

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a escala de laboratorio

Andrea Belén Aldás Vargas

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D, Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, febrero de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a escala de laboratorio

Andrea Belén Aldás Vargas

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D
Directora del proyecto y
Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D
Coordinadora de carrera y
Miembro del Comité de Tesis

Dr.-Ing. Ródney Peñafiel
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, febrero de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Andrea Belén Aldás Vargas

C. I.: 1803017423

Fecha: Quito, febrero de 2014

Dedicatoria

A mis padres y abuelita, quienes son mi sustento y han sido mi guía durante todo este camino, gracias por su amor incondicional. También a mis amigos, con quienes he compartido varios años de mi vida y han sabido apoyarme cuando más lo necesité.

Agradecimientos

A Valeria Ochoa, la directora de este proyecto, por estar siempre dispuesta a ayudarme y compartir conmigo su tiempo y sus conocimientos.

A María de Lourdes Torres y Ródney Peñafiel, miembros del comité de tesis, por su colaboración y valiosos aportes.

A la empresa CORENA S.A y especialmente a Santiago González por haber colaborado con las muestras de suelo que se utilizaron en este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental y a todos quienes lo conforman, por abrirme sus puertas y haberme brindado su amistad sincera.

Al Laboratorio de Microbiología y a todos sus miembros, por toda la ayuda recibida.

A mi familia y amigos por siempre ofrecerme palabras de aliento en los momentos difíciles.

RESUMEN

La actividad petrolera es uno de los principales motores económicos del Ecuador. Sin embargo, los procesos de exploración, explotación, transporte, almacenamiento y comercialización del hidrocarburo representan un riesgo inminente de contaminación tanto para el ambiente como para los seres vivos. Por eso, la prevención, control y remediación de la contaminación por hidrocarburos juega un rol fundamental en el desarrollo sustentable de esta industria en el país. El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a escala de laboratorio. En un principio, seis muestras de suelo contaminado con distintas concentraciones de hidrocarburo (AC, MCR, MC, BC y T) fueron caracterizadas físico-química y microbiológicamente. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de toxicidad microbiana y finalmente de degradación. Los parámetros físico-químicos evaluados fueron: concentración de amonio, color, conductividad, concentración de cloruro, demanda química de oxígeno (DQO), densidad aparente, granulometría, gravedad específica, concentración de fluoruro, humedad gravimétrica, materia orgánica, pH, porosidad, concentración de sulfato, concentración de sulfuro e hidrocarburos totales de petróleo (TPHs). Adicionalmente, conteos de población total microbiana y de consorcios degradadores de hidrocarburos fueron realizados para cada muestra de suelo contaminado. De todos los parámetros físico-químicos evaluados, la concentración de cloruro demostró estar directamente relacionada con la concentración de TPHs presentes en el suelo. En el ensayo de toxicidad microbiana se evaluó el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de gasolina en el crecimiento microbiano de la muestra testigo en bioensayos batch. La gasolina demostró ser tóxica para los microorganismos en el rango de concentración evaluado, de modo que la concentración de gasolina que produjo un 20% de reducción en la población microbiana (IC_{20}) fue 0.24% (v/v), mientras que cuando la concentración fue de 5 y 10% (v/v), la inhibición fue total. Los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs bajo condiciones aerobias fueron monitoreados durante 110 días. La humedad fue controlada semanalmente mediante la adición de un medio nutritivo líquido, mientras que varios parámetros como concentración de amonio, cloruro, conductividad, DQO, humedad, materia orgánica, pH, concentración de TPHs y población microbiana fueron monitoreados periódicamente durante todo el bioensayo. En términos generales se puede concluir que la concentración de TPHs se redujo con el tiempo de incubación en un 50% para AC, 19% para MCR, 54.8% para MC y 56% para MAC. Conjuntamente, los conteos de microorganismos degradadores ($UFC\ g^{-1}$ suelo) aumentaron en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs y las propiedades del suelo mejoraron con el tiempo de incubación. El presente estudio demuestra que los hidrocarburos fueron efectivamente degradados por microorganismos aerobios bajo las condiciones evaluadas. La importancia de este proyecto radica en que permite modelar un mecanismo de biorremediación a escala de laboratorio para su posterior aplicación en el campo, desarrollando de esta manera una tecnología de remediación ambiental con un potencial de contribuir al cuidado del ambiente y de la gran biodiversidad presente en Ecuador.

ABSTRACT

The oil industry is one of the main economic engines of Ecuador. However, the processes of exploration, extraction, transportation, storage and marketing of hydrocarbons represent an imminent risk of contamination to both the environment and the living beings. Prevention, control and remediation of hydrocarbon pollution have a fundamental role in the sustainable development of this industry in the country. The objective of this research was to evaluate the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons at laboratory scale. At first, six samples of soil contaminated with different concentrations of hydrocarbon (AC, MCR, MC, BC and T) were physico-chemically and microbiologically characterized. Then microbial toxicity tests and biodegradation essays took place. The physicochemical parameters evaluated were: ammonium concentration, color, conductivity, chloride concentration, chemical oxygen demand (COD), bulk density, particle size, specific gravity, fluoride concentration, moisture, organic matter, pH, porosity, sulfate concentration, sulfide concentration and total petroleum hydrocarbons (TPH). Additionally, total microbial population and hydrocarbon degrading consortia were evaluated for each sample of contaminated soil. Of all the physicochemical parameters evaluated, the chloride concentration proved to be directly related to the concentration of TPHs in soil. The microbial toxicity essay evaluated the inhibitory effect of different gasoline concentrations in microbial growth on the free TPHs sample in batch bioassays. Gasoline proved to be toxic to the microorganisms in the concentration range evaluated, so the gas concentration that produced a 20 % reduction in the microbial population (IC_{20}) was 0.24 % (v/v), while when the gas concentration was 5 and 10% (v/v) the inhibition was complete. TPH degradation bioreactors of contaminated soil under aerobic conditions were monitored for 110 days. Moisture was weekly controlled by adding a liquid nutritional medium, while several parameters as ammonium concentration, chloride concentration, conductivity, COD, moisture, organic matter, pH, TPHs concentration and microbial populations were monitored periodically throughout the bioassay. In general it can be concluded that the TPHs concentration was reduced with incubation time by 50% for BC, 19% for MCR, 54.8 % for MC and 56 % for MAC. At the same time, degrading bacteria counts ($CFU\ g^{-1}$ soil) increased on the TPH degradation bioreactors and soil properties improved with the incubation period. The present study demonstrates that aerobic microorganisms under the conditions evaluated effectively degraded hydrocarbons. The importance of this project is that allows to model a mechanism of a laboratory scale bioremediation for further application in the field, thus developing a remediation technology with high potential to contribute the environmental and high biodiversity protection in Ecuador.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	14
1.1 El petróleo	14
1.1.1 Información general.....	14
1.1.2 El petróleo como agente contaminante	15
1.2 Industria Petrolera en el Ecuador.....	17
1.2.1 Datos históricos	17
1.2.2 Actualidad en el ámbito petrolero	18
1.2.3 Daños ambientales	21
1.3 El Suelo	23
1.3.1 Características generales	23
1.3.2 Características microbiológicas.....	24
1.4 Biorremediación	25
2. Objetivo General	28
3. Objetivos Específicos.....	28
4. Área de Trabajo	29
5. Justificación.....	29
6. Materiales	31
6.1 Muestras de suelo contaminado	31
6.2 Técnicas analíticas	31
6.2.1 Equipos comunes.....	31
6.2.2 Medición de amonio	32
6.2.3 Color	32
6.2.4 Medición de cloruro.....	32
6.2.5 Medición de conductividad	32
6.2.6 Demanda química de oxígeno (DQO)	32
6.2.7 Densidad aparente, gravedad específica y porosidad	33
6.2.8 Medición de fluoruro	33
6.2.9 Grado textural.....	33
6.2.10 Humedad gravimétrica	33
6.2.11 Materia orgánica	33
6.2.12 Medición de pH	33
6.2.13 Medición de sulfato	34
6.2.14 Medición de sulfuro	34
6.3 Técnicas microbiológicas.....	34

6.3.1	Medio líquido basal mineral (BSM)	34
6.3.2	Medio Luria Bertani (LB)	35
6.3.3	Medio sólido basal mineral con gasolina	35
6.3.4	Medio sólido basal mineral con petróleo	35
6.3.5	Conteo de unidades formadoras de colonia totales (UFC totales)	35
6.3.6	Conteo de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras) ..	35
6.3.7	Valoración de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)	36
6.4	Ensayo de toxicidad microbiana	36
6.5	Bioensayos de degradación.....	37
6.5.1	Bioreactores.....	37
6.5.2	Medio nutritivo	37
7.	Métodos.....	37
7.1	Muestras de suelo contaminado	37
7.2	Métodos analíticos	38
7.2.1	Medición de amonio	38
7.2.2	Color	38
7.2.3	Medición de cloruro.....	39
7.2.4	Medición de conductividad	39
7.2.5	Demanda química de oxígeno (DQO)	40
7.2.6	Densidad aparente, gravedad específica y porosidad	41
7.2.7	Medición de fluoruro	42
7.2.8	Grado textural.....	42
7.2.9	Humedad gravimétrica.....	43
7.2.10	Materia orgánica	43
7.2.11	Medición de pH	44
7.2.12	Medición de sulfato	44
7.2.13	Medición de sulfuro	45
7.2.14	Medición de TPHs	45
7.3	Métodos microbiológicos	46
7.3.1	Medio basal mineral (BSM).....	46
7.3.4	Medio sólido basal mineral con petróleo	47
7.3.5	Conteo de unidades formadoras de colonia totales (UFC totales)	47
7.3.6	Conteo de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras) ..	47
7.3.7	Valoración de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)	48
7.4	Ensayos de toxicidad microbiana.....	48
7.5	Bioensayos de degradación.....	49
7.5.1	Medio nutritivo	49

7.5.2 Biorreactores	50
8. Resultados.....	51
8.1 Caracterización físico-química y microbiológica de muestras de suelo contaminado con TPHs	51
8.2 Ensayos de toxicidad microbiana.....	55
8.3 Bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburo	56
9. Discusión.....	63
9.1 Caracterización físico-química y microbiológica de muestras de suelo contaminado	63
9.2 Ensayos de toxicidad	69
9.3 Bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburos.....	72
10. Conclusiones	81
11. Recomendaciones.....	82
12. Bibliografía	83
13. Tablas.....	88
14. Figuras	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos en función del lugar de recolección de las muestras y al proyecto de la empresa CORENA S.A al cual pertenece.....	88
Tabla 2. Caracterización físico-química de las muestras de suelo contaminado con TPHs expresadas por base seca en función de la concentración de amonio, color, concentración de cloruro, conductividad, densidad, DQO y la concentración de fluoruro (parte I).....	90
Tabla 3. Caracterización físico-química de las muestras de suelo contaminado con TPHs en base seca en función de la gravedad específica, porcentaje de humedad, porcentaje de materia orgánica, pH, porcentaje de porosidad, concentración de sulfato, concentración de sulfuro y concentración de TPHs (parte II).....	91
Tabla 4. Caracterización inicial de las muestras de suelo contaminado con TPHs en función del análisis granulométrico.....	92
Tabla 5. Caracterización microbiológica de las muestras de suelo contaminado con TPHs ...	93
Tabla 6. Concentración de TPHs reportado en base seca en las muestras de suelo contaminado al inicio y al final de los bioensayos de degradación.....	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ensayo de toxicidad microbiana que muestra el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de gasolina en el crecimiento microbiano de la muestra testigo (T) luego de 48 horas de incubación a 30°C.	95
Figura 2. Variación de la concentración de amonio en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana.	96
Figura 3. Variación de la conductividad en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana.	97
Figura 4. Variación de la concentración de cloruro en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana.	98
Figura 5. Variación de la demanda química de oxígeno en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana.	99
Figura 6. Variación del porcentaje de humedad en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana.	100

- Figura 7.** Variación del porcentaje de materia orgánica en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. 101
- Figura 8.** Variación del pH en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. 102
- Figura 9.** Variación de las unidades formadoras de colonia (UFC) totales luego de 48 horas de incubación a 37°C. Monitoreo durante el ensayo de degradación llevado a cabo por 15 semanas a 30°C en biorreactores aireados una vez a la semana. 103
- Figura 10.** Variación de las unidades formadoras de colonia (UFC) degradadoras luego de 48 horas de incubación a 37°C. Monitoreo durante el ensayo de degradación llevado a cabo por 15 semanas a 30°C en biorreactores aireados una vez a la semana. 104

1. Introducción

1.1 El petróleo

1.1.1 Información general

El petróleo es una mezcla compleja y heterogénea de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos que tienen entre uno y sesenta átomos de carbono (US EPA, 2011). Este compuesto también contiene elementos como el oxígeno, nitrógeno y azufre en proporciones cambiantes de acuerdo al lugar en el que se localiza (Feininger, 1975). Se estima que el crudo promedio contiene 84% de carbono, 14% de hidrógeno, 1 - 3% sulfuro, 1% nitrógeno, 1% oxígeno y 0.1% sales y minerales (American Petroleum Institute, 2003). El petróleo se puede clasificar en base a su densidad, la cual se mide en una escala desarrollada por el American Petroleum Institute (API) conocida como grados API (American Petroleum Institute, 2003). Si el crudo tiene una densidad de 10 a 22° API aproximadamente, debido a la presencia de hidrocarburos de gran peso molecular como las ceras, se le considera pesado, por lo que es poco soluble en agua y carece de movilidad tanto en agua como en suelo (US EPA, 2011). Por otro lado, si la densidad del crudo está entre 30 y 40° API, puesto que contiene hidrocarburos de bajo peso molecular, se le denomina crudo liviano, y se caracteriza por ser más soluble en agua y tener mayor movilidad que el crudo pesado (US EPA, 2011).

El origen del petróleo aún es incierto, sin embargo, se han formulado tres teorías acerca de la formación del oro negro, las cuales cuentan con sustento científico. La primera es la teoría inorgánica, en la que se plantea que el carbono e hidrógeno se encontraron a altas temperaturas y presiones en medio del globo terrestre, formando así no sólo el petróleo sino también el gas natural (Trujillo, 2010). La segunda teoría denominada orgánica, sostiene que

el petróleo surgió como consecuencia de desechos naturales que se acumularon y descompusieron durante millones de años, siendo arrastrados por ríos y mares dando lugar a las rocas sedimentarias y al petróleo (Trujillo, 2010). La tercera teoría propone que los cambios geológicos provocaron cambios en la corteza terrestre permitiendo que diversos materiales unidos a las rocas formen franjas orgánicas que con el tiempo se convirtieron en el oro negro (Trujillo, 2010). La teoría de origen orgánico es actualmente la más aceptada.

1.1.2 El petróleo como agente contaminante

La compleja composición química típica del petróleo, se caracteriza por ser persistente y por su capacidad para bioacumularse. La persistencia es una característica relacionada a la viscosidad, la adherencia y la capacidad de este compuesto para ser evaporado (Nomack, 2010). Por lo tanto, los hidrocarburos grandes y viscosos comúnmente son los más difíciles de degradarse por su hidrofobicidad y poca biodisponibilidad (Balba, Al-Awadhi, & Al-Daher, 1998). La persistencia de este compuesto se ha reportado ampliamente en derrames que han sucedido alrededor del mundo. Estudios realizados por Reddy y sus colaboradores (2002), reportan que luego de 30 años de sucedido un derrame en un ecosistema acuático en West Falmouth Harbor, Florida, aún se encontraron residuos de crudo en concentraciones similares a las reportadas en 1969. Cabe indicar que el crudo puede volatilizarse o ser foto-oxidado, pero su rango de hidrólisis es bastante bajo porque los hidrocarburos que lo conforman no cuentan con grupos funcionales que puedan ser degradados bajo condiciones ambientales (US EPA, 2011). Los derrames de crudo tienen grandes impactos ambientales en todos los ecosistemas. Por ejemplo, cuando los cuerpos de agua dulce se contaminan, no solo los organismos acuáticos se afectan, sino también aves, e incluso las plantas cercanas, alterando

de esta manera el equilibrio ecológico de todo el lugar. Estos efectos normalmente empeoran cuando los cuerpos de agua no fluyen como en el caso de los lagos. Se debe tener en cuenta que el agua dulce es también necesaria para la supervivencia humana, por lo que su contaminación es bastante grave. Con respecto a los derrames en ecosistemas marinos, los efectos reportados son innumerables, ya que si bien es cierto hay animales como los peces que pueden escapar de los derrames, en el fondo marino toda forma de vida se ve afectada al poco tiempo por las complejas relaciones que existen entre especies animales, vegetales y su ecosistema (Nomack, 2010). El suelo, al igual que los ecosistemas antes mencionados, se ve bastante alterado por la presencia de hidrocarburos ya que toda forma de vida se ve afectada, además de que las matrices sólidas absorben el contaminante y ocasionan mayor persistencia (Chaineau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003). Estudios realizados demuestran que el petróleo es tóxico tanto para mamíferos como para aves y organismos acuáticos. El contacto físico del hidrocarburo con la lana de mamíferos o las plumas de las aves, hace que estas pierdan sus funciones protectoras y por ende los animales quedan expuestos al contaminante y sus efectos tóxicos. En el caso de las aves, estos efectos son bastante fuertes, ya que sin plumas no pueden flotar y mucho menos volar. En general, una gran cantidad de animales son susceptibles a los efectos tóxicos del crudo, por lo que la inhalación o ingestión de éste, afecta el sistema nervioso central, el hígado, el sistema digestivo, el sistema reproductivo y los pulmones de estos seres vivos (Nomack, 2010). Adicionalmente pueden morir por inanición debido a que sus fuentes de comida son destruidas. Por todo lo mencionado, la intervención del ser humano para sanear el ambiente es de alto interés mundial, los problemas de contaminación actuales se pueden solucionar por medio de nuevas tecnologías como la biorremediación.

1.2 Industria Petrolera en el Ecuador

1.2.1 Datos históricos

En el país, existen reservas de petróleo tanto en la región costa como en el oriente. Se cree que el crudo que se encuentra en la Amazonía ecuatoriana, surgió de forma inorgánica a partir de sedimentos de los Andes los cuales se formaron hace aproximadamente 100 millones de años en el período Cretácico (Feininger, 1975). El primer pozo exploratorio en Ecuador conocido como Ancón-1 fue perforado alrededor del año 1911 (EPPETROECUADOR, 2006), lo que ocasionó una intensa búsqueda de pozos petroleros en todo el territorio. En 1921 grandes cantidades de reservas fueron encontradas en el oriente ecuatoriano, y cuatro años después, en 1925 se registró la producción de tres mil barriles diarios de crudo de 32° API. De este modo, surgió la necesidad de refinar el petróleo extraído, por lo que en 1940 nació la refinería La Libertad, ubicada en la provincia de Santa Elena, la misma funciona hasta la actualidad (EPPETROECUADOR, 2010). En el mismo año, en la Amazonía, Shell exploró y perforó cuatro pozos petroleros. Posteriormente, en el año de 1941 se inició la búsqueda de oro negro en la Provincia de Esmeraldas, dando lugar a la creación de la empresa petrolera ecuatoriana La Cautivo que fue de mucha relevancia en la Península (EPPETROECUADOR, 2010). Años más tarde, en 1957, alrededor de tres mil hectáreas fueron entregadas en concesión a la empresa Alberto Puig Arosemena. Empresas extranjeras, como el consorcio Texaco-Gulf iniciaron sus actividades extractivas en la Amazonía en 1964, utilizando alrededor de medio millón de hectáreas otorgadas por el Estado ecuatoriano para la exploración y explotación de petróleo por un período de 40 años (EPPETROECUADOR, 2006). Aproximadamente en 1972, se creó la empresa estatal Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana (CEPE), la cual en 1974 dio lugar al consorcio CEPE-Texaco-Gulf, con un 25%

de acciones pertenecientes a la empresa ecuatoriana, dicha asociación se mantuvo a cargo de la actividades petroleras en el país por un largo período de tiempo (EPPETROECUADOR, 2006). Esta etapa en la historia constituye lo que se conoce como el ‘Boom Petrolero’ por los altos precios que alcanzó el crudo, y por lo tanto los buenos ingresos que produjo esta industria al país. Posteriormente, en 1989, la empresa antes conocida como CEPE da lugar a la formación de Petroecuador (EPPETROECUADOR, 2010), institución nacional que ha estado encargada de las actividades petroleras como extracción, refinación, transporte y comercialización en el territorio ecuatoriano. En el año 2007, se creó una nueva empresa estatal con el nombre de Petroamazonas S.A., con la finalidad de que los campos abandonados por OXY sean administrados. Una vez que esta organización cumplió cinco años desde su creación, las distintas actividades petroleras se dividieron entre las dos empresas pertenecientes al estado. De esta manera, Petroamazonas asumió las actividades de exploración y extracción de crudo, mientras que Petroecuador quedó a cargo de la refinación, transporte y comercialización de hidrocarburos (Araujo, 2012).

1.2.2 Actualidad en el ámbito petrolero

De acuerdo al Informe Anual de Actividades emitido por Petroecuador, se estima que la producción diaria en el 2011 fue mayor a 150 mil de barriles de petróleo, generando una producción total anual superior a 55 millones de barriles (EPPETROECUADOR, 2011). En otro informe, emitido por el Banco Central del Ecuador, referente a la producción petrolera en el mes de enero de 2013, se reportó una extracción promedio de crudo diaria en las empresas públicas de 374 mil barriles, de los cuales el 82.9% corresponde a la producción de Petroamazonas EP y el 17.1% a la Operadora Río Napo. Las compañías privadas por su parte,

produjeron en el mismo mes 130.9 mil barriles de crudo (Banco Central del Ecuador, 2013). En base a estos datos, se puede observar como la producción diaria de crudo es una actividad que va en aumento, la cual genera grandes ingresos al país, tomando en cuenta que la mayoría de petróleo extraído se exporta al mercado asiático.

El crudo que el país exporta es de dos tipos: crudo liviano y pesado. El crudo liviano que se exporta denominado como “Oriente” tiene 26° API, mientras que el crudo pesado conocido como “Napó” cuenta con 19° API (EPPETROECUADOR, 2011). Las exportaciones anuales se incrementaron durante 2011 en relación con lo sucedido años anteriores, alcanzando un monto aproximado de 11 mil millones de dólares por la comercialización de 105.5 millones de barriles de crudo (EPPETROECUADOR, 2011). Por otro lado, en enero de 2013, las exportaciones de crudo alcanzaron un total de 10.5 millones de barriles, de los cuales 6.2 millones corresponde a las exportaciones de crudo Oriente, 3 millones al crudo Napó y 1.4 millones a la Secretaría de Hidrocarburos (Banco Central del Ecuador, 2013). Si se realiza una proyección en base al mes de enero, estimando que el número de barriles exportado se mantenga durante todo el año, se esperaría que la exportación anual para 2013 alcance alrededor de 126 millones de crudo.

Por la alta demanda de crudo que existe a nivel mundial, la necesidad de actividades de exploración y explotación en el país es cada vez mayor. De acuerdo al Informe de Actividades Anuales publicado por Petroecuador, alrededor de 43 nuevos pozos fueron perforados en 2011. El área con mayor producción fue el pozo de Shushufindi en la provincia de Sucumbíos con 22 pozos, seguido por Auca en la provincia de Orellana con 19 y Libertador también perteneciente a Sucumbíos con 2 pozos. En el mismo año, la superintendencia de oleoducto

transportó casi 126 millones de barriles de crudo, sin contar con el transporte de derivados por medio de poliductos y tampoco la operación en terminales y depósitos (EPPETROECUADOR, 2011). Lamentablemente, el transporte es una de las actividades críticas de la industria petrolera, puesto que varios derrames de crudo se han suscitado justamente en esta etapa. En la sección 1.2.3, se detallan los derrames de crudo más importantes.

Ecuador no se dedica únicamente a la extracción de crudo, sino también a la producción de derivados. Actualmente el país cuenta con tres refinerías. Esmeraldas ubicada en la provincia del mismo nombre, La Libertad ubicada en la provincia de Santa Elena y la Refinería Amazonas localizada en la provincia de Sucumbíos. La capacidad de operación de cada refinería varía siendo la de Esmeraldas la más productiva con 110 mil barriles por día, seguida por La Libertad con 45 mil barriles diarios y finalmente refinería Amazonas con 20 mil barriles por día. La producción total de derivados durante 2011 superó los 65 millones de barriles, siendo Esmeraldas la de mayor producción con 42,5 millones de barriles, mientras que La Libertad únicamente produjo 22.3 millones (EPPETROECUADOR, 2011).

En base a los datos presentados, es evidente que la explotación petrolera es una de las actividades económicas más importantes en el país, sin embargo, la sensibilidad de los ecosistemas de los cuales se extrae petróleo, involucra un alto riesgo de contaminación. Desde hace varias décadas, durante los procesos de explotación, en la Amazonía ecuatoriana se han construido alrededor de 400 fosas sin ningún tipo de normativa ambiental, dentro de las cuales se han depositado varios tipos de desechos tales como: crudo, lodos, ripio de perforación y desechos sólidos como plásticos y metales (Romero, 2010). Tomando en cuenta que muchos

componentes del petróleo son tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Liu , Luo, Teng, Li, & Ma, 2010), el peligro para todas las formas de vida inminente, tal y como se detalla en la sección 1.1.2.

1.2.3 Daños ambientales

Las actividades petroleras que se desarrollan en nuestro territorio pueden generar contaminación en cada una de sus etapas, uno de los mayores riesgos que se presenta es el derrame de crudo.

Los derrames de crudo en Ecuador, lamentablemente son hechos que se presentan con muchísima frecuencia. En los últimos 30 años se han derramado aproximadamente 20 millones de galones de petróleo en la Amazonía, de acuerdo a Diego Mosquera, biólogo que trabaja en la Estación de Biodiversidad de Tiputini (Gil, 2013), por lo que los daños ambientales son incuantificables, tomando en cuenta la fragilidad del ecosistema amazónico. Según datos del Ministerio del Ambiente (MAE) la media de accidentes fue casi de 50 anuales entre el 2000 y 2010, y la causa del 28% de dichos accidentes es la corrosión de las tuberías del Sistemas de Oleoducto Transecuatoriano (SOTE). Este fue construido en los años 70 y mide 500 km de largo que permiten transportar crudo de la Amazonía hacia la costa (Gil, 2013). De acuerdo al MAE, existen otras causas para el total de 539 derrames producidos entre 2000-2010, entre los que se encuentran: atentados (26%), fallas mecánicas (17.8%), sin datos de causa (14.5%), fallas humanas (11.8%) y desastres naturales (1.5%) (Gil, 2013).

En el 2013, el 31 de mayo se produjo un sonado derrame de aproximadamente 12000 barriles de crudo a orillas del río Coca, el cual se fue desplazando hasta llegar al río Napo y posteriormente hacia el Amazonas, causando preocupación no sólo en el territorio ecuatoriano,

sino también en Perú y Brasil. La causa de este derrame corresponde a un desastre natural que ocasionó la ruptura del SOTE (Gil, 2013), y los efectos en las diferentes formas de vida no se pueden valorar aún. Como se expuso anteriormente en la sección 1.1.2, los ecosistemas terrestres y acuáticos se ven bastante afectados por la presencia de hidrocarburos. Lamentablemente, este no fue el único accidente suscitado en el presente año, lo cual resulta aún más grave.

De acuerdo a datos del Sistema de Indicadores Pasivos Ambientales y Sociales (SIPAS), perteneciente al MAE, las provincias que mayor cantidad de daño ambiental han sufrido son Sucumbíos y Orellana, como consecuencia de ser también las zonas en las que mayor cantidad de actividades petroleras se llevan a cabo. Hasta el año 2009, se calcula que el número de derrames en Sucumbíos fue de 396 y en Orellana 398, tomando en cuenta únicamente los eventos en los que más de 5 barriles fueron vertidos (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2013). Adicionalmente, la superficie afectada ha sido valorada, lo que reporta que más de 1 millón de metros cuadrados han sido contaminados con hidrocarburos en cada provincia (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2013). Cabe recalcar que los derrames que se producen por negligencia o son poco notorios, muchas veces no se reportan a ninguna entidad, por lo que no forman parte de estas estadísticas (Gil, 2013).

En conclusión, las actividades de producción y transporte de crudo han ocasionado problemas ambientales en nuestro territorio desde su inicio hasta la actualidad, por lo que se puede establecer la carencia de medidas preventivas durante estas actividades y la necesidad de buscar soluciones a estos problemas de contaminación ambiental.

1.3 El Suelo

1.3.1 Características generales

El suelo está conformado por minerales, materia orgánica, agua y aire que se han formado como resultado de cambios climáticos y las actividades desarrolladas por los seres vivos a nivel superficial (McCauley , Jones, & Jacobsen, 2005). La estructura del suelo no se ha mantenido constante, sino que se ha ido transformando mediante procesos físicos, químicos y biológicos a lo largo del tiempo.

Todos los cambios producidos en el suelo, fueron dando lugar a la formación de diferentes horizontes denominados O, A, B, C y R. El horizonte O es una delgada capa que contiene materia orgánica parcialmente descompuesta, el A es el suelo propiamente dicho y contiene gran cantidad de materia orgánica lo que le confiere un color más oscuro que el resto de capas. En el horizonte B se acumulan arcillas y carbonatos provenientes del horizonte A, mientras que en el C se encuentra el material parental más desgastado. Finalmente el horizonte R contiene rocas y una gran acumulación de materiales depositados por el viento, agua y gravedad (Coyne, 2000).

El suelo tiene diferentes características físicas como la textura y la porosidad. La estructura del suelo está compuesta por partículas, las cuales pueden agregarse y junto con la materia orgánica dar lugar a gránulos (McCauley , Jones, & Jacobsen, 2005). Tanto los gránulos como las partículas, al igual que la rotura de rocas y minerales, dan lugar a la textura (McCauley , Jones, & Jacobsen, 2005). Para analizar este parámetro, se pueden llevar a cabo operaciones unitarias sencillas como el tamizado. Este método permite separar las partículas del suelo de acuerdo a su diámetro. La grava está compuesta por las partícula más grandes, las

partículas medianas se clasifican como arena, y las partículas más pequeñas vienen a ser las arcillas y el limo (McCauley , Jones, & Jacobsen, 2005). La porosidad es otra característica importante del suelo, y se define como la porción del volumen del suelo que no está siendo ocupada (Nimmo, 2004). En estos espacios el flujo de aire, agua y nutrientes se lleva a cabo. La textura y la estructura determinan el nivel de interconexión de partículas, influyendo así directamente sobre la porosidad (Coyne, 2000).

Además de las características físicas que se han descrito, existen propiedades químicas como la conductividad y el pH. La conductividad es una medida de la capacidad del suelo para conducir electricidad, debido a la presencia de sales (McCauley , Jones, & Jacobsen, 2005). El pH se refiere a la cantidad de iones hidronios presentes en el suelo, en caso de que estos iones estén presentes en gran número el resultado será un pH bajo o ácido, mientras que si hay escasez de hidronios se obtendrá un pH alto o alcalino. Adicionalmente, en el suelo se pueden encontrar una amplia gama de minerales y compuestos químicos que le confieren características únicas a este elemento.

1.3.2 Características microbiológicas

El suelo es un consorcio de células vivas en una matriz orgánico-mineral (Coyne, 2000). Esta matriz se caracteriza por presentar diferentes microambientes y puede albergar una gran cantidad de microorganismos. El desarrollo de los microorganismos en el suelo depende de varios factores, uno de los más importantes es la humedad, ya que diversos nutrientes inorgánicos como carbono, nitrógeno y fósforo se encuentran disueltos en agua y pueden ser utilizados por los microorganismos para llevar a cabo procesos metabólicos (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

Las bacterias, por su gran capacidad de supervivencia, han sido encontradas en todo tipo de ecosistemas, incluyendo el suelo contaminado con hidrocarburos, lo cual resulta de gran importancia económica y ambiental. Esta adaptación de los consorcios microbianos se debe principalmente a la selección natural y al intercambio genético (Joynt, Bischoff, Turco, Konopka, & Nakatsu, 2006). Para que los procesos metabólicos de los microorganismos se lleven a cabo, se requiere la presencia de un aceptor de electrones, que generalmente es el oxígeno, lo cual se lleva a cabo fácilmente si se tiene en cuenta que la superficie del suelo está en contacto con la atmósfera (EPA , 1994). Los microorganismos oxidadores de hidrocarburos crecen de forma inmediata en la superficie del petróleo especialmente si la temperatura y la presencia de nutrientes es favorable, esto se debe a que en condiciones aerobias, la oxigenasa se encarga de introducir átomos de oxígeno en el hidrocarburo, lo que conlleva una cascada de procesos bioquímicos que permite la posterior mineralización o degradación de hidrocarburos (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

1.4 Biorremediación

La biorremediación se define como el uso de procesos de degradación biológica en sistemas naturales para remover o reducir la presencia de contaminantes que amenazan al ser humano o al medio ambiente (Thapa , Kumar, & Ghimire, 2012). Muchos contaminantes son mineralizados gracias a la acción de microorganismos quienes a partir de compuestos xenobióticos llevan a cabo procesos metabólicos vitales para su supervivencia. La biorremediación de hidrocarburos complejos requiere un consorcio microbiano, pues de forma individual, cada microorganismo puede metabolizar únicamente un rango limitado de compuestos contaminantes (Madigan, Martinko, & Parker, 2004). De este modo, algunos

miembros del consorcio pueden secretar enzimas o agentes surfactantes, mientras que otros, factores de crecimiento o proteínas que sean de utilidad para otros miembros de la comunidad microbiana (Mukherjee & Bordoloi, 2011). En términos generales, los organismos más fuertes de la comunidad microbiana son los que transforman el contaminante en compuestos más simples que pueden ser aprovechados por el resto del grupo (Paliwal, Puranik, & Purohit, 2012), dando lugar de esta manera a procesos de degradación.

Los procesos de biorremediación son en la actualidad cada vez más utilizados ya que a diferencia de los procesos físico-químicos o térmicos como la incineración, ozonación y combustión (Liu , Luo, Teng, Li, & Ma, 2010), la biodegradación es un proceso natural de remediación que no exige una inversión elevada en reactivos, infraestructura y requerimientos energéticos (Joynt, Bischoff, Turco, Konopka, & Nakatsu, 2006). Se estima que el costo de tratamiento por tonelada de suelo contaminado con hidrocarburos es casi 100% superior cuando se realiza un tratamiento químico en lugar de biorremediación. Estudios adicionales demuestran que el tratamiento de un contaminante in situ es hasta un 40% más económico que el tratamiento ex situ (Maila & Cloete, 2004). Por lo tanto, esta técnica no sólo resulta más amigable con el ambiente, sino también más económica.

Existe una gran variedad de técnicas de biorremediación que permiten tratar la contaminación ambiental por presencia de hidrocarburos, entre ellas, las que resaltan son las biopilas y el landfarming. Las biopilas son una tecnología, en la que se forman celdas con el suelo contaminado y la actividad microbiana es estimulada mediante la aireación, la adición de nutrientes y el control de humedad. Dentro de las ventajas de esta técnica, está la sencillez en su diseño e implementación además de los bajos requerimientos de espacio en relación a otros

métodos (EPA , 1994). Mientras que una de sus mayores desventajas es que no se desempeña bien si la concentración de hidrocarburos pesados excede a $50\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$, y la presencia de metales pesados puede inhibir la vida microbiana necesaria para realizar procesos de biorremediación (EPA , 1994). En un ensayo de biorremediación por medio de la utilización de biopilas, presentado por Jorgensen y sus colegas (2000), se describe que luego de 5 meses de ensayo, la concentración de hidrocarburo se redujo en un 71%. El landfarming al igual que las biopilas requiere aireación, nutrientes y un control de humedad, pero en este caso se debe realizar una mezcla de suelo contaminado en altas concentraciones, con sedimentos limpios, de modo que la concentración de los contaminantes se reduzca (Kudjo, 2009) y no inhiba por completo la actividad microbiana (Ercoli, 2008). Dentro de las ventajas de esta técnica está que se puede manejar de manera sencilla, mientras que una de sus mayores limitaciones es que se requiere una gran cantidad de espacio físico para su funcionamiento y el tiempo de degradación es bastante prolongado (EPA , Chapter IV. Biopiles, 1994). En un estudio realizado por Marin y sus colaboradores (2005), en el que se realizó un ensayo de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos por medio de la técnica de landfarming, se reportó que luego de once meses, el 80% de TPHs presentes en el suelo fueron degradados en condiciones de lluvia baja y temperaturas elevadas. Los dos métodos descritos anteriormente han presentado resultados positivos en la degradación de hidrocarburos, en un tiempo aproximado entre seis meses y dos años respectivamente (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004). Cabe indicar que el tiempo de degradación depende de también de otros factores como la concentración inicial del hidrocarburo. En términos generales, el mecanismo mediante el cual los contaminantes son degradados implica la rotura de grandes moléculas por

parte de los microorganismos y la posterior conversión de estos compuestos a dióxido de carbono y agua bajo condiciones aerobias (Maila & Cloete, 2004).

El presente estudio de investigación consistió en el estudio de seis muestras de suelo contaminado con hidrocarburos provenientes de la Costa y Amazonía ecuatorianas. Cada muestra contenía distintas concentraciones de hidrocarburos, por lo que fue caracterizado en base a parámetros físico-químicos y microbiológicos. Adicionalmente, la toxicidad microbiana del contaminante fue evaluada por medio de bioensayos en los que se realizaron conteos microbianos en medios de cultivo con distintas concentraciones de hidrocarburo en forma de gasolina. Finalmente se llevaron a cabo bioensayos de degradación batch por medio de la bioestimulación de microorganismos indígenas en las muestras de suelo durante 110 días de incubación.

2. Objetivo General

Evaluar la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a escala de laboratorio utilizando muestras provenientes de derrames de hidrocarburos ocurridos en la costa y amazonía ecuatorianas.

3. Objetivos Específicos

- Desarrollar métodos analíticos y técnicas microbiológicas para caracterizar en términos físico-químicos y microbiológicos muestras de suelo contaminado con hidrocarburos.

- Realizar ensayos de toxicidad microbiana para evaluar el efecto de la presencia de hidrocarburos en el crecimiento microbiano.
- Realizar ensayos de biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburos en presencia de oxígeno a escala laboratorio.
- Monitorear el proceso de biorremediación de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburo mediante la medición de parámetros físico-químicos y la determinación de población microbiana total y de bacterias degradadoras en diferentes instancias del proceso de degradación.

4. Área de Trabajo

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA-USFQ) del Colegio Politécnico de la Universidad San Francisco de Quito, en el campus de Cumbayá - Quito.

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos fueron gentilmente proporcionadas por la empresa CORENA S.A.

5. Justificación

El Ecuador es un país petrolero por excelencia, produce alrededor de 500 000 barriles diarios de crudo, con los cuales se cubre alrededor de un 25% del presupuesto estatal, este valioso recurso se extrae tanto por empresas estatales como privadas (El Universo, 2012). Si se tiene en cuenta la alta demanda de crudo que existe a nivel mundial, y la gran cantidad de pozos petroleros que hay en el país, se estima que las actividades de exploración, explotación,

transporte y comercialización se seguirán llevando a cabo a lo largo del tiempo en nuestro territorio.

Si bien la explotación petrolera trae beneficios económicos y sociales al país, también conlleva riesgos para el medio ambiente y la salud pública durante la extracción y el transporte del crudo por oleoductos. Solo en el año 2012, en el período de Enero a Mayo ocurrieron un promedio de cinco derrames, habiéndose vertido en total aproximadamente 50 barriles de crudo (El Comercio, 2012). El primer evento ocurrió el 22 de enero en el bloque 21 operado por Petroamazonas en la Parroquia Chonta Punta en Napo, afectando a las comunidades Kichwa y Waorani. El segundo episodio sucedió en el campo Tetete en Sucumbíos por la ruptura de una tubería que hizo que el crudo se filtre y llegue incluso hasta el Río Ucano. Un tercer incidente ocurrió en Shushufindi por el cambio de tuberías, pero se desconoce el número de barriles derramados y las comunidades afectadas. Otro derrame, se suscitó en el poliducto por el cual se transporta petróleo desde Esmeraldas hasta el Sur del país, a la altura del Parque Nacional Cotopaxi, el hecho sucedió en el momento en que el Cuerpo de Ingenieros del Ejército se encontraba realizando excavaciones, la gasolina salió en forma de vapor y controlar la situación tomó un tiempo de aproximadamente diez horas (El Comercio, 2012). En el 2013, el 31 de mayo se produjo uno de los derrames más terribles, en el que vertieron 11 400 barriles en el río Napo el cual colinda con el Parque Nacional Yasuní, y transportó el crudo por nuestro territorio hasta llegar al Amazonas (Gil, 2013). Evaluando un corto período de tiempo, las consecuencias de los derrames de petróleo son gravísimas, sin embargo, si se suma todo el daño ambiental que ha ocurrido en el país, las pérdidas son incuantificables.

Entre los principales efectos que tienen los derrames petroleros están: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar del derrame, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y contaminación por infiltración de cuerpos de agua subterráneos (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004). La biorremediación es una alternativa que permite evitar o minimizar los efectos dañinos al medio ambiente mediante la descontaminación del suelo de forma natural usando microorganismos. La importancia de este proyecto radica en que permitirá modelar un mecanismo de biorremediación a escala de laboratorio con un potencial de aplicación en el campo, aportando así al cuidado del medio ambiente y de la gran biodiversidad presente en nuestro país.

6. Materiales

6.1 Muestras de suelo contaminado

- Fundas plásticas ziploc

6.2 Técnicas analíticas

6.2.1 Equipos comunes

- Balanza de precisión (Mettler-Toledo International Inc., USA)
- Multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 μL y 1-5 mL (Labnet International Inc., USA)
- Agitador magnético

6.2.2 Medición de amonio

- Electrodo de referencia (Thermo Specific pH Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Electrodo selectivo de amonio (Thermo Specific Ion Selective Electrode, ISE Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Cloruro de amonio NH_4Cl (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.2.3 Color

- Tablas de color de Munsell

6.2.4 Medición de cloruro

- Electrodo selectivo de cloruro (Thermo Specific Ion Selective Electrode, ISE Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Cloruro de sodio NaCl (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.2.5 Medición de conductividad

- Electrodo de conductividad (Thermo Specific pH Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Estándar de conductividad (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)

6.2.6 Demanda química de oxígeno (DQO)

- Espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)
- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)
- Solución de digestión de alto rango compuesta por dicromato de potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 (95 - 97%) (Reactivos H.V.O, Ecuador)

- Solución de ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 (95 - 97%) con nitrato de plata AgNO_3 (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.2.7 Densidad aparente, gravedad específica y porosidad

- Pesa muestras de aluminio

6.2.8 Medición de fluoruro

- Electrodo selectivo de fluoruro (Thermo Specific Ion Selective Electrode, ISE Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Fluoruro de sodio NaF (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.2.9 Grado textural

- Laboratory Test Sieve Endecotts Ltd. (Endecotts Ltd., London, England)
- Solids Handling Study Bench (Armfield, London, England)

6.2.10 Humedad gravimétrica

- Horno (40 GC Lab Oven, Chicago, Illinois, USA)
- Pesa muestras de aluminio

6.2.11 Materia orgánica

- Horno (40 GC Lab Oven, Chicago, Illinois, USA)
- Horno mufla (Ney Vulcan 3-550, York, PA)
- Crisoles

6.2.12 Medición de pH

- Triodo de pH (Thermo Specific pH Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA))

- Buffers de calibración (pH 4, 7 y 10) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)

6.2.13 Medición de sulfato

- Triodo de pH (Thermo Specific pH Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA))
- Horno (40 GC Lab Oven, Chicago, Illinois, USA)
- Filtros de microfibra de vidrio 934-AH (Whatman, Piscataway, NJ, USA)
- Equipo de filtración (kitasato y mangueras)
- Cloruro de bario $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Ácido clorhídrico HCl (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.2.14 Medición de sulfuro

- Espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)
- Sulfuro de sodio $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 (95 - 97%) (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Cloruro de Zinc ZnCl (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.3 Técnicas microbiológicas

6.3.1 Medio líquido basal mineral (BSM)

- K_2HPO_4 (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Na_2HPO_4 (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- NH_4Cl (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)

6.3.2 Medio Luria Bertani (LB)

- Agar LB, Miller (DifcoTM, Becton Dickinson and Company, Países Bajos)

6.3.3 Medio sólido basal mineral con gasolina

- Medio líquido basal mineral (BSM)
- Bacto Agar (DifcoTM, Becton Dickinson and Company, Países Bajos)
- Gasolina (Tipo: Extra)

6.3.4 Medio sólido basal mineral con petróleo

- Medio líquido basal mineral (BSM)
- Bacto Agar (DifcoTM, Becton Dickinson and Company, Países Bajos)
- Petróleo

6.3.5 Conteo de unidades formadoras de colonia totales (UFC totales)

- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 μL (Labnet International Inc., USA)
- Autoclave (Sterilmatic, Market Forge Industries Inc., USA)
- Incubadora (Durex, Ecuador)
- Mechero (Humboldt, USA)
- Asa de vidrio o bastón de hockey

6.3.6 Conteo de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)

- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 μl (Labnet International Inc., USA)

- Autoclave (Sterilmatic, Market Forge Industries Inc., USA)
- Incubadora (Durex, Ecuador)
- Mechero (Humboldt, USA)
- Asa de vidrio o bastón de hockey

6.3.7 Valoración de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)

- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 µl (Labnet International Inc., USA)
- Autoclave (Sterilmatic, Market Forge Industries Inc., USA)
- Incubadora (Durex, Ecuador)
- Mechero (Humboldt, USA)
- Asa de vidrio o bastón de hockey

6.4 Ensayo de toxicidad microbiana

- Medio sólido basal mineral con gasolina (sección 6.3.3)
- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 µl (Labnet International Inc., USA)
- Autoclave (Sterilmatic, Market Forge Industries Inc., USA)
- Incubadora (fabricada en el Laboratorio de Ing. Ambiental (LIA-USFQ))
- Mechero (Humboldt, USA)
- Asa de vidrio o bastón de hockey

6.5 Bioensayos de degradación

6.5.1 Bioreactores

- Bandejas de plástico 1.5 galones (Rubbermaid Easy Find Lids, USA)
- Incubadora (fabricada en el Laboratorio de Ing. Ambiental (LIA-USFQ))
- Balanza analítica (Mettler-Toledo, USA)

6.5.2 Medio nutritivo

- KH_2PO_4 (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- K_2HPO_4 (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Na_2HPO_4 (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- NH_4Cl (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- FeCl_3 (Reactivos H.V.O, Ecuador)

7. Métodos

7.1 Muestras de suelo contaminado

Seis muestras de suelo contaminado con hidrocarburos fueron utilizadas a lo largo de este proyecto de investigación, todas ellas fueron gentilmente proporcionadas por la empresa CORENA S.A. El suelo contaminado con hidrocarburos fue retirado de las oficinas de dicha empresa en la ciudad de Quito y llevado al Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ) en Cumbayá donde fueron colocadas dentro de otra funda Ziploc y almacenadas en refrigeración a 4°C, en una zona de poca luz.

7.2 Métodos analíticos

7.2.1 Medición de amonio

El amonio presente en las muestras de suelo se determinó usando como referencia el método SM 4500-NH₃ D (APHA). Este parámetro fue medido empleando un electrodo selectivo de amonio Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) y un electrodo de referencia Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). La curva de calibración se realizó empleando soluciones estándar en un rango bajo de concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 mg NH₄⁺ L⁻¹ y en un rango alto de concentración de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg NH₄⁺ L⁻¹. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de NH₄⁺ como cloruro de amonio (NH₄Cl). 2mL de una solución de ajuste de fuerza iónica (ISA amonio) se añadieron a 20mL de cada estándar y se procedió a medir el potencial en mV con el electrodo de amonio y el electrodo de referencia. Los valores de potencial se graficaron en función del logaritmo base 10 de la concentración de amonio de acuerdo a lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. Para analizar las muestras, 30mL de agua destilada fueron agregados a 18g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. A continuación se tomaron 20mL de mezcla y se agregaron 2mL de solución de ajuste de fuerza iónica (ISA) y se midió el potencial en mV. La concentración de amonio en cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.2 Color

El color de las muestras de suelo se estableció usando como referencia el método ASTM D1535 (ASTM), empleando tablas de color Munsell. El procedimiento consistió en la

comparación visual del color de las muestras de suelo usadas en el estudio de investigación, con los estándares de las tablas de Munsell.

7.2.3 Medición de cloruro

La medición de cloruro en las muestras de suelo se realizó usando como referencia el método ASTM D512-89(99) (C) (ASTM). Este parámetro fue medido empleando un electrodo selectivo de cloruro Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). La curva de calibración se realizó empleando soluciones estándar en un rango de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750mg Cl⁻ L⁻¹. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de Cl⁻ como cloruro de sodio. 0.4 mL de una solución de ajuste de fuerza iónica (ISA cloruro) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) fueron agregados a 20mL de cada solución estándar, la mezcla fue agitada y posteriormente se midió el potencial en mV utilizando un electrodo selectivo de cloruro. Los valores de potencial se graficaron en función del logaritmo base 10 de la concentración de cloruro de acuerdo a lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. Para analizar las muestras, 30mL de agua destilada fueron agregados a 18g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. A continuación se tomaron 20mL de mezcla y se agregaron 0.4mL de solución de ajuste de fuerza iónica (ISA) y se midió el potencial en mV. La concentración de cloruro en cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.4 Medición de conductividad

La medición de conductividad se llevó a cabo usando como referencia el método SM 2510 (APHA). 30mL de agua destilada fueron añadidos a 18g de suelo de cada una de las

muestras analizadas, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. La conductividad fue determinada tomando 35mL de mezcla utilizando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) que fue calibrado con el estándar de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.5 Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno se determinó mediante un método colorimétrico a una longitud de onda de 600nm, tomando como referencia el método SM 5220 B (APHA). La curva de calibración se realizó a partir de una solución madre de 1000 mg $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ de KHP en un rango de concentración de estándares de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$. Soluciones de digestión con dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y ácido sulfúrico con nitrato de plata en una relación de 6g AgNO_3 por kg H_2SO_4 fueron empleadas para la determinación de la DQO. La digestión de los estándares se realizó con 2.5mL de estándar, 1.5mL de solución de digestión y 3.5mL de ácido sulfúrico con nitrato de plata por dos horas a una temperatura de 150°C en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos). Una vez que las muestras fueron digeridas se procedió a medir la absorbancia empleando el espectrofotómetro (Spectronic 20D+, Nueva York, Estados Unidos). Los valores de absorbancia se graficaron en función de la demanda química de oxígeno de acuerdo a lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. 30mL de agua fueron agregados a 18g de suelo, se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos. A continuación se realizó la digestión de las muestras y se procedió a medir la absorbancia. La DQO de cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.6 Densidad aparente, gravedad específica y porosidad

La densidad aparente fue determinada en base al método ASTM D854 (APHA). 25 a 30g de suelo fueron pesados con la finalidad de que un pesa muestras de aluminio con un volumen de 8.48cm³ quede lleno con la muestra. La densidad aparente fue obtenida teóricamente dividiendo el peso de la muestra de suelo seco a 105°C durante 14 horas para el volumen original de la muestra empleada.

$$\text{Densidad} \left(\frac{g}{cm^3} \right) = \frac{\text{peso suelo seco}(g)}{\text{volumen muestra} (cm^3)} \quad \text{Ecuación 1}$$

La gravedad específica fue obtenida al dividir la densidad de las muestras de suelo para la densidad del agua (1 g cm⁻³).

$$\text{Gravedad específica} = \frac{\text{densidad del suelo} (g/cm^3)}{\text{densidad del agua} (g/cm^3)} \quad \text{Ecuación 2}$$

La porosidad fue calculada en base al método ASTM D854-91 (ASTM). Se utilizó el valor de densidad aparente y una densidad de partícula de 2.65¹ g cm⁻³ para la fracción de suelo mineral (X_s) y 0.8² g cm⁻³ para la fracción correspondiente a materia orgánica (X_{mo}).

$$\text{Porosidad}(\%) = \left[1 - \frac{\text{densidad aparente} (g/cm^3)}{\left(X_s * 2.65 \left(\frac{g}{cm^3} \right) \right) + \left(X_{mo} * 0.80 \left(\frac{g}{cm^3} \right) \right)} \right] x 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

¹ Springer-reference: <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/77024.html>

² Plant & Soil Sciences eLibrary:

<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1130447039&topicorder=5&maxto=10>

7.2.7 Medición de fluoruro

El fluoruro presente en las muestras de suelo se determinó utilizando como referencia el método ASTM D512-89(99) (C) (ASTM). Este parámetro fue medido empleando un electrodo selectivo de fluoruro Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). La curva de calibración se realizó empleando soluciones estándar en un rango bajo de concentración de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mg F⁻ L⁻¹. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de F⁻ como fluoruro de sodio. 2mL de una solución de ajuste de fuerza iónica (TISAB III) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) fueron agregados a 20mL de cada solución estándar, la mezcla fue agitada y posteriormente se midió el potencial en mV utilizando un electrodo selectivo de fluoruro. Los valores de potencial se graficaron en función del logaritmo base 10 de la concentración de fluoruro de acuerdo a lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. Para analizar las muestras, 25mL de agua destilada fueron agregados a 15g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. A continuación se tomaron 10mL de mezcla y se agregó 1mL de solución de ajuste de fuerza iónica (TISAB III) y se midió el potencial en mV. La concentración de fluoruro en cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.8 Grado textural

La textura del suelo fue determinada de acuerdo al protocolo descrito por Currin y sus colaboradores (2008). 200g de cada muestra fueron sometidos a un proceso de secado a 70°C por 24 horas en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos). Alícuotas de aproximadamente 25g de suelo por muestra fueron tamizadas en un equipo Laboratory Test Sieve Endecotts Ltd. (Endecotts Ltd., London, England) con la ayuda de un

agitador vibratorio de Solids Handling Study Bench (Armfield, London, England). Los orificios del tamiz utilizado fueron 250, 355, 500, 710, 1000 y 2000 μ m de diámetro. La clasificación del suelo se realizó en base a una escala presentada en Lehrbuch der Bodenkunde (Scheffer & Schachtschabel, 2010), que se detalla en el Anexo 1.

7.2.9 Humedad gravimétrica

La humedad de las muestras fue evaluada utilizando como referencia el método ASTM D2216-98 (ASTM). 10g de suelo fueron sometidos a un proceso de secado a 105°C durante la noche en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos) y por diferencia en peso se determinó el porcentaje de humedad empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \left[\frac{\text{peso suelo fresco (g)} - \text{peso suelo seco (g)}}{\text{peso suelo fresco (g)}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

7.2.10 Materia orgánica

La materia orgánica fue determinada en base al método ASTM F1647 (ASTM). 10g de suelo fueron sometidos a un proceso de secado a 105 °C durante la noche en un horno GC-Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos). El peso de suelo seco fue registrado y se procedió a incinerar la muestra a 550°C por 4 horas en una mufla Vulcan 3-Series Burnout Furnaces 3-550 A. (Vulcan Benchtop Furnaces, O'Connor International Limited, Bangkok). Las cenizas fueron pesadas y por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de materia orgánica, como se presenta en la siguiente ecuación:

$$\text{Materia orgánica (\%)} = \left[\frac{\text{peso suelo seco (g)} - \text{peso cenizas (g)}}{\text{peso suelo seco (g)}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

7.2.11 Medición de pH

La medición de pH de las muestras se realizó usando como referencia el método EPA 9045 (EPA, US EPA New England Region 1 Library). 30mL de agua destilada fueron agregados a 18g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. El potencial de hidrógeno fue determinado tomando 20mL de mezcla empleando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) que fue calibrado usando soluciones buffer con un pH de 4, 7 y 10. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.12 Medición de sulfato

El sulfato presente en las muestras de suelo se midió utilizando como referencia el método SM 426 C (APHA). 30mL de agua destilada fueron agregados a 15g de suelo de cada muestra, la solución se mezcló y dejó reposar por 30 minutos. A continuación la mezcla fue filtrada empleando filtros de papel absorbente. El pH de 15mL de la muestra filtrada fue ajustado a 2 con ácido clorhídrico (HCl) al 30%. A continuación, 25mL de una solución 0.1M de cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) fueron agregados a la muestra filtrada y con pH ácido, se dejó reposar durante una hora y el sulfato presente en la solución precipitó como sulfato de bario (BaSO_4). Posteriormente, se realizó una filtración al vacío empleando filtros de micro fibra de vidrio con un diámetro de 45.5mm y tamaño de poro 1.2 μm (Whatman, Inglaterra, Reino Unido). Las muestras filtradas fueron secadas a 105°C en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos) durante 8 horas. La cantidad de sulfato de bario formada se determinó por diferencia de peso entre el peso del filtro y el peso del filtro con la muestra seca.

7.2.13 Medición de sulfuro

El sulfuro total en solución se determinó usando como referencia el método SM 4500-S²⁻ D (APHA). La medición de sulfuro disuelto se realizó por el método colorimétrico de azul de metileno a una longitud de onda de 670nm (Cline, 1969). La curva de calibración se realizó a partir de soluciones estándar de 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mg S⁻ L⁻¹. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 100 mg L⁻¹ de S²⁻ como sulfuro de sodio (Na₂S). En un balón volumétrico de 25mL se añadieron 5mL de ZnCl (2%), 2.5mL de DMP (2g L⁻¹) con 20% de ácido sulfúrico concentrado, 0.125mL de solución de sulfato de amonio y hierro, 0.1mL de solución estándar y se aforó el balón con agua destilada. A continuación se midió la absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic 20D+, Nueva York, Estados Unidos) y estos valores se graficaron en función de la concentración de sulfuro de acuerdo a lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.97. Para analizar las muestras, 50mL de agua destilada se agregaron a 10g de suelo, se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos. 0.1mL de la mezcla se agregaron a un balón aforado de 25mL junto con 5mL de ZnCl, 2.5mL de DMP y 0.125mL de solución de sulfato de amonio y hierro y se procedió a determinar la absorbancia. La concentración de sulfuro en cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente, y tomando en cuenta el factor de dilución. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.2.14 Medición de TPHs

La cantidad de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) presentes en las muestras de suelo contaminado fue medida en el Laboratorio de la Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental (LABFIGEMPA), perteneciente a la Universidad Central del Ecuador, el cual está acreditado por el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE). Una

segunda medición fue realizada en el Laboratorio del Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ), perteneciente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, el cual también se encuentra acreditado. En ambos casos, el método de referencia utilizado fue EPA 418.1, es decir los TPHs fueron medidos por espectroscopía infrarroja.

7.3 Métodos microbiológicos

7.3.1 Medio basal mineral (BSM)

La composición del medio basal mineral (pH 7.1-7.3) usado en las diluciones previo al conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) totales fue (en mg L⁻¹): K₂HPO₄ (4000), Na₂HPO₄ (4000), NH₄Cl (2000), MgSO₄ (200), CaCl₂·2H₂O (10), FeSO₄·7H₂O (10). El medio basal mineral fue autoclavado a 121°C y 1 atm de presión por 15 minutos en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

7.3.2 Medio Luria Bertani (LB)

El medio LB empleado en el conteo de UFC totales fue generado con 40g L⁻¹ de Agar LB, Miller (DifcoTM, Becton Dickinson and Company, Países Bajos). El medio LB fue autoclavado de acuerdo a lo descrito en la sección 7.3.1 y repartido en cajas petri estériles.

7.3.3 Medio sólido basal mineral con gasolina

El medio basal mineral con gasolina fue generado mediante la adición de 15g L⁻¹ de Bacto Agar (DifcoTM, Becton Dickinson and Company, Países Bajos) al BSM descrito en la sección 7.3.1. Este medio fue autoclavado de acuerdo a lo descrito en la sección 7.3.1. Dentro de la sorbona se agregó gasolina (tipo extra) en una proporción de 0.5% (v/v). El medio fue repartido en cajas petri estériles.

7.3.4 Medio sólido basal mineral con petróleo

El medio basal mineral con petróleo fue generado mediante la adición de 15g L^{-1} de Bacto Agar (Difco™, Becton Dickinson and Company, Países Bajos) al BSM descrito en la sección 7.3.1. El medio fue autoclavado de acuerdo a lo descrito en la sección 7.3.1. Dentro de la sorbona se agregó petróleo obtenido del LIA-USFQ en una proporción de 0.1% (v/v). El medio fue repartido en cajas petri estériles.

7.3.5 Conteo de unidades formadoras de colonia totales (UFC totales)

Para llevar a cabo el conteo de UFC totales, 5g de suelo fueron agregados a un recipiente de vidrio estéril que contenía 45 mL de BSM, obteniendo así una dilución de 10^{-1} . Posteriormente, la mezcla fue homogenizada con ayuda de un Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA). A partir de la primera dilución, se llevaron a cabo diluciones seriales (10^{-4} – 10^{-5}) tomando 1mL de muestra y transfiriendo este volumen a otro tubo de ensayo que contenía 9 mL de BSM. Las diluciones más altas de cada muestra fueron sembradas por triplicado en el Medio Luria Bertani descrito en la sección 7.3.2 e incubadas a 37°C en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Los conteos de UFC totales se realizaron a las 24 y 48 horas, y se registraron los valores obtenidos, tomando como válidos únicamente los platos petri que tenían entre 30 y 300 UFC.

7.3.6 Conteo de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)

Para llevar a cabo el conteo de UFC degradadoras, 5g de suelo de las muestras analizadas fueron agregados a un recipiente de vidrio estéril que contenía 45mL de BSM, obteniendo así una dilución de 10^{-1} . Posteriormente, la mezcla fue homogenizada con ayuda de un Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA). A partir de la primera dilución, se

realizó una nueva dilución en serie (10^{-2}) tomando 1 mL de muestra y transfiriendo este volumen a otro tubo de ensayo que contenía 9 mL de BSM. Las dos diluciones fueron sembradas por triplicado en un medio basal mineral sólido que contenía gasolina como única fuente de carbono. Las cajas fueron incubadas a 30 ± 1 °C en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA – USFQ). Los conteos de UFC degradadoras fueron realizados cada 24 horas durante 5 días y se registraron los valores obtenidos, tomando como válidos únicamente los platos petri que tenían entre 30 y 300 UFC.

7.3.7 Valoración de unidades formadoras de colonia degradadoras (UFC degradadoras)

La valoración de presencia o ausencia de UFC degradadoras se llevó a cabo en un medio selectivo que contenía petróleo. 5g de suelo fueron agregados a un recipiente de vidrio estéril que contenía 45mL de medio basal mineral (BSM), obteniendo así una dilución de 10^{-1} . Posteriormente, la mezcla fue homogenizada con ayuda de un Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA). La mezcla fue sembrada por triplicado en un medio basal mineral sólido que contenía petróleo como única fuente de carbono. Las cajas fueron incubadas a 30 ± 1 °C en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA-USFQ). El crecimiento microbiano fue monitoreado cada 24 horas durante 5 días, valorando únicamente si existe presencia o ausencia de UFC degradadoras.

7.4 Ensayos de toxicidad microbiana

Los ensayos de toxicidad microbiana se realizaron por duplicado, utilizando la muestra testigo (T), con la finalidad de evaluar el efecto inhibitorio de la exposición de los microorganismos a diferentes concentraciones de hidrocarburo representado como gasolina en el crecimiento microbiano. 5g de suelo fueron agregados a un recipiente de vidrio estéril que

contenía 45mL de medio basal mineral (BSM), obteniendo así una dilución de 10^{-1} . La mezcla fue homogenizada con ayuda de un Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA). Posteriormente, la mezcla fue sembrada por duplicado en medio basal mineral sólido que contenía 2.5 g DQO-acetato L^{-1} como fuente de carbono y gasolina como agente inhibitorio en diferentes concentraciones. Ensayos con 8 diferentes concentraciones de gasolina y un medio control que no contenía el contaminante fueron estudiados bajo condiciones batch. La concentración de gasolina evaluada fue 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 5 y 10% (v/v). Las cajas fueron incubadas a $30^{\circ}C$ en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA-USFQ). El crecimiento microbiano (CM) fue monitoreado cada 24 horas durante 2 días. Este parámetro fue normalizado en base la población microbiana presente en los ensayos control, los cuales no contenían el agente inhibitorio. La concentración de gasolina que inhibió el crecimiento microbiano en un 20%, 50% y 80% se denominó IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} , respectivamente y fueron calculados mediante la ecuación que se presenta a continuación.

$$Inhibición(\%) = 100 - \left[100 \cdot \frac{CM \text{ concentración evaluada}}{CM \text{ ensayo control}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

7.5 Bioensayos de degradación

7.5.1 Medio nutritivo

La composición del medio nutritivo (pH 7.1-7.3) fue (en mg L^{-1}): KH_2PO_4 (85), K_2HPO_4 (217), Na_2HPO_4 (334), NH_4Cl (10), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (22.5), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (27.5), $FeCl_3$ (250). El medio fue autoclavado a $121^{\circ}C$ y 1 atm de presión por 15 minutos en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

7.5.2 Biorreactores

Los bioensayos de degradación de las muestra de suelo contaminado con TPHs se llevaron a cabo en bandejas de plástico de 1.5 galones (Rubbermaid Easy Find Lids, USA), las cuales fueron pesadas vacías y etiquetadas. 500g de cada muestra de suelo fueron colocados en cada bandeja por duplicado (muestra 1 y muestra 2), obteniendo así 12 reactores denominados AC 1, AC 2, MCR 1, MCR 2, MC 1, MC 2, MAC 1, MAC 2, BC 1, BC 2, T1, T2. Las bandejas fueron colocadas de forma aleatoria dentro de la incubadora del LIA – USFQ a una temperatura de 30 ± 2 °C. Las bandejas con sus tapas fueron pesadas semanalmente, con la finalidad de controlar la pérdida de humedad. En caso de que el peso obtenido fuese menor al esperado se agregó el medio nutritivo (sección 7.5.1) hasta alcanzar aproximadamente el peso inicial. Asimismo, cada semana las bandejas fueron aireadas manualmente durante 1 minuto utilizando espátulas. En el caso particular de los ensayos AC 1, AC 2, BC 1 y BC 2 las espátulas permanecieron en el interior de las bandejas para evitar pérdidas en peso debido a la textura lodosa de las muestras de suelo.

El funcionamiento de los biorreactores y el alcance de la biorremediación fue evaluado a través de monitoreos continuos en los que se midieron parámetros físico-químicos y microbiológicos. Dentro de los parámetros físico-químicos se realizaron monitoreos de amonio, cloruro, conductividad, demanda química de oxígeno (DQO), humedad, materia orgánica y pH aproximadamente cada 20 días. En el caso de los parámetros microbiológicos se realizaron conteos microbianos totales y conteos microbianos de degradadores aproximadamente cada 30 días. Adicionalmente, se realizaron dos mediciones de la concentración de hidrocarburo presente en las muestras de suelo expresada como TPHs de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.14.

8. Resultados

8.1 Caracterización físico-química y microbiológica de muestras de suelo contaminado con TPHs

6 muestras de suelo contaminado con hidrocarburos expresados como hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) fueron caracterizadas en este proyecto de investigación. Las muestras presentan características diferentes especialmente en lo que respecta al nivel de contaminación, es por esto que han sido denominadas en base a la concentración de TPHs presentes en cada muestra.

En la Tabla 1 (Sección 13) se presenta una descripción detallada de las muestras de suelo contaminado que fueron gentilmente proporcionadas por la empresa CORENA S.A. La primera muestra proviene de un tanque contaminado de la actividad petrolera en el Río Napo en la Joya de los Sachas y fue trasladada hasta el Centro de Tratamiento Lágrimas de Conejo (CTLC) de la empresa mencionada, el cual se ubica en Lago Agrio vía a Dureno en El Campo Libertador Shushuquí. Esta muestra presenta una alta concentración de TPHs (95434mg kg^{-1} suelo) por lo que se la identificó con las siglas AC (altamente contaminada). La segunda muestra de suelo proveniente de la provincia de Sucumbíos fue tomada de una piscina pequeña cubierta y totalmente seca en el CTCL de la empresa CORENA S.A. y presenta una contaminación media de TPHs (3567mg kg^{-1} suelo) y una textura rocosa, por lo que fue denominada como MCR (medianamente contaminada rocosa). La tercera muestra fue colectada en Shushufindi en la estación central de Minga, este suelo fue trasladado hacia el Centro de Tratamiento Ambiental La Parker (CTALP) localizado en la Joya de los Sachas, provincia de Orellana. En esta muestra, la presencia de TPHs fue reportada en un rango medio

de concentración (3113mg kg^{-1} suelo), por lo que la muestra fue nombrada como MC (medianamente contaminada). La cuarta muestra analizada proviene de Auca 53 en Dayuma – Orellana y fue trasladada hasta el CTALP de la empresa CORENA S.A. Esta muestra presenta una concentración mediana - alta de TPHs (4920mg kg^{-1} suelo), por lo que se le asignaron las siglas MAC (mediana - altamente contaminada). La quinta muestra fue colectada en el estero del Río Winchele, en la provincia de Esmeraldas y posteriormente trasladada hasta el CTALP ubicado en la Joya de los Sachas. La medición de TPHs se encuentra en el rango bajo de concentración (682mg kg^{-1} suelo), por lo tanto se le asignaron las siglas BC (baja contaminación). Finalmente, la sexta muestra analizada se colectó de un terreno aledaño al CTLC en el cantón Lago Agrío, provincia de Sucumbíos. Dicha muestra no presenta contaminación hidrocarburífera por lo que fue identificada como T (testigo), la concentración de TPHs reportada fue $<100\text{mg kg}^{-1}$ suelo.

Las 6 muestras de suelo contaminado con TPHs fueron caracterizadas en base a parámetros físico-químicos. Los parámetros analizados fueron amonio, color, conductividad, cloruro, densidad, demanda química de oxígeno (DQO), fluoruro, gravedad específica, humedad, materia orgánica, pH, porosidad, sulfato, sulfuro, TPHs y granulometría. En las Tablas 2-4 (Sección 13) se presentan los resultados de la caracterización físico-química en base seca de las muestras de suelo contaminado con TPHs.

El primer parámetro analizado en las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos fue la concentración de amonio, el cual tiene un amplio rango de variación, en la muestra AC se registró el valor más alto de 386.24mg kg^{-1} , en las muestras con mediana contaminación MCR y MC se presentaron valores entre 32.99 y 39.55mg kg^{-1} , mientras que las muestras

MAC, BC y T se reportaron valores bajos de 7.12, 17.68 y 44.13mg kg⁻¹, respectivamente. Con respecto a la concentración de cloruro, la muestra AC registró el valor más alto de 4779.38mg kg⁻¹, las muestras MCR y MC registraron valores intermedios de 429.76 y 220.94mg kg⁻¹, mientras que las muestras MAC, BC y T presentaron un rango bajo de concentración de cloruros de 46.74, 27.53 y 8.15mg kg⁻¹, respectivamente. La conductividad medida en las muestras de suelo contaminado se encontró en su mayoría en rangos altos, la muestra AC presentó un valor máximo de 503μS cm⁻¹, las muestras MCR, MC y BC registraron valores intermedios entre 191 y 250μS cm⁻¹, y las muestras MAC y T valores bajos de 19.33 y 25.79μS cm⁻¹, respectivamente. En la muestra AC, la demanda química de oxígeno reportada fue bastante elevada, con un valor de 17510.66mg kg⁻¹; en las muestras MCR, MAC y T se reportaron cifras promedio de 1390.78, 1472.39 y 4484.42mg kg⁻¹, respectivamente, y se presentaron valores bajos de 970.98 y 612.39mg kg⁻¹ para las muestras MC y BC. Los valores promedios de la densidad de todas las muestras de suelo analizadas se encontraron entre 1.61 y 2.61g cm⁻³. La presencia de fluoruro en las muestras resultó en valores bastante bajos. En las muestras MAC y T se registraron valores muy bajos de 0.06mg kg⁻¹, mientras que en la muestra AC se reportó un valor significativamente más alto de 6.80mg kg⁻¹, para el resto de las muestras los valores estuvieron entre 1 y 1.7mg kg⁻¹. Los valores de gravedad específica variaron entre 1.61 y 2.61 para todas las muestras analizadas. En términos del porcentaje de humedad, la muestra AC presentó el valor más alto de 89.29%, seguido por la muestra T con 58.04%, y la muestra BC con 49.30%. Las muestras MCR, MC y MAC presentaron valores en un rango más bajo de 20.22, 25.70 y 29.30%, respectivamente. En cuanto al porcentaje de materia orgánica presente, la muestra T registró el valor más alto correspondiente a un 94.03%, seguido por las muestras MAC con 62.40%, MC con 53.66% y

MCR con 52.82%. Las muestras AC y BC presentaron los valores más bajos 52.82 y 33.17%, respectivamente. La mayoría de las muestras de suelo analizadas registraron un valor de pH neutro a excepción de la muestra que presenta la mayor contaminación (AC) la cual reportó un pH alcalino de 8.06 y las muestras MAC y T las cuales presentaron un pH ácido de 4.97 y 5.36, respectivamente. La porosidad del suelo también fue caracterizada en esta investigación, se registraron cifras altas en las muestras AC y T, las cuales presentaron valores de 31.36 y 39.12%, respectivamente; cifras intermedias para las muestras MCR con 7.81%, MAC con 13.55% y BC con 11.22% de porosidad. La muestra MC registró el valor más bajo en este parámetro con 1.43%. La presencia de sulfato no fue detectada en ninguna de las muestras de suelo caracterizadas. En lo referente a la concentración de sulfuro, la muestra AC presentó el valor más alto de 60.92mg kg^{-1} , seguido por las muestras MC, MAC, BC y T las cuales contienen entre 24.54 y $33.60\text{mg S}^{2-} \text{kg}^{-1}$, respectivamente, por otro lado la muestra MCR reportó la menor cantidad de sulfuro con 9.47mg kg^{-1} . En cuanto a la medición de TPHs realizada por LABFIGEMPA, la muestra AC presentó el valor más alto 95434mg kg^{-1} , las muestras MC y MCR registraron valores intermedios de 3567 y 3113mg kg^{-1} , respectivamente. La muestra MAC presentó un valor de 4920mg kg^{-1} , la muestra BC registró una concentración baja de 682mg kg^{-1} mientras que en la muestra T se reportó una cantidad menor a 100mg kg^{-1} .

El análisis granulométrico presentado en la Tabla 4 (Sección 13) indica que todas las muestras de suelo contaminado excepto BC, contienen una alta proporción de partículas con un tamaño mayor a $2000 \mu\text{m}$. En la muestra AC corresponde al 69.10%, en MCR al 82.63%, en MC al 66.46%, en MAC al 74.31% y en T al 68.92%. La muestra BC difiere del resto de muestras en su análisis granulométrico pues presenta un 39.36% de partículas de gran tamaño.

La población microbiana también fue caracterizada a través de un conteo total en medio Luria Bertani obteniendo una población total para las muestras AC, MCR y T de 10^6 (UFC g^{-1} suelo), mientras que para las muestras MC, MAC y BC la población se encuentra en el rango de 10^5 (UFC g^{-1} suelo). Adicionalmente, en el conteo de colonias degradadoras se encontró una población de 10^3 (UFC g^{-1} suelo) para la muestra MAC, una población de 10^4 (UFC g^{-1} suelo) para las muestras AC, BC y T. Las muestras MCR y MC reportaron una población de 10^5 (UFC g^{-1} suelo). Los valores del conteo de colonias totales y degradadoras se encuentran descritos en la Tabla 5 (Sección 13).

8.2 Ensayos de toxicidad microbiana

La toxicidad del hidrocarburo representado como gasolina fue evaluada a través del conteo microbiano (CM) en bioensayos batch luego de 48 horas de incubación tanto en los ensayos control como en los diferentes tratamientos con concentraciones en aumento de gasolina. La población bacteriana en ausencia de gasolina fue 6×10^4 UFC g^{-1} suelo, y a partir de este dato el crecimiento microbiano fue normalizado para las diferentes concentraciones de gasolina evaluadas. En términos generales se puede establecer que la cantidad de microorganismos presentes en los bioensayos fue disminuyendo a medida que la concentración de gasolina fue incrementando como se ilustra en la Figura 1 (Sección 14). Por ejemplo, una concentración de gasolina de 0.1% (v/v) inhibió el CM únicamente en un 6.90% mientras que en el caso en el que la gasolina está presente en 1% (v/v), el crecimiento microbiano se inhibió en un 68.69%. En los bioensayos que contenían 5 y 10% (v/v) de gasolina, la inhibición bacteriana fue total, ya que no se observó CM después del período de

incubación. Los valores de IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} , respectivamente fueron calculados por medio de la λ y se obtuvo que una concentración de gasolina de 0.24% (v/v) ocasiona una inhibición microbiana del 20%, mientras que si la concentración de contaminante es de 0.38% (v/v), la inhibición es del 50%. Finalmente, cuando la concentración de gasolina es de 2.44% (v/v), se registra una inhibición del 80% en el crecimiento microbiano.

8.3 Bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburo

Los bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburos se llevaron a cabo bajo condiciones aerobias durante 110 días de incubación. Dos reactores plásticos con 450 g de suelo por cada muestra caracterizada previamente fueron colocados dentro de la incubadora del LIA – USFQ a una temperatura de 30 ± 2 °C, dando un total de 12 biorreactores. Los biorreactores fueron monitoreados semanalmente con la finalidad de controlar la pérdida de humedad y proveer la cantidad de macro y micro nutrientes necesaria para mantener la actividad microbiana.

En base a los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica inicial de las muestras de suelo descrita previamente se establecieron los parámetros a ser monitoreados periódicamente durante el bioensayo de degradación. Los análisis que se realizarán son: concentración de amonio, conductividad, concentración de cloruro, DQO, humedad, materia orgánica y pH. Las Figuras 2 – 9 (Sección 14) presentan los resultados de la variación de los diferentes parámetros con respecto al tiempo en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs bajo condiciones aerobias en ensayos batch.

La Figura 2 muestra la variación en la concentración de amonio con respecto al tiempo de incubación en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs. La concentración inicial de amonio en los biorreactores AC es un orden de magnitud superior a la concentración en el resto de biorreactores, motivo por el cual los datos de monitoreo de este parámetro se presentan por separado. En la Figura 2A se ilustra la variación de la concentración de amonio con respecto al tiempo en los biorreactores AC, donde se puede observar que al inicio del bioensayo se registró una reducción significativa de 386.24 a 109.84 mg NH₄⁺ kg⁻¹ en el día 83 y posteriormente se estabilizó en dicho valor. La variación de la concentración de amonio con respecto al tiempo en los biorreactores MCR, MC, MAC, BC y T se presenta en la Figura 2B. En MCR la concentración inicial fue 32.99mg NH₄⁺ kg⁻¹, la cual aumentó en el día 83 llegando a 50.76mg kg⁻¹ mientras que en el día 101 esta cifra disminuyó hasta regresar casi a su valor inicial. En los biorreactores MC, MAC y BC se observa la misma tendencia que en los biorreactores MCR. Los biorreactores MC reportaron valores muy cercanos a los mostrados por los biorreactores MC con una concentración inicial de 39.55mg NH₄⁺ kg⁻¹, mientras que MAC tuvo los valores de amonio más bajos presentando 7.12mg kg⁻¹ como concentración inicial. BC por su parte tuvo una concentración inicial de amonio de 17.687mg kg⁻¹. Por otro lado en los biorreactores T, la concentración de amonio disminuyó paulatinamente con el tiempo de incubación, mostrando un valor inicial de 44.13mg kg⁻¹ y una concentración final de 10.31mg kg⁻¹.

En la Figura 3 se presenta la variación de la conductividad con respecto al tiempo de incubación en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs. En los biorreactores AC se observó un aumento pronunciado en la conductividad desde 503 hasta 1830.25µS cm⁻¹ luego de un mes de iniciado el bioensayo de degradación, pero posteriormente

este parámetro se estabilizó. En el caso de los biorreactores MCR y MC, la conductividad aumentó en el primer monitoreo y posteriormente descendió hasta estabilizarse en cifras cercanas a las reportadas en la caracterización inicial. En los biorreactores MCR el valor inicial de la conductividad fue $196.10\mu\text{S cm}^{-1}$, y luego de varios altibajos se estabilizó en $716.50\mu\text{S cm}^{-1}$ en el último monitoreo. Los biorreactores MC, presentaron un valor inicial de $250.60\mu\text{S cm}^{-1}$ el cual luego de algunos cambios se estabilizó en $750\mu\text{S cm}^{-1}$. Los biorreactores MAC y T reportaron los datos más bajos para conductividad. Los reactores MAC por su parte, presentaron $19.33\mu\text{S cm}^{-1}$ al inicio del ensayo, mostraron un notable incremento al cumplirse un mes del ensayo y posteriormente se mantuvo en $52.60\mu\text{S cm}^{-1}$. La conductividad en los biorreactores T fue inicialmente $25.79\mu\text{S cm}^{-1}$, dicho valor se incrementó hasta llegar a $103.28\mu\text{S cm}^{-1}$ luego de un mes de iniciado el ensayo, y posteriormente se estabilizó alrededor de $85\mu\text{S cm}^{-1}$. Los biorreactores BC al inicio del bioensayo contaban con una conductividad de $191.73\mu\text{S cm}^{-1}$ este valor fue ascendiendo hasta estabilizarse cerca de $400\mu\text{S cm}^{-1}$ en los dos últimos monitoreos.

En la Figura 4 se ilustra la variación en la concentración de cloruro con respecto al tiempo de incubación en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs. La concentración inicial de cloruro en los biorreactores AC es un orden de magnitud superior a la concentración del resto de biorreactores, motivo por el cual los datos de monitoreo de este parámetro se presentan por separado. En la Figura 4A se ilustra la variación de la concentración de cloruro con respecto al tiempo para los biorreactores AC, mientras que en la Figura 4B se presenta la variación del mismo parámetro para el resto de reactores. Los biorreactores AC, MCR y MC presentaron una reducción progresiva en este parámetro a

través del tiempo de incubación. La concentración de cloruro inicial de los biorreactores AC fue de $4779.38 \text{ mg kg}^{-1}$ y se redujo hasta $2063.18 \text{ mg kg}^{-1}$ al final del bioensayo. Los biorreactores MCR por su parte, registraron valores iniciales de $429.76 \text{ mg kg}^{-1}$ y terminaron con $161.46 \text{ mg kg}^{-1}$ de cloruro después de 110 días de incubación. En los biorreactores MC, la concentración de cloruro se redujo de 220.94 hasta 71.95 mg kg^{-1} en el día 57, pero en los monitoreos posteriores se estabilizó cerca de 100 mg kg^{-1} . En el caso particular de los biorreactores MAC, BC y T se observa una variación similar en la concentración de cloruro con respecto al tiempo de incubación. La presencia de cloruro en los biorreactores MAC, BC y T aumentó después de un mes de iniciado el bioensayo de degradación y posteriormente decreció. En el caso de los biorreactores MAC y T el cloruro se estabilizó alrededor de 20 y 30 mg kg^{-1} , respectivamente; mientras que los biorreactores BC presentaron una tendencia al alza en los dos siguientes monitoreos, estabilizándose alrededor de 40 mg kg^{-1} de cloruro.

La Figura 5 muestra la variación en la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo de incubación en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs. La DQO en los biorreactores AC es significativamente mayor a la DQO del resto de biorreactores, motivo por el cual los datos de monitoreo de este parámetro se presentan por separado. En la Figura 5A se ilustra la variación de la DQO con respecto al tiempo en los biorreactores AC, mientras que en la Figura 5B se presentan los resultados para el resto de reactores. En todos los casos, la DQO aumentó paulatinamente a través del tiempo de incubación. En los biorreactores AC la DQO aumentó de 17510.66 ; hasta alrededor de 20000 mg kg^{-1} luego de un mes, y continuó incrementándose hasta alcanzar un valor de 47000 mg kg^{-1} al final del bioensayo y se estabilizó. Los biorreactores MCR y MC presentaron un incremento exponencial en la DQO de 1390.78 y $970.98 \text{ mg kg}^{-1}$ hasta 6300.42 y

10897.77mg kg⁻¹, respectivamente al finalizar el ensayo de degradación. En el caso de los biorreactores MAC y T, la tendencia es similar pero con cambios menos drásticos, la DQO aumentó de 1472.39 y 915.10mg kg⁻¹ hasta 2997.86 y 8805.10mg kg⁻¹, después de 110 días de incubación. En los biorreactores BC, el comportamiento es bastante particular, pues su valor inicial de DQO fue 612.39mg kg⁻¹ el cual aumentó hasta 2941.94mg kg⁻¹ luego de un mes de iniciado el ensayo; en el tercer monitoreo se notó una reducción hasta 668.67mg kg⁻¹ y posteriormente se presentó un importante aumento el cual alcanzó 5177.00mg kg⁻¹ al final del bioensayo.

En la Figura 6 se ilustra la variación del porcentaje de humedad en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo de incubación en ensayos batch. El monitoreo de humedad, presentó una ligera fluctuación para todas las muestras, pero no se observó una diferencia significativa entre los valores iniciales y finales obtenidos para este parámetro.

La variación del porcentaje de materia orgánica en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo de incubación en ensayos batch se presenta en la Figura 7. Los biorreactores MCR, MC, MAC, BC y T presentaron una reducción progresiva en este parámetro mientras que en el caso de los biorreactores AC la disminución de este parámetro no es tan notable. Los valores de materia orgánica reportados por los biorreactores AC fluctúan entre 29.40% al inicio del bioensayo y 22.54% al final. En los biorreactores MCR, MC, MAC y BC, la cantidad de materia orgánica se redujo con el tiempo de incubación de 52.82, 53.66, 62.04 y 33.17% hasta 10.33, 7.04, 6.37 y 12.74 % en el último monitoreo. Los biorreactores T fueron los que mayor contenido de materia orgánica

presentaron al inicio del bioensayo con un importante 94.03%, el cual decayó en los dos meses siguientes hasta llegar aproximadamente a 20% y finalmente registró 13.03% en el último monitoreo.

El último parámetro físico-químico que formó parte de los monitoreos fue el pH, cuya variación en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs se presenta en la Figura 8. En términos generales este parámetro no presentó cambios significativos con el paso del tiempo de incubación en ninguno de los biorreactores. Los biorreactores AC, MCR, MC, MAC, BC y T reportaron valores iniciales de pH de 8.06, 6.47, 7.95, 4.97, 7.89 y 5.36 y después de 110 días de incubación valores finales de 7.32, 6.84, 7.70, 5.09, 7.87 y 5.99, respectivamente.

Adicionalmente se realizaron conteos microbianos tanto de colonias totales como de colonias degradadoras durante los ensayos de degradación. Los conteos microbianos totales se realizaron en los días 3, 66 y 90. La Figura 9 presenta la variación de las unidades formadoras de colonia (UFC) con respecto al tiempo de incubación. La población microbiana total de los biorreactores AC que inicialmente se encontraba en 10^6UFCg^{-1} suelo descendió hasta 10^5UFCg^{-1} suelo en los dos monitoreos, siendo ligeramente superior en el día 90 que en el día 66. En los biorreactores MCR la presencia de microorganismos aumentó ligeramente a los dos meses de iniciado el bioensayo y para el tercer mes vuelve a descender, siempre en el rango de 10^6UFC g^{-1} suelo. Los biorreactores MC presentaron un descenso en su población microbiana total luego del primer monitoreo pero para el final del bioensayo los microorganismos presentaron una recuperación, la población de esta muestra se encontró en 10^5UFC g^{-1} suelo. La cantidad de microorganismos totales en los biorreactores MAC fluctuó alrededor de

1×10^6 UFC g^{-1} suelo a lo largo del ensayo de degradación. En los biorreactores BC, el conteo microbiano total inicial fue de 7.95×10^5 UFC g^{-1} suelo el cual descendió dramáticamente hasta 1.82×10^5 UFC g^{-1} suelo luego de dos meses de iniciado el bioensayo pero se incrementó de la misma manera hasta 8.87×10^5 UFC g^{-1} suelo para el final del bioensayo. Con respecto a los biorreactores T, la población inicial fue de 1.14×10^6 UFC g^{-1} suelo, la cual decreció hasta 6.10×10^5 UFC g^{-1} suelo para el día 66 y sumó 9.61×10^5 UFC g^{-1} suelo en el último monitoreo.

En lo referente a la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos, los monitoreos se realizaron en los días 18, 73, 94 y la variación de la población de cada muestra con respecto al tiempo de incubación se representa en la Figura 10. Los biorreactores AC tuvieron una población degradadora de 10^4 UFC g^{-1} suelo hasta el día 63, pero al final del bioensayo, se dio un ligero aumento alcanzando un 10^5 UFC g^{-1} suelo. En el caso de los microorganismos presentes en los biorreactores MCR su población en general fue estable en el rango de 10^5 UFC g^{-1} suelo aunque en el día 73 se dio un ligero descenso. Con respecto a los microorganismos degradadores de los biorreactores MC se reportaron en 10^5 UFC g^{-1} suelo y luego se presentó un ligero incremento a partir del segundo monitoreo el cual se mantuvo hasta terminar el bioensayo. Los biorreactores MAC por su parte reportaron una población degradadora de 10^4 UFC g^{-1} suelo la cual aumentó notablemente de 1.19 a 4.65 desde el montaje del bioensayo hasta el último monitoreo. Los microorganismos degradadores en los reactores BC decrecieron notablemente en el día 73 pero posteriormente en el día 94 la población se recuperó incluso superando su conteo inicial. La muestra T presentó un incremento paulatino en su población degradadora la cual fue 1.92×10^4 UFC g^{-1} suelo inicialmente y al concluir el ensayo fue de 2.85×10^4 UFC g^{-1} suelo.

Durante los bioensayos de degradación, la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) se redujo con respecto al tiempo de incubación en casi todas las muestras de acuerdo a lo reportado en la Tabla 6 (Sección 13). En la muestra AC la concentración de TPHs bajó de 95434 hasta un valor superior a 50 000mg kg⁻¹. La muestra MCR que contaba inicialmente con 3567 disminuyó hasta 2889 mg TPHs kg⁻¹. Con respecto a MC, la concentración de TPHs disminuyó de 3113 a 1405mg kg⁻¹. En la muestra denominada MAC los TPHs disminuyeron de 4920 mg kg⁻¹ a 2760mg kg⁻¹. La muestra BC por su parte, contaba inicialmente con 682mg TPHs kg⁻¹ y este valor se mantuvo hasta el final del ensayo. En la muestra testigo T, la concentración de TPHs se mantuvo por debajo de 100 mg kg⁻¹.

9. Discusión

9.1 Caracterización físico-química y microbiológica de muestras de suelo contaminado

En base a los resultados de la caracterización físico-química de las 6 muestras de suelo contaminado con diferentes concentraciones de TPHs descritas en la Sección 8.1 se puede establecer que en la muestra altamente contaminada (AC) se registraron los valores más altos de la concentración de amonio, cloruro, conductividad, humedad y DQO. Estos valores exceden los niveles base de la muestra testigo por un factor de 8.8, 181.8, 19.5, 1.5 y 3.9, respectivamente. Estos resultados sugieren que la concentración de TPHs influye de alguna manera en estos parámetros, motivo por el cual dichas características fueron monitoreadas a lo largo del ensayo de biodegradación.

La concentración de amonio en la muestra AC, tuvo el valor más alto en relación con el resto de muestras, siendo un orden de magnitud más alto que en las muestras MCR, MC, BC y T, e incluso dos órdenes de magnitud superior a la muestra MAC.

El cloruro es un excelente indicador de contaminación agrícola, industrial y doméstica (Metcalf & Eddy, Inc., 2005), por lo que se espera encontrar concentraciones altas de este parámetro en muestras de suelos como AC que presenta una elevada concentración de TPHs producto de las actividades de la industria petrolera. En términos de la humedad, esta fue de aproximadamente 90%, este valor no es sorprendente teniendo en consideración que a simple vista la muestra presentaba mucha viscosidad producto de la alta concentración de TPHs. Grisso y colaboradores (2009) en su estudio sobre la conductividad eléctrica del suelo, ejemplifican que si un terreno que contiene el mismo tipo de suelo y una de las secciones se humedece periódicamente mientras que la otra no, la conductividad va a disminuir como consecuencia de que se ha incrementado la humedad propia del suelo. En el caso de las muestras de suelo evaluadas en este proyecto, la conductividad no disminuye con el incremento de humedad. Esto indica que la presencia de hidrocarburos interfiere directamente con la conductividad. Por lo tanto este parámetro no está relacionado con el porcentaje de humedad sino con el grado de contaminación. Con respecto al DQO, la muestra AC presentó el valor más elevado, siendo un orden de magnitud más alto que las muestras MCR, MAC y T y dos órdenes de magnitud superior a lo reportado por las muestras MC y BC. A pesar de que los datos parecerían indicar que el valor en DQO de la muestra AC se debe al alto nivel de contaminación, este parámetro no depende directamente de la cantidad de TPHs, puesto que las muestras MCR, MAC y T reportaron valores similares a pesar de que MCR y MAC contienen un orden de magnitud más TPHs que T. De igual manera, la muestra MC y BC que

reportaron un rango bajo de DQO, tienen diferencias en su cantidad de TPHs, siendo la muestra MC más contaminada en un factor de 4.5. El porcentaje de materia orgánica de AC es comparable con el de BC, sugiriendo que este parámetro no se ve afectado por la presencia de TPHs. El pH es uno de los parámetros más importantes a tener en consideración durante los procesos de biorremediación, puesto que un rango alrededor de 6 y 9 es el más óptimo para la vida (Metcalf & Eddy, Inc., 2005). La muestra AC a pesar de presentar un pH ligeramente alcalino se encuentra dentro de los límites antes mencionados. Contrario a lo que se podría pensar, esta muestra presentó el conteo total microbiano más alto con una población de 10^6 UFC g^{-1} suelo, pero únicamente el 3% corresponde a la población de bacterias degradadoras, por lo que probablemente la contaminación es reciente y por ende no ha transcurrido el tiempo suficiente para que las bacterias hayan podido adaptarse. De acuerdo a lo reportado por Madigan y colaboradores (2004), a pesar de que los microorganismos oxidantes de hidrocarburos crecen inmediatamente sobre la superficie de este compuesto, se ha visto que en condiciones ideales debe transcurrir aproximadamente un año a partir de haberse producido un derrame para que un 80% de los componentes no volátiles de hidrocarburos pueden ser oxidados por bacterias.

En términos generales, en las muestras que presentan contaminación mediana de hidrocarburos MCR y MC, los resultados de la concentración de amonio, conductividad, humedad y materia orgánica son muy similares entre sí y este hecho se puede atribuir a que la concentración de TPHs es también semejante. Los valores de cloruro y DQO son más altos en la muestra MCR y en el caso del pH el rango se encuentra entre 6.5 y 8. Los valores de amonio son muy similares a los niveles base de la muestra testigo. La concentración de cloruro de la muestra MCR es aproximadamente dos veces el valor de MC. Sin embargo, estos valores

son un orden de magnitud más bajos que aquellos de AC y un orden de magnitud más altos que el de la muestra testigo. En las dos muestras, los valores de conductividad son muy similares. Al comparar estos datos con los reportados en la muestra AC, se observa que la conductividad en MCR y MC es menor por un factor de 2 - 2.6. La humedad para MCR y MC se encuentra en el rango entre 20 – 25%, siendo cerca de la mitad de lo reportado en la muestra T y la cuarta parte de lo medido en AC. La materia orgánica se encuentra alrededor del 50% en ambos casos, aproximadamente el doble de lo reportado en la muestra AC pero casi la mitad de lo que se presenta en T. Con respecto a los conteos microbianos, MCR tiene una población total de 10^6 UFC g^{-1} suelo de la cual el 24% de microorganismos son degradadores. En el caso de MC, la tendencia es similar, con una población total de alrededor 10^5 UFC g^{-1} suelo y un importante 31% de microorganismos degradadores. Cabe recalcar que en estas dos muestras se presentó la mayor cantidad de población degradadora.

En el caso de la muestra MAC, la cual presenta una contaminación medianamente alta, se reportan los valores más bajos de amonio y conductividad. Esto probablemente debido a que el suelo es arenoso y bastante diferente en relación al resto de muestras. La concentración de amonio y cloruro están en el mismo orden de magnitud que BC aunque la concentración de hidrocarburos es 7.2 veces inferior en esta última. La concentración de DQO, humedad y materia orgánica se encuentran en el mismo rango que MC y MCR. Se ha reportado que existe una relación directa entre la conductividad y el tamaño de partículas, de modo que para suelos arenosos se esperan valores mínimos (Grisso, Alley, Holshouser, & Thomason, 2009). La muestra MAC se caracteriza por ser arenosa y por lo tanto presenta valores muy bajos de conductividad, concordando con lo expuesto anteriormente. Cabe indicar que el pH de esta muestra es ácido, lo cual podría afectar los ensayos de biorremediación. A pesar de lo

mencionado, en bioensayos de degradación con valores de pH alrededor de 5.2, no se presentó una inhibición total de la actividad microbiana en ensayos de degradación semejantes a los realizados en este estudio (Saadoun & Al-Ghzawi, 2005). El conteo microbiano total para MAC es el más bajo, lo cual puede ser atribuido a la acidez del suelo. La población degradadora reportada fue equivalente al 7% de la población total.

La muestra con baja contaminación (BC) presenta valores de conductividad semejantes a los de MCR aunque la concentración de hidrocarburos es cinco veces inferior. La concentración de amonio, cloruro y humedad son muy similares a los valores reportados en la muestra testigo. La concentración de DQO es bastante baja, de hecho es un orden de magnitud inferior a la muestra testigo. La humedad en este caso es aproximadamente del 50%, siendo este un valor bastante cercano al presentado en la muestra T, mientras que la cantidad de materia orgánica en BC se asemeja a la reportada en AC, siendo menor en un factor de 2.8 en comparación con el suelo testigo. Estos resultados ilustran que independientemente de la concentración de hidrocarburos, la materia orgánica es una característica propia de cada suelo y no se ve afectada por la presencia del contaminante. El pH por su parte, es casi el mismo que presentó la muestra MCR a pesar de que la concentración de TPHs para MCR es un orden de magnitud superior al encontrado en MCR. A pesar de que BC es una de las muestras con menor concentración de TPHs, el conteo microbiano total fue inferior al reportado por las muestras MC y MCR; y aproximadamente el 8% de su población total está formada por un consorcio degradador.

La muestra testigo, la cual cuenta con una cantidad de TPHs inferior a 100 mg kg^{-1} , se caracteriza por ser arenosa asemejándose a MAC. De todas las muestras analizadas en este

estudio, T y MAC presentan valores muy similares de conductividad y pH. Estudios realizados por Grisso y colaboradores (2009) sobre la conductividad eléctrica de los suelos, soportan la idea de que los suelos arenosos cuentan con valores de conductividad mínimos. La humedad de T por su parte, se presenta en un rango superior al reportado por las muestras MCR, MC, MAC y BC y menor al reportado en AC. Estos resultados confirman el hecho de que la humedad intrínseca en cada muestra no guarda relación con el nivel de contaminación de hidrocarburos. En términos del contenido de materia orgánica, esta muestra registra los valores más altos, seguida por la muestra MAC, a pesar de que los TPHs en MAC son alrededor de 5000 mg kg⁻¹. Físicamente en la muestra T se pudieron observar restos de hojarasca y de raíces que pese a ser retirados casi en su totalidad, seguro contribuyeron al 94.03% de materia orgánica presente en dicha muestra. En lo referente a la concentración de amonio y cloruro se puede establecer que los niveles base en suelo están dentro de rangos esperados. La población total se presenta en una cantidad semejante a la muestra MCR, pero en este caso cerca del 2% del consorcio tiene la capacidad de degradar hidrocarburos.

En términos generales se puede concluir que en todas las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos la concentración de cloruro se ve afectada principalmente por la presencia de TPHs, es decir conforme la concentración de TPHs se incrementa también aumenta el valor del ion cloruro. En el caso de la DQO, se observa la misma tendencia, es decir la DQO aumenta conforme se incrementa el grado de contaminación por hidrocarburos. La muestra testigo es la excepción, puesto que presenta valores más altos que aquellos reportados en las muestras contaminadas. Este fenómeno puede deberse a que tanto la materia orgánica como la materia inorgánica están sujetas a la oxidación durante el ensayo de medición de DQO

(Ramachandra, 2006) y como la muestra T reportó el valor más alto de materia orgánica, es posible que esta materia sea la que se está oxidando.

Los valores obtenidos de densidad, gravedad específica, porosidad y concentración de sulfato en todas las muestras de suelo contaminado no presentan diferencias significativas en comparación con los valores registrados en la muestra testigo. En base a estos resultados, se puede determinar que los parámetros antes mencionados son independientes del grado de contaminación con TPHs.

9.2 Ensayos de toxicidad

El efecto inhibitorio del hidrocarburo en el crecimiento microbiano fue evaluado en ensayos batch en presencia de concentraciones en aumento de gasolina empleando la muestra testigo. El rango de concentración de gasolina estudiado en los diferentes ensayos fue bastante bajo (< 10% (v/v) de gasolina) ya que la muestra testigo no presenta contaminación de TPHs. Así, se espera que los microorganismos presentes sean muy sensibles y no resistan altas concentraciones de contaminante.

La gasolina presente en los diferentes bioensayos resultó inhibitoria para el crecimiento microbiano (Figura 1). En base a los resultados obtenidos, se puede establecer que en los bioensayos con concentraciones bajas de gasolina (0.1 – 0.3% v/v), el crecimiento microbiano disminuye en forma lineal con la concentración del hidrocarburo en comparación con el ensayo control en el cual la actividad microbiana fue del 100%. Mientras que en el caso de los bioensayos con una concentración de gasolina mayor o igual a 0.4 % (v/v), la reducción en la población microbiana es mucho más pronunciada. Finalmente no se registró crecimiento

microbiano en presencia de concentraciones de 5 y 10 % (v/v) de gasolina. La concentración IC_{20} fue 0.24% gasolina (v/v). Este valor resulta importante pues indica que para obtener un crecimiento microbiano óptimo del 80% en comparación al control no inhibido, la concentración de TPHs en el suelo no debe exceder 0.24 % (v/v). En la literatura existen muy pocos estudios sobre la toxicidad de TPHs en términos de crecimiento microbiano en un medio sólido como el evaluado en este proyecto de investigación. En una tesis de pregrado realizada en 2010 por Valarezo se evaluó la toxicidad de TPHs en lodos activados por el método respirométrico. Se utilizó diésel como agente inhibitorio y glucosa como fuente de carbono, obteniéndose que un 0.014%(v/v) de diésel inhibe en un 50% la actividad microbiana. Si relacionamos los datos de la literatura con los del presente estudio de investigación, podemos concluir que la toxicidad de TPHs para los microorganismos de la muestra testigo evaluada en este estudio, es menor que para los microorganismos evaluados por Valarezo. Esto puede deberse a que el origen de la muestra testigo corresponde a un terreno aledaño a suelo que ha sufrido contaminación por hidrocarburos, por lo que la exposición al contaminante aunque haya sido mínima, contribuye al nivel de supervivencia presentado.

Por otro lado, un método que ha sido ampliamente usado y descrito para evaluar la toxicidad microbiana consiste en una prueba de luminiscencia, en la que se evalúa la intensidad de luz producida por *Vibrio fischeri* luego de ser expuesta a un contaminante durante 30 minutos, en relación a la intensidad que produce la misma bacteria en condiciones óptimas (Pico & Trujillo, s.f). En un estudio, en el que se realizaron ensayos de toxicidad por el método descrito anteriormente, se encontró que al igual que en los ensayos del presente

estudio, la inhibición de la luminiscencia fue mayor en las muestras que contenían mayor cantidad de TPHs (Chaineau, Yepremian, Vidalie, Ducreux, & Ballerini, 2003).

La toxicidad de TPHs se puede atribuir a la persistencia de estos contaminantes en el medio ambiente debido a la hidrofobicidad, el alto peso molecular y el impedimento esteárico, característicos de estos compuestos (Field, 2002). Un artículo científico, resalta que la toxicidad de los hidrocarburos se atribuye directamente a su baja solubilidad en agua, lo que incrementa su persistencia en el medio ambiente ya que el hidrocarburo va a acumularse en matrices sólidas en las que puede precipitar y afectar a la población microbiana indígena del lugar (Liu , Luo, Teng, Li, & Ma, 2010). Por otro lado, la estructura compleja y ramificada de los hidrocarburos ocasiona que estos compuestos al ser atacados por enzimas microbianas no se rompan y por lo tanto no se degraden, ocasionando un alto índice de muerte en comunidades microbianas (Field, 2002).

Los derrames de petróleo producen cambios en el medio ambiente que hacen que la vida microbiana desarrolle diferentes estrategias que les permite sobrevivir en ambientes tóxicos. Una de estas estrategias es la modificación de membrana celular, este cambio permite que funciones biológicas se lleven a cabo pese a la contaminación ambiental. Por otro lado, la producción de compuestos activos en la superficie celular e incluso la expulsión de fluidos se usa para disminuir la concentración de contaminantes y reducir así el grado de toxicidad (Tyagi, Da Fonseca, & De Carvalho, 2011).

9.3 Bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburos

En los biorreactores de degradación la humedad fue monitoreada y controlada semanalmente. Los parámetros físico-químicos tales como la concentración de amonio, concentración de cloruro, conductividad, DQO, humedad, materia orgánica y pH fueron evaluados periódicamente, mientras que la concentración de TPHs fue monitoreada al inicio y al final de los bioensayos. La población microbiana fue evaluada en tres ocasiones a lo largo de los 110 días de incubación.

La variación de la humedad interna de los biorreactores a lo largo del bioensayo pudo ser controlada semanalmente mediante la adición de medio nutritivo. En términos de la aireación esta fue realizada semanalmente brindando las condiciones ideales para el crecimiento microbiano. La aireación durante el ensayo de degradación es de suma importancia debido que la homogenización permite que se incremente el área de contacto del suelo contaminado con los microorganismos y en consecuencia se puedan llevar a cabo procesos de degradación (Saadoun & Al-Ghzawi, 2005).

En términos generales, la concentración de amonio, en todos los biorreactores excepto AC y T presentó un aumento en el monitoreo del día 80 y una estabilización hacia el final del bioensayo. En los monitoreos de concentración de cloruro se observa una disminución para casi todas las muestras a medida que los bioensayos de degradación avanzan. Con respecto a la conductividad, en la mayoría de biorreactores se incrementa en el primer monitoreo y posteriormente se estabiliza. En lo que a la DQO respecta, en todos los biorreactores se incrementa a través del tiempo. Por otro lado, la humedad y el pH en general varían de forma

no significativa para todos los biorreactores. La materia orgánica por su parte, se redujo desde el primer monitoreo, excepto en el caso de AC en el que se mantuvo estable.

La concentración de amonio mostró una reducción a lo largo del tiempo de incubación en el caso de las muestra AC y T. Esta disminución se puede atribuir a un proceso microbiano en el cual las bacterias transforman el amonio a nitrato bajo condiciones aerobias. Se ha demostrado que la aireación del suelo estimula la mineralización del nitrógeno orgánico, lo que incrementa la oxidación del amonio y por ende la producción del ion nitrato (Cavagnaro, Jackson, Hristova, & Scow, 2008). Estos resultados sugieren que la aireación tuvo mayor efecto en estas dos muestras, incrementando la actividad microbiana. En el caso de los reactores MCR, MC, MAC y BC, se presenta un incremento en la concentración de amonio en el día 83 como efecto de una amonificación en el suelo y posteriormente en el día 101 se observa un posible proceso de nitrificación en el cual la concentración de amonio se reduce y se forma el nitrato descrito previamente. Previamente, procesos de amonificación han sido descritos especialmente cuando una gran carga de materia orgánica se provee al sistema. Burger y Jackson (2003) en un estudio en el que se compara la amonificación y la nitrificación en cultivos convencionales y orgánicos, reportaron que independientemente del tipo de cultivo, la competencia entre microorganismos nitrificadores es mayor, por lo que la descomposición de materia orgánica y posterior liberación de amonio se presentó en un mayor porcentaje que la nitrificación. Se recomienda en estudios posteriores, monitorear la concentración del ion nitrato con respecto al tiempo a lo largo de los ensayos de biodegradación para corroborar la amonificación.

La concentración de cloruro en los biorreactores es otro parámetro fundamental que fue medido a lo largo de todo el bioensayo de degradación, pues como se mencionó anteriormente, es un indicador de contaminación industrial (Metcalf & Eddy, Inc., 2005). Por lo que su concentración en términos generales es mayor en los biorreactores que muestran mayor cantidad de TPHs. En un estudio en el que se caracterizaron muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, se reportó que los iones de cloruro fueron mayores en los suelos contaminados que en los suelos control. Durante el proceso de refinamiento de crudo, gran cantidad de cloruro en forma de hipoclorito de sodio y también en una suspensión $\text{CuSO}_4/\text{NH}_4\text{Cl}$ es utilizado, por lo que se puede dar lugar a una acumulación de este ion (Adebisi & Adeyemi, 2010). En el caso de los biorreactores MAC, se observa un patrón diferente en el que no existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de TPHs presentes y la cantidad de cloruro. En el estudio de caracterización de suelos que se describió anteriormente, se demostró que la presencia de sales inorgánicas pueden incrementar la concentración de cloruro en el suelo, pero en el caso de MAC se reportó una conductividad muy baja por lo que la ausencia de sales también se ve reflejada en la baja concentración de cloruro (Adebisi & Adeyemi, 2010). En todos los biorreactores, el cloruro disminuyó al inicio del bioensayo y posteriormente se estabilizó. En un estudio bibliográfico se reportó que un gran número de hongos presentes en el suelo en presencia de cloruro tienen la capacidad de formar compuestos órgano-clorados tales como cloro-metano como producto de su metabolismo durante el crecimiento. Estos organismos son capaces de transformar entre el 10 y el 90% del cloruro presente siempre y cuando se encuentre en concentraciones de 15 a 2000 mg kg^{-1} (Ober, 1998). En el presente estudio, todos los biorreactores presentan concentraciones de cloruro menores a 2000mg kg^{-1} , excepto AC, en cuyo caso también se

observó una reducción de concentración de cloruro. Se estima que en los reactores se pueden estar formando compuestos órgano clorados, por lo que se recomienda realizar estudios adicionales que permitan corroborar esta información.

La conductividad presentó un gran incremento en el caso de los biorreactores AC, hacia el final del bioensayo. Esto se puede atribuir a que los compuestos complejos que forman parte del hidrocarburo se están transformando en compuestos más simples como alcanos, alquenos y compuestos aromáticos durante este proceso de degradación (Tyagi, Da Fonseca, & De Carvalho, 2011). De acuerdo a una publicación de Friedman (2005), en el que se describe al suelo como una mezcla de diferentes componentes, se manifiesta que cada elemento tiene una conductividad propia, y que al medir el potencial eléctrico, el valor reflejado es una suma de estos valores. Por lo tanto, compuestos producto de la degradación, podrían contribuir al aumento la conductividad del suelo a lo largo del bioensayo. Debido a que la humedad dentro de los reactores fue controlada por medio de la adición del medio nutritivo y este contenía sales, se puede establecer una relación entre los resultados de conductividad y el medio nutritivo añadido semanalmente. En un estudio, se expone que el suelo es una matriz trifásica sólida-líquida-gaseosa, cuya única fase capaz de reportar potencial eléctrico es la acuosa (Friedman, 2005). De modo que si en los bioensayos de remediación del presente estudio, la humedad se controló por medio de un medio rico en sales, la consecuencia evidente es que se produzca un incremento inicial en la conductividad, el cual posteriormente puede estabilizarse como respuesta a una adaptación microbiana a los micro y macro nutrientes que se le están proveyendo.

La demanda química de oxígeno incrementó con el tiempo de incubación para todos los biorreactores, lo que sugiere que los hidrocarburos complejos están siendo degradados bajo condiciones aerobias generando como productos sustancias más simples solubles que pueden ser susceptibles de seguir siendo oxidadas y por ende detectadas por el método colorimétrico de medición de DQO. En el caso de los biorreactores que presentan la mayor contaminación (AC), se registra la concentración más alta de DQO a lo largo de todo el ensayo de biorremediación, especialmente entre el día 28 y 84, reportando una velocidad de producción de DQO de $485.95 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. En el resto de biorreactores, la DQO aumentó en proporciones diferentes hacia el final del bioensayo, por lo que las velocidades de producción de este parámetro fueron calculadas para los dos últimos monitoreos. La mayor velocidad de formación de DQO fue reportada por el biorreactor MC ($839.00 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$), seguido por T ($537.86 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$), BC ($351.73 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$), MCR ($227.36 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y finalmente MAC ($101.63 \text{mgDQO kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$). En base a estos resultados, se observa que no existe ninguna relación entre la velocidad de formación de DQO y el grado de contaminación de muestras, pero en todos los biorreactores excepto AC se observan valores de DQO estables que despuntan hacia el final del bioensayo. Este incremento puede explicarse porque a medida que el tiempo de incubación aumenta, también se incrementa la degradación de hidrocarburo, lo cual se ve reflejado en el incremento de microorganismos degradadores de TPHs que se presenta por medio de la Figura 11.

En términos de la humedad, se observó que ésta fue efectivamente controlada ya que los valores iniciales no sufrieron cambios bruscos a lo largo del tiempo de incubación, lo que indica que la adición de medio líquido nutritivo ayudó a mantener la concentración adecuada de humedad y adicionalmente al contener micro y macronutrientes, contribuyó al equilibrio

entre carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P). El mismo hecho se presentó en un estudio realizado por Mukherjee y Bordoloi (2011), en el cual la humedad interna de los microcosmos de remediación se mantuvo mediante la adición de un medio nutritivo similar al utilizado en el presente estudio. Las moléculas C, N y P son de suma importancia para la vida microbiana ya que favorecen a la estructura celular, al transporte de nutrientes y a una gran cantidad de procesos metabólicos (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

Con respecto a la materia orgánica, en los biorreactores AC, la cantidad de materia orgánica presente se redujo en un 25% a lo largo de 110 días de incubación. En los biorreactores BC, la materia orgánica se redujo hasta en un 61.6%. Cambios más radicales se observaron en los biorreactores MCR cuyo porcentaje bajó en un 80.5%, en MC y T se registró un descenso de 86% y finalmente en los biorreactores MAC la cantidad de materia orgánica se redujo en un 90%. Liu y colaboradores (2010) en sus estudios sobre biorremediación de lodo contaminado con TPHs mediante estimulación de microorganismos indígenas, reportaron que luego de 360 días de ensayo no sólo se redujo la concentración de TPHs en cerca de un 50%, sino también la presencia de materia orgánica en un 25%. El porcentaje de reducción de materia orgánica en el estudio citado anteriormente, coincide con lo reportado por AC. Incluso se puede observar un mayor índice de remoción de materia orgánica en el resto de reactores del presente estudio, a pesar de que el tiempo de incubación fue menor que en el caso de Liu y colaboradores (2010). Por otro lado, en los monitoreos se pudo observar una relación entre los cambios suscitados en la conductividad y en la materia orgánica. De acuerdo a un estudio, en el que se evaluó la estabilidad de la materia orgánica tanto en condiciones aerobias como anaerobias, se demostró que existe una relación inversamente proporcional entre la conductividad y la materia orgánica independientemente

del oxígeno (Kolar, Ledvina, Kuzel, Klimes, & Stindl, 2006). Esto sustenta los resultados de dichos parámetros en el presente estudio, en los que a medida que la materia orgánica se reduce, la conductividad se incrementa. Para terminar, resulta importante recalcar que la reducción de materia orgánica es beneficioso para los bioensayos de degradación, pues se ha reportado que cuando el suelo contiene gran cantidad de arena y materia orgánica la biodisponibilidad del contaminante disminuye debido a que se adhiere a estos elementos (Maila & Cloete, 2004).

El pH de los biorreactores no cambió de forma significativa durante los bioensayos de degradación de suelo contaminado con TPHs. El pH en todos los biorreactores se mantuvo en el rango de 4.89 a 8.50. Cabe indicar que el rango es tan amplio debido a que algunas muestras presentaron un pH ligeramente alcalino y otras ligeramente ácido. El hecho de que la variación de pH haya sido bastante limitada resulta beneficioso para los procesos de degradación, ya que cambios bruscos en este parámetro puede resultar en condiciones de estrés para los microorganismos. Esto evitaría un desarrollo óptimo y por lo tanto afectaría el proceso de biorremediación de TPHs. Se ha reportado que cuando el pH es controlado durante los ensayos de biodegradación, se evita que los ácidos orgánicos y minerales que se pueden producir como resultado del metabolismo microbiano afecten el equilibrio ecológico de los consorcios (Saadoun & Al-Ghzawi, 2005). Esto es fundamental ya que la presencia de cada miembro de la comunidad microbiana permite que los procesos de degradación se puedan llevar a cabo de la mejor manera.

En términos de los parámetros físico-químicos monitoreados en los diferentes biorreactores a lo largo del proceso de incubación se puede concluir que aquellos que se

relacionan con la contaminación como el cloruro, se fueron asemejando a los niveles reportados como base en los biorreactores testigo. En un estudio de biorremediación in situ similar al del presente trabajo de investigación, en el que muestras de suelo fueron incubadas a 25 °C por aproximadamente 360 días, se demostró que el suelo luego de ser tratado fue más apto para la agricultura y que la actividad microbiana mejoró tanto en el suelo contaminado como en la muestra testigo (Liu , Luo, Teng, Li, & Ma, 2010). Por lo tanto, se sugiere la realización de ensayos complementarios, en los que se evalúe la germinación de semillas en las muestras de suelo remediado.

En todos los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs, la población microbiana total decreció durante el tiempo de incubación. Esto pudo deberse a que las bacterias presentes carecían de viabilidad. Es decir que a pesar de que se encontraban presentes no eran capaces de reproducirse o no se encontraban lo suficientemente adaptadas como para persistir en el medio (Madigan, Martinko, & Parker, 2004). Mukherjee y Bordoli (2011) en un estudio sobre biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, llevaron a cabo ensayos de biodegradación con la ayuda de desechos de cerdo y como consecuencia el conteo de bacterias heterotróficas en sus ensayos se incrementó de 10^7 a 10^{15} a los 180 días de iniciado el ensayo. En el caso de este proyecto de investigación, en el que no se realizó bioaumentación sino únicamente bioestimulación, no existe un agente externo que contribuya a que la población microbiana se incremente de forma significativa.

La concentración de TPHs en cada biorreactor fue evaluada al inicio y al final de los bioensayos de degradación de suelo contaminado con hidrocarburos. Los datos sugieren que efectivamente el hidrocarburo representado como TPHs fue exitosamente degradado bajo

condiciones de aireación en bioensayos batch. El porcentaje de degradación de TPHs no presenta relación con el grado de contaminación por hidrocarburos, es así que en los biorreactores con contaminación alta (AC) se registra un porcentaje de degradación comparable con los biorreactores MC y MAC. Estos datos son consistentes con los resultados del monitoreo de bacterias degradadoras en los diferentes biorreactores, en los que se observa que la población aumentó. Los consorcios degradadores en AC y MAC se incrementaron en un 66.2 y 74.4%, respectivamente. Cabe indicar que en estos dos biorreactores se obtuvo una reducción en la concentración de TPHs mayor a 50%. Los biorreactores MC presentaron un aumento de microorganismos degradadores de hidrocarburos de apenas un 9.7%, a pesar de que la reducción de TPHs fue comparable a la obtenida en los biorreactores AC y MC. En el caso de los biorreactores MCR la población se mantuvo estable lo cual concuerda de alguna manera con el 19% de reducción en la concentración de TPHs. Estos datos sugieren una relación entre los microorganismos degradadores y la reducción en la concentración de TPHs por lo que se puede afirmar que procesos de degradación aerobia de TPHs se llevaron a cabo en los biorreactores estudiados en este proyecto de investigación. En ensayos de degradación *in situ* de hidrocarburos mediante bioestimulación, se ha reportado que la población degradadora de TPHs se incrementó únicamente en un 25% luego de 360 días de ensayo (Liu , Luo, Teng, Li, & Ma, 2010). En base a los datos, se puede concluir que los microorganismos respondieron de manera óptima al proceso de bioestimulación realizado en el presente estudio. Liu y colaboradores (2010) resaltan que los índices de degradación de hidrocarburos dependen en gran medida de la composición de comunidades microbianas y su adaptación a la presencia de hidrocarburos. Finalmente, si bien es cierto que la disminución de la concentración de TPHs con el tiempo de incubación en los diferentes biorreactores se puede atribuir a un

metabolismo microbiano aerobio activo, la volatilización de los hidrocarburos totales de petróleo también puede ser responsable en cierta medida por dicha disminución. De acuerdo a la US Environmental Protection Agency (EPA), las fracciones ligeras de hidrocarburo comúnmente son las primeras en reducirse por medio de volatilización mas no por procesos de degradación (EPA , 1994), esto pudo haberse llevado a cabo durante la aireación semanal de suelo en los biorreactores. Estudios adicionales deben realizarse para determinar en qué grado la reducción en la concentración de TPHs se puede atribuir al proceso de degradación y al proceso de volatilización, respectivamente.

Para terminar, los bioensayos de degradación de suelo contaminado con TPHs fueron exitosos. Las propiedades del suelo contaminado mejoraron con el tiempo de incubación y la presencia del contaminante se redujo en gran medida como resultado de la actividad de consorcios degradadores de TPHs presentes en las muestras de suelo y en cierta medida también por procesos de volatilización.

10. Conclusiones

Las seis muestras de suelo contaminado con TPHs fueron caracterizadas de acuerdo a sus propiedades físico-químicas y microbiológicas. Los ensayos de toxicidad microbiana demostraron que los TPHs representados como gasolina inhibieron el crecimiento microbiano en concentraciones muy bajas. Los bioensayos de degradación fueron efectivos en la reducción de concentración de TPHs en los biorreactores AC, MCR, MC y MAC. En términos generales se puede concluir que la concentración de cloruro está directamente relacionada con el grado de contaminación por hidrocarburos en las diferentes muestras de suelo.

11. Recomendaciones

En estudios posteriores, se recomienda emplear muestras de suelo contaminado con TPHs que se caractericen por tener el mismo origen, de modo que las propiedades de cada una puedan compararse solamente en base a las diferentes concentraciones de hidrocarburo y los efectos del contaminante en el suelo.

Para complementar el presente estudio, se recomienda que en trabajos futuros, las bacterias degradadoras de hidrocarburos sean aisladas e identificadas por medio de técnicas de biología molecular.

Durante la aplicación en el campo de la tecnología de biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos desarrollada en este trabajo de investigación se sugiere la adición de desechos agronómicos y agentes surfactantes para incrementar la disponibilidad del contaminante y garantizar una remediación más eficiente.

12. Bibliografía

- Adebiyi, F., & Adeyemi, A. (2010). Characterisation of the petroleum hydrocarbons-contaminates soils around petroleum products depot. *Chemistry and Ecology*, 26(2), 137-146.
- American Petroleum Institute. (15 de Noviembre de 2003). *Test Plan and Robust Summary for Crude Oil*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2013, de <http://www.epa.gov/oppt/chemrtk/pubs/summaries/crdoilct/c14858tc.htm>
- APHA. (n.d.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC, 200005.
- Araujo, A. (2012). *Petroamazonas se consolida como petrolera estatal*. Recuperado el 28 de noviembre de 2013, de El Comercio: http://www.elcomercio.ec/negocios/petroleo-Petroamazonas-petroleo_ecuatoriano-petrolera-estatal_0_811119052.html
- ASTM. (n.d.). *Annual Book of Standards, Volumes 11.01 and 11.02, D19 Water*. West Conshohocken, PA, 19428.
- Balba, M., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assesment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 155-164.
- Banco Central del Ecuador. (2013). *Estadísticas Macroeconómicas - Presentación Conyutural*. Quito: Banco Central del Ecuador.
- Burger, M., & Jackson, L. (2003). Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 29-36.
- Cavagnaro, T., Jackson, L., Hristova, K., & Scow, K. (2008). Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil . *Applied Soil Ecology*, 13-18.
- Chaineau, C., Yepremian, C., Vidalie, J., Ducreux, J., & Ballerini, D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted soi: biodegradation, leaching and toxicity assesments. *Water, Air and Soil Pollution*, 144, 419-440.
- Cline, J. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 454-458.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Paraninfo.

- Currin, C. A., Delano, P. C., & Valdes-Weaver, L. M. (2008). Utilization of a citizen monitoring protocol to assess the structure and function of natural and stabilized fringing salt marshes in North Carolina. *Wetlands Ecol Manage*, 97-118.
- El Comercio. (2012). *Quinto derrame de hidrocarburos en Ecuador este año*. Recuperado el 23 de 09 de 2012, de El Comercio: http://www.elcomercio.com/negocios/Quinto-derrame-hidrocarburos_0_695930632.html
- El Universo. (2012). *Ecuador registró más de \$1000 millones por venta de crudo en abril*. Recuperado el 04 de 11 de 2012, de El Universo: <http://www.eluniverso.com/2012/05/31/1/1356/ecuador-registromas-1000-millones-venta-crudo-abril.html>
- EPA . (1994). Chapter IV. Biopiles. 1-27.
- EPA. (n.d.). *US EPA New England Region 1 Library*. Boston, MA, 02109.
- EPETROECUADOR. (2006). *Exploración de crudo en el Ecuador*. Quito.
- EPETROECUADOR. (2010). *El petróleo en Ecuador*. Quito.
- EPETROECUADOR. (2011). *Informe Anual* . EPETROECUADOR, Quito.
- Ercoli, E. (2008). Biorremediación de suelos: desde el concepto a su aplicación. *Supervisión y Fiscalización Ambiental*.
- Feininger, T. (1975). Origin of Petroleum in the Oriente of Ecuador. *AAPG Bulletin*.
- Field, J. (2002). Limits of anaerobic biodegradation. *Water Science and Technology* , 45(10), 9-18.
- Friedman, S. (2005). Soil properties influence apparent electrical conductivity: a review. . *Computers and Electronics in Agriculture*, 45-70.
- Gil, I. (13 de junio de 2013). *BBC Mundo*. Recuperado el 28 de noviembre de 2013, de Por qué hay un derrame petrolero por semana en Ecuador? : http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2013/06/130610_ciencia_ecuador_derrame_rio_limpieza_ig.shtml
- Grisso, R., Alley, M., Holshouser, D., & Thomason, W. (2009). Precision Farming Tools: Soil Electrical Conductivity. *Virginia Cooperative Extension*, 442-508.
- Jorgensen, K., Puustinen, J., & Suortti, A. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107, 245-254.

- Joynt, J., Bischoff, M., Turco, R., Konopka, A., & Nakatsu, C. (2006). Microbial Community Analysis of Soils Contaminated with Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. *Microbial Ecology*.
- Kolar, L., Ledvina, R., Kuzel, S., Klimes, F., & Stindl, P. (2006). Soil organic matter and its stability in aerobic and anaerobic conditions. *Soil and Water Research*, 57-64.
- Kudjo, E. (2009). Bioremediation of Contaminated Soils: What It Is and How To Do It.
- Liu, W., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z., & Ma, L. (2010). Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environment Geochemistry and Health*, 32, 23-29.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Illinois : Pearson.
- Maila, M., & Cloete, T. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 3, 349-360.
- Marin, J., Hernández, T., & García, C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 98, 185-195.
- McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2005). Basic Soil Properties.
- Metcalf & Eddy, Inc. (2005). *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*. New York: McGraw Hill .
- Ministerio de Ambiente del Ecuador. (2013). *Ministerio de Ambiente del Ecuador*. Recuperado el 28 de noviembre de 2013, de Sistema de Indicadores de Pasivos Ambientales y Sociales: <http://www.sipas-pras.gob.ec/sipasweb/#>
- Mishra, S., Jyot, J., Chander, R., & Lal, B. (2001). In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Current Microbiology*, 328-335.
- Mukherjee, A., & Bordoloi, N. (2011). Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environment Science and Pollutant Research*, 18, 471-478.
- Nimmo, J. (2004). Porosity and pore size distribution. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 295-303.
- Nomack, M. (2010). *Environmental impacts of oil spills*. Recuperado el 28 de noviembre de 2013, de The Encyclopedia of Earth: <http://www.eoearth.org/view/article/158443/>

- Oberg, G. (1998). Chloride and organic chlorine in soil. *Acta of hydrochemistry and hydrobiology*, 137-144.
- Oberg, G. (1998). Chloride and organic chlorine in soil. *Acta of hydrochemistry and hydrobiology*, 137 - 144.
- Ochoa, V., Banihani, Q., León, G., Khatri, C., Field, J., & Sierra, R. (2009). Toxicity of fluoride to microorganisms in biological. *Water Research*, 43, 3177-3186.
- Paliwal, V., Puranik, S., & Purohit, H. (2012). Integrated Perspective for Effective Bioremediation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 903-924.
- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Red de Revistas Científicas de América Latina y El Caribe, España y Portugal*, 2(002), 40-49.
- Pico, Y., & Trujillo, G. (s.f). *Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria Vibrio fischeri*. Recuperado el 28 de noviembre de 2013, de Ensayos aplicables a más de una matriz: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap20.pdf>
- Ramachandra, T. (2006). *Soil and Groundwater Pollution from Agricultural Activities*. New Delhi: TERI Press.
- Reddy, C., Eglinton, T., Hounshell, A., White, H., Li, X., Gaines, R., y otros. (2002). The West Falmouth Oil Spill after thirty years: the persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments. *Environmental Science and Technology*, 36, 4754-4760.
- Saadoun, I., & Al-Ghzawi, Z. (2005). Bioremediation of Petroleum Contamination. En M. Fingerman, & R. Nagabhushanam, *Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. Louisiana: Science Publishers.
- Scheffer, F., & Schachtschabel. (2010). *Lehrbuch der Bodenkunde*. Berlin: Spektrum.
- Thapa , B., Kumar, A., & Ghimire, A. (2012). Review on Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants in Soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8(1), 164-170.
- Trujillo, R. (2010). *Hidrocarburos Manejo Seguro* . Bogotá.
- Tyagi, M., Da Fonseca, M., & De Carvalho, C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231-241.

US EPA. (2011). *Hazard Characterization Document - Crude oil*. Recuperado el 01 de 11 de 2013, de http://www.epa.gov/chemrtk/hpvis/hazchar/Category_Crude%20Oil_March_2011.pdf

Valarezo, N. (2010). Efecto de la concentración de la biomasa y la presencia de aceites vegetales, aceites vegetales quemados, sales e hidrocarburos en lodos activados. *Tesis de pregrado como requisito para la obtención del título de Ingeniería Ambiental*.

13. Tablas

Tabla 1. Descripción de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos en función del lugar de recolección de las muestras y al proyecto de la empresa CORENA S.A al cual pertenece.

	Contaminación	Origen	Proyecto	DESCRIPCIÓN
AC	alta	piscina 1A	Rio Napo	Fondos de Tanque contaminados con hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera de RIO NAPO en la Joya de los Sachas. Este suelo se encuentra en una piscina con abundante agua lluvia que se ha almacenado de manera natural. La piscina se encuentra en el Centro de Tratamiento Lágrimas de Conejo de CORENA S.A. ubicado en Lago Agrio vía Dureno en Campo Libertador Shushuqui
MCR	media	piscina pequeña s/n	MKP Guanta	Suelo más un poco de lastre contaminado con una cantidad mínima de hidrocarburo proveniente de Sucumbios. Se encuentra en una piscina pequeña cubierta y totalmente seco. Se lo voltea de manera continua. La piscina se encuentra en el Centro de Tratamiento Lágrimas de Conejo de CORENA S.A. ubicado en Lago Agrio vía Dureno en Campo Libertador Shushuqui
MC	media	piscina pequeña s/n	Minga	Suelo contaminado con hidrocarburo de Shushufindi estación central de Minga. Se encuentra en una piscina pequeña cubierta y totalmente seco. Se lo voltea de manera continua en el Centro de Tratamiento Ambiental La Parker de CORENA S.A. ubicado en la Joya de los Sachas.

	Contaminación	Origen	Proyecto	DESCRIPCIÓN
MAC	media alta	piscina pequeña s/n	Halliburton	Vegetación contaminada con hidrocarburo y suelo proveniente de auca 53 Dayuma -Orellana. Se secó en piscina pequeña cubierta y se usó en compostaje. Se lo volteó de manera continua en el Centro de Tratamiento Ambiental La Parker de CORENA S.A. ubicado en la Joya de los Sachas.
BC	baja	CTA - piscina 4	OCP - winchele	Suelo contaminado con hidrocarburo proveniente del estero del Río Winchele debido al derrame de OCP en la provincia de Esmeraldas. Se encuentra en una piscina no cubierta en el Centro de Tratamiento Ambiental La Parker de CORENA S.A. ubicado en la Joya de los Sachas.
T	baja	campo	-	Suelo del terreno aledaño al CDT Lagrimas de Conejo en Lago Agrio

Tabla 2. Caracterización físico-química de las muestras de suelo contaminado con TPHs expresadas por base seca en función de la concentración de amonio, color, concentración de cloruro, conductividad, densidad, DQO y la concentración de fluoruro (parte I)

Muestra	Amonio mg kg ⁻¹	Color	Cloruro mg kg ⁻¹	Conductividad uS cm ⁻¹	DQO mg kg ⁻¹	Densidad g cm ⁻³	Fluoruro mg kg ⁻¹
AC	386.24 ± 27.30	Negro	4779.38 ± 194.78	503.00 ± 8.64	17510.66 ± 94.14	1.82 ± 0.04	6.80 ± 0.44
MCR	32.99 ± 1.75	Negro	429.76 ± 27.15	196.10 ± 9.20	1390.78 ± 14.64	2.44 ± 0.01	0.13 ± 0.01
MC	39.55 ± 1.98	Negro	220.94 ± 8.02	250.60 ± 16.20	970.98 ± 32.37	2.61 ± 0.00	0.56 ± 0.08
MAC	7.12 ± 0.07	Rojizo	46.74 ± 7.29	19.33 ± 1.38	1472.39 ± 51.97	2.29 ± 0.01	0.06 ± 0.00
BC	17.68 ± 1.28	Gris	27.53 ± 1.86	191.73 ± 1.07	612.39 ± 26.63	2.35 ± 0.03	1.65 ± 0.14
T	44.13 ± 2.02	Café oliva	26.30 ± 2.89	25.79 ± 1.38	4484.42 ± 133.86	1.61 ± 0.89	0.06 ± 0.01

Tabla 3. Caracterización físico-química de las muestras de suelo contaminado con TPHs en base seca en función de la gravedad específica, porcentaje de humedad, porcentaje de materia orgánica, pH, porcentaje de porosidad, concentración de sulfato, concentración de sulfuro y concentración de TPHs (parte II)

Muestra	Gravedad Específica	Humedad * %	Materia orgánica %	pH	Porosidad %	Sulfato mg kg ⁻¹	Sulfuro mg kg ⁻¹	TPHs mg kg ⁻¹
AC	1.82 ± 0.04	89.29 ± 1.33	29.40 ± 1.09	8.06 ± 0.02	13.64 ± 1.67	n/d	60.92 ± 2.49	95434
MCR	2.44 ± 0.01	20.22 ± 0.20	52.82 ± 2.18	6.47 ± 0.05	46.04 ± 0.81	n/d	9.47 ± 0.39	3567
MC	2.61 ± 0.00	25.70 ± 0.29	53.66 ± 0.80	7.95 ± 0.04	57.60 ± 0.20	n/d	26.70 ± 0.74	3113
MAC	2.29 ± 0.01	29.30 ± 0.38	62.40 ± 1.09	4.97 ± 0.09	53.17 ± 0.89	n/d	26.34 ± 0.79	4920
BC	2.35 ± 0.03	49.30 ± 0.36	33.17 ± 2.07	7.89 ± 0.08	15.53 ± 1.42	n/d	33.60 ± 0.70	682
T	1.61 ± 0.54	58.04 ± 0.76	94.03 ± 0.71	5.36 ± 0.04	77.20 ± 1.87	n/d	24.54 ± 0.51	<100

n/d: no detectado

* característica analizada en base húmeda

Tabla 4. Caracterización inicial de las muestras de suelo contaminado con TPHs en función del análisis granulométrico

Tamaño de orificio en tamiz (μm)	AC	MCR	MC	MAC	BC	T
	%	%	%	%	%	%
>2000	69,10 \pm 0,39	82,63 \pm 0,11	66,46 \pm 0,36	74,31 \pm 0,04	23,21 \pm 0,56	68,92 \pm 0,18
>1000	12,32 \pm 0,17	9,30 \pm 0,35	26,13 \pm 0,42	14,99 \pm 0,05	14,64 \pm 0,30	20,81 \pm 0,09
500-710	7,43 \pm 0,38	5,99 \pm 0,19	6,13 \pm 0,03	7,71 \pm 0,02	39,36 \pm 1,15	5,82 \pm 0,34
>355	2,34 \pm 0,02	1,26 \pm 0,11	0,60 \pm 0,02	1,70 \pm 0,03	10,94 \pm 0,14	1,44 \pm 0,08
0-250	8,80 \pm 0,57	0,82 \pm 0,06	0,68 \pm 0,02	1,29 \pm 0,04	11,85 \pm 0,65	3,02 \pm 0,05

Tabla 5. Caracterización microbiológica de las muestras de suelo contaminado con TPHs

	Totales	Degradadoras
	UFC g⁻¹ suelo	UFC g⁻¹ suelo
AC	2.33E+06	7.82E+04
MCR	1.14E+06	2.71E+05
MC	8.13E+05	2.56E+05
MAC	1.63E+05	1.19E+04
BC	7.95E+05	6.24E+04
T	1.14E+06	1.92E+04

Tabla 6. Concentración de TPHs reportado en base seca en las muestras de suelo contaminado al inicio y al final de los bioensayos de degradación

	TPHs iniciales	TPHs finales
	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹
AC	95434	>50000
MCR	3567	2889
MC	3113	1405
MAC	4920	2760
BC	682	500
T	<100	<100

14. Figuras

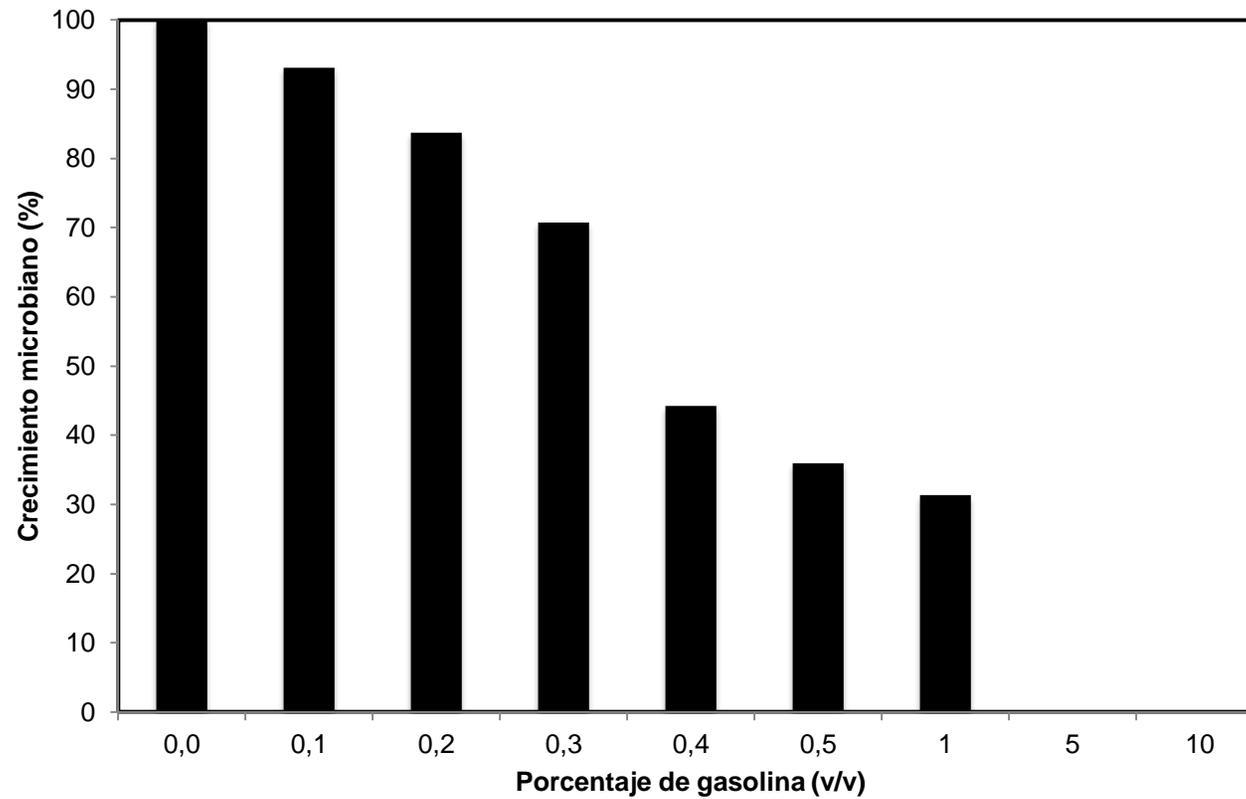


Figura 1. Ensayo de toxicidad microbiana que muestra el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de gasolina en el crecimiento microbiano de la muestra testigo (T) luego de 48 horas de incubación a 30°C.

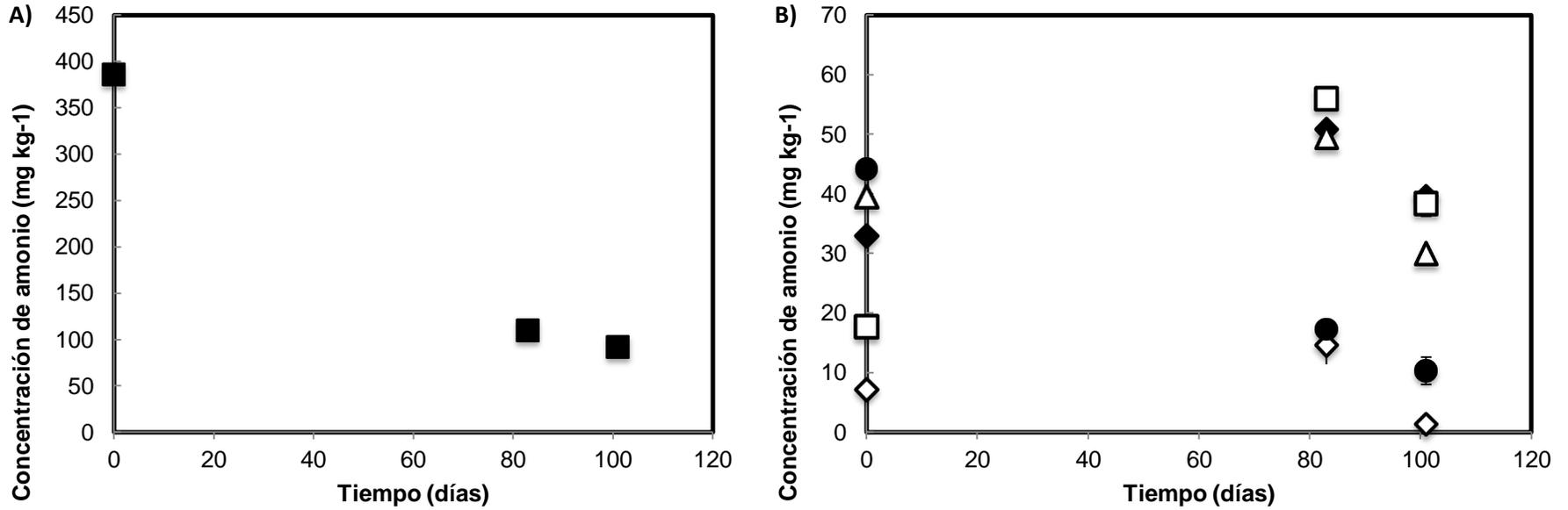


Figura 2. Variación de la concentración de amonio en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: a) (■) AC y b) (◆) MCR, (Δ) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

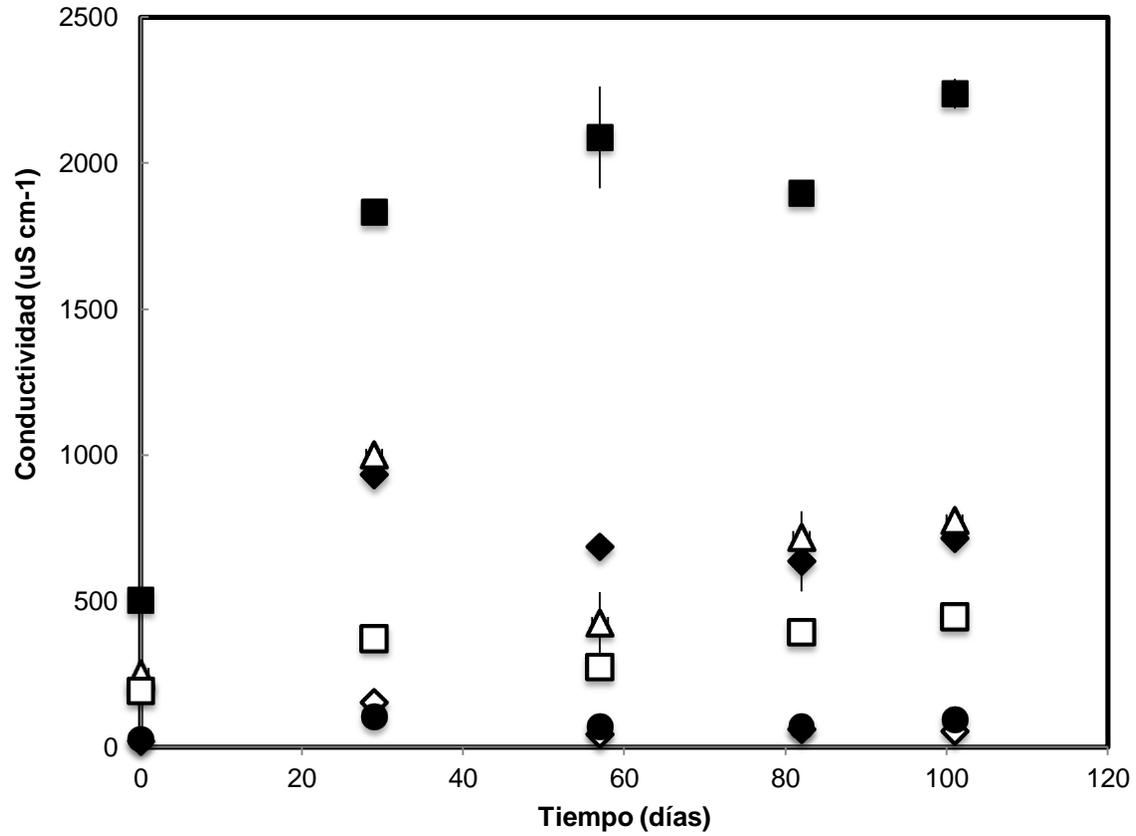


Figura 3. Variación de la conductividad en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (△) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T.

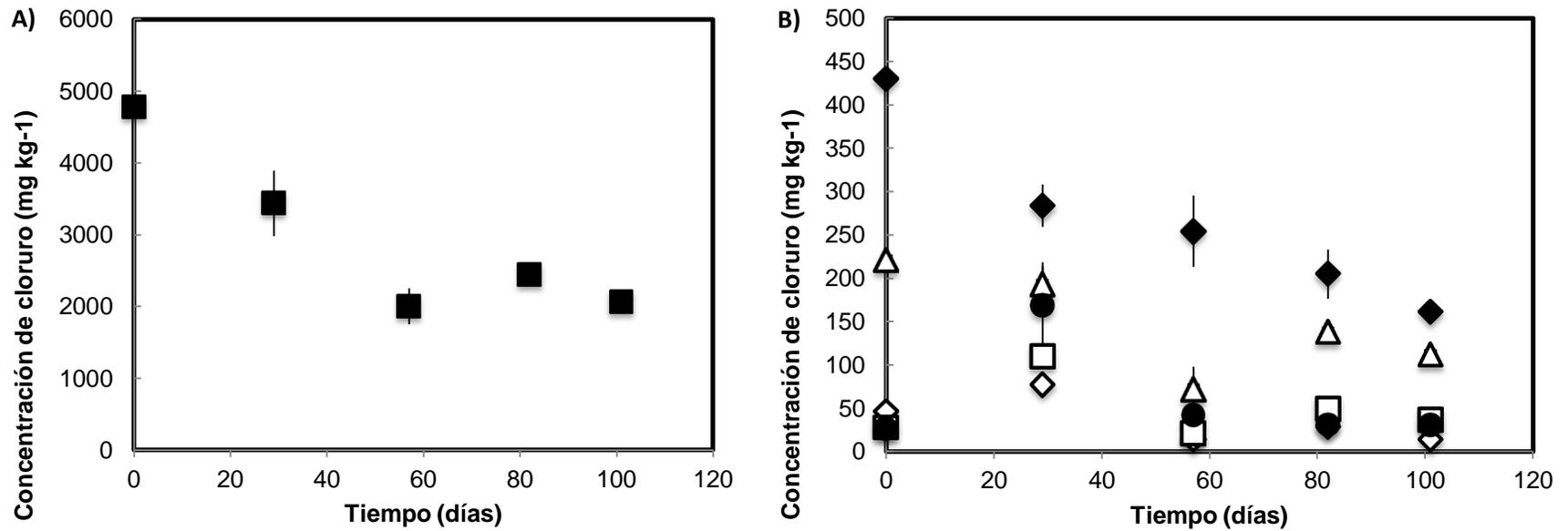


Figura 4. Variación de la concentración de cloruro en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: a) (■) AC y b) (◆) MCR, (Δ) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

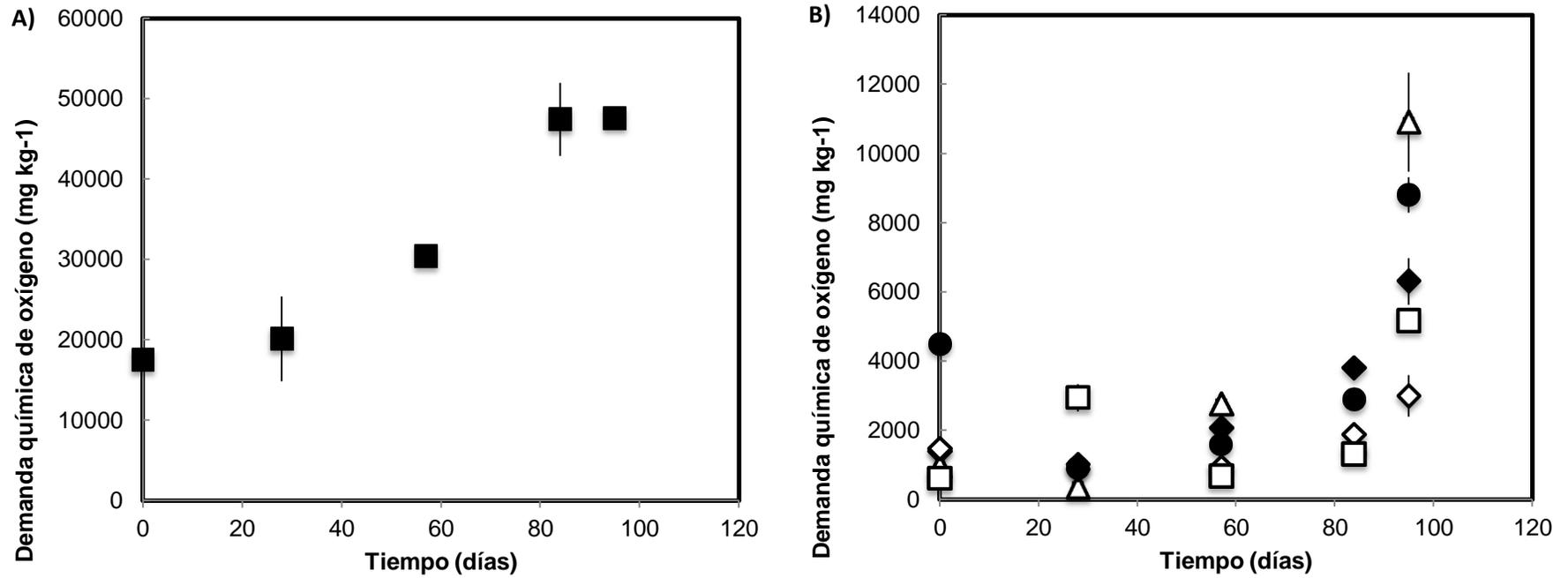


Figura 5. Variación de la demanda química de oxígeno en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: a) (■) AC y b) (◆) MCR, (Δ) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

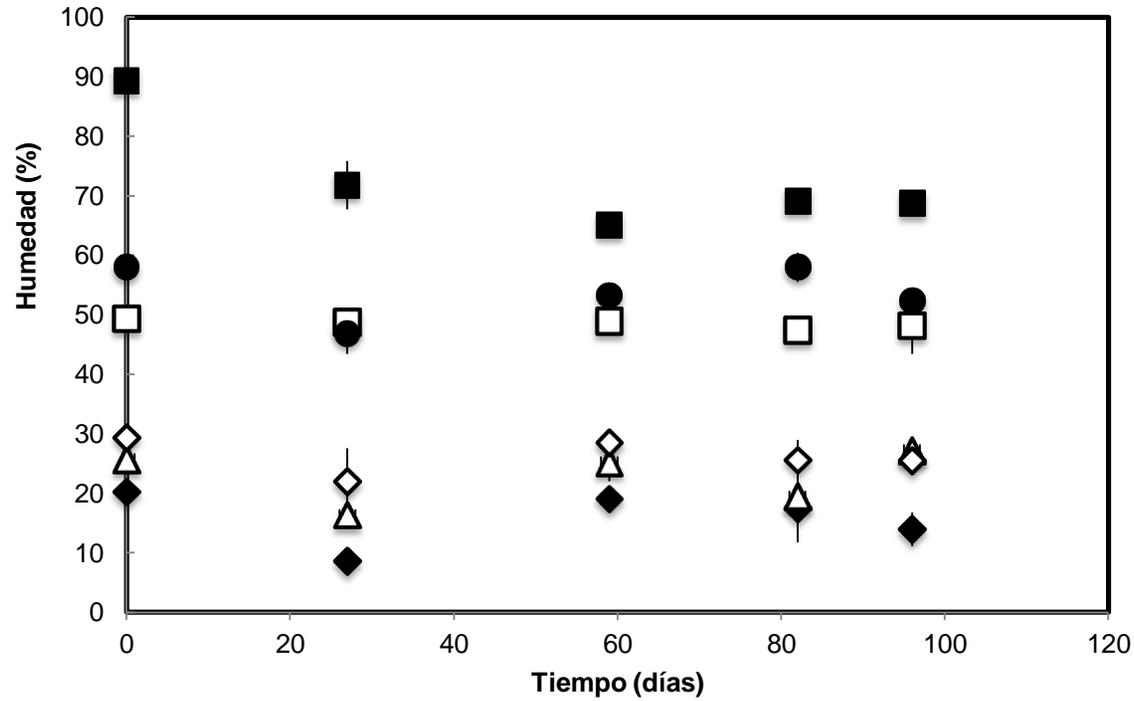


Figura 6. Variación del porcentaje de humedad en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (△) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

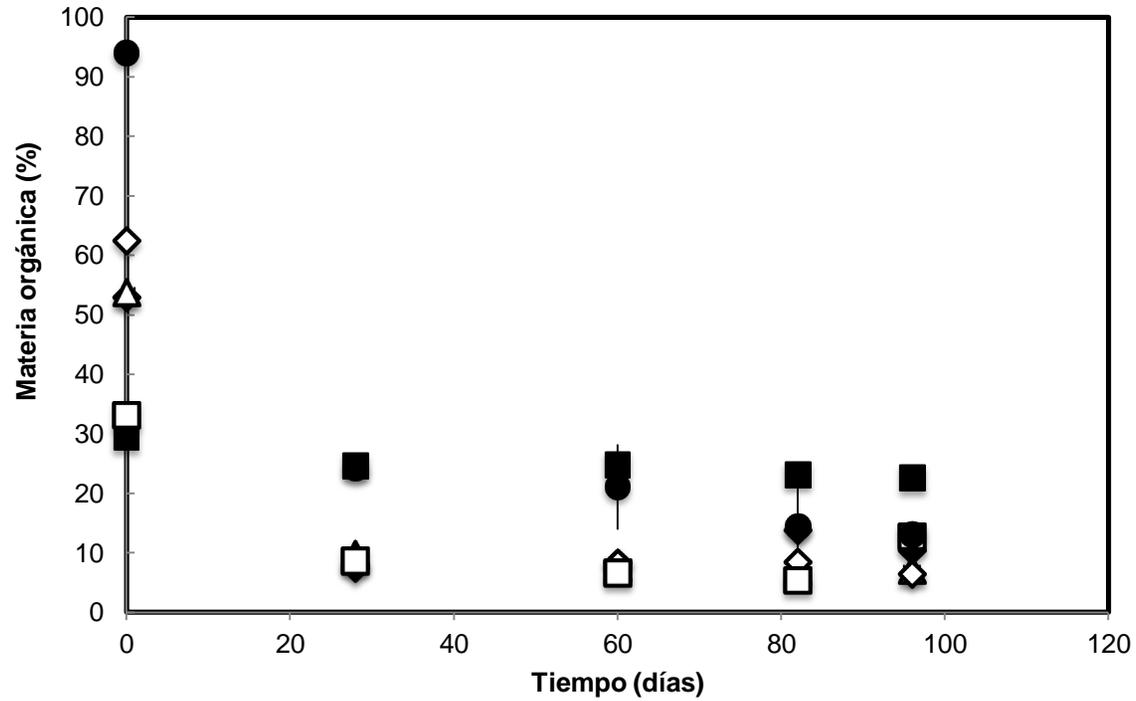


Figura 7. Variación del porcentaje de materia orgánica en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (Δ) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

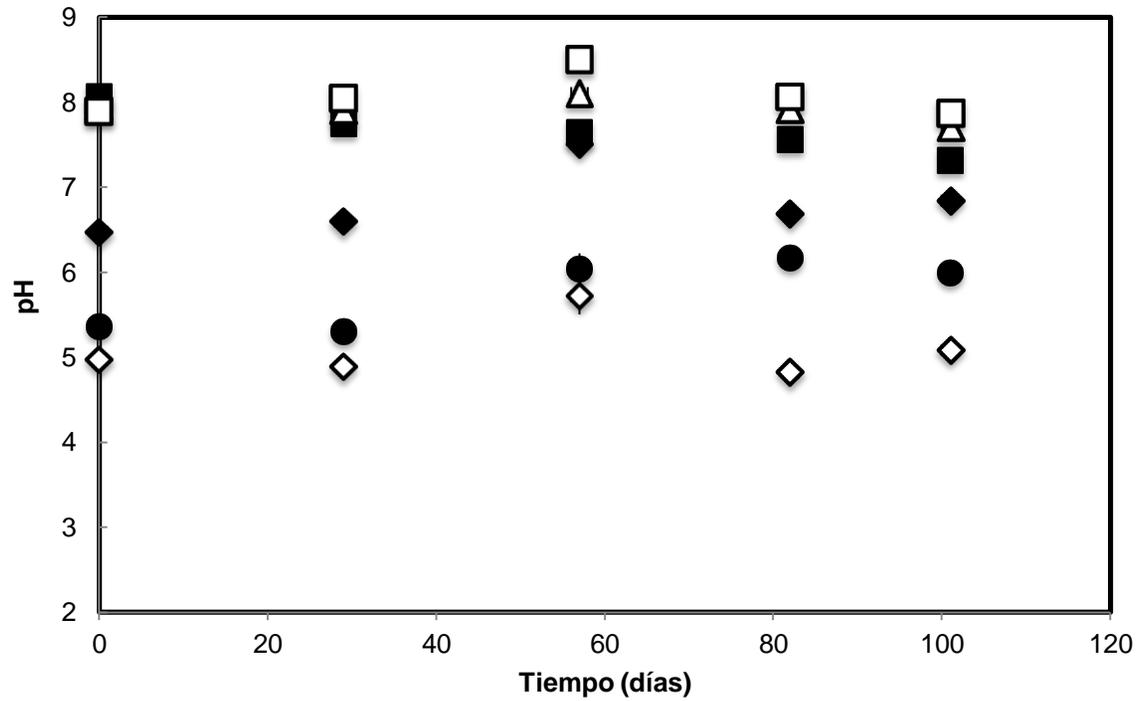


Figura 8. Variación del pH en los biorreactores de degradación de suelo contaminado con TPHs con respecto al tiempo en ensayos batch realizados a 30°C y aireados manualmente una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (△) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

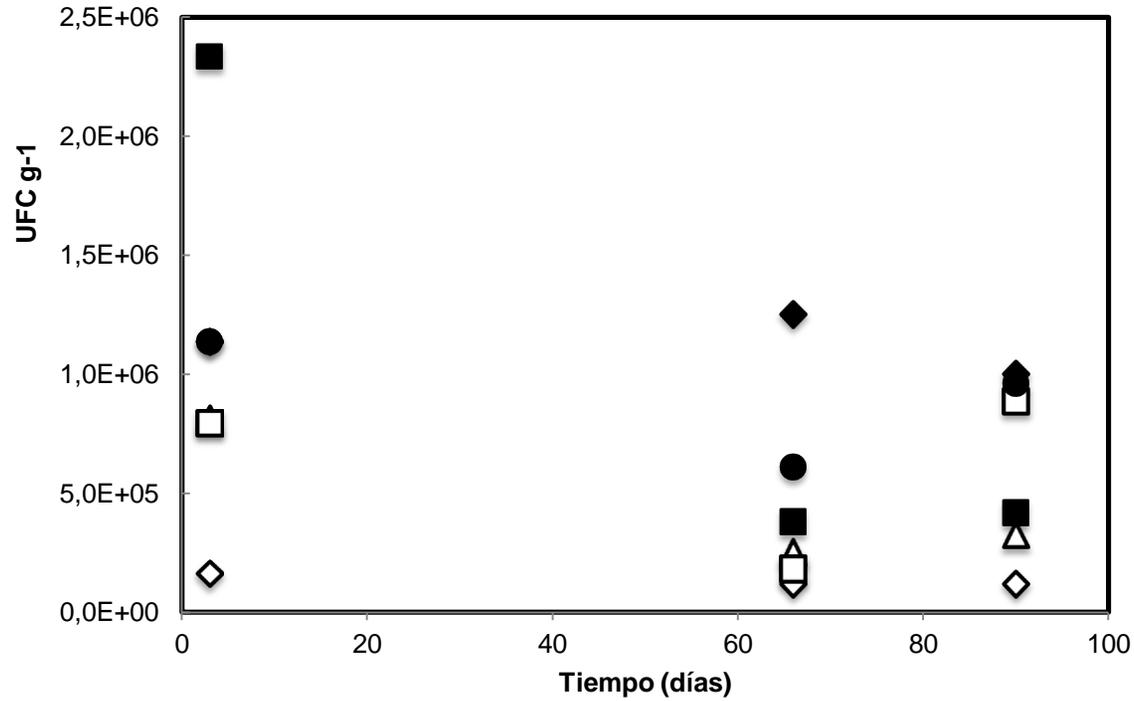


Figura 9. Variación de las unidades formadoras de colonia (UFC) totales luego de 48 horas de incubación a 37°C. Monitoreo durante el ensayo de degradación llevado a cabo por 15 semanas a 30°C en biorreactores aireados una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (△) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T. Las barras de error representan desviaciones estándares para ensayos realizados por duplicado.

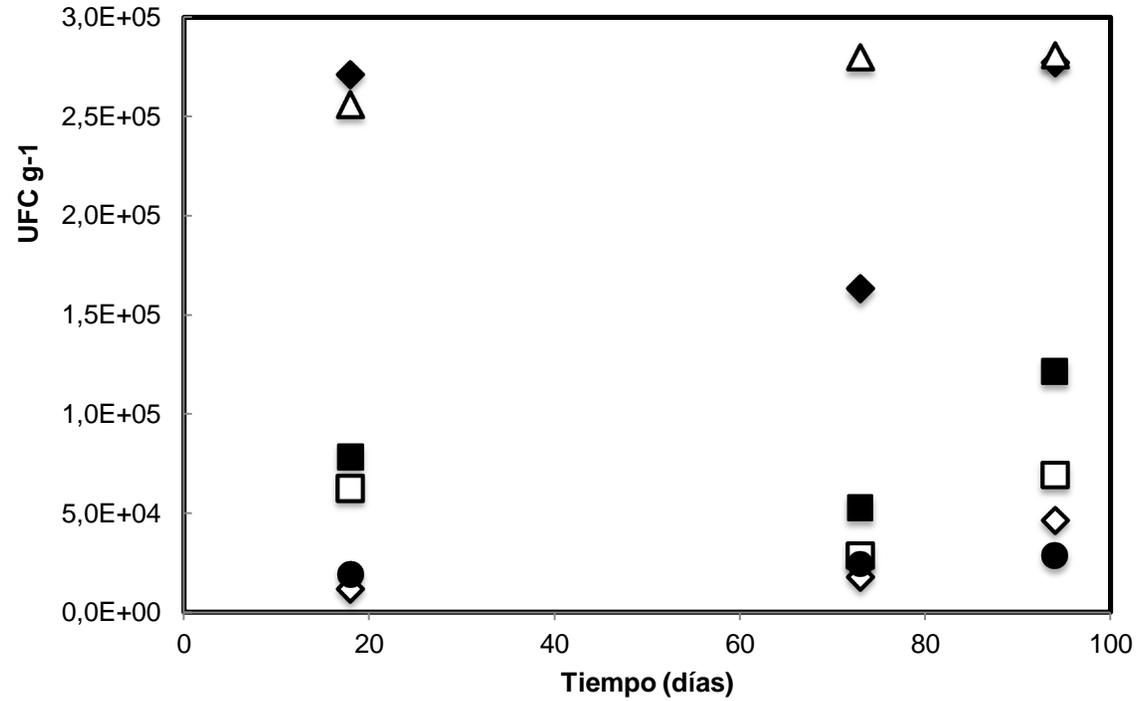


Figura 10. Variación de las unidades formadoras de colonia (UFC) degradadoras luego de 48 horas de incubación a 37°C. Monitoreo durante el ensayo de degradación llevado a cabo por 15 semanas a 30°C en biorreactores aireados una vez a la semana. Leyenda: (■) AC, (◆) MCR, (Δ) MC, (◇) MAC, (□) BC y (●) T