8	21,0	24,5	24,0

La variación de temperatura en función del tiempo se muestra en el siguiente gráfico.



**Gráfico 6.** Variación de la temperatura durante el proceso de biorremediación

Como se ha mencionado la temperatura ambiental rige la temperatura del suelo, mediante los datos de temperatura media en esta parte del país se encuentra entre 22 a 30° C, lo que se ve reflejado en los datos presentados.

### 3.2.4 Tiempo

La variable tiempo fue analizada para determinar cómo se dio la disminución en este parámetro y ver las diferencia estadísticas del mismo y sus interacciones.

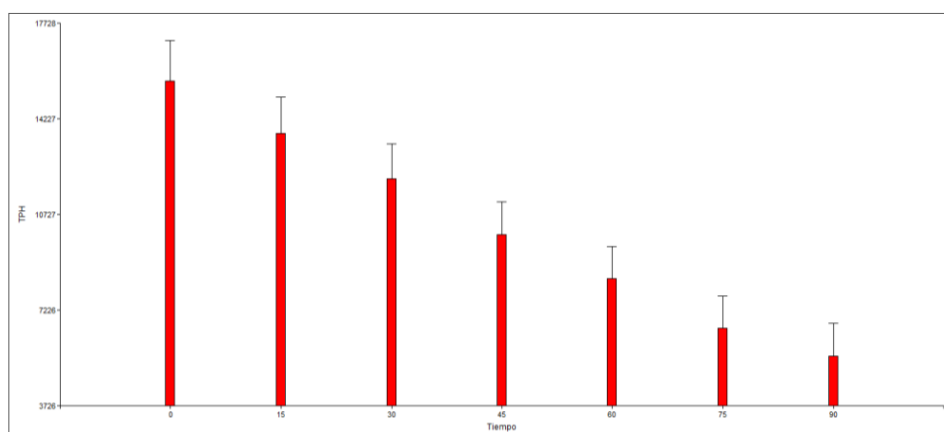
Los análisis estadísticos se presentan en los siguientes cuadros.

**Tabla 14.** Análisis Tiempo / TPH. Prueba Tukey Alpha=0,05

<b>Tiempo</b>	<b>Concentración media de TPH (mg/Kg)</b>	<b>Comparación de tratamientos</b>
90	5550,5	A
75	6558,83	A
60	8378,21	A B
45	9976,88	A B
30	12031,58	B C
15	13680,96	B C
0	15618,63	C

Las variaciones estadísticas del tiempo con los resultados de las concentraciones medias de TPH, muestran claramente que se da una tendencia de tres grupos dándose más interacción entre el primer mes y el segundo, siendo el último mes de análisis un grupo que está ligeramente ligado al segundo mes pero tiende a ser un poco más marcada la diferencia.

Una vez transcurridos los 90 días del ensayo se observa que la inoculación de la enzima a generado porcentajes aceptables de remoción de TPH versus los tratamientos que no utilizaron el inóculo, una de las causas atribuibles a este elevado porcentaje de remoción es un trabajo en conjunto entre la enzima de ensayo y los consorcios bacterianos autóctonos de la zona.



**Gráfico 7** Análisis estadístico en función de los tres meses del ensayo.

### 3.3 Cinética de degradación

#### 3.3.1 Determinación de Km.

Para la determinación del Km se procedió a utilizar la fórmula de cinética de primer orden, con los valores de concentración inicial, concentración final y el tiempo en el cual se dio esta reducción, se procedió al empleo de la fórmula de primer orden de lo cual se han obtenidos los siguientes valores presentados en la tabla 15.

**Tabla 15.** Concentración de TPH (mg/kg)

TRATAMIENTOS		TPH (mg/Kg) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	7.976,7	6.130,0	4.930,0	3.315,7	2.329,0	1.606,7	897,3
Diesel 20ml	T1D2	9.246,7	7.077,7	5.717,7	4.252,7	3.096,0	2.046,7	1.170,7
Diesel 10ml	T1D3	8.762,0	8.023,3	6.184,0	4.622,7	3.356,7	2.841,7	1.806,0
Testigo Diesel	T1D4	9.165,0	8.739,7	8.218,0	7.604,7	7.153,3	6.585,3	6.300,0
Bunker 40ml	T2D1	22.410,7	18.266,3	15.666,7	10.646,7	7.993,3	3.982,0	2.551,0
Bunker 20ml	T2D2	23.161,7	19.480,0	16.173,0	12.649,3	9.973,3	6.216,0	4.744,3
Bunker 10ml	T2D3	23.373,3	21.361,0	19.426,0	17.432,0	13.931,3	10.091,3	8.162,0
Testigo bunker	T2D4	20.853,0	20.369,7	19.937,3	19.291,3	19.192,7	19.101,0	18.772,7

Con los resultados presentados en la tabla anterior se realizara regresiones para determinar los  $R^2$ , y determinar cuál de los tratamientos se ajusta mejor a una cinética de primer orden o de orden cero.

### Primer orden

La regresión de primer orden se usó mediante la ecuación:

$$\frac{dc}{dt} = -kC$$

$$\text{Ln}C_f = -k\Delta t + \text{Ln}C_o$$

$$y = mx + n$$

En donde se obtuvo el Ln de todas las concentraciones obtenidas en el experimento

**Tabla 16.** Logaritmo natural de la concentración de TPH (mg/kg)

TRATAMIENTOS		Logaritmo Natural (concentración)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	8,98	8,72	8,50	8,11	7,75	7,38	6,80
Diesel 20ml	T1D2	9,13	8,86	8,65	8,36	8,04	7,62	7,07
Diesel 10ml	T1D3	9,08	8,99	8,73	8,44	8,12	7,95	7,50
Testigo Diesel	T1D4	9,12	9,08	9,01	8,94	8,88	8,79	8,75
Bunker 40ml	T2D1	10,02	9,81	9,66	9,27	8,99	8,29	7,84
Bunker 20ml	T2D2	10,05	9,88	9,69	9,45	9,21	8,73	8,46
Bunker 10ml	T2D3	10,06	9,97	9,87	9,77	9,54	9,22	9,01
Testigo bunker	T2D4	9,95	9,92	9,90	9,87	9,86	9,86	9,84

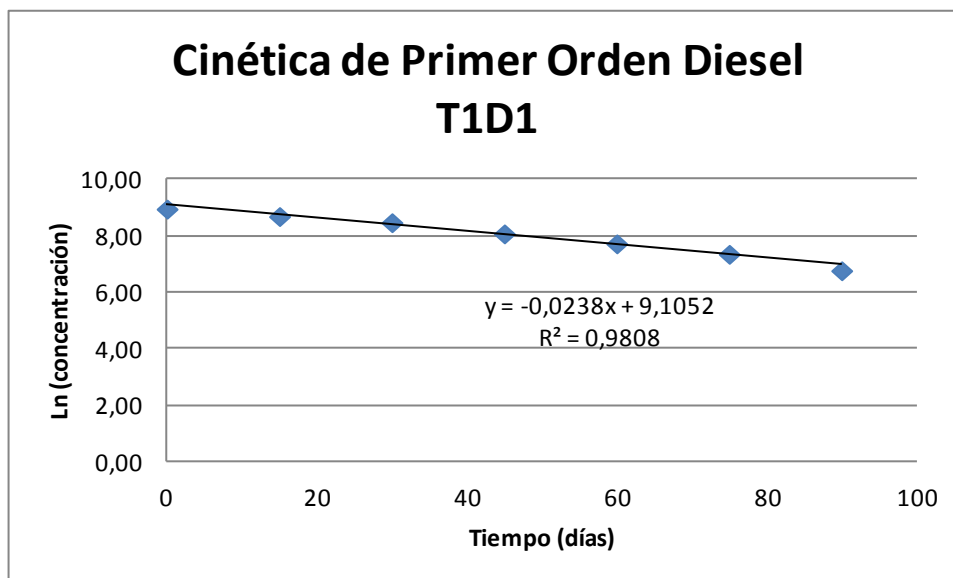
Con los valores de Ln de las concentraciones y mediante el uso del método de regresión de mínimos cuadrados se obtuvo el coeficiente de determinación  $R^2$ , y determinar cuál de los valores se acerca más a 1, se toma en consideración que los factores usados durante el experimento son de diferente naturaleza se usara los valores más cercanos a 1 en el caso del factor diésel y el más cercano a uno en el caso del factor bunker.

**Tabla 17.** Coeficiente de determinación  $R^2$ , cinética de primer orden.

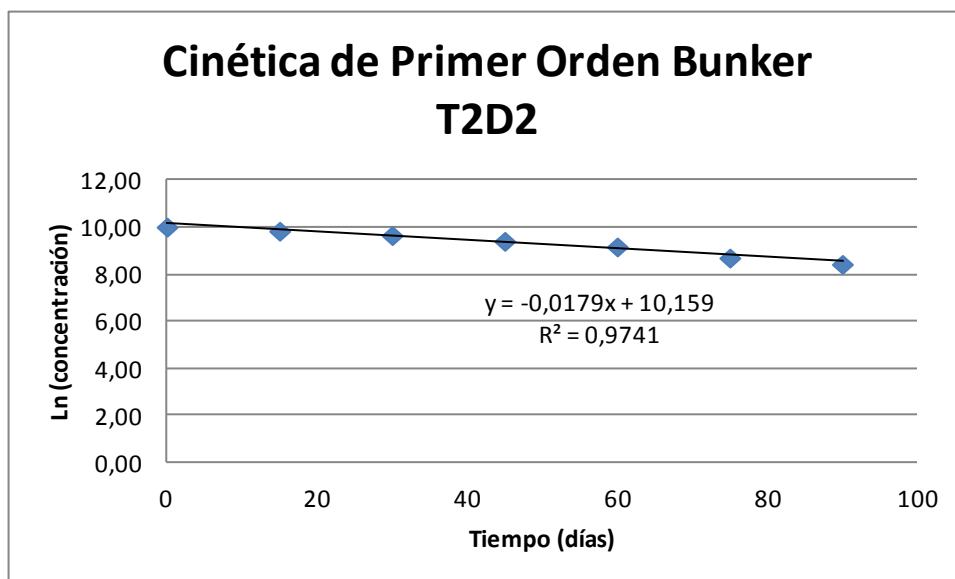
Primer Orden		
TRATAMIENTOS	Código	$R^2$
Testigo Diesel	T1D4	0,9954
Diesel 40ml	T1D1	0,9808
Diesel 10ml	T1D3	0,9795
Bunker 20ml	T2D2	0,9741
Diesel 20ml	T1D2	0,9739
Bunker 40ml	T2D1	0,9516
Bunker 10ml	T2D3	0,9438
Testigo bunker	T2D4	0,9413

El valor testigo diésel es descartado por no aplicar quedando para cinética de primer orden el tratamiento T1D1 para el caso del factor diésel, en el caso del factor bunker se usa el tratamiento T2D2.





**Gráfico 8.** Cinética de primer orden para diésel.



**Gráfico 9.** Cinética de primer orden para bunker.

La constante de la cinética se determina  $k = -0.0238$  en el factor diésel y de  $-0,0179$  en el caso de bunker.

Segundo orden

La regresión de segundo orden se uso mediante la ecuación:

$$\frac{dc}{dt} = -kC^2$$

$$\frac{1}{C_f} = k\Delta t + \frac{1}{C_o}$$

$$y = mx + n$$

En donde se obtuvo el recíproco de todas las concentraciones obtenidas en el experimento

**Tabla 18.** Recíproco de la concentración de TPH (mg/kg)

Segundo orden

TRATAMIENTOS		Recíproco = 1 / (Concentración)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	1,25E-04	1,63E-04	2,03E-04	3,02E-04	4,29E-04	6,22E-04	1,11E-03
Diesel 20ml	T1D2	1,08E-04	1,41E-04	1,75E-04	2,35E-04	3,23E-04	4,89E-04	8,54E-04
Diesel 10ml	T1D3	1,14E-04	1,25E-04	1,62E-04	2,16E-04	2,98E-04	3,52E-04	5,54E-04
Testigo Diesel	T1D4	1,09E-04	1,14E-04	1,22E-04	1,31E-04	1,40E-04	1,52E-04	1,59E-04
Bunker 40ml	T2D1	4,46E-05	5,47E-05	6,38E-05	9,39E-05	1,25E-04	2,51E-04	3,92E-04
Bunker 20ml	T2D2	4,32E-05	5,13E-05	6,18E-05	7,91E-05	1,00E-04	1,61E-04	2,11E-04
Bunker 10ml	T2D3	4,28E-05	4,68E-05	5,15E-05	5,74E-05	7,18E-05	9,91E-05	1,23E-04
Testigo bunker	T2D4	4,80E-05	4,91E-05	5,02E-05	5,18E-05	5,21E-05	5,24E-05	5,33E-05

Con los valores de los recíprocos de las concentraciones y mediante el uso del método de regresión de mínimos cuadrados se obtuvo el coeficiente de determinación  $R^2$ , y determinar cuál de los valores se acerca más a 1.

**Tabla 19.** Coeficiente de determinación  $R^2$ , cinética de segundo orden

Segundo orden

TRATAMIENTOS	Código	$R^2$
Testigo Diesel	T1D4	0,9910
Testigo bunker	T2D4	0,9453
Diesel 10ml	T1D3	0,8839
Bunker 20ml	T2D2	0,8800
Bunker 10ml	T2D3	0,8785
Diesel 40ml	T1D1	0,8193
Diesel 20ml	T1D2	0,8113
Bunker 40ml	T2D1	0,7989

De acuerdo al método de regresión de los mínimos cuadrados se selecciona el valor que más se acerca a 1 en el caso de la cinética de segundo orden, los valores testigos son descartados ya que no poseen inóculo y se trabaja con el resto de tratamientos.

Los tratamientos al presentar un coeficiente de relación de  $<0,8$  no son tomados en cuenta debido que no ser aplicables por el método de regresión de mínimos cuadrados.

### 3.3.2 Proyección según ecuaciones de cinética química.-

#### Primer orden-

Dada la constante  $k=-0.0238$ , se reemplazara en la ecuación para determinar los tiempos que tomaran los tratamientos que no llegaron a los valores permisibles de la legislación ecuatoriana según decreto ejecutivo RAOH 1215.

**Tabla 20.** Valores de incumplimiento de legislación ambiental.

TRATAMIENTOS		TPH (mg/Kg) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	7.976,7	6.130,0	4.930,0	3.315,7	2.329,0	1.606,7	897,3
Diesel 20ml	T1D2	9.246,7	7.077,7	5.717,7	4.252,7	3.096,0	2.046,7	1.170,7
Diesel 10ml	T1D3	8.762,0	8.023,3	6.184,0	4.622,7	3.356,7	2.841,7	1.806,0
Testigo Diesel	T1D4	9.165,0	8.739,7	8.218,0	7.604,7	7.153,3	6.585,3	6.300,0
Bunker 40ml	T2D1	22.410,7	18.266,3	15.666,7	10.646,7	7.993,3	3.982,0	2.551,0
Bunker 20ml	T2D2	23.161,7	19.480,0	16.173,0	12.649,3	9.973,3	6.216,0	4.744,3
Bunker 10ml	T2D3	23.373,3	21.361,0	19.426,0	17.432,0	13.931,3	10.091,3	8.162,0
Testigo bunker	T2D4	20.853,0	20.369,7	19.937,3	19.291,3	19.192,7	19.101,0	18.772,7

Ecuación reemplazada

$$\text{Ln}C_f = -k\Delta t + \text{Ln}C_o$$

$$\text{Ln}C_f = -0.0238\Delta t + \text{Ln}C_o$$

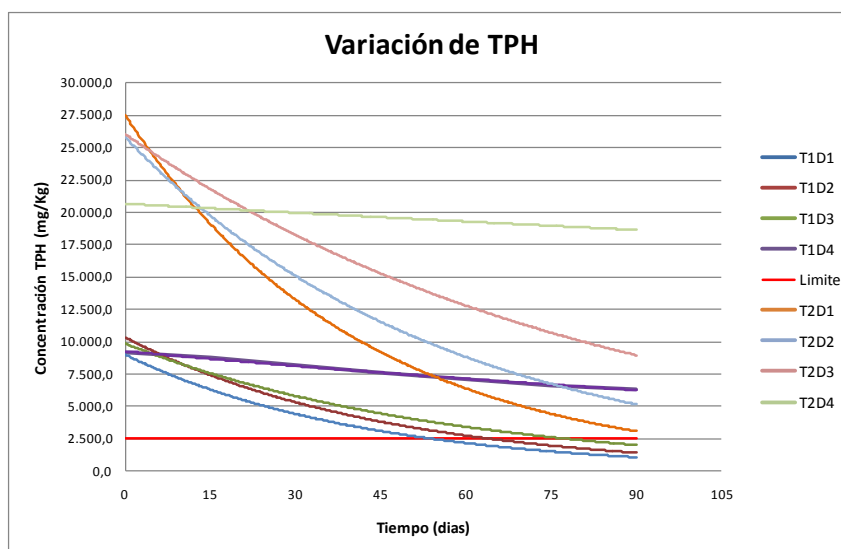
$$\text{Ln}C_f = -0.0179\Delta t + \text{Ln}C_o$$

Tomado en consideración que la concentración que indica la legislación RAOH 1215 es como valor máximo permisible de 2500 mg/kg, se reemplazara este valor como concentración final y se calculara el tiempo.

$$\Delta t = \frac{\text{Ln}C_f - \text{Ln}C_o}{-k}$$

**Tabla 21.** Días para cumplir con legislación ambiental

TRATAMIENTOS		Días para cumplir con 2500 ppm TPH	
		$k=-0.0238$	$k=-0.0179$
Diesel 40ml	T1D1	N/A	N/A
Diesel 20ml	T1D2	N/A	N/A
Diesel 10ml	T1D3	N/A	N/A
Testigo Diesel	T1D4	38,83	51,63
Bunker 40ml	T2D1	0,85	1,13
Bunker 20ml	T2D2	26,92	35,79
Bunker 10ml	T2D3	49,71	66,10
Testigo bunker	T2D4	84,71	112,63

**Gráfico 10.** Cinética de primer orden para el factor diésel

En los dos casos las cinéticas se han ajustado a un primer orden, para los casos de los blancos la tendencia se presenta de manera lineal lo cual indica que en estos casos la disminución de la concentración se dio en un valor casi imperceptible.

Aunque con los resultados presentados se observa disminución en los dos casos, el factor bunker no cumplió el parámetro esperado de llegar a valores menores de

2500 ppm ya que en es el valor máximo permisible en la legislación ecuatoriana. Caso contrario en el diésel en donde se dio una disminución y se obtuvo valores permisible por la ley en el periodo analizado.

Una de la causas podría ser que el tiempo que duro el ensayo no fue suficiente para el bunker, se necesitaría de por lo menos 5 a 6 meses para poder llegar a valores menores de TPH. Como le reporta Soto (2001) donde para muestras parecidas utilizó un periodo de 6 meses de prueba otros autores contrastan con estudio donde los tiempos de monitoreo son de 4 meses en este caso a valor de cuantificar la eficiencia de la enzima se propuso 3 meses.

### **3.4 Rendimiento**

#### **3.4.1 Tasa de degradación**

La tasa de degradación es una relación directamente proporcional a las concentraciones ya que se usan los valores de concentración inicial y concentración final en base a esto se realiza un cambio tomando como Concentración inicial ( $C_0$ ) igual a 0 y la Concentración final ( $C_f$ ) igual a 100 y los intervalos serán los que marque en ritmo de esta manera se presenta en la tabla 22.

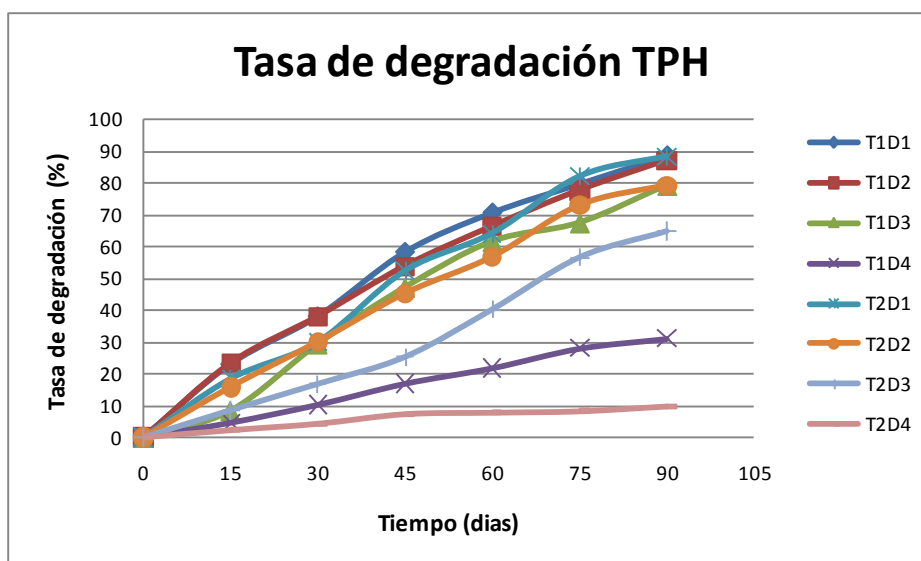
De esta manera se puede observar como los tratamientos tienen el mismo comportamiento de los analizados en el ítem anterior TPH, los resultados presentan el mismo comportamiento pero se encuentran en función de %.

De los tratamientos estudiados, se observa que 5 de ellos llegaron a niveles de remoción superiores al 75%, tomando como referencia la concentración inicial

versus la concentración final. Dos tratamientos considerados como las muestras control (sin dosis) y el tratamiento T3D2 han generado valores de remoción menores al 75%, considerándose tratamientos poco eficientes.

**Tabla 22.** Tasa de degradación de TPH en función del tiempo.

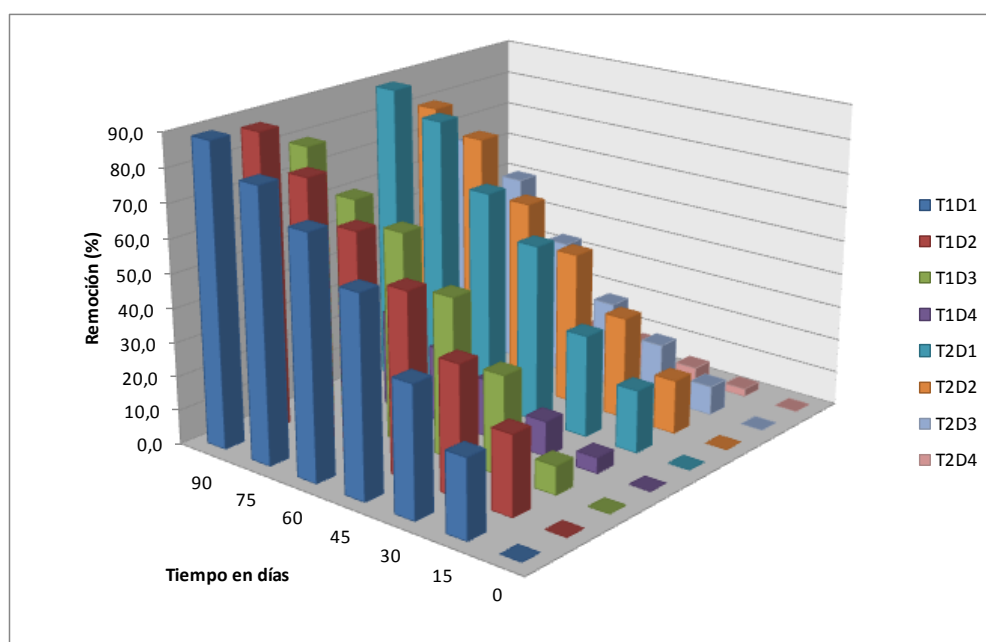
TRATAMIENTOS		TASA DE DEGRADACIÓN (%) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	0,0	23,2	38,2	58,4	70,8	79,9	88,8
Diesel 20ml	T1D2	0,0	23,5	38,2	54,0	66,5	77,9	87,3
Diesel 10ml	T1D3	0,0	8,4	29,4	47,2	61,7	67,6	79,4
Testigo Diesel	T1D4	0,0	4,6	10,3	17,0	21,9	28,1	31,3
Bunker 40ml	T2D1	0,0	18,5	30,1	52,5	64,3	82,2	88,6
Bunker 20ml	T2D2	0,0	15,9	30,2	45,4	56,9	73,2	79,5
Bunker 10ml	T2D3	0,0	8,6	16,9	25,4	40,4	56,8	65,1
Testigo bunker	T2D4	0,0	2,3	4,4	7,5	8,0	8,4	10,0



**Gráfico 11.** Tasa de degradación de TPH.

El tratamiento T1D1 es el que tiene mejores resultados mientras el T4D2 es el que obtuvo un resultado casi insignificante en un periodo de estudio de 3 meses.

En el gráfico 12 son mostrados los valores de remoción obtenidos para cada uno de los tratamientos expresados en porcentaje para la muestra experimental, en los diferentes tiempos del estudio, en el cual se obtienen porcentajes de remoción desde la primera quincena.



**Gráfico 12.** Remoción de TPH en la muestra experimental

Este gráfico ayuda ver el proceso de manera global desde que empezó hasta que terminó, la diferencia que no se puede observar es el límite permisible de la RAOH 1215.

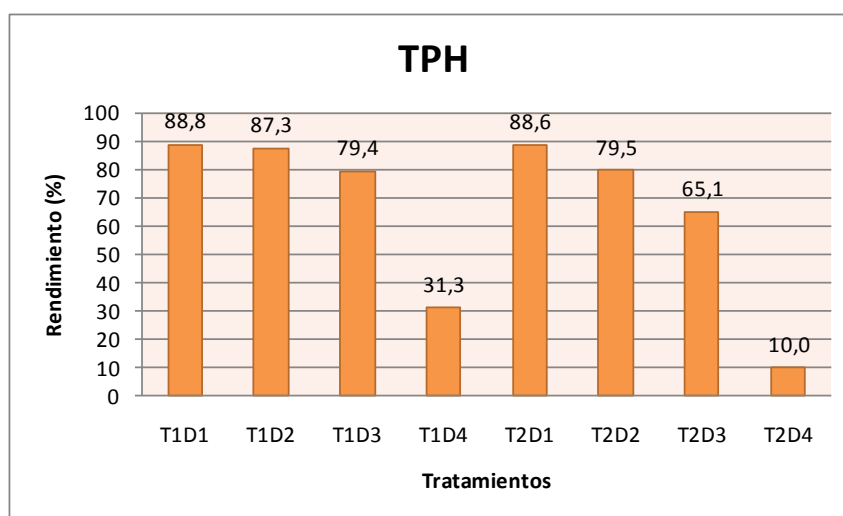
### 3.4.2 TPH

De los resultados que se encuentran en el cuadro 4.4 se establece que el mejor tratamiento con el rendimiento óptimo en la disminución de TPH a los 90 días es el T1D1 con el 88,8%, el tratamiento T1D2 si bien posee un rendimiento muy parecido



pero sus valores no llegaron al valor máximo permisible por lo que son excluidos de esta comparación.

La variación de biorremediación en función del tiempo se expresa en el gráfico 13.



**Gráfico 13.** Evaluación de rendimiento a los 90 días

La interpretación de este gráfico da un visión global de los rendimientos del proceso de remediación al cabo de los 90 días con el uso de la enzima, claramente se observa como los tratamientos donde se utilizó mayor cantidad de enzima produjo mayor cantidad de remoción de TPH en suelos contaminados.

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

El método de ex-situ de landfarm para remediar suelos contaminados por hidrocarburos es una técnica que da excelentes resultados frente a otras técnicas de remediación, es así que esta metodología lograr altos grados de eficiencia en la remoción de contaminantes, tomando en cuenta que las técnicas in-situ pueden lograr igual o mejores resultados siempre y cuando se utilicen de manera adecuada los parámetros de control (pH, temperatura, humedad), además de realizar un control al sistema de manera puntual y riguroso donde no varié las condiciones de manera que pueda afectar al proceso de bioremediación (Bongkeun, 2000), (Ebru, 2004).

Soto (2000) reporta que los contaminaste de hidrocarburo como gasolinas, diésel, kerosén son compuestos de hidrocarburos que por su naturaleza de compuestos simples con menos enlaces y ramificaciones son más fáciles de degradar en comparación a los hidrocarburos como parafinas, aromáticos y asfáltenos, ciclo parafinas, estos se consideran los más resistentes a la bioremediación.

El coctel de enzimas (oxigenasas y peroxidasas), incluidas en el inóculo enzimático aceleran el proceso de remediación, según Benavidez (2005) la técnica ex-situ de landfarm puede alcanzar valores aceptables de remoción en periodos que varían de 6 meses a varios años.

La alta eficiencia en la remoción de TPH del suelo por parte del inóculo enzimático se debe a su gran especificidad esto gracias a que puede romper las cadenas de carbono en cadenas más pequeñas con los cual este carbono puede ser

asimilado por las colonias de bacterias autóctonas propias del suelo (Oilfield Chemicals, 1900).

La bioaumentación con nutrientes NPK tiene resultados positivos los porcentajes de remediación utilizando esta técnica son considerables y van desde un 62% a un 85% en un tiempo de 45 días (Roberto, 2000), para esta investigación los porcentajes estuvieron en un rango del 82% en un tiempo de 90 días.

Según reporta Arroyo (2001), la necesidad de condiciones óptimas de pH, temperatura y nutrientes debe estar balanceada de manera que no se dé efectos contraproducentes ya que un desbalance en estos elementos puede generar que los tiempos de proceso se alarguen y en el peor de los casos el inóculo enzimático no tenga las condiciones necesarias para en conjunto con las bacterias poder degradar los compuestos de hidrocarburos.

De la misma manera se puede constatar que los tratamientos testigos T1D4 y T2D4, han generado reducción en su carga contaminante, la metodología de landfarm según se evidencia al tener un correcto manejo puede lograr resultados de disminución de TPH aun cuando los valores reportados sean mínimos, contrastando con estos valores se puede aplicar los mencionado por Lee (2001) donde se realiza el método de atenuación natural que posee características semejantes a las que tuvo los tratamientos testigos del presente ensayo y en donde se destaca a la atenuación natural como un técnica viable para la bioremediación.

Con respecto a las pruebas estadísticas existe una marcada diferencia en las dos muestras utilizadas como agentes contaminaste, esto como se anotan en párrafos anteriores debido a su naturaleza carbonada.

En lo relacionado a la cinética de degradación se ajustó a una cinética de primer grado, aun cuando los valores tienen fluctuaciones importantes, como era de esperarse, los resultados indican la diferencia de los agentes utilizados. Todos los factores y sus interacciones resultaron ser significantes, la adición de nutrientes, las diferentes cantidades de inóculo enzimático, los dos agentes contaminantes, exceptuando este último que produjo las evidencias más significantes. Como se evidencia en los tratamientos T1 (diésel) los resultados son mejores frente a los resultados del tratamiento T2 (bunker) a los 90 días de iniciado el ensayo generando una diferencia importante ya que el diésel al ser más fácil de remediar produjo mejores resultados frente a la complejidad del bunker.

Considero la extensión del diseño experimental, el número de repeticiones por tratamiento, por otra parte la robustez de la prueba ANOVA mostro su pertinencia.

Los diferentes agentes contaminantes que sirvieron para este trabajo de investigación aplicada presentaron diferencia marcada en sus estructuras químicas para la biorremediación. En el caso de diésel fue importante la identificación de sus principales cadenas y enlaces simples mientras en el bunker (asfáltenos, aromáticos, ciclo aromáticos).

Los análisis de macro y micro nutrientes en el suelo antes de la contaminación ayudaron a realizar un cálculo y ajuste de la cantidad de fertilizante que se tuvo que utilizar en este estudio de investigación, ya que según reporta Maroto (2001), las cantidades óptimas de NPK para biorremediación son 20:1:1.

Con respecto a las pruebas estadísticas de homogeneidad del análisis estadístico se conoce que en todo experimento siempre habrá un remanente de variabilidad

debido a causas o aleatorias que provocan la variabilidad natural del proceso (Gutiérrez, 2008).

En base a los resultados obtenidos del ensayo se puede mencionar que las cantidades de inóculo bacteriano no tienen mayor diferencia estadística en todos los ensayos se tiene tasas de remoción en promedio del 81%, según la Oilfield Chemicals se debe colocar un cantidad equivalente a 2000 g por tonelada de suelo en las conversiones de coloco 20 ml del producto y de este estándar se varió las concentraciones en un extremo superior y la mitad para demostrar cual era más eficiente, se propone para estudios futuros tomar cantidades más representativas como 0 ml, 10 ml, 50 ml y 100 ml y ver si en estas cantidades las variaciones en la tasa de degradación son más evidentes para que la discusión tenga más relevancia.

Los tratamientos que recibieron dosis de 40 ml (T1D1 y T2D1) de inóculo enzimático presentaron una mayor eficiencia aun cuando los demás tratamientos tienen ligeras diferencias que son casi imperceptibles, basado en los estudios de Rodríguez (2008) donde se obtuvieron resultados donde el rendimiento de la bioremediación para TPH genera datos muy homogéneos entre todos los tratamientos en donde casi todos los tratamientos generan un promedio de casi el 65% de rendimiento, para este ensayo el promedio general está en un 81% de rendimiento en los dos casos se utilizó ensayos de campo y se evaluaron con metodologías parecidas las diferencias fueron en los sustratos utilizados y el tipo de los parámetros de control.

Con la obtención de una cinética de primer orden como lo indica Rodríguez 2000, se observa que los tratamientos se justas a la ecuación  $y = -0,0238x + 9,1052$  y

a la ecuación  $y = -0,0179x + 10,159$ , en el caso de los factores diésel y bunker respectivamente, sin embargo con los valores obtenidos de R<sup>2</sup>, los valores que se ajustan más a 1 son los valores de los tratamientos testigos, confirmando que el proceso de biorremediación por landafarming tiene una efectividad esperada.

Las interacciones entre el pH y la temperatura demostraron estar ligados directamente al proceso, razón por la cual fueron medidos situación que ayudo a tener mayores datos para el análisis estadístico y las presentes discusiones.

La temperatura ambiental actúa directamente sobre la temperatura del suelo impactado la actividad metabólica y consecuente mente la biodegradación (EPA, 2012).

En trabajos parecido (Gutiérrez, 2008), su puede constatar que con la adición de diferentes tipos de sustratos (compost, Bocashi), los resultados obtenidos presentan homogeneidad con los reportados en este ensayo siendo diferentes en las variables utilizadas mientras en el autor utilizó la metodología de varios sustratos en este trabajo se varió las fuentes de contaminación.

El usos de bacterias (*Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp), han producido excelentes resultados a nivel de laboratorio demostrando que su especificidad en la remoción de compuestos específicos, estas bacterias han sido asiladas de lugares contaminados o de lodos de perforación, según reporta Benavides (2005), los ensayos realizados con este tipo de bacterias aisladas pueden generar altos porcentajes de remediación. Tomando en cuenta el estudio de Soto (2000), donde en vez de utilizar bacterias aisladas se utilizó bacterias autóctonas del mismo lugar estas produjeron porcentajes

de remediación parecidos a los reportados por otros autores que realizaron ensayos de remediación con bacterias aisladas.

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp han sido estudiadas in-vitro bajo condiciones controladas de pH, temperatura, medios de cultivo, cantidad de luz, etc. (Benavidez, 2005). Este control al ser altamente eficiente debe ser probado en campo, el presente trabajo de investigación al ser realizado en un invernadero no pudo controlar estos parámetros permitiendo que los microorganismos autóctonos se adapten a él proporcionando una bioaumentación del mismo.

Controlar parámetros ambientales bajo estas condiciones de campo si bien fuera posible pero el gasto operativo que demandaría tener instalaciones a gran escala que fueran capaces de regular condiciones sería muy alto y costoso razón por lo cual es impracticable.

La ubicación del ensayo fue un factor primordial para los resultados obtenidos, desde 1980 se han registrado innumerables desastres por derrames de hidrocarburos en la región amazónica razón por la cual el ensayo se lo realizó bajo las condiciones naturales de esta parte de Ecuador.

La naturaleza del suelo al ser un suelo arcillo con gran cantidad de hierro propio de los bosques húmedos montados de las estribaciones de la cordillera baja, es un suelo que al no tener características muy favorables pH ácido para este tipo de ensayos tuvo que ser homogenizado con suelo de características más aptas para este fin. Este parámetro tuvo incidencia directa en los resultados, ya que las arcillas por

su naturaleza son suelos difíciles de trabajar y produjo a los 60 días una baja de pH en conjunto con la adición de la segunda dosis de fertilizante e inóculo enzimático.

El parámetro de control TPH es el más usado siendo este un indicador del nivel de contaminación. Otros autores a más de estos parámetros han utilizado otros parámetros de control. Soto (2000) utiliza un control de saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos. Generando interacciones con mayor contrastes entre las variaciones de TPH con el resto de parámetros medidos. Rodríguez (2008) en su estudio realiza ensayos donde sus parámetros de control están basados a la medición de níquel, cadmio, plomo y TPH que de la misma manera genera un mayor campo de interacciones son indicadores que pueden en momentos contrastar con el indicador TPH de la misma manera mayor cantidad de datos pueden ayudar a robustecer el diseño estadístico.

El suelo al ser un suelo arcilloso propio de pisos húmedos de la amazonia tienen características entre ácidas y ligeramente ácidas de entre 4 a 6 (Hernando, 2007), con estas consideraciones al inicio se tuvo un pH ácido pero al equilibra el sistema con la adición de un suelo neutro y la adición de nutrientes se observa una variación tendiendo a un pH más básico, a los dos meses se tiene una nueva variación lo que produjo que se ajuste el sistema con cal en solución además de la re adición de nutrientes, homogenizado y una aireación más extensa para equilibrar el sistema.



## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

Una vez terminado el ensayo de biorremediación utilizando la metodología de landfarm y recopilados todos los datos: tablas, cuadros, cuadros estadísticos, ANOVAS, graficas, referencias bibliográficas, papers, investigaciones complementarias se ha podido concluir que la adición del inóculo enzimático cumplió su objetivo general que fue acelerar el proceso de remedición, como se ha discutido en capítulos anteriores la adición del mismo acelero el proceso de manera que los tratamiento que utilizaron el inóculo frente a los tratamientos blanco fueron mucho más eficientes tanto así que para que el proceso de descontaminación se dé en los tratamientos que no utilizaron el inóculo se necesitaría de muchos más tiempo por lo menos de 6 meses a 9 meses de trabajo de campo lo que implica mayor gasto operativo.

El objetivo de realizar un análisis de condiciones físico-químicas fue para aplicar la técnica de bioaumentación la cual tuvo resultados positivos ya que el suelo al ser un suelo de características acidas y arcillo por sí solo no hubiera podido realizar un proceso de biorremediación, además que estos elementos proporcionaron los elementos necesarios, con el análisis inicial se evidencia a la pobreza de estos elementos, esto concuerda con varios autores que mencionan que la capa vegetal del suelo del oriente es de solo unos pocos centímetros la adición de NPK en la porción 20:1:1 balanceo el sistema. Con la evaluación de estas características se pudo mejorar las condiciones para el proceso de biorremediación y por lo tanto para tener resultados óptimos.

Las conclusiones acerca de una concentración óptima no pudieron ser muy evidentes ya que como se menciona en capítulos anteriores a medida que incrementamos las concentraciones de inóculo enzimático el porcentaje de remoción de TPH era mayor, se ha dejado planteado que para futuras investigaciones se tome valores de concentración de 0 ml, 20 ml, 50 ml y 100 ml con lo cual se pueda evidenciar más claramente cual concentración es la más idónea, este objetivo fue planteado principalmente por el costo que conlleva el uso de este producto con estimaciones se ha calculado que el precio de los 15 kg de inóculo enzimático está en \$450.00, para lo cual hay que dosificar en medidas que no se malgaste el producto por los costos y porque una sobre concentración puede inhibir el proceso y anular todas las bacterias.

El costo de un proceso de biorremediación bajo condiciones de campo con el uso de esta tecnología puede alcanzar bordear entre \$10,000.00 a 15,000.00 dependiendo de la magnitud del sitio a remediar, este es el criterio más importante para evaluar una dosificación correcta a condiciones ambientales.

También se concluye que las concentraciones utilizadas para el presente ensayo no demostraron ser estadísticamente significativas, debido a que la variación en sus concentraciones de aplicación no fue la más apta, aunque se evidencio que las concentraciones de inóculo con 40 ml para los dos casos diésel y bunker tuvieron excelentes resultados frente a las otras concentraciones aunque como ya se indicó no existió una diferencia marcada

Como se evidencio la temperatura afecta directamente a la temperatura del suelo, al proceso de landfarm al ser un proceso que no genera calor interno a diferencia del compost este estará regulado por la temperatura ambiente los valores reportados tuvieron una media de 23° C lo cual es ideal para el proceso los ligeros picos que se dieron a los días 15 y 75 no afectaron de manera significativa.

Las variaciones del pH de la misma manera no fueron muy significativas salvo en el día 60 donde se evidencio un pico de bajada llegando a ser un suelo ácido para lo cual se tuvo que adicionar cal para regular el sistema, el descenso del pH no tuvo una incidencia directa sobre el proceso se hubiera esperado que el inóculo y las poblaciones autóctonas si inhibieran a un pH bajo pero a la rápida acción de equilibrar el sistema no se evidenciaron cambios tan drásticos.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores el control de estas condiciones y un buen control son fundamentales una demostración cuantitativa es que las concentración de TPH se redujeron de valores de 22981.9 mg/kg hasta 5152.4 mg/kg para el caso del bunker y para el caso del diésel 8661 mg/kg hasta 1291 mg/kg de haber existido condiciones desfavorables de pH y temperatura este proceso jamás hubiera podido ser tan eficiente.

Usando regresiones lineales se determinó que la cinética que más se ajusta al proceso fue la cinética de primer orden, los valores reportados con el ajuste de cinéticas de segundo y orden cero no registraban valores viables.

El ser un proyecto de biorremediación ex-situ artificial en donde el suelo tuvo que ser contaminado artificialmente se tuvo que realizar un proyecto en miniatura

donde se recreen las condiciones ambientales normales a las cuales están expuestos los procesos de biorremediación normalmente, las cantidades de suelo utilizadas y los valores en volumen utilizados tanto de bunker como de diésel estuvieron cercanos a los valores que se dan en bajo condiciones normales, el proceso de recrear condiciones de contaminación tuvo los resultados esperados basados en proyectos de remediación in-situ parecidos, los parámetros de control y las técnicas utilizadas demostraron que el escalado inverso cumplió sus objetivos

Los valores a los que se ajustó el sistema de TPH están ligados directamente a la cantidad de diésel y bunker adicionados, las cantidades no sobrepasaron los 23000 ppm ya que con valores mayores no se puede dar una biorremediación ya que las bacterias y el inóculo bacteriano estarían en condiciones inoperables por lo cual se trató en lo posible de adicionar cantidades que simulen un suelo contaminado de manera natural.

En función de los resultados obtenidos se acepta la hipótesis nula, ya que la concentración que dio los mejores resultados fue la concentración alta de 40 ml de inóculo enzimático tanto para el caso del diésel y del bunker.

## CAPÍTULO VI

### RECOMENDACIONES

El uso de un inóculo enzimático debería ser estudiado de manera más exhaustiva, en base a la legislación ambiental vigente RAOH 1215 en donde estipula que el recurso suelo para ser considerado remediado debe cumplir cuatro parámetros químicos TPH, Plomo, Cadmio, Níquel y HAP's, debido al costo de los análisis de todos estos parámetros esta investigación se centro solo en TPH.

Para procesos de biorremediación en suelos que contengan contaminantes como bunker y crudo pesado en grandes cantidades, se recomienda primero se realice un pre tratamiento mediante lavados con detergentes surfactantes para mediante arrastre hidráulico se elimine de manera mecánica gran parte de contaminante y de esta manera bajar las concentraciones de TPH a concentraciones óptimas de trabajo para la enzima.

Durante el proceso de biorremediación de suelo por landfarm es necesario estimular el crecimiento de los microorganismos mediante la adición de variables abióticas principalmente provisión de agua mediante la humectación, el oxígeno mediante la aireación mecánica, ya que este es el aceptor de electrones en el proceso aerobio, llevado a cabo por bacterias y el adecuado suministro de nutrientes

Llevar un control de pH adecuado para intervenir en el caso de que las condiciones del mismo empiece a generar procesos de acidificación con lo cual la bioaumentación realizada se vería afectada directamente en las poblaciones bacterianas autóctonas del suelo

Al aplicar el proceso de bioestimulación tener un estricto control de la dosificación para evitar un excedente en la proporción de nutrientes.

Es notorio que los factores ambientales influyeron de manera directa al desarrollo y metabolismo de las colonias autóctonas del suelo durante el proceso de biorremediación por landfarm

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

- Agarry, S., & Solomon, B. (2008). Inhibition kinetic of phenol degradation by indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. . *Bioremediation*, 12-20.
- Agencia. (1999). *Agencia de proteccion ambiental*. Recuperado el 2012, de [www.atsdr.cdc.gov/ec](http://www.atsdr.cdc.gov/ec)
- Annachhatre, A., & Gheewala, S. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol*, 35-36.
- Araujo, I. (2004). *Recuperación biológica de suelos contaminados con ríos de perforación, base aceite*. Maracaibo.
- Atlas, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación: Madrid.
- Benzina, A. (2001). *Agricultura orgánica: Fundamentos para la región andina*. Alemania: Neckar-verlang.
- Bongkeun, S. (2000). Isolation and characterization of diverse halobenzoate, 66-68
- Buckman, H. (1985). *Naturaleza y propiedades de los suelos*. Mexico: Limusa.
- EPA. (2012). *Agencia de proteccion ambiental*. Recuperado el 2012, de [www.epa.gov/out/cat/landfarm](http://www.epa.gov/out/cat/landfarm)
- Eweis, J. (1999). *Principios de Bioremediación*. España: McGraw-Hill.
- FAO. (1997). *Guía para la descripción de perfiles de suelo*. Roma: FAO.
- Guaranda, W. (2012). *FUNDACIÓN REGIONAL DE ASESORÍA EN DERECHOS HUMANOS*. Obtenido de <http://www.inredh.org/index.php>
- Levin, H., & Lee, J. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. USA: McGraw-Hill.
- MAE. (2000). TULAS. *TULAS*. Quito, Pichincha, Ecuador: MAE.
- MAE. (2001). Decreto ejecutivo 1215. *Decreto para control hidrocarburífero*. Pichincha, Ecuador.
- Morris, L. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Madrid: Mc Graw - Hill.
- Mulas, R. (2014). *Fundamentos de biorremediación, Tratamiento y recuperación de suelos contaminados*. Obtenido de

[http://suel.wikispaces.com/file/view/Fundam\\_Biorremediacion.pdf/52971546/Fundam\\_Biorremediacion.pdf](http://suel.wikispaces.com/file/view/Fundam_Biorremediacion.pdf/52971546/Fundam_Biorremediacion.pdf)

- Pardo, J. (2004). *Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo*. Bogota.
- PEPDA. (2012). *Protección Ambiental*. Recuperado el Julio de 2012, de <http://proteccionambiental.org/site/pepda.htm>
- Petroecuador. (1999). Hidrocarburo totales de petróleo. *Hidrocarburo totales de petróleo*. Sucumbios, Ecuador.
- Petroleo, M. (2000). Manual de control de derrames de petróleo. *Manual de control de derrames de petróleo*. Sucumbios, Ecuador.
- Riser, E. (1996). Remediation of petroleum contaminated soil. LLC.
- Rittmann, B. (1996). Biotecnología del medio ambiente. Madrid: Mc Graw-Hill.
- Ryan, J., & Loehr, E. (1991). Bioremediation of organic contaminated soils. *Journal of Hazardous materials*, 159-169.
- Samanez, G. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo. San Marcos, Peru.
- Suquilanda, M. (1996). *Agricultura orgánica*. Quito: UPS.
- Veihmeyer, F., & Hendrickson, A. (1949). *Methods of measuring field capacity and permanent wilting percentage of soil*. Sci.



**CERTIFICADO**

**Nosotros: Ing. Rafael Vargas y Ing. Pedro Romero**

**CERTIFICAN**

**La tesis de grado titulada “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO, PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS”, realizada por el señor EDISON PATRICIO MARCILLO TIPÁN, ha sido revisado prolijamente y cumple con los requerimientos: teóricos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la ESPE, por lo que nos permitimos acreditarlo y autorizar la entrega a la Dra. María Augusta Chavez M.Sc., en su calidad de Coordinadora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. El trabajo en mención consta de dos ejemplares empastados y dos discos compactos, los cuales contienen el documento en formato portátil de Acrobat (pdf).**

**Sangolquí, 17 de abril de 2014**

---

**Ing. Rafael Vargas**

**DIRECTOR**

---

**Ing. Pedro Romero**

**CODIRECTOR**