

UCH-FC
Q. Ambiental
L 433
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**"BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS, PROVENIENTES DE ACEITES DE MOTORES"**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

Blenda Esperanza Leal León



Director de Seminario de Título: Ing. María José Cucurella
Profesores Patrocinantes: Dra. Margarita Carú
Mag. Julio Hidalgo

Marzo de 2009
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

BLENDA ESPERANZA LEAL LEÓN

**“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS, PROVENIENTES DE ACEITES DE MOTORES”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Ing. María Jose Cucurella
Director Seminario de Título

Dra. Margarita Carú
Profesor Patrocinante

Mag. Julio Hidalgo
Profesor Patrocinante

M. Cs. Sylvia Copaja
Corrector

M. Cs. Héctor Bravo
Corrector

Santiago de Chile, marzo de 2009

Facultad de Ciencias
Biblioteca Central
U. de Chile

RESEÑA



Mi nombre es Blenda Esperanza Leal León, nací en Santiago de Chile el mes de octubre del año 1983. Pertenezco a una familia muy particular, soy la menor y más regalona de cinco hermanas mujeres. Aunque la vida me puso una prueba muy dura en mi juventud temprana he sabido junto con mi madre salir adelante. Poseo una personalidad bastante especial, soy una chica muy, pero muy alegre, responsable, sensible, pero con gran carácter, un poco desordenada, ambiciosa, muy luchadora y esforzada sobre todo.

Me destaco por mi perseverancia y energía en la solución de problemas, adaptándome a las necesidades que se me presenten.

Mis primeros años de escolaridad los tuve en el colegio República del Paraguay destacándome por mis, buenas notas, mi buena voluntad por hacer las cosas, mi compañerismo y por ser una chica "ritaln", donde rara vez se me puedo ver quieta. Tuve una activa participación en las actividades escolares, principalmente en los actos y bailes escolares, como el baile paraguayo.

Mi segundo periodo de escolaridad fue en el Liceo Carmela Carvajal de Prat, donde mi máxima dedicación fue en mis estudios y el deporte. Rendí la PAA en 2001 e ingresé a la Universidad de Chile a estudiar Química Ambiental.

El periodo universitario los realice en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, institución que me cautiva enormemente, por su misión y principios orientadores, lugar en donde, vi el mundo con otros ojos. Donde realice mi unidad de investigación, titulada "Proceso de Lixiviación en el Suelo Ralún".



Dedicado a mi madre, ya que sin ella no hubiese sido posible cumplir mis sueños. Por cada palabra de aliento otorgada para salir adelante. A tus cuidados y noches en vela, ganamos el trofeo de la vida y gracias a tu perseverancia y dedicación, tuve las herramientas para ser quien soy hoy.

***“Male siempre serás la estrella que ilumina mi vida”
Blenda.***

AGRADECIMIENTOS



La realización de una Tesis es una experiencia intensa, en la que se comparten momentos y vivencias con un gran número de personas, que directa o indirectamente participan del trabajo realizado. Por lo tanto antes que todo quisiera mostrar mi agradecimiento de una manera general a todas las personas que han intervenido en la realización de esta.

Agradezco primero que todo a mi familia, en especial a mis padres, por haberme enseñado a luchar en la vida, y a entender que la educación es la mejor herencia que me pudieron dejar. Gracias por sobre todo a mi madre por haber estado ahí en espíritu apoyándome en estos años de universidad, y durante toda mi vida. A mis cuatro hermanas Susana, Leonor, Belén y Yaneri, por su cariño y apoyo. Y a mi cuñadito Cesar, por su ayuda constante en materias académicas. Y a ti Rodrigo, por alentarme en todo este periodo de trabajo.

A mis profesores guías, Dra. Margarita Cáru, por haberme dejado trabajar en su laboratorio y confiar en mis capacidades y el Mg. Julio Hidalgo por su paciencia ante las miles de inquietudes que tuve. A los profesores de la comisión, por su paciencia ante los variados cambios de enfoque del trabajo y constante apoyo en las decisiones tomadas durante el transcurso de la memoria.

A la empresa Züblin International GmbH, por darme la posibilidad de realizar mi tesis, por los conocimientos adquiridos no sólo en la materia ambiental (ya que sin duda esto me servirá sin lugar a dudas en mi futuro profesional), y por el financiamiento económico que me brindo, para poder lograr obtener mi título profesional. A cada uno de los integrantes del Departamento SGI, a María José Cucurella por confianza, compañerismo, amistad y simpatía y mi jefe Juan Ordenes por su apoyo, seguridad brindada y fe que puso en mi, a Claudia Peña por su simpatía, cariño y orientaciones brindadas, a Ivo Reyes por ser como eres. Sergio por tu ayuda y consejos en el desarrollo del presente trabajo.

Finalmente debo dar gracias a todos aquellos que creyeron en mí y me dieron todo su apoyo. Muchas Gracias!!!



ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	18
1. Antecedentes Generales	18
1.1.- Contexto Ambiental	18
1.2.- El Suelo	19
1.3.- Hidrocarburos (HC).	20
1.3.1.- COMPOSICIÓN GENERAL DEL PETRÓLEO	21
1.3.2.- FAMILIAS DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO.	22
1.3.3.- DERIVADOS DEL PETRÓLEO	24
1.3.4.- HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO.	25
1.3.5.- Legislación Ambiental de Hidrocarburos	26
1.4.- Biorremediación	29
1.4.1.- FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DE LA BIODEGRADACIÓN	32
1.4.2.- CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO	34
1.5.- Cinética	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	37
OBJETIVOS GENERALES	37



OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
II. MATERIALES Y MÉTODOS	38
Materiales	38
Métodos	38
1.- Origen de las muestras y Diseño de muestreo.	38
1.1.- Muestreo del suelo contaminado.	40
1.2.- Muestreo del suelo Limpio.	42
2.- Determinación de parámetros físicos y químicos del suelo	42
2.1.- Determinación del pH	42
2.2.- Determinación de la Conductividad Eléctrica	43
2.3.- Determinación de Fósforo disponible	43
2.4.- Determinación de Materia Orgánica	43
2.5.- Determinación de Cationes	44
3.- Determinación de Hidrocarburos	45
3.1.- Hidrocarburos Fijos	45
3.2.- Hidrocarburos Fracción GRO-DRO (Derivados de la gasolina y diesel).	45
3.3.- Determinación Hidrocarburos Volátiles	45
4.- Preparación de solución estimuladora de la biodegradación de Hidrocarburos in situ	46
5.- Ensayo de bioestimulación.	46
6.- Aislamiento de microorganismos potencialmente degradadoras de hidrocarburos	47
7.1.- Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos	50
7.2.- Determinación cuantitativa de de la biodegradación de hidrocarburos.	50
8.- Determinación del crecimiento microbiano.	51
9.- Ensayo de biodegradación utilizando biofertilizante comercial	52
9.1.- Implementación en Terreno.	52



III. RESULTADOS	54
1.- Características del Sitio de Estudio	54
2.- Caracterización fisicoquímica de Suelo.	55
3.- Contenido de hidrocarburo en el suelo	57
4.- Ensayo de Bioestimulación en microcosmos	58
5.- Aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de hidrocarburos	60
6.- Biodegradación de Hidrocarburos por consorcio microbiano.	64
6.1.- Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos	64
6.2.- Determinación cuantitativa de la degradación de hidrocarburos "in vitro"	65
6.3.- Determinación del crecimiento microbiano durante el ensayo de biodegradación "in vitro"	67
7.- Cinética.	69
8.- Efecto de bioestimulación de la degradación de hidrocarburos del aceite, usando un fertilizante comercial.	71
IV. DISCUSIONES	73
V. CONCLUSIONES	76
VI. RECOMENDACIONES	77
VII. BIBLIOGRAFÍA	78
VIII. ANEXO	81
1.- Cinética	81
1.1.- Ecuación de Velocidad	81
1.2.- Reacción pseudo primer orden.	82
1.3.- Tiempo de vida Media ($t_{1/2}$):	84
1.4.- Modelado de crecimiento de la población	85

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1: Proceso natural de atenuación, de hidrocarburos.	31
Figura 2: Factores involucrados en la Biodegradación	32
Figura 3 y 4: Manchas de aceite en suelo estudiado.	38
Figura 5: Imagen Satelital sector de la empresa, Programa Google Earth.	39
Figura 6: Imagen Satelital de terreno de la empresa, Programa Google Earth	39
Figura 7: Plano de sitio de Empresa. El recuadro rojo muestra el sitio donde se obtuvo las muestras de suelo control. Y los puntos negros las muestras contaminadas.	40
Figura 8: Fotos del sitio de muestreo. En esta imagen se puede apreciar la dimensión de las maquinas que se encuentran estacionadas en el sitio de estudio.	41
Figura 9: Forma de aplicación	47
Figura 10: Esquema de inoculación de las placas de cultivo, (A) y (B), representan los inoculos derivadas de los dos frascos experimentales iniciales.	48
Figura 11: Inoculación en gradiente de concentración de aceite con incubación (A) y (B)	49
Figura 13 14 y 15: Incubación con inoculaciones en medio sólido con papel filtro	50
Figura 16 y 17: Aceite liquido en tratamiento	51
Figura 18: Fertilizante comercial	52
Figura 19: Terreno de aplicación	53
Figura 20: Impermeabilización del terreno	53
Figura 21: Tratamiento de suelo en terreno	53
Figura 22 y 23: Aspectos del suelo de los ensayos de bioestimulación A) suelo tratado y B) suelo control.	59
Figura 24: Grafico de degradación de hidrocarburos fijo en suelos contaminado a 30 y 60 días	60
Figura 25 y 26: Cultivo en placas selectivas con 0.5% p/v de aceite usado como fuente de carbono.	61
Figura 27: Cultivo en placas selectivas con 1,5 % p/v, con inoculación (A o B)	61
Figura 28 y 29: A) Inoculación en Gradiente de Concentración de Aceite usado. B) desarrollo microbiano a lo largo de una línea de la gradiente.	62

Figura 30 y 31: Colonias que crecen alrededor de los discos de papel filtro embebidos en aceite usado.	62
Figuras 32 a 37: Colonias aisladas desde las placas de selección.	63
Figura 38,39 y 40: Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos por el consorcio microbiano. A y B solución estimuladora con aceite usado e inoculada con microorganismos y C testigo son inocular.	65
Figura 41: Cultivo en medio nutritivo para determinación de número de células viables	67
Figura 42: Curva de crecimiento microbiano.	68
Figura 43: Gráfico de pseudo primer orden del modelo experimental, en el primer tramo del tratamiento.	69
Figura 44: Gráfico de segundo orden del modelo experimental	70
Figura 45: Modelo de crecimiento de la población.	71
Figura 46: Concentración de Hidrocarburos fijos en suelos tratados con fertilizante y agua. Ensayo que duro 40 días.	72





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las fracciones químicas contenidas en crudo de petróleo	22
Tabla 2. Ejemplos de estructura de hidrocarburos parafínicos	23
Tabla 3. Ejemplos de estructura de hidrocarburos aromáticos	24
Tabla 4. Ejemplos de estructura de hidrocarburos gasolina y queroseno	25
Tabla 5. Resumen de concentraciones (mg/Kg) máximas, permitidas de hidrocarburos, según uso, textura y fracción del suelo. Según normas Canadieses.	27
Tabla 6. Límites permisibles o Niveles de limpieza para algunos contaminantes según la normativa de E.E.U.U	28
Tabla 7. Limite máximos permisibles para fracción de hidrocarburos en suelos, según PROFEPA.	29
Tabla 8 Número de aplicación de solución.	47
Tabla 9. Características físico-químicas de un suelo control y el suelo en estudio.	56
Tabla 10. Concentración de cationes en suelo control y suelo en estudio.	57
Tabla 11. Fracciones de hidrocarburos en suelo control y suelo contaminado.	58
Tabla 12. Cepas aisladas que se encuentra en el GeneBank.	64
Tabla 13 Análisis de suelo y soluciones.	66
Tabla 14 Determinación del numero de células viables/mL (UFC/mL)	68

RESUMEN

La contaminación por hidrocarburos provenientes de diferentes derivados del petróleo no es un tema menor en la actualidad. Dentro de las contaminaciones más importantes producida por los hidrocarburos está aquella proveniente de aceites usados. A nivel mundial existen normas que rigen los niveles de concentración máximos permitidos en los diferentes tipos de suelos.

El presente trabajo, describe las investigaciones y estudios que se hicieron para buscar una forma de biorremediar un suelo industrial contaminado por diferentes tipos de aceites usados provenientes de motores de automóviles y maquinaria pesada.

Algunas bacterias autóctonas del suelo son capaces de degradar de forma natural los hidrocarburos derivados del petróleo. Este proceso microbiológico puede ser estimulado mejorando la biodegradación de los hidrocarburos presentes en estos desechos transformándolo en compuestos no tóxicos. Todos los ecosistemas tienen capacidad para remediar en parte las perturbaciones producidas por contaminantes mediante la actividad microbiológica. Sin embargo este proceso requiere condiciones fisicoquímicas adecuadas para la actividad microbiológica. Por lo tanto esta degradación podría tomar varias decenas de años hasta que el crudo se haya descompuesto totalmente, a menos que se proporcionen las condiciones para una actividad microbiológica eficiente. Esta última es la idea principal de esta investigación, acelerar la degradación en forma natural de los hidrocarburos en un suelo contaminado, para lo cual se formularon diferentes medios de cultivo donde las bacterias puedan crecer utilizando como fuente de carbono, los hidrocarburos contaminantes. Además, fue necesario proporcionar otros nutrientes como nitrógeno y fósforo los cuales son esenciales para el crecimiento microbiano.

El uso de microorganismos capaces de degradar los compuestos químicos orgánicos que contaminan el suelo, se conoce como biorremediación. Este proceso se puede estimular mejorando las condiciones del suelo (contenido de nutrientes, oxigenación,

temperatura, etc.) o por inoculación de microorganismos aumentado la capacidad de biodegradación del suelo.

En este Seminario de Título, se determinó el efecto del aporte de nutriente y aireación sobre la biodegradación de los hidrocarburos del suelo. Además, se aislaron microorganismos del suelo contaminado y se evaluó su crecimiento en medios de cultivos utilizando los aceites usados como fuente de carbono.

Para estimar el tiempo necesario para reducir los hidrocarburos contaminantes se propuso un modelo cinético que permita determinar los parámetros del proceso, tales como la concentración de hidrocarburos en un tiempo t , tiempo de vida media y concentración y número de bacterias presentes al tiempo t .

ABSTRACT

Nowadays, the hydrocarbon-contamination originated from the different petroleum products is not a minor issue. Among the most important kind of contaminations caused by hydrocarbons appears the one derived from used oils. Globally there are rules governing the maximum permissible levels of concentration in different soil types

This paper describes the research and studies that were made to find a way to bioremedy an industrial soil contaminated by different types of waste oil from motor vehicles and heavy machinery.

Some indigenous soil bacteria are able to degrade in natural way the hydrocarbons derived from oil. This microbial process can be stimulated improving the biodegradation of all the hydrocarbons located in these remainders and transforming it into nontoxic compounds. All ecosystems have the capacity to remedy some part of the disruptions caused by pollutants through some microbiological activity. However, this process requires adequate physicochemical conditions for microbiological activity. Therefore this degradation could take several decades until the crude oil has been completely decomposed, unless you provide the conditions for an efficient microbial activity. The last one is the main idea of this research, to accelerate the natural degradation of hydrocarbons in a contaminated soil, for this reason, it was formulated different culture environments where the bacteria can grow up using as a source of carbon the hydrocarbons contaminated. Moreover, it was necessary to provide additional nutrients such as nitrogen and phosphorus, which are essential for microbial growth.

The use of micro-organisms those were able to degrade the organic chemical compounds that contaminate the soils is known as bioremediation. This process can be stimulated improving the soil conditions (nutrient content, oxygenation, temperature, etc.) or by inoculation of microorganisms increasing the capacity of soil degradation.

In this work, it was determined the effect of nutrient supply and aeration on the biodegradation of hydrocarbons from the ground. Moreover microorganisms were isolated from contaminated soil and assessed their growth in some culture environments using waste oils as a source of carbon.

To estimate the time necessary to reduce hydrocarbon pollutants, it was proposed a kinetic model in order to determine the process parameters, such as concentration of hydrocarbons in a time t , average time of life and concentration and number of bacteria presented at time t .

ABREVIATURAS

BTEX:	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
CESMEC:	Centro de Estudios de Medición y Certificación de Calidad.
GRO-DRO:	Fracción de Hidrocarburos derivados de la gasolina y diesel.
HC:	Hidrocarburos
HTP:	Hidrocarburos totales policíclicos
MTBE:	Metil, Terbutil Eter
RIL:	Residuo Industrial Liquido
RISES:	Residuo Industriales Sólidos
PAH:	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.
PROFEPA :	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
TEX:	Tolueno, etilbenceno y xileno
UFC :	Unidades formadoras de colonia
WCS:	Canada-Wide Standard
R:M.:	Región Metropolitana.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales

1.1.- Contexto Ambiental

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua, de gran consideración. Una de las más severas contaminaciones que se produce a nivel mundial, es debida al manejo del petróleo y sus derivados. Los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos, compuestos orgánicos constituidos por carbono e hidrógeno.

Los derrames de hidrocarburos constituyen una de las principales fuentes de contaminación de los suelos, aguas superficiales y subterráneas, flora y fauna silvestre.

La contaminación con hidrocarburos afectan al suelo o el agua reduciendo o impidiendo el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos y biológicos que dependen del tipo de hidrocarburos, de las propiedades físicas del suelo y de la microbiota. Estos procesos pueden llevar a una disminución del contaminante más o menos lento, ocasionando en la mayoría de los casos una importante toxicidad.

El deterioro del suelo debido a la acumulación de contaminantes, es consecuencia directa de las actividades humanas por prácticas agrícolas, forestales, mineras, agroquímicos que producen desechos industriales (acopios, vertidos ilegales), vertido de residuos sólidos urbanos, o por productos fitosanitarios empleados en agricultura (abonos y fertilizantes químicos) o purines de las actividades ganaderas entre otros.

Un suelo contaminado, es aquel que presenta algún elemento o producto que supera las concentraciones, el nivel basal local y la media del entorno, con respecto a los

niveles de referencia. Por ello es muy importante contar con valores base, a nivel regional de las concentraciones mínimas de contaminantes que es de esperar en los suelos.

El suelo tiene en general una gran capacidad amortiguadora, su resiliencia y sus propiedades de filtración y capacidad de sorción (adsorción y absorción) de sustancias contaminantes hacen que los daños no se perciban hasta una fase muy avanzada. Por lo que es de gran importancia tomar ciertas medidas, para evitar daños considerables e irreversibles.

1.2.- El Suelo

El suelo es la cubierta superficial de la Tierra, es el material suelto no consolidado que resulta inicialmente de la alteración meteorológica o de la disgregación física de las rocas y que, bajo la influencia de la biota, evoluciona hasta formar un sistema complejo compuesto por minerales y partículas orgánicas producidas por la acción del agua y procesos de desintegración orgánica. Es también el lugar donde el hombre realiza la mayoría de sus actividades, como por ejemplo generar alimentos, criar animales, explotar los bosques y los minerales, etc.

El suelo es un sistema biogeoquímico que mantiene con la biosfera, la atmósfera y la hidrosfera un intercambio de materia y energía. Esta distribución de los materiales que constituyen el suelo, no es homogénea y según evoluciona forma extractos sucesivos de color, textura y estructura diferentes, denominados horizontes. El conjunto de estos horizontes constituyen el perfil de un suelo y es el estudio de este perfil lo que refleja la acción de procesos bioquímicos y físico-químicos que han tenido lugar en él.

La estructura física está determinada por el material geológico, la cubierta vegetal, la topografía, y los cambios que las mismas actividades humanas han provocado en él. Por ejemplo, la industria deteriora la cubierta vegetal del suelo, facilitando su erosión por el agua y el viento.

El suelo está compuesto principalmente por:

- Compuestos Inorgánicos, no disueltos, producidos por la meteorización y la descomposición de las rocas superficiales. El suelo posee varias partículas, de diferentes tamaños, principalmente la piedra, arcilla, arena, limo y grava. Las pequeñas sirven como depósito de nutrientes y también determinan en gran medida la capacidad del suelo para almacenar agua y aire.
- Compuestos inorgánicos, solubles utilizados por plantas y microorganismos para su crecimiento.
- Distintos tipos de materia orgánica, viva o muerta, formada por restos vegetales, animales y microorganismos. Aquí está la materia orgánica llamada humus, que representa entre el 2 y el 5% del suelo superficial de las zonas húmedas, siendo menor a 0,5% en los áridos y mayor de 95% en los suelos de turba
- Gases y agua, entre los gases se encuentran principalmente oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. La composición gaseosa del suelo es variable debido a la actividad metabólica de la biota tales como respiración, fotosíntesis, fijación de dióxido de carbono. El contenido de agua determina la humedad del suelo, en ella se encuentran disueltas los compuestos inorgánicos que sirven de nutrientes a la biota.

1.3.- Hidrocarburos (HC).

Son los compuestos orgánicos más simples, están formados por carbono e hidrógeno, a partir de los cuales derivan la mayoría de los derivados orgánicos. Los hidrocarburos se clasifican según su estructura en dos grupos principales, hidrocarburos alifáticos o de cadena abierta e hidrocarburos cíclicos. En los hidrocarburos de cadena abierta, con más de un átomo de carbono, éstos están unidos entre sí, formando cadenas lineales o ramificadas. En los compuestos cíclicos, los átomos de carbono forman uno o más anillos cerrados.

Los hidrocarburos se pueden clasificar, según su origen en; hidrocarburos biogénicos e hidrocarburos fósiles. Los hidrocarburos biogénicos son sintetizados por casi todos

los seres vivos, incluyendo las plantas, animales terrestres y marinos, y los microorganismos como bacterias, plancton marino, diatomeas y algas (Bedair & Al-Saad, 1992). Estos hidrocarburos son de baja complejidad estructural y su síntesis está regulada genéticamente, como por ejemplo la metanogénesis.

Los hidrocarburos fósiles son los que provienen del petróleo, gas natural o carbón a partir de éstos combustibles en especial del petróleo se obtienen una variedad de hidrocarburos por el refinado de petróleo y en general por la industria petroquímica. Estas actividades humanas y el uso de combustible fósil son la principal causa de la contaminación del suelo por hidrocarburos.

1.3.1.- Composición General del Petróleo

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, con un número de carbonos en sus moléculas que varían aproximadamente entre 1 y 50. Su aspecto es de un líquido viscoso, de color pardo oscuro, de olor desagradable, tóxico, irritante e inflamable. Se encuentra en yacimientos a diferentes profundidades en el interior de la tierra. Su origen estaría asociado a procesos de descomposición de animales y plantas que habitaron en la era Mesozoica, hace 225 o 136 millones de años. Los hidrocarburos del petróleo se puede clasificar en alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. (Fernández y col. 1992).

Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones (tabla 1): i) fracción saturada (*n*-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), ii) fracción aromática (monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), iii) fracción de resinas y iv) fracción de asfaltenos que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alta masa molar (Speight, 1991).

Tabla 1. Composición de las fracciones químicas contenidas en crudo de petróleo

FRACCIÓN	COMPOSICIÓN
Saturados	n-alcanos, alcanos de cadenas ramificadas e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromaticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
Asfáltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

1.3.2.- Familias de hidrocarburos derivados del Petróleo.

Parafinas (n-alcanos e isoprenoides): Entre las parafinas hay una fracción muy volátil que corresponde a n-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C_1 - C_{10} (de 1 a 10 átomos de carbono). Esta fracción representa hasta un 30% del crudo de petróleo y es la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización (Howe-rant, 1996) y tienen poca afinidad química. La estructura general de todas las parafinas es; C_nH_{2n+2} , donde según el número de carbonos que estos poseen, difieren en el estado en el que se encuentren, es decir; los primeros cuatro miembros de las series homólogas de las parafinas no ramificadas son gaseosas (ver tabla), las parafinas no ramificadas de C_5 a C_{17} son líquidas y las parafinas no ramificadas con 18 y más átomos de carbono son sólidas.

Tabla 2. Ejemplos de estructura de hidrocarburos parafínicos

Hidrocarburo Parafínicos		Estructura de Hidrocarburo Parafínico
Gaseosas	Metano	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
	Butano	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H}-\text{C} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{C}-\text{H} \\ & & & \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{array}$
Líquidas	Pentano	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
	Heptadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$
Sólidas	Nonadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
	Eicosano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$

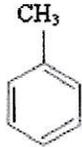
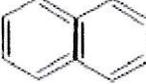
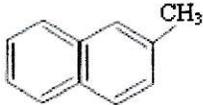
Naftenos (cicloalcanos): Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos, que forman una molécula circular en la cual todos los enlaces de carbono están saturados con hidrógeno. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados.

Oleofinas (alquenos): Los alquenos están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza.

Hidrocarburos aromáticos: Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos). Entre los hidrocarburos monoaromáticos encuentra el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad. Los Hidrocarburos poliaromáticos tienen dos o más núcleos de seis carbonos dispuestos hexagonalmente en forma de cadena cerrada. Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados. Mientras que en los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. También se pueden incluir

compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

Tabla 3. Ejemplos de estructura de hidrocarburos aromáticos.

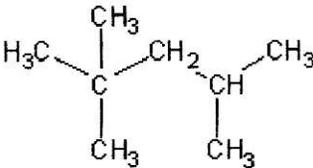
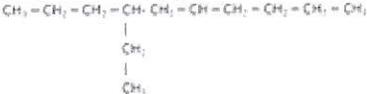
Hidrocarburo Aromáticos		Estructura de Hidrocarburo Aromático
Monoaromático	Benceno	
	Tolueno	
Poliaromático	Naftaleno	
	2-Metilnaftaleno	

Resinas y asfaltenos: Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre, y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. (Howe-Grant, 1996).

1.3.3.- Derivados del Petróleo

Dentro de los derivados del petróleo se puede encontrar la gasolina, queroseno, destilados medios (querosenos, gasoil, aceites lubricantes), residuos (que al ser destilado se obtiene otros aceites más pesados), ceras, parafinas y betunes asfálticos (alquitranes). El número de átomos de carbono que posee la fracción perteneciente a la gasolina es de C_5 a C_{10} , mientras que en el queroseno es C_{12} a C_{18} .

Tabla 4. Ejemplos de estructura de hidrocarburos gasolina y queroseno.

Derivado del Petróleo	Estructura	
Gasolina	2,2,4-Trimetilpentano	
Queroseno	4-eti-decanol	

1.3.4.- Hidrocarburos totales del Petróleo.

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP), es el parámetro de medición analítico más utilizado para describir la presencia de hidrocarburos en un sitio. Este parámetro representa una familia de varios cientos de compuestos químicos originados de petróleo crudo sin especificar a una sustancia en particular (ASTDR, 1998). Los HTP se comportan de forma similar en el suelo o el agua. Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los HTP incluyen a hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina, y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina.

Los HTP pueden entrar al ambiente por accidentes, fugas y derrames industriales, o como subproductos de uso comercial de los derivados del petróleo. Una vez que llega a las aguas oceánicas una fracción de los HTP flotará en el agua y formará una capa superficial. En tanto, la otra fracción de los HTP se depositará en los sedimentos del fondo.

La contaminación por HTP surge cuando las cantidades de hidrocarburos presente en los suelos, aguas superficiales y/o subterráneas es mayor a la capacidad de degradación de los microorganismos presentes en el medio, responsables de oxidar y mineralizar los HTP a sustancias inocuas. Las fracciones de HTP que no sean

degradadas se adherirán a las partículas en el suelo o sedimentos donde pueden permanecer por largo tiempo dando origen a un suelo contaminado por hidrocarburos, alterando la fisicoquímica del suelo y la biota asociada. (SERMANAT, 2003).

1.3.5.- Legislación Ambiental de Hidrocarburos

En nuestro país la presencia de hidrocarburos esta regulada para las aguas continentales y marinas a través de normas de emisión y normas secundarias de calidad ambiental. En tanto para las matrices suelos y sedimentos no hay un marco legislativo aplicable respecto a los límites permisibles de hidrocarburos. Sin embargo, se hace mención en el decreto 594 "Reglamento sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo" cuyo tercer párrafo, "De la disposición de RIL y RISES", artículo 20, indica que para la disposición final de los residuos industriales, que la empresa emisora de estos, deberá presentar a la autoridad sanitaria, la cantidad y calidad de los residuos industriales que ésta genere. Asimismo en este decreto se clasifica a los aceites usados como un residuo peligroso.

A nivel internacional, existen normas que indican las concentraciones máximas permisibles en el suelo. Entre ellas se encuentra las normas establecidas por "The Canada-Wide Standard (CWS) (C.C.M.E, 2008), para hidrocarburos del petróleo (HCP) la cual clasifica a los HCP en cuatro fracciones (F1 a F4) de acuerdo al número de átomos de carbono del hidrocarburos. Se excluyen en estas fracciones, el benceno y benzo (a) pireno, y BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), compuestos que son poco soluble, volátil y móvil en el subsuelo y medio ambiente.

La fracción F1 representan los HCP entre 6 a 10 átomos de carbono, la fracción F2 corresponde a HCP de >C10 a C16, la fracción F3 >C16 a C34 y fracción F4 que incluye HCP de más de 35 átomos de carbono.

Tabla 5. Resumen de concentraciones (mg/Kg) máximas, permitidas de hidrocarburos, según uso, textura y fracción del suelo. Según normas Canadieses.

Uso de la tierra	Textura del suelo	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
Agricultura	Suelo de grano grueso	30 ^b	150	300	2800
	Suelo de grano fino	210(170 ^a)	150	1300	5600
Residencial/ Parque	Suelo de grano grueso	30 ^b	150	300	2800
	Suelo de grano fino	210(170 ^a)	150	1300	5600
Comercial	Suelo de grano grueso	320(240 ^a)	260	1700	3300
	Suelo de grano fino	320(170 ^a)	260(230 ^a)	2500	6600
Industrial	Suelo de grano grueso	320(240 ^a)	260	1700	3300
	Suelo de grano fino	320(170 ^a)	260(230 ^a)	2500	6600

Las propiedades de la contaminación de los suelos con HCP varía con el tipo de petróleo la fuente, el tipo de suelo, la composición, grado de elaboración (crudo, refinado o mezclado), y el grado de erosión causado por la exposición al medio ambiente.

Otras normas, son aquellas establecidas en los Estados Unidos, donde cada gobierno estatal ha desarrollado sus propios límites permisibles, los cuales fueron definidos de acuerdo a una evaluación de riesgo (Saval., 1995). Para un mismo compuesto existe un gran rango permisible, por ejemplo, para HTP el límite varía de 40 a 2000 mg/Kg como se muestra en las Tabla 6. En México, la PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente) ha manejado criterios de limpieza desarrollados por el Grupo de Trabajo sobre Restauración de Suelos Contaminados conformado por esta dependencia (Tabla 7) (Ortinez y col, 1999)

Tabla 6: Límites permisibles o niveles de limpieza para algunos contaminantes según la normativa de E.E.U.U.

Estados de E.E.U.U.	Tipos de Contaminantes	Parámetros	Límite (mg/Kg)	Método Analítico
Alabama	Gasolina	Http	100	EPA 9071
	Diesel			EPA 418.1
	Aceite usado			
Arkansas	Gasolina	HTP	100-1000	EPA 418.1
	Diesel			EPA 8015M
	Aceite usado			
Delaware	Gasolina	Http	100	EPA 418.1M
	Diesel			Epa 9071
				EPA 8015M
Idaho		Http	40-200	EPA 9015M
	Diesel		100-2000	Epa 8015
			100	EPA 418.1
Georgia	Gasolina	Http	100-500	California M
	Diesel			
	Aceite usado			
	Diesel	Benzopireno	0.03-0.2	EPA 550 EPA 8270
		Antraceno	110,0	EPA 8270
		Criseno	0.3	
		Fluorantreno	370	
		Fluoreno	14,0	
Pireno	11,0			
Kansas	Diesel	Naftaleno	143	
Missouri	Gasolina	Http	5-10	EPA 418.1

Tabla 7: Limite máximos permisibles para fracción de hidrocarburos en suelos, según PROFEPA.

Fracción de Hidrocarburos	Uso del suelo predominante (mg/Kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1.200	1.200	5.000
Pesada	3.000	3.000	6.000

1.4.- Biorremediación

La biorremediación comprende un conjunto de tecnologías basadas en el uso de organismos vivos para reducir o eliminar contaminantes desde el medio ambiente y así recuperar y habilitar los distintos ecosistemas.

Todos los ambientes naturales tienen una capacidad depurativa intrínseca que se conoce como Atenuación Natural, y que comprende a un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos, que ocurren espontáneamente en un espacio determinado, como repuesta al ingreso de los contaminantes al medio. Bajo condiciones ambientales favorables la atenuación natural (biorremediación intrínseca) reduce, la concentración, la toxicidad o la movilidad de los contaminantes en suelo o agua subterránea. Este proceso de atenuación natural incluye diversos mecanismos tales como dispersión, dilución adsorción, volatilización, estabilización y transformación o degradación de contaminantes por vía química o biológica.

En general, se puede considerar que en un proceso de atenuación natural, intervienen o pueden intervenir los siguientes procesos (Martín y col, 2004.)

1. Transformación química La tasa de transformación química depende de diferentes variables tales como pH, temperatura y naturaleza del contaminante.
2. Estabilización: Los contaminantes quedan químicamente ligados por un agente estabilizante (por ejemplo, arcilla y materiales húmicos) y se dificulta o impide su migración.
3. Volatilización: Parte de los compuestos son evaporados, por presión de vapor altos.

4.-Dispersión y dilución: La fuente de contaminación cesa, se dispersa la contaminación y disminuye la concentración del contaminante.

5. Biodegradación: Corresponde a la degradación de los contaminantes por organismos autóctonos que utilizan estos compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono. Este proceso es el más importante para remediar el medio ambiente ya es capaz de degradar los contaminantes a sus constituyentes inorgánicos principalmente CO_2 y H_2O (Plaza y col, 2003). Todos los compuestos orgánicos de origen natural son susceptibles de ser biodegradado, por la microbiota (bacterias, arqueas y hongos) así por ejemplo, los microorganismos que degradan los BTEX son ubicuos, y puede ser estimulado mediante la adición de nutrientes y aceptores de electrones (tales como O_2 y NO_3^-).

Existen varias estrategias para mejorar estos procesos naturales de biodegradación in situ. La Bioestimulación es una estrategia de biorremediación que está basada en el mejoramiento de las condiciones ambientales (oxígeno, humedad, potencial redox, pH, adición de nutrientes etc) para favorecer los procesos de biodegradación microbiana. La bio-estimulación más común es la bioventilación (adición de oxígeno) que favorece los procesos de biodegradación aeróbica.

Alternativamente cuando la microbiota presente en el sitio no es capaz de degradar los contaminantes presentes en el o los microorganismos encuentran en baja concentración, se puede aplicar la estrategia de Bioaumento, que consiste en inocular la matriz contaminada (suelo o agua) con microorganismos capaces de biodegradar los contaminantes.

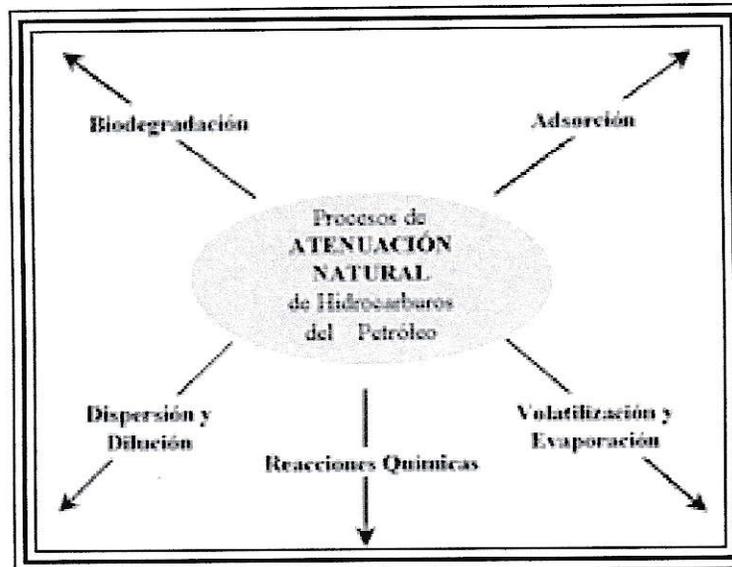


Figura 1: Proceso natural de atenuación, de hidrocarburos.

En la biodegradación de hidrocarburos del petróleo, hay fracciones como BTEX y algunos PAH (hidrocarburos policíclicos aromáticos) que pueden ser degradados en condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, otros PAH, el MTBE (metil, terbutil éter, un aditivo de la gasolina) y diversos componentes de los hidrocarburos del petróleo no son fácilmente biodegradables. (Martín y col, 2004.)

En la biorremediación de suelo contaminado con los hidrocarburos del petróleo, estos contaminantes son mineralizados por microorganismos autóctonos del suelo y como consecuencia los hidrocarburos del petróleo son convertidos a dióxido de carbono, agua y biomasa, principalmente además de formas inorgánicas de N, P y S (Alexander, 1994). Esto se logra mediante estrategias de bioestimulación o de bioaumento con microorganismos con capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y a las características del suelo en el sitio del tratamiento. Su aceptación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Sin embargo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y del impacto sobre la matriz contaminada (Semple y col., 2001)

Se han identificado muchos factores que afectan la duración y cinética de la remoción de hidrocarburos. Estos incluyen las propiedades del suelo, tales como pH, temperatura, humedad, aireación y estado de los nutrientes, características de los

hidrocarburos; y la ecología de las poblaciones microbianas presentes en el suelo. (Figura 2)

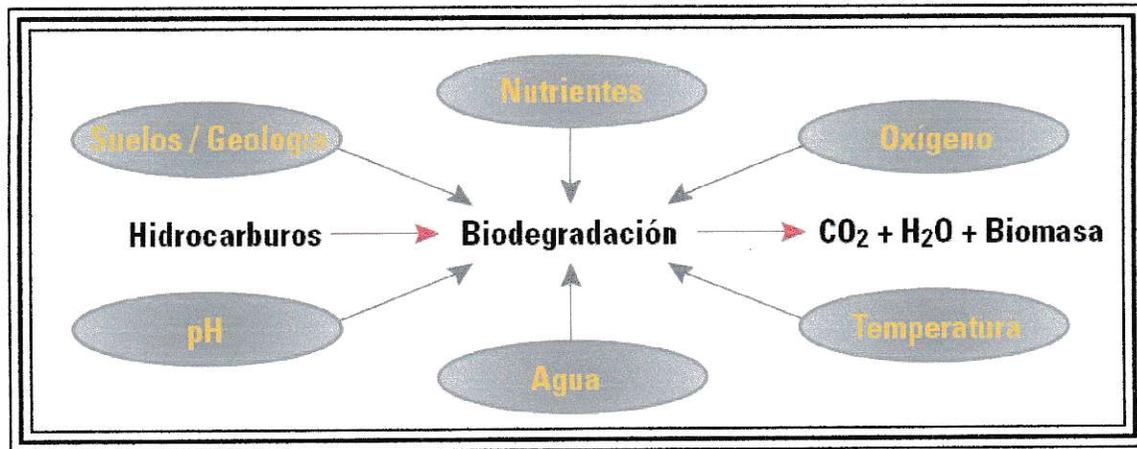


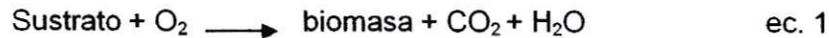
Figura 2: Factores involucrados en la Biodegradación

1.4.1.- Fundamentos Bioquímicos de la Biodegradación

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que los microorganismos requieren de fuentes de energía y nutrientes para sustentar su crecimiento. El metabolismo microbiano son una serie de reacciones de óxido-reducción y su diversidad depende de los aceptores y dadores de electrones de estas reacciones. Así, un compuesto orgánico como hidrocarburo que es externo a la célula puede actuar como dador de electrones, de modo que su oxidación produce energía necesaria para los procesos de biosíntesis de la célula. (Arroyo y col, 2001).

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 aceptor de electrones es el oxígeno el proceso se conoce como respiración aeróbica con producción de biomasa, CO₂ y H₂O (ec.1). Cuando el oxígeno es limitante, los microorganismos utilizan aceptores alternativos y la biodegradación será en anaerobiosis, proceso que se conoce como respiración anaeróbica (Arroyo y col, 2001).

Degradación aeróbica (respiración aeróbica):



La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores (Arroyo y col, 2001) tales como:

- Disponibilidad de nutrientes: El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y para ello requieren energía para sus procesos de síntesis y fuentes de nutrientes como carbono, fósforo y nitrógeno. Por lo general, el suelo posee la mayoría de los nutrientes a concentraciones suficiente, sin embargo si hay déficit de algún nutriente, se limitará el crecimiento microbiano. La relación promedio de los macronutrientes C:N:P necesaria para sustentar el crecimiento microbiano es aproximadamente 100:10:1, respectivamente. Por lo tanto, cuando hay contaminación con un hidrocarburo se produce un desbalance de la relación con un déficit de N y P que limita el crecimiento microbiano y por ende la biodegradación del hidrocarburo que se utiliza como fuente de carbono y energía.
- pH del suelo: afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo, el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo.
- Temperatura: la mayoría de los microorganismos crecen en rangos de temperatura, entre 15 y 45 °C, disminuyendo la actividad de biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.
- Humedad: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad limita el oxígeno y

genera condiciones reductoras produciéndose un cambio en las actividades de la comunidad microbiana que favorece los procesos anaeróbicos.

- Estructura química del hidrocarburo: la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica (Arroyo y col, 2001.).

Los factores que controlan la densidad de población y la diversidad biológica de un suelo, pueden ser de dos tipos:

- Factores fisicoquímicos: En este grupo se incluyen la disponibilidad de carbono orgánico y de aceptores electrónicos, el potencial de oxidación-reducción, los nutrientes inorgánicos, el pH, el contenido de agua, la temperatura, la salinidad y la textura del suelo.
- Factores biológicos: En este grupo de factores se incluyen la presencia de otros microorganismos con los cuales se establecen interacciones positivas como la competencia por los recursos y la depredación, por protozoos. Las plantas también afectan la composición de la microbiota ya que proporcionan nutrientes o secretan, inhibidores metabólicos. (Martin y col. 2004).

1.4.2.- Contaminación de suelos por hidrocarburos del petróleo

El trabajo de este seminario de título sobre biorremediación se realizó con suelos del Taller Central de Zublin International GmbH una empresa especialista en servicios a la minería, tales como la construcción de túneles, piques, inclinados, chimeneas, galerías y cavernas y la construcción de las obras civiles de proyectos hidroeléctricos.

Para el desarrollo de sus proyectos se utiliza una variedad de maquinarias, las cuales son reparadas y mantenidas periódicamente en el Taller Central de la empresa, donde se encuentran estacionados en el patio o zonas de aparcamiento. Producto de la

manipulación mecánica de las maquinarias o por filtraciones propias de los equipos, hay derrame de aceites usados contaminando localmente el suelo del taller.

Un objeto de la empresa en este sentido es contar con un sistema adecuado que permita minimizar los riesgos para la salud de las personas y el medioambiente. Las tecnologías actualmente utilizadas para remediar los efectos del derrame de aceites usados envuelven altos costos ya que se basan en procesos físicos y químicos

Dado el tipo de contaminación en estos suelos una aplicación posible para remediar la contaminación por aceites usados es la Biorremediación, que forma parte de la propuesta que se abordará en el presente trabajo.

La recuperación de suelos contaminados mediante tratamiento biológico, implicaría mejoras significativas para el manejo de este problema, ya que la biorremediación tiene ventajas importantes en relación a otras tecnologías de limpieza como por ejemplo ser un proceso de menor costo, con pocos efectos adversos y más seguros. Ya que esta técnica, no se utiliza sustancias químicas peligrosas ni genera residuos industriales peligrosos que deban manejarse de manera especial, disminuyendo de este modo el costo de gestión de residuos.

Este sistema de tratamiento del suelo permite a la empresa dar cumplimiento a la normativa aplicable en materias ambientales y de seguridad en el trabajo, tales como: DS 459 y DS 148 (Reglamento Sanitario sobre Manejos de Residuos Peligrosos), entre otros.

1.5.- Cinética

La biorremediación es una técnica en la que el tiempo de degradación de un contaminante es variado, según el tipo, lugar, condiciones en el que este se produzca. Un método, de gran ayuda para hacer una estimación de la razón con que cambia la concentración de un reactivo o producto a través del tiempo, es la cinética, la que nos permite estimar las concentraciones de hidrocarburos en tiempos variados.

La cinética es la parte de la físico-química que estudia la velocidad de las reacciones y sus mecanismos. Determina las etapas de una reacción, y rapidez con que se alcanza el equilibrio. La velocidad de una reacción depende de la naturaleza de las sustancias, temperatura y concentración de los reactivos. Un incremento de temperatura produce casi invariablemente un aumento de velocidad; además, muchas reacciones se ven influidas por la presencia de sustancias con capacidad de acelerar o disminuir la velocidad y que se conocen con el nombre de catalizadores y las reacciones afectadas se dicen que son catalizadas.

Las reacciones químicas tienen lugar a muy distintas velocidades. El aumento de la concentración inicial origina una aceleración en la velocidad. Esta no permanece constante durante el proceso de transformación sino, que es máxima al comienzo y decrece a medida que se consumen los reactivos. Teóricamente, es necesario un tiempo infinito para que esta velocidad se haga cero. En la práctica consideramos que aquella procede con tal lentitud, después de un cierto tiempo, que se lleva a cabo en un intervalo finito de tiempo.

Hay que destacar que también existe la posibilidad en una reacción, de combinar dos tipos de reacciones, de primer orden y de segundo orden (ver Anexo), en este tipo de sucesos se puede encontrar las llamadas reacciones logísticas, las que se ocupan en gran medida en la microbiología, en las que se puede suponer la tasa intrínseca de crecimiento o velocidad específica de crecimiento o velocidad de crecimiento por unidad de tiempo por individuo, este modelo se le conoce como crecimiento poblacional, que describe la tasa de reproducción de una población.

HIPÓTESIS

Por medio de la estimulación microbiana autóctona existente en los suelos, se puede bajar las concentraciones de hidrocarburos en un suelo contaminado por aceites usados.

El tratamiento de biorremediación es eficaz en la degradación de hidrocarburos de aceites usados.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Desarrollar una técnica, a nivel experimental, de biorremediación de sitios contaminados por hidrocarburos y aceites usados, mediante la utilización de microorganismo autóctonos del suelo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Caracterizar el suelo de estudios y determinar el efecto de la adición de nutrientes y aireación del suelo contaminado sobre la capacidad de biodegradación in situ de los aceites usados.
- 2.- Aislar e identificar cepas bacterianas autóctonas con capacidad degradativa de hidrocarburos procedentes de aceites usados y cuantificar la capacidad de crecimiento de las bacterias a expensas de estos hidrocarburos.
- 3.- Generar un modelo cinético, que nos permita estimar la velocidad de degradación de los hidrocarburos en un tiempo (t), para proponer una estrategia de biorremediación para este tipo de suelos contaminados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Medios de cultivo
- Suelo contaminados con crudo de petróleo, procedentes de empresa minera Zublin Internacional GmbH, en Quilicura, Santiago-Chile.
- Aceite usado, procedente de los talleres mecánicos de las obras de minería que ejecuta la empresa.

Métodos

1.- Origen de las muestras y Diseño de muestreo.

El suelo contaminado por hidrocarburo, se obtuvo de la parte superficial del patio de un taller mecánico del rubro minero, ubicado en la RM, en la comuna de Quilicura, en el Loteo Industrial, kilómetro 11 de la carretera 5 Norte.

Este, es un suelo que se encuentra cubierto de una importante cantidad de ripio, ya que su principal fin es ocuparlo para estacionamiento y tráfico de equipos mineros.



Figura 3 y 4: Manchas de aceite en suelo estudiado.

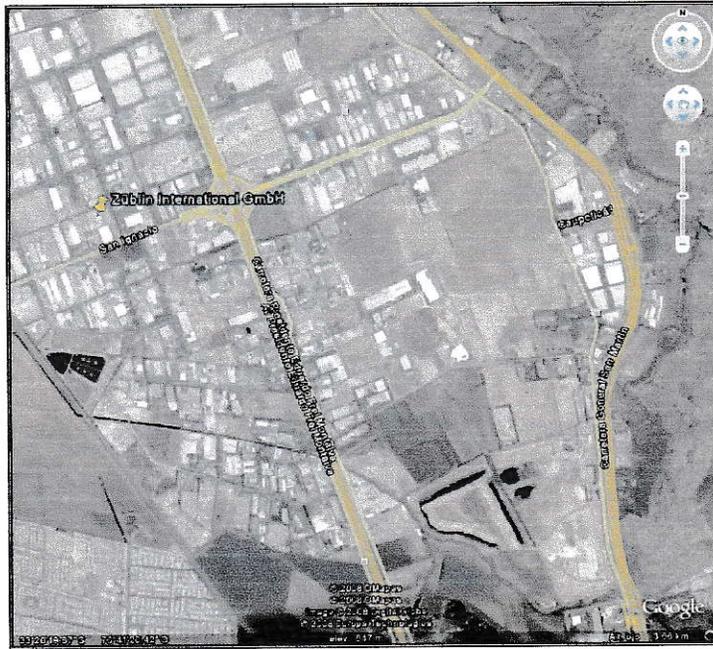


Figura 5: Imagen Satelital sector de la empresa, Programa Google Earth.



Figura 6: Imagen Satelital de terreno de la empresa, Programa Google Earth

1.1.- Muestreo del suelo contaminado.

El método de muestreo que se trató de seguir para el suelo contaminado, fue el muestreo aleatorio en forma de Z, pero debido a las condiciones del terreno y también a que los sitios contaminados en estudio que poseían una distribución de concentraciones de hidrocarburos desconocidas, impidió que se pudiera aplicar este método de manera óptima (ver figura 8).

Para la aplicación de estos métodos de muestreo, fue necesario distinguir los lugares donde el suelo presentaba una mayor contaminación, así como también ver si existía la presencia de algún tipo de derrame en el sitio, de este modo, en base a estos aspectos tratar de obtener una forma de Z invertida.

En la siguiente (figura 7) se muestra el esquema del patio del taller mecánico donde se sacaron las muestras. Los puntos señalados con negro, indican las zonas de muestreo del suelo contaminado.

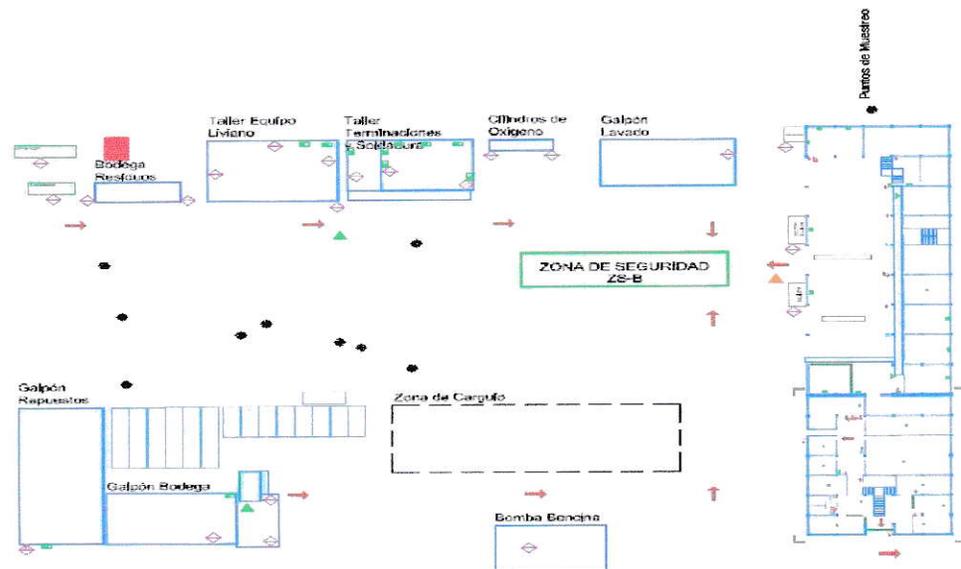


Figura 7: Plano de sitio de Empresa. El recuadro rojo muestra el sitio donde se obtuvo las muestras de suelo control. Y los puntos negros las muestras contaminadas.



Figura 8: Fotos del sitio de muestreo. En esta imagen se puede apreciar la dimensión de las máquinas que se encuentran estacionadas en el sitio de estudio.

Las muestras se obtuvieron desde el centro de la mancha, con la precaución de no sacar de los bordes del derrame (ya que la concentración de contaminantes en ésta parte podría ser heterogénea). La profundidad de las muestras sacadas es de aproximadamente 20 centímetros.

Como el suelo es industrial, posee una capa importante de ripio, por lo que, todas las muestras fueron cernidas con una malla de 1 cm, para separar ripio y otras impurezas. Terminado este proceso se recuperó un 45% de la muestra inicial. Luego, se procedió rápidamente a mezclar cada una de éstas y crear así, una sola muestra.

Todas las muestras de suelo fueron tamizadas y luego analizadas para determinar su contenido de hidrocarburos, y propiedades físico-químicas como son: conductividad eléctrica, pH, materia orgánica, fósforo disponible, sodio, potasio, magnesio y calcio.

1.2.- Muestreo del suelo Limpio.

En la obtención de la muestra de suelo no contaminado se tomó una calicata de suelo que no se encontraba afectada por ningún tipo de derrame, ubicada al costado de los galpones de la empresa (fuera completamente del área de trabajo). Se tomó una calicata de 1 m², y se excavó hasta 25 cm de profundidad, a la cual se le hizo escarpe, retirando los primeros 5 cm superficiales de tierra (por presencia de pastizal). El recuadro rojo ubicado al costado de la figura 7, es el sitio de extracción del suelo sin contaminación.

Se procedió a cernir la muestra con una malla de 1 cm para separar restos vegetales, piedras de menor tamaño y otras impurezas.

Las muestras fueron contenidas en bolsas de polietileno cerradas con precinto plástico, fueron transportadas a los diferentes laboratorios, para su análisis; CESMEC (Centro de Estudios de Medición y Certificación de Calidad) para el estudio de hidrocarburos, Laboratorio de Suelos de la Universidad de Chile para los análisis físico-químicos y Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Chile para el análisis biológico.

2.-. Determinación de parámetros físicos y químicos del suelo

2.1.- Determinación del pH

Para esta determinación se preparó una suspensión de agua desionizada en una proporción suelo; solución de 1: 2,5, en un frasco que luego fue agitado su contenido por dos horas en un agitador orbital, luego de este tiempo se agitó de forma manual. Se introdujo un electrodo de vidrio en el sobrenadante y se determinó el valor del pH una vez estabilizada la lectura, con un medidor de pH (Sadzawka, 2000).

2.2.- Determinación de la Conductividad Eléctrica

Para la determinación de la conductividad eléctrica, se empleó el mismo proceso descrito en el punto anterior, salvo que luego de la agitación se introdujo el conductímetro en la parte superior de la suspensión y se procedió a leer la conductividad eléctrica de la solución (Sadzawka, 2000).

2.3.- Determinación de Fósforo disponible

Para la determinación de fósforo disponible se utilizó el Método Olsen. Se usó una solución de extracción de bicarbonato de sodio a pH de 8,5. Es una extracción no muy fuerte y por lo mismo da números para suficiencia y deficiencia generalmente bajos. Se utilizaron tres muestras de 2,5 g de suelo cada una (incluyendo un blanco y contra muestra), se les agregó 50 mL de solución de bicarbonato de sodio 0,5 M, se agitaron por 30 minutos y se filtraron. A los extractos de las muestras filtradas, se le agregó reactivo mezclado (ácido sulfúrico, molibdato de amonio, ácido ascórbico y tartrato de potasio y amonio), se agitó y dejó reposar por una hora, y se procedió a medir la absorbancia a 880 nm, luego se realizó una curva de calibración de absorbancia de fósforo utilizando los siguientes datos (Sadzawka, 2000):

a: mg/L de P en el extracto de la muestra

b: mg/L de P en el blanco

20: relación liquido: suelo

Fh: factor de corrección por humedad

$$P(\text{mg / kg}) = (a - b) * 20 * fh$$

2.4.- Determinación de Materia Orgánica

El método consiste en una combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de dicromato y ácido sulfúrico. Después de la reacción se mide colorimétricamente el cromato reducido.

Se pesa 1 a 2 g de suelo seco y se transfiere 1 mL de la serie de estándares de sacarosa (0-10-20-30-40-50 mL de 100 mg/mL de Carbono, solución de sacarosa, 100 mg/mL de C, esta serie de estándares contiene 0-10-20-30-40-50 mg/mL de C.) a matraces erlenmeyer de 125-150 mL. Adicionar 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 mol/L, agregar cuidadosa y rápidamente 20 mL de ácido sulfúrico, agitar y dejar reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos, adicionar 70 mL de agua, mezclar y dejar reposar durante una noche. Leer la absorbancia a 600 nm del sobrenadante claro, cuidando de no disturbar el sedimento del fondo del matraz (Sadzawka, 2000).

Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y los mg de carbono de la serie de estándares de sacarosa.

$$\text{Carbono orgánico (\%)} = \frac{(a - b)}{s} * 1,2 * 100 * fh$$

Donde:

a = mg de C en la muestra

b = mg de C en el blanco

s = masa en mg de la muestra de suelo

fh = factor de corrección por humedad.

$$\text{Materia orgánica (\%)} = \text{carbono orgánico (\%)} * 1,72$$

Donde:

1,72 = factor estimado de conversión

2.5.- Determinación de Cationes

Extracto de saturación por cromatografía iónica (IP-HPLC).

3.- Determinación de Hidrocarburos

3.1.- Hidrocarburos Fijos

Los hidrocarburos fijos se determinaron mediante extracción con solventes orgánicos y posteriormente por cuantificación gravimétrica. Método Canadiense, para hidrocarburos en suelos con más de 50 átomos de carbono.

Para la determinación con solvente orgánico volátil, el solvente es evaporado y posteriormente condensado en un refrigerante, se le hace pasar por la muestra y se le regresa al origen para ser nuevamente evaporado. La muestra sólida es mezclada con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual, se le coloca en un dedal o cartucho de papel o fibra de vidrio y se usa un solvente orgánico apropiado para su extracción en equipo Soxhlet. Mediante los reflujos del solvente y la temperatura se permite el contacto íntimo de la muestra con el solvente de extracción, de esta manera se logra la liberación de los hidrocarburos presentes en la muestra. El extracto orgánico se concentra (si es necesario) o bien se evapora para realizar el intercambio de solvente, acorde con el método de cuantificación (Flores y col., 2006).

3.2.- Hidrocarburos Fracción GRO-DRO (Derivados de la gasolina y diesel).

La fracción GRO-DRO corresponde hidrocarburos de entre 10 y 24 átomos de carbono. La determinación de esta fracción se realizó por Cromatografía Gaseosa-Detector FID. Realizado en laboratorio de Química y Minerales de CESMEC (Centro de Estudios de Medición y Certificación de Calidad).

3.3.- Determinación Hidrocarburos Volátiles

La fracción de hidrocarburos volátiles corresponde a compuestos de entre 5 y 10 átomos de carbono. Esta fracción se determinó por el método de Cromatografía Gaseosa – Detector FID. Realizado en laboratorio de Química y Minerales de CESMEC (Centro de Estudios de Medición y Certificación de Calidad).

4.- Preparación de solución estimuladora de la biodegradación de Hidrocarburos in situ

Para favorecer la biodegradación de los hidrocarburos contaminantes en el suelo se utilizó una solución nutritiva que favoreciera el crecimiento de los microorganismos del suelo y donde los hidrocarburos contaminantes fueran la principal fuente de carbono.

Para la solución estimuladora N° 1, se utilizaron los siguientes reactivos:

• Micronutrientes	2 mL
• Vitaminas	2 mL
• NH ₄ Cl	4 g
• Buffer fosfato 1,0 M	5 mL (50 mM)
• Medio LB	10 mL Agua
• Destilada	<u>81 mL</u>
Volumen total	100 mL

Para la solución estimuladora N° 2, se utilizaron los siguientes reactivos:

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2,5 mL
CaCl * 2H ₂ O	1 mL
FeEDTA	1 mL
Micronutrientes	1 mL
Vitaminas	1 mL
NH ₄ NO ₃	2 g/L
Medio LB	10 mL
Agua Destilada	<u>981,5 mL</u>
Volumen total	1000 mL

Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave por 30 min a 15 psi. Cuando la solución se utilizó como medio de cultivo sólido se agregó agar al 2% previo a la esterilización.

5.- Ensayo de bioestimulación.

Para realizar el ensayo de bioestimulación del suelo, las muestras de suelo fueron tamizadas y se colocaron 400 g de suelo en cuatro recipientes plásticos de 900 mL, con los siguientes tratamientos:

Recipientes N°1 y N°2 corresponde a los controles y se les agregó 20 mL (5 mL/100 g de suelo); de agua destilada estéril, mientras que a los recipientes N°3 y N°4 corresponden a los tratamientos y se le agregó solución estimuladora. N°1 estéril. El programa de aplicación de las soluciones se indica en la tabla 8.

Tabla 8 Numero de aplicación de solución.

MUESTRA	SOLUCIÓN AGREGADA	TIEMPO DE ADICIÓN	NUMERO DE APLICACIONES
N° 1	Agua Destilada	Los primeros 15 días, la solución se aplicó cada 7 días luego, día por medio.	12
N° 2	Agua Destilada		30
N° 3	Solución Estimuladora		30
N° 4	Solución Estimuladora		12

Cada muestra se aireaba diariamente de manera manual, por el tiempo que duró el experimento. Para que la aplicación de la solución fuera lo más homogénea posible, en cada aplicación el suelo se disgregaba manualmente.



Figura 9: Forma de aplicación

6.- Aislamiento de microorganismos potencialmente degradadoras de hidrocarburos

Para el aislamiento de los microorganismos se incubó 6 g de suelo contaminado con 6 mL de la solución estimuladora N°1 estéril en una botella de vidrio de 250 mL. Esta preparación se realizó en duplicado y se etiquetó como (A) y (B), adicionalmente un

tercer frasco (C), contenía 6 g de suelo contaminado más 6 mL de agua destilada (control). Las tres muestras se incubaron y agitaron durante 5 días, a 24°C

Luego de la incubación se inocularon placas de petri que contenían medio de cultivo sólido preparado a partir de la solución estimuladora N°2 con agar al 2% más aceite usado de motores diesel, que es el principal contaminante de estos suelos. Se prepararon dos set de placas petri:

Tres placas con solución estimuladora más aceite usado al 0,5% v/v.

Tres placas con solución estimuladora más aceite usado al 1,5% v/v

Para la inoculación de las placas se realizó un rallado con una asa, de acuerdo al esquema de la figuras 10. Las placas fueron incubadas a 24°C hasta la visualización de las colonias.

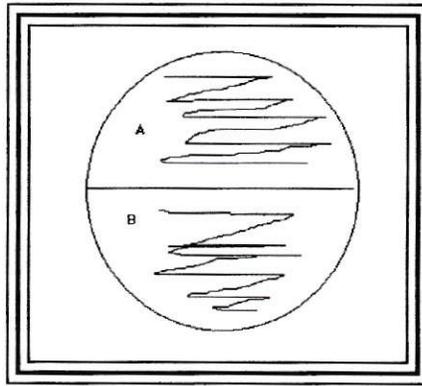


Figura 10: Esquema de inoculación de las placas de cultivo, (A) y (B), representan los inoculos derivadas de los dos frascos experimentales iniciales.

Considerando que las concentraciones de aceite que se usaron podían ser tóxicas para los microorganismos que se esperaba aislar, se preparó un cultivo alternativo. Este cultivo se realizó en placas de petri que contenían una gradiente de aceite entre 0 - 1.5 % v/v. (Figura 11) las placas fueron inoculadas en hileras a lo largo de la gradiente.

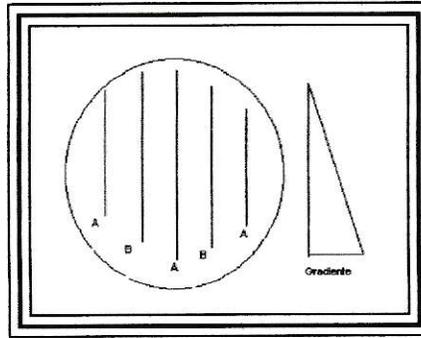


Figura 11: Inoculación en gradiente de concentración de aceite con incubación (A) y (B)

Una de las dificultades de preparar el medio de cultivo con aceite usado, es que trae numerosas impurezas que afectan la visualización de las colonias microbianas. Para resolver esta situación las colonias obtenidas en los medios sólidos anteriores se crecieron en medio sin aceite y el aceite se aplicó puntualmente mediante discos de papel filtro embebido en aceite usado, como se muestra en la figura 12. En este medio se probaron la mezcla de microorganismos obtenidos en los cultivos (A) y (B) iniciales.

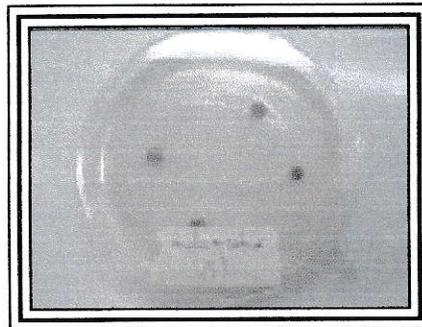


Figura 12: Placa con césped microbiano y discos de papel filtro con aceite usado.

Los microorganismos o consorcio microbiano que creció alrededor de los discos de papel filtro fueron usados como inóculos en experimentos de degradación de hidrocarburos y se designaron como inóculos (α y β). Para ello las bacterias que crecieron alrededor de los discos fueron resuspendidas, la solución estimuladora como se muestra en la figura 13-14 y 15.

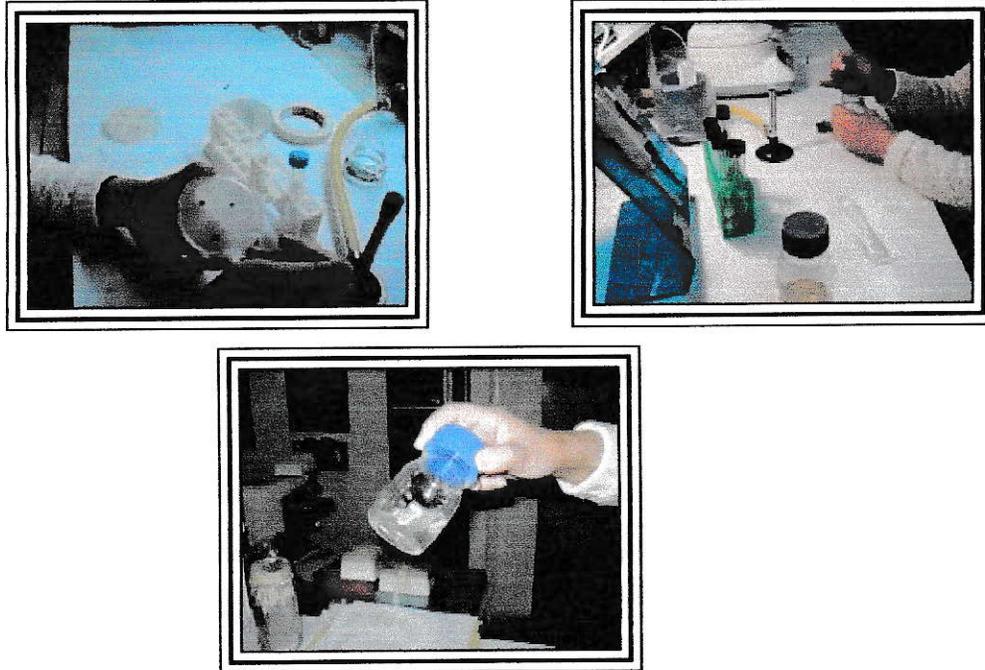


Figura 13 14 y 15: Incubación con inoculaciones en medio sólido con papel filtro

7.1.- Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos

Para evaluar si el consorcio aislado era capaz de degradar los hidrocarburos presente en estos aceites usados, se inoculó 25 mL de la solución estimuladora N°2 conteniendo 200 μ L de aceite usado liquido, utilizando los inoculos (α y β) separadamente, un tercer frasco se mantuvo con control sin inocular. La eficiencia de degradación se determinó cualitativamente mediante la observación de las paredes del frasco durante la incubación.

7.2.- Determinación cuantitativa de de la biodegradación de hidrocarburos.

Para realizar una determinación cuantitativa de la degradación fue necesario escalar el ensayo. Para ello se prepararon 12 botellas de 2 litros conteniendo cada una 250 mL de solución estimuladora N° 2 estéril con 3,0% v/v de aceite usado. Para estimular el crecimiento bacteriano inicial se agregó a cada botella 2,5 mL de medio nutritivo (LB), al inicio del experimento. Cuatro botellas no se inocularon con bacterias y se dejaron como control (C₁- C₂- C₃- C₄), y las otras ocho restantes se inocularon con 1 mL de los

consorcios microbianos (α y β) y se etiquetaron de la siguiente manera ($A_1 - A_2 - A_3 - A_4$) y ($B_1 - B_2 - B_3 - B_4$). Los cultivos se incubaron a 28°C durante ocho semanas con agitación diaria intermitente aproximadamente 8 horas al día de agitación. El aspecto de los cultivo se muestra en las figuras 16 y 17. Terminada la incubación se analizaron los hidrocarburos fijos del control y de los tratamientos con los dos tipos de consorcios microbianos aislados.

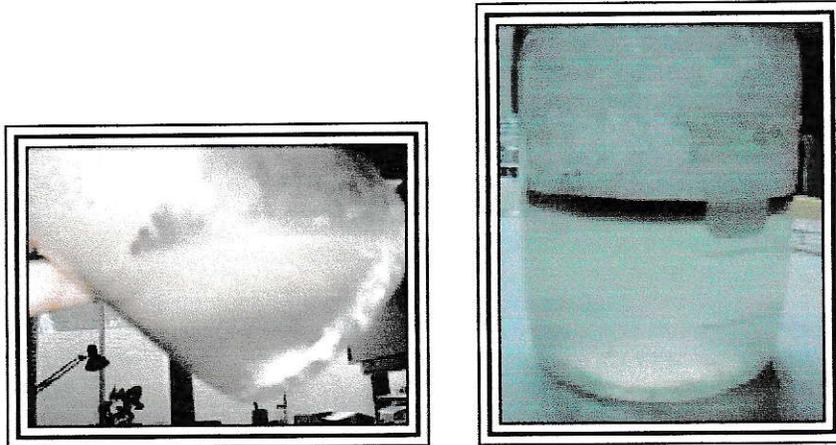


Figura 16 y 17: Aceite liquido en tratamiento

8.- Determinación del crecimiento microbiano.

El crecimiento microbiano se determinó mediante el conteo de células viables. Para ellos se preparó un cultivo con 20 mL del consorcio microbiano en un litro de solución estimuladora N°2 con 0,1% v/v de aceite usado. Se usó una concentración menor del aceite usado para poder obtener una curva de crecimiento microbiano en un menor tiempo. Concentraciones mayores de aceite retardan mucho el crecimiento, ya que hay un período de aclimatación muy largo. El cultivo se incubó a 28°C y se extrajo 1 mL de muestra a diferentes tiempos (0, 23, 47, 74, 97 h.) y se hicieron diluciones seriadas de la muestra. 0,1 mL de una dilución adecuada fue sembrada en placas con medio sólido nutritivo para determinar el número de células viables en cada tiempo. En los primero tiempos se utilizaron diluciones $10^{-1} - 10^{-3}$, en los tiempos finales cuando el cultivo era más denso se utilizaron diluciones de $10^{-6} - 10^{-8}$. Las bacterias viables

formaran una colonia en la placa de petri la cual será visible después de incubar 24 h. a 28°C.

9.- Ensayo de biodegradación utilizando biofertilizante comercial

Se masaron 400 g de suelo contaminado en dos recipientes plásticos de 900 mL, y se etiquetaron como M y N, el primero de estos se le agregó 20 mL de una solución fertilizantes comercial (Plant Food), preparada con 2 g fertilizante por en 50 mL de agua. Al recipiente control se le agregó 20 mL de agua destilada, cada dos días, durante 50 días.

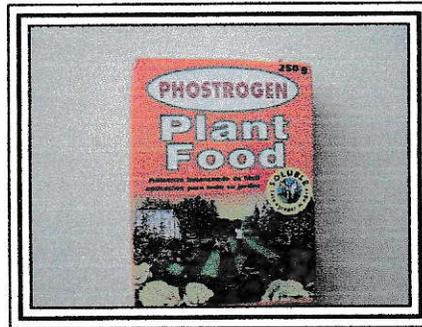


Figura 18: Fertilizante comercial

9.1.- Implementación en Terreno.

Para implementar el sistema de biorremediación en terreno se realizó una perforación de 7 x 2 m² y 80 cm de profundidad, el lugar se impermeabilizó con polietileno, para evitar el contacto del suelo contaminado con el suelo limpio y también cualquier tipo de filtración del contaminante hacia las napas subterráneas. Tratamiento que se seguirá implementando y monitoreando en fechas posteriores.

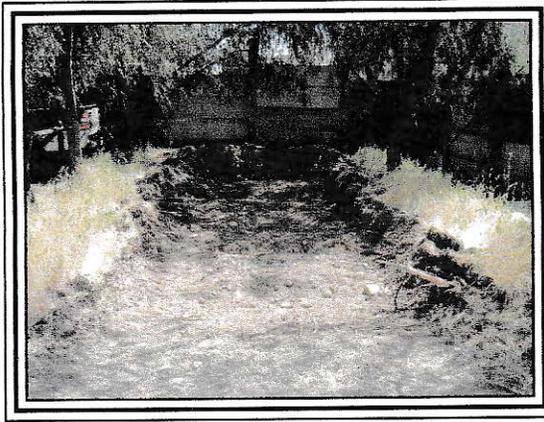


Figura 19: Terreno de aplicación del tratamiento



Figura 20: Impermeabilización del terreno

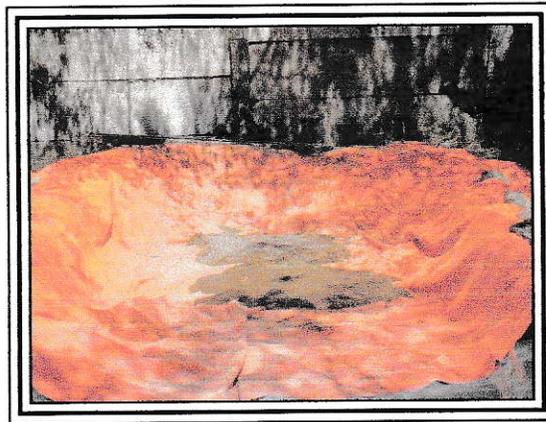


Figura 21: Tratamiento de suelo en terreno

III. RESULTADOS

1.- Características del Sitio de Estudio

Los estudios efectuados en este seminario se realizaron con suelos de la empresa Zublin International GmbH, la cual está ubicada en el loteo Industrial de Quilicura, Kilómetro 11 de la Panamericana Norte en Santiago de Chile. En el sector de sus instalaciones se encuentra los talleres centrales de la empresa, siendo estos últimos destinados a llevar a cabo las reparaciones y “overhaul” superior de su maquinaria principal.

Las instalaciones se encuentran emplazadas sobre una plataforma de material compactado (relleno) en la que se realizan sus operaciones. En cuanto al terreno se dispone de registros de estudios de mecánica de suelos, hechos recientemente en la zona por la empresa especialista Geofun Ltda. El estudio se hizo entre el sector de Avenida Santa Lucia y Calle Cerro Portezuelo, detectándose que el sitio en estudio corresponde a la unidad denominada “fino del norte”, unidad constituida por material limoso y arcilloso de plasticidad mediana alta, de color café claro, con intercalaciones de lentes arenosos de espesor variable (Geofun. 2006). Estos materiales se han depositado debido al represamiento natural de las aguas provenientes de los esteros Lampa y Colina, producido por el desarrollo paulatino del cono del Río Mapocho. Las partículas de suelo provenientes de la descomposición de rocas sedimentarias y volcánicas de los cordones cordilleranos ubicados en el sector norte. Ocasionalmente se han depositado suelos mas gruesos, tales como arenas y gravas, que son transportadas por el cause de los esteros y que quedan incluidos en un estrato mas fino típicamente limo-arenoso a arcilla-arenosa (Geofun, 2006).

La zona tiene un drenaje deficiente, razón por la cual el nivel freático, que se encuentra a escasa profundidad (aproximadamente 1,8 m.), en ocasiones de periodos de lluvias, se eleva rápidamente. La baja pendiente del terreno y la existencia de suelos superficiales impermeables son factores que impiden un drenaje natural y eficiente (Geofun, 2006).

El suelo es de carácter arenoso-limoso, estructura edáfica que le ayuda a mantener condiciones aeróbicas.

Al momento de extraer las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, el suelo se encontraba muy compacto, producto principalmente del permanente tránsito de maquinaria pesada por el sector del patio de las instalaciones de la empresa, que sumado además con la gran cantidad de ripio presente en el lugar, complica las labores de muestreo en el terreno.

También hay que mencionar que la mancha de aceite extraída puede presentar poca homogeneidad. Las muestras de suelo consideradas como suelo limpio, fueron extraídas en un terreno aledaño a aquellos en que se realizan los trabajos, el cual presenta condiciones físicas diferentes, a las del suelo contaminado, pero es un buen parámetro de análisis de comparación, para ver el grado de contaminación que presenta el suelo en tratamiento.

2.- Caracterización fisicoquímica de Suelo.

Las muestras de suelos analizadas no presentaron diferencias importantes en sus propiedades edáficas tales como: pH, conductividad eléctrica, fósforo disponible, materia orgánica y concentración de cationes.

En la Tabla 9, se puede observar que el suelo limpio es moderadamente alcalino con un pH de 8,4 mientras el suelo contaminado es ligeramente alcalino con pH 7,3 de acuerdo a la denominación agronómica de suelo. Esta menor alcalinidad del suelo contaminado podría ser consecuencia del proceso de degradación de los hidrocarburos contaminantes por parte de los microorganismos, lo cual puede acidificar el suelo, debido por ejemplo a la generación de ácidos orgánicos y, la acumulación de carbón orgánico. Los valores de pH recomendado para un suelo en biotratamiento, debe ser superior a 6,5, preferentemente en un rango de 7 a 8 (Tyagi. 1991).. Este rango de pH favorece el crecimiento y desarrollo de la mayoría de los microorganismos heterotrófico. Además cabe mencionar que pH extremos reduce la

disponibilidad de nutrientes como el nitrato, sulfato, fosfatos. También los extremos de pH afectan la solubilidad de los nutrientes y los procesos de absorción/adsorción de los contaminantes y de los iones, por lo tanto el pH cercano a la neutralidad ayuda a controlar la fuga de metales pesados hacia los acuíferos (Aycachi, 2008).

Tabla 9. Características físico-químicas de un suelo control y el suelo en estudio.

Caracterización fisicoquímica de Suelo.				
	pH	CE (mg/Kg)	P disponible (mg/Kg)	%MO
Suelo control	8,4	1,98	17,39	16,39
Suelo contaminado	7,3	1,71	19,84	20,15

En la Tabla 9, se muestran los valores de la conductividad eléctrica de ambos suelos. Esta propiedad química del suelo permite conocer la concentración de sales solubles en el suelo. Los valores encontrados en las muestras sugiere que ellos no son suelos salinos, en base a lo indicado por el US Salinity Laboratory de Riverside (George E. 2006) que establece que suelos con valores de salinidad entre 0-2, se consideran normales. La determinación de la conductividad eléctrica de un suelo es un parámetro importante, ya que tiende a cambiar el contenido de agua, medida que en este caso se considera relevante en la degradación de los hidrocarburos.

En la Tabla 9, se muestra la concentración de fósforo disponible en ambos suelos. De acuerdo a Vanek (Vanek, 2008), la concentración de fósforo disponible para ambos suelos es considerada como alta cuando se encuentra entre los rangos 15-20 (mg/Kg) (Vanek, 2008). Este nutriente es esencial para el crecimiento microbiano y no se encontraría en concentración limitante para el proceso de biodegradación.

La materia orgánica en el suelo contaminado es ligeramente más alta que en el suelo limpio, lo cual es esperable ya que podría haber mayor actividad microbiana, por la presencia de compuestos orgánicos oxidables.

En la tabla 10, se muestra la concentración de cationes en ambos suelos. Los datos indican la mayores diferencias están en el contenido de ion sodio que es mucho menor

en el suelo contaminado. También hay diferencias en el contenido de Mg^{+2} aparece aumentado en el suelo contaminado.

Tabla 10. Concentración de cationes en suelo control y suelo en estudio.

	Concentración de Cationes			
	Na ⁺ (cmol/Kg)	K ⁺ (cmol/Kg)	Mg ⁺² (cmol/Kg)	Ca ⁺² (cmol/Kg)
Suelo control	2,99	0,03	0,16	0,19
Suelo contaminado	0,22	0,22	2,04	0,42

3.- Contenido de hidrocarburo en el suelo

En la tabla 11, se muestran las fracciones de hidrocarburos que se determinaron en los suelos estudiados. La concentración de Hidrocarburos volátiles, para ambos suelos es baja, lo que se puede deber, a que este tipo de hidrocarburos se volatiliza rápidamente o que los contaminantes de estas faenas no contienen mayoritariamente este fracción de hidrocarburos.

Aunque, la concentración de hidrocarburos provenientes de la fracción GRO-DRO (derivados de la gasolina y diesel), no es alta para ningún tipo de suelo, se obtuvo un mayor valor en el suelo contaminado.

Para el caso de hidrocarburos fijos, el suelo contaminado presenta una elevada concentración inicial de 42.198 (mg/Kg). Esto nos indica que el tipo hidrocarburos que permanece en estos suelos, corresponde a compuestos con un número alto de átomos de carbono, hidrocarburos que son más recalcitrantes a la biodegradación debido a su mayor tamaño y probablemente a su menor disponibilidad debida a procesos de adsorción o absorción. Este tipo de hidrocarburos tendría la ventaja de una menor movilidad en el suelo lo cual reduciría el riesgo de contaminación de las napas subterráneas existentes en esta zona. La concentración de este tipo de hidrocarburos en el suelo limpio es de 598 (mg/Kg), la cual está bajo los niveles aceptables de

hidrocarburos en suelos y por lo tanto se puede considerar un suelo limpio de hidrocarburos.

Tabla 11. Fracciones de hidrocarburos en suelo control y suelo contaminado.

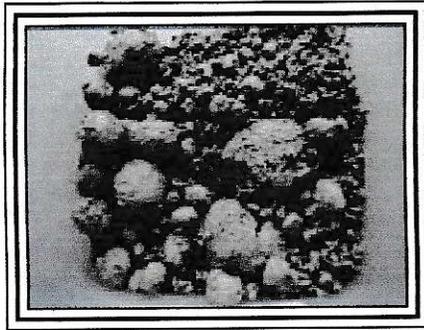
	Concentración de Tipos de Hidrocarburos presentes en Suelo (mg/Kg).		
	Volátiles	GRO-DRO	Fijos
Suelo control	6,4	101	598
Suelo contaminado	3,5	797	42198

4.- Ensayo de Bioestimulación en microcosmos

Para evaluar la capacidad de degradación presente en los suelos, se diseñó un ensayo de bioestimulación, en un ensayo de microcosmos con 400 g de suelo contaminado por ensayo. Los tratamientos consistieron en aplicar una solución bioestimuladora (ver Materiales y Métodos) y un control tratado con agua destilada estéril.

Los suelos fueron mantenidos a temperatura ambiente y agitados diariamente en forma manual. Las figuras 22 y 23, muestra el aspecto que adquiere el suelo debido a la agitación aplicada. Los conglomerados se formaron como consecuencia de la presencia de los hidrocarburos, por lo tanto periódicamente los suelos fueron disgregados para favorecer la aireación.

A)



B)

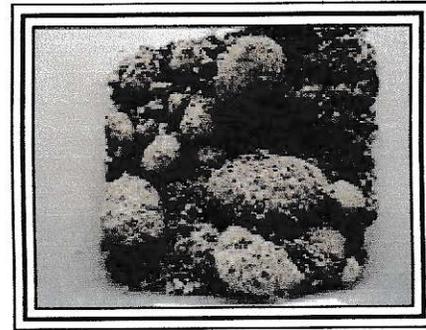


Figura 22 y 23: Aspectos del suelo de los ensayos de bioestimulación A) suelo tratado y B) suelo control.

En figura 24 se muestra los valores de hidrocarburos alcanzados luego del tratamiento de bioestimulación. Después de transcurridos los 30 primeros días de tratamiento, se observa una disminución paulatina en los niveles de Hidrocarburos Fijos en el suelo que se le aplicó solución estimuladora, mientras que en el suelo que solo se le adicionó agua, la disminución fue mas lenta. Por consiguiente, existe una mayor tasa de biodegradación en el suelo con tratamiento. A los 60 días de tratamiento se advierte que, tiene el mismo comportamiento en la degradación, representada por una tasa de degradación de un 35,6%, resultado superior al del suelo sin tratamiento 28,5% .Cabe señalar, que visualmente, ambos suelos presentaron un aspecto similar. En cuanto a los valores de Hidrocarburos se estima que en un tiempo (t), existirá un periodo estacionario o de meseta, donde la disminución de la concentración de hidrocarburo será casi inapreciable, lo que se conoce como periodo de saturación, donde alcanzado este periodo se puede dar por concluido el proceso de Biorremediación.

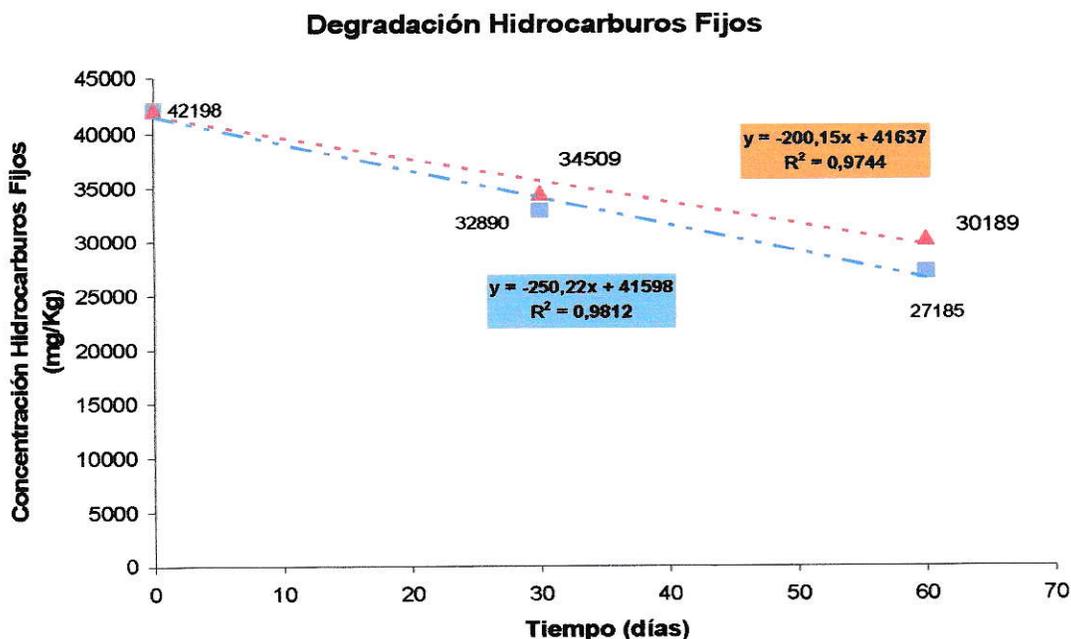


Figura 24: Grafico de degradación de hidrocarburos fijo en suelos contaminado a 30 y 60 días. La curva roja pertenece al suelo sin tratamiento, mientras que la curva en azul al suelo en tratamiento.

5.- Aislamiento de microorganismos potencialmente degradados de hidrocarburos

Para el aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores se utilizó suelo contaminado. Para ello se cultivó el suelo con solución estimuladora durante 5 días y a partir de la suspensión de suelo se sembraron placas de Petri con solución estimuladora solidificada con agar al 2% la cual contenía aceite usado como única fuente de carbono. Se prepararon placas a dos concentraciones de aceite usado: 0,5 % y 1,5% p/v. A los 5-6 días de cultivo de las placas de Petri, se observó la presencia de colonias de distintas formas y tamaño en las dos concentraciones usadas.

En las figuras 25 y 26 se muestra el aspecto de colonias obtenidas en las placas de selección. A partir de estos cultivos se obtuvieron dos inóculos designados como A y B

y corresponde a una mezcla de microorganismos que crecieron en la placa de selección.

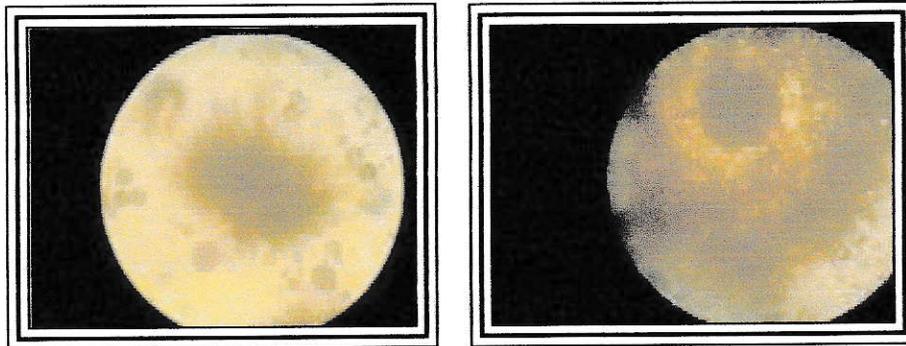


Figura 25 y 26: Cultivo en placas selectivas con 0.5% p/v de aceite usado como fuente de carbono.

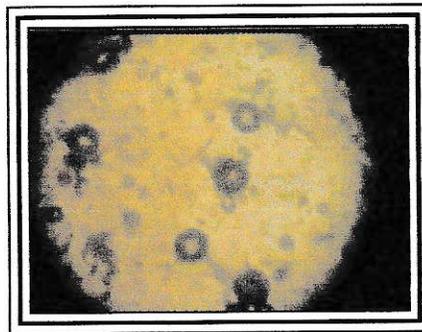
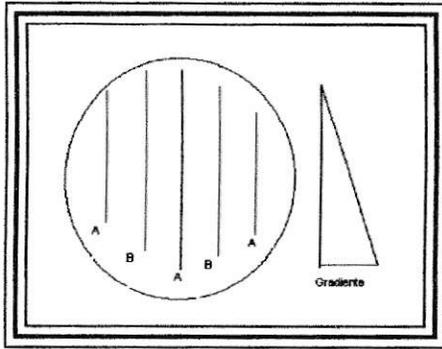


Figura 27: Cultivo en placas selectivas con 1,5 % p/v, con inoculación (A o B)

En las placas control sin aceite usado, hay un crecimiento homogéneo de microorganismos, tipo césped en toda la placa.

Para verificar, si los microorganismos aislados crecían mejor a una concentración menor de aceite, se cultivaron en placas con una gradiente de aceite. Los cultivos obtenidos mostraron que los microorganismos se desarrollaron a lo largo de la gradiente. La figura 29 muestra el aspecto que se observó a lo largo de una línea de inoculación.

A)



B)

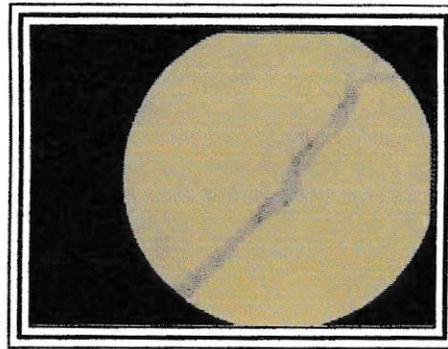


Figura 28 y 29: A) Inoculación en Gradiente de Concentración de Aceite usado. B) desarrollo microbiano a lo largo de una línea de la gradiente.

La Inoculación en placas en medio sólido con papel filtros sumergido en aceite líquido usado, se realizo con el fin de, ver si existía un crecimiento preferencial de bacterias en un área en donde existe claramente presencia de hidrocarburos y también para ver si estos microorganismos ocupan el carbono de los hidrocarburos como medio de alimentación. Se depositan estos filtros sumergidos directamente en aceite usados.

Las fotos de las figuras 30 y 31 muestra el crecimiento, de dos tipos de colonias alrededor de estos filtros, por lo que se comprobó que estos microorganismos lo utilizan como fuente de carbono.

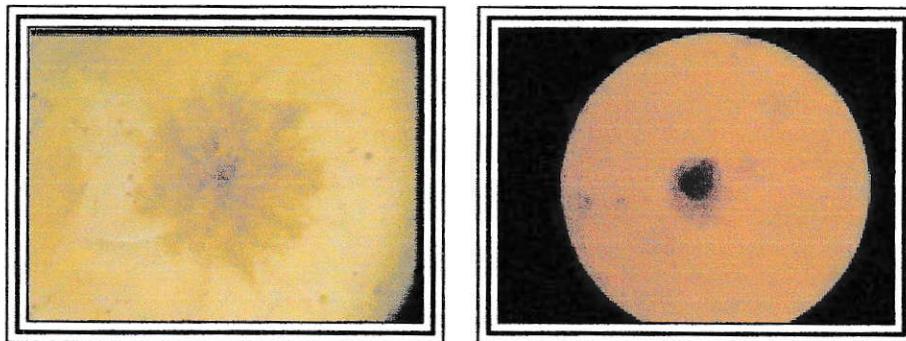
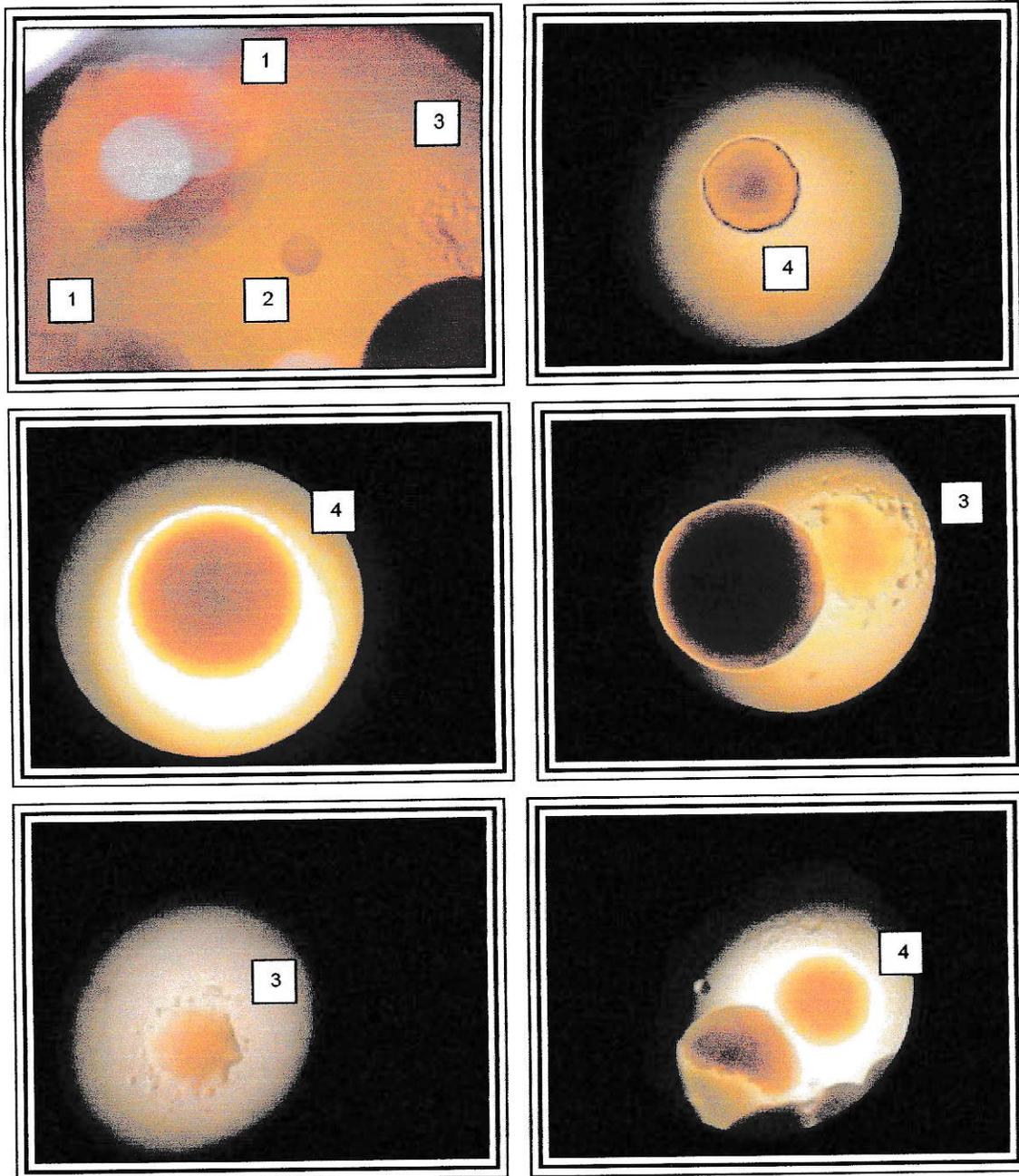


Figura 30 y 31: Colonias que crecen alrededor de los discos de papel filtro embebidos en aceite usado.

A partir de las placas selectivas, se aislaron 6 tipos de bacterias, las cuales forman parte del consorcio microbiano que se utilizó para realizar el ensayo de degradación

de hidrocarburos. En las siguientes figuras, se muestra el aspecto de las colonias de algunos de los microorganismos aislados.



Figuras 32 a 37: Colonias aisladas desde las placas de selección.

En la fotografías al microscopio óptico se muestra el aspecto de algunas colonias. Una de ellas muestra una colonia traslucida con un centro más denso y bordes irregulares (1), una colonia esférica de menor tamaño con bordes muy definidos (2), una colonia poco densa e irregular (3) y una colonia con centro denso y bordes irregulares, que parece estar formada por microorganismo filamentoso del tipo actinobacteria.

Como se observa en la tabla 12, se obtuvieron seis secuencias de DNA que codifica para el RNA 16S, las cuales están estrechamente relacionadas con los siguientes organismos; *Comamonas sp*, *Sphingobacterium sp* y *Pseudomonas sp*. Todas las secuencias obtenidas de los aislados mostraron una gran similitud (96%-99%) con secuencias más relacionadas disponibles en las bases de datos GeneBank.

Tabla 12 Cepas aisladas que se encuentra en el GeneBank.

Aislado	Max identidad	Secuencia más relacionada con el aislado que se encuentra en el GeneBank	Nº de Acceso GeneBank
B1	98%	<i>Comamonas sp.</i> TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	AJ550282.1
B2	96%	<i>Sphingobacterium sp.</i> QMT3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU216022.1
B3	99%	<i>Pseudomonas sp.</i> L37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	DQ300311.1
B4	99%	<i>Pseudomonas sp.</i> BSw10041N 16S ribosomal RNA, partial sequence	FJ416144.1

6.- Biodegradación de Hidrocarburos por consorcio microbiano.

6.1.- Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos

Para determinar si los microorganismos aislados eran capaces de degradar los hidrocarburos presentes en los aceites usados de motores. Se realizó un ensayo que contenían 20 mL de la solución estimuladora más 200 uL de aceite usado. Se

prepararon 2 ensayos los cuales fueron inoculados con las mezclas A y B obtenidas en la etapa de aislamiento y un ensayo control no inoculado. Después de aproximadamente 15 días de incubación a 25°C y con agitación el aspecto de los cultivo inoculados indica que no hay presencia de material graso en las paredes del frasco comparado con el control, lo que sugiere que hubo degradación del hidrocarburo. Además se observa que la solución estimuladora es más transparente y existe un precipitado, que en parte correspondería a materia orgánica (biomasa), producto del crecimiento microbiano. En las siguientes figuras, se observa el aspecto que tenían los cultivos y el testigo al final del período de incubación.

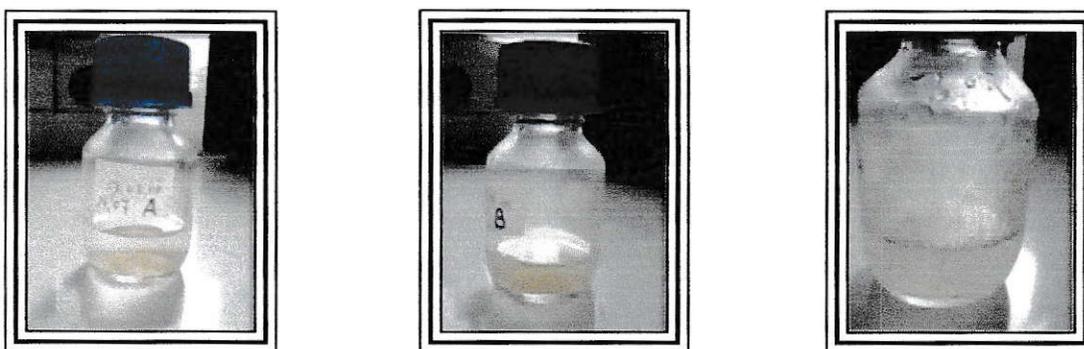


Figura 38,39 y 40: Determinación cualitativa de la degradación de hidrocarburos por el consorcio microbiano. A y B solución estimuladora con aceite usado e inoculada con microorganismos y C testigo sin inocular.

6.2.- Determinación cuantitativa de la degradación de hidrocarburos “in vitro”

Para realizar una determinación cuantitativa de la degradación fue necesario escalar el ensayo. Para ello se prepararon 12 botellas de 2 litros conteniendo cada una 250 mL de solución estimuladora N° 2 estéril con 3,0% v/v de aceite usado. Cuatro botellas no se inocularon con bacterias y se dejaron como control (C₁- C₂- C₃ -C₄), y las otras ocho restantes se inocularon con 1 mL de los consorcios microbianos (α y β) y se etiquetaron de la siguiente manera (A₁- A₂- A₃- A₄) y (B₁ - B₂ - B₃ - B₄).. Al final de la incubación se analizaron los hidrocarburos fijos del control y de los tratamientos, los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 13:

Tabla 13 Análisis de suelo y soluciones.

Ensayo	Hidrocarburos fijos (mg/kg)
Control sin inocular (C)	13703
Ensayo con inóculo A (A)	9969
Ensayo con inóculo B (B)	13372
Concentración inicial de Hidrocarburos fijos en el ensayo	22157

Se puede ver que en el tiempo de tratamiento, la concentración de hidrocarburos fijos bajó en las tres muestras (A, B, C), con respecto a valor inicial. La muestra con menor concentración de hidrocarburos fijos, fue la muestra A, en un 55%, mientras que la muestra B (40% de reducción) casi no obtuvo diferencia en relación al control sin inocular C (41% de reducción). Cabe mencionar que en el ensayo control (C) si bien no fue inoculado, la aplicación del aceite, el cual no estaba estéril, debió servir como fuente de microorganismos para permitir la biodegradación. Al final de la incubación el ensayo C claramente exhibe crecimiento microbiano en la botella. Los resultados obtenidos nos indican que en el aceite es posible encontrar algunos microorganismos que, bajo condiciones adecuadas pueden crecer y degradar los hidrocarburos.

Por lo tanto, de acuerdo a los datos obtenidos en el ensayo de biodegradación, el tratamiento de aireación y la estimulación microbiana permitieron la degradación de casi el 55% de los hidrocarburos presente en el aceite usado en el tiempo de tratamiento en solución.

No obstante, un factor limitante en el ensayo fue la aireación, principalmente, por la capa de aceite que se formó en la superficie de la solución de cultivo al momento de adicionar el aceite. Esta cubierta oleosa redujo la adecuada interacción entre la fase gaseoso y líquida del recipiente, pese a la constante agitación a la cual fueron sometidas las muestras.

Esta aproximación experimental permitió demostrar que el consorcio microbiano fue capaz de degradar los hidrocarburos presentes en el aceite usado. Sin embargo, esta

estrategia no asegura el éxito de la biorremediación *in situ* mediante una inoculación microbiana, ya que en el ensayo realizado, la biodisponibilidad de hidrocarburos es muy distinta a la biodisponibilidad en el suelo, ya que no están presentes los efectos de adsorción/absorción a la matriz, que podrían hacer menos eficiente la degradación.

6.3.- Determinación del crecimiento microbiano durante el ensayo de biodegradación "in vitro"

Para determinar si la solución estimuladora suplementada con aceite usado era capaz de sustentar el crecimiento bacteriano, se realizó una curva de crecimiento del cultivo mediante la determinación de células viables en diferentes tiempos. El diseño experimental se describió en materiales y métodos (sección 8). Una vez establecido el cultivo, se extrajo una alícuota de 1 mL a los 0, 23, 47, 74 y 97 horas de incubación y se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 0,1 mL de diluciones adecuada en placas con medio nutritivo. Las placas fueron incubadas a 25°C para permitir la aparición de colonias como se muestra en la Figura 41. A partir del número de colonias obtenidas en las placas de cultivo se estimó el número de células viables/mL. que se muestran en la Tabla 14. La curva de crecimiento del cultivo se muestra en la Figura 42.

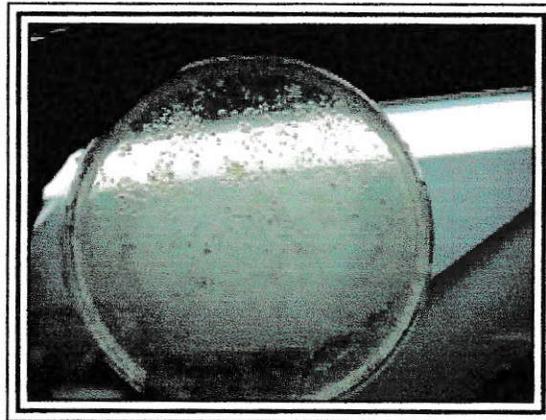


Figura 41: Cultivo en medio nutritivo para determinación del número de células viables

Tabla 14: Determinación del número de células viables/mL (UFC/mL)

Tiempo (horas)	Dilución usada para la determinación	Nº de colonias/placa	Nº de células/mL (*)
0	10^{-3}	183	1.83×10^6
23	10^{-4}	300	3.0×10^7
47	10^{-6}	20	2.0×10^8
74	10^{-6}	39	3.9×10^8
97	10^{-7}	3	3×10^9

(*) el número de células viables /mL se calcula de la siguiente manera

$$\text{UFC/mL} = \text{Nº colonia por placa} \times \text{dilución} \times \text{factor de dilución del inóculo (10)}$$

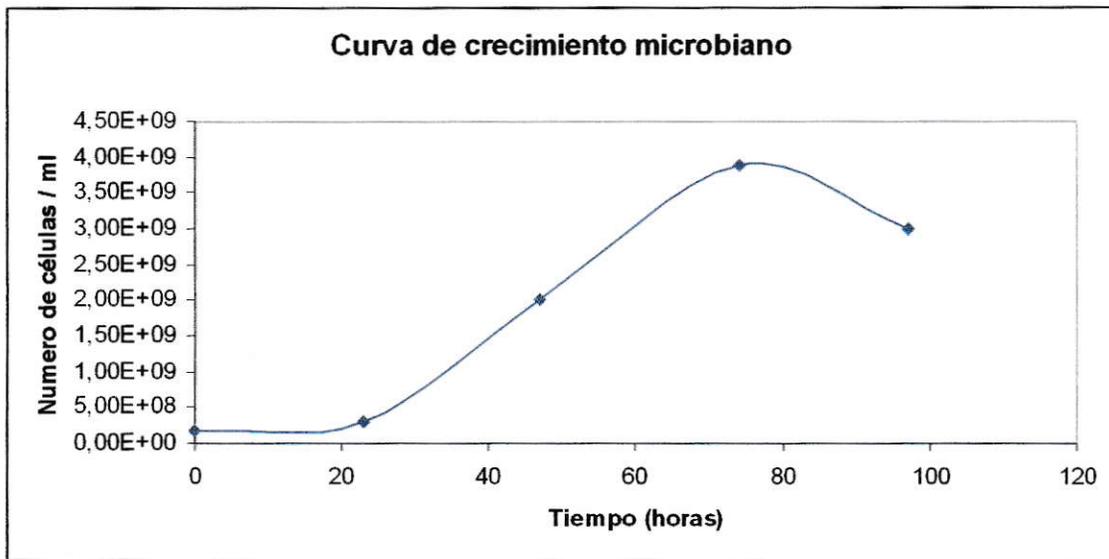


Figura 42: Curva de crecimiento microbiano.

La curva de crecimiento observada nos permite deducir que el medio de cultivo fue capaz de favorecer el crecimiento y que por lo tanto los microorganismos fueron capaces de utilizar el aceite como fuente de carbono. La curva tiene un típico comportamiento exponencial con una fase final de crecimiento estacionario. Se destaca que la concentración de microorganismos viables en el ensayo alcanzó el orden de 10^9 UFC/mL, valor muy favorable para que se efectúe el proceso de biodegradación. Estas concentraciones resultan ser superiores al rango de 10^3 y 10^4

recomendado en la literatura (Ercoli y col. 2001) para que se efectuó el proceso de Biorremediación satisfactoriamente.

7.- Cinética.

En la busca del modelo cinético que nos permita ver el comportamiento de la degradación bacteriana en este tipo de contaminantes, ver si pertenece a un sistema de primer orden, y estimar el tiempo de vida media. Se grafica el $\ln [HC]$ en el tiempo, y al entregar una recta de carácter lineal, de pendiente negativa, nos aseguramos que la ecuación de la reacción al inicio del tratamiento, es de primer orden y que el tiempo de vida media para el suelo que se encuentra contaminado es de 66 días.

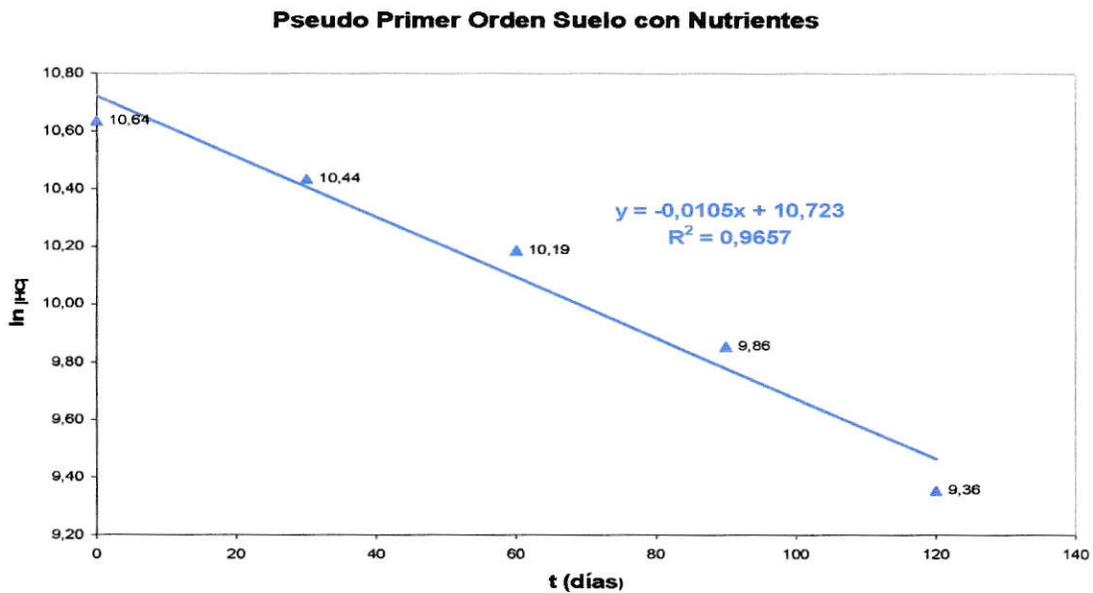


Figura 43: Gráfico de pseudo primer orden del modelo experimental, en el primer tramo del tratamiento.

Para descartar completamente que la ecuación de la reacción es de segundo orden, es necesario graficar $1/[HC]$ en el tiempo y si la línea de tendencia es de forma parabólica, podemos asegurar que no es una reacción de segundo orden (figura 44).

Segundo Orden Suelo con Nutrientes

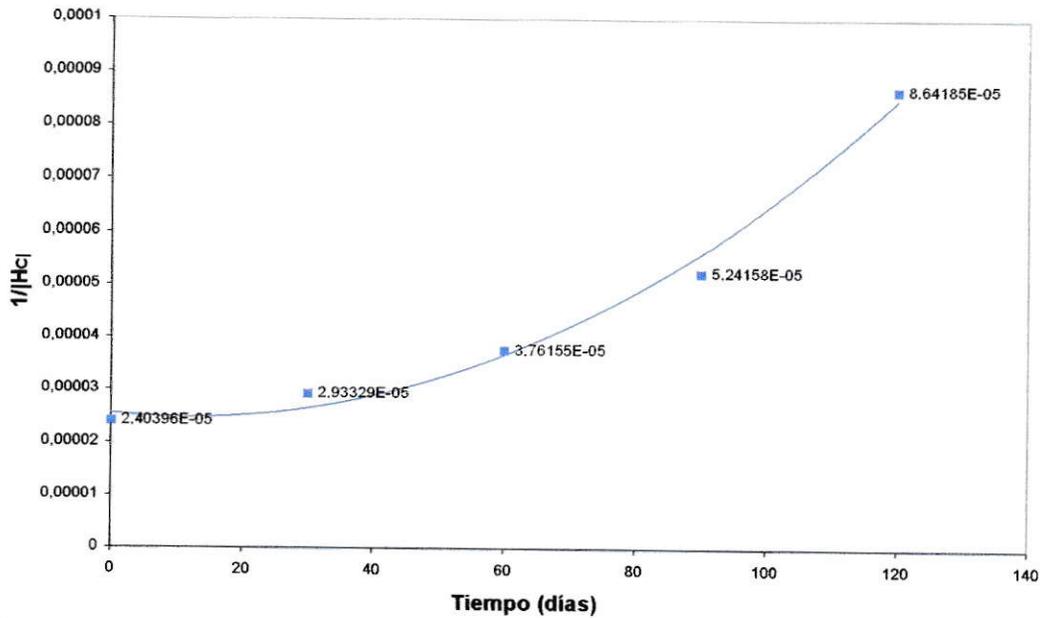


Figura 44: Gráfico de segundo orden del modelo experimental

En la figura 45 que representa el crecimiento poblacional de los microorganismos, se puede observar que existe una etapa inicial hasta las 24 horas, de tendencia lineal y que representa un retardo en el crecimiento y luego cambia a un crecimiento exponencial que a las 80 horas se vuelve constante y corresponde al inicio de la fase de crecimiento estacionario. Con esta curva se puede apreciar el comportamiento que tienen los microorganismos en el tiempo que se realiza el tratamiento, donde se puede observar, que al inicio de este las células toman un tiempo en adaptarse al medio, que luego crecen y luchan por sobrevivir mientras exista alimento y posteriormente su crecimiento disminuye al agotarse su alimento.

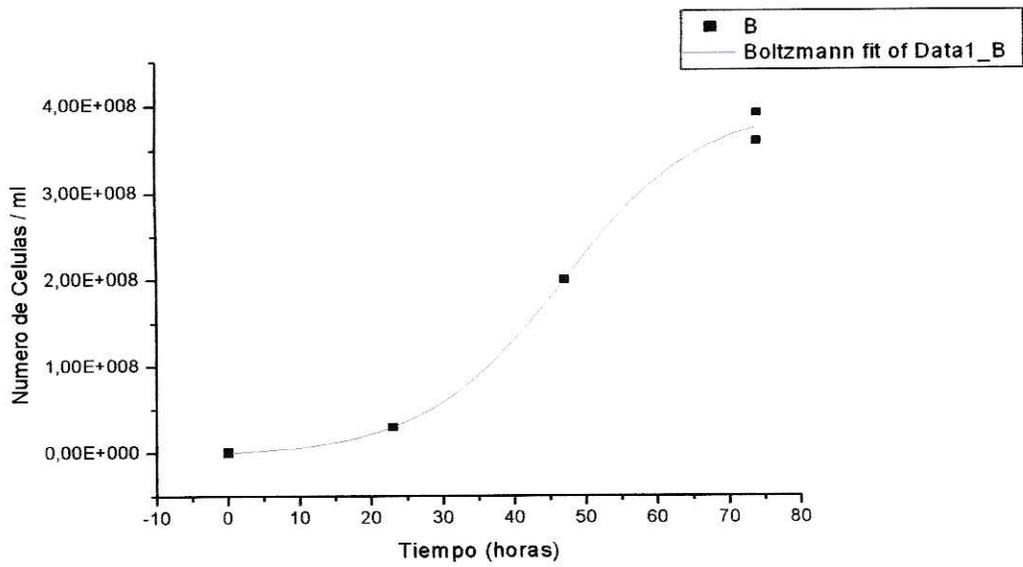


Figura 45: Modelo de crecimiento de la población.

8.- Efecto de bioestimulación de la degradación de hidrocarburos del aceite, usando un fertilizante comercial.

Para desarrollar una estrategia de degradación que permitiría promover la estimulación microbiana con un producto de menor costo. Se realizó un ensayo de microcosmo, donde se utilizó un fertilizante comercial (Plant Food). Los valores obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 46.

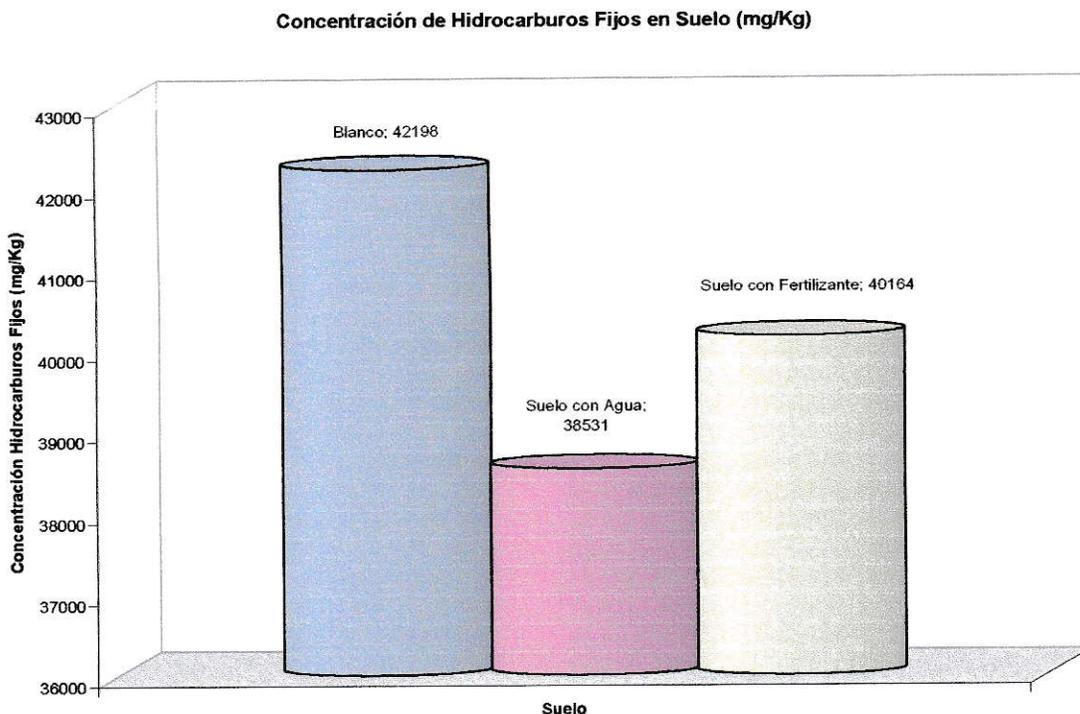


Figura 46: Concentración de Hidrocarburos fijos en suelos tratados con fertilizante y agua. Ensayo que duro 40 días.

Estos resultados indican que en este tipo de suelo, el proceso de lavado y la constante aireación del suelo, es un buen parámetro eficiente de degradación de hidrocarburos fijos. Se puede ver en este caso, que el proceso de reducción de hidrocarburos en el ensayo con fertilizantes fue más lenta comparado con la muestra tratada con agua. Lo cual significaría que bajo las condiciones in situ no haya limitaciones de nutrientes para el crecimiento bacteriano y por lo tanto el factor limitante es principalmente la aireación del suelo.

IV. DISCUSIONES

Las características fisicoquímicas de los suelos en estudio (contaminado y control), no presentan grandes diferencias entre si. Sin embargo, el contenido de hidrocarburos en el suelo contaminado es más alto. Asimismo, el pH del suelo contaminado es más bajo probablemente por la generación de ácidos orgánicos y la cantidad de materia orgánica, la cual es más alta en este suelo.

Al realizar los análisis de hidrocarburos en el suelo contaminado y el limpio, tampoco se pudo ver grandes diferencias entre los suelos, las concentraciones de hidrocarburos volátiles y provenientes de diesel y gasolina son consideradas concentraciones bajas (C.C.M.E. 2001). La gran diferencia que se presentó en ambos suelos, fue en la concentración de hidrocarburos fijos, hidrocarburos de mayor masa molar. Donde la concentración en el suelo contaminado, excede de sobre manera (42.198 mg/Kg), los límites permitidos por normas Canadienses (3.000 mg/kg,) (C.C.M.E. 2001), para este tipo de hidrocarburo, textura y uso del suelo. Por este motivo el único parámetro que se siguió monitoreando por el resto del estudio, fue la concentración de hidrocarburos fijos.

Rara vez, la contaminación por hidrocarburos se produce en el momento, por ejemplo un conducto en un tanque de almacenamiento de gasolina, pueden dejar escapar durante muchos años y contaminar el suelo circundante y, por tanto, la microflora indígena puede degradar, desarrollar y adaptarse a la utilización de los contaminantes como carbono y fuente de energía. Por esta razón, la microflora natural a menudo se utiliza para la degradación de minerales e hidrocarburos de petróleo (Watanabe, 2001). Es por esto que la idea de incrementar el desarrollo y crecimiento de microorganismos autóctonos en el suelo es la técnica que se realizó en este estudio.

Los resultados obtenidos indican que los suelos en estudios contienen una microbiota nativa capaz de biodegradar los hidrocarburos contaminantes, como es el caso de las especies *Comamonas sp*, *Sphingobacterium sp* y *Pseudomonas sp*, encontrados

sigue las secuencias de DNA. Con respecto a esta última especie (organismo más predominante), aumenta transitoriamente en la primera fase de biorremediación (Kaplan y Kitts, 2004)., lo que en algún momento puede llegar a ser una desventaja, ya que los antecedentes que se tienen de la pseudomonas indican que degradan los contaminantes que se encuentran más biodisponibles (Heiss-Blanquet et al., 2005), pero no los hidrocarburos que se presentan más arraigados. Por otro lado los ensayos de laboratorios a nivel de microcosmos como en cultivo, indican que los microorganismos son capaces de utilizar los compuestos orgánicos presentes en los aceites usados como única fuente de carbono y energía. Sin embargo; hay que considerar, que una sola bacteria normalmente tiene un solo rango pequeño de degradación "relativa", y por tanto, una sola especie no logra degradar toda las fracciones de hidrocarburos de aceite (Mishra y col., 2001).

Dada la presencia de estos microorganismos degradadores en la microbiota nativa, su actividad puede ser estimulada por condiciones ambientales favorables para la biodegradación tales como oxigenación, una relación de nutrientes adecuadas y humedad. Los ensayos de microcosmos mostraron que la aplicación de una solución estimuladora que contiene macronutrientes como fósforo y nitrógeno, vitaminas y elementos trazas favorecen la degradación de los contaminantes

En el periodo que se realizó el estudio, se observó una degradación graduada de hidrocarburos. Los factores que pudieron haber afectado en la degradación más lenta de los hidrocarburos pueden ser variados, dentro de los cuales se pueden mencionar:

- La alta concentración de hidrocarburos presentes al inicio del estudio.
- Poca o lenta aclimatación de los microorganismos al contaminante.
- El número de microorganismos no fue el más adecuado para la biodegradación.
- Limitaciones de nutrientes tales como N, P, K, S o elementos traza, necesarios para el crecimiento bacteriano..
- Las condiciones de humedad no fueron las favorables (por exceso o falta).
- Limitaciones de oxígeno que afectan la respiración aeróbica de los microorganismos degradadores.

- Otro factor importante que controlar, que depende directamente es la temperatura, pero que para efectos de esta memoria se considero constante, por no existir grandes variaciones, que ejerce una marcada influencia en la biodegradación de hidrocarburos, por su efecto en la naturaleza física y composición química del mismo, en la velocidad de degradación del hidrocarburo por los microorganismos y sobre la composición de la comunidad microbiana (Atlas R. y Bartha R.. 2002). Según Makred, la temperatura máxima para potenciar el crecimiento de los aislados bacterianos y la degradación óptima del crudo del petróleo, seria los 37°C (Mukred A. y col. 2008).

Comparando los tiempos de vida media del proceso biológico se puede observar que el sistema tratado con una solución estimuladora mostró una mejor remoción del contaminante que el suelo tratado solo con agua.

La curva de crecimiento bacteriano en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono, mostró que el crecimiento tiene 3 fases en el primer tiempo se observa una ecuación de primer orden de forma lineal, y en el segundo tiempo una segunda curva de forma parabólica, parecido al de la autocatálisis, que revela el crecimiento exponencial de los microorganismos y en un tercer periodo de tiempo el crecimiento se reduce, se vuelve constante y corresponde el período de crecimiento estacionario. Por lo que se puede ver que, los microorganismos del suelo, tienen un desgaste a una concentración determinada, y que hace cada vez, es más difícil degradar los hidrocarburos.

Aunque la biodescontaminación es en principio una técnica prometedora, deben conocerse y tenerse en cuenta sus limitaciones y los criterios para el uso adecuado de dicho proceso. Entre las limitaciones, se encuentra el grado final de descontaminación alcanzable, el tiempo requerido para alcanzarlo, la posibilidad de que se generen productos intermedios tóxicos, etc. Su éxito, depende principalmente de las condiciones ambientales predominantes, en la estructura química de los contaminantes, sobre la biodisponibilidad de los compuestos contaminantes, y por lo tanto, en la interacción entre el contaminante, la matriz del suelo y microorganismos (Del'Arco & de Franc, a, 2001; Volkering y col, 1998).

V. CONCLUSIONES

- El diseño experimental, para degradar HTPs, es adecuado para el tratamiento de este tipo de contaminación.
- Las bacterias autóctonas aisladas desde el suelo contaminado, tienen capacidad para biodegradar los hidrocarburos presentes en la mezcla de aceites usados.
- Los experimentos realizados para reducir la concentración de hidrocarburos y aceites usados, si bien han sido más lentos que los resultados esperados, son los deseados.
- El modelo cinético creado, nos permitió estimar la velocidad de degradación de los hidrocarburos en un tiempo (t) deseado. Donde se demuestra que al adicionar los nutrientes esenciales para el óptimo desarrollo de microorganismos al suelo contaminado, la velocidad de degradación de los Hidrocarburos aumenta.

VI. RECOMENDACIONES

Finalmente, este estudio muestra la factibilidad de aplicar en este terreno un sistema de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aprovechando la actividad de las bacterias autóctonas del suelo. Considerando los resultados obtenidos y la factibilidad tanto en el estudio como económica, puede considerarse a la biorremediación como una estrategia adecuada para la eliminación de hidrocarburos provenientes de aceites usados de motor en este tipos de suelo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M. 1994. Biodegradation and bioremediation. 1ª ed. Academic Press, San Diego. 302.
- Arroyo M., Mª Esther Quesada, R. Quesada, Juan Manuel. 2001. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos, GEOCISA. División de protección ambiental de suelos. 297-299.
- ASTDR, 1998. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Toxicológica de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH). Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, E.E.U.U. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts123.html
- Atlas R. y Bartha R.. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Editorial Eddison Wesley, 4ª ed. 677.
- Aycachi R. 2008. Biodegradación de petróleo diesel. Facultad de ciencias biológicas. Departamento de microbiología y parasitología. Universidad nacional Pedro Ruiz Gallos. Lambacheque 13.
- Bedair, H & Al-Saad. 1992. Dissolved and Particulate Adsorbed Hydrocarbons in Water of Shatt Al-Arab River, Iraq. Publicación: Water, Air, Soil Pollution. Editor: Springer Netherlands. Volumen 61. Numero 3-4: 397-408.
- C.C.M.E. (Canadian Council of Ministers of the Environment) 2008. Canada-Wide Standard for Petroleum Hydrocarbons (PHC) in Soil: Scientific Rationale. PN 1399 ISBN 978-1-896997-77-3-PDF. XVI, 2-7.
- C.C.M.E. Endorsed by CCME Council of Ministers, 2001. Canada-Wide Standard for petroleum hydrocarbons (PHC) in soil. Winnipeg. 6
- Del'Arco, J. & de Francia, F. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. Environ Pollut 110, 515-519.
- Douglas A. Skoog, D. West, Donald M., James F., Stanley R. Crouch. 2008. Fundamentals of Analytical Chemistry. Editorial Reverté (ISBN). Volumen IV.
- Ercoli E., Gálvez J., Di Paola M., Cantero J., Videla S., Medaura M., Bauza J. 2001. Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de HC en suelos. Laboratorio de Bioproceso, Facultad de Ingeniería, Univ. Nacional. de Cuyo. <http://www.eduardoercoli.com.ar/publicaciones.htm> . 3.
- Fernández P., Grifoll M., Solanas A., Bayona J.M. y Albaigés J. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Sci. Technol. 26. 817-829.

Flores D., Zegarra H., Arce J.M., Fernández L., Ramirez M., Rojas N., Uribe R., Reyes R., Roldán T. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelo aplicados a la remediación de sitios. Volumen I. Instituto Nacional de ecología. 92.

Geofun. 2006. Informe de mecánica de suelo Geofun. Contacto personal <http://geofun.cl/servicios.htm> .5

George E Brown Jr.2006 Salinity Laboratory, Riverside California. <http://www.sciencecentral.com/>

Heiss-Blanquet S., Benoit Y., Marechaux C. y Monot F. 2005. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J Appl Microbiol* 99, 1392–1403.

Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4^{ta} ed. Wiley Interscience Publication. New York. 342-480.

Kaplan C. y Kitts C. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol* 70,1777–1786.

Martin C., González A .y Blanco M. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev. Iberoam.* <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/issue3sp.shtml>. 3-4, 11-13, 113

Mishra S., Jyot J., Kuhad R. & Lal B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oilysludge- contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 67, 1675–1681.

Mukred A.,Hamid A., Hamzah A. y Yusoff W.2008. Growth Enhancement of Effective Microorganisms for Bioremediation of Crude oil Contaminated Waters. *Asian Network For Scientific Information, Pakistan.* 1709

Ortínez O., Ize I. y Gavilán A. PROFEPA. 1999. Restauración de Suelos Contaminados. México. <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/gacetitas/422/restauracion.html>

Plaza G., Ulfig K. y Brigmon R. 2003. Relationship between soil microbial diversity and bioremediation process at an oil refinery. *Acta Microbiol Pol* 52, 173–182.

Saval B. 1995. Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM. <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/gacetitas/422/restauracion.html>

Sadzawka A., Grez R., Mora M.L., Saavedra N., Carrasco M. y Rojas C. 2000. Métodos de análisis recomendados para lo suelos Chilenos. Serie Actas Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 9-11, 26-30).

SERMANAT, 2003. Norma oficial mexicana NOM-138-SERMANAT/SS-2003. Límites Permisibles de Hidrocarburos en Suelos as Especificaciones para su Caracterización y Remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 4-5.

Semple, K., Reid B. & Fervor T. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112 (2): 269-283.

Speight J. 1991. *The chemistry and technology of petroleum*. Segunda Edición. Marcel Dekker New York. U.S.A.

Tyagi R. 1991. Biological Treatment of petroleum Refinery Wastewater. In: *Biological degradation of wastes*. Martin A.M. Elsevier Applied Science, London. 323-430.

Vanek S.. 2008. *Materiales sobre macronutrientes en cultivos y el suelo para la Comunidad de Práctica Andina del McKnight CCRP*. Universidad Cornell. <http://www.cornell.edu/> . 10.

Volkering, F., Breure, A. & Rulkens, W. (1998). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401–417.

Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 12, 237–241.

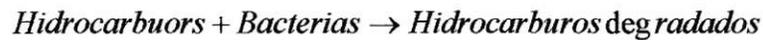
Weisstein E., 2008. "Logistic Equation". From MathWorld-A Wolfram Web Resource. <http://www.nationmaster.com/encyclopedia/Logistic-function>

VIII. ANEXO

1.- Cinética

1.1.- Ecuación de Velocidad

Considérese una reacción química en la que dos reactivos (hidrocarburos y bacterias), dan un producto (P).



Donde a, b y c son los coeficientes estequiométricos y HC, B, P las especies químicas.

Durante el transcurso de las reacciones, la concentración de hidrocarburos inicial decrece mientras la concentración de productos aumenta. En la figura A1 se muestra la gráfica típica de concentración v/s tiempo para un reactante.

La curva de velocidad de una reacción de primer orden, donde se indica que a tiempos iguales se produce una disminución relativa de concentraciones, es la siguiente:

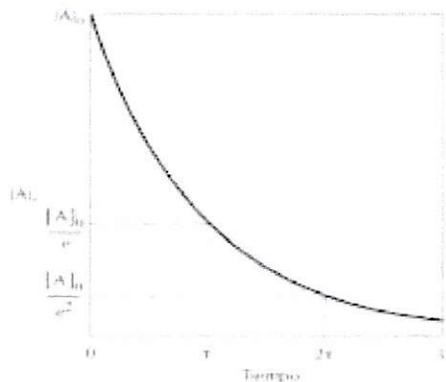


Figura A1: Curva de velocidad de una reacción de primer orden, (Douglas , y col.1977).

Donde la velocidad de reacción se define como la variación de la concentración de un reactivo o producto por unidad de tiempo. Y viene dado por la pendiente de la curva en dicho tiempo.

$$v = -\frac{d[HC]_0}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad \text{ec.3}$$

La forma de hallar experimentalmente la velocidad de reacción es:

$$v = K[\text{reactivo}]^n \quad \text{velocidad de reacción} = \text{constante} * [\text{concentración de reactivos}]^n$$

Donde:

- La constante de proporcionalidad K , denominada constante cinética de velocidad o coeficiente de velocidad, depende de la temperatura y de la presión. Y puesto que v tiene unidades de concentración dividida por tiempo, las unidades de k es t^{-1} .
- El valor del exponente n es el orden de la reacción.

Existen variados tipos de reacciones, las que dependen del valor o número del exponente, de la velocidad de reacción. Un tipo de este tipo de reacción es la de primer orden:

1.2.- Reacción pseudo primer orden.

Ahora bien si se supone que la reacción (ec 2) es de pseudo primer orden. Donde $n = 1$, donde la velocidad es proporcional a la reacción de un solo reactivo y por tanto, tenemos que la ecuación cinética es:

$$v = -\frac{d[HC]_0}{dt} = k[HC]_0 \quad \text{ec.4}$$

$$v = K[HC] \quad \text{ec.5}$$

Y si se, considera trazas de HC, o exceso de B

$$[B] \gg [HC]_0$$

$$v = k[B]^a [HC]_0^b \quad \text{ec.6}$$

Y reemplazando $K' = k [B]^a$

$$v = k' [HC]_0^b$$

Integrando, se obtiene:

$$v = -\frac{d[HC]}{dt} = k' [HC] \quad \text{ec.7}$$

$$\int_{[HC]_0}^{[HC]} \frac{d[HC]}{[HC]} = -k' \int_0^t dt \quad \text{ec.8}$$

$$\ln \frac{[HC]}{[HC]_0} = -k't \quad \text{ec.9}$$

$$\frac{[HC]}{[HC]_0} = e^{-k't} \quad \text{ec.10}$$

$$[HC] = [HC]_0 e^{-k't} \quad \text{ec.11}$$

Al ser una reacción de primer orden, al graficar $\ln [HC]$ v/s tiempo debe dar una línea recta de pendiente negativa:

$$\ln [HC] - \ln [HC]_0 = -k't \quad \text{ec.12}$$

$$\ln [HC] = -k't + \ln [HC]_0 \quad \text{ec.13}$$

$$y = -mt + n \quad \text{ec.14}$$

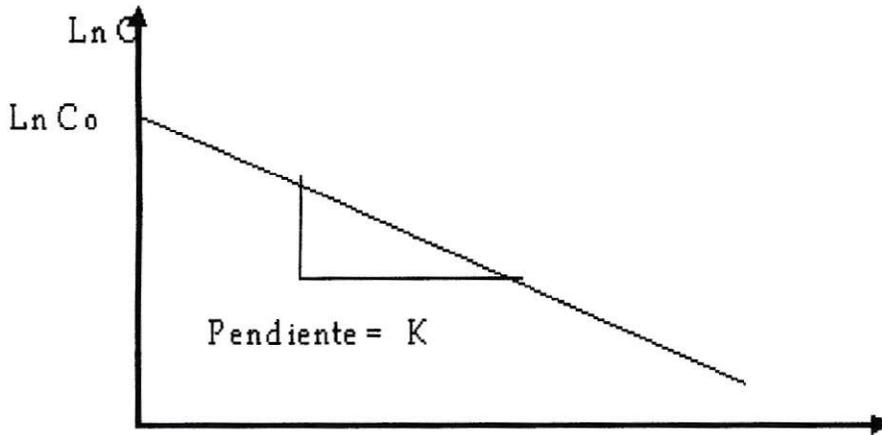


Figura A2: Gráfico de una reacción de primer orden

De este tipo de reacciones se puede obtener información, como es el tiempo de vida media.

1.3.- Tiempo de vida Media ($t_{1/2}$):

Tiempo que debe transcurrir para que la concentración inicial se reduzca a la mitad de su valor.

$$[HC] = \frac{[HC]_0}{2} \quad \text{ec. 15}$$

Y reemplazando en:

$$\ln \frac{[HC]}{[HC]_0} = -k't \quad \text{ec. 16}$$

$$\ln \frac{[HC]_0/2}{[HC]_0} = -k't \quad \text{ec. 17}$$

$$\ln \left(\frac{1}{2} \right) = -k't_{1/2} \quad \text{ec. 18}$$

$$\ln 1 - \ln 2 = -k't_{1/2} \quad \text{ec. 10}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k'} \quad \text{ec.20}$$

En el caso de que el supuesto de que la degradación de los hidrocarburos no es de primer orden, cabe presumir que podría llegar a ser de segundo orden, donde $n = 2$, la velocidad es proporcional al producto de las concentraciones de dos reactivos o al cuadrado de la concentración de uno solo. Donde la velocidad de reacción queda expresada como:

$$v = k[A]*[B] = k[A]^2 \quad \text{ec.21}$$

Integrando:

$$\frac{1}{[HC]} = \frac{1}{[HC]_0} + kt \quad \text{ec.22}$$

La importancia de determinar el orden de una reacción química radica en que a partir de ese parámetro puede obtenerse información sobre el mecanismo molecular en que opera.

Hay que destacar que también existe la posibilidad en una reacción, de combinar ambos tipos de reacciones, en este tipo de sucesos se puede encontrar las llamadas reacciones logísticas, las que se ocupan en gran medida en la microbiología, en las que se puede suponer la tasa intrínseca de crecimiento o velocidad específica de crecimiento o velocidad de crecimiento por unidad de tiempo por individuo, este modelo se le conoce como crecimiento poblacional.

1.4.- Modelado de crecimiento de la población

Existe un modelo de crecimiento de poblaciones, creado por Pierre-François Verhulst (1804-1849) en 1938, que describe la tasa de reproducción de una población, que es proporcional a:

- La población existe en el medio.
- La cantidad de los recursos disponibles

El segundo punto del modelo, de la competencia por los recursos disponibles, es el que tiende a limitar el crecimiento de la población.

De la siguiente ecuación, el término (P) representa el tamaño de la población y t representa el tiempo, modelo que queda expresado por medio de la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dP}{dt} = rP \left(1 - \frac{P}{K} \right) \quad \text{ec.23}$$

$$\frac{dP}{dt} = rP - \frac{rP^2}{K} \quad \text{ec.24}$$

Donde; r es una constante que define la tasa de crecimiento de la población y k es la capacidad de carga.

La Interpretación de la ecuación es; en el primer momento la tasa de crecimiento es sin inconvenientes, en un tiempo (+rP). El valor de la tasa r representa el aumento proporcional de la población (P) en una unidad de tiempo. A medida que el tiempo avanza y que la población crece, el segundo término, que multiplicado por $-rP^2/K$, se hace más grande que el primero, ya que algunos miembros de la población (P) interfieren entre sí, por lo que preexiste competencia de algunos recursos críticos, tales como la alimentación o espacio. Este efecto discrepante se llama "cuello de botella". En un tercer periodo la competencia disminuye y la combinación de la tasa de crecimiento, hasta el valor (P) deja de crecer, en estos momentos se dice que se alcanza la madurez de la población.

Si se divide la ec. 24, a ambos lados de esta por K (Weisstein, 2008).

$$\frac{d}{dt} \frac{P}{K} = r \frac{P}{K} \left(1 - \frac{P}{K} \right) \quad \text{ec.25}$$

Y reemplazando P/K por x, $x = P/K$ nos da la siguiente ecuación diferencial.

$$\frac{dx}{dt} = rx(1 - x) \quad \text{ec.26}$$

Cuando $r = 1$ se tiene el caso particular de la ec., del inicio.

En ecología las especies se denominan a veces r-estratega o k-estratega dependiendo de la selectiva de los procesos que han modelado la historia de vida de sus estrategias. La solución de la ecuación al integrar (P_0 la población inicial) es:

$$P(t) = \frac{K P_0 e^{rt}}{K + P_0 (e^{rt} - 1)}$$

Donde:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} P(t) = K.$$

Es decir que, K es el valor límite de P ; el valor más alto que la población puede llegar en un tiempo infinito. Es importante destacar que la capacidad de carga es asintótica cuando el valor inicial $P_0 > 0$ y en el caso de que $P(0) > K$.