

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES



**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS QUE
DEGRADAN HIDROCARBUROS: BIORREMEDIACIÓN EN
SUELOS CONTAMINADOS CON BORRAS MEDIANTE LA
TÉCNICA DE COMPOSTAJE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
*MAGISTER SCIENTIAE***

PIERINA ELIZABETH GUILLÉN ZUBIATE

LIMA - PERU

2010

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS QUE
DEGRADAN HIDROCARBUROS: BIORREMEDIACIÓN EN
SUELOS CONTAMINADOS CON BORRAS MEDIANTE LA
TÉCNICA DE COMPOSTAJE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
*MAGISTER SCIENTIAE***

Presentado por:

PIERINA ELIZABETH GUILLÉN ZUBIATE

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

**Mg Sc Zulema Quinteros Carlos
PRESIDENTA**

**Mg Sc Juan Guerrero Barrantes
PATROCINADOR**

**M S. Víctor Miyashiro Kiyari
MIEMBRO**

**Dr Edgar Sánchez Infantas
MIEMBRO**

DEDICATORIA

*Dedico la presente tesis a mi padre, a mis hermanas, a mi esposo y a mi querido hijo
Especialmente a mi madre Elizabeth Zubiato por su constante apoyo y motivación*

AGRADECIMIENTOS

- Al Ing. Mg. Sc. Juan Guerrero Barrantes, profesor principal de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por su dedicación y compromiso durante el desarrollo de la investigación en la prueba de compostaje. Por sus grandes consejos, motivación durante la culminación de la tesis y gran estima como persona y como profesional.
- A la Dra. Jazmín Hurtado Custodio, jefa del Departamento de Microbiología y docente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su asesoramiento en la evaluación microbiológica y la prueba en terrarios durante el desarrollo de la tesis. Por su asistencia en la revisión del informe de tesis, así como por su gran aprecio y apoyo incondicional.
- Al Dr. Tomás Agurto Sáenz, actual decano de la Facultad de Biología de la Universidad Ricardo Palma; por su apoyo con respecto del uso de los equipos del laboratorio de Microbiología durante el desarrollo de la tesis.
- A la Ing. Otilia Aguirre Romero y al Ing. Luis Moreno Figueroa por su gran ayuda en la realización y culminación de la tesis.
- Al Ministerio de Energía y Minas - CAREC por el financiamiento de la tesis, y a la Refinería Conchán por brindar sus instalaciones y equipos para la ejecución del proyecto.

Guillen, P. 2010. Identificación de bacterias nativas que degradan hidrocarburos: biorremediación en suelos contaminados con borras mediante la técnica de compostaje. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina.

RESUMEN

En esta investigación se realizaron dos pruebas de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburo, provenientes de la Refinería Conchán. Inicialmente en el laboratorio se logró aislar e identificar bacterias y hongos del hidrocarburo pesado (con 17 a 19 grados API), se determinó su actividad degradativa y emulsificante, además se seleccionó el “consorcio bacteriano selecto” que fue utilizado en las dos pruebas de biorremediación. En cuanto a los resultados, en la primera prueba de biorremediación “prueba en terrarios” se observó en el terrario número cinco (T5), a los 90 días, el 79 % de remoción del hidrocarburo del suelo, mientras que en la segunda prueba de biorremediación “prueba de compostaje” se observó, para todas las biopilas, a los 86 días, entre el 95 % a 99 % de remoción del hidrocarburo y los niveles de hidrocarburo total de petróleo (TPH) estuvieron por debajo de los límites de aceites y grasas determinados por la normativa de la Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas de Perú. Con lo que se puede concluir que para esta investigación, la técnica de compostaje fue el mejor tratamiento para el suelo contaminado con hidrocarburo.

Palabras clave: bioremediación, compostaje, terrario, borra

Guillen, P. 2010. Identification of native bacteria that degrade hydrocarbons: bioremediation in soils polluted with "borra" using the technique of composting. Tesis Mg. Sc. Lima, Peru. Universidad Nacional Agraria La Molina.

SUMMARY

In this research, two tests have been carried out concerning to the bioremediation of contaminated soils with hydrocarbon from Conchan's Refinery. At a beginning in the laboratory investigation we got to isolate and identify bacteria and fungus from the heavy hydrocarbon (with a 17 to 19 API degree). It was determined their degradative and emulsifier activity, in the same way the "select bacterial consortium" was selected and used in the two bioremediation tests. As for the results, in the first test of bioremediation "test in terrariums", was observed in terrarium number five (T5), that after 90 days it was obtained 79 % of hydrocarbon removal from the soil ,while in the second bioremediation test "proof of composting" was observed that after 86 days, all biopiles presented between 95 % to 99 % removal of hydrocarbon and the TPH levels were below the limits of oils and fats determined by the regulations of the General Directorate of Environmental Affairs - Ministry of Energy and Mines. Therefore we can conclude that for this research, the composting technique was the best treatment for hydrocarbon contaminated soil.

Key words: bioremediation, composting, terrarium, borra

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE CUADROS	xvii
ÍNDICE DE ANEXOS	xx
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Historia y actualidad de la biorremediación	5
2.2 Contaminantes del suelo y sus efectos	17
2.3 El hidrocarburo y sus propiedades	19
2.4 Clasificación del hidrocarburo por la industria petrolera	33
2.5 La biorremediación y su aplicación	35
2.5.1 Aplicabilidad	36
2.5.2 Métodos de biorremediación	38
2.5.3 Factores que condicionan el proceso de biorremediación	42
2.5.4 Fases del proceso de biorremediación	47
2.5.5 Efectos de la biorremediación en las propiedades del suelo	48
2.5.6 Algunas técnicas de biorremediación empleadas para descontaminar el suelo con borra	49
2.6 Compost en suelos contaminados con hidrocarburo	60
2.6.1 Factores que condicionan el proceso de compostaje	61
2.6.2 Evaluación de las variables determinantes en el proceso de degradación del hidrocarburo total de petróleo (TPH) por el compost	69

2.6.3 Técnicas de compostaje	71
2.6.4 Etapas del proceso del compostaje	77
2.6.5 Principios básicos del compostaje	79
2.6.6 Métodos del proceso del compostaje	80
2.6.7 Etapas del proceso de compostación	82
2.6.8 Aplicaciones. Ventajas y desventajas del compostaje	83
III. MATERIAL Y MÉTODOS	86
3.1 Caracterización de la borra	86
3.1.1 Lugar de estudio	86
3.1.2 Historia o antecedentes de las pozas de borra	86
3.1.3 Muestreo de la borra	88
3.1.4 Características fisicoquímicas de la borra	90
3.1.5 Caracterización de TPH en la borra	92
3.2 Caracterización de la arena	93
3.2.1 Muestreo de la arena	93
3.2.2 Evaluación de la materia orgánica y pH en la arena	94
3.2.3 Caracterización del TPH en la arena	94
3.3 Evaluación microbiológica	95
3.3.1 Materiales	95
a. Material biológico	95
b. Material de laboratorio	95
c. Equipos de campo	96
d. Medios de cultivos	96
3.3.2 Aislamiento y caracterización microbiológica de bacterias y hongos	97
a. Selección de las muestras	97
b. Aislamiento y dilución de bacterias y hongos	99
c. Siembra y recuento de las bacterias y hongos	99
d. Crecimiento en medio selectivo y segundo recuento	101
e. Caracterización morfológica microscópica y macroscópica de las cepas bacterianas	104

f. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos	108
3.4 Prueba de actividad degradativa en cultivo Bushnell Haas (BH)	110
3.4.1 Materiales	110
a. Medios de cultivo	110
b. Equipos	111
3.4.2 Determinación de la actividad degradativa, emulsificante y caracterización taxonómica	111
a. Reactivación de cepas	111
b. Obtención del pellet	112
c. Siembra en cultivo BH	112
d. Incubación	112
e. Selección de las bacterias y hongos según la calificación de actividad degradativa en cultivo BH	113
f. Criterios cualitativos durante los procesos de actividad degradativa	114
g. Determinación de la actividad emulsificante de las bacterias	122
h. Caracterización taxonómica por la técnica API 20 NE	124
3.5 Prueba de degradación de la borra (TPH) en terrarios	126
3.5.1 Materiales	126
a. Medio de cultivo	126
b. Equipos	126
c. Otros	127
3.5.2 Preparación de los tratamientos biológicos de cada terrario	127
a. Obtención de los pellets de las bacterias	127
b. Selección de matraces para la prueba de degradación en terrarios	128
c. Acondicionamiento del suelo	129
d. Esterilización del suelo con luz ultravioleta	131
3.5.3 Evaluación de la degradación por peso y gravimétrica de los terrarios	132

a. Determinación de los TPH presentes en los terrarios	132
b. Determinación de los PAH presentes en los terrarios	133
3.6 Prueba de degradación de la borra (TPH) con la técnica de compost sin bioaumentación y con bioaumentación	134
3.6.1 Ubicación	134
3.6.2 Materiales	134
a. Equipos de campo	134
b. Equipos de protección personal	135
c. Equipos de medición	135
d. Otros	135
3.6.3 Acondicionamiento de pozas que contendrán las biopilas de compost	136
a. Nivelación y compactación del suelo	136
b. Revestimiento de las pozas	137
3.6.4 Composición y cantidades del contenido de biopila de compost	138
a. Caracterización del estiércol	138
b. Cantidad y proporciones del contenido de las biopilas	139
c. Procedimiento de armado de las biopilas de compost	140
3.6.5 Bioaumentación	146
a. Preparación del material microbiano selecto (MMS)	146
b. Incorporación del MMS al compost	148
3.6.6 Caracterización de los parámetros que intervinieron en el proceso del compost.	150
a. Evaluación de la poblacional bacteriana	150
b. Evaluación de la temperatura	150
c. Evaluación del Ph	151
d. Evaluación del TPH	151
 IV. RESULTADOS	 152
4.1 Determinación de los resultados de caracterización de la borra y el suelo contaminado	152

4.1.1 Características fisicoquímicas de la borra	152
a. Fluidez	152
b. Viscosidad	153
c. Grados API	153
d. Composición y contaminantes	153
e. Nivel de asfalteno	154
f. Característica de TPH en la borra	155
4.1.2 Característica de TPH en el suelo	156
4.2 Determinación de los resultados del recuento y caracterización del consorcio microbiano aislado de las pozas de borra.	157
4.2.1 Primer recuento de bacterias con dilución 1:10 ³ en medio TSA	157
4.2.2 Primer recuento de hongos con dilución 1:10 ³	159
4.2.3 Segundo recuento de bacterias con dilución 1:10 ⁴ en agar selectivo en muestra de borra sólida y borra líquida	160
4.2.4 Recuento de hongos con dilución 1:10 ⁴	161
4.2.5 Resultado de la evaluación fenotípica de las bacterias	162
a. Evaluación morfológica microscópica	162
b. Evaluación macroscópica	163
c. Según las pruebas bioquímicas	163
4.2.6 Evaluación fenotípica de los hongos	164
a. Según la característica morfológica a nivel macroscópico y microscópico	164
4.3 Resultado de la prueba de actividad degradativa en cultivo BH	165
4.3.1 Actividad degradativa y emulsificante utilizando 50 uL de cepas bacterianas	165
4.3.2 Actividad degradativa y emulsificante utilizando 100 uL de cepas bacterianas	166
4.3.3 Actividad degradativa en hongos	167
4.3.4 Identificación de bacterias con la técnica de análisis API 20 NE	167
4.4 Resultado de la degradación del hidrocarburo en terrarios	169
4.4.1 Cuantificación de la arena según el peso en gramos de los terrarios	169

4.4.2 Porcentaje de remoción del hidrocarburo en cada terrario	169
4.4.3 Cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) presentes en los terrarios	171
4.5 Resultado de la técnica de compost y su bioaumentación con borra	173
4.5.1 Resultado del recuento bacteriano en cada biopila	173
4.5.2 Resultado de la variación temporal de la temperatura en cada una de las biopilas	175
4.5.3 Resultado de la variación de pH en cada biopila	177
4.5.4 Resultado de la caracterización del TPH y de la densidad poblacional de las bacterias en tres etapas del proceso de compostaje	179
4.5.5 Resultado de la variación temporal de la concentración de TPH en cada biopila de compostaje	182
V. DISCUSIÓN	184
VI. CONCLUSIONES	187
VII. RECOMENDACIONES	190
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192
IX. ANEXO	198

ÍNDICE DE FIGURAS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1 Estructura del fenantreno	24
Figura 2 Representación simplificada de la separación de asfaltenos	29
Figura 3 Proceso productivo básico (destilación primaria)	33
Figura 4 Principios de la biorremediación	35
Figura 5 Relación de parámetros de todo tipo implicados en la biorremediación	37
Figura 6 Actividades microbiana en el proceso de biorremediación de compuestos orgánicos	38
Figura 7 Aproximación a la biorremediación.	40
Figura 8 Factores que condicionan el proceso de biorremediación	43
Figura 9 Esquema de un landfarming	52
Figura 10 Esquema de remediación con biopilas	54
Figura 11 Esquema general de la desorción térmica	56
Figura 12 Esquema de inyección de vapor	57
Figura 13 Esquema de inyección a aire caliente	58
Figura 14 Esquema de lavado de suelos	59
Figura 15 Esquema de vitrificación del suelo	60
Figura 16 Variación de temperatura y pH en una pila de compostaje	63
Figura 17 Fuentes de carbono y nitrógeno	66
Figura 18 Fases del compostaje	67
Figura 19 Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas	72
Figura 20 Representación esquemática de un sistema de biopilas estáticas	73
Figura 21 Remoción de materia orgánica y perfiles de temperatura durante el proceso de compostaje	78
Figura 22 Proceso de compostación y factores físicos incidentes	81

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Croquis 1 Plano de ubicación de la Refinería Conchán y de las pozas de borras	87
Fotografía 1 Ubicación de las dos pozas de borras	87
Figura 23 Contenido de las pozas con borras	88
Figura 24 Muestreo de la borra a nivel superficial y profundo	89
Fotografía 2 Zona de muestreo de la borra	89
Figura 25 Calicata en la arena que rodea la poza de borra	93
Fotografía 3 Galones con muestra de borra	97
Figura 26 Procedimientos para la obtención del consorcio microbiano	98
Figura 27 Morfología microscópica de las bacterias	105
Fotografía 4(a) Morfología microscópica	105
Fotografía 4(b) Morfología macroscópica	105
Fotografía 5(a) Morfología macroscópica hongos	109
Fotografía 5(b) Morfología microscópica hongos	109
Figura 6(a) Morfología macroscópica hongos	110
Figura 6(b) Morfología microscópica hongos	110
Figura 28 Procedimiento de siembra en cultivo BH	113
Fotografía 7 Cepa B1 (100 uL) a los 49 días del proceso de desarrollo de la actividad degradativa	114
Figura 29 Identificación de bacterias oleofílicas	125
Figura 30 Procedimiento de la prueba de degradación en terrarios	128
Fotografía 8 Suelo acondicionado en terrarios	132
Figura 31 Diagramación de las dimensiones de las pozas para las biopilas de compost	136
Fotografía 9 Nivelación y compactación del suelo	137
Fotografía 10 Revestimiento de las pozas	137
Fotografía 11 Estiércol fermentado listo para el compostaje	139
Fotografía 12 Material vegetal utilizada en la formación del las biopilas de compost	141
Fotografía 13 Borra que se utilizó en las pruebas en compost	142

Fotografía 14 Incorporación del estiércol que recibirá a la borra	142
Fotografía 15 Vertido de la borra	143
Figura 32 Diagrama de flujo del trabajo de compostaje	143
Fotografía 16 Humedecimiento de las biopilas	144
Fotografía 17 Volteo de las biopilas	145
Fotografía 18 Centrifugación del consorcio microbiano selecto	146
Fotografía 19 Obtención de los pellets	146
Fotografía 20 Preparación del material microbiano destinado para el compost	147
Fotografía 21 Volteo de las biopilas CB1 y CB2	148
Fotografía 22 Incorporación de material microbiano selecto a la biopila	148
Fotografía 23 Regado de la biopila	149

IV. RESULTADOS

Figura 33 Determinación del tipo de hidrocarburo según el grado API de cada poza de borra	153
Figura 34 Dinámica poblacional de las cepas bacterianas provenientes de la muestra de borra líquida	157
Figura 35 Dinámica poblacional de las cepas bacterianas provenientes de la muestra de borra sólida	158
Figura 36 Coeficiente de variación del primer recuento de bacterias	158
Figura 37 Dinámica poblacional de las cepas hongos provenientes de la muestra de borra	159
Figura 38 Registro del primer recuento de hongos en UFC/g	159
Figura 39 Dinámica poblacional de las cepas bacterianas provenientes de la muestra de borra líquida	160
Figura 40 Dinámica poblacional de las cepas bacterianas provenientes de la muestra de borra líquida.	160
Figura 41 Coeficiente de variación del segundo recuento de bacterias	161
Figura 42 Segundo recuento de hongos en UFC/g en medio Sabouraud	161
Figura 43 Porcentaje de bacterias por su coloración Gram	162
Figura 44 Identificación del tipo morfológico de las bacterias	163

Figura 45 Relación de la actividad emulsificante en las bacterias (50 uL) con mayor actividad degradativa	165
Figura 46 Relación de la actividad emulsificante en las bacterias (100 uL) con mayor actividad degradativa	166
Figura 47 Resultados de la evaluación de la actividad degradativa en los hongos	167
Figura 48 Representación de la actividad degradativa y emulsificante en la prueba API 20 NE	168
Figura 49 Porcentaje de remoción de TPH en terrarios vs la normativa peruana	171
Figura 50 Comparación de los PAH de la borra con los criterios para terrenos contaminados emitidos por la DGAA - Perú.	173
Figura 51 Dinámica poblacional de las bacterias durante el proceso de compostaje	174
Figura 52 Desviaciones estándar y medias del recuento de bacterias durante el proceso de compostaje	174
Figura 53 Comparación de la variación temporal de la temperatura en la biopila control (Co), biopila C1 y biopila CB1	176
Figura 54 Comparación de la variación temporal de la temperatura en la biopila control (Co), biopila C2, biopila CB2 y biopila C3	177
Figura 55 Comparación de la variación del pH en la biopila control con las biopilas C1 y CB1	178
Figura 56 Comparación de la variación del pH en la biopila control con las biopilas C2, biopila CB2 y biopila C3	179
Figura 57 Evaluación de la concentración de TPH y el incremento de bacterias durante tres etapas del proceso de compostaje	181
Figura 58 Variación temporal de la concentración de TPH en cada biopila de compostaje	182
Figura 59 Porcentaje de Remoción de TPH en cada biopila	183

ÍNDICE DE CUADROS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1 Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo	21
Cuadro 2 Métodos estándar para la precipitación de asfáltenos	30
Cuadro 3 Fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo.	32
Cuadro 4 Tipos de crudo según grados API	34
Cuadro 5 Límites de concentración de metales pesados en el compost final	70
Cuadro 6 Resumen de los resultados de algunos estudios realizados a escala piloto	83

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Cuadro 7 Método de análisis para determinar las propiedades de la borra	92
Cuadro 8 Métodos de análisis para determinar el TPH en la borra	93
Cuadro 9 Métodos de análisis para evaluar materia orgánica y pH	94
Cuadro 10 Métodos de análisis para determinar TPH	94
Cuadro 11 Descripción de las muestras obtenidas de la poza 1 de la borra	97
Cuadro 12 Cantidad de bacterias registradas en la muestra de borra sólida y líquida	100
Cuadro 13 Cantidad de hongos registrados en la muestra de arena con borra (MBA)	101
Cuadro 14 Segundo recuento de bacterias registradas en la muestra de borra sólida y líquida	102
Cuadro 15 Recuento de hongos registradas en muestra de borra con arena	103
Cuadro 16 Etapas en la tinción Gram	104
Cuadro 17 Características morfológicas macroscópico y microscópico de las cepas bacterianas	106
Cuadro 18 Evaluación bioquímica de las cepas bacterianas para determinar enterobacterias	107

Cuadro 19 Características de la morfología macroscópica de hongos	108
Cuadro 20 Características microscópica de las cepas de hongos	109
Cuadro 21(a) Procesos de desarrollo de la actividad degradativa por las cepas bacterianas a través del tiempo (periodos)	115
Cuadro 21(b) Calificación de la actividad degradativa a través del tiempo (periodos)	115
Cuadro 22 Prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de 100 uL de cepas bacterianas en medio BH con hidrocarburo (borra)	117
Cuadro 23 Registro de la calificación de la actividad degradativa con cepas bacterianas de 100 uL en medio de cultivo BH con hidrocarburo	118
Cuadro 24 Prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de 50 uL de cepas bacterianas en medio BH con hidrocarburo (borra)	119
Cuadro 25 Registro de la calificación de la actividad degradativa de cepas bacterianas de 50 uL en medio de cultivo BH con hidrocarburo	120
Cuadro 26 Prueba de desarrollo de la actividad degradativa con hongos en medio BH con hidrocarburo (borra).	121
Cuadro 27 Registro de la calificación de la actividad degradativa de los hongos en medio BH	122
Cuadro 28 Determinación de la actividad emulsificante de las cepas bacterianas con mayor actividad degradativa (100 uL)	123
Cuadro 29 Pasos para la realización de la prueba API 20 NE	124
Cuadro 30 Contenido de los matraces microbianos para la prueba de terrarios	129
Cuadro 31 Cálculos de las cantidades de cada terrario	130
Cuadro 32 Composición del estiércol de vaca	138
Cuadro 33 Cantidad en kg de insumos requeridos en cada biopila de compost	139
Cuadro 34 Proporciones de borra para cada biopila	140

IV. RESULTADOS

Cuadro 35 Característica de fluidez del hidrocarburo (borra)	152
Cuadro 36 Composición y contaminantes del hidrocarburo	154

Cuadro 37 Nivel de asfalto presente en la borra	155
Cuadro 38 Resultados de TPH en la muestra de 1 kg de borra, mediante dos métodos	155
Cuadro 39 Resultados del análisis de la arena alrededor de las pozas de borra	156
Cuadro 40 Resultados de la característica morfológica de los hongos	164
Cuadro 41 Bacterias identificadas mediante la técnica API 20 NE	168
Cuadro 42 Consumo de arena final en cada terrario	169
Cuadro 43 Remoción en porcentaje del hidrocarburo	170
Cuadro 44 Niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en terrarios	172
Cuadro 45 Concentración de TPH total por cromatografía y el promedio de bacterias en UFC/g de cada biopila	180

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1 Resultado del análisis de metales pesados realizado al hidrocarburo “borra”, en el laboratorio fisicoquímico de la Refinería Conchán	198
Anexo 2(a) Resultado del análisis inicial de hidrocarburo total de petróleo (TPH) realizado al hidrocarburo “borra”, según los métodos cromatográfico y gravimétrico en el laboratorio ENVIROLAB	199
Anexo 2(b) Resultado del análisis inicial de hidrocarburo total de petróleo (TPH) realizado en la arena con hidrocarburo “borra”, según el método cromatográfico en el laboratorio ENVIROLAB	200
Anexo 3(a) Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina “Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes”	201
Anexo 3(b) Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina “Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes”	202
Anexo 3(c) Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina “Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes”	203
Anexo 4(a) Resultado del análisis de la actividad emulsificante de las bacterias realizada en el laboratorio de biología de la Universidad Nacional de San Marcos	204
Anexo 4(b) Receta de la preparación de los medios de cultivo BH, solución salina al 0.85 % y el Medio Mínimo de Goldman	205
Anexo 5(a) Resultado de la Prueba de API 20 NE	206
Anexo 5(b) Resultado de la Prueba de API 20 NE	207
Anexo 6 Resultado del análisis de TPH por el método gravimétrico para la Prueba de degradación de terrarios, realizado en el laboratorio ENVIROLAB	208
Anexo 7: Resultado del análisis de hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH),	209

presentes en la Prueba de degradación en terrarios	
Anexo 8 Relación de la temperatura de las biopilas en la Prueba de compostaje	210
Anexo 9(a) Resultado del análisis de TPH del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de marzo	211
Anexo 9(b) Resultado del análisis de TPH del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de mayo	212
Anexo 9(c) Resultado del análisis de TPH del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de junio y julio	213
Anexo 10 Normativa peruana de la Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas de Perú (DGAA-MINEM) “Criterios para terrenos contaminados”	215

I. INTRODUCCIÓN

Los derrames de petróleo constituyen una fuente de contaminación del suelo, del aire y del agua y de los seres vivos impactados en el momento. Esto origina efectos directos en las poblaciones de los microorganismos, la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo induce la selectividad y la disminución de la diversidad. Los microorganismos, tolerantes a este ambiente de estrés, desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.*, 1991).

Día a día se torna más necesario conocer e implementar medidas naturales, que no alteren el ecosistema terrestre donde se apliquen, que den una solución efectiva, y que estén al alcance de todos los niveles empresariales, para esto se necesita reproducir y a la vez conocer tecnologías limpias, sencillas y económicas para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

La biorremediación es una buena alternativa debido a que reduce los costos en un 30 a 40 % en comparación con los costos del tratamiento químico, la incineración o el relleno industrial (King *et al.*, 1992). Durante la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo las bacterias oxidan el petróleo a dióxido de carbono, agua y energía, y aproximadamente 50 % del carbono en el petróleo es usado por la biomasa bacteriana (Sharabí & Bartha, 1993). Asimismo es un método de descontaminación natural, sin el uso de agentes químicos (como solventes o detergentes), cuyo fin es de transformar los contaminantes a productos no peligrosos, o destruirlos completamente y lo cual podría ser mucho menos costoso que otras tecnologías alternativas, tales como: tratamientos químicos, tratamientos térmicos, confinamientos, etc.

La selección de bacterias y hongos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivo puro rico en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo e hidrocarburo pesado (borra). Los resultados de las pruebas en laboratorio respaldan la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas.

La evaluación sucesiva de los microorganismos que utilizan hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de energía, es prioritaria para demostrar la eficiencia de las tecnologías de biorremediación en suelos expuestos a concentraciones tóxicas de petróleo en el suelo.

No debemos de olvidar que la alteración de terrenos causada por la actividad industrial de hidrocarburos puede afectar a la vegetación, la fauna y población en muchas formas. También puede causar efectos ambientales negativos permanentes en la superficie, como en el caso de los tanques y borras abandonadas; cambios dramáticos en el paisaje, tales como contaminación del suelo, suelo infértil, deterioro del suelo a largo plazo y riesgo a la salud, asimismo los efectos de la actividad con hidrocarburo pueden extenderse más allá del perímetro de la empresa hidrocarburífera.

La planeación adecuada puede minimizar enormemente la cantidad de desechos depositados sobre la tierra, y puede minimizar el potencial de contaminación causada por los desechos después de su cierre. Es por ello que cierto grado de remediación debe ocurrir en el momento de la entrada en funcionamiento.

Las ideas sugeridas en los planes de remediación deben ser examinadas cuidadosamente para determinar su factibilidad, siempre tomando en cuenta que la efectividad de las técnicas posibles depende del suelo y de las características topográficas y climatológicas de cada sitio.

Dentro de los lugares en que se encuentran suelos contaminados con hidrocarburos en Perú, se ha elegido como lugar de investigación a la Refinería Conchán de PETROPERÚ S.A.

La Refinería Conchán fue elegida como lugar de estudio de investigación por contener dos pozas de residuos industriales de hidrocarburos (borra) sobre una determinada área de un cerro arenoso. Estas pozas de borra durante muchos años atrás fueron utilizadas como depósitos donde se disponían los residuos industriales de la refinería.

La refinería se encuentra ubicada al sur de la ciudad de Lima, en el kilómetro 38 de la Panamericana Sur. La refinería está orientada a la producción de asfaltos y combustibles, su importancia productiva radica en la producción de asfaltos, siendo responsable del 80% de la producción interna de éste derivado necesario para la reconstrucción y ampliación de la red vial.

La planta industrial de la refinería realiza una destilación fraccionaria del petróleo, en cuyo proceso se separan sus componentes por sus cualidades de reutilidad como combustible, según su temperatura de ebullición, como la preparación de: gasolina (octanaje de: 84, 90, 95, 97), solvente (Nº1 y Nº3), querosene, Diesel Nº2, petróleo industrial (Nº5, Nº6 y Nº 500), cemento asfáltico (10/20, 20/30, 40/50, 60/70, 85/100 y 120/150), asfalto líquido (RC-250, RC-70 y MC30), Ronax.

Como uno de los residuos industriales de la refinería se menciona a la borra, la cual hace referencia a residuos industriales que se formaron, en el fondo de los tanques de almacenamiento de crudo y pozas de recuperación, de la mezcla heterogénea de hidrocarburos con sólidos y agua entrampada como subproducto común de la producción de crudos, o mezcladas con compuestos inorgánicos formados por arenas, arcillas, lodos provenientes del pozo y polvos finos que llegan al crudo en su superficie por acción del viento. El hidrocarburo existente en la borra puede contener un alto porcentaje de parafinas de alto peso molecular o asfaltenos (Dirección de Medio Ambiente de la Refinería Conchán, 2004).

Con el fin de aportar al desarrollo de una metodología práctica de tratamiento biológico de suelos contaminados con hidrocarburo (borra), se colectó, aisló, seleccionó y caracterizaron las bacterias nativas y hongos degradadores, provenientes de las dos pozas de borra mencionadas. Con estos microorganismos aislados se realizaron pruebas biológicas cuyos objetivos se mencionan a continuación:

Objetivo general

- Evaluar la capacidad del proceso de descomposición de compost, en la biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburo (borra)

Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas y concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en la borra, determinantes en una refinería
- Aislar, seleccionar, identificar y cuantificar a las bacterias y hongos, mediante análisis microbiológicos, a partir de muestras de borra sólida, borra líquida y borra con arena
- Evaluar la actividad emulsificante del consorcio microbiano de mayor actividad degradativa en cultivo Bushnell Haas (BH)
- Determinar mediante evaluación gravimétrica el consumo del TPH, mediante la prueba en terrarios de arena
- Evaluar los parámetros de temperatura, pH y el consumo de TPH en el compost con bioaumentación y sin bioaumentación

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 HISTORIA Y ACTUALIDAD DE LA BIORREMEDIACIÓN

Los microorganismos han estado degradando los compuestos orgánicos del suelo y del agua desde el comienzo de la vida en el planeta (Madigan *et al.*, 2000). Su relativa simplicidad estructural hace de ellos los seres vivos con más capacidad de adaptación tanto funcional como genética a los múltiples ambientes en los distintos hábitats.

Con el tiempo el hombre utilizó este fenómeno para gestionar residuos en fosas sépticas y para tratar aguas de uso doméstico e industrial en plantas depuradoras.

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Bushnell & Haas, 1941; Zobell, 1946; Sisler & Zobell, 1947; Davis, 1956; Van der Linden & Thijsse, 1965). Este "uso" intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación ("biorremediation"). Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al "landfarming" actual, y sus actores, compañías petrolíferas.

En cuanto a la biorremediación *in situ*, las primeras patentes, fundamentalmente para gasolina, aparecen en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos.

Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de "air sparing" (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo

tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados y los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc. Paralelamente se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de la otra gran familia de técnicas, las *ex situ* (landfarming, composting, etc.) (Riser-Roberts, 1998).

En consecuencia, el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos contaminados ha avanzado mucho y en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales.

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se ha traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos. Al mismo tiempo, se ha ido desarrollando una conciencia social de este peligro que lentamente va forzando el establecimiento de legislación para reducir la producción de residuos contaminantes y prevenir el escape de los mismos al medio circundante. Algunos accidentes que han supuesto un elevado impacto ambiental como el vertido de combustible del Exxon Valdez, la liberación de productos radiactivos tras el accidente de la central nuclear de Chernóbil, la rotura de la presa de Aznalcóllar o la reciente catástrofe ecológica producida por el vertido del petrolero Prestige frente a las costas gallegas, han puesto de manifiesto la justificada preocupación y alarma que estos temas suscitan en el conjunto de la población y lo mucho que queda por hacer para prevenir o resolver adecuadamente ese tipo de situaciones.

Algunos famosos accidentes generaron el impulso a las investigaciones sobre biodegradación del petróleo como:

- **Prestige**

El 13 de noviembre de 2002, el petrolero Prestige, buque monocasco cargado con 77 000 t de fuel, procedente del norte de Europa y con destino Singapur, sufre en medio de

un temporal una avería a 30 millas de la costa del cabo Finisterre. Durante el paseo de 6 días frente a la costa de Galicia, con un fuerte temporal del noroeste, el buque vertió 44 000 t de fuel, y el 19 de noviembre, a 130 millas de la costa, se partió en dos hundiéndose a 3500 y 3800 metros de profundidad, con 37 000 t de fuel en sus bodegas, que enseguida comenzaron a salir a la superficie. Se contaminaron más de 2500 km de costa y más de 700 playas. Lo que inicialmente era un siniestro marítimo se transformó en un desastre con terribles consecuencias en el orden social, económico y medioambiental.

Comparadas con las 20 000 toneladas que el petrolero Erika derramó a 400 kilómetros de las costas francesas en 1999 o, sobre todo, con las 38 000 toneladas que vertió en 1989 el Exxon Valdez en las costas de Alaska, esas 4 000 toneladas del Prestige no parecía mucho. De hecho, tan sólo un mes después del hundimiento ya se calculaba que habían salido unas 17 000 toneladas de fuel. Pero lo que llevaba el Prestige era fuel del tipo número 6, en la terminología inglesa. Es decir, el peor de todos porque es viscoso -con lo que cuesta eliminarlo- y, además, tenía sustancias potencialmente cancerígenas. Este fuel del Prestige se obtiene como residuo tras el refinado del petróleo en el que el crudo se calienta a 400 grados en una torre de destilación.

Es importante conocer que de los componentes del petróleo, los gases son los más volátiles y lo primero que se obtiene. Tras ellos va la gasolina, el querosene, los gasóleos, los aceites lubricantes y, después, el fuel. Tras él sólo quedan los asfaltos. Es conveniente detallar esto porque el asunto de la viscosidad y las grietas fue fundamental en la estrategia de manipulación en este caso. La viscosidad se define como la resistencia que ofrece un líquido a fluir. Disminuye al aumentar la temperatura, por lo que en las frías aguas del fondo marino, alguien se aventuró a decir que como el fuel era muy viscoso no saldría por las grietas.

Otro parámetro fisicoquímico importante era la densidad, definida como la masa por unidad de volumen, normalmente en gramos por centímetros cúbicos. Dicho en palabras más sencillas, de la densidad depende que un material se hunda o flote.

Si tomamos como medida el agua pura que tiene densidad uno, todo lo que tenga menos densidad flotará y lo que tenga más se hundirá. Por ejemplo, la gasolina, que tiene densidad 0,68 flotará en el agua. Lo mismo le sucede a la madera cuya densidad es 0,9. El fuel tiene densidad 0,96 por lo que, en principio, flotaría en el agua aunque estaría casi en el límite. No obstante, hay que matizar que el agua del mar, al ser en realidad una disolución de agua y de sal, no tiene densidad 1 sino 1,04.

Actualmente sucesivas investigaciones se vienen realizando ya sea por instituciones gubernamentales y no gubernamentales, en relación al monitoreo y evaluación de los niveles de contaminación presentes en el agua, en el sedimento y en los organismos hidrobiológicos.

▪ **Exxon Valdez**

El 24 de Marzo de 1989 un petrolero de más de 300 metros de eslora, llamado Exxon Valdez, llevaba un millón y medio de barriles de crudo mientras navegaba bordeando la costa de Alaska. Había salido horas antes del puerto de Valdez con rumbo a California para depositar su carga en una refinería de la Exxon. Una inexplicable cadena de errores cometidos por el guardacostas, el capitán y su tercero llevó al barco hasta los arrecifes de Blight. Aunque intentaron evitarlos no fue posible y el barco se incrustó en uno de ellos, produciéndose así una enorme grieta en el casco y derramándose el crudo.

La bahía de Prince William se cubrió con 33 000 toneladas de crudo que inmediatamente "arrasaron" las playas de la zona. La respuesta de la administración y de la compañía implicada fue rápida y en ella el protagonismo principal lo tuvo el uso de un fertilizante oleofílico (Inipol EAP22) que estimuló adecuadamente la degradación de los hidrocarburos (Pritchard *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1994) Las arenas de la zona eran claramente deficitarias en nitrógeno y fósforo por lo que, después de una fase de limpieza por medios físicos, la biodegradación propiciada por los microorganismos indígenas hizo el resto y varios meses después gran parte del crudo había desaparecido. No obstante, no

resultó fácil demostrar que los microorganismos habían sido los responsables del proceso y que la adición del fertilizante había sido un éxito.

Hasta entonces se había establecido una monitorización estándar de la biodegradación mediante un cociente entre la degradación de los alcanos lineales (de 17 y 18 átomos de carbono) frente a la de dos biomarcadores habituales como son el pristano y el fitano (hidrocarburos mucho más difícilmente biodegradables). Sin embargo, en este caso particular el método no funcionó, y los microorganismos presentes en las playas se demostraron capaces de degradar también estos hidrocarburos ramificados, si no tan rápidamente como los lineales, sí de una manera importante.

La solución la aportó la geoquímica del petróleo. Desde hacía bastante tiempo se venían usando algunos otros biomarcadores con el objetivo de caracterizar tipos de petróleo en yacimientos profundos. Uno de ellos era el 17a(H), 21b(H)-hopano, terpeno no biodegradable que permitiría establecer una relación segura frente a los hidrocarburos del petróleo biodegradables. Bragg *et al.* (1994) y Prince *et al.* (1994) consiguieron verificar estadísticamente la degradación biológica gracias al uso de este hopano y, además, los datos obtenidos mostraron que los niveles de nitrógeno en las aguas intersticiales eran el factor limitante de la biodegradación, al menos con el tipo de materiales geológicos que hay en las playas de Alaska.

Estudios posteriores han demostrado que la tasa de oxígeno también es un factor fundamental. Aunque la orientación puramente práctica pudiera parecer la más indicada para vertidos masivos queda, no obstante, mucho camino por recorrer para entender qué ocurre realmente cuando en un suelo o en una playa, como entonces, se produce un vertido de hidrocarburos.

La enorme trascendencia que han tenido en las últimas décadas los accidentes de petroleros y las consiguientes mareas negras (baste recordar los más recientes del Mar Egeo en la costa gallega, del Erika en Normandía y del Prestige, nuevamente en Galicia) ha servido para impulsar la investigación de todo tipo de métodos de remediación.

La biorremediación tiene, en este contexto, un campo de aplicación importante no sólo en vertidos marinos, sino también en vertidos y contaminación terrestre. Estos episodios no son tan famosos como las mareas negras, pero sí mucho más abundantes. Las causas son muy variadas: instalaciones obsoletas, depósitos deteriorados, accidentes en el transporte, roturas de oleoductos, etc. que han supuesto la contaminación de aguas y suelos. Si a esto añadimos la gran cantidad de residuos que desde una refinería hasta un pequeño taller se producen a diario, la necesidad de técnicas que puedan abaratar las soluciones es evidente.

▪ Países en vías de desarrollo vs países desarrollados

Una problemática ambiental recientemente tomada en cuenta por países desarrollados es el de legislar, inventariar y encontrar el tratamiento adecuado a los pasivos ambientales históricos existentes en sus respectivos estados.

En países en vías de desarrollo como el nuestro este concepto ocupa solamente un marco teórico muy pobre ya que en la actualidad más importante es reducir la contaminación y minimizar el impacto desde las fuentes hacia el medio circundante.

La poca investigación en esta área ambiental tiene como causas importantes la falta de legislación para el manejo de residuos peligrosos, la falta de técnicas para hacer la "evaluación inicial y la evaluación de la exposición en un sitio contaminado" por estos residuos, la irresponsabilidad de los "contaminadores" y quizás la causa más importante sea el alto costo económico que significa remediar un suelo, un cuerpo de agua y/o un flujo de agua subterránea.

El desarrollo industrial, el generalizado manejo de agroquímicos en las actividades agrícolas, el crecimiento urbano y los problemas político-sociales en América Latina fomentan una creciente producción de residuos peligrosos, los que han sido, son y probablemente seguirán siendo causantes de la contaminación de muchos lugares y que en adelante llamaremos "sitios contaminados".

El término residuo peligroso involucra el concepto de residuo, que son todos los materiales generados en procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permite reutilizarlos, en tanto el término peligrosidad según la OPS engloba a las sustancias que por sus características físicas, químicas o infecciosas pueden: (a) causar un aumento de la mortalidad o un aumento de enfermedades graves irreversibles o reversibles que producen invalidez, o contribuir significativamente a ello, o (b) plantear un riesgo sustancial real o potencial a la salud humana o al ambiente cuando son tratados, almacenados, transportados, eliminados o manejados en forma indebida.

Estados Unidos es el país que ha marcado la pauta en el diseño de metodologías para el estudio de sitios peligrosos. Dos de ellas, complementarias entre sí, son las más populares. Una fue diseñada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la otra fue originada por la Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades del Departamento de Salud Pública (ATSDR). La primera estima el riesgo en salud basándose en datos ambientales del sitio y la segunda evalúa el riesgo en salud con fundamento en los datos ambientales y en los antecedentes de salud registrados en el área de influencia del sitio.

La aplicación exacta de los métodos de la EPA y de la ATSDR en América Latina, presenta algunas dificultades, fundamentalmente por dos hechos: el gran número de sitios que deben estudiarse y la escasez de recursos económicos para efectuar los estudios tan detallados que se requieren en dichas metodologías. Por consiguiente, se plantea una alternativa, adaptando los puntos más valiosos de los métodos estadounidenses, a las condiciones y necesidades de los países latinoamericanos.

Existen avances en el uso de tecnologías de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos en Latinoamérica. En el año 1999, se publicó la segunda versión "Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados" como producto de la segunda etapa de la Red Panamericana de Manejo Ambiental de Residuos, REPAMAR, la cual fue una iniciativa regional para promover la minimización de residuos y el desarrollo económico sustentable, por la OPS/CEPIS, con el apoyo del gobierno de Alemania a través de la GTZ.

Otra iniciativa acerca de este tema la dio el Ministerio de Medio Ambiente de Colombia quienes juntos a UNIDO (United Nations Industrial Developed Organization) e ICS (International Centre for Science and High Technology), organizaron el taller denominado "Environmental Pollution and Applicability of Remediation Technologies in Latin American Countries", que se realizó desde el día 4 hasta el 7 de diciembre del 2000 en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.

Investigaciones de biorremediación en el occidente de Tabasco (México) demostraron una descomposición en medios de cultivo (líquido) de casi 70 % de hidrocarburos del tipo fuertemente intemperizado durante un período de 17 días por estimulación de bacterias nativas, resultando en un incremento de bacterias de 70 000 veces (Wilson *et al.*, 1993). Asimismo estudios preliminares de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) indican que la biodegradación pasiva es probablemente responsable de la destoxificación de los desechos del petróleo en varias localidades en el estado de Tabasco (Ferrer, 1997).

Estudios preliminares de laboratorio en desechos similares de áreas de producción petrolera en Argentina, mostraron que se pueden reducir concentraciones de hidrocarburos hasta en 75 % en 20 días, y se puede reducir la toxicidad aguda hasta cinco veces (Adams & Marczewski, 1993).

Áreas de producción similares en Tamaulipas (México) demuestran destoxificación de desechos aceitosos, con incorporación del aceite en el humus del suelo y el inicio de revegetación dentro de un período de dos años, todo lo anterior debido a los procesos pasivos (Torres *et al.*, 1993).

▪ **En Perú:**

Desde hace varios años en Perú las empresas petroleras empezaron a trabajar proyectos de investigación para la recuperación del suelo contaminado por borras, es así que a continuación se señalan algunas investigaciones ejecutadas:

- Experiencia de Repsol YPF en biorremediación de suelos. La experiencia en Latinoamérica destaca técnicas para remediar tierras contaminadas de yacimientos y refinerías, como en Mendoza (Argentina), donde se aplicó un landfarming, y experiencias de fitorremediación en Lima (Perú) en el año 2008. En los terrenos, de alguna estación de servicio, afectados por derrames son habituales las técnicas de tratamiento *in situ*, descontaminando los terrenos sin retirarlos de su emplazamiento, estimulando la actividad de la vida microbiana local, mediante aireación subsuperficial ("*bioventing*") y, en su caso, aporte de nutrientes (García, s.f.).

- PETROPERÚ S.A. contrató a el Consorcio HAZCO - Sagitario, para remediar los pasivos ambientales de los suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando la técnica de biorremediación, de la Refinería La Pampilla S.A., se previó efectuar una disposición y confinamiento seguro en el lote A5 de propiedad de PETROPERU, vecino a Refinería La Pampilla S.A., en aquellos puntos no previstos en Normas Peruanas el confinamiento seguro respondió a normativas de Canadá y EEUU, año 2005.

- PETROPERÚ S.A. - Petroleum Tubular Inspection Of Peru SRL, se realizaron trabajos de tratamiento de borras (biorremediación de suelos) en el Relleno Industrial de Milla Seis de la Refinería Talara - Cia. PTI (Compañía Petroleum Tubular Inspection) año 2000. Donde se realizó la recuperación del suelo contaminado por borras, en la etapa de laboratorio y la etapa de campo.

- Refinería La Pampilla S.A., cuenta con un proyecto de investigación donde se aislaron 262 cepas bacterianas, a partir de muestras de suelo y agua de las cuales se seleccionaron 55 cepas bacterianas, que fueron las de mayor actividad emulsificante y se les evaluó actividad degradativa. El 100 % crecieron sobre el petróleo y mostraron crecimientos comparables a las escalas dos, tres, cuatro y cinco de Mc. Farland. Los microorganismos aislados fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofasciens*, *Listonella dansela*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus var anitratus* (Arenas, 1999).

- Pluspetrol Perú Corporation en Pavayacu - Loreto en 1998, presento en su Plan de manejo de residuos para actividades de perforación en el Lote 8, el uso de la técnica de biorremediación en lodos base aceite, con el objetivo de reducir el nivel de hidrocarburos presentes en los rípios de perforación (base aceite).

- Rentaría y Miranda (1998), en Trujillo, realizaron el aislamiento y selección primaria de microorganismos capaces de utilizar petróleo como única fuente de carbono. Ellos evaluaron el crecimiento sobre petróleo de noventa cepas bacterianas provenientes de muestras de agua y suelo contaminadas con petróleo crudo, cinco cultivos mostraron mayor actividad: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*, los que fueron evaluados a través de los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento y tiempo generacional.

- En materia normativa existen avances en la gestión de residuos sólidos en Perú, se cuenta con la Ley de Residuos Sólidos - Ley N° 27314 y el Reglamento de Residuos Sólidos D.S. N° 057-04-PCM que señalan que todos los residuos deben recibir tratamiento antes de ser enviados a la disposición final.

- La guía ambiental para la Disposición de Desechos de Perforación en la Actividad Petrolera del Ministerio de Energía y Minas, actualmente vigente, indica los siguientes métodos de tratamiento y disposición de desechos:

▪ **Tratamiento biológico *in situ***

El tratamiento biológico de sólidos en el lugar utiliza amplios sistemas de aireación para la reducción y remoción de contaminantes orgánicos degradables biológicamente. Estos incluyen la degradación biológica de hidrocarburos mediante el mezclado constante, arado rotatorio, arado con discos y volteado de los sólidos contaminados para promover una mayor aireación. Esta técnica se emplea cuando se cuenta con la aprobación de las autoridades competentes. Se debe tener en cuenta que el método de tratamiento y

disposición debe ser incluido en el plan de manejo ambiental del estudio de impacto ambiental.

Aproximadamente el 90% del material orgánico se remueve y convierte en dióxido de carbono y agua o en nuevos sólidos biológicos. Idealmente, se continuará la extensa aireación para oxidizar la masa de lodo a dióxido de carbono y agua, de tal manera que no haya una acumulación de lodo neta.

Sin embargo, la experiencia ha demostrado que aproximadamente el 25 % de los sólidos biológicos producidos son inertes a la oxidación biológica y, por lo tanto, se acumulan en el sistema. Se recolecta el exceso de lodo, éste es desaguado y luego de la prueba de clasificación de desechos, con frecuencia, es adecuado para el relleno industrial.

El tipo de tratamiento biológico en el lugar se basa en el tipo de desecho y es específico a la zona. Los tratamientos biológicos deben ser monitoreados de cerca, con el fin de mantener la eficiencia.

▪ **Biorrecuperación**

La biorrecuperación abarca una variedad de métodos de tratamiento que utilizan la actividad de microorganismos que absorben contaminantes presentes en aguas contaminadas, suelos o componentes de diversos productos de desecho. El término biorrecuperación a veces se utiliza para hacer referencia al tratamiento de suelos contaminados. En el tratamiento de suelos contaminados por petróleo, las áreas de derrame, áreas de tanques de almacenamiento enterrados, etc., la cantidad de microorganismos generalmente no es suficiente para darse abasto con la descomposición de altos niveles de hidrocarburos dentro de un periodo económico.

Diversos factores ecológicos, tales como temperatura y oxigenación, influyen en los niveles de población de microorganismos, así como en su actividad y, dependiendo de las condiciones del lugar, requieren que el fortalecimiento sea exitoso.

La biorrecuperación implementa una selección de tipos de micro organismos naturales que se adecúan específicamente a la tarea de descomponer hidrocarburos en el suelo contaminado.

Es responsabilidad del generador asegurar que un desecho en particular sea realmente adecuado para el proceso de biorrecuperación y que el proceso se realice de una manera ambientalmente aceptable.

El generador de desechos deberá cerciorarse:

- que el desecho no contenga componentes que limiten o no hagan posible el proceso biológico.
- que el desecho no contenga altos niveles de metales pesados que pudieran interferir con los procesos metabólicos de las bacterias.
- que se definan las necesidades suplementarias de nutrientes y que se puedan cumplir durante el proceso.
- que el producto resultante del proceso de biorrecuperación sea adecuado para ser reintroducido en el medio.
- asegurarse que el área de biorrecuperación, si se ha realizado in situ, se encuentre protegida y que la contaminación del agua superficial y agua subterránea no se produzca mientras se esté desarrollando el proceso.
- mantener registros exactos del tipo, cantidad y niveles de contaminación del desecho tratado.

La biorrecuperación *in situ* no debe considerarse como un medio de disposición de sólidos fácil y de bajo costo. El proceso puede ser difícil de implementar y controlar para asegurar resultados satisfactorios. La biorrecuperación *in situ* sólo deberá considerarse luego de un análisis geotécnico e hidrogeológico adecuado del área. También se deberá considerar el análisis químico y microbiológico de sólidos.

2.2 CONTAMINANTES DEL SUELO Y SUS EFECTOS

Un suelo contaminado es aquel que ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias, y como consecuencia, pasa de actuar como un sistema protector a ser causa de problemas para el agua, la atmósfera, y los organismos. Al mismo tiempo se modifican sus equilibrios biogeoquímicos y aparecen cantidades anómalas de determinados componentes que originan modificaciones importantes en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

En definitiva se produce un empeoramiento de las propiedades del suelo y una disminución de la masa de suelo. Estos efectos tiene dos consecuencias generales, a corto plazo disminución de la producción y aumento de los gastos de explotación (cada vez el suelo necesita mayor cantidad de abonos y cada vez produce menos). A largo plazo infertilidad total y desertización del territorio.

Los hidrocarburos y sus derivados son sustancias de alto peso molecular, mayormente insolubles en agua, que resultan muy tóxicas para los organismos vivos. La mayoría de los microorganismos del suelo no pueden crecer en presencia de hidrocarburos y mueren. Entre estos microorganismos afectados están varios de importancia ecológica, como las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Los efectos tóxicos sobre los microorganismos se pueden evaluar mediante parámetros como la biomasa microbiana total, ya que la muerte masiva de

microorganismos provocará un descenso en dicha biomasa. Sin embargo, en casi todos los ambientes del planeta existen -aunque en muy baja cantidad- microorganismos (entre bacterias y hongos) capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlos como fuente de carbono (Parrish *et al.*, 1999) y esta es una de las posibles causas de incremento de la biomasa microbiana luego de un tiempo de exposición al contaminante.

Si el petróleo penetra en el sustrato, los tiempos de permanencia suelen aumentar, de conformidad con el tipo de sustrato. En la playa de las costas sujetas a una variedad de niveles energéticos con arena, grava o piedras, que permiten el drenaje, son porosas y el petróleo penetra con relativa facilidad. Si después viene absorbido por la superficie mayor de los granos del sustrato y queda expuesto *in situ* haciéndose más viscoso, puede permanecer en el sedimento durante muchos años.

Por ello, el petróleo puede verse aprisionado en un sedimento anaeróbico en el que su tasa de degradación será muy baja y los organismos que traten de recolonizar pueden encontrarse con hidrocarburos tóxicos. En estas condiciones, se ven favorecidas las especies que toleran los hidrocarburos.

Para la remediación de suelos contaminados se debe tener en cuenta características químicas y cantidad de suelo contaminado, naturaleza de los contaminantes, persistencia en el ambiente y potencial para expandirse, se requiere categorizar los suelos en base a los impactos, oportunidades de reutilización del suelo, identificar riesgo a largo plazo por los suelos contaminados, definir si es necesaria la limpieza y sus niveles, evaluar alternativas de tecnologías de remediación y seleccionarla y construir y operar el sistema de remediación. Algunas de estas tecnologías consideran técnicas de extracción del vapor del suelo (EVS), bioventilación, biopilas, landfarming y mitigación natural.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) es la agencia regulatoria ambiental federal en los EEUU. La EPA establece los estándares y políticas federales para la

regulación de desechos peligrosos, el manejo de la calidad de aire, el manejo de la calidad de agua y la limpieza y mitigación de descargas residuales al suelo y aguas.

La Comisión de Control de Recursos Hídricos (Water Resources Control Board), perteneciente a la Agencia de Protección Ambiental de California (CALEPA), maneja las descargas de desechos a la tierra y todos los programas de evaluación y remediación de suelos y aguas subterráneas en lugares contaminados con petróleo.

El gobierno ecuatoriano determina los niveles de hidrocarburos totales de petróleo (TPH del inglés total petroleum hydrocarbons), muy inferiores a las 5000 ppm.

El gobierno peruano en el año 2007 aprobó con el DS N° 199 -2007-CONAM/PCD los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para suelo en la cual establece los niveles de TPH para suelo agrícola (1000 ppm), para residencial /parques (1000 ppm) y para uso comercial / industrial (5000 ppm). Para fracción de hidrocarburos F4 (>C 34) para uso comercial / industrial (6600 ppm) y para hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (benzo (a) pireno (mg/kg MS) para uso comercial es 0,7 ppm.

2.3 EL HIDROCARBURO Y SUS PROPIEDADES

Las teorías elaboradas sobre el origen del petróleo son numerosísimas, pero hasta hoy no se puede decir que ninguna haya tenido una demostración completa.

Hay varias teorías de tipo inorgánico, por ejemplo, las que suponen la existencia bajo superficie de la tierra de carburos metálicos que en contacto con el agua se habrían descompuesto, produciéndose hidrocarburos que, condensándose en estratos superiores más fríos, podrían haber dado lugar al petróleo.

Otras teorías, también de tipo inorgánico, atribuyen la formación del petróleo a la reacción de metales alcalinos existentes en estado libre en el interior de la tierra con bióxido de carbono a alta temperatura, a través de una serie de reacciones y en contacto con el agua.

Otras teorías suponen la formación de hidrocarburos ligeros a partir de grandes masas de sustancias orgánicas animales o vegetales bajo la acción de grandes presiones y temperaturas en el seno de la tierra. Estos hidrocarburos ligeros habrían podido unirse formando hidrocarburos más pesados por polimerización bajo la acción de determinadas sustancias que hayan actuado de catalizadores.

Es razonable suponer las teorías orgánicas más acertadas; pero es evidente que grandes volúmenes de materia orgánica sólo pueden dar lugar a pequeñas cantidades de hidrocarburos, por lo que la presencia de éstos en las grandes bolsas que se encuentran en la naturaleza sólo es probable por su facilidad de difusión a través de los estratos porosos y por su densidad, menor que la del agua, factores ambos que han hecho posible la acumulación de los hidrocarburos formados en extensas regiones en unos pocos puntos altos de bolsas impermeables formadas por los plegamientos de la corteza terrestre.

La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84 - 87 % de carbono, de 11 - 14 % de hidrógeno, de 0 - 8 % de azufre y de 0 - 4 % de oxígeno y nitrógeno y metales como el níquel y el vanadio.

El petróleo se extrae de las bolsas o yacimientos que hemos descrito, perforando las capas impermeables que lo contienen. Los crudos de petróleo se dividen fundamentalmente en dos grupos: crudos parafínicos y crudos asfálticos.

▪ **Propiedades físicas**

Entre los hidrocarburos (compuestos de carbono e hidrógeno), la composición media aproximada incluye un 65 % de hidrocarburos alifáticos (33% de alcanos lineales y ramificados más un 32% de cicloalcanos) y un 35% de aromáticos, aunque esta distribución, formada durante la catagénesis, depende de la composición del kerógeno original. Los grupos más importantes se detallan a continuación (Kostecky & Calabrese, 1991; Killops & Killops, 1993; Primo Yufera, 1996; Riser-Roberts, 1998; Eweis *et al.*, 1999).

Se menciona la composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo

Fracción	Composición
Saturados	n-alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (PAH)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de PAH, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

Hidrocarburos alifáticos

También conocidos como hidrocarburos saturados o parafinas se dividen en alcanos (lineales o ramificados) y cicloalcanos (también conocidos como naftenos o hidrocarburos nafténicos). Son componentes no polares.

Alcanos

Los alcanos son hidrocarburos saturados, es decir, contienen solamente carbono e hidrógeno y los enlaces carbono-carbono son sencillos. Los alcanos lineales son predominantes en el petróleo e incluyen compuestos de hasta unos cuarenta átomos de carbono o incluso más, aunque los más abundantes son los más ligeros (Killops & Killops, 1993). Por debajo de seis átomos de carbono (metano, etano, propano, butano y pentano) son gaseosos en condiciones normales; los que se encuentran entre seis y quince átomos de carbono son líquidos; los mayores de quince átomos de carbono son líquidos bastante viscosos y los más pesados entre estos constituyen el grupo de las ceras. Los alcanos ramificados más habituales son los isoalcanos (2-metilalcanos) y algo menos los anteisoalcanos (3-metilalcanos).

Alquenos

Los alquenos son productos no saturados que poseen uno o más dobles enlaces. Su presencia en el petróleo es muy minoritaria.

Cicloalcanos

Los más abundantes incluyen series de ciclopentanos y ciclohexanos con cadenas alquílicas de un número de átomos de carbono similar al de los alcanos lineales. En general

son líquidos, pero a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica se pueden convertir en sólidos. También se encuentran cicloalcanos con más de un anillo, por ejemplo los alquilperhidronaftalenos, pero su abundancia decrece a medida que crece el número de anillos, siendo escasos o permaneciendo ausentes los perhidroantracenos y perhidrofenantrenos.

Estos compuestos poseen la misma estructura que los hidrocarburos aromáticos, pero carecen de enlaces dobles y, por tanto, de anillos bencénicos.

- Hidrocarburos aromáticos

Los compuestos aromáticos tienen estructuras basadas en la molécula de benceno lo que les confiere una débil polaridad. Se encuentran en el petróleo, incluyendo compuestos de uno a cinco anillos y aromáticos alquil-sustituídos. Los compuestos aromáticos son más estables que otros cíclicos debido a que comparten electrones deslocalizados por los enlaces "p".

Compuestos monoaromáticos

El compuesto aromático más simple es el benceno. Benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno son conocidos colectivamente como BTEX, y están entre los más solubles de los hidrocarburos. Por ello, son los componentes más móviles geoquímicamente de la gasolina convencional, con lo que su presencia en vertidos de suelos y aguas es habitual.

Compuestos poliaromáticos

Grupo compuesto por más de 100 compuestos orgánicos diferentes que contienen varios anillos bencénicos. Algunos de ellos son persistentes y cancerígenos.

De entre ellos habría que señalar la presencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) que representan uno de los principales problemas ambientales de nuestro tiempo. No son particularmente abundantes en el petróleo, al menos en la forma en que se presentan en la literatura, ya que básicamente aparecen con cadenas lineales unidas en algún punto del anillo. De esta forma no hay cantidades grandes de naftaleno en el petróleo, pero sí de alquilnaftalenos.

Los PAH se forman normalmente durante la quema incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la basura y otras sustancias orgánicas como el tabaco o la carne a la brasa.

Lo mismo ocurre con los derivados del fenantreno (compuesto de tres anillos de benceno fusionados) y del antraceno. Cabe señalar que así como en el caso del benceno los sustituyentes alquílicos suelen ser cadenas largas, para los PAH lo habitual es que se trate de grupos metilo o etilo.

La presencia en el petróleo de PAH con mayor peso molecular que los ya citados es casi testimonial. En cualquier caso, todos ellos son sólidos en condiciones normales y poseen muy baja solubilidad. En la Figura 1 se muestra la estructura del fenantreno.

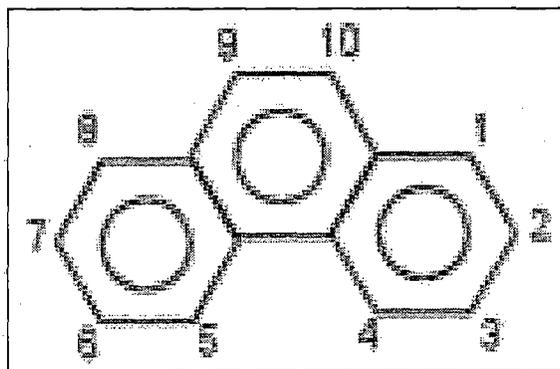


Figura 1: Estructura del fenantreno

Componentes no hidrocarbonados

La inclusión en el petróleo de compuestos no hidrocarbonados incrementa la complejidad de la mezcla, ya de por sí difícil de abordar si sólo se consideran los hidrocarburos. En concreto, el crudo contiene cantidades apreciables de compuestos orgánicos de nitrógeno, azufre y oxígeno (NSO) y, en menores proporciones, de compuestos organometálicos (destacan las porfirinas), metales y sales inorgánicas (Speight, 2001). Por otra parte, en la fracción no destilable del petróleo (asfaltenos y resinas) se encuentran la mayor parte de los componentes heterocíclicos (con N, S y O) motivo por el que se puede considerar a esta fracción parte del conjunto de compuestos no hidrocarbonados.

Compuestos de azufre

Una cantidad significativa de azufre (aprox. un 2 % en peso) puede estar presente en compuestos de peso molecular medio, pertenecientes a la fracción aromática de los hidrocarburos y que se denominan tiofenos, derivando estos de compuestos presentes en kerógenos ricos en azufre. En cualquier caso, los compuestos que contienen azufre tales como los benzotiofenos, dibenzotiofenos, naftobenzotiofenos y sus derivados alquílicos son más abundantes que los compuestos de nitrógeno y oxígeno.

Compuestos de nitrógeno

Los compuestos de nitrógeno que se encuentran en el crudo se pueden agrupar en dos bloques (Benedik *et al.*, 1998); el primero con la moléculas de carácter no básico que incluyen a pirroles e índoles y derivados alquílicos del carbazol; mientras que las moléculas de carácter básico son, fundamentalmente, derivados de la piridina y la quinoleína.

Compuestos de oxígeno

El oxígeno apenas aparece en las fracciones más volátiles del petróleo. Por el contrario, en fracciones pesadas o en crudos poco madurados su proporción aumenta, sirviendo también como indicador de la mayor o menor oxidación de la mezcla producto del "weathering" (envejecimiento).

Los compuestos orgánicos con oxígeno presentan una gran variedad de formas de las que muchas están presentes en el petróleo. En el grupo de los compuestos alifáticos destaca la abundancia de ácidos nafténicos; entre las moléculas aromáticas son habituales compuestos muy parecidos a los del azufre, en los cuales el sustituyente furano reemplaza al tiofeno.

Porfirinas y metales

Como ya se ha mencionado, el petróleo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos. No obstante la aparición de impurezas tales como el agua, sales y algunos componentes metálicos es habitual.

Los metales más abundantes en el petróleo son el vanadio y el níquel (en ocasiones más de 1000 ppm), su incorporación al petróleo tiene lugar durante la diagénesis, en el proceso de degradación de la clorofila. El núcleo de ésta contiene porfirina que posee un ión central metálico (Mg^{2+}) que será reemplazado en los primeros momentos de VO^{2+} y Ni^{2+} . Las peculiaridades de este tipo de compuestos organometálicos hace que, normalmente, se considere su estudio por separado del de los compuestos de nitrógeno, incluyéndose por otra parte sus contenidos en V y Ni en la cuantificación total de metales en el petróleo.

En cuanto a los componentes metálicos se pueden fijar dos grupos que incluyen los más significativos en el petróleo (Engel & Macko, 1993; Reimann & Caritat, 1998; Speight, 2001):

- Zn, Ti, Ca y Mg aparecen principalmente en forma de jabones organometálicos con propiedades surfactantes.
- V, Cu, Ni y Fe están en su mayoría presentes en compuestos solubles en el petróleo, ya que estos metales son capaces de quelarse con componentes pirrólicos derivados de la clorofila (porfirinas ya mencionadas) y la hemoglobina originales de los biopolímeros generadores del petróleo.

Todos estos compuestos organometálicos se recogen en la fracción no destilable del petróleo por lo que su estudio individualizado resulta complejo.

- Constituyentes no destilables: asfaltenos y resinas

Los asfaltenos son compuestos aromáticos y heteroatómicos de gran polaridad y con pesos moleculares que oscilan entre 1 000 y 100 000. Su principal característica es la tendencia a la asociación y formación de micelas. Cuando se habla de benceno u otro compuesto en particular se hace referencia a especies químicas bien definidas con propiedades perfectamente medibles y reproducibles. Por el contrario, los asfaltenos no son una especie química y sí una familia de compuestos que presentan sólo un comportamiento global característico. Bajo el término asfaltenos se agrupa a los componentes que quedan como fracción insoluble después de tratar una mezcla en determinadas condiciones (solventes, temperaturas, etc.).

La composición de esta fracción insoluble varía con el tipo de petróleo y la característica común, que los hace importantes en la producción de crudo, es que suelen originar precipitados (sólidos) que dañan el medio poroso o bloquean tuberías de

conducción en instalaciones de extracción o de refino. También cabe recordar que gran parte de los compuestos NSO, porfirinas y otros organometálicos se recogen en esta fracción.

Las resinas pueden considerarse un subgrupo dentro de los asfaltenos, o más en general otra fracción no destilable formada por compuestos aromáticos malténicos muy polares con gran tendencia a la adhesión, aunque por otra parte su presencia limita la tendencia a la interacción entre los asfaltenos. Su peso molecular se encuentra entre 500 y 5 000 unidades.

La complejidad de las fracciones no destilables hace difícil precisar más sus propiedades así como los efectos que sobre los procesos habituales en la industria petroquímica y en la problemática ambiental puedan tener.

Existe una significativa diferencia de los asfaltenos precipitados con n-heptano respecto a los precipitados con n-pentano, la relación H/C de los primeros es más baja, lo que indica su alto grado de aromaticidad. Las relaciones N/C, O/C y S/C son usualmente más altas en los asfaltenos precipitados con n-heptano, lo que se debe a la alta proporción de heteroátomos en esta fracción. En la Figura 2 se presenta la representación simplificada de la separación de asfaltenos.

Los asfaltenos se consideran como los componentes de menor valor de un aceite crudo, ya que causan un marcado aumento de su viscosidad, haciéndolo difícil de transportar y de procesar.

En diversos estudios se ha encontrado que los asfaltenos son los principales componentes en diferentes aceites crudos (Yen & Chilingarian, 1994), y debido a su característica de ser no refinables, son motivadores de diversos problemas en su manejo, tales como taponamiento en equipos, reducción de la producción de productos destilables en la refinación del aceite crudo debido a su alta resistencia a la desintegración, iniciadores y/o motivadores de formación de coque en los procesos catalíticos ocasionando una

desactivación importante en los catalizadores, etc. En el Cuadro 2 se mencionan los métodos estándar para la precipitación de asfaltenos (Speight *et al.*, 1984).

Adicionalmente, debido a la presencia de metales pesados, los asfaltenos son difíciles de biodegradar, representando los compuestos más indeseables desde el punto de vista de tratamiento de desperdicios del petróleo.

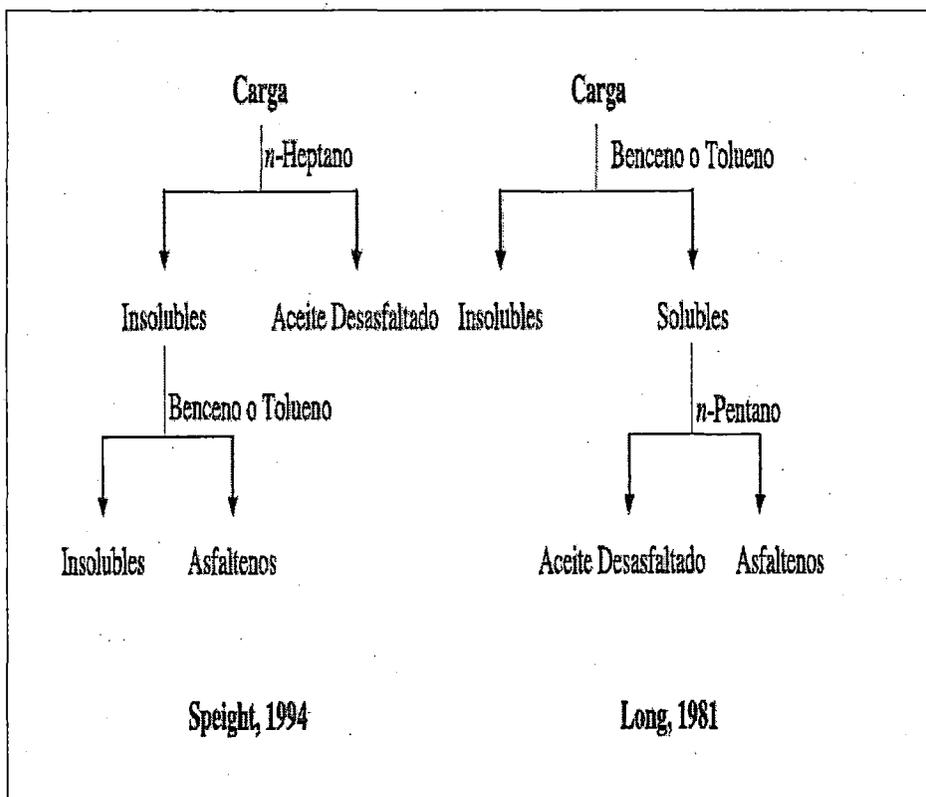


Figura 2: Representación simplificada de la separación de asfaltenos

Cuadro 2: Métodos estándar para la precipitación de asfaltenos

Método	Agente precipitante	Calentamiento	Vol. precipitante/ gramos de muestra	Metodología
ASTM D-893	n-pentano grado comercial	65±5°C. Filtrar los sólidos suspendidos usando 150 mL de pentano a temperatura ambiente	10	Centrifugar a 600-700 rpm durante 20 min. Decantar hasta que queden sólo 5 mL de solución en el tubo de centrifuga. Volver a centrifugar en las mismas condiciones. Secar a 105±2°C durante 30 min. Dejar en reposo durante 15 h. Filtrar. Enjuagar 3 veces con 10 mL cada una.
ASTM D-2006	n-pentano grado comercial	No requiere de calentamiento	50	Disolver en benceno. Calentar si es necesario. Adicionar n-pentano y agitar 5 min. Reposar por 2 horas. Filtrar a vacío. Enjuagar el matraz donde se hizo la prueba. Secar a 105°C.
Syncrude	n-pentano grado analítico, benceno grado comercial	Calentar para disolver si es necesario	1 mL benceno, 40 mL nC ₅	Adicionar n-pentano y agitar bien. Calentar unos pocos segundos hasta disolución. Reposar 30 min. Enjuagar con 10-20 mL de n-pentano.
ASTM D-2007	n-pentano grado comercial	Requiere calentamiento para disolverse	10	Adicionar n-heptano y refluxar durante 1 h. Enfriar durante 1.5-2.5 h en la oscuridad. Filtrar sobre papel Whatman no. 42. Enjuagar el papel filtro con n-heptano caliente durante 1 h. Refluxar con 30-50 mL de tolueno hasta que los sólidos obtenidos sean disueltos completamente. Evaporar el tolueno en un baño de agua. Secar a 100-110°C durante 30 min.
IP 143-77	n-heptano, tolueno	Requiere refluxo	100	Adicionar n-heptano y refluxar durante 15-20 min. Enfriar durante 1 h. Filtrar a vacío. Enjuagar 3 veces con 10 mL cada una. Secar a 107°C durante 15 min.
ASTM D-3279	n-heptano con pureza mayor al 99%	Requiere refluxo	100	

Fuente: Speight *et al.* (1984)

▪ Destilación del petróleo

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que potencialmente pueden ser contaminantes en el ambiente, hay que entender el proceso de refinado del crudo utilizado para la obtención de estos productos petrolíferos.

El refinado pasa por un proceso de destilación con la finalidad de eliminar el color y olor, así como también, los compuestos de azufre.

La composición química de la gasolina es diferente a la del gasoil debido a que se han obtenido como productos de destilación del petróleo a partir de diferentes intervalos de temperatura. La obtención de gasolina es menos directa que la de los fueles y gasóleos, ya que en primera fase se obtiene por destilación del crudo entre 20 - 180°C. Esto implica una composición de n-alcanos más ligera (C6 - C11) que los fueles y gasóleo (C10 - C25).

En el Cuadro 3 se mencionan las fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo.

La obtención de diversos productos útiles a partir del petróleo crudo se realiza sometiéndolo a un proceso de destilación fraccionaria. La causa determinante de la separación de los componentes del crudo es la temperatura. Cada componente tiene un punto de ebullición diferente, de tal forma que, una vez alcanzado, provoca la separación del compuesto del resto del conjunto. El petróleo crudo es sometido en el horno a una temperatura que generalmente bordea los 400 grados centígrados, al entrar en la torre de fraccionamiento, se evapora una gran parte, los vapores ascienden a través de unos orificios que tienen las bandejas horizontales dispuestas a distintas alturas de la torre. Como esta es sucesivamente menos caliente en sus partes superiores, los vapores van enfriándose y condensándose a distintas temperaturas. Al volver al estado líquido, esas bandejas horizontales les sirven de recipientes. Las fracciones más pesadas son recogidas del fondo de la torre y se convierten en combustible residual o en asfalto. De las otras fracciones, salidas de bandejas gradualmente más altas, van a derivarse los aceites

lubricantes, el gas oil, el querosene y la gasolina, tras de nuevos tratamientos y refinaciones posteriores.

Los hidrocarburos que forman el asfalto son todos pesados, la molécula complicada, pues los hidrocarburos ligeros se eliminan en el proceso de destilación. Ver Figura 3.

Cuadro 3: Fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo

FRACCIÓN	TEMPERATURA EBULLICIÓN	COMPOSICIÓN APROXIMADA	USOS
Gasolina ligera	20-100	$C_5H_{12} - C_7H_{16}$	Disolvente
Bencina	70 - 90	$C_6 - C_7$	Limpieza en seco
Lingroína	80 - 120	$C_6 - C_8$	Disolvente
Gasolina	20 - 180	$C_6 - C_{11}$	Carburante de motores
Querosene, Jet	200 - 300	$C_{12} - C_{16}$	Alumbrado y carburante
Gasolina, Diesel	200 - 350	$C_{13} - C_{18}$	Carburante de motores
Aceite lubricante	200 - 350	$C_{16} - C_{20}$	Lubricantes
Grasas, vaselina	250 - 400	$C_{18} - C_{22}$	Farmacéutica
Cera de parafina	245 - 540	$C_{20} - C_{45}$	Velas
Betún asfáltico (35% peso)	> 540	$C_{30} - C_{45}$	Alquitrán asfáltico coque de petróleo

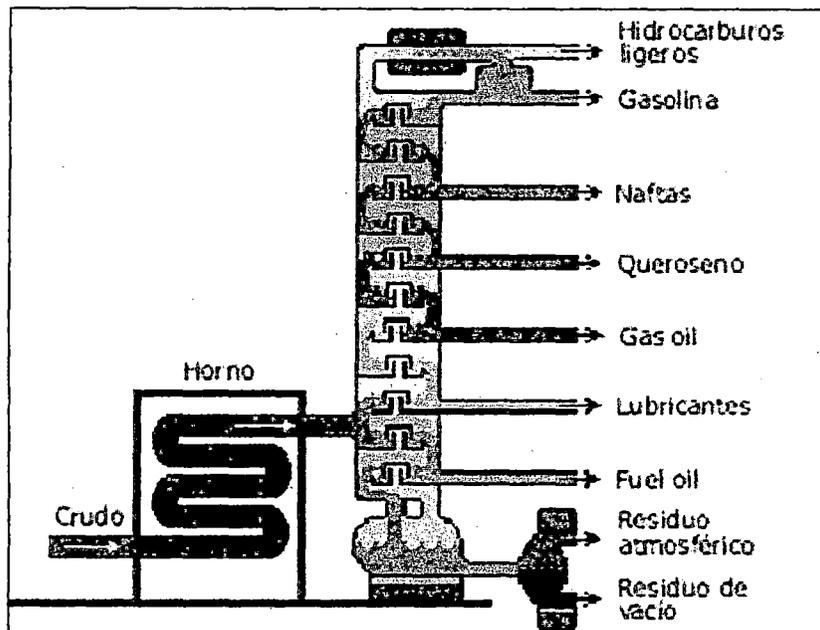


Figura 3: Proceso productivo básico (destilación primaria)

Los diferentes productos derivados del proceso de destilación primaria pueden pasar a tanques de almacenamiento o por mayores procesos químicos para, mediante procesamiento adicional, obtener productos más livianos.

2.4 CLASIFICACIÓN DEL HIDROCARBURO POR LA INDUSTRIA PETROLERA

En la industria petrolera se comercializa el petróleo en base seca, por lo tanto la determinación de agua y sedimento es fundamental. Es por ello que se destaca la clasificación del crudo por medio de grados API y porcentaje de agua y sedimentos para la estimación del precio del crudo.

La gravedad API, de sus siglas en inglés American Petroleum Institute, es una medida de densidad que describe que tan pesado o liviano es el petróleo comparándolo con el agua. Si los grados API son mayores a 10, es más liviano que el agua, y por lo tanto flotaría en esta. La gravedad API es también usada para comparar densidades de fracciones extraídas del petróleo. Cuanto mayor es el grado API mejor es la calidad del petróleo. Ver Cuadro 4.

Cuadro 4: Tipos de crudo según grados API

Tipo	Densidad grados API
Extra pesados	< 10
Pesados	10 – 22.3
Medianos	22.3 – 31.1
Ligero	31.1 – 39
Superligero	> 39

Fuente: Instituto Mexicano de Petróleo

En el segundo caso, el petróleo que tenga menor azufre (menos de 0.5%), se conoce como crudo dulce, caso contrario (mayor contenido de azufre) se denomina crudo ácido. Por lo tanto, el petróleo que tenga menor viscosidad y contenido azufre tendrá un mayor precio en el mercado internacional. Generalmente hablando, un mayor valor de gravedad API en un producto de refinería representa que este tiene un mayor valor comercial. Esto básicamente debido a la facilidad (operacional y económica) de producir destilados valiosos como gasolina, jet fuel y gasóleo con alimentaciones de crudos livianos y a los altos rendimientos de los mismos. Esta regla es válida hasta los 45 grados API, más allá de este valor las cadenas moleculares son tan cortas que hacen que los productos tengan menor valor comercial.

2.5 LA BIORREMEDIACIÓN Y SU APLICACIÓN

La biorremediación es definida por la Academia Americana de Microbiología como “el uso de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos ambientales como resultado de la acumulación de desechos peligrosos” (Gibson & Sayler, 1992). Estas técnicas están aprobadas por varias agencias reguladoras en todo el mundo (United States Environmental Protection Agency-EPA, Environmental Canadá, etc.).

Se ha demostrado que el crecimiento de los microorganismos requiere de fuentes de carbono derivadas de los hidrocarburos del petróleo.

El principio básico del proceso de biorremediación consiste en la destrucción de la estructura de los hidrocarburos para convertirlos en los componentes no tóxicos de bióxido de carbono, agua y biomasa. Ver Figura 4. Esto se logra mediante el cultivo de bacterias endémicas con capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y a las características del suelo en el sitio del tratamiento.

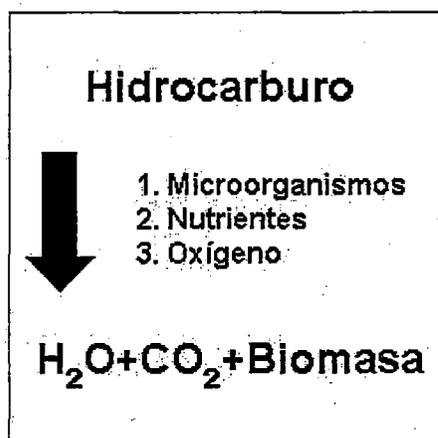


Figura 4: Principios de la biorremediación

El proceso en algunos casos consiste en la inoculación del material contaminado por petróleo con varias cepas de microorganismos combinadas con aminoácidos, enzimas, vitaminas, minerales y nutrientes que mejoran la bioreceptividad y la capacidad metabólica de las bacterias aumentando su capacidad de oxigenación y mineralización de los hidrocarburos. Tal como cualquier otro organismo, los pequeños comedores de petróleo necesitan alimentos para vivir y multiplicarse, incluso carbono, fósforo, nitrógeno y oligoelementos; en otras palabras, con su enorme apetito por los hidrocarburos, las bacterias literalmente se los comen y van limpiando el suelo.

2.5.1 APLICABILIDAD

El ámbito de aplicabilidad de la biorremediación es amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (Atlas & Unterman, 1999):

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar (Young & Cerniglia, 1995; Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999):

- Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, BTEX -benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos-, PAH, y todos los productos compuestos por mezclas de aquellos (gasolina, querosene, gasoil, fuel oil, etc.).
- Hidrocarburos clorados (pesticidas -DDT y otros-, PCB -bifenilos policlorados-, TCE -tricloroetileno-, PCE -percloroetileno-, herbicidas,...).
- Compuestos nitroaromáticos (TNT -trinitrotolueno- y otros).
- Metales pesados (la biorremediación de metales pesados no ha sido utilizada).

- Otros contaminantes: compuestos organofosforados, dioxinas (Halden & Dwyer, 1997), cianuros, fenoles, etc.

Es evidente que no podemos llevar a cabo un análisis detallado de los estudios de biodegradación existentes sobre todos los compuestos citados anteriormente. Por ello el texto se centrará fundamentalmente en los hidrocarburos así como en los temas que han sido objeto del análisis experimental.

Por otro lado, las enumeraciones precedentes dejan claro que la complejidad implicada en esta tecnología hace inexcusable una aproximación multidisciplinar en la que la microbiología, la química y la ingeniería tienen un papel importante. La amplitud de los aspectos incluidos en la aplicación de las tecnologías de biorremediación se refleja en las Figuras 5 y 6.

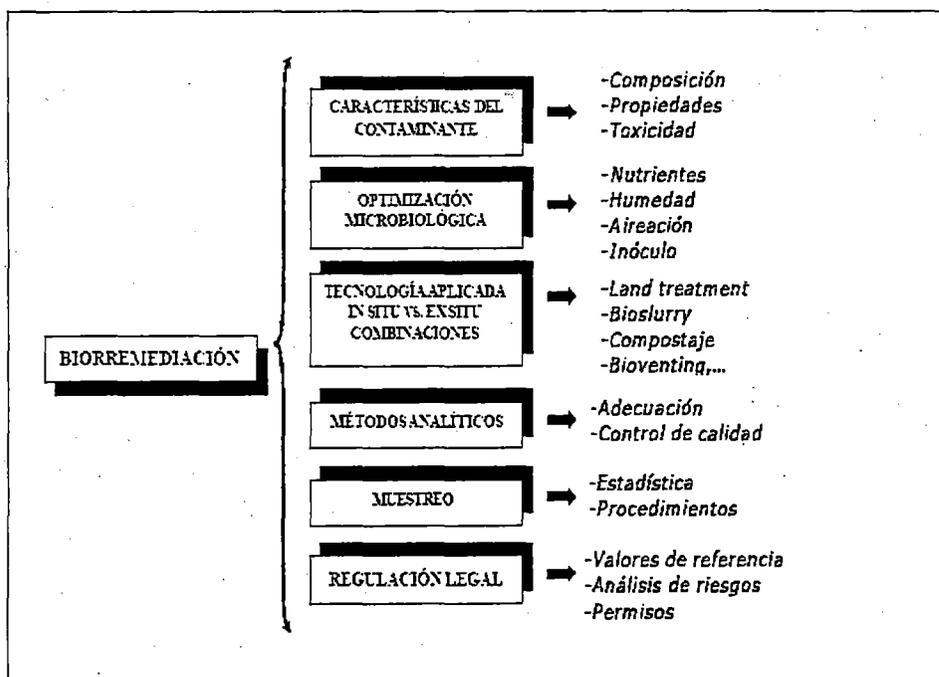


Figura 5: Relación de parámetros de todo tipo implicados en la biorremediación (modificada de Walter & Crawford, 1997)

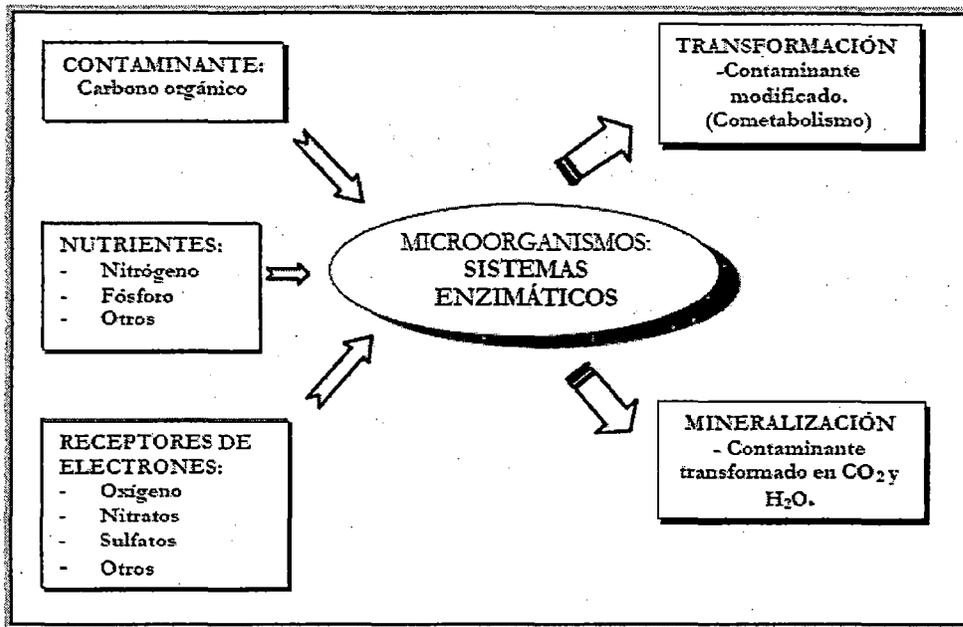


Figura 6: Actividad microbiana en el proceso de biorremediación de compuestos orgánicos

2.5.2 MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN

Desde un punto de vista metodológico existen tres conceptos importantes, que determinan a su vez otras tantas aproximaciones principales a la biorremediación, y que se comentan una síntesis de estas técnicas a continuación:

- **Atenuación natural**

Se denomina biorremediación intrínseca o atenuación natural a la que sobre muchos compuestos orgánicos se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Watanabe, 2001). Estos utilizan su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta CO_2) los compuestos o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio.

En otras ocasiones las transformaciones cometabólicas son las responsables de biodegradación. En cualquier caso los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes.

La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las "habilidades metabólicas" de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y lógicamente de la geoquímica y la hidrogeología en la zona. En relación con el oxígeno, y en un modelo muy simplificado, el proceso se definiría de la siguiente forma:

- En presencia de oxígeno (condiciones aerobias) los microorganismos convertirían en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana. Se habla de biodegradación aerobia o bien de biorremediación aerobia.
- En el caso de escasez de oxígeno (condiciones anaeróbicas), los microorganismos producen otros compuestos, dependiendo de los aceptores de electrones disponibles (nitrito, sulfato, formas oxidadas de Fe o Mn, etc.). Hablaríamos de biodegradación anaerobia o bien de biorremediación anaerobia, proceso generalmente más lento que el aerobio.

Abunde o falte el oxígeno en el medio, éste puede reunir unas condiciones ideales en las que los contaminantes se transformarían en compuestos no peligrosos para los posibles receptores. En este caso, la estrategia apropiada de biorremediación puede ser la atenuación natural (Mills *et al.*, 2003). Desafortunadamente, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en cualquier medio, señalándose a continuación los más habituales (King *et al.*, 1997):

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones¹.

¹ Los organismos heterótrofos obtienen la energía que necesitan por medio de la oxidación de los compuestos orgánicos que asimilan. Una parte de la energía obtenida se pierde en forma de calor y el resto se conserva en forma de adenosintrifosfato (ATP), quedando así disponible para el movimiento, crecimiento y otras formas de trabajo. La oxidación total de un compuesto orgánico determinado produce dióxido de carbono (CO₂) como producto final. Según sea el último aceptor utilizado se identifican dos tipos de respiración, a saber: **Respiración aeróbica** donde el oxígeno es

- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante.

Si aportamos al medio alguno de los elementos de los que carece o bien potenciamos los existentes, favoreceremos la eliminación del posible contaminante. En muchos casos este tipo de intervención será necesaria para reforzar el proceso natural o bien para implantar unas condiciones que reduzcan el riesgo ("Engiere Bioremediation Strategies"), ver Figura 7.

En esto se basan las siguientes aproximaciones biotecnológicas: (a) introducción de modificaciones en el ambiente mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos ("bioestimulation" o "enhanced biorremediación") y (b) la adición de microorganismos ("bioaugmentation").

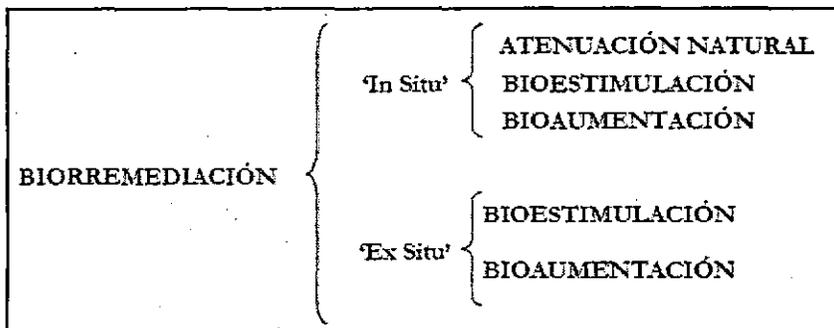


Figura 7: Aproximación a la biorremediación

el aceptor final externo de electrones, o **Respiración anaeróbica**, donde el aceptor final de electrones no es el O₂ sino otro compuesto inorgánico, como son el nitrato y el sulfato, entre otros.

• Bioestimulación

Existen multitud de técnicas para aplicar la bioestimulación. Una primera división se puede hacer entre prácticas *in situ* (bioventing, air sparing, adición de nutrientes, etc.) y técnicas *ex situ* (landfarming, biopilas, biorreactores, etc.), dependiendo de una gran variedad de factores específicos (Kerr, 1994; King *et al.*, 1997; Riser-Roberts, 1998; Atlas & Unterman, 1999; Eweis *et al.*, 1999). En muchos casos será suficiente añadir aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, etc.) aunque en otros se podría requerir la adición de nutrientes o ajustes de pH. En todo caso, estas aproximaciones se sostienen en la premisa de que los microorganismos indígenas son capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación.

En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada (Morra, 1996) y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación. En esta línea, los sistemas “pump and treat” para aguas subterráneas (Bosma, 2001), que están a caballo entre las técnicas *in situ* y *ex situ*, se están imponiendo en los últimos tiempos porque permiten utilizar un tanque mezclador como un verdadero biorreactor, con el fin de controlar todos los parámetros importantes.

• Bioaumentación

Otras líneas de investigación han llevado a la utilización de microorganismos especializados y exógenos al medio con el fin de optimizar la remediación (Walter, 1997; Atlas & Unterman, 1999). Esta técnica (bioaumentación) puede ser apropiada para proyectos *ex situ*, especialmente en lo que se refiere a la utilización de consorcios especializados (Viñas *et al.*, 2002). No obstante, falta por demostrar su completa validez en procesos *in situ*, ya que se han señalado una serie de razones que dificultan la aplicabilidad de la misma:

- El tamaño de la población de microorganismos degradadores crece rápidamente como respuesta a la contaminación del medio y es muy difícil, si no imposible, incrementar la población microbiana más allá de esos valores mediante un inoculo externo.
- La capacidad de carga de muchos ambientes viene determinada por factores tales como la presencia de depredadores, la superficie 'libre' de contaminantes y la presencia de abundante materia orgánica (Providenti *et al.*, 1992).
- Los microorganismos añadidos compiten con la población indígena antes de ocupar los nichos potenciales.

Pese a todo, la investigación en este terreno avanza a gran velocidad; además, la creación de microorganismos desarrollados por ingeniería genética puede con el tiempo ser el factor desencadenante de cambios decisivos en el panorama actual de la biorremediación.

2.5.3 FACTORES QUE CONDICIONAN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles.

Los factores que condicionan el proceso de biorremediación se muestran en la Figura 8.

Cada cepa microbiana tiene un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como son: la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. En consecuencia, cuanto mayor

sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos la biodegradación se ralentiza, siendo los rangos óptimos para la biodegradación: pH entre 6 - 8 y temperaturas entre 20 - 30 °C (Alexander, 1999).

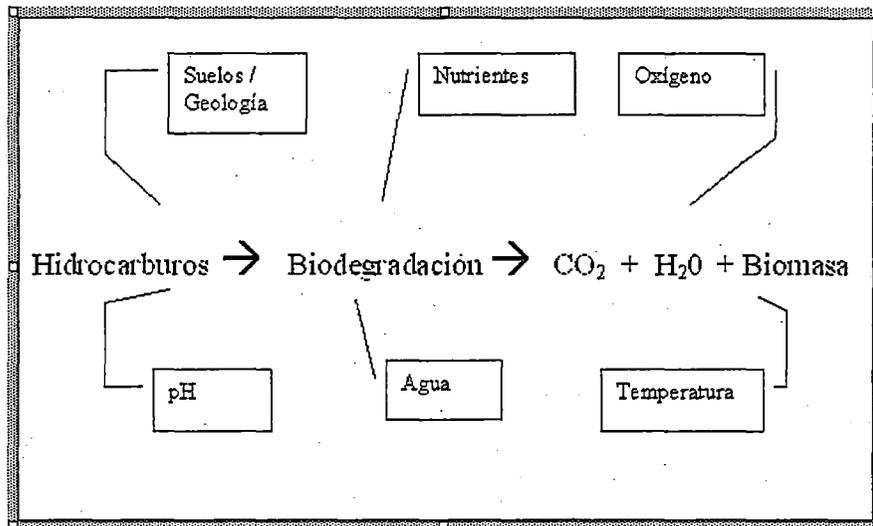


Figura 8: Factores que condicionan el proceso de biorremediación

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones. Las formas catiónicas (NH₄⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻, Cl⁻) son más solubles a pH alcalino (Sharpley, 1991). En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6 - 8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4 - 7,8) (Dibble & Bartha, 1979). Verstraete *et al.* (1976) consiguieron duplicar la biodegradación de un suelo contaminado con gasolina incrementando el pH de 4,5 a 7,4. Para alcalinizar un suelo se utiliza arena de caliza e iones Ca²⁺ y Mg²⁺ mientras que para acidificar un suelo se utiliza FeSO₄ (Baker, 1994).

Sin embargo, con poblaciones microbianas adaptadas también se ha descrito biodegradación de los PAH en suelos extremadamente ácidos de pH 2 (Stapleton, 1998).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20 - 30 °C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados (ver revisión Menn *et al.*, 2000). No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos temperaturas extremas: a 10 °C en suelos subárticos y a 5 °C en suelos árticos (Whyte *et al.*, 1999) y hasta 60 °C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Sorkoh *et al.*, 1993).

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Alexander, 1999; Menn *et al.*, 2000).

Dibble & Bartha (1979), describieron un rango de humedad óptimo del 30 - 90 % de la capacidad de campo para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, mientras que Lajoie & Strom (1994) y Pramer & Bartha (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40 % de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60 % de la capacidad de campo del suelo (Menn *et al.*, 2000).

La estructura química de las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los *n*-alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10-C20) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, y que por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C20) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua (Chaineau *et al.*, 1995). Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que la *n*-alcano y alcanos ramificados. Asimismo, los PAH que contienen de dos a tres anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los PAH de cuatro anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad (Kästner, 2000).

Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a la complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas (Harayama *et al.*, 1997; 1999).

La biodisponibilidad, la tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad.

En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes (Stucki & Alexander, 1987; Tabak *et al.*, 1994 y 1995; Harms *et al.*, 1996; Bosma *et al.*, 1997).

Un fenómeno que afecta de forma negativa a la biodisponibilidad de los contaminantes es el envejecimiento o *ageing* que se define como la pérdida de la biodegradabilidad de los compuestos a lo largo del tiempo en el suelo (aunque la población

microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica (Huesemann, 1995; Nocentini, 2000; Breedveld & Sparrevik, 2001). Este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo, absorción a la materia orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; a la disolución en fases líquidas no acuosas (FLNA), o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo (Loosdrecht *et al.*, 1990; Weissenfels *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1993; Alexander, 1995; Shuttleworth y Cerniglia, 1995; Alexander, 1999; Bosma *et al.*, 1997).

Con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes existen numerosos ejemplos en la bibliografía de la utilización de tensioactivos sintéticos y biotensioactivos en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Volkering & Breure, 1998; Chritofi & Ivshina, 2002).

La presencia de aceptores de electrones. La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O₂ como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O₂, y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₂, Mn⁴⁺ y Fe³⁺) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Holliger y Zehnder, 1996; Grishchenkov *et al.*, 2000; Boopathy, 2002; Massias *et al.*, 2003).

Los nutrientes inorgánicos. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca²⁺, Na⁺, Fe²⁺ y SO₄²⁻ ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (Menn *et al.*, 2000).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Dott *et al.*, 1995; Breedveld y Sparrevik, 2001; Chaineau *et al.*,

2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (Environmental Protection Agency - EPA, 1995), y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10 (Dibble & Bartha, 1979), 500:10 (Zhou & Crawford, 1995) y de 100:10:1 a 300:10:1 respecto al COT a degradar (Bossert & Bartha, 1984, Oudot & Dutrieux, 1989; Alexander, 1999; Atagana *et al.*, 2003). Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos.

Morgan & Watkinson (1992) describieron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Zhou & Crawford, 1995; Margesin y Schinner, 1997; Genouw *et al.*, 1994). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA® 22) para la biorremediación de suelos contaminados (Lindstrom *et al.*, 1991; Pritchard & Costa, 1991). Además es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio).

2.5.4 FASES DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Para la evaluación e implementación de biorremediación involucre diferentes etapas, por la cual se necesita información relacionada con el contaminante y el medio contaminado. Esta se debe coleccionar durante la caracterización del sitio y los estados del estudio de factibilidad.

Las fases del proceso de biorremediación son las siguientes:

- Físicoquímico, conocer el tipo y concentración del contaminante.
- Caracterización del suelo, definir características químicas, microbiológica y físicas del suelo.
- Microbiológico, evalúa la presencia de poblaciones microbianas, su actividad metabólica real y potencial y las degradaciones de contaminantes presentes en el suelo.
- Selección de la técnica de remediación, tomando en cuenta la optimización de las condiciones físicoquímicas (humedad, compuestos inorgánicos, biodisponibilidad) y biológicos (posibilidad de inocular poblaciones microbianas alóctonas).

2.5.5 EFECTOS DE LA BIORREMEDIACIÓN EN LAS PROPIEDADES DEL SUELO

La contaminación por hidrocarburos tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un suelo, pudiendo impedir o retardar el crecimiento de la vegetación sobre el área contaminada (Luque *et al.*, 1995; Lieth & Markert, 1990).

La biorremediación como solución a problemas de contaminación, se presenta como una alternativa altamente recomendable debido a su bajo impacto al ambiente, producción mínima de residuos y por lo general son residuos menos problemáticos que tratados, por utilizar a los microorganismos como maquina de transformación y operación.

La biorremediación de suelos no es un proceso instantáneo, es decir, el suelo no queda descontaminado nada más al aplicar los microorganismos precisos. Los resultados de su aplicación varían dependiendo del nivel de contaminación, del tipo y duración de los contaminantes implicados y de las propias condiciones ambientales del terreno, como son temperatura, el clima y la presencia de sustancias químicas, tanto sólidas como líquidas.

La biorremediación aumenta el proceso de tratamiento que consiste en estar continuamente añadiendo microbios que eliminen los residuos contaminantes.

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (Alexander, 1999). Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Kastner, 2000).

Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean de gran recalcitrancia (Alexander, 1999). Únicamente en aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos de gran recalcitrancia, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, procedentes de cultivos de laboratorio con capacidades degradativas especializadas, para posibilitar la degradación de los contaminantes existentes. Sin embargo, a menudo la falta de adaptación de las poblaciones exógenas, puede poner en peligro su supervivencia (Dejonghe *et al.*, 2001; Kastner, 2000). Por lo tanto, antes de iniciar cualquier estudio de biorremediación, es esencial conocer si la población microbiana existente en el suelo es potencialmente degradadora de los contaminantes presentes y es suficiente para llevar a cabo el proceso de biodegradación en un tiempo razonable (Wrenn & Venosa, 1996).

Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando microcolonias que se encuentran separadas unos 100 μm , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3 μm (Harms *et al.*, 1996).

2.5.6 ALGUNAS TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN EMPLEADAS PARA DESCONTAMINAR EL SUELO CON BORRA

Los hidrocarburos dependiendo su tipo, requieren diferentes tiempos de degradación. Las parafinas de cadenas cortas son los sustratos fácilmente degradables por

los microorganismos seguidos en orden descendiente por las parafinas de cadena larga, isoparafinas, cicloparafinas, aromático, heterocíclico, resinas y asfaltenos. Los compuestos polares y los asfaltenos son generalmente considerados resistentes a la biodegradación o esta ocurre tan lentamente que hace ineficaz el tratamiento biológico en forma práctica. Los productos de la degradación son CO₂, agua, ácidos grasos y material celular.

Los métodos de biorremediación se pueden aplicar *in situ*, al que llamaremos biorremediación asistida *in situ* (BAS) o *ex situ* normalmente a cielo abierto (landfarming), instalaciones cubiertas y/o en reactores biológicos.

La tasa de biodegradación depende fundamentalmente del número de bacterias degradadoras de petróleo presentes, la cantidad de agua, oxígeno, concentración de nutrientes, parámetros físicos (temperatura, pH, etc), constituyentes característicos del hidrocarburo y condiciones climáticas de la zona.

Las técnicas de remediación más comunes se mencionan a continuación: biorremediación *in situ*, landfarming, biopilas, bioreactor, bioventilación, desorción térmica, fitoremediación, lavado de suelos y vitrificación.

▪ **La biorremediación *in situ***

Consiste en modificar las condiciones fisicoquímicas en la zona contaminada para que se incremente, tanto el número de microorganismos capaces de degradar los tóxicos presentes, como su tasa metabólica. El propósito es incrementar la velocidad de degradación de los tóxicos.

Este método implica la adición de humedad y de los nutrientes necesarios para conseguir el incremento microbiano y favorecer el metabolismo. Se pueden tratar grandes extensiones de suelo con un mínimo transporte, normalmente utilizando una retroexcavadora, la aireación frecuentemente se realiza empleando la misma

retroexcavadora. Solo es posible un control ambiental mínimo de los parámetros físicos y de los productos de las reacciones microbianas en general se dispersan libremente.

Este proceso puede ser acelerado mediante el reciclaje de parte de suelo empleado. Este método posee la ventaja de que se pueden tratar grandes cantidades de tierra a la vez y que es efectivo para la reducción de las concentraciones de casi todos los constituyentes de los petróleos típicos.

▪ El landfarming

Es una tecnología de remediación de suelos, donde el mismo es retirado a otro terreno y mezclado en la superficie, reduciendo así las concentraciones de petróleo mediante la biodegradación por diferentes microorganismos al hacer uso de la facultad de degradar sustancias orgánicas al aprovecharlas como fuente de energía.

La biorremediación *ex situ*, se utilizan para tratar contaminaciones que no se pueden eliminar eficientemente *in situ*, ya sea porque la sustancia no se puede degradar o por las características del suelo contaminado, o bien porque el tratamiento se deba terminar en un lapso relativamente corto.

El método del landfarming es similar a la biorremediación *in situ*, excepto que, en este, el suelo contaminado es retirado y esparcido en otro terreno, mezclado en la superficie. Ver Figura 9.

El terreno debe poseer buenas características de laboreo agrícola: ausencia de piedras, fácilmente removible, pH cercano a la neutralidad, facilidad de aireación y poseer un contenido adecuado de nitrógeno y fósforo.

Deben tomarse precauciones respecto a la posibilidad de migración de los contaminantes hacia las capas de agua subterráneas, curso de agua superficial o zonas agrícolas y forestales.

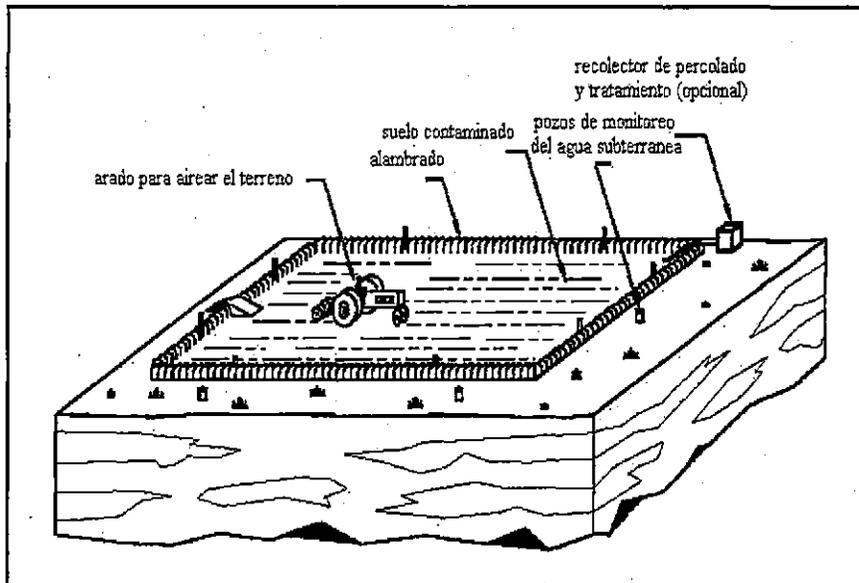


Figura 9: Esquema de un landfarming

Los factores a considerar en la biorremediación *in situ* y landfarming:

- Temperatura: biodegradación decae con la temperatura (a más temperatura, más biodegradación).
 - Humedad: ideal, 18%.
 - Nutrientes: especialmente nitrógeno y fósforo.
- pH: 6,5 (lo que impide la migración de metales y brinda óptima biodegradación).
- Oxígeno.

▪ Biopilas

También conocidos como bioceldas, estas son usadas para reducir las concentraciones de los constituyentes del petróleo en suelos excavados mediante la biodegradación.

Esta tecnología involucra el apilamiento del suelo en celdas y la estimulación de la actividad aeróbica de los microorganismos dentro del suelo a través de la aireación y o adición de minerales, nutrientes y humedad. Ver Figura 10.

El incremento de la actividad microbiana lleva a una degradación y adsorción de los constituyentes del petróleo a través de la respiración.

Las biopilas son similares al landfarming, los dos métodos son en la superficie del terreno, pero en las biopilas se utilizan sistemas de ingeniería que usan oxígeno, generalmente aire, para estimular el crecimiento y reproducción de las bacterias aeróbicas, las cuales degradan los constituyentes del petróleo absorbidos en el suelo. Mientras que los landfarmig son aireados por labrado o arado.

Las biopilas son aireadas más a menudo forzando aire a moverse por inyección o extracción a través de ranuras o tuberías perforadas en toda la pila.

La volatilidad de los contaminantes dispuestos a tratar en la biopilas, son importantes porque los constituyentes volátiles tienden a evaporarse desde la biopila durante la extracción o inyección y rara vez son biodegradados por las bacterias. Constituyendo vapores en aire que serán inyectados dentro de la biopila disipándose dentro de la atmósfera, a menos que la misma sea cubierta y que los vapores sean colectados por unas tuberías instaladas debajo de la cobertura.

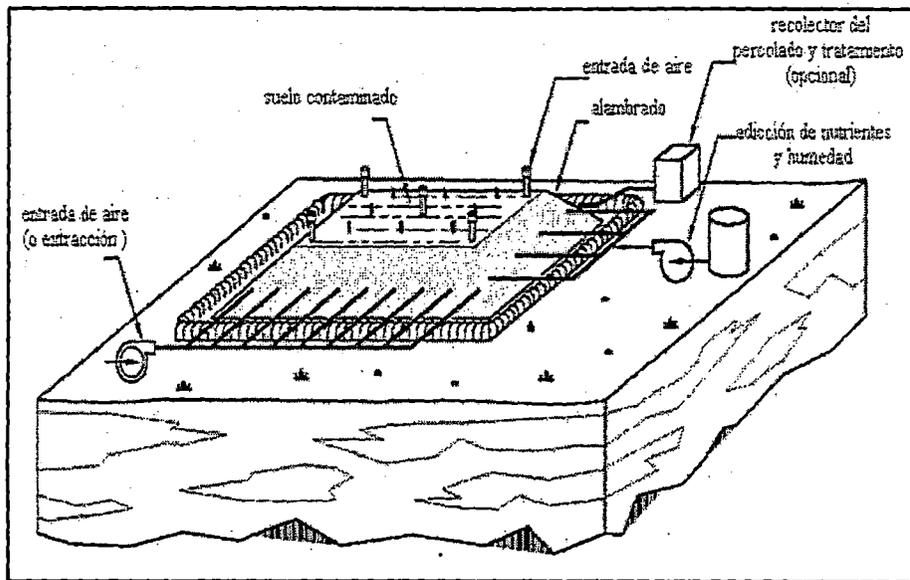


Figura 10: Esquema de remediación con biopilas

▪ Bioreactores

Otra metodología de biorremediación *ex situ* es el uso de bioreactores que pueden definirse como un depósito en el que se producen una serie de reacciones biológicas llevadas a cabo por los microorganismos o enzimas que se encuentran dentro del mismo.

Consiste en extraer el suelo contaminado y se lo somete a tratamientos que pueden ser en fase semisólida o en fase sólida. En el primer caso se prepara un lodo fluido agregando agua, nutrientes y cultivos densos de microorganismos. Este método tiene como ventaja las posibilidades de controlar los parámetros operacionales, ya que la eficacia de estos métodos depende en gran medida de las labores de manejo, tales como control de la humedad del material en proceso de remediación, temperatura, oxigenación y por lo tanto reduce significativamente el tiempo de tratamiento.

La alternativa de usar reactores biológicos para realizar un tratamiento intensivo se encuentra seriamente limitada por los costos que implica grandes volúmenes de suelo.

- **La bioventilación**

Es un término usado para la biodegradación aeróbica estimulada por oxígeno introducido a través de la ventilación del suelo.

Generalmente es una tecnología de remediación in-situ que utiliza microorganismos nativos para biodegradar los constituyentes orgánicos absorbidos por suelos en la zona no saturada, es más usada con productos de peso medio como el diesel y los combustibles de inyección.

- **Desorción térmica**

Es una tecnología no incinerativa, se puede aplicar *in situ* o *ex situ*. El suelo contaminado es colocado en una atmósfera inerte para incrementar la presión de vapor de los contaminantes orgánicos con bajo punto de ebullición, pasándolos de la fase sólida a la gaseosa y recolectarlos en circuitos cerrados., lo que permite separar los compuestos orgánicos de la matriz suelo. Ver Figura 11.

La desorción se ve afectada principalmente por la temperatura y el tiempo de residencia. A mayor temperatura y tiempo de residencia, mayor es la eficiencia de remoción.

Existen también métodos que aplican temperaturas suficientemente altas para oxidar los contaminantes orgánicos por completo. El control y el monitoreo de emisiones gaseosas es crítico en estas técnicas de remediación, a fin de evitar que se produzca contaminación atmosférica al tratar y remediar la contaminación del suelo.

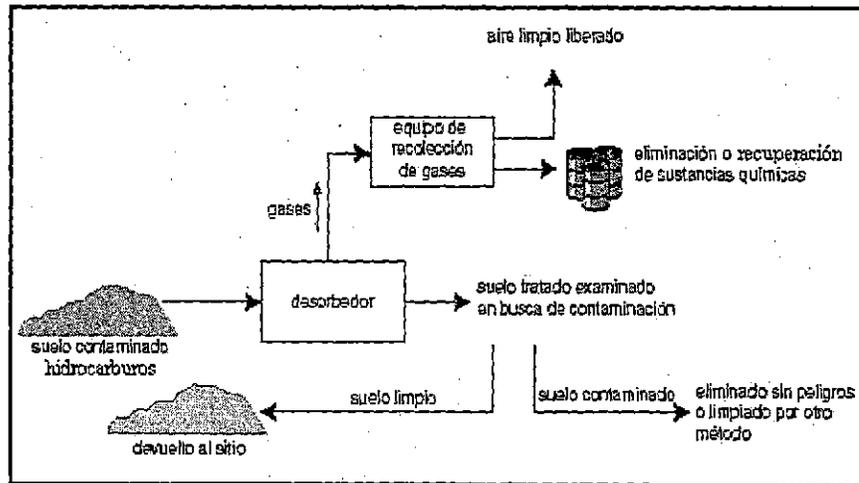


Figura 11: Esquema general de la desorción térmica

Tratamientos *in situ* más comunes de desorción térmica

- **Inyección de vapor:** se fuerza o inyecta a entrar vapor al subsuelo a través de pozos perforados en la zona contaminada. El vapor calienta el área, moviliza y evapora las sustancias. Ver Figura 12.
- **Inyección de aire caliente:** similar a la inyección de vapor, salvo que en lugar de vapor se inyecta aire caliente. Ver Figura 13.
- **Inyección de agua caliente:** similar a la inyección de vapor, salvo que en este caso se reemplaza el vapor por agua caliente.
- **Calentamiento con resistencia eléctrica:** hace pasar una corriente eléctrica por debajo de la superficie a través de pozos hechos de acero. El calor de la corriente convierte en vapor el agua del suelo evaporando las sustancias presentes.

- **Calentamiento por radio frecuencia:** consiste típicamente en colocar una antena que emite ondas de radio en un pozo. Las ondas de radio calientan el suelo y ello hace que los químicos se evaporen.
- **Conducción térmica:** se aplica calor a través de pozos de acero o mediante una manta que cubre la superficie del suelo. Al calentarse la zona contaminada, los elementos nocivos se destruyen o evaporan. La manta se utiliza en los sitios donde la contaminación es poco profunda. De lo contrario, se utilizan los pozos de acero.

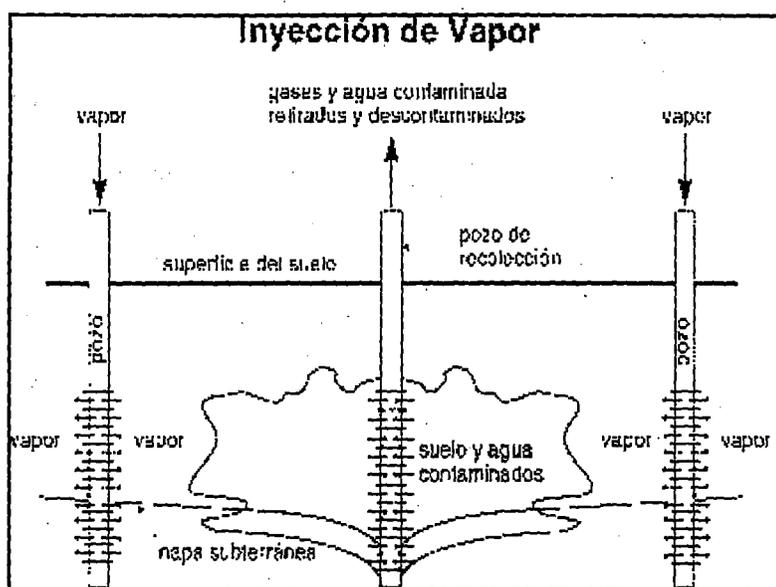


Figura 12: Esquema de inyección de vapor

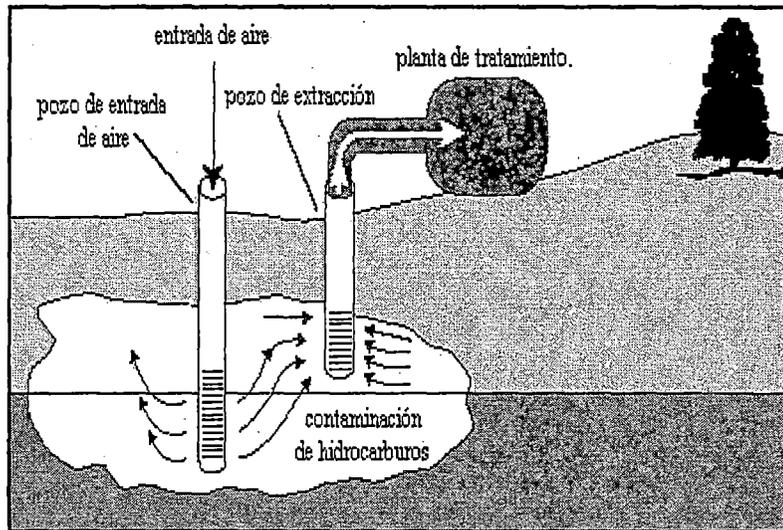


Figura 13: Esquema de inyección a aire caliente

- **Fitorremediación**

Las técnicas de fitorremediación aprovechan la capacidad de ciertas especies vegetales de extraer del suelo, a través de sus raíces, contaminantes inorgánicos, orgánicos y acumularlos en su tejido vegetal. En la aplicación de estas técnicas se debe prever el tratamiento y disposición final del material vegetal.

- **Lavado de suelos**

En este tipo de tratamiento se aplican productos químicos tales como surfactantes que cambian las propiedades físicas de los hidrocarburos a fin de que estos se puedan remover mecánicamente, por ejemplo con un skimmer. Una adición de <1 % de Surfactantes es de uso muy común, mientras que concentraciones >2 % podrían afectar la conductividad hidráulica. De acuerdo al tipo y/o combinación de contaminantes se deben seleccionar los productos idóneos a ser aplicados en el tratamiento. Ver Figura 14.

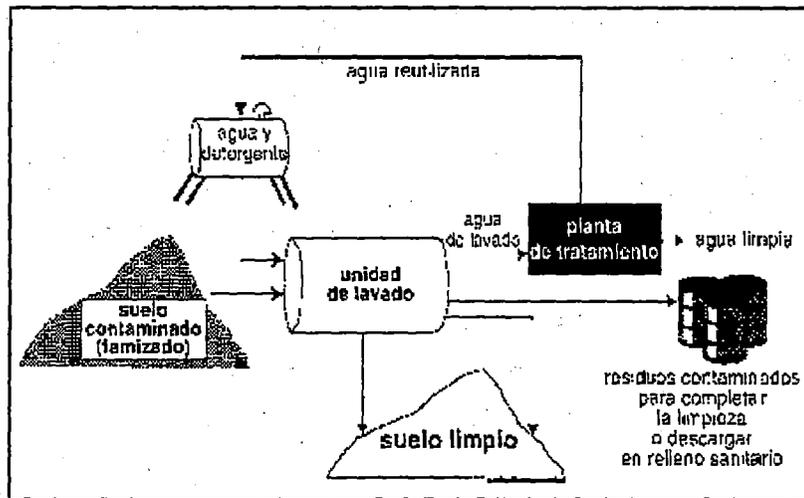


Figura 14: Esquema de lavado de suelos

- **Vitrificación**

Una corriente eléctrica pasa entre electrodos situados colocados verticalmente en el suelo, con un potencial de 12 kV donde esto genera un alta temperatura (1500 - 2000 °C) que causa la formación de vidrio (como silicatos) que incorporan los desechos.

Los contaminantes son encapsulados e inmovilizados calentando el suelo a altas temperaturas El suelo y los materiales contenidos se convierten en vidrio estable. Ver Figura 15.

Este proceso los destruye por pirolisis u oxidación, descomposición térmica de algunos contaminantes inorgánicos e inmovilización térmica estable de compuestos en materiales vitrificados cristalinos.

Se aplica a suelos hasta 15 metros de profundidad.

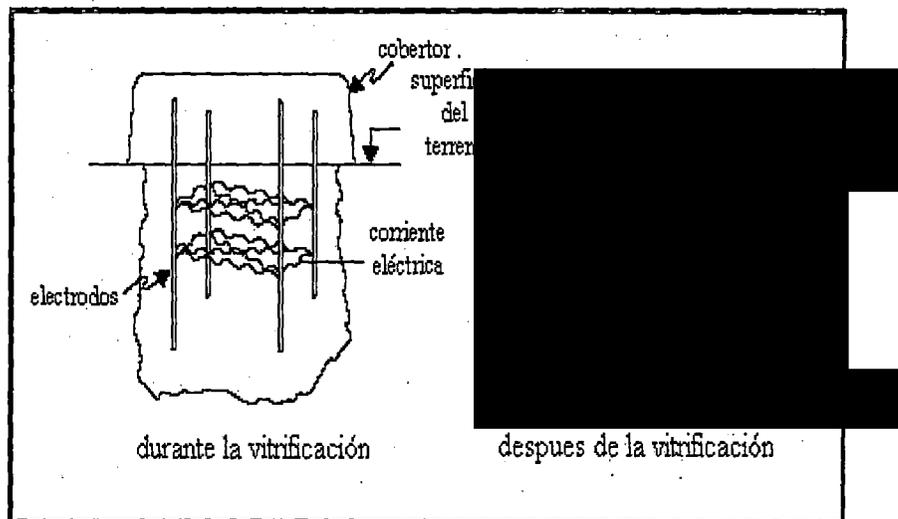


Figura 15: Esquema de vitrificación del suelo

2.6 COMPOST EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBURO

El compostaje es el proceso biológico aeróbico, mediante el cual los microorganismos actúan sobre la materia rápidamente biodegradable, permitiendo obtener compost, abono. Es un método aplicado a residuos sólidos donde el componente orgánico de residuo sólido es descompuesto biológicamente bajo condiciones controladas a un estado en el cual puede ser manejado, almacenado y/o dispuesto en el suelo sin afectar de manera el ambiente (Golueke, 1977).

La tecnología de biorremediación con compostaje se fundamenta en la estimulación de la actividad biodegradadora de las poblaciones microbianas presentes en un suelo contaminado, mediante la adición de un compost, diseñado -a medida- según las características y requerimientos de cada suelo contaminado a tratar y enriquecido en poblaciones microbianas degradadoras de los contaminantes presentes en dicho suelo.

Los microorganismos degradadores presentes en suelos altamente contaminados suelen desarrollar mecanismos reguladores genéticos que responden a la presencia o ausencia de determinados compuestos contaminantes, teniendo muchos de ellos la capacidad de utilizar los propios contaminantes como fuente de carbono. Sin embargo, los suelos contaminados suelen tener una actividad microbiana baja, básicamente debido a la falta de condiciones ambientales favorables, como la baja concentración de materia orgánica, oxígeno, nitrógeno y/o fósforo, etc. Así, la adición, durante el proceso de tratamiento *in situ* de los suelos contaminados, de compost diseñados a medida, enriquecidos en poblaciones microbianas biodegradadoras y con un alto porcentaje de materia orgánica biodegradable, provocará un aumento de la capacidad biorremediadora intrínseca de cada suelo contaminado, acelerando así el proceso su recuperación.

2.6.1 FACTORES QUE CONDICIONAN EL PROCESO DE COMPOSTAJE

Como se ha comentado, el proceso de compostaje se basa en la actividad de microorganismos que viven en el entorno, ya que son los responsables de la descomposición de la materia orgánica. Para que estos microorganismos puedan vivir y desarrollar la actividad descomponedora se necesitan unas condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxigenación.

Son muchos y muy complejos los factores que intervienen en el proceso biológico del compostaje, estando a su vez influenciados por las condiciones ambientales, tipo de residuo a tratar y el tipo de técnica de compostaje empleada. Los factores más importantes son:

- **Temperatura**

Esta tiene efecto en el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos. Es un parámetro útil para medir el proceso de descomposición ya que en la medida que se desarrolla el metabolismo de las bacterias se genera calor por lo tanto el incremento de temperatura es un buen indicador de cómo está funcionando el proceso.

Se consideran óptimas las temperaturas del intervalo 35 - 55 °C para conseguir la eliminación de patógenos, parásitos y semillas de malas hierbas. A temperaturas muy altas, muchos microorganismos interesantes para el proceso mueren y otros no actúan al estar esporados. Se realiza la evaluación de la temperatura, básicamente el seguimiento del rango termófilo (mayor de 50 °C) para asegurar la higienización del material.

Los microorganismos más eficientes en la compostación son los microorganismos mesófilos cuya temperatura óptima corresponde a los 35 - 40 °C y los termófilos quienes requieren de 55 °C o un poco más.

Estas temperaturas mantenidas en el tiempo permiten ejercer naturalmente un tratamiento de sanitización especialmente con respecto a microorganismos patógenos, así como también logran destruir semillas de malezas, esporas de hongos y algunas fitotoxinas que posteriormente significarían un problema al adicionar el compost sobre cultivos agrícolas.

El manejo de la temperatura requiere cuidado y control ya que así como la alta temperatura es capaz de sanitizar de patógenos también puede terminar con la flora benéfica antes que el proceso lo haga naturalmente en el momento justo.

Las lecturas periódicas mediante el uso del termómetro ayudan a determinar el momento en que la pila debe ser volteada, si ésta alcanza sobre los 70 °C.

Si una pila de compostaje no logra subir su temperatura por sobre los 48 °C pasados algunos días, está indicando que probablemente no hay suficiente nitrógeno en la pila para activar o gatillar el proceso.

En el Figura 16 se observa la variación de temperatura y pH en una pila de compostaje.

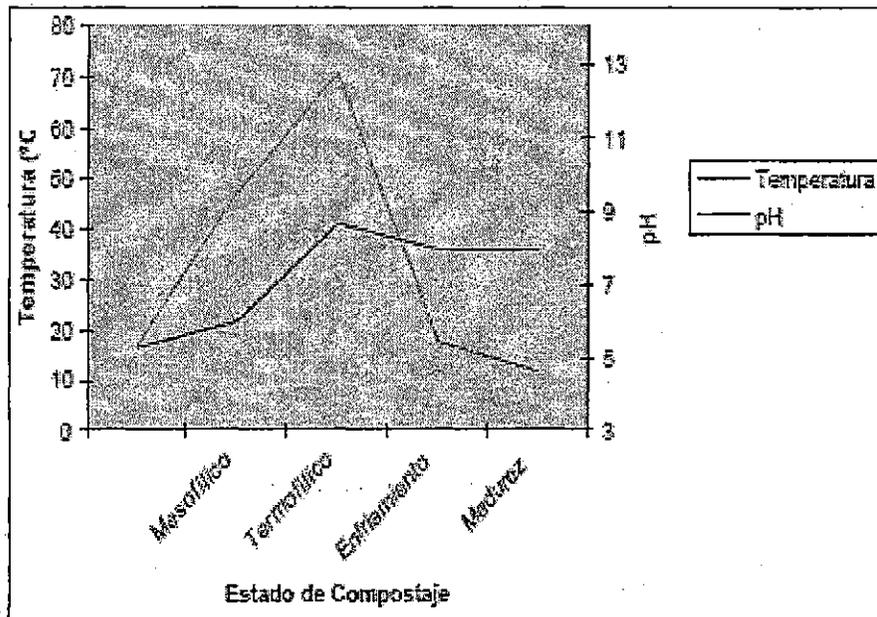


Figura 16: Variación de temperatura y pH en una pila de compostaje

Fuente: Gray & Biddlestone (1981)

Humedad

En el proceso de compostaje es importante que la humedad alcance unos niveles óptimos del 40 - 60 %. Si el contenido en humedad es mayor, el agua ocupará todos los poros y por lo tanto el proceso se volvería anaeróbico, es decir se produciría una putrefacción de la materia orgánica. Si la humedad es excesivamente baja se disminuye la actividad de los microorganismos y el proceso es más lento. El contenido de humedad dependerá de las materias primas empleadas.

Para materiales fibrosos o residuos forestales gruesos la humedad máxima permisible es del 75 - 85 % mientras que para material vegetal fresco, ésta oscila entre 50-60%. Por tanto se aseguran los valores óptimos de entre el 40 - 60 % y determinar si el riego es necesario.

- pH

Este es un parámetro importante para evaluar el ambiente microbiano y la estabilización de los residuos. El valor del pH, al igual que la temperatura varía con el tiempo y el proceso de compostaje. El pH inicial está normalmente entre 5 y 7.

Influye en el proceso debido a su acción sobre microorganismos. En general los hongos toleran un margen de pH entre 5-8, mientras que las bacterias tienen menor capacidad de tolerancia (pH= 6 - 7,5). Se sigue la evolución de pH iniciales bajos hasta el pH clásico del compost que es ligeramente básico (pH aproximado entre 7 y 8).

En los primeros días de compostaje, el pH cae a 5 o menos, debido a la presencia de ácidos orgánicos simples, y la temperatura sube debido a la producción de organismos mesófilos. Después de aproximadamente 3 días, la temperatura llega a la etapa termófila y el pH comienza a subir hasta aproximadamente 8 a 8,5 para el resto del proceso aeróbico. El valor del pH llega a un valor de 7 a 8 en el compost maduro.

- Oxígeno

Este factor es el cuarto más importante, ya que si la pila o cúmulo en donde se encuentran las materias primas del compost deja de tener aireación el proceso de fermentación cambia de aeróbico a anaeróbico generándose productos distintos y con manejo diferente y graves problemas de olor.

La mayoría de los problemas de olores en los procesos de compostaje aeróbico se deben fundamentalmente, a problemas de deficiencia en el volteo donde se pueden desarrollar condiciones anaeróbicas, bajo estas condiciones se pueden generar ácidos orgánicos, muchos de los cuales presentan olores desagradables.

También se producen malos olores, al agregar materiales cuya descomposición ocurre en un tiempo relativamente largo. Para evitar y minimizar los problemas potenciales de olores, es importante reducir el tamaño de las partículas, separa plásticos y otros materiales no elementos en el origen.

El oxígeno se mueve dentro de la pila principalmente por difusión, así si la pila es muy grande se dificulta el paso de oxígeno al centro de la misma, es por eso que en grandes instalaciones o en pilas muy grandes se recomienda hacer aireación forzada.

- **Población microbiana**

El compostaje es un proceso aeróbico de descomposición de la materia orgánica, llevado a cabo por una amplia gama de poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos. Los hongos, junto con las bacterias heterótrofas y un reducido grupo de otros organismos constituyen los descomponedores de la biosfera. Su actividad es esencial para el continuo funcionamiento de la naturaleza. La descomposición libera dióxido de carbono y aporta compuestos nitrogenados y otros minerales al suelo.

- **Relación C/N equilibrada**

Este es otro parámetro de producción muy importante a la hora de dar las condiciones perfectas para que se inicie el desarrollo de los microorganismos, esta relación puede variar entre un substrato y otro.

Los materiales orgánicos ricos en carbono y pobres en nitrógeno son la paja, el heno seco, las hojas, las ramas, la turba y el serrín. Los pobres en carbono y ricos en nitrógeno son los vegetales jóvenes, las deyecciones animales y los residuos de matadero.

La fuente de energía para bacterias y hongos es el carbono presente en los carbohidratos provenientes de maderas, material celulósico y hojas. El nitrógeno, un

componente de las proteínas, es necesario para soportar el desarrollo de los microorganismos beneficiosos.

Mezclando diferentes materiales es posible realizar un buen balance para esta relación. Ver Figura 17.

Fuentes de CARBONO	Fuentes de NITROGENO
Cajas de cartón	Filtros de café
Tallos de maíz	Phumaz
Hojas perennes	Flores
Granos, Desechos y vainas	Uvas
Hojas de Laurel	Guano de murciélago
Hojas	Cerveza
Cáscara de nueces	Heno de Alfalfa
Paja de avena	Manzanas
Papel	Pelo
Acículas de pino	Plantas de interior
Hojas de Rododendro	Vainas de leguminosas
Aserrín	Lechuga
Paja	Estiércol
Residuos de la caña de azúcar	Hojas de roble
Remas anuales	Piel de cebolla
Chips de madera	Piel de Naranja
Cartón	Restos de podas
	Rosas
	Algas marinas
	Hojas de Té (Con bolsitas)
	Hojas de Nabo
	Piel de manzana
	Piel de Banana
	Residuos de cerveceria
	Harina de Sangre
	Repollo
	Zanahorias
	Apio
	Trébol
	Molienda de café

Figura 17: Fuentes de carbono y nitrógeno

Tiempo

Mientras mayor es el tiempo de permanencia de los materiales a compostar dentro de la pila más seguridad se tendrá de la completa degradación y madurez del compost.

Respecto a la curva de compostaje existen diversas interpretaciones de cuando, o a qué temperatura en relación con el tiempo se produce el peak (pico) y cuando inicia su descenso. Algunos trabajos hablan que el máximo se alcanza en pocos días cuatro a siete, sin embargo en otros trabajos y experiencias este punto ocurre al día siguiente que se inicia la pila de compostación.

El compost debe pasar por todas sus fases para estar maduro fase I, fase II y fase III, como se puede observar en la Figura 18.

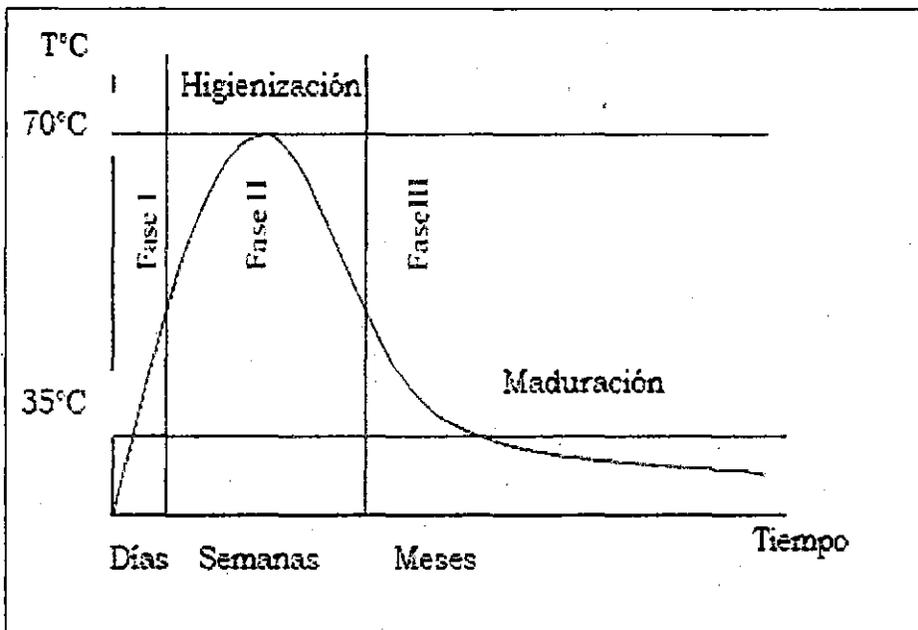


Figura 18: Fases del compostaje

Fase I las bacterias mesófilas, sobre materia orgánica fácilmente degradable tal como azúcares, almidón y proteínas luego sobreviene la fase II o fase termofílica en la que ocurre la digestión de la celulosa y hemicelulosa y por último viene la fase III de estabilización en la que disminuye la temperatura conjuntamente con la tasa de descomposición microbiana.

La destrucción de organismos patógenos es un elemento importante de diseño en el proceso de compostaje, porque afectará el perfil de temperatura y al proceso de aireación. La tasa de mortalidad de los patógenos está en función del tiempo y de la temperatura, la mayoría de los patógenos serán destruidos rápidamente cuando todas las partes de la pila estén sometidas a una temperatura de aproximadamente 55 °C.

Solamente unos pocos pueden sobrevivir a temperaturas de hasta 67 °C durante un corto período de tiempo. Se pueden eliminar todos los patógenos existentes dejando el material que esta fermentándose a una temperatura de 70 °C durante 2 horas.

- **Período de estabilización del material**

El proceso de compostación es variable y depende del material a utilizar, se puede reconocer al producto terminado cuando la temperatura del material baja a aproximadamente 25 °C y se mantiene sin subir por lo menos una semana.

Un criterio simple para saber si el producto se encuentra estabilizado es colocar un poco del material dentro de una bolsa plástica cerrada, y esperar 24 h, esperando no encontrar emanación de malos olores, humedad ni aumento de temperatura. Otra manera, consiste en hacer germinar semillas, las cuales efectivamente brotarían pero no serían viables a corto plazo.

Una vez que se considera estabilizado el material, se debe dejar reposar o madurar, entre 15 a 45 días, para posibilitar la higienización del compost, al terminar de degradarse todos los restos de material orgánico.

2.6.2 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DETERMINANTES EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL TPH POR EL COMPOST

a. Contenido de humedad

La medición de este parámetro se debe realizar al iniciar el proceso efectuándolo con una periodicidad de una a dos semanas, o cada vez que se realice el volteo de la pila. El nivel de humedad de las pilas debe oscilar entre 40 a 60 % y se puede controlar fácilmente apretando una muestra de compost en las manos y estrujarlo; no debe caer agua a lo más una o dos gotas.

b. pH

Debe ser medido con pHmetro, y los valores normales al final del proceso deben fluctuar entre 7 a 8.

c. Contenido de metales pesados

Debe realizarse al iniciar el proceso y al producto final sólo si existen dudas de la procedencia de la materia prima, ya sea que provenga de lodos de plantas de tratamiento, desechos orgánicos de procesos químicos, etc. El análisis debe hacerse en laboratorio especializado para los siguientes elementos: níquel, zinc, plomo, cadmio, cobre, arsénico, cianuro, cromo, selenio, mercurio

La Organización Mundial de la Salud ha establecido los rangos tolerables de metales pesados que puede contener el compost maduro o final. Estos rangos son expuestos en el Cuadro 5.

**Cuadro 5: Límites de concentración de metales pesados en el
compost final**

Metales Pesados (en mg/kg de materia seca)	Rangos Normales
Boro	60 - 360
Cadmio	15 - 40
Cobre	90 - 260
Hierro	8.000 - 15.000
Mercurio	1 - 5
Manganeso	300 - 1.300
Molibdeno	10
Plomo	200 - 400
Zinc	800 - 1.200

d. Temperatura en el proceso

Deben efectuarse mediciones desde el inicio y con cierta periodicidad durante el tiempo de compostación especialmente al momento de los volteos o, por lo menos una vez por semana con termómetro de varilla; si el proceso se realiza en pilas de gran longitud, la temperatura debe medirse cada 15 a 20 metros, estableciendo un control gráfico como se ejemplifica a continuación:

La temperatura durante el proceso debería fluctuar entre 55 °C a 70 °C durante el proceso.

e. Contenido de oxígeno

Es necesaria la presencia de oxígeno para que las bacterias lleven a cabo el proceso de mineralización. El nivel óptimo de oxígeno existente en una muestra debe ser aproximadamente de un 5 %.

2.6.3 TÉCNICAS DE COMPOSTAJE

Como el rendimiento de producto es básicamente el mismo en las distintas técnicas de compostaje (en hileras con volteo, pila estática aireada o en biorreactor), los criterios de selección se basan en la inversión, funcionamiento, disponibilidad de terreno, complejidad operacional y el potencial para generar problemas ambientales.

Las técnicas de compostaje varían de acuerdo a las condiciones de aireación, período de volteo y la calidad requerida en el producto final. Todo sistema de compostaje necesita una serie de medidas de monitoreo para verificar constantemente las condiciones de temperatura y humedad.

Las técnicas principales corresponden a las que a continuación se describen, la elección de cualquiera de ellas va a depender de los objetivos planteados por el productor, el producto que desea elaborar, de las necesidades del mercado, de la cantidad de material a procesar y del tipo de substrato con el que se pretende trabajar, entre otros.

En la práctica y en general una de las tecnologías de composteo más utilizada para el tratamiento de extensas áreas de suelos contaminados, principalmente por hidrocarburos totales de petróleo, se lleva a cabo en condiciones aerobias y se conoce como biopilas, bioceldas o pilas de composteo (Iturbe-Argüelles *et al.*, 2002).

Las biopilas, son una forma de composteo en el cual se forman pilas con el suelo contaminado y agentes de volumen. El sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento, que incluyen sistemas para coleccionar lixiviados y alguna forma de aireación (Eweis *et al.*, 1998).

A continuación se mencionan las técnicas de compostaje:

a. Biopilas alargadas

El sistema de biopilas alargadas es el proceso de composteo más económico y sencillo. En éstas, el material a compostear se apila sobre una plataforma en montones a lo largo. Ver Figura 19.

En este tipo de biopila, la aireación se realiza mediante el mezclado manual o mecánico de la composta, proceso que a su vez permite homogeneizar la temperatura.

El mezclado de la composta proporciona una mayor distribución y facilita la biodegradación de los contaminantes, ya que permite la homogeneización de los nutrientes, agua, aire, contaminantes y microorganismos.

La frecuencia del mezclado de la pila depende de la actividad microbiana, que generalmente puede determinarse por el perfil de la temperatura en la composta, que puede realizarse una vez al día (EPA, 1995) o bien una vez al mes (Sellers *et al.*, 1993).

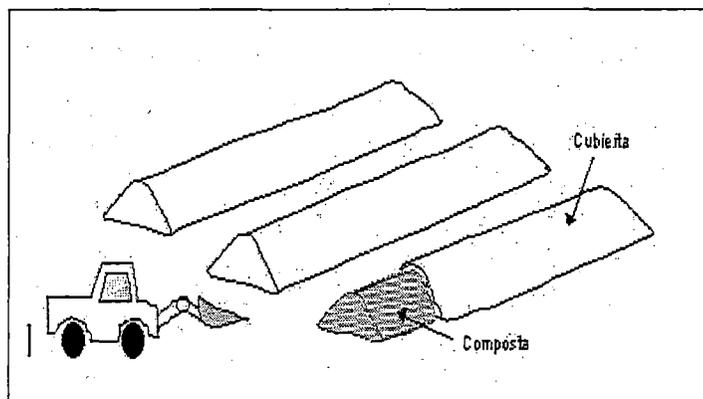


Figura 19: Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas

b. Biopilas estáticas

A diferencia de las anteriores, las biopilas estáticas no necesitan mezclarse mecánicamente, ya que la aireación y homogeneización del calor en la composta se lleva a cabo por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire, mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila. Ver Figura 20.

En las biopilas estáticas, normalmente se emplea un sistema de extracción de aire, ya que ello permite la captura de los vapores de cierta fracción de compuestos orgánicos volátiles que llegan a ser removidos del suelo contaminado durante el proceso de aireación. Estos vapores son enviados a un sistema de biofiltración u oxidación catalítica para su tratamiento (Eweis *et al.*, 1998).

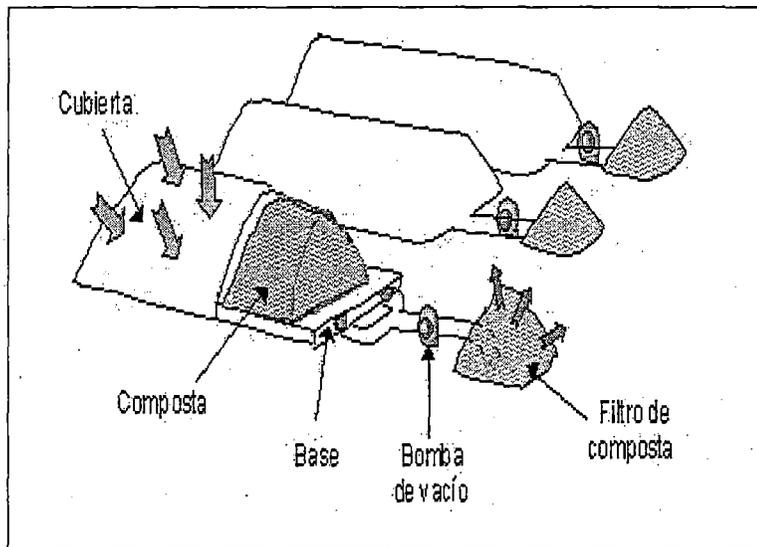


Figura 20: Representación esquemática de un sistema de biopilas estáticas.

El uso de un sistema de inyección o extracción de aire en este tipo de biopila, permite el control manual o automático de la velocidad del flujo de aire que provee de

oxígeno al proceso de composteo, permitiendo así establecer una relación entre el flujo de aire y la actividad microbiana a través del tiempo (Eweis *et al.*, 1998).

c. Compostaje en pilas estáticas no aireadas

Es el sistema más antiguo de compostaje, en el que se forman pilas de reducida altura, que se dejan sin movimiento, ventilándose naturalmente, por lo tanto, ocurren procesos de anaerobiosis zonales, con generación de malos olores, gases y líquidos. Lo anterior, genera una fermentación deficiente e irregular, no obteniendo un producto de alta calidad.

El tiempo de estabilización de la pila está entre cuatro y seis meses. En regiones con mucha pluviometría o alta humedad ambiental, se recomienda colocar el material bajo techo o galpones.

d. Compostaje en reactor

Este proceso se lleva a cabo en un contenedor cerrado, donde se establece un proceso aerobio acelerado para generar compost (alrededor de un mes).

Los distintos tipos de residuos se alimentan a la máquina, y luego se dosifica una cantidad programada de material rico en carbono (aserrín, paja) para asegurar el proceso de descomposición.

Luego, la mezcla es desmenuzada dentro de la máquina para asegurar un tamaño de partícula adecuado. Una vez realizado el proceso de trituración y mezcla, el material pasa a un contenedor de compostaje provisto de una bomba para inyectar aire a la mezcla, lo que facilita el trabajo de los microorganismos que convierten los desechos en compost.

e. Compostaje en pilas de volteo o en hileras:

Este sistema considera el volteo del producto ya sea manual o mecánicamente, en este sistema de compostaje en pilas se amontona el material al aire libre o en galpones, con un cargador frontal. Si esta termina en su parte superior en punta se habla de una pila triangular; si su superficie superior es plana se habla de una pila trapezoidal.

Las pilas deben ser volteadas en forma regular, ya sea con máquinas especialmente destinadas a éste fin (volteadoras) o también se pueden usar cargadores frontales pero conlleva el riesgo de no lograr un mezclado apropiado del material en proceso, también se pueden voltear en forma manual.

El volteo debe ir disminuyendo a medida que pasa el tiempo, se recomienda, por ejemplo, que durante el primer mes se realice dos veces a la semana; en el segundo mes, una vez a la semana; el tercer mes, cada 15 días y los meses restantes, una vez al mes, dependiendo de la mezcla utilizada.

Con el volteo de las pilas se persigue obtener los siguientes efectos:

- Mezclado
- Evitar compactación
- Intercambio gaseoso
- Creación de nuevas superficies de ataque para los microorganismos
- Control de la temperatura, pH y humedad

Para proteger las pilas del exceso de humedad o de un secado extremo, se pueden proteger con telas especiales de material poroso al aire.

Debido al costo y trabajo adicional que esto significa, se evita muchas veces usarlas. Desde el punto de vista de requerimientos de mano de obra, es conveniente reemplazar el uso de tela por techumbre, especialmente en zonas con alta pluviometría.

Las pilas trapezoidales aprovechan muy bien el espacio disponible, por lo que son especialmente recomendables para instalaciones en recintos cerrados. Existe sin embargo el peligro de que las pilas se construyan demasiadas altas (superiores a 2 m de altura) y si a esto se agrega intervalos demasiados largos entre volteos y técnicas de volteo deficientes, no es posible garantizar el intercambio de aire entre el interior de la pila y el medio, no asegurando el que es necesario para mantener las condiciones aeróbicas del medio, produciendo así condiciones anaeróbicas donde se pueden formar gases mal olientes y otros que son relevantes para los aspectos climáticos (por ej. CH₄) y ambientales en general.

Estos gases también se pueden formar por anaerobiosis zonales y transitorias, pero en cantidades mucho más pequeñas. Otro proceso de apilación consiste en una serie de capas intercaladas de material a compostar y tierra usada como material absorbente. Por ejemplo: una primera capa inferior de 10 cm de tierra con aserrín, una capa con residuos a compostar de 5 cm, una capa de tierra de 5 cm, una capa de residuos de 10 a 15 cm, una capa de tierra de 2 cm, hasta alcanzar la altura de 1 m. Esta mezcla se estabiliza a los cuatro a cinco meses, con un volteo semanal.

Es recomendable para volúmenes pequeños, por ejemplo el procesado de restos de una vivienda o parcela (compostaje doméstico).

La técnica de pila de volteo, es relativamente fácil de aplicar, dependiendo del volumen a tratar: Un ejemplo de dimensionamiento y tratamiento de pila de volteo en hilera, puede ser:

- Altura: entre 1.5 y 1.8 m
- Base: entre 2.4 a 3.6 m

- Largo: variable
- Paredes verticales con una inclinación cercana a los 30
- Humedecimiento: con riego por aspersión o manguera
- Rango de humedad óptimo: 40 a 60 %
- Periodicidad de volteo: variable, de muy frecuente, dos veces a la semana en el primer mes a una vez al mes en el último período. Dependiendo del lugar geográfico donde se emplace y tipo de sustrato a trabajar (% de humedad, T°).
- Volteo: puede ser manual, con cargador frontal, o con volteadoras diseñadas para este fin.

2.6.4 ETAPAS DEL PROCESO DEL COMPOSTAJE

De acuerdo con las características del proceso de composteo, en la etapa inicial es necesaria una aireación eficiente (alto flujo de aire), debido a que en esta etapa existe una acelerada actividad microbiana. Este aumento en la actividad microbiana provoca un aumento en la demanda de oxígeno y un rápido aumento en la generación de calor metabólico, produciéndose temperaturas que se elevan hasta un rango termofílico (50 a 60 °C) (EPA, 1998). Sin embargo, generalmente durante el composteo de suelos contaminados adicionados con agentes de volumen, el estado termofílico usualmente no se logra, por lo tanto, la temperatura no excede a los 45 °C (Semple *et al.*, 2001).

Después de un cierto tiempo la actividad microbiana disminuye, debido a que los componentes fácilmente biodegradables son consumidos. En esta etapa el requerimiento de oxígeno y la temperatura disminuyen gradualmente, por lo que la composta requiere una menor aireación (menor flujo de aire).

En la Figura 21 se muestra la relación entre la degradación de compuestos orgánicos (función de la actividad microbiana) y los perfiles de temperatura dentro de la composta a través del tiempo. De acuerdo con esta relación se puede emplear un programa

analógico que regule automáticamente la velocidad de flujo del aire en función de la temperatura que se registra en la composta (EPA, 1998).

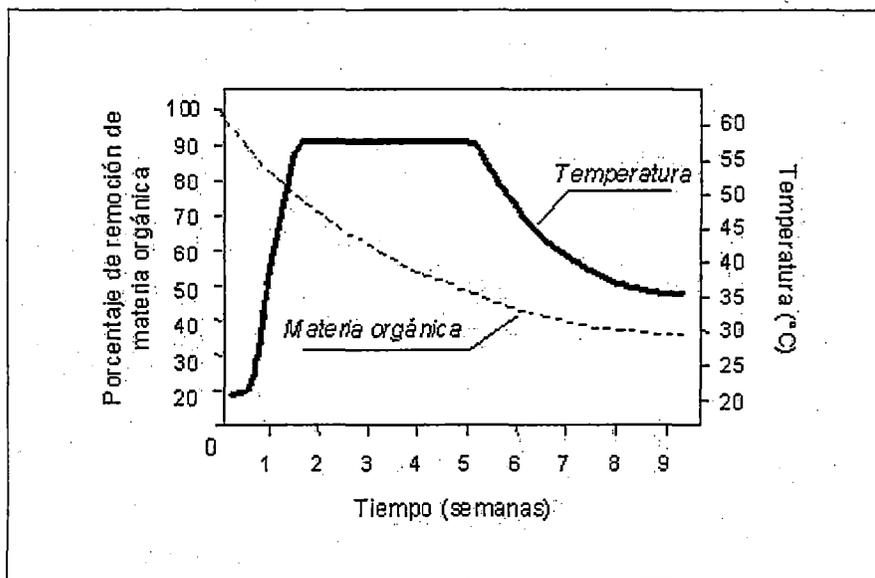


Figura 21: Remoción de materia orgánica y perfiles de temperatura durante el proceso de composteo.

El aumento y la caída en el perfil de la temperatura, a menudo pueden usarse para monitorear el desempeño de una pila de composteo. Una vez que la pila se enfría y la temperatura dentro de ésta se aproxima a la temperatura ambiente, el periodo de composteo activo puede considerarse completo. Otras características que indican el éxito de un proceso de composteo, son el cambio en la textura y el olor de la pila en la etapa final. Al inicio del proceso se generan olores fuertes y desagradables, mientras que en la etapa final éstos desaparecen y el olor es parecido al de tierra de jardín. Por su parte, la textura de la mezcla es mucho más homogénea que al inicio.

Estos cambios en el olor y textura son el resultado de la biodegradación de la materia orgánica, que al pasar de forma sólida a gaseosa, da como resultado una reducción en el tamaño de la biopila. Dependiendo de la cantidad de material orgánico mezclado con el suelo, puede esperarse que la masa de la biopila se reduzca hasta en 40 % (Eweis *et al.* 1998).

2.6.5 PRINCIPIOS BÁSICOS DEL COMPOSTAJE

La construcción de una biopila de composteo (alargada o estática) consiste básicamente en realizar los siguientes pasos (Von Fahnestock *et al.*, 1998):

- a. Acondicionamiento de un área que sirva de base para la biopila, cuya dimensión dependerá de la cantidad de suelo a tratar. La base puede ser un suelo arcilloso compactado, concreto o polietileno de alta densidad. Se recomienda la instalación de un sistema de recolección de lixiviados mediante canales o tubos. Los lixiviados pueden ser almacenados en un tanque e incorporados a la biopila mediante un sistema de irrigación.
- b. Excavación del suelo contaminado. Se recomienda que antes de realizar esta actividad se lleve a cabo un estudio del sitio para conocer las características del suelo y del contaminante a tratar.
- c. Transportación del suelo al sitio de tratamiento. Es recomendable que éste se encuentre lo más cercano posible al sitio en donde se localiza el suelo contaminado.
- d. Acondicionamiento de la biopila. En esta fase, deben adicionarse los agentes de volumen, así como los nutrientes y agua necesarios. En algunos casos se recomienda la adición de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar al (los) contaminante(s). Para el caso de suelos intemperizados, se recomienda la adición de surfactantes para facilitar la desorción de los contaminantes.
- e. Mezclado del suelo y colocación del material sobre la base. No existe una medida idealmente establecida para el largo y ancho de las pilas, esto generalmente depende del volumen de suelo a tratar y del área disponible. En el caso de biopilas estáticas, se recomienda que no excedan los 2.5 m de altura, con el fin de evitar problemas de difusión del aire a través de la composta.
- f. Finalmente la biopila debe cubrirse con un material inerte (grava, aserrín, polietileno de baja densidad, entre otros). En el caso de las biopilas estáticas, se requiere de la instalación de tubos de respiración.

2.6.6 MÉTODOS DEL PROCESO DEL COMPOSTAJE

El proceso de compostaje puede ocurrir por dos métodos:

- **Método natural:** los residuos orgánicos se colocan en pilas de forma variada. La aireación necesaria para el desarrollo del proceso de descomposición biológica se obtiene volteándola periódicamente con la ayuda de un equipo apropiado. El tiempo para que el proceso concluya, varía de tres a cuatro meses.
- **Método acelerado:** la aireación se produce a través de tuberías perforadas, sobre las cuales se colocan las pilas de material orgánico, o en reactores rotatorios, dentro de los cuales se colocan los residuos, que avanzan en sentido contrario al de la corriente de aire. Posteriormente se apilan, como en el método natural. El tiempo de permanencia dentro del reactor es de unos cuatro días, y el tiempo total del compostaje acelerado es de dos a tres meses.

El grado de descomposición o degradación del material sometido al proceso de compostaje, es un indicador del estado de avance de la “maduración” del compost orgánico. El aspecto del material -color, olor y humedad- da ciertas indicaciones. Así, el color final es oscuro, el olor es similar a tierra mojada, y la humedad se reduce. Al comienzo del proceso de descomposición del material actúan los microorganismos que producen fermentación ácida, y el pH se vuelve más bajo, lo cual es favorable para la retención de amoníaco. Al final del proceso, la humedad del compost para uso agrícola o de jardinería no debe pasar del 40%. Ver Figura 22.

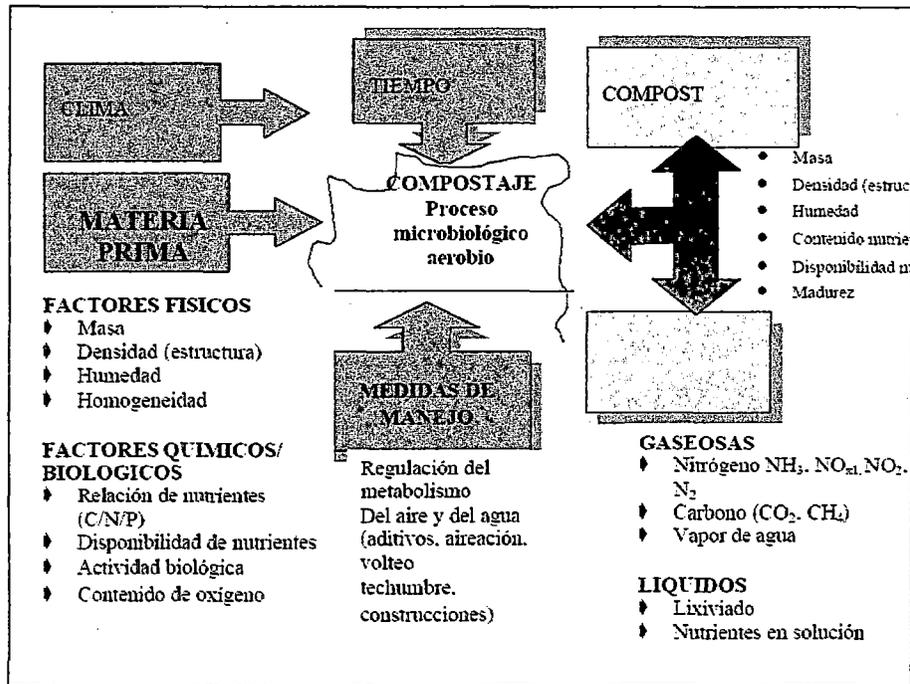


Figura 22: Proceso de compostación y factores físicos incidentes

El diagrama adjunto, da cuenta de los procesos de compostación y factores físicos incidentes. En primer lugar, es posible distinguir los factores físicos considerados, tal es el caso de: clima, tiempo, materia prima y medidas de manejo o también llamada ingeniería de proceso. En cuanto a las dos primeras es importante destacar que corresponden a variables externas, y por lo tanto, difíciles de manejar, pero controlables en base al diseño de las instalaciones (ej. producción de compost bajo techo).

En el caso de las materias primas y las medidas de manejo, estas incluyen todas las variables relacionadas con las proporciones óptimas de nutrientes, carbono, nitrógeno, contenido de oxígeno, aireación, cantidad de agua, entre otras.

En segundo lugar, se encuentran los factores resultantes del proceso mismo de compostación, tal es el caso del producto compost y de emisiones. En el caso del compost las variables a considerar tienen relación con las características mismas del producto como: estructura, humedad, contenido de nutrientes y grado de madurez.

En el caso de las emisiones (gaseosas), corresponden a todos los gases que resultan del proceso de compostación propiamente tal, es decir, cantidades y relaciones de carbono/nitrógeno, vapor de agua y otros. La situación de los líquidos tiene que ver con la cantidad de lixiviados generados y con los nutrientes que se pierden en estos líquidos.

2.6.7 ETAPAS DEL PROCESOS DE COMPOSTACIÓN

El patio de compostaje o área de la instalación donde se colocan los residuos para transformarse en compost debe estar pavimentado, o cubierto con arcilla compactada, dotado de un sistema de captación de lixiviados, aguas de lluvia, y disponer de un estanque de estabilización. En algunos casos esta área se ubica al aire libre y en otras bajo techo.

Una vez que el material a compostar tiene un tamaño pequeño (casi como aserrín) puede ser colocado en "pilas" o columnas trapezoidales o triangulares (esto de acuerdo al tipo de proceso realizado), y dejar en este estado para que se produzca la fermentación aeróbica en todas sus fases. Estas se voltean periódicamente, a fin de homogenizar y airear el material. Opcionalmente, el proceso acelerado se puede realizar en pequeñas instalaciones, insuflándoles aire, o facilitando el movimiento de aire por medio de compresores o aspiradores.

La operación de volteo del material permite dar la aireación necesaria a las pilas con lo que además se controla la temperatura del proceso. El volteo puede ser manual para pequeñas escalas de producción o bien puede ser realizado por equipos especializados.

Los tratamientos finales del compost maduro consisten en triturarlo y tamizarlo, para darle una menor granulometría y volverlo más manejable. Este tipo de manejo permite prensar y disponer en sacos, lo cual facilita su movilización y transporte. El almacenamiento de los productos finales debe hacerse en un galpón cubierto.

2.6.8 APLICACIONES. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL COMPOSTAJE

La técnica del compostaje puede aplicarse para tratar suelos y sedimentos contaminados por compuestos orgánicos biodegradables. Este tipo de sistemas se ha usado con éxito para la remediación de suelos contaminados por pentaclorofenol (PCP), gasolinas, TPH y PAH. Se ha demostrado también, que es posible reducir la concentración y toxicidad de algunos explosivos (TNT) hasta niveles aceptables (Van Deuren *et al.*, 1997; Semple *et al.*, 2001). En el Cuadro 6 se resumen algunos estudios de aplicaciones de sistemas de composteo para la remediación de suelos contaminados por TPH.

Cuadro 6: Resumen de los resultados de algunos estudios realizados a escala piloto

Tipo de biopila	Suelo (m ³)	Contaminante y concentración inicial	Tiempo (días)	Remoción (%)	Referencia
Alargada	100	TPH: 20,000 ppm	104	43	Abiola <i>et al.</i> (1997)
Estática				50	
Alargada	500	TPH: 40,000 ppm	450	70	Hiroyuki <i>et al.</i> (1999)
Estática	250	TPH: 20,000 ppm			
Alargada	0.4	Diesel: 50,000 ppm	45	94	Cunningham & Philip (2000)
Estática					
Estática	27	TPH: 30,000 ppm	154	80	Iturbe <i>et al.</i> (2002)

Como una de las principales ventajas que presentan los sistemas de composteo y en general las tecnologías de biorremediación, se resumen a continuación (Alexander 1981; Eweis *et al.*, 1998; Semple *et al.*, 2001; Iturbe - Argüelles *et al.*, 2002):

- son sistemas económicamente factibles, comparados con las tecnologías térmicas y fisicoquímicas tradicionales.

- son tecnologías relativamente simples, comparadas con la mayoría de las tecnologías tradicionales. El diseño y construcción de las biopilas son relativamente sencillos.
- pueden considerarse estrategias efectivas y ambientalmente “amigables”, ya que biotransforman parcial o totalmente los contaminantes en biomasa y productos estables e inocuos.
- el objetivo del composteo es la biodegradación (destrucción) y detoxificación de contaminantes, mientras que otras tecnologías, como la adsorción en carbón activado, el lavado, el confinamiento y solidificación/estabilización, únicamente transfieren los contaminantes de un medio a otro. Una consecuencia común de la actividad microbiana es la detoxificación de químicos tóxicos.
- el suelo biorremediado con el uso de sistemas de composteo, no necesita ser confinado posteriormente.

Asimismo:

- mejora la actividad degradadora de microorganismos indígenas.
- utiliza para la remediación microorganismos endógenos, siendo mayor y fácil la adaptabilidad de estos microorganismos a un medio contaminado. Además, estos microorganismos no presentan una alta competencia, estarán perfectamente adaptados a las condiciones ambientales de un suelo contaminado.
- consigue niveles finales de descontaminación más altos, debido a la presencia de un inóculo bioaumentado de microorganismos degradadores en el compost, acelerando, así, el proceso de remediación.
- el tratamiento tiene una duración menor, comparado con otros procesos de remediación.
- es una tecnología versátil, puesto que se desarrolla “a medida” según los requerimientos específicos de cada emplazamiento.
- necesita menores requerimientos de manipulación y mantenimiento, lo que reduce los costes de tratamiento.

Algunas de las limitaciones que presenta el uso del sistema de composteo son (Van Deuren *et al.*, 1997; Eweis *et al.*, 1998):

- está limitado a contaminantes orgánicos.
- concentraciones muy altas de contaminantes pueden resultar tóxicas e inhibir la biodegradación. En el caso de hidrocarburos (TPH), es recomendable que la concentración no exceda 50 000 ppm. Por otra parte, concentraciones de metales pesados mayores a 2 500 ppm pueden inhibir el crecimiento microbiano.
- una disminución en la actividad microbiana provoca una disminución en la degradación y aumenta el periodo del tratamiento. Por ello, el éxito del proceso depende de la capacidad para crear y mantener las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento microbiano.
- existe el riesgo de que ciertos compuestos originalmente inocuos, puedan ser convertidos en productos tóxicos para una u otra especie.
- es necesario contar con un espacio adecuado para montar los sistemas.
- el suelo contaminado debe excavarse, lo que puede provocar la liberación de compuestos orgánicos volátiles.
- el arrastre de vapores durante el proceso de aireación requiere de tratamiento antes de descargar a la atmósfera.
- existe un incremento volumétrico del material a tratar por la adición de los agentes de volumen. Sin embargo, este problema queda solucionado con el tiempo de tratamiento.
- en general, los procesos de biorremediación requieren mayor tiempo de tratamiento que los físicos y químicos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BORRA

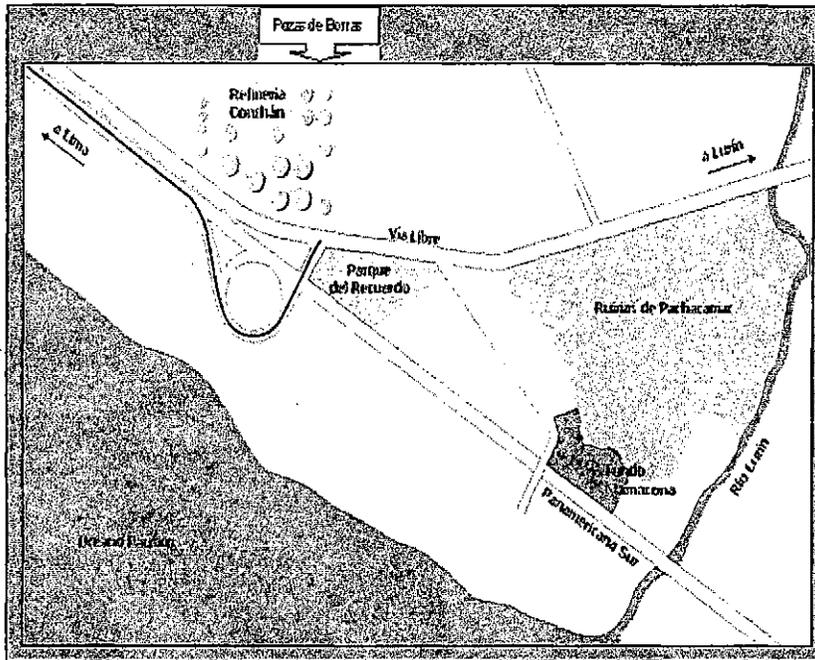
3.1.1 LUGAR DE ESTUDIO

La Refinería Conchán se encuentra ubicada al sur de la ciudad de Lima, en el kilómetro 38 de la Panamericana Sur y está orientada a la producción de asfaltos y combustibles. En el Croquis 1 se observa la ubicación de la Refinería Conchán y donde se ubicaron las dos pozas con borra.

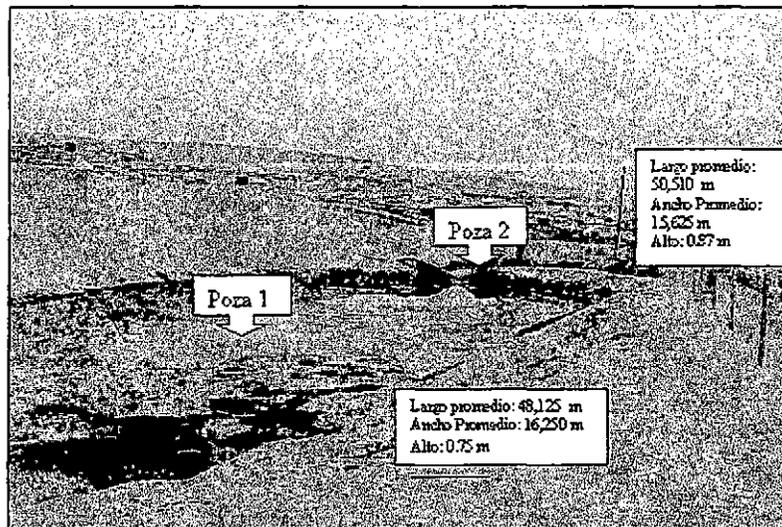
La Refinería Conchán contó con dos grandes depósitos con hidrocarburo (o llamado también pozas de borra) los cuales estuvieron dispuestos en el nivel superior de un cerro. Estas dos pozas con borras tienen forma elipsoidal (poza 1 y poza 2), dentro del área de la refinería. La poza 1 ubicada cerca al tanque 32 y la poza 2 dispuesta al costado de la poza 1.

3.1.2 HISTORIA O ANTECEDENTES DE LAS POZAS DE BORRA

La antigüedad de las dos pozas de borra se remonta alrededor de 1989, por la aparición de material no comercial que fue dispuesto en dos pozas para confinar los residuos líquidos (hidrocarburos) de la limpieza de los tanques, limpieza de las pozas de separadores de aceites / agua del tipo API, sedimento de los tanques, etc.; sin considerar algún tipo de impermeabilización del suelo. En la Fotografía 1 se observa la ubicación de las dos pozas de borras, en la parte superior de un cerro dentro del ámbito de la Refinería Conchán.



Croquis 1: Ubicación de la Refinería Conchán y de las pozas de borras



Fotografía 1: Ubicación de las dos pozas de borras

En la Figura 23 se demuestra gráficamente el contenido de los materiales dentro de las pozas.

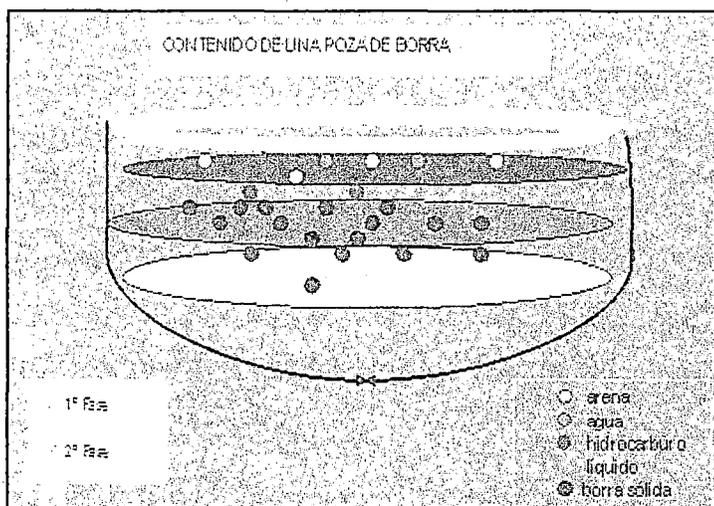


Figura 23: Contenido de las pozas con borras

3.1.3 MUESTREO DE LA BORRA

Con la finalidad de caracterizar físicamente el hidrocarburo contenido en las pozas de borra dentro del laboratorio de la Refinería Conchán, se realizó el muestreo en la parte superficial de cada poza, desde el borde de la poza a un (1) metro de distancia de esta, colectando un volumen de cuatro litros. Asimismo se realizó también el muestreo en la parte profunda de cada poza, para la poza 1 a una profundidad de 40 cm y para la poza 2 a una profundidad de 60 cm. Ver Figura 24 y Fotografía 2.

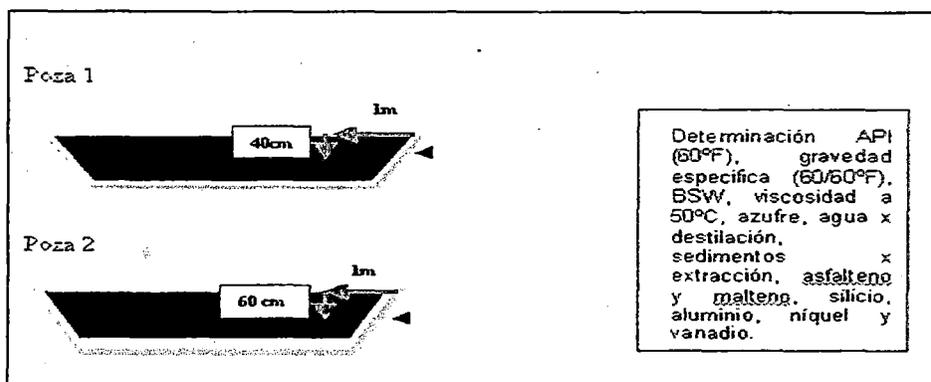


Figura 24: Muestreo de la borra a nivel superficial y profundo

Los análisis fisicoquímicos realizados fueron: determinación API (60 °F), gravedad específica (60/60 °F), BSW, viscosidad a 50 °C, azufre, agua por destilación, sedimentos por extracción, asfaltenos y maltenos, silicio, aluminio, níquel y vanadio.

Mientras se realizaba el muestreo se observó presencia de dos grandes barriles enterrados en las pozas de borras, los cuales estaban generando una coloración rojiza en una parte de la zona a muestrear.



Fotografía 2: Zona de muestreo de la borra

3.1.4 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA BORRA

Se realizó la evaluación fisicoquímica del hidrocarburo de las dos pozas de borra para identificar y conocer las características del fluido.

a. Materiales

Relación de material, instrumental y equipo:

- Borra de la Refinería Conchán
- pipeta de 100 uL
- estufa con precisión científica
- centrifugas
- microscopio LEIKA
- horno
- autoclave

b. Métodos de caracterización fisicoquímica de la borra

A continuación se menciona los métodos utilizados:

- **Gravedad API - Método del hidrómetro de vidrio:** expresada en grados API, describe que tan pesado o liviano es el petróleo crudo y sus derivados comparándolo con el agua. Si los grados API son mayores a 10, es más liviano que el agua, y por lo tanto flotaría en esta. Denota la relación correspondiente de peso específico y de la fluidez de los crudos con respecto al agua. Se registra la lectura a temperatura estándar de 60 °F (15.56 °C), utilizando las Tabla Internacionales Normalizadas (Método ASTM 1250). La gravedad API se lee observando la libre flotación del hidrómetro API y anotando la graduación más próxima a la aparente

intersección del plano horizontal de la superficie del líquido con la escala vertical del hidrómetro, luego que se haya alcanzado la temperatura en equilibrio. La temperatura de la muestra se lee de un termómetro ASTM separado y preciso en la muestra.

- **Determinación de agua y sedimento:** es importante evaluar estas impurezas porque las cantidades excesivas de estas pueden producir corrosión en equipos y problemas de procesamiento, además es necesario con el fin de medir volúmenes netos de petróleo. El agua y el sedimento (sólidos contaminantes) pueden ser determinados juntos por un procedimiento de centrifugación (ASTM D 96). El método utilizado de centrifugación fue seleccionado teniendo en cuenta el tipo de hidrocarburo, por lo tanto se utilizó el método de centrifugación para crudos asfálticos: solventes aromáticos (tolueno). También se determinó la cantidad de sedimento en la muestra mediante la extracción con solvente (ASTM D 473) y el agua por destilación (ASTM D- 95).
- **Viscosidad cinemática:** la viscosidad es la resistencia que opone un fluido al movimiento, en otras palabras, es la resistencia que oponen las moléculas de un fluido al desplazamiento relativo por deslizamiento. La viscosidad se determinó mediante la prueba ASTM D- 445 (tubos capilares) un viscosímetro a las temperaturas de 50 °C. La norma ASTM D445 describe el uso de viscosímetros de vidrio capilar estándar calibrados para medir la viscosidad cinemática de líquidos transparentes y opacos.
- **Precipitación del asfalteno:** con respecto al disolvente usado se ha optado por usar n-heptano debido a que la precipitación es fácil de lograr y la repetibilidad experimental es mejor (Tojima *et al.*, 1998). Si se usa n-heptano los asfaltenos son de alto peso molecular y mayor polaridad, en tanto que con n-pentano son menos polares y de peso molecular más bajo, aunque con n-pentano se precipita una mayor cantidad que con n-heptano (Andersen & Birdi, 1990).

Los análisis fueron desarrollados en el laboratorio fisicoquímico de la Refinería Conchán. En el Cuadro 7 se mencionan todos los métodos de análisis que se desarrollaron para determinar las propiedades de la borra.

Cuadro 7: Métodos de análisis para determinar las propiedades de las dos pozas de borra

Propiedades físicas	Método de análisis
API (60 °F)	ASTM D-287
Gravedad específica (60/60 °F)	ASTM D369
Viscosidad a 50 °C, cSt	D445
BSW, % volumen	ASTM D-96
Sedimentos por extracción % m/m	ASTM D473
Agua por destilación, % masa	ASTM D-95
Propiedades químicas	Método de análisis
Azufre, % masa	ASTM D1266
Silicio, ppm	ASTM D5184
Níquel, ppm	D5863
Vanadio, ppm	D5863
Aluminio, ppm	ASTM D5184
Asfalteno	n-heptano

3.1.5 CARACTERIZACIÓN DE TPH EN LA BORRA

Se seleccionó la poza 1 para las sucesivas evaluaciones, por tanto se empezó determinando los hidrocarburos totales (C9-C40), mediante la caracterización cromatografía y gravimétrica. En el Cuadro 8 se mencionan los análisis de TPH que fueron ejecutados por el laboratorio ENVIROLAB.

Cuadro 8: Métodos de análisis para determinar el TPH en la borra

Descripción de muestra vs Análisis	Método de análisis
Hidrocarburos (C9 - C40) mg/kg	SM 5520 F Gravimétrico
Hidrocarburos totales extraíbles mg/kg	(EPA 8015-M) Cromatografía

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ARENA

3.2.1 MUESTREO DE LA ARENA

Se realizó una calicata a 2.10 m de la zona de la orilla de la poza 1 de borra, muestreando arena a superficie y a media profundidad, con la finalidad de identificar las posibles infiltraciones existentes en el subsuelo. Ver Figura 25. Por otro lado, durante la excavación de la calicata se pudo visualizar pequeñas infiltraciones de residuo líquido aceitoso en la arena.

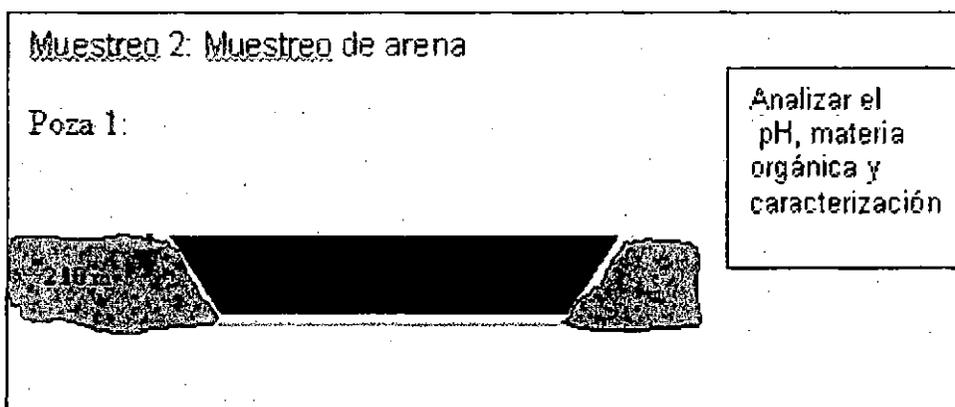


Figura 25: Calicata en la arena que rodea la poza de borra

3.2.2 EVALUACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA Y PH EN LA ARENA

Con las muestras de arena se determino la presencia de materia orgánica y pH, por el laboratorio Envirolab. En el Cuadro 9 se muestra los métodos de análisis utilizados.

Cuadro 9: Métodos de análisis para evaluar materia orgánica y pH

Parámetros	Método de análisis
Materia orgánica mg/kg	Método de Walkley & Black
pH del suelo	EPA 9045 – Soil pH

3.2.3 CARACTERIZACIÓN DEL TPH EN LA ARENA

Para determinar la presencia de hidrocarburo en la arena, se realizó el análisis cromatográfico y gravimétrico, por el laboratorio ENVIROLAB. Ver Cuadro 10.

Cuadro 10: Métodos de análisis para determinar TPH en la arena

Descripción de muestra vs Análisis	Método de análisis
Hidrocarburos (C9 – C40) mg/kg	SM 5520 F. Gravimétrico
Hidrocarburos totales extraíbles mg/kg	EPA 8015-M. Cromatografía

3.3 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.3.1 MATERIALES

a. Material biológico

Se realizó un tercer muestreo en las dos pozas de borra recolectando borra sólida, borra líquida y borra con arena, en la misma zona del primer muestreo (zona norte y sur de cada poza).

b. Material de laboratorio

- Placas Petri
- tubos de ensayo de vidrio
- Enlemmeyer
- mechero
- pipetas 5mL - 10 mL
- pipeta de 100 uL
- aza de siembra
- balanza analítica
- estufa Precisión Científica
- microscopio LEIKA
- horno
- autoclave
- lámpara UV
- refrigeradora
- borra de la Refinería Conchán

c. Equipos de campo

- Envases de plástico
- guantes
- mascarilla de boca
- lentes para el uso de lámpara UV
- hisopos grandes esterilizados
- algodón, alcohol, lejía, papel craft, pabilo, etc.
- viales
- vortex

d. Medios de cultivos

- Agar Nutritivo
- agar Cetrimide
- agar Sabouraud
- agar Tryptosa Soya (TSA)
- caldo de TSB
- agar Plate-Count
- agar Pseudomonas
- solución salina
- reactivos bioquímicos
- agua destilada estéril

3.3.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS

a. Selección de las muestras

Las muestras obtenidas fueron tres: borra sólida, borra líquida y borra con arena, las cuales fueron dispuestas en cada uno de los galones. Ver Fotografía 3 y Cuadro 11.



Fotografía 3: Galones con muestra de borra

Cuadro 11: Descripción de las muestras obtenidas de la poza 1 de borra

Muestra	Código	Zona de muestreo
Borra con arena	MBA	Extraída de la orilla de la poza de borra. Se muestreó borra con arena.
Borra sólida	MBS	Extraída a un metro de profundidad de la poza de borra
Borra líquida	MBL	Extraída de la superficie de la poza de borra

Seguidamente en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Cayetano Heredia, se realizó el aislamiento de las bacterias y hongos de las tres muestras y se siguieron los procedimientos que se detallan en la Figura 26 para la obtención de los microorganismos.

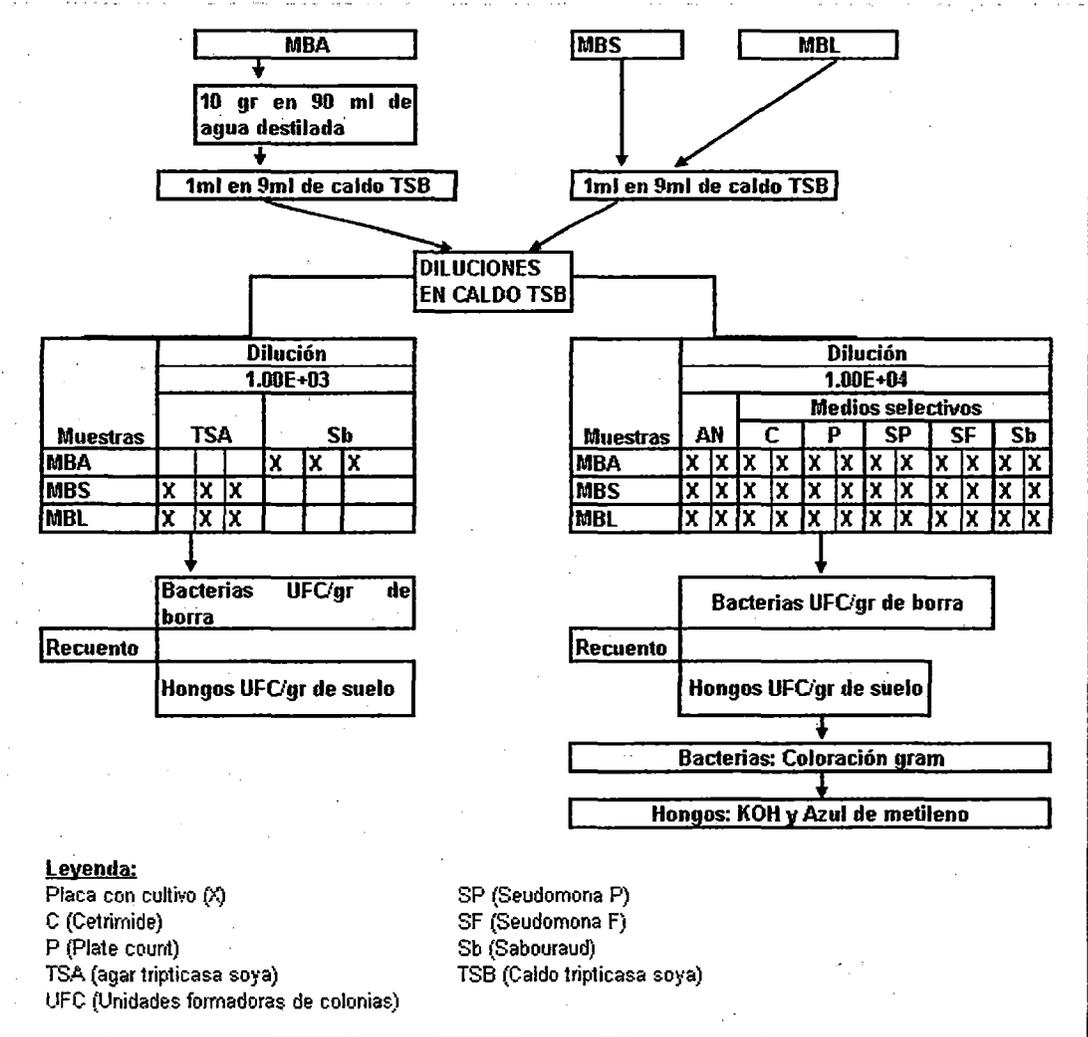


Figura 26: Procedimientos para la obtención del consorcio microbiano

b. Aislamiento y dilución de bacterias y hongos

Se realizaron dos tipos de aislamientos:

- Para la muestra de borra con arena (MBA) se extrajo 10 g y se colocó en un vaso Pyrex de laboratorio con 90 mL de agua destilada y se realizó una mezcla.
- Para las muestras de borra solida (MBS) y borra liquida (MBL) se extrajo 1 g de cada muestra para ser depositado en un tubo de ensayo con 9 mL de caldo TSB (se realizaron tres repeticiones para cada muestra) y fueron incubados a 42 °C por 24 horas hasta obtener crecimiento, observando la turbidez característica del crecimiento bacteriano.

Se realizaron diluciones de 1 mL con caldo TSB hasta la dilución 10^4 y se incubaron a 42 °C por 24 horas.

c. Siembra y recuento de las bacterias y hongos

Se realizó una primera siembra con dilución 10^3 en placas Petri con agar TSA y Sabouraud por triplicado. Esta operación se realizó manteniendo la pipeta de manera que forme un ángulo de 45°, levantando la tapa de la placa sólo lo suficiente para introducir la punta de la pipeta, tocando el fondo de la placa durante la descarga y luego levantando la pipeta sin tocar otra área seca de la placa. Se vertieron 12 mL del medio de cultivo fundido en cada placa de Petri, flameando la boca del recipiente antes de la adición y dejando solidificarse sobre una superficie nivelada (5 - 10 minutos). Las placas con agar TSA para bacterias fueron incubadas a 42 °C por 24 horas y para hongos se utilizó el agar Sabouraud con incubación de 48 horas.

Luego de obtenido el crecimiento se realizó una primera cuantificación de las bacterias mediante el recuento de unidades formadoras de colonias/g (MBS y MBL) y de

hongos mediante el recuento de unidades formadoras de colonias/ g de suelo (MBA); así como la coloración respectiva para bacterias (coloración Gram) y hongos (coloración KOH y azul de metileno).

A continuación se muestran el Cuadro 12, en relación con el recuento de bacterias en agar TSA de la muestra de borra sólida y borra líquida, así como el Cuadro 13, con respecto del recuento de hongos en agar Sabouraud de la muestra de arena con borra.

Cuadro 12: Cantidad de bacterias registradas en la muestra de borra sólida y líquida

Primer recuento en UFC/g de muestra de borra sólida (MBS) y líquida (MBL)			
N° de placa	MBS	N° de placa	MBL
Bs1	1.51E+05	B11	2.50E+05
Bs2	1.25E+05	B12	2.26E+05
Bs3	1.93E+05	B13	1.89E+05
Evaluación estadística		Evaluación estadística	
Promedio	5.03E+04	Promedio	2.22E+05
Desviación estándar	3.43E+04	Desviación estándar	3.07E+04
Media	1.56E+05	Media	2.22E+05
M+1D	2.24E+05	M+1D	2.82E+05
M-1D	8.91E+04	M-1D	1.61E+05

Cuadro 13: Cantidad de hongos registrados en la muestra de arena con borra (MBA)

N° de placa	Recuento en UFC/g de suelo de la muestra MBA
Ho1	6.00E+04
Ho2	5.70E+04
Ho3	3.00E+04
Evaluación estadística	
Promedio	1.90E+04
Media	4.90E+04
M+1D	8.14E+04
M-1D	1.66E+04

El crecimiento de las hongos aisladas de la muestra MBA alcanzaron el valor máximo a las 72 horas con 6.00×10^4 UFC/g de suelo.

d. Crecimiento en medio selectivo y segundo recuento

Con dilución $1:10^4$ fueron sembrados en agar Nutritivo y en medios de cultivos selectivos para bacterias (agar Cetrimide, agar Pseudomonas P, agar Pseudomonas F, agar Plate-Count y agar Sabouraud) por duplicado, y se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h - 48 h. Ver Anexo 1: Composición de medios de cultivo. En este orden, se revisó el crecimiento diariamente y se realizó la cuantificación por medio de un segundo recuento de bacterias (UFC/g) y hongos (UFC/g).

Finalmente se realizó la siembra en tubos de vidrio pequeños para guardar las cepas a una temperatura de 4 °C, para sus posteriores usos en el trabajo experimental. A continuación se muestra, en el Cuadro 14, el segundo recuento de bacterias para la muestra de borra sólida y borra líquida.

Cuadro 14: Segundo recuento de bacterias registradas en la muestra de borra sólida (MBS) y líquida (MBL) en UFC/g

UFC/g en muestra de borra sólida		UFC/g en muestra de borra líquida	
N° de placa	MBS	N° de placa	MBL
B32 Agar Pseudomonas P	1.13E+06	B3 Agar Plate - Count	1.60E+06
B24 Agar Nutritivo	7.50E+05	B4 Agar Pseudomonas F	4.40E+05
B11 Agar Nutritivo	7.30E+05	B5 Agar Nutritivo	1.52E+06
B2 Agar Plate - Count	1.53E+06	B6 Agar Plate - Count	1.31E+06
B21 Agar Cetrimide	1.54E+06	B7 Agar Nutritivo	1.20E+06
B1 Agar Plate - Count	1.74E+06	B8 Agar Pseudomonas P	5.30E+05
		B9.1 Agar Pseudomonas P	1.83E+06
		B9.2 Agar Pseudomonas P	1.25E+06
		B10 Agar Plate - Count	1.72E+06
		B12 Agar Cetrimide	1.30E+06
		B13 Agar Nutritivo	1.23E+06
		B14 Agar Nutritivo	8.30E+05
		B15 Agar Pseudomonas P	8.20E+05
		B16 Agar Nutritivo	9.50E+05
		B17 Agar Pseudomonas P	6.10E+05
		B19 Agar Nutritivo	3.30E+05
		B20 Agar Pseudomonas F	1.00E+05
		B22 Agar Plate - Count	3.70E+05
		B23 Agar Cetrimide	5.20E+05
		B25 Agar Pseudomonas P	1.22E+06
		B35 Agar Nutritivo	1.28E+06
Parámetros estadísticos			
Promedio	1.88E+05	Promedio	7.62E+04
Desviación estándar	4.33E+05	Desviación estándar	4.97E+05
Coefficiente de varianza	35%	Coefficiente de varianza	50%

El crecimiento de las bacterias aisladas de la borra líquida alcanzó el valor máximo a las 72 horas con 1.83×10^6 UFC/g en la placa con el código B9.1 y el valor mínimo con 1.00×10^5 UFC/g en la placa con el código B20. Por otro lado, el crecimiento de las bacterias aisladas de la borra sólida alcanzó el valor máximo a las 72 horas con 1.74×10^6 UFC/g en la placa con el código B1 y el valor mínimo con 7.30×10^5 UFC/g en la placa con el código B11. El tiempo de crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo agar Pseudomonas P se realizó en un día. A diferencia del crecimiento de las bacterias que crecieron en agar Plate-Count, agar Cetrimide y agar Pseudomonas F, el cual demoró dos días. Se realizó también el recuento de hongos de la muestra de arena con borra en dilución de 10^4 el cual se muestra en el Cuadro 15. Como se muestra en el Cuadro 15 el crecimiento de los hongos en agar Sabouraud aislados de la borra con arena alcanzó el valor máximo a las 72 horas con 5.50×10^5 UFC/g en la placa con el código H26 y el valor mínimo con 1.20×10^5 UFC/g en la placa con el código H31.

Cuadro 15: Recuento de hongos registrados en muestra de borra con arena

Nº de placa	Recuento en UFC/g de suelo (muestra de borra con arena)
H26	5.50E+05
H27	4.50E+05
H39	4.70E+05
H28	2.80E+05
H29	5.40E+05
H30	4.30E+05
H31	1.20E+05
H33	2.10E+05
H34	1.80E+05
H36	2.30E+05
H37	4.10E+05
H38	3.20E+05
Parámetros estadísticos	
Promedio	3.58E+04
Media	3.49E+05
M+1D	6.34E+05
M-1D	6.45E+04

e. **Caracterización morfológica microscópica y macroscópica de las cepas bacterianas**

- **Evaluación microscópica**, se realizó a partir de la tinción de Gram. En el Cuadro 16 se presenta las etapas de la tinción de Gram. Se realizó la coloración Gram a 27 colonias de bacterias de las placas con crecimiento, para poder identificar de acuerdo a su coloración las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. Se utilizó un microscopio con ocular doble electrónico y ocular micrométrico.

Cuadro 16: Etapas en la tinción de Gram

Paso	Método	Resultados	
		Gram +	Gram -
Tinción inicial	Cristal violeta durante 30"	Se tiñen de violeta	Se tiñen de violeta
Mordiente	Lugol durante 30"	Permanecen violeta	Permanecen violeta
Decoloración	Alcohol de 95 %, durante 10 - 20"	Permanecen violeta	Se decoloran
Contraste	Safranina durante 20 - 30"	Permanecen violeta	Se tiñen de rosa

También se observó los distintos morfotipos: los cocos que son de forma esférica, pueden aparecer aislados después de la división celular (micrococos), aparecer por pares (diplococos), formar cadenas (estreptococos), o agruparse de manera irregular (estafilococos) y división a lo largo de dos planos diferentes (tétradas). Los bacilos poseen forma alargada. En general suelen agruparse en forma de cadena (estreptobacilos) o en empalizada, en pares (diplobacilos). Ver Figuras 27 y Fotografía 4(a) y Cuadro 17

- **Evaluación macroscópica**, se usó el método convencional en placa a partir: del color de la colonia (An: anaranjado; Am: amarillo; B: blanco; M: marrón; R: rosado); de la forma de la colonia (I: irregular; R: rizoide; r: redondas o esféricas;

M: micelar); consistencia (E: entrelazado; C: cremoso, M: mucosidad; S: sequedad; B: butiroso); borde (L: liso; I: irregular; G: granulado); Elevación (Cb: convexa baja; Cp: convexa papilar; U: umbilicado; P: plana); y superficie (L: liso; G: granular). Ver Fotografía 4(b) y Cuadro 17.

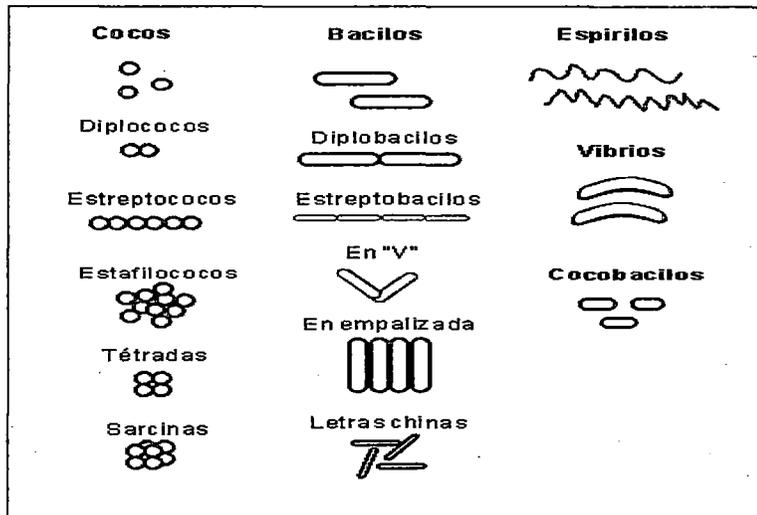
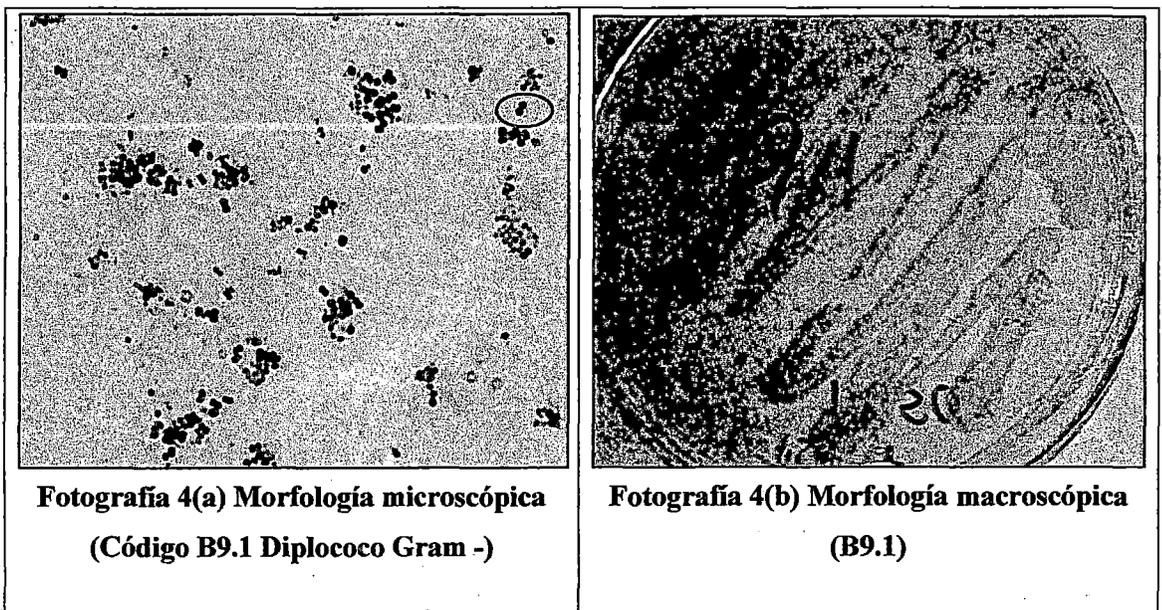


Figura 27: Morfología microscópica de las bacterias



Cuadro 17: Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas

Código de la Cepa	Coloración Gram	Característica morfológica microscópica	Característica morfológica macroscópica					
			Color	Consistencia	Forma	Elevación	Borde	Superficie
B1	Bacilo -	Bacilo	B	S	I	P	L	L
B2	Bacilo +	Diplobacilo	B	C	I	U	I	G
B3	Bacilo -	Bacilo	B	S	I	P	L	L
B4	Bacilo +	Bacilo	B	C	I	U	I	G
B5	Bacilo -	Estreptobacilo	M	E, C	R	Cp	I	G
B6	Bacilo -	Diplobacilo	An	E, C	R	Cp	I	G
B7	Bacilo -	Diplobacilo	An	S	R	P	L	G
B8	Bacilo -	Bacilo	An	S	R	P	L	G
B9.1	Coco +	Diplococo	R	B	r	Cb	G	G
B9.2	Bacilo -	Cocobacilo	An	B	r	Cb	G	G
B10	Bacilo +	Diplobacilo	B	C	I	U	I	G
B11	Bacilo +	Diplobacilo	B	C	I	U	I	G
B12	Bacilo -	Bacilo	An	E, C	R	Cp	I	G
B13	Bacilo -	Estreptobacilo	An	E, C	R	Cp	I	G
B14	Bacilo -	Estreptobacilo	B	C	I	U	G	G
B15	Bacilo -	Bacilo	Am	C	I	U	I	G
B16	Bacilo -	Bacilo	B	C	I	P	I	G
B17	Bacilo -	Bacilo	B	C	I	P	I	G
B19	Bacilo -	Bacilo	M	E, C	R	Cp	I	G
B20	Bacilo -	Estreptobacilo	M	S	I	U	G	G
B21	Bacilo -	Bacilo	B	E, C	I	P	L	L
B22	Bacilo -	Bacilo	B	E, C	I	P	L	L
B23	Bacilo +	Bacilo	B	S	I	P	I	G
B24	Coco +	Tetradas	B	C	I	U	G	G
B25	Bacilo -	Diplobacilo	B	C	I	U	I	G
B32	Bacilo -	Diplobacilo	B	C	r	Cb	L	L
B35	Bacilo -	Bacilo empalizadas	B	S	I	P	L	I

- **Caracterización según requerimiento nutricional para determinar presencia de enterobacterias**

El estudio se realizó mediante pruebas bioquímicas que se aplicaron a los aislamientos bacterianos, según el Cuadro 18.

Las enterobacterias son bacilos cortos Gram negativos no esporulados, que pueden o no tener motilidad. Son anaerobios facultativos o anaeróbicos.

Cuadro 18: Evaluación bioquímica de las cepas bacterianas para determinar enterobacterias

Código de la Cepa	Coloración Gram	TSI	LIA	SIM		Glucosa		Catalaza	Oxidaza	Citrato	Lactosa (Mc Conkey)
				(Turbidez/Motilidad)	Indol	MR	VP				
B1	Bacilo -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B2	Bacilo +	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B3	Bacilo -	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B4	Bacilo +	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B5	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
B6	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
B7	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
B8	Bacilo -	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
B9.1	Coco +	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B9.2	Bacilo -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B10	Bacilo +	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B11	Bacilo +	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B12	Bacilo -	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B13	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B14	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B15	Bacilo -	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
B16	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B17	Bacilo -	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B19	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B20	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B21	Bacilo -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B22	Bacilo -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B23	Bacilo +	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B24	Coco +	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
B25	Bacilo -	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B32	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
B35	Bacilo -	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-

f. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos

Las características fenotípicas se expresan según las variedades de color, forma, consistencia, aspecto. Así como la morfología macroscópica de la colonia y morfología vista al microscopio.

- **Para la evaluación macroscópica**, se observó el color del anverso y reverso, la textura de la colonia, la formación de micelio aéreo y la formación de surcos. Ver Cuadro 19. Asimismo, se tomaron fotos del desarrollo macroscópico en placa Petri. Ver Fotografía 5(a) y 6(a).

Cuadro 19: Caracterización de la morfología macroscópica de hongos

Codigo de cepas	Característica macroscópicas
h33, h38 y h39	Las colonias h38 y h39 de color plomo a grisáceo; blanco en los borde y con esporangios negros; con franja blanca; filamentosas; reverso de color blanco a incoloro; textura algodonosa. Luego con crecimiento aereo abundante que llega hasta el borde de la placa. La colonia h33 de color blanco; con franja blanca; filamentosas; reverso blanco a incoloro; textura algodonosa.
h28, h36 y h30	Colonia h28 y h36 de color verde petroleo con franja blanca; micelio blanco; reverso color verde; textura aterciopelado pulverulento; con surcos radiales. La colonia h30 con coloración marron con verde grisáceo; micelio blanco; reverso marron con verde; textura aterciopelada; con surcos.
h 26, h 31, h 34	Colonias de color blanco grisáceo y esporangio negros; con franja blanca; reverso de color blanco a incoloro; textura algodonosa.
h 27	Colonias color negro con blanco; reverso color blanco con negro; textura aterciopelada; con franja blanca filamentosas.
h 29 y h 37	Colonias de color plomo oscuro; reverso color incoloro; franja blanca ; textura cremosa.

- **Para la evaluación microscópica**, se usó una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3 % para poder observar la morfología mediante el microscopio. En un portaobjetos se colocaron unas gotas de KOH, realizándose un ligero frotis sobre aquél. Posteriormente se observaron los detalles morfológicos a través de un

microscopio electrónico Nikon de ocular 100 x para su identificación (ver Cuadro 20). Sólo se pudo observar con el microscopio el estado reproductivo de seis cepas de hongos. Asimismo se tomaron fotografías a sus estados reproductivos, ver Fotografía 5(b) y 6(b).

Cuadro 20: Características microscópicas de seis cepas de hongos

Codigo de cepas	Característica microscópica
h33, h38 y h39	Esporangios esféricos; hifa cenociticas color oscuro y rizoide color oscuro.
h28, h36 y h30	Cabezas conidiales biseriado y predominantemente radial; Hifa tabicada.



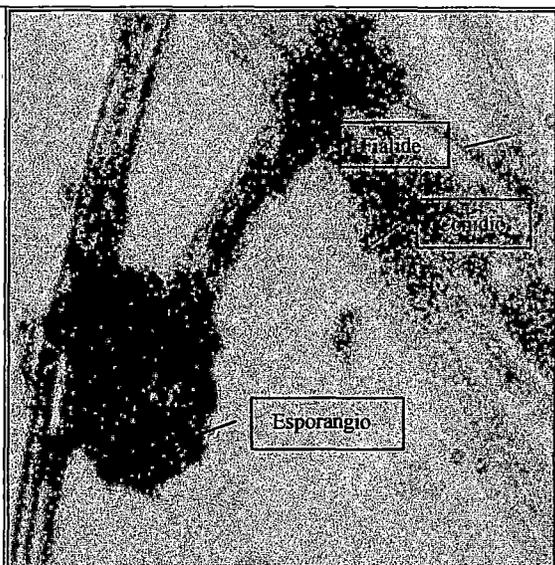
Fotografía 5(a): Morfología macroscópica de hongos



Fotografía 5(b): Morfología microscópica de hongos



Fotografía 6(a): Morfología macroscópica de hongos



Fotografía 6(b): Morfología microscópica hongos

3.4 PRUEBA DE ACTIVIDAD DEGRADATIVA EN CULTIVO BUSHNELL HAAS (BH)

3.4.1 MATERIALES

- Medios de Cultivo

- Medio de cultivo BH (Ver Anexo: Composición del cultivo)
- solución salina al 0.85 %
- caldo Nutritivo
- borra

b. Equipos

- Placas Petri
- tubos de vidrio
- centrifuga 7000 rpm
- horno
- pipetas Pasteur de vidrio
- pipeta de 100 uL
- pipetas de vidrio de 5mL - 10 mL
- varillas de vidrio
- tips de plástico

3.4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADATIVA, EMULSIFICANTE Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

a. Reactivación de cepas

Para la prueba de evaluación de la actividad degradativa en medio de cultivo BH, se reactivaron las cepas bacterianas y hongos del consorcio microbiano que estuvieron guardados en el cepario a 4 °C.

Las cepas bacterianas se reactivaron en tubos de vidrio con 5 mL de caldo Nutritivo y se incubaron a temperatura ambiente por 36 horas para el desarrollo de su biomasa (ver Figura 28).

b. Obtención del pellet

Las cepas reactivadas fueron centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos a 6 °C y se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos en solución salina y centrifugados dos veces en las mismas condiciones anteriormente descritas, para eliminar nutrientes, contando con un ambiente estéril dentro del laboratorio. Estos pellets de concentrado celular fueron utilizados como inóculo en la prueba de degradación.

c. Siembra en cultivo BH

En placas petri con medio de cultivo BH solidificado con agar se adicionó una fina capa de borra encima del medio de cultivo. Luego se esparció en cada placa 100 uL del pellet (las que contiene 0.5 mL de solución salina). Se realizó el mismo procedimiento con 50 uL del pellet. Se utilizó luz ultravioleta (intensidad de 253 - 260 nm) por una hora como medio de esterilización de la borra. Se comprobó la esterilidad considerándose dos placas de control.

Se realizó la siembra de 80 placas las cuales contaron con repeticiones. Los hongos no fueron centrifugados, por lo cual se sembró directamente en la placa que contenía el medio de cultivo BH y la borra.

d. Incubación

Se incubaron a temperatura de 30 °C - 34 °C hasta esperar el crecimiento de los microorganismos, para observar luego de cinco meses la degradación de las bacterias y hongos en el medio de cultivo BH con borra. En la Figura 28 se muestra el procedimiento de siembra en medio BH de las cepas aisladas de las pozas con borra.

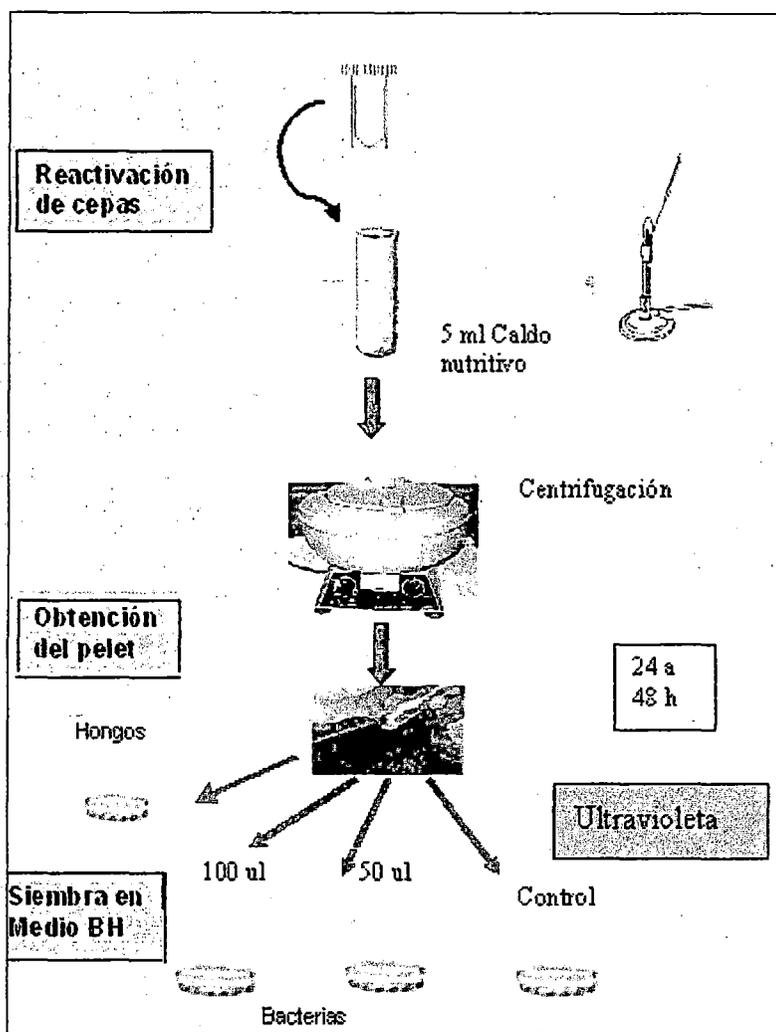


Figura 28: Procedimiento de siembra en cultivo BH

e. Selección de las bacterias y hongos según la calificación de actividad degradativa en cultivo BH

Se seleccionaron las bacterias que tuvieron mayor actividad degradativa según criterios cualitativos elaborados a partir de la observación de los cambios que se generaron durante los procesos de degradación bacteriana y micológica. Luego se realizó una comparación de la actividad emulsificante de aquellas bacterias que presentaron una alta calificación de actividad degradativa a través del tiempo hasta no detectarse presencia de agar BH en la placa.

La actividad degradativa estuvo representada por los espacios que a simple vista se observaron en el medio de cultivo y la ausencia de borra (ver Fotografía 7).



Fotografía 7: Ceba B1 (100 uL) a los 49 días del proceso de desarrollo de la actividad degradativa

f. Criterios cualitativos durante los procesos de actividad degradativa

Para evaluar la degradación de las bacterias y hongos de la borra en medio BH se realizó un seguimiento cualitativo, teniendo en cuenta una calificación de la actividad degradativa de las bacterias, según los periodos degradativos del consumo de la borra y del consumo total del agar BH. Se recomienda realizar las observaciones cada 15 días. La calificación de la actividad degradativa de las bacterias se muestra en el Cuadro 21(a).

A partir del proceso quinto la actividad degradativa de las bacterias disminuye debido a que el agar que es su medio nutritivo empieza a cuartearse y los procesos seis, siete y ocho indican que no hay actividad y que el agar se secó. Esta misma evaluación se consideró para evaluar la actividad degradativa de los hongos.

Cuadro 21(a): Procesos de desarrollo de la actividad degradativa por las cepas bacterianas a través del tiempo (periodos)

Procesos	Actividad degradativa
1. Placas con presencia de áreas degradativas sin borra, en el lugar donde se coloco la cepa bacteriana.	Consumo de la borra en el borde de la placa donde se coloco la cepa bacteriana.
2. Placas con un aumento del área degradativa sin borra.	Consumo de la borra con el aumento del espacio donde se coloco la cepa.
3. Placas con un mayor aumento (octava parte) del área degradativa sin borra	Consumo de la borra en la octava parte de la placa.
4. Placas con un mayor aumento (cuarta parte de la placa) del área degradativa sin borra y mayor consumo del agar (disminución del ancho del agar).	Consumo de la borra en la cuarta parte de la placa y consumo del agar
5. Cuarteamiento del agar con borra.	Escasa a nula actividad degradativa
6. Sequedad del agar con la borra (dando una textura de plástico).	Nula actividad degradativa
7. Aumento de la sequedad del agar con la borra	Nula actividad degradativa
8. Enrollamiento de la borra (textura de plástico), no presencia de agar.	Nula actividad degradativa

La calificación de la actividad degradativa se muestra en el Cuadro 21(b).

Cuadro 21(b): Calificación de la actividad degradativa a través del tiempo (periodos)

Alta	Media	Baja	Nula
Cuando se desarrolla tres a mas procesos de actividad degradativa.	Cuando se desarrolla de dos a tres procesos de actividad degradativa.	Cuando se desarrolla un proceso de actividad degradativa.	Sin ninguna reaccion.

En el Cuadro 22 se muestra la prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de 100 uL de cepas bacterianas y en el Cuadro 23 su registro de la calificación.

En el Cuadro 24 se muestra la prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de 50 uL de cepas bacterianas y en el Cuadro 25 su registro de la calificación.

En el Cuadro 26 se muestra la prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de hongos.

Cuadro 23: Registro de la calificación de la actividad degradativa con cepas bacterianas de 100 uL en medio de cultivo BH con hidrocarburo

Cepas Bacterianas	Actividad degradativa
B1	Alta
B9.1	Alta
B9.2	Alta
B15	Alta
B5	Media
B2	Media
B35	Media
B12	Media
B7	Baja
B24	Baja
B10	Baja
B11	Baja
B14	Baja
B6	Nulo
B4	Nulo
B19	Nulo
B20	Nulo
B21	Nulo
B23	Nulo
B25	Nulo
B32	Nulo
B3	Nulo
B17	Nulo
B16	Nulo
B8	Nulo
B13	Nulo
B22	Nulo

La actividad degradativa de cuatro cepas bacterianas (B1, B9.1, B9.2 y B15) comenzó a los 40 días hasta los 94 días, considerándose 44 días de actividad con una calificación de alta actividad degradativa por presentar cuatro periodos de actividad. A partir de los 49 días hubo reacción en otras 4 cepas bacterianas (B5, B2, B35 y B12) que duro 31 días de actividad degradativa, con mediana actividad y cinco cepas bacterianas (B7, B24, B10, B11 y B14) que tuvieron sólo nueve días de actividad degradativa, con baja actividad.

Cuadro 24: Prueba de desarrollo de la actividad degradativa con inoculación de 50 uL de cepas bacterianas en medio BH con hidrocarburo (borra)

Proceso de desarrollo de la actividad degradativa de las cepas bacterianas	Periodos N=8	Días	50 ul de cepas bacterianas						B24, B15, B17, B16, B8, B13, B22, B7, B3, B12, B10, B11, B4, B14, B6, B19, B20, B21, B23, B25 y B32.
			B1	B5	B9.2	B2	B9.1	B35	
Placas con presencia de áreas degradativas sin borra, en el lugar donde se coloco la cepa bacteriana.	09/01/04	40	0	0	0	0	0	0	0
Placas con un aumento del área degradativa sin borra.	18/01/04	49							0
Placas con un mayor aumento (octava parte) del área degradativa sin borra.	18/02/04	80	0	0	0	0	0	0	0
Placas con aumento de la cuarta parte del área degradativa sin borra y mayor consumo del agar (menor ancho del agar).	02/03/04	94	0	0	0	0	0	0	
Cuarreamiento del agar con borra.	18/03/04	110		0	0	0	0	0	0
Sequedad del agar con la borra (textura de plástico).	05/04/04	127	0	0	0	0	0	0	0
Aumento de la sequedad del agar con la borra	23/04/04	145	0	0	0	0	0	0	0
Enrollamiento de la borra, sin agar.	18/05/04	170	0	0	0	0	0	0	0
Evaluación			1	1	1	1	1	1	0

Calificación de la actividad degradativa de las bacterias según los números de periodos de la actividad:

Actividad degradativa

Calificación	Numero de periodos
Alta	Más de 3
Media	2 - 3
bajo	1
Nula	0

Fuente propia

Cuadro 25: Registro de la calificación de la actividad degradativa de cepas bacterianas de 50 uL en medio de cultivo BH con hidrocarburo

Cepas bacterianas	Actividad degradativa
B1	Baja
B5	Baja
B9.2	Baja
B2	Baja
B9.1	Baja
B35	Baja
B24	Nula
B15	Nula
B17	Nula
B16	Nula
B8	Nula
B13	Nula
B22	Nula
B12	Nula
B7	Nula
B3	Nula
B10	Nula
B11	Nula
B4	Nula
B14	Nula
B6	Nula
B19	Nula
B20	Nula
B21	Nula
B23	Nula
B25	Nula
B32	Nula

La actividad degradativa para seis cepas bacterianas (B1, B5, B9.2, B2, B9.1 y B35) comenzó a los 49 días y tubo solo 31 días de actividad degradativa con una calificación de baja actividad degradativa por solo presentar un periodo de actividad. Pasados los días se cuarteo y se observó un enrollamiento de textura plastificada del hidrocarburo.

Cuadro 26: Prueba de desarrollo de la actividad degradativa con hongos en medio BH con hidrocarburo (borra)

Proceso de desarrollo de la actividad degradativa de los hongos	Periodos= 8	Días	Hongos												
			H29	H28	H30	H31	H27	H39	H26	H37	H34	H38	H36	H33	
Placas con presencia de áreas degradativas sin borra, en el lugar donde se coloco el hongo	09/01/2004	40								0	0	0	0	0	0
Placas con un aumento del área degradativa sin borra.	18/01/2004	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placas con un mayor aumento (octava parte) del área degradativa sin borra.	18/02/2004	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placas con un mayor aumento (cuarta parte de la placa) del área degradativa sin borra y mayor consumo del agar (disminución del ancho del agar).	02/03/2004	94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuarreamiento del agar con borra.	18/03/2004	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sequedad del agar con la borra (dando una textura de plástico).	05/04/2004	144	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aumento de la sequedad del agar con la borra.	23/04/2004	145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enrollamiento de la borra (textura de plástico), no presencia de agar.	18/05/2004	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluación			1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

Actividad degradativa

Calificación de la actividad degradativa de los hongos según los números de periodos de la actividad

Calificación	Numero de periodos
Alta	Más de 3
Media	2 - 3
bajo	1
Nula	0

Fuente propia

Cuadro 27: Registro de la calificación de la actividad degradativa de los hongos en medio BH

Hongos	Actividad degradativa
H27	Bajo
H28	Bajo
H29	Bajo
H30	Bajo
H31	Bajo
H39	Bajo
H37	Nulo
H26	Nulo
H34	Nulo
H38	Nulo
H36	Nulo
H33	Nulo

La actividad degradativa se observó en seis cepas de hongos (H27, H28, H29, H30, H31 y H39) comenzó a los 40 días y se observó degradación hasta los 49 días. En los siguientes días no se observó ninguna reacción en la placa.

g. Determinación de la actividad emulsificante de las bacterias

Para comprobar la actividad degradativa de las bacterias, se realizó la "Prueba de actividad emulsificante de las bacterias degradadoras de petróleo", según la metodología propuesta por Goldman *et al.* (1982).

La evaluación fue realizada en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La absorbancia leída se convirtió en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE /mL), siendo 0.816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro. Ver Cuadro 28.

Cuadro 28: Determinación de la actividad emulsificante de las cepas bacterianas con mayor actividad degradativa (100 uL)

CEPA	Actividad degradativa (100uL)	Actividad emulsificante	
		Absorbancia	UAE/mL
B9.2	Alta	1.140	1.397
B1	Alta	0.840	1.029
B9.1	Alta	0.764	0.936
B15	Alta	0.742	0.909
B2	Media	0.558	0.683
B35	Media	0.430	0.527
B5	Media	0.380	0.466
B12	Media	0.245	0.300
B7	Baja	0.175	0.214
B24	Baja	0.170	0.208
B14	Baja	0.90	0.110
B10	Baja	0.72	0.088
B11	Baja	0.64	0.078

A mayor absorbancia es mayor la actividad emulsificante de la cepa. Por tanto, en la prueba de actividad emulsificante, se observó que fueron cuatro las cepas bacterianas (cepa B9.2, cepa B1, cepa B9.1 y cepa B15) las que presentaron mayor actividad emulsificante, la cual fluctuó entre 0.909 y 1.397 UAE/mL.

Fueron cuatro cepas bacterianas que presentaron mediana actividad degradativa y baja actividad emulsificante (B2, B35, B5 y B12). Asimismo, cinco cepas presentaron baja actividad degradativa y baja actividad emulsificante (B7, B24, B14, B10 y B11).

Con estas 13 cepas bacterianas se desarrollarán más adelante evaluaciones de las concentraciones de TPH en dos pruebas biológicas degradativas de hidrocarburos: prueba de degradación de la borra (TPH) en terrarios y la prueba de degradación con el uso de la técnica de compostaje sin bioaumentación y con bioaumentación.

h. Caracterización taxonómica por la técnica API 20 NE

Se usó la técnica API 20 NE para identificar las bacterias aisladas en las pruebas microbiológicas, que se utiliza en bacterias Gram negativas y oxidasa positivas (no enterobacterias). En la Figura 29 se menciona el procedimiento para identificación de bacterias oleofílicas. La prueba API 20 NE y las lecturas fueron hechas en la Universidad Particular Cayetano Heredia. La técnica API 20 NE fue elegida por su gran fiabilidad, y por ser un protocolo estandarizado, la cual contiene bases de datos donde introducir los resultados y se puede obtener una clasificación precisa. Ver Cuadro 29.

Cuadro 29: Pasos para la realización de la prueba API 20 NE

Pasos	Descripción de la prueba API 20 NE
Preparación de la Galería API 20 NE:	Se depositó aproximadamente 5 mL, de agua destilada en los alveolos de la cámara, para proporcionar una atmósfera húmeda a la cámara de incubación. Se rotuló la cámara con la clave respectiva. Luego, la galería de la bolsa hermética estéril fue incubada
Inoculación de la Galería	Se llenaron los microtubos (no las cúpulas) de las pruebas Nitrato de potasio, P-nitrofenil- BD galactopiranosido o PNPG, con la suspensión bacteriana utilizando una pipeta Pasteur, evitando que se formen burbujas. Luego se transfirió gotas de suspensión bacteriana a una ampolla de medio Auxiliar (AUX Medium). Se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas. Después se llenaron los microtubos y las cúpulas de las pruebas Glucosa (GLU) a Fenil-acetato (PAC), de tal manera que el nivel del líquido quedaba horizontal o ligeramente convexo en la cúpula, nunca cóncavo. Se llenó luego con aceite de parafina estéril las cúpulas de las tres pruebas subrayadas (GLU; Arginina (ADH); Urea (URE), de tal manera que se formó un menisco convexo. Luego se cubrió la cámara y se incubó a 30 °C durante veinticuatro horas.
Lectura de la Galería	Después de veinticuatro horas de incubación, la lectura se llevó a cabo utilizando la tabla de lectura del API 20 NE. Se anotaron todas las reacciones espontáneas: GLU, ADH, URE, Esculina (ESC), Gelatina (GEL), PNPG y se registraron en las fichas respectivas según el catálogo analítico.

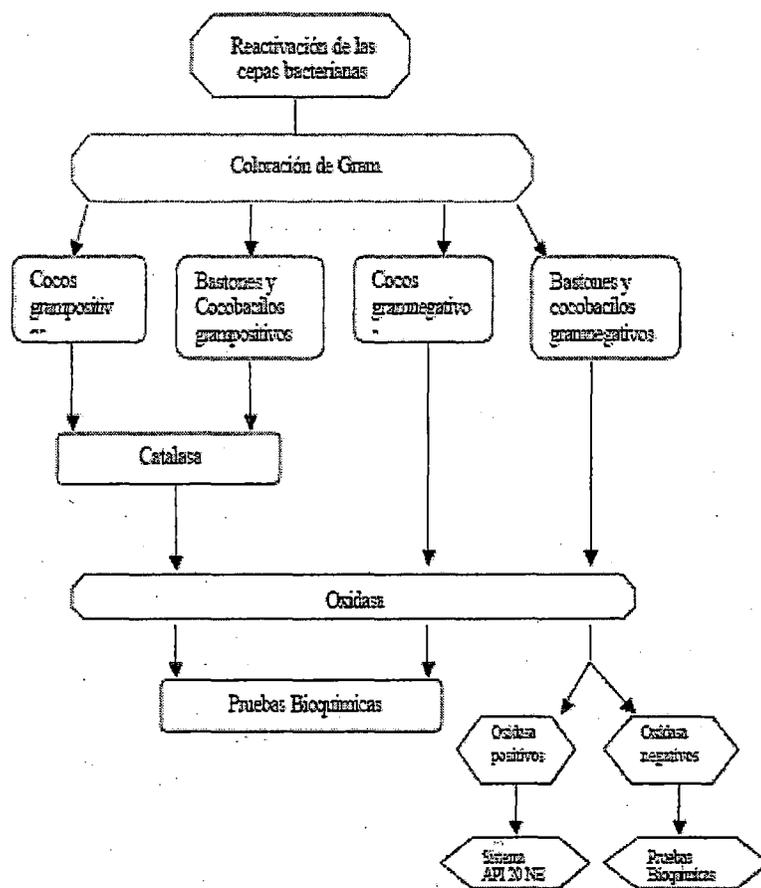


Figura 29: Identificación de bacterias oleofílicas

3.5 PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE LA BORRA (TPH) EN TERRARIOS

3.5.1 MATERIALES

a. Medios de cultivo

- Caldo Nutritivo
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- K_2HPO_4
- solución salina
- agar Nutritivo
- agar Sabouraud

b. Equipos

- Viales
- centrifuga
- pipetas estériles
- pipetas Pasteur estériles
- tubos de vidrio
- estufa
- refrigeradora
- envases de plástico

c. Otros

- Borra
- cepas aisladas en la prueba degradativa en medio BH

3.5.2 PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE CADA TERRARIO

a. Obtención de los pellets de las bacterias

Primero se realizó la reactivación de las cepas guardadas en el cepario a 4 °C, luego fueron sembradas en medio de cultivo de caldo Nutritivo por 24 horas. Seguidamente se procedió a su centrifugación por 10 minutos, por dos repeticiones, quedándose con los pellet en 5 mL de solución salina al 0.85 %.

La prueba se realizó en el Laboratorio Microbiológico de la Universidad Cayetano Heredia. Sólo se obtuvo el pellet de las bacterias por centrifugación, como se muestra en la Figura 30.

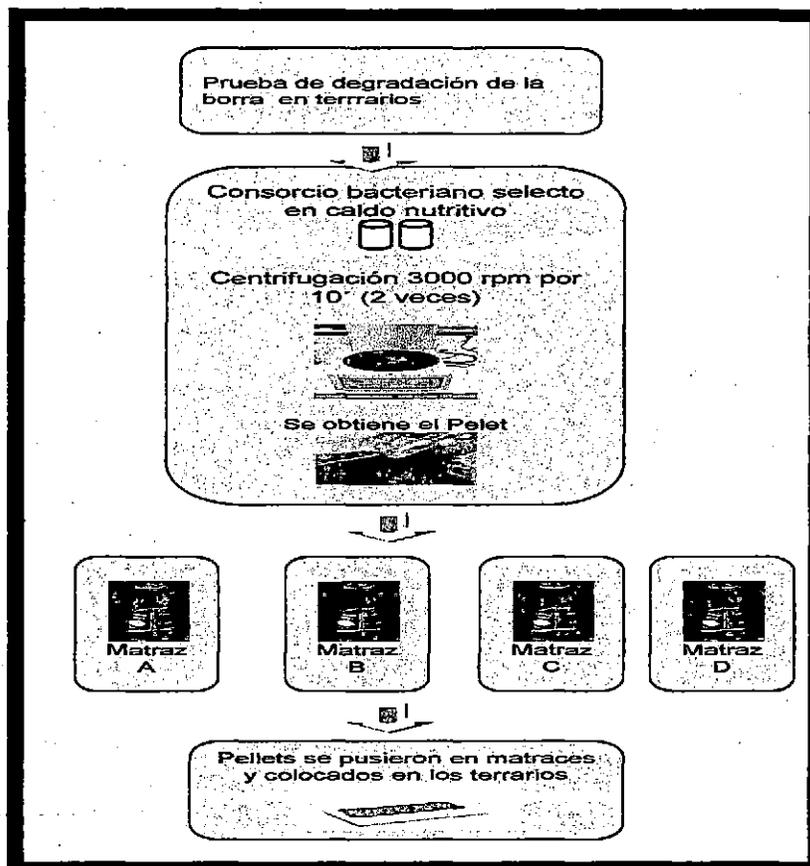


Figura 30: Procedimiento de la prueba de degradación en terrarios

b. Selección de matraces para la prueba de degradación en terrarios

Los pellets de las cepas bacterianas y de los hongos fueron colocados con solución salina en matraces de 150 mL para los terrarios que se muestra en el Cuadro 30.

Cuadro 30: Contenido de los matraces microbianos para los terrarios

Terrarios	Matraces *	Contenido de cada matraz
	(mL)	(mL)
Terrario N° 1 Control biótico	-	-
Terrario N° 1.1 Control biótico	-	-
Terrario N° 2 Control biótico	-	-
Terrario N° 2.1 Control biótico	-	-
Terrario N° 3	Matraz A	Mezcla del total de las 27 cepas bacterianas y los 12 hongos
Terrario N° 3.1		
Terrario N° 4	Matraz B	Total de las 27 cepas bacterianas
Terrario N° 4.1		
Terrario N° 5	Matraz C	13 cepas bacterianas que tuvieron alta y mediana actividad degradativa y emulsificante
Terrario N° 5.1		
Terrario N° 6	Matraz D	Los 12 hongos
Terrario N° 6.1		

* Cada matraz tiene su respectiva repetición

c. Acondicionamiento del suelo

Se acondicionaron seis terrarios en recipientes rectangulares de plástico de 10 kg de capacidad y sus respectivas repeticiones.

Se extrajo arena (sin presencia de hidrocarburo) de una zona alejada de la ubicación de las pozas de borras de la Refinería Conchán. A la arena se le realizó la caracterización del

suelo considerándose la composición, los componentes textural y se evaluó presencia de materia orgánica.

Se consideró el uso de nutrientes y agua para el aumento poblacional microbiano en presencia del hidrocarburo. Se emplearon concentraciones de nitrógeno y fósforo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 .

Se pesaron 36 kilos de suelo para 12 envases o terrarios. Para 30 kilogramos de suelo se agregó 1304 mL de solución conteniendo 132.38 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 31.49 g de K_2HPO_4 . El suelo fue cuidadosamente mezclado.

Se calcularon las cantidades de: arena, contaminante (borra), pellets, solución salina (SS) y nutrientes (N) a utilizar en la prueba. Ver Cuadro 31.

Cuadro 31: Cálculos de las cantidades de cada terrario

Numero de terrarios	Suelo (gr)	Borra (gr)	Pellet (ml)	SS (ml)	Nutrientes (ml)	Agua (ml)	
Terrario Nº 1	3000	75	0	150	0	130.4	Componente 1
Terrario Nº 1.1	3000	75	0	150	0	130.4	
Terrario Nº 2	3000	75	0	150	130.4	0	Componente 2
Terrario Nº 2.1	3000	75	0	150	130.4	0	
Terrario Nº 3	3000	75	150	0	130.4	0	Componente 3
Terrario Nº 3.1	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 4	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 4.1	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 5	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 5.1	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 6	3000	75	150	0	130.4	0	
Terrario Nº 6.1	3000	75	150	0	130.4	0	

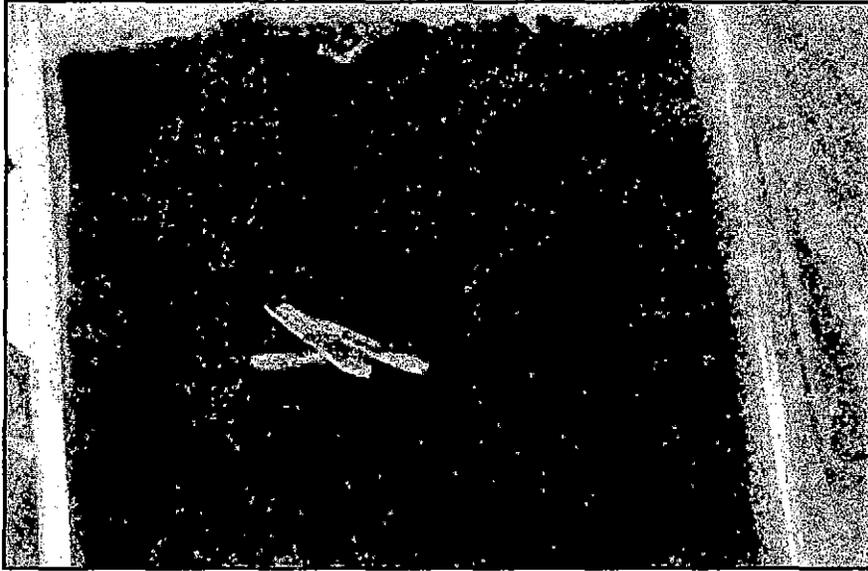
d. Esterilización del suelo con luz ultravioleta (Belloso *et al.*, 1998)

La esterilización se realizó con 24 kilogramos de arena, los cuales fueron separados en porciones de aproximadamente 4 kg y se extendieron sobre bandejas recubiertas en bolsas de polietileno de boca ancha, la arena tuvo una profundidad en la bandeja de 3 centímetros, la esterilización con luz ultravioleta (intensidad de 253 - 260 nm) se realizó a una distancia de 20 cm.

Durante treinta minutos, removiendo la arena cada quince minutos. La esterilidad de la arena se comprobó mediante una prueba de esterilidad, en la cual 5 g de suelo fueron suspendidos en solución salina estéril al 0.85 % y a partir de la suspensión se sembró en 25 mL de caldo Nutritivo y a su vez en agar Nutritivo. Luego de 24 horas de incubación se observó que no hubo crecimiento microbiano, por tanto, seguidamente de la esterilización en luz ultravioleta, el suelo fue inoculado inmediatamente para evitar cualquier contaminación.

La arena de los terrarios esterilizados fueron: terrario 3, terrario 3.1, terrario 4 y terrario 4.1, terrario 5, terrario 5.1, terrario 6 y terrario 6.1, según se muestra en el Cuadro 31.

Los terrarios fueron ubicados en un cuarto abierto de la azotea del laboratorio. Durante los tres meses que duró la prueba, cada tres días se le agregó 100 mL de agua a cada terrario y se removió manualmente para oxigenar al sistema, tratando de que el contaminante en cuestión esté en contacto con los microorganismos biorremediadores. El movimiento manual de la arena proporciona una mayor oxigenación, brindando el oxígeno que necesitan las bacterias aerobias para una mejor degradación de la borra. Ver Fotografía 8.



Fotografía 8: Suelo acondicionado en terrarios

3.5.3 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE HIDROCARBURO REDUCIDO EN CADA TERRARIOS

a. Determinación de los TPH presentes en los terrarios

Se realizó el análisis de TPH inicial y de TPH final del proceso según el método gravimétrico por el laboratorio ENVIROLAB-PERÚ S.A.C. Seguidamente se evaluó el porcentaje de hidrocarburo reducido en cada terrario.

Los resultados de TPH final fueron comparados con la normativa nacional vigente con el criterio del nivel de saneamiento de 5000 mg/kg de la Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas (DGAA - MINEM) (Dirección General de

Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas - DGAA, 1994), el cual diferencia las concentraciones de los parámetros indicadores de contaminación según el uso de suelo, para este caso se ha considerado como suelo industrial.

b. Determinación de los PAH presentes en los terrarios

Se evaluó la cantidad de PAH en una muestra de terrario para conocer la presencia de elementos aromáticos. Los PAH son contaminantes orgánicos persistentes (POP, del inglés persistent organic pollutants)), que debido a su propiedad lipofílica (la cual se incrementa según aumentan el peso y tamaño molecular) son bioacumulables. Su principal impacto en la salud humana se centra en sus propiedades genotóxicas (teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas) (Neff, 2004).

Los resultados fueron comparados con los criterios para terrenos contaminados de la normativa peruana de la DGAA.

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) dependiente de la Organización Mundial de la Salud (WHO), evaluó como probables carcinógenos humanos (Grupo 2A) a: benzo(a) antraceno, benzo(a) pireno y dibenzo(a,h) antraceno; y como posibles carcinógenos humanos (2B) a: benzo(b) fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, indeno (1,2,3c,d) pireno y naftaleno. El benzo(a) pireno es uno de los 12 compuestos prioritarios designados por la EPA de los EEUU, como contaminantes tóxicos bioacumulativos persistentes (PBT, del inglés persistent bioaccumulative and toxic).

3.6 PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE LA BORRA (TPH) CON LA TÉCNICA DE COMPOST SIN BIOAUMENTACIÓN Y CON BIOAUMENTACIÓN.

3.6.1 UBICACIÓN

Se realizó dentro de las instalaciones del taller de Conservación de Suelos y Agricultura Sostenible (CONSAS) de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

Se utilizó el sistema de compostaje abierto que es el más tradicional donde los sustratos a compostar se disponen en pilas que pueden estar al aire libre o cubiertas.

3.6.2 MATERIALES

a. Equipos de campo

- Balanza
- botas de jebe
- carretillas tipo Bugui de 90 L.
- lampas tipo cuchara
- trinche
- manguera de 20 m
- tamiz de ½ de pulgada
- tamiz de ¼ de pulgada
- manta plástica 1 mm de espesor (geomembrana)

b. Equipos de protección personal

- Guantes de jebe
- gafas de protección
- botas de hule

c. Equipos de medición

- Termómetro digital marca HANNA
- pHmetro

d. Otros

- Cañas de bambú
- estiércol de vacuno del establo de la UNALM
- mezcla de pajas y material verde
- agua potable
- borra procedente de Refinería Conchán

3.6.3 ACONDICIONAMIENTO DE LAS POZAS QUE CONTENDRÁN LAS BIOPILAS DE COMPOST

La prueba consistió en la formación de seis biopilas de compost, de las cuales la primera fue el control y a las cinco restantes se les aplicó diferentes proporciones de borra y solamente a dos de estas se les realizó el tratamiento de bioaumentación.

Se utilizó un área para la construcción de dos grandes pozas rectangulares donde se colocaron tres biopilas de compost de 1 m^3 de volumen en cada biopila.

a. Nivelación y compactación del suelo.

En el área seleccionada se preparó el suelo para poder instalar las pozas, por lo que se niveló y compactó. Se llenó de agua a cada una de las pozas para compactar el suelo. Las medidas de las pozas fueron: 2.3 m (ancho) x 8.3 m (largo) y 1.0 m de profundidad. En la Figura 31 se muestra la diagramación de la poza con las biopilas y en la Fotografía 9 la nivelación y compactación del suelo.

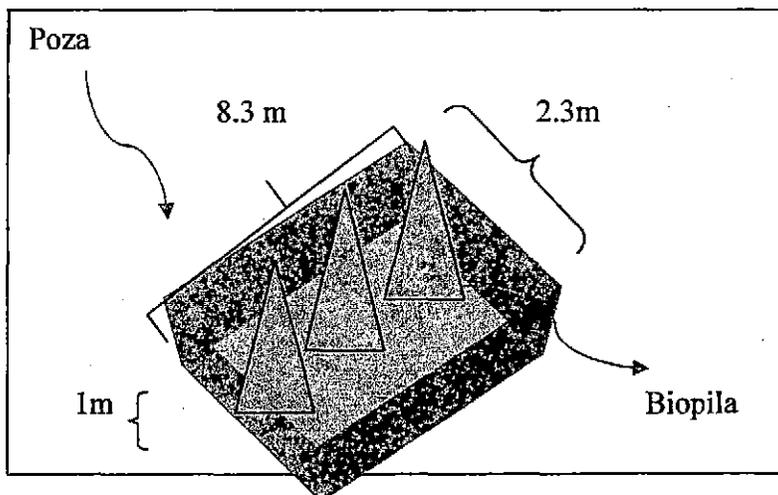


Figura 31: Diagramación de las dimensiones de las pozas para las biopilas de compost

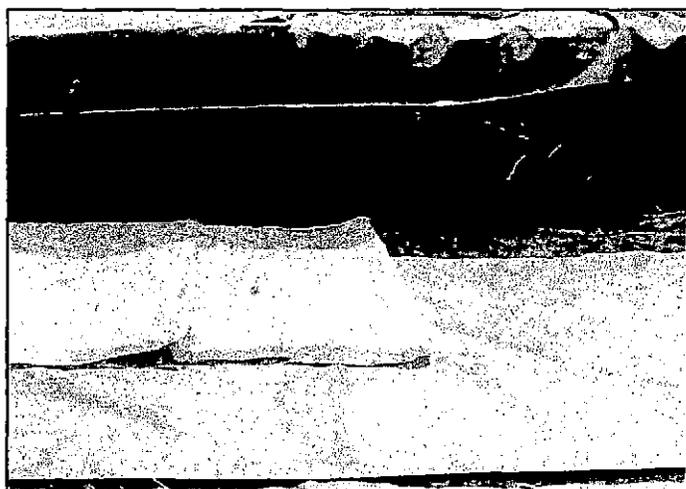
Una de las pozas fue nivelada dejando una pendiente de 12 % (1 cm de desnivel) a lo largo para que pueda existir un trabajo de lixiviados y así reutilizarlos en nuestro tratamiento.



Fotografía 9: Nivelación y compactación del suelo

b. Revestimiento de las pozas

Durante la construcción de las pozas, estas fueron revestidas con una manta plástica (geomembrana de PVC) de 1 mm de espesor para evitar la contaminación del suelo con hidrocarburos y/o metales pesados. Ver Fotografía 10.



Fotografía 10: Revestimiento de las pozas

3.6.4 COMPOSICIÓN Y CANTIDADES DEL CONTENIDO DE BIOPILA DE COMPOST

a. Caracterización del estiércol

Se hicieron análisis de composición de materia orgánica en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF) de la facultad de Agronomía de la UNALM. Ver Cuadro 32. Antes de usar el estiércol, se llevó a cabo un proceso de fermentación. Para esto se vaciaron todos los sacos de estiércol y se formó un montículo en el suelo. Se regó con agua potable y se mezcló durante una semana hasta que estuvo totalmente húmedo y homogéneo. En la Fotografía 11 se muestra el estiércol fermentado listo para armar las pilas de compostaje.

Cuadro 32: Composición del estiércol de vaca

Composición	Valor
N	2,38%
P ₂ O ₅	1,82%
K ₂ O	4,03%
CaO	5,18%
MgO	1,71%
M.O.	57,00%
Na	0,98%
pH	8,5
CE dS/m	11,22
Hd	30,50%



Fotografía 11: Estiércol fermentado listo para el compostaje.

b. Cantidad y proporciones del contenido de las biopilas

La cantidad bruta aproximada de insumos requeridos para cada biopila se presenta en el Cuadro 33.

Cuadro 33: Cantidad en kg de insumos requeridos en cada biopila de compost

Insumo	Peso por carretilla	Cantidad de carretillas	Total de insumos en kg
Estiércol de vaca	55 kg	5	275 kg
Caña	30 kg	3	90 kg
Brócoli (<i>Brassica oleracea itálica</i>)	50 kg	2	100 kg
Paja de maleza seca	34 kg	7	238 kg
Total Insumos	179 kg	17	703 kg

Se consideró una biopila de control y cinco biopilas a las que se le agregó borra en diferentes proporciones: Ver Cuadro 34.

Cuadro 34: Proporciones de borra para cada biopila

Nº de biopilas	Código de biopilas	Descripción de las biopilas	Proporción en kg de borra	Porcentaje en 1 m ³ de la biopila
1	Co	Biopila control	0	0
2	CB1	Biopila con borra y más bioaugmentación	25 kg	2.5 %
3	C1	Biopila con borra	25 kg	2.5 %
4	CB2	Biopila con borra y más bioaugmentación	50 kg	5 %
5	C2	Biopila con borra	50 kg	5 %
6	C3	Biopila con borra	75 kg	7.5 %

c. Procedimiento de armado de las biopilas de compost

Primer paso: estando ya preparadas las pozas cubiertas con geomembranas, se demarcó el área de la base de la biopila usando tallos secos de caña (tres carretillas). Esto brindó una mejor aireación durante el proceso de compostaje y favoreció la descomposición de la materia viva mediante la proliferación de bacterias aerobias termófilas, que están presentes en forma natural en cualquier lugar, seguida de la fermentación generada por otras especies de bacterias, hongos y actinomicetos (bacterias tipo moho). En la Fotografía 12 se observa el material vegetal utilizado en la formación del compost y en la Fotografía 13 se observa la borra utilizada en las pruebas de biorremediación en compost.

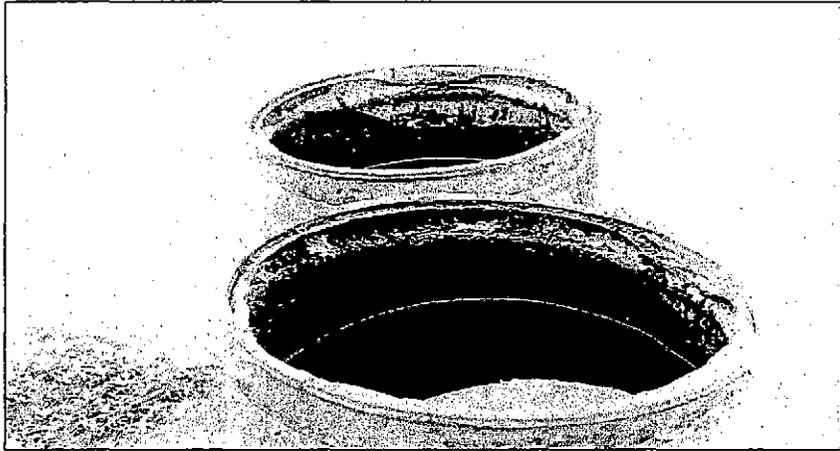
Segundo paso: se colocó en el centro de la base de la biopila un tronco de bambú, que permitió que se forme un hueco a modo de chimenea, para permitir la salida de gases que se produzcan durante el proceso de compostaje, así como el ingreso del aire al interior de la pila.

Tercer paso: inició incorporándose como base una mezcla de tres carretillas de paja seca, encima se colocó dos carretillas de estiércol y una carretilla de brócoli. Luego se agregó dos carretillas de estiércol mezclado con una parte de la borra requerida, sobre esto se colocó una carretilla de estiércol con la última cantidad de la borra. Ver Fotografía 14 y 15.

El armado de las biopilas finalizó con la adición de tres carretillas de paja hasta completar la altura de un metro. Se retiró el tronco de bambú al día siguiente del armado de la biopila. Ver Figura 32.



Fotografía 12: Material vegetal utilizado en la formación de las biopilas de compost



Fotografía 13: Borra que se utilizó en las pruebas en compost



Fotografía 14: Incorporación de borra al estiércol



Fotografía 15: Vertido de la borra

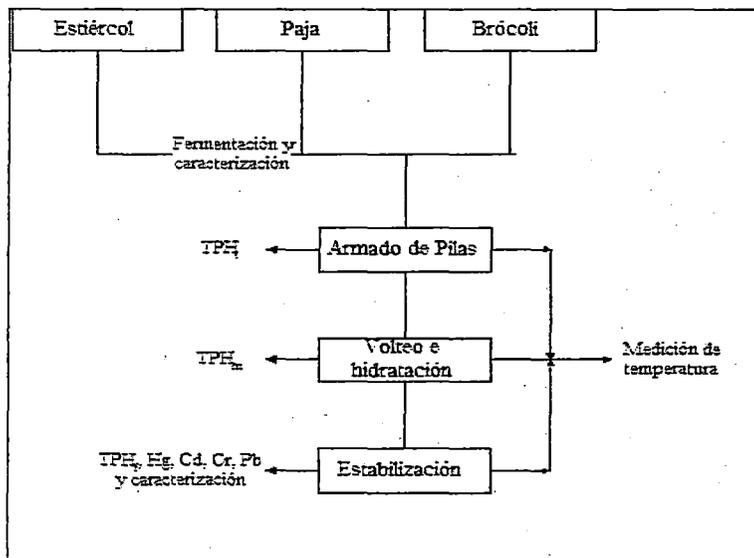


Figura 32: Diagrama de flujo del trabajo de compostaje

Luego que se encontraron formadas las biopilas, estas se humedecieron quincenalmente con un volumen total de cinco litros de agua, por aspersión. Como valor guía se mantuvo una humedad entre el 50 y 60 % de la capacidad del suelo. Ver Fotografía 16.

Las biopilas de compost fueron volteadas cada 30 días para mejorar la oxigenación y homogenización del material compostado. El momento de volteo fue determinado por el descenso de la temperatura (Sztern & Pravia, 1999). En total se realizaron tres volteos a cada pila. Ver Fotografía 17.

Mientras duró la permanencia de las borras en las biopilas de compostaje, estas fueron removidas con ayuda del personal de apoyo una vez al mes. Es así que el movimiento del material contaminado favoreció la penetración de oxígeno en los suelos, evitando su compactación, la posible producción de metano y la aparición de zonas anaerobias. Durante el movimiento del material contaminado, así como durante el retiro de los suelos ya tratados se tuvo especial cuidado de no rasgar la lámina de polietileno con la pala.



Fotografía 16: Humedecimiento de las biopilas



Fotografía 17: Volteo de las biopilas

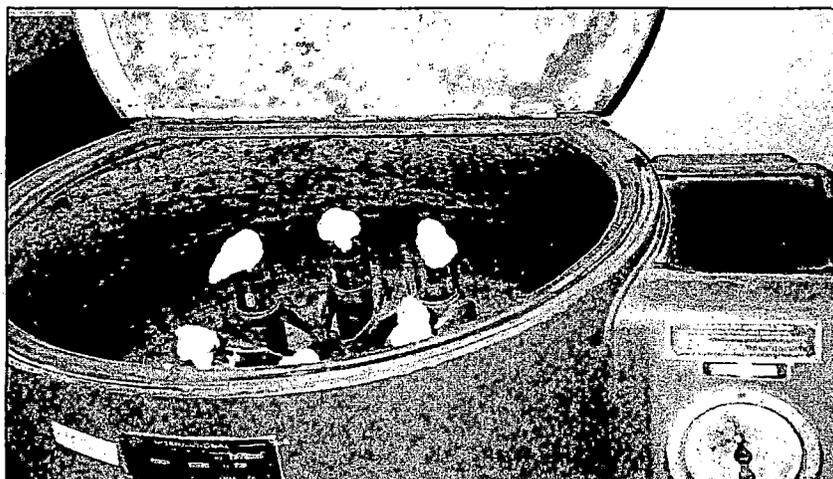
3.6.5 BIOAUMENTACIÓN

Dentro del proceso de elaboración del compost, se seleccionaron dos biopilas (CB1 y CB2) a las cuales se les agregaron las 13 cepas bacterianas que presentaron mayor actividad degradativa y emulsificante de la borra en la prueba con medio BH.

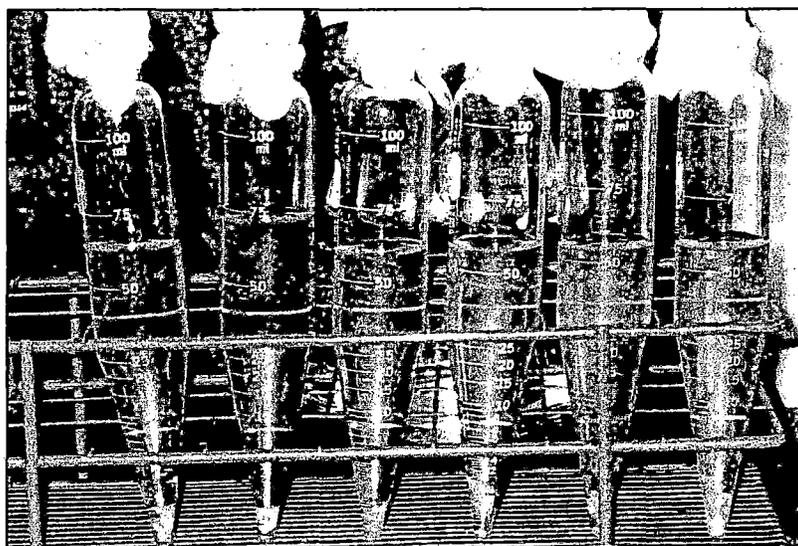
a. Preparación del material bacteriano

Se reactivaron y se sembraron las 13 cepas con bacterias y se incubaron por 24 h a 37 °C, en el laboratorio de la Universidad Ricardo Palma. Se siguió el mismo procedimiento para la obtención de pellets que fue desarrollado en la prueba de degradación del hidrocarburo en terrarios, con la diferencia que se preparó mayor material bacteriano. Se obtuvo 384.61 mL de cada cepa bacteriana en solución salina en el laboratorio de la Refinería Conchán. En la Fotografía 18 se observa la centrifugación de las bacterias y en la Fotografía 19 los pellets

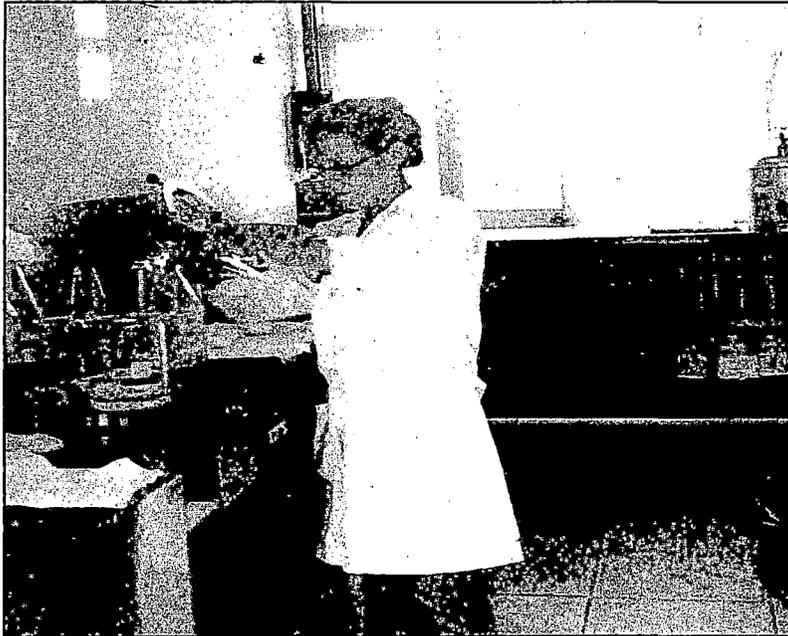
obtenidos después de la centrifugación. En la Fotografía 20 se muestra la preparación del material bacteriano para ser luego distribuido a la biopila de compost correspondiente.



Fotografía 18: Centrifugación del consorcio bacteriano



Fotografía 19: Obtención de los pellets



Fotografía 20: Preparación del material bacteriano destinado para la bioaumentación en compost

b. Incorporación del consorcio bacteriano al compost

Se realizó el volteo del material orgánico contenido en la biopila. Ver Fotografía 21 (Volteo de las biopilas CB1 y CB2). Transcurrido un mes se realizó la inoculación del consorcio bacteriano a la biopila CB1 y a la biopila CB2. Los resultados estuvieron en función a la medición de la temperatura, pH para la obtención del compost, población bacteriana y la degradación de TPH en cada biopila con bioaumentación y sin bioaumentación.

En la Fotografía 22 se observa la incorporación del consorcio bacteriano a las biopilas CB1 y CB2. Consecuentemente se regaron las biopilas para controlar la humedad durante el proceso de volteo y evitar que los microorganismos sean impactados. Ver Fotografía 23. Asimismo, se volvió a colocar la caña de bambú en la biopila para mantener aireado el sistema

de compostaje y al cumplir los 120 días que duró la prueba. Se observó que el material que compone el compost ya se encontraba descompuesto y de color marrón oscuro. Suponiendo una aceleración de la descomposición de los hidrocarburos.



Fotografía 21: Volteo de las biopilas CB1 y CB2



Fotografía 22: Incorporación del consorcio bacteriano a la biopila



Fotografía 23: Regado de la biopila

3.6.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE INTERVINIERON EN EL PROCESO DEL COMPOST

a. Evaluación poblacional bacteriana

La evaluación poblacional se realizó para conocer la dinámica poblacional en determinadas biopilas. La evaluación consistió en la cuantificación de bacterias por el método de recuento de placas. Lo cual permitió contar el número de bacterias del compost, suspendiendo un peso conocido de la muestra en un disolvente estéril hasta la dilución $1: 10^4$ UFC/g.

b. Evaluación de la temperatura

Se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos con el propósito de establecer diferencias en las propiedades analizadas en ambos sitios con el parámetro de temperatura. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de diferencias significativas en las propiedades medidas.

Se midió la temperatura con un termómetro digital marca HANNA semanalmente, la temperatura ambiente al medio día y la temperatura de las pilas en tres puntos del núcleo de cada pila formando un triángulo equilátero. Para tomar la temperatura se utilizaron guantes quirúrgicos largos (hasta el hombro) y encima un guante de cuero (hasta el codo). También se usaron mascarillas descartables como medida de seguridad.

c. Evaluación del pH

Se realizó la medición mediante el método de laboratorio de pasta saturada. Se pesó 10 g del suelo en un vaso de 100 mL, adicionándose 20 mL de agua destilada, para luego agitar la mezcla durante 30 minutos y dejarla reposar por otros 30 minutos, acto seguido se realizó la lectura del pH en el potenciómetro sumergiendo el electrodo (Bazán, 1996).

d. Evaluación del TPH

Se realizaron tres evaluaciones del TPH al segundo mes de las construcciones de las biopilas en uno de los volteos (TPH inicial), un análisis al tercer mes y al cuarto mes el análisis de TPH final (compost formado). Las muestras fueron caracterizadas de forma gravimétrica y cromatográfica en el laboratorio ENVIROLAB-PERÚ S.A.C. (método analítico EPA 8015).

Los resultados de TPH fueron comparados con la normativa nacional vigente con el criterio del nivel de saneamiento de 5000 mg/kg de la DGAA (DGAA, 1994), y los estándares de Canadian Environmental Quality Guidelines, que diferencian las concentraciones de los parámetros indicadores de contaminación según el uso de suelo, para este caso se ha considerado como suelo industrial.

IV. RESULTADOS

4.1 DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA BORRA Y EL SUELO CONTAMINADO

4.1.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA BORRA

Se menciona a continuación los resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al hidrocarburo presente en las dos pozas, con el objetivo de conocer las propiedades del hidrocarburo, en relación a su fluidez, sedimentos y nivel de hidrocarburo. Los análisis fueron ejecutados en el laboratorio fisicoquímico de la Refinería Conchán.

a. Fluidez

Se presentan las características de fluidez del hidrocarburo, lo cual calificó al hidrocarburo como pesado. Ver Cuadro 35.

Cuadro 35: Característica de fluidez del hidrocarburo (borra)

Fluidez	Poza 1		Poza 2	
	Superficie	Profundidad	Superficie	Profundidad
API (60°F)	19.6	19.3	17	18.7
Gravedad específica (60/60°F)	0.936	0.938	0.952	0.942
Viscosidad a 50°C, cSt	485.4	534.183	478.681	534.46

b. Viscosidad

Considerándose el parámetro de viscosidad del hidrocarburo, se observó mayor viscosidad en la profundidad de las pozas que en la zona de superficie.

c. Grados API

De acuerdo a la Escala de clasificación por gravedad API, el hidrocarburo contenido en las dos pozas estuvo en promedio de 17 a 19 grados API, por tanto la composición aproximada fue de un hidrocarburo pesado. Cuanto más alto es el grado API, es más ligero y su calidad es mucho mejor. Ver Figura 33.

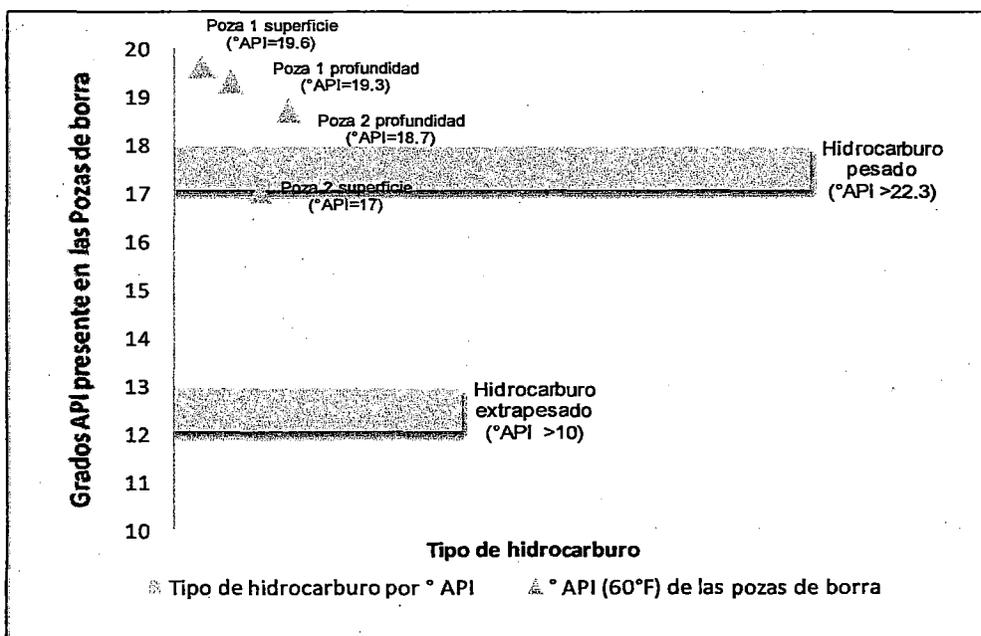


Figura 33: Determinación del tipo de hidrocarburo según el grado API de cada poza con borra

d. Composición y contaminantes

Se presentan la composición del hidrocarburo en el Cuadro 36.

Cuadro 36: Composición y contaminantes del hidrocarburo

Composición:	Poza 1		Poza 2	
	Superficie	Profundidad	Superficie	Profundidad
Sedimentos (por extracción), % masa	4.5	4	3	2
Azufre total, % masa	1.04	0.93	0.99	0.95
Contaminantes:				
Agua (por destilación), % masa	4.6	6	4.2	4.5
Metales:				
Silicio (ppm)	176.32	195.86	105.79	105.86
Níquel, ppm	59.38	57.72	63.43	51.53
Vanadio, ppm	11.45	10.02	10.17	9.02
Aluminio, ppm	68.11	62.97	38.74	39.16
Otros				

En el Cuadro 34 se observó que la cantidad de agua y sedimentos en la borra fue alta. Asimismo se registró alto porcentaje en azufre (% masa); y los metales pesados como el níquel, vanadio, sílice y aluminio se presentaron en menor cantidad. Los resultados de laboratorio de los análisis realizados para evaluar la composición de metales del hidrocarburo se presenta en el Anexo 1.

e. Nivel de asfalteno

Se presenta el nivel de asfalteno de la borra en el Cuadro 37.

Cuadro 37: Nivel de asfalto presente en la borra

Nivel	Poza 1		Poza 2	
	Superficie	Profundidad	Superficie	Profundidad
De asfalto, % masa	14.325	20.37	19.2	25.48

Las borras presentaron alto porcentaje de asfaltos con valores que van entre un 14 a 25 %. La mayor cantidad de asfaltos está en la parte profunda de la poza que hace que el hidrocarburo sea más viscoso, en comparación con el hidrocarburo en la superficie. También existe un 68 a 76 % de otros subproductos como por ejemplo los maltenos que puede contener la borra.

f. Característica de TPH en la borra

Se obtuvieron los resultados cromatográficos y gravimétricos del hidrocarburo de la poza 1, a través de los análisis realizados por el laboratorio ENVIROLAB. Se observó, según los resultados, que la borra estuvo conformada por hidrocarburo pesado. Ver Cuadro 38.

Cuadro 38: Resultados de TPH en la muestra de 1 kg de borra, mediante dos métodos

Métodos – TPH (mg/kg)	Poza 1		
	Zona de superficie	Media profundidad	Fondo de la poza
Gravimétrico	302188	401268	382006 (38 %)
Cromatográfico	268676	257186	151495 (15 %)

Se observó mayor cantidad de hidrocarburo total en los análisis gravimétricos, ya que se determinó según el peso específico del líquido, este análisis cuantitativo es menos específico que el cromatográfico, según el Instituto Mexicano del Petróleo. Los resultados de laboratorio de los análisis realizados para evaluar hidrocarburos totales se presentan en el Anexo 2.

4.1.2 CARACTERÍSTICA DE TPH EN EL SUELO

El laboratorio ENVIROLAB realizó los análisis de hidrocarburos totales (mg/kg), de los cuales se obtuvieron los resultados cromatográficos y gravimétricos. Ver Cuadro 39.

Cuadro 39: Resultados del análisis de la arena alrededor de la poza 1 de borra

Resultados	Arena en superficie	Arena a 2.10 metros de profundidad
Hidrocarburos totales extraíbles (mg/kg)	No detectable	79
pH del suelo	7.8	8.0

Se identificó que a 2.10 m de profundidad de la poza 1 de borra, la arena contuvo 79 mg/kg de hidrocarburo total, mediante el análisis cromatográfico, lo cual indicó presencia de una pequeña cantidad de hidrocarburo liviano o aceite en el suelo. El pH de la arena a superficie y a profundidad fue básico. Los resultados de laboratorio de los análisis realizados para evaluar hidrocarburo total de petróleo en la arena se presenta en el Anexo 3.

4.2 DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL RECuento Y CARACTERIZACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO AISLADO DE LAS POZAS DE BORRA.

4.2.1 PRIMER RECuento DE BACTERIAS CON DILUCIÓN 1:10³ EN MEDIO TSA.

Se observa en la Figura 34 que para el primer recuento de bacterias se presentó una dinámica poblacional de 1.89×10^5 UFC/g hasta 2.50×10^5 UFC/g en la muestra de borra líquida.

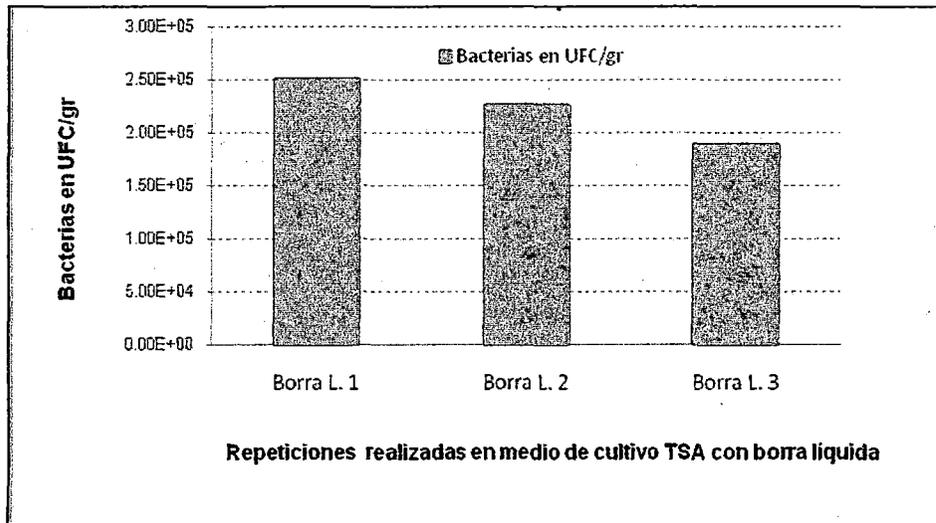


Figura 34: Dinámica poblacional de las cepas bacterianas proveniente de la muestra de borra líquida

Se observa en la Figura 35 que para el primer recuento de bacterias se presentó una dinámica poblacional de 1.51×10^5 UFC/g hasta 1.93×10^5 UFC/g en la muestra de borra sólida.

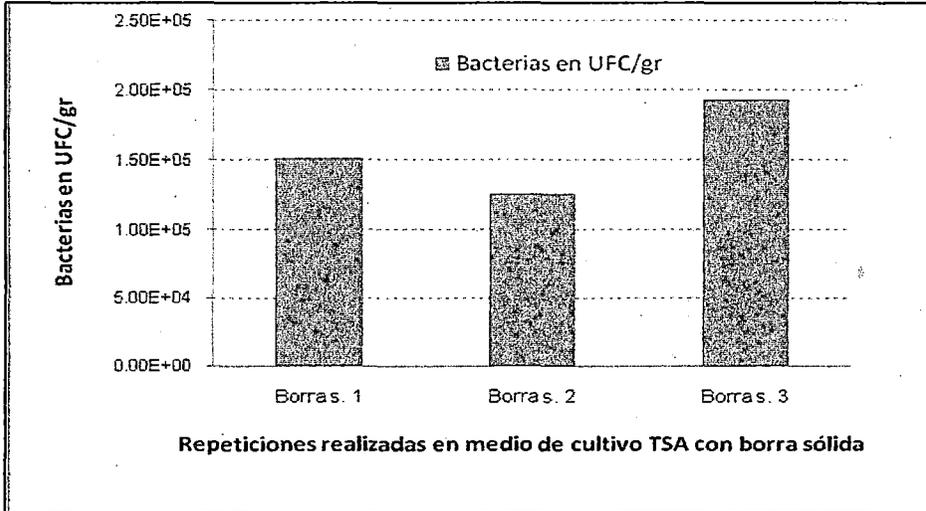


Figura 35: Dinámica poblacional de las cepas bacterianas proveniente de la muestra de borra sólida

Se observa en la Figura 36 que la muestra de borra sólida presento un mayor coeficiente de variación (CV= 22%) que implica mayor heterogeneidad de bacterias extraídas, sobre las obtenidas (CV=14%) en la muestra de borra líquida.

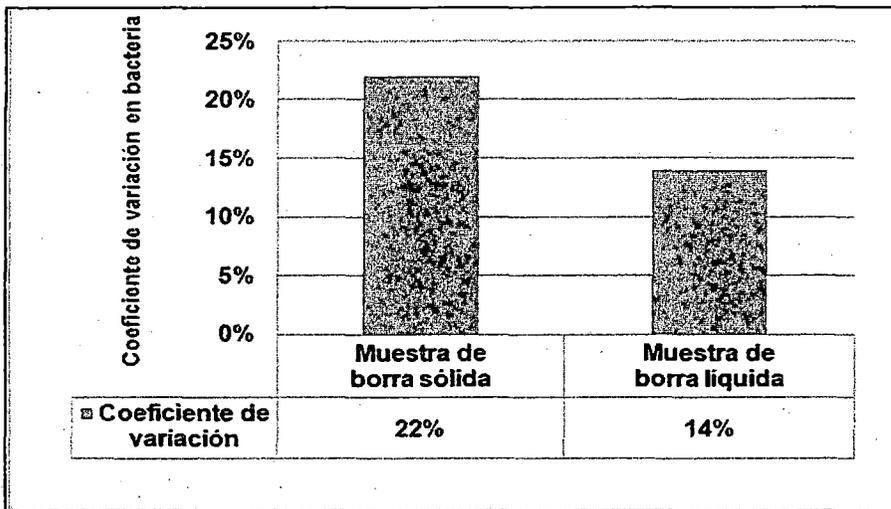


Figura 36: Coeficiente de variación del primer recuento de bacterias en borra sólida y líquida

4.2.2 PRIMER RECUENTO DE HONGOS CON DILUCIÓN 1:10³

Se muestra en la Figura 37 los resultados del primer recuento de hongos en medio Sabouraud en muestra de borra con arena. Se observa que para el primer recuento de hongos, se presentó una dinámica poblacional de 3.00×10^4 UFC/g hasta 6.00×10^4 UFC/g en la muestra de borra.

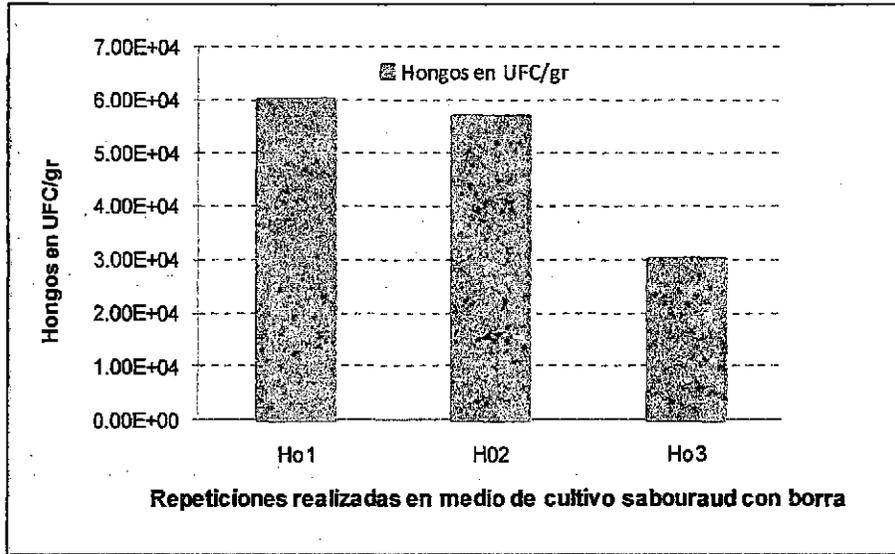


Figura 37: Dinámica poblacional de las cepas hongos proveniente de la muestra de borra

Se observa en la Figura 38 el valor medio obtenido del primer recuento de hongos de la muestra de borra que fue de 4.90×10^4 UFC/g, el cual se encuentra en un intervalo de $8.14 \times 10^4 \pm 1.66 \times 10^4$ UFC/g.

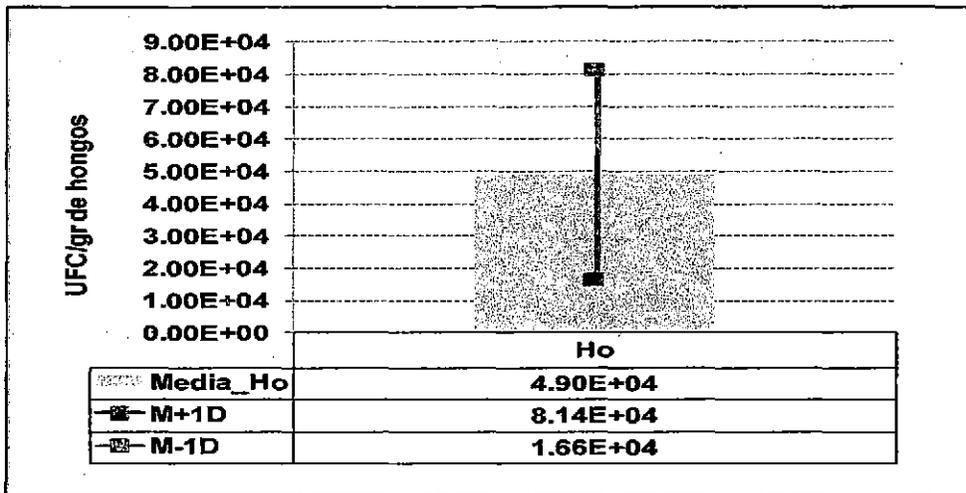


Figura 38: Registro del primer recuento de hongos en UFC/g

4.2.3 SEGUNDO RECUENTO DE BACTERIAS CON DILUCIÓN 1:10⁴ EN MEDIO TSA

Se observa en la Figura 39 que para el segundo recuento de bacterias una dinámica poblacional en la muestra de borra líquida de 1.00×10^5 UFC/g hasta 1.83×10^6 UFC/g.

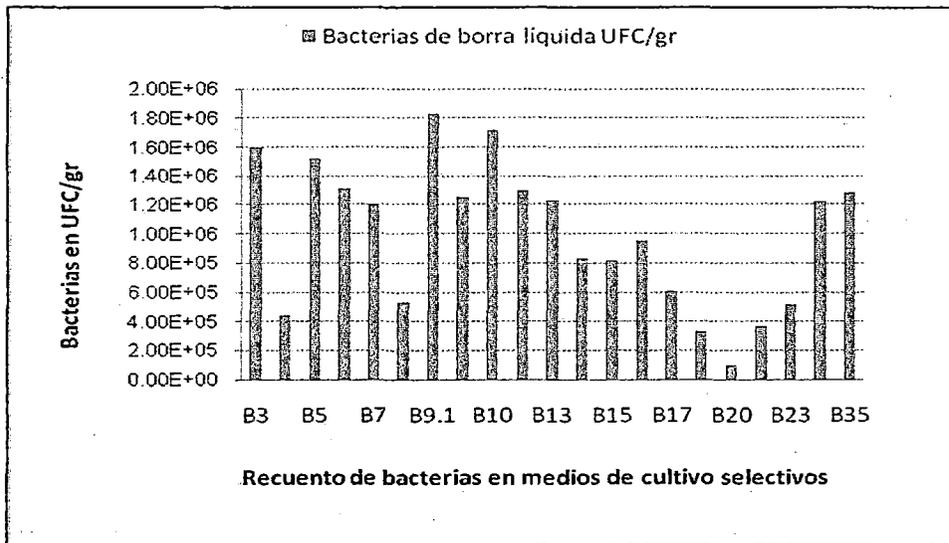


Figura 39: Dinámica poblacional de las cepas bacterianas proveniente de la muestra de borra líquida.

En la Figura 40 se muestra para el segundo recuento de bacterias una dinámica poblacional en la muestra de borra sólida de 7.30×10^5 UFC/g hasta 1.74×10^6 UFC/g.

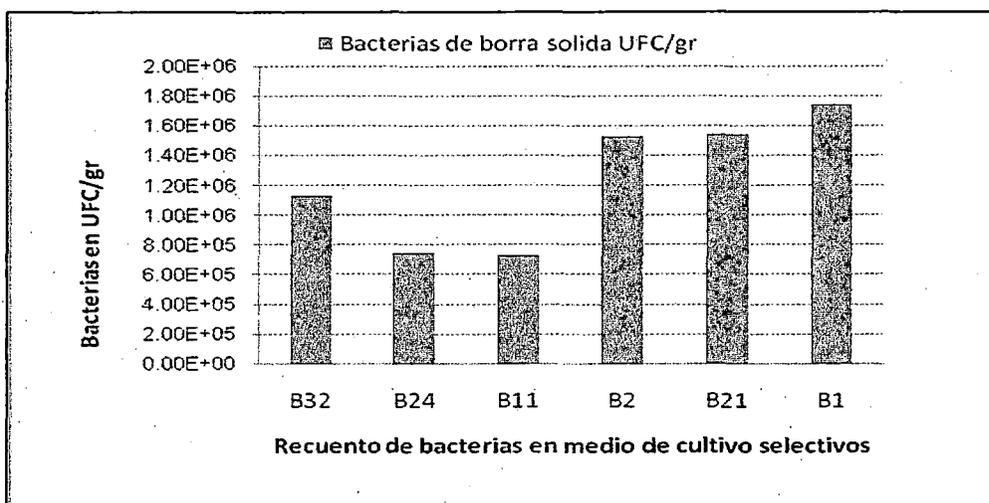


Figura 40: Dinámica poblacional de las cepas bacterianas proveniente de la muestra de borra sólida

En la Figura 41 se muestra que la muestra de borra líquida presentó un mayor coeficiente de variación (CV= 50 %) que implica mayor heterogeneidad de bacterias extraídas, sobre las obtenidas (CV=35 %) en la muestra de borra sólida.

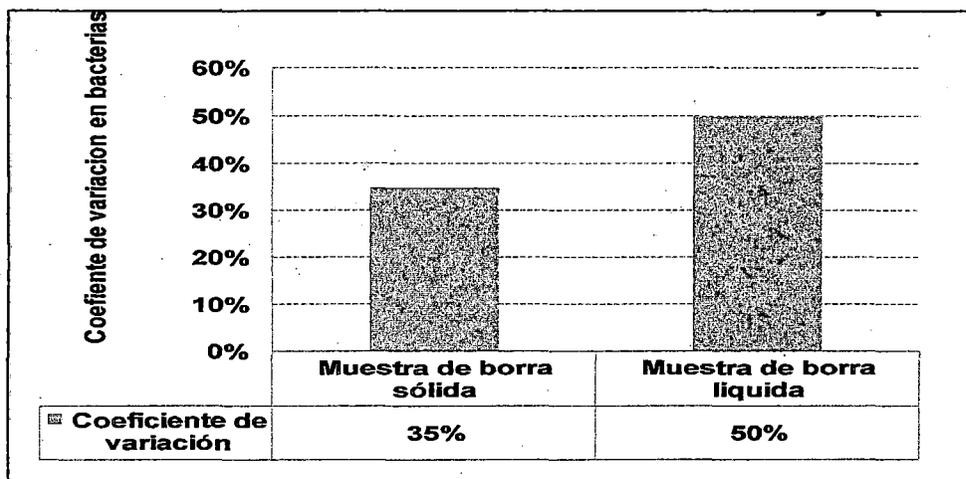


Figura 41: Coeficiente de variación del segundo recuento de bacterias

4.24 RECUENTO DE HONGOS CON DILUCIÓN 1:10⁴

En la Figura 42 se muestra el recuento de hongos en UFC/g en medio Sabouraud. El valor medio que se obtuvo del segundo recuento de hongos de la muestra de borra con arena es 3.49×10^5 UFC/g, el cual se encontró en un intervalo de $6.34 \times 10^5 \pm 6.45 \times 10^4$ UFC/g.

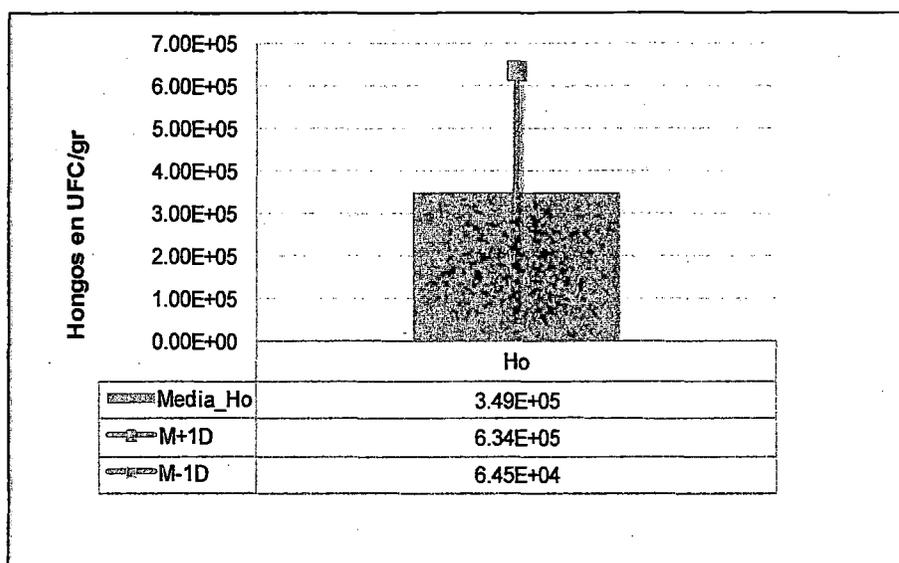


Figura 42: Segundo recuento de hongos en UFC/g en medio Sabouraud

4.2.5 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BACTERIAS

a. Evaluación morfológica microscópica

De las 27 cepas bacterianas aisladas, se determinó el porcentaje de bacterias positivas y negativas según coloración Gram y el porcentaje de la evaluación morfológica de las mismas.

En la Figura 43 se registra 20 bacilos Gram negativos (74 %) y cinco bacilos Gram positivos (19 %) y dos coco Gram positivos (7 %). En el caso de los hidrocarburos, las bacterias Gram negativas se encontraron más adaptadas a tales fuentes de carbono (Venosa *et al.*, 1999).

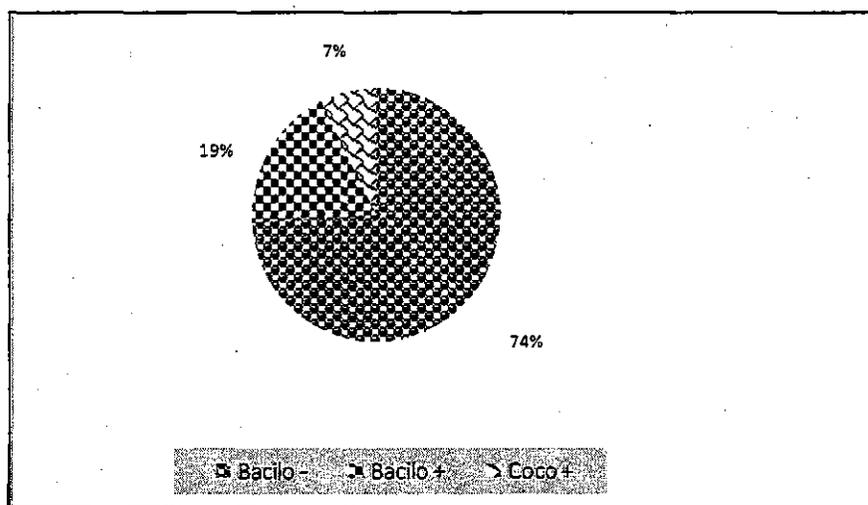


Figura 43: Porcentaje de bacterias por su coloración Gram

En la Figura 44 se muestra lo que se registró al observar las bacterias coloreadas a través del microscopio. Se registra mayor presencia de bacterias en forma de bacilo. Se observó 12 bacilos (44,4 %), siete diplobacilos (25,9 %), estreptobacilos (14,8 %), cocobacilos (3,7 %), bacilos en empalizada (3,7 %), tétradas (3,7 %) y diplococos (3,7 %).

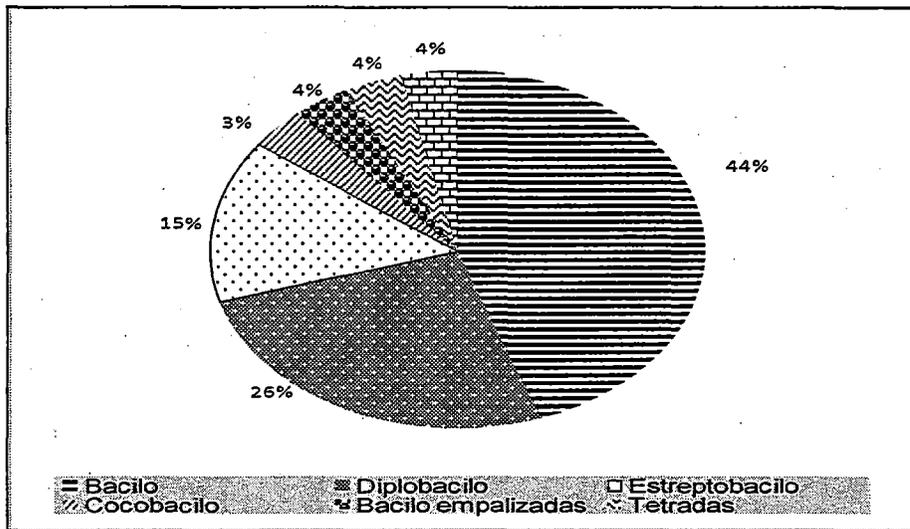


Figura 44: Identificación del tipo morfológico de las bacterias

b. Evaluación macroscópica

La mayoría de las cepas bacterianas presentaron coloración blanquecina, cremosa de forma irregular, mayormente plana, lisa y granular. Sólo se registraron seis cepas bacterianas de color anaranjado, tres cepas de color marrón, una cepa de color amarillo y una cepa de color rojo.

c. Según las pruebas bioquímicas

Se determinó que las bacterias aisladas de las tres muestras de borra, no se encontraban dentro del grupo de enterobacterias.

4.2.6 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LOS HONGOS

a. Según la característica morfológica a nivel macroscópico y microscópico

Se observa en el Cuadro 40 la caracterización morfológica a nivel macroscópico y microscópico de seis cepas de hongos que fueron identificados según género taxonómico.

Cuadro 40: Resultados de las características morfológicas de los hongos

Característica macroscópicas	Característica microscópica	Division	Esporas asexuales	Esporas sexuales	Micelo	Genero	Codigo de cepas
Las colonias h38 y h39 de color plomo a grisáceo; blanco en los borde y con esporangios negros; con franja blanca; filamentosa; reverso de color blanco a incoloro; textura algodonosa. Luego con crecimiento aereo abundante que llega hasta el borde de la placa. La colonia h33 de color blanco; con franja blanca; filamentosa; reverso blanco a incoloro; textura algodonosa.	Esporangios esfericos; cenociticas color oscuro y rizoide color oscuro	hifa color Zygomycota	Endógena (en sacos)	Zigosporas	Cenocítico o no septado	Rhizopus	h33, h38 y h39
Colonia h28 y h36 de color verde petroleo con franja blanca; micelio blanco; reverso color verde; textura aterciopelado pulverulento; con surcos radiales. La colonia h30 con coloración marron con verde grisáceo; micelo blanco; reverso marron con verde; textura aterciopelada; con surcos.	Cabezas conidiales biseriado y predominantemente radial. Hifa tabicada	Ascomicota	Exógenos En las puntas o lados de la hifas	Ascoesporas	Septado	Aspergillus	h28, h36 y h30

4.3 RESULTADO DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD DEGRADATIVA EN CULTIVO BH

4.3.1 ACTIVIDAD DEGRADATIVA Y EMULSIFICANTE UTILIZANDO 50 uL DE CEPAS BACTERIANAS

Se evaluó la actividad degradativa inoculando 50 uL de cepas bacterianas al medio de cultivo BH con borra y luego a las que presentaron mayor degradación se les evaluó su actividad emulsificante. Ver Figura 45.

En la figura 45 se observa que inoculando 50 uL de cepas bacterianas se obtuvieron cepas con baja actividad degradativa y actividad emulsificante del hidrocarburo. Entre las cepas registradas seis cepas (cepa B9.2, cepa B1, cepa B9.1, cepa B2, cepa B35 y cepa B5), sólo presentaron un periodo de actividad degradativa.

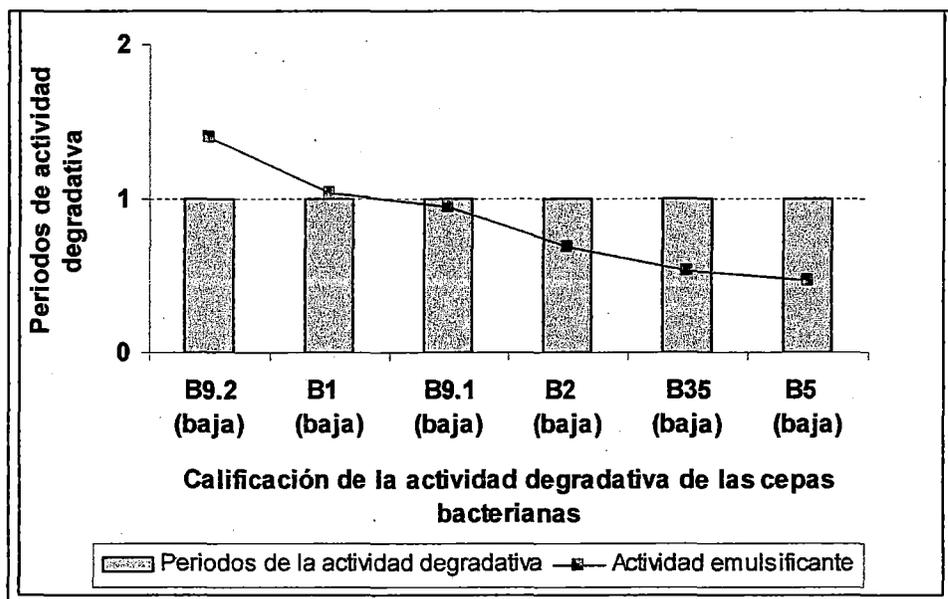


Figura 45: Relación de la actividad emulsificante en las bacterias (50 uL) con mayor actividad degradativa

4.3.2 ACTIVIDAD DEGRADATIVA Y EMULSIFICANTE UTILIZANDO 100 uL DE CEPAS BACTERIANAS

Se evaluó la actividad degradativa inoculando 100 uL de cepas bacterianas al medio de cultivo BH con borra y luego a las que presentaron mayor degradación se les evaluó su actividad emulsificante. En la Figura 46 se observa que a mayor actividad degradativa hay mayor actividad emulsificante. Para la prueba se inoculó 100 uL de cepas bacterianas al medio de cultivo BH con borra y se obtuvo mayor actividad degradativa y emulsificante del hidrocarburo en: cuatro cepas bacterianas (cepa B9.2 con 1.397 UAE/mL; cepa B1 con 1.029 UAE/mL; cepa B9.1 con 0.936 UAE/mL y cepa B15 con 0.909 UAE/mL). También se observó que nueve cepas obtuvieron una mediana actividad degradativa y fue decreciendo su actividad emulsificante (cepa B2, cepa B35, cepa B5, cepa B12, cepa B7, cepa B24, cepa B14, cepa B10 y cepa B11). Los resultados de laboratorio de la evaluación de la actividad emulsificante de las cepas bacterianas se presenta en el Anexo 4.

Estas 13 cepas bacterianas fueron consideradas como el “Consortio bacteriano selecto” y utilizadas para las pruebas de degradación de borra en terrarios y la prueba de degradación de borra en compost sin bioaumentación y compost con bioaumentación.

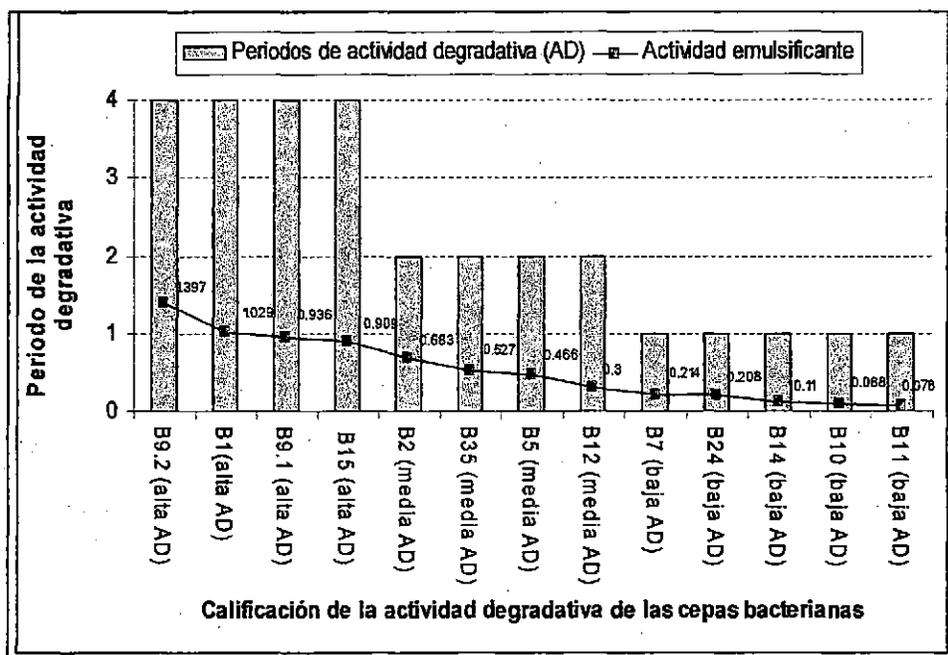


Figura 46: Relación de la actividad emulsificante en las bacterias (100 uL) con mayor actividad degradativa

4.3.3 ACTIVIDAD DEGRADATIVA EN HONGOS

Solo se evaluó la actividad degradativa en hongos y no se realizó la prueba de actividad emulsificante. En la Figura 47 se observa que seis hongos (H27, H28, H29, H30, H31 y H39) presentaron una calificación de baja actividad degradativa debido a que presentaron sólo un periodo del proceso de desarrollo de la actividad degradativa y seis hongos presentaron una calificación de nula actividad degradativa puesto que no presentaron reacción degradativa del hidrocarburo en el medio BH.

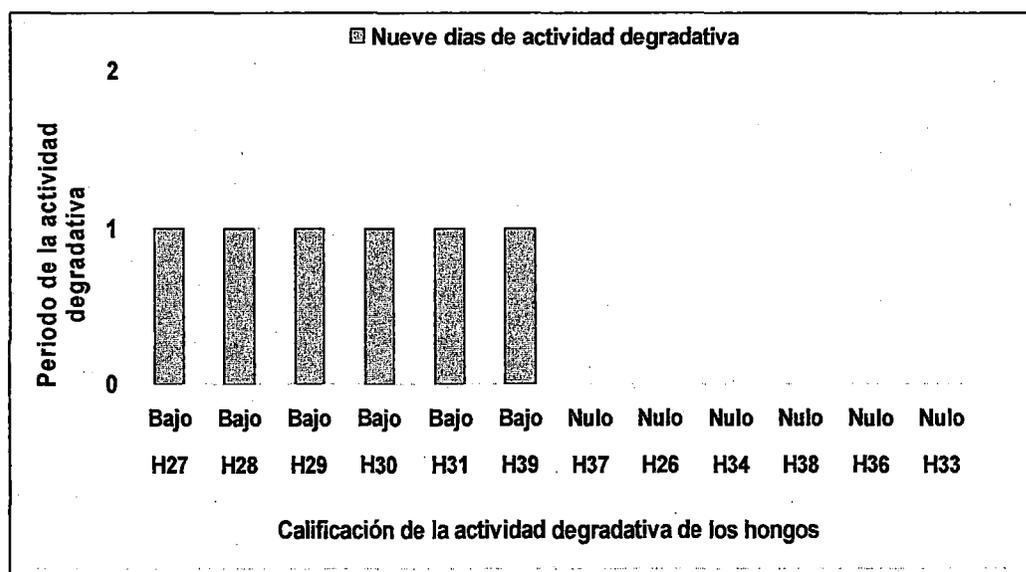


Figura 47: Resultados de la evaluación de la actividad degradativa en los hongos

4.3.4 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON LA TÉCNICA DE ANÁLISIS API 20 NE

Con el uso de la técnica de análisis API 20 NE se identificaron cuatro bacterias según especies taxonómicas, ver Cuadro 41. Los resultados de laboratorio determinaron cuatro especies de bacterias. Las fichas API 20 NE se presentan en el Anexo 5.

Se determinó la actividad emulsificante de las bacterias identificadas según su taxonomía, ver Figura 48.

Cuadro 41: Bacterias identificadas mediante la técnica API 20 NE

Nº de placa	Especies de bacterias	Actividad emulsificante UAE/mL	Actividad degradativa
B1	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>masoucida</i> / <i>achromogenes</i>	1.029	Alta
B9.2	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1.397	Alta
B15	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	0.909	Alta
B5	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.466	Mediana
B35		0.527	Mediana

En la Figura 48 se presenta la actividad emulsificante en hidrocarburo de las cepas que fueron identificadas taxonómicamente. Tres cepas se encontraron dentro de las cepas que presentaron alta actividad emulsificante (cepa B1, cepa B9.2 y la cepa B15); y dos cepas bacterianas (cepa B5 y la cepa B35) presentaron mediana actividad emulsificante en hidrocarburo.

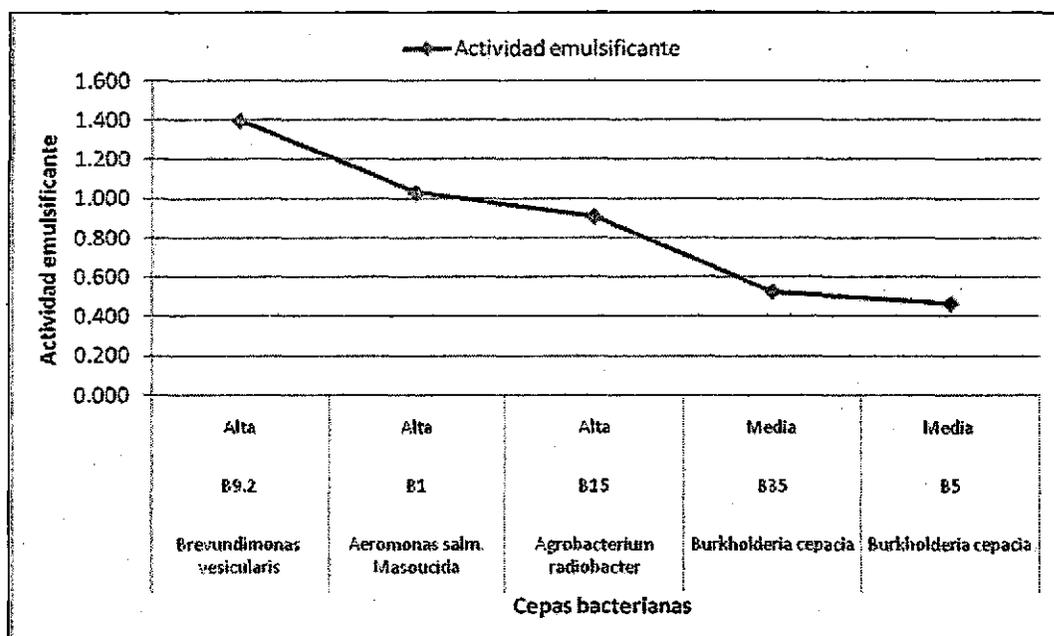


Figura 48: Representación de la actividad degradativa y emulsificante en las bacterias identificadas por la prueba API 20 NE

4.4 RESULTADO DE LA DEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN TERRARIOS

4.4.1 CONSUMO DE LA ARENA SEGÚN EL PESO EN GRAMOS DE LOS TERRARIOS

Al peso inicial total de la arena de cada terrario se extrajo el 5 % y se obtuvo un peso inicial de 3187.63 g de suelo preparado. Teniendo en cuenta el peso final de la arena en cada terrario se obtuvo el consumo de arena final. Ver Cuadro 42.

Cuadro 42: Consumo de arena final en cada terrario

Tratamientos	Peso de la arena		Consumo de arena
	Peso inicial de la arena	Peso final de la arena	
T1	3187.63	2970	217.63
T1.1	3187.63	2990	197.63
T2	3187.63	2925	262.63
T2.1	3187.63	2980	207.63
T3	3187.63	2950	237.63
T3.1	3187.63	2900	287.63
T4	3187.63	2700	487.63
T4.1	3187.63	2925	262.63
T5	3187.63	2800	387.63
T5.1	3187.63	2780	407.63
T6	3187.63	2900	287.63
T6.1	3187.63	2775	412.63

4.4.2 PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE HIDROCARBURO EN CADA TERRARIO

Teniendo el TPH inicial y TPH final de las muestras de terrarios evaluadas se determinó el porcentaje de remoción del hidrocarburo, ver Cuadro 43.

En la Figura 49 se presenta la cantidad de TPH final (g/kg) para cada terrario comparados con la normativa peruana de los límites de aceites y grasas (5.0 g/kg) para terrenos contaminados según el Ministerio de Energía y Minas de Perú. Asimismo se determinó el porcentaje de remoción de TPH en suelo para cada terrario. Los resultados de laboratorio de los análisis realizados para evaluar hidrocarburo total en terrarios se presenta en el Anexo 6.

Cuadro 43: Remoción en porcentaje del hidrocarburo

Tratamientos	Peso de la arena		Evaluación TPH			
	Peso inicial de la arena	Peso final de la arena	TPH final (g/kg)	TPH inicial (g/kg)	TPH final (g/kg)	Porcentaje remoción de TPH
Terrario N° 1	3187.63	2970	3.64	27.14	10.81	60
Terrario N° 1.1	3187.63	2990	3.73	27.14	11.15	59
Terrario N° 2	3187.63	2925	3.16	27.14	9.24	66
Terrario N° 2.1	3187.63	2980	3.49	27.14	10.40	62
Terrario N° 3	3187.63	2950	2.48	27.14	7.32	73
Terrario N° 3.1	3187.63	2900	2.76	27.14	8.00	71
Terrario N° 4	3187.63	2700	2.60	27.14	7.61	72
Terrario N° 4.1	3187.63	2925	2.62	27.14	7.66	72
Terrario N° 5	3187.63	2800	2.00	27.14	5.60	79
Terrario N° 5.1	3187.63	2780	2.42	27.14	6.73	75
Terrario N° 6	3187.63	2900	3.22	27.14	9.34	66
Terrario N° 6.1	3187.63	2775	2.27	27.14	6.30	77

En la Figura 49 se observa que el mayor porcentaje de remoción de TPH se registró en los terrarios T5 (79 %) y T5.1 (75 %), los cuales fueron inoculados con el consorcio bacteriano selecto.

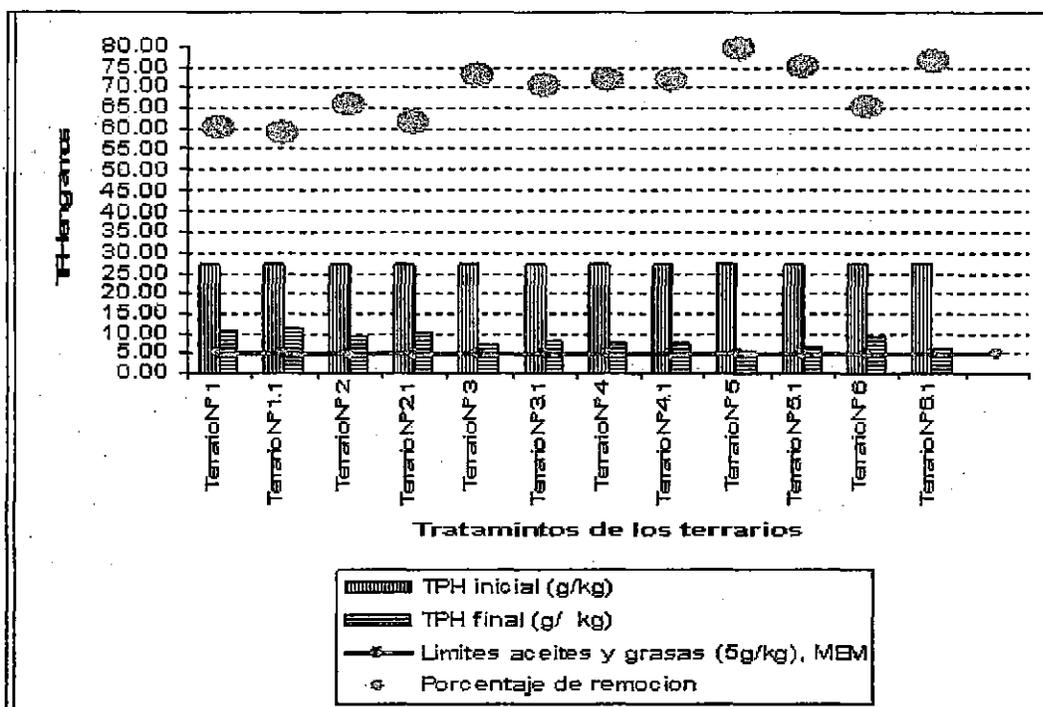


Figura 49: Porcentaje de remoción de TPH en terrarios vs normativa peruana

4.4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS PAH PRESENTES EN LOS TERRARIOS

Se realizó la evaluación de la presencia de PAH en el suelo contaminado con borra luego de tres meses de concluida la prueba de degradación del hidrocarburos en suelo acondicionado con nutrientes. Los análisis de laboratorio fueron realizados por el laboratorio ENVIROLAB. Los resultados de laboratorio de los análisis realizados para evaluar PAH se presentan en el Anexo 7.

En el Cuadro 44 se presentan los elementos aromáticos registrados en el suelo evaluado en la prueba de terrarios. En la Figura 50 se muestra la comparación de los PAH presentes en la borra con la normativa peruana sobre los criterios para terrenos contaminados, emitidos por la DGAA.

Se registraron ocho hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo tratado según la prueba de degradación del hidrocarburo en suelo acondicionado con nutrientes.

El nivel más alto dentro de los PAH, fue para el fenantreno con 0.29 mg/kg. Según la Guía para el manejo de Desecho de las Refinerías de Petróleo Volumen VII, del Ministerio de Energía y Minas, que presenta los criterios para terrenos contaminados, el fenantreno registra un 5 mg/kg, por tanto, se considera que el suelo está ligeramente contaminado al hallarse el fenantreno con un valor por debajo de dicha cifra.

El fenantreno puede afectar a las personas que están en continuo contacto con la borra, ya sea respirándolo y es posible que se absorba a través de la piel. El contacto con esta sustancia puede irritar la piel y los ojos. Si se expone la piel contaminada con fenantreno al sol se puede producir un salpullido o quemadura de la piel, a veces con ampollas.

Cuadro 44: Niveles de PAH en los terrarios

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)	Resultados de los análisis	Criterios ² para terrenos contaminados (mg/kg de materia seca)		
		A	B	C
Acenaftileno	0.04	0.1	10	100
Acenafteno	0.04	0.1	10	100
Fluoreno	0.14	0.1	10	100
Fenantreno	0.29	0.1	5	50
Fluoranteno	0.02	0.1	10	100
Pireno	0.05	0.1	10	100
Benzo (a) antraceno	0.02	0.1	1	10
Criseno	0.03	0.1	1	10

² Leyenda (DGAA, 1994):

- A: Límites aproximados de detección analítica para niveles de línea base natural y orgánica para metales e inorgánicos.
- B: Por debajo de esta cifra el suelo está ligeramente contaminado y se encuentra contaminado si la supera.
- C: El suelo se encuentra considerablemente contaminado.

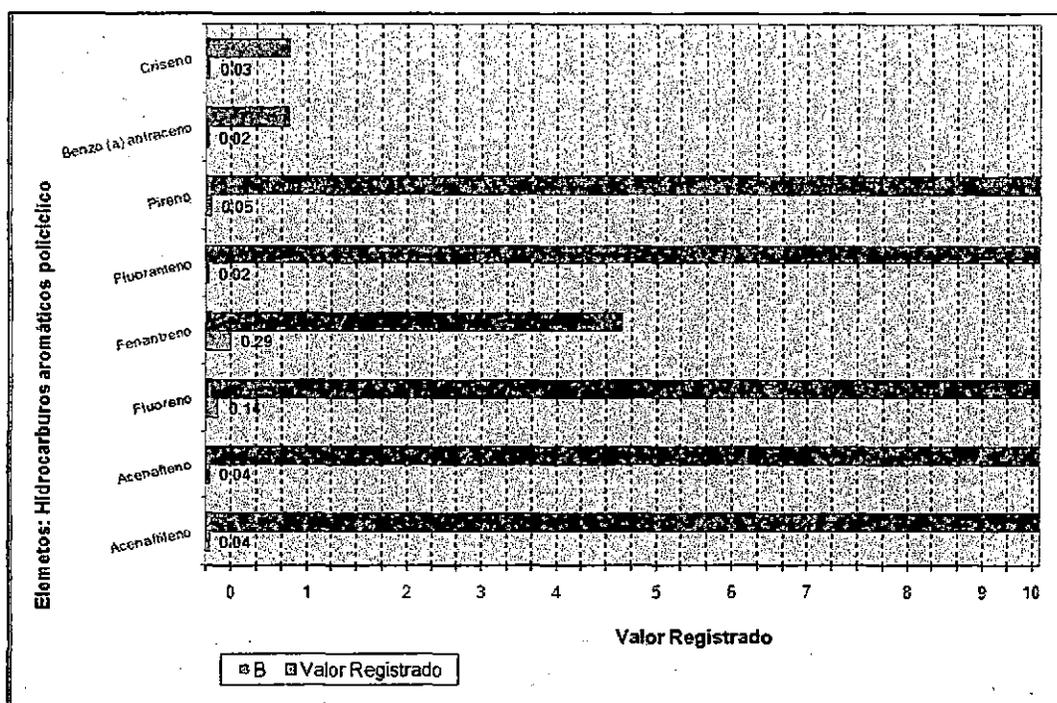


Figura 50: Comparación de los PAH de la borra con los criterios para terrenos contaminados emitidos por la DGAA - Perú

4.5 RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE COMPOST Y SU BIOAUMENTACIÓN CON BORRA

4.5.1 RESULTADOS DEL RECuento BACTERIANO EN CADA BIOPILA

En la Figura 51 se muestra la dinámica poblacional de las bacterias en cada una de las biopilas de compost, observándose que las biopilas CB1 y CB2 presentaron mayor dinámica poblacional durante el proceso de compostaje. Esto puede deberse a que las bacterias que fueron incorporadas por bioaumentación no presentaron mayor competencia con las bacterias nativas del compost, provenientes especialmente del estiércol de vaca. Por otro lado, en la Figura 52 se muestra las desviaciones estándares y medias de cada biopila determinada en el recuento bacteriano.

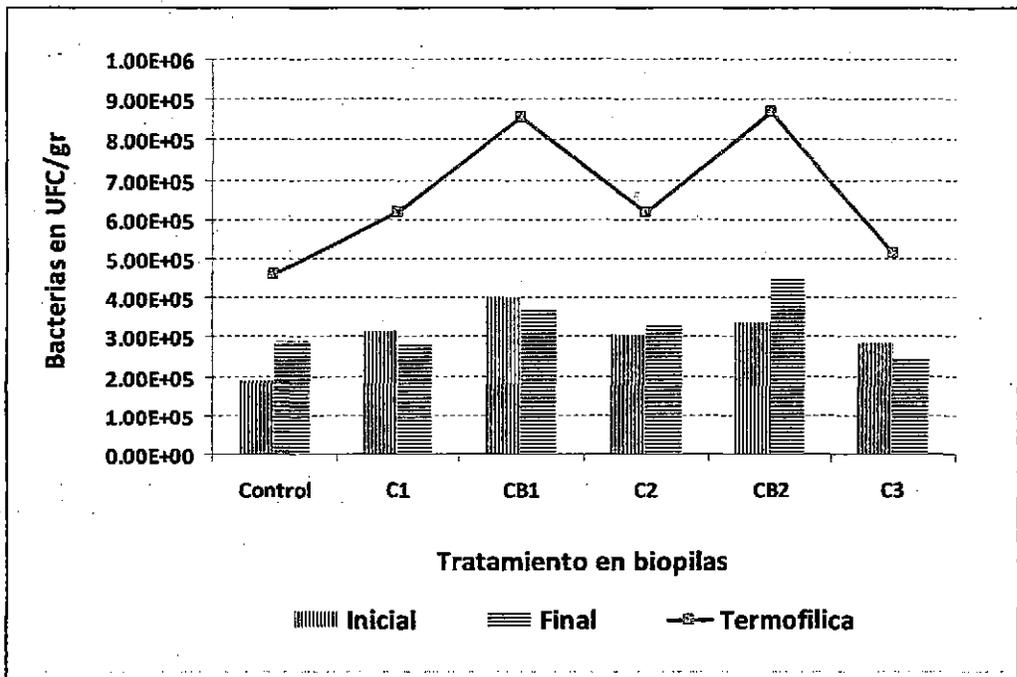


Figura 51: Dinámica poblacional de las bacterias durante el proceso de compostaje

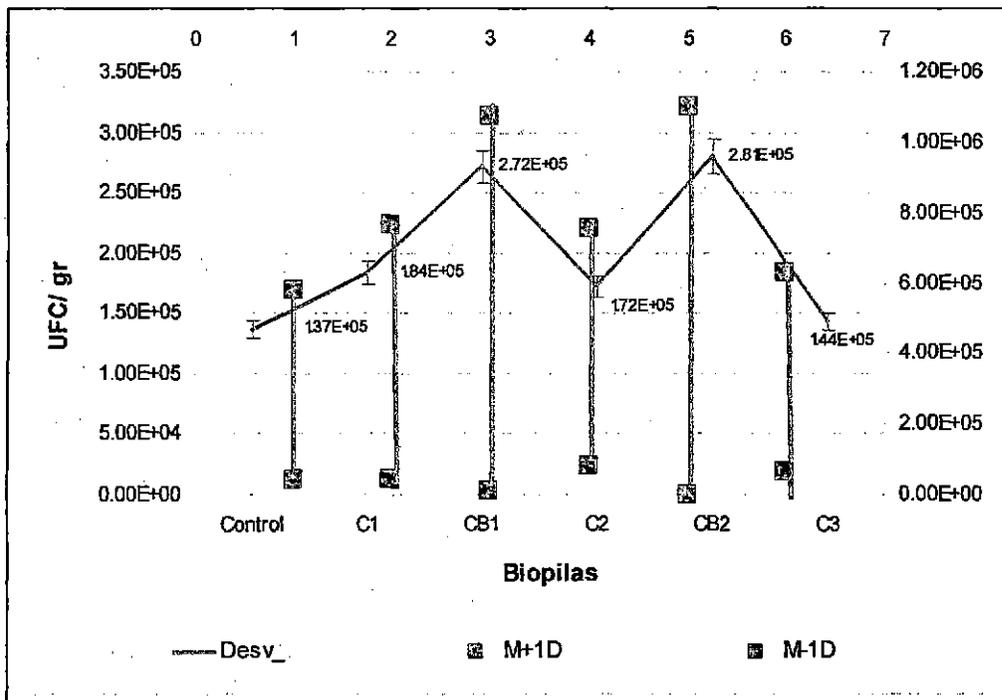


Figura 52: Desviaciones estándar y medias del recuento de bacterias durante el proceso de compostaje

Se observa que el valor medio obtenido para las siguientes biopilas: la biopila control (Co) es $4.58 \times 10^4 \pm 5.81 \times 10^5$, para la biopila C1 es $4.24 \times 10^4 \pm 7.64 \times 10^5$; la biopila CB1 es $9.01 \times 10^3 \pm 1.07 \times 10^6$; la biopila C2 es $7.91 \times 10^4 \pm 7.54 \times 10^5$; la biopila CB2 es $1.62 \times 10^3 \pm 1.10 \times 10^6$ y la biopila C3 es $6.78 \times 10^4 \pm 6.32 \times 10^5$. La desviación estándar que se registró en las biopilas son: la biopila control (Co) es 1.37×10^5 ; para la biopila C1 es 1.84×10^5 ; la biopila CB1 es 2.72×10^5 ; la biopila C2 es 1.72×10^5 ; la biopila CB2 es 2.81×10^5 y la biopila C3 es 1.44×10^5 .

4.5.2 RESULTADO DE LA VARIACIÓN TEMPORAL DE LA TEMPERATURA EN CADA UNA DE LAS BIOPILAS

El tiempo del seguimiento, control y medición de la temperatura se realizó hasta los 122 días que culminó el proceso de compostaje. Considerando que la fase termófila es de 40 °C. Los resultados de la medición de la temperatura se presentan en el Anexo 8.

- Biopilas Co, C1 y CB1

En la Figura 53 se observa que a los 15 días de compostación las biopilas de compostaje presentaron una temperatura termofílica similar. A los 30 días (primer volteo) la biopila control (Co) tuvo la temperatura más alta (69.8 °C) a diferencia de las demás biopilas -biopila C1 (58°C) y CB1 (68.7°C)-, las cuales aumentaron la temperatura recién a los 52 días (cuando se pudo realizar el primer volteo), A los 66 días (segundo volteo) en la biopila Co la temperatura llegó a 45.7 °C y luego bajó a 23.2 °C a los 122 días.

En la biopila C1 y CB1 a los 64 días las temperaturas se mantuvieron bajas y a los 78 días recién se tuvo una segunda fase termofílica en la biopila C1 (49.1°C) y a los 92 días en la biopila CB1 de 39.8 °C. Luego a los 120 días la temperatura bajó para la biopila C1 (19.6°C) y la biopila CB1 (22.5°C).

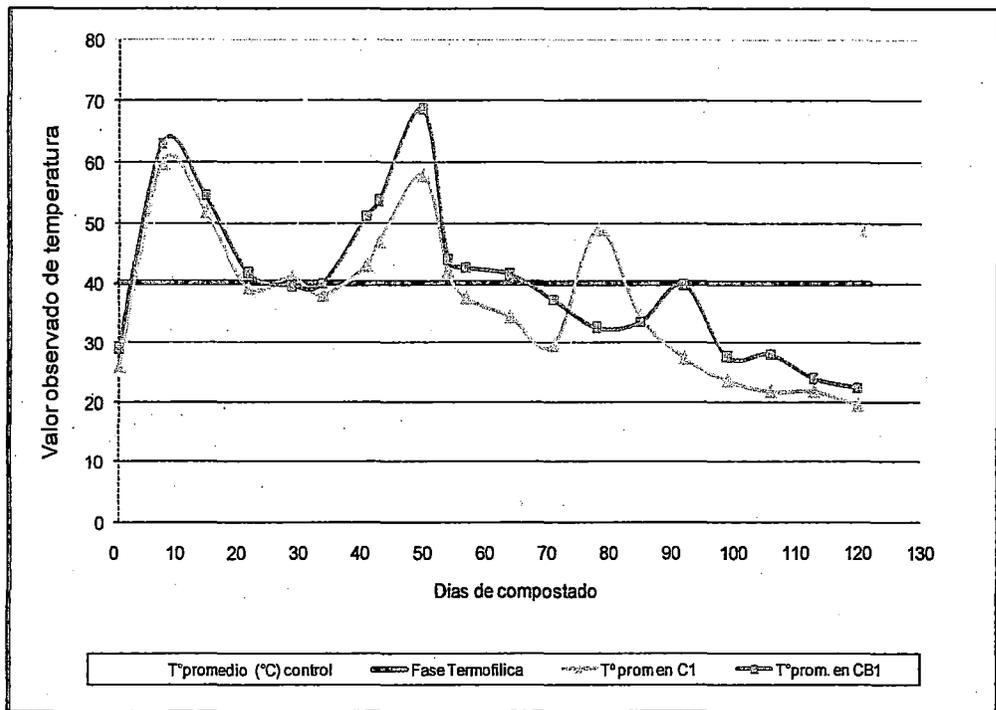


Figura 53: Comparación de la variación temporal de la temperatura en la biopila control (Co), biopila C1 y biopila CB1

- Biopilas Co, C2, CB2 y C3

En la Figura 54 se observa que a los 15 días de compostación las biopilas de compostaje presentaron una temperatura termofílica similar.

A los 30 días (primer volteo) la biopila control Co (69.8 °C) y la biopila C2 (61.97 °C) tuvieron las temperaturas más altas comparándolas con las demás biopilas -biopila C3 (50.6°C) y CB2 (52°C)- las cuales recién aumentaron a los 38 días (primer volteo). Seguidamente las temperaturas fueron bajando hasta que se realizó el segundo volteo a los 66 días para la biopila Co 45.7 °C y luego fue bajando progresivamente hasta alcanzar los 23.2 °C a los 122 días. Por otro lado a los 73 días en las biopilas C2 (47.67 °C) y C3 (42.4 °C) recién se presentó la segunda fase termofílica y luego bajaron las temperaturas progresivamente hasta los 23 °C a los 120 días.

En la biopila CB2 (44 °C) a los 75 días recién aumento la temperatura y a los 94 días ocurrió la fase termofílica con 47.7 °C. Luego a los 120 días la temperatura bajo hasta los 23 °C.

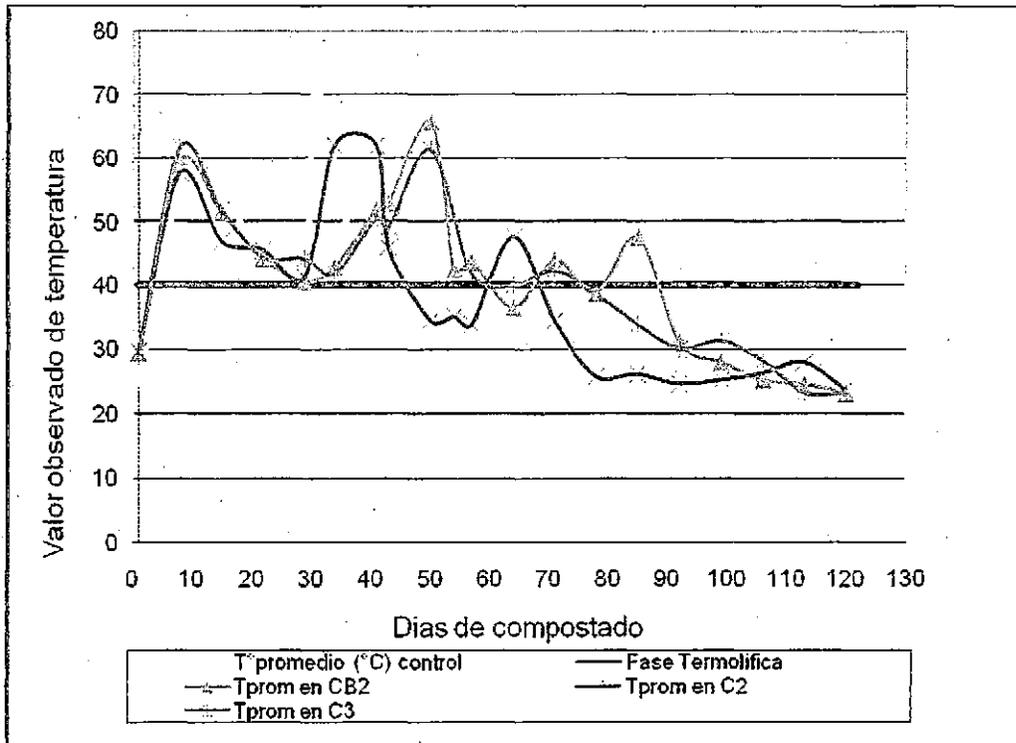


Figura 54: Comparación de la variación temporal de la temperatura en la biopila control (Co), biopila C2, biopila CB2 y biopila C3

4.5.3 RESULTADO DE LA VARIACIÓN DE pH EN CADA BIOPILA

Se muestra la variación de pH en cada biopila durante el proceso de compost.

- Biopilas Co, C1 y CB1

En la Figura 55 se observa que la variación de pH durante los días de compostación estuvo en el rango de 5.9 a 7.2 en las biopilas C1 y CB1. El incremento de pH puede haberse debido al aumento de la actividad microbiana, durante la subida de temperatura antes y al final del proceso de compostaje.

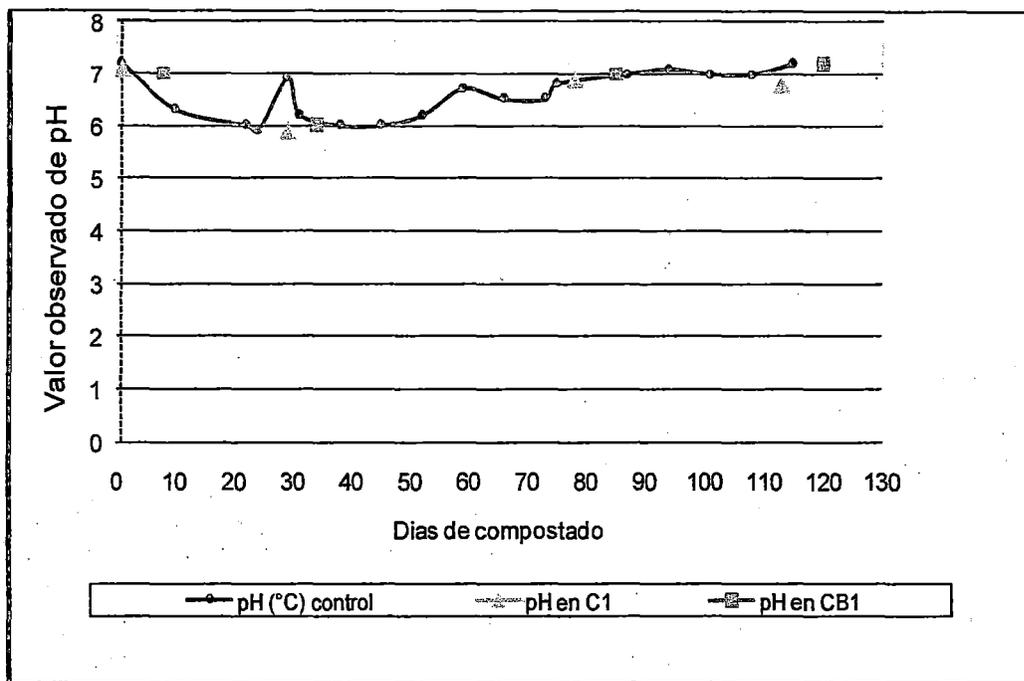


Figura 55: Comparación de la variación del pH en la biopila control con las biopilas C1 y CB1

- Biopilas Co, C2, CB2 y C3

En la Figura 56 se observa que la variación de pH durante los días de compostación tuvo similar valores de pH a los mostrados en la Figura 55. El rango de pH fue de 5.9 a 7.5 en las biopilas C2, CB2 y C3.

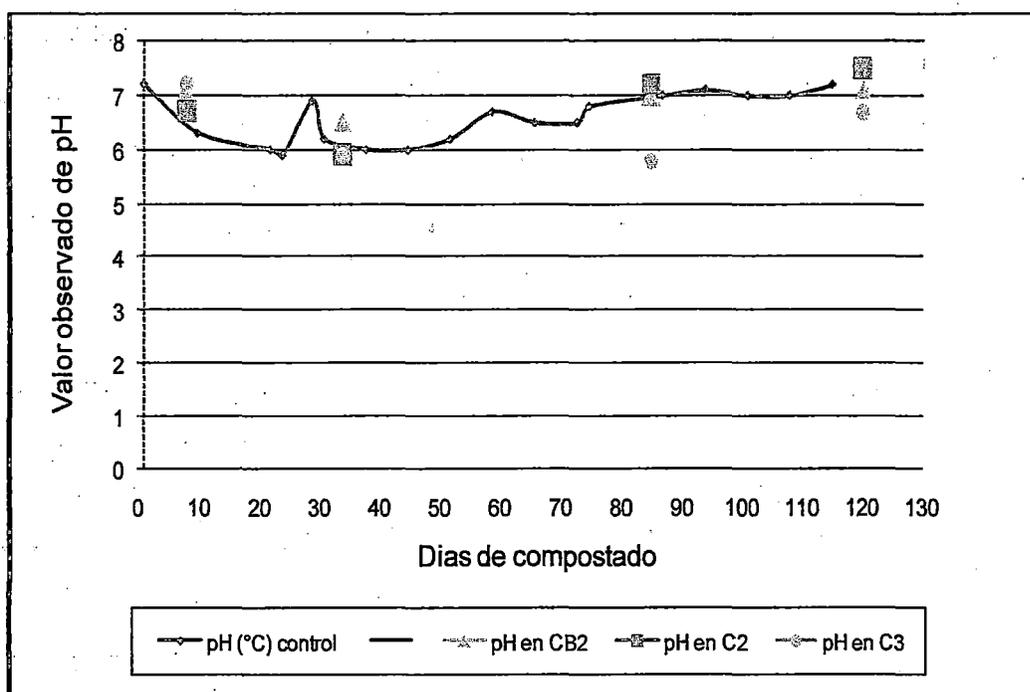


Figura 56: Comparación de la variación del pH en la biopila control con las biopilas C2, biopila CB2 y biopila C3

4.5.4. RESULTADO DE LA CARACTERIZACIÓN DEL TPH Y DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE LAS BACTERIAS EN TRES ETAPAS DEL PROCESO DE COMPOSTAJE

Las evaluaciones de TPH y de la densidad poblacional de bacterias en cada biopila de compostaje se realizaron en tres etapas del año 2004. En el mes de marzo se efectuó una primera evaluación, en el mes de mayo la segunda evaluación y en el mes de junio la última evaluación. Los resultados de la evaluación de hidrocarburos totales se presentan en el Anexo 9. Ver Cuadro 45 y Figura 57.

El compost permaneció en las biopilas hasta que se logró un nivel de saneamiento de 5000 mg/kg, según los lineamientos de la DGAA (Anexo 10).

Cuadro 45: Concentración de TPH total por cromatografía y el promedio de bacterias en UFC/g de cada biopila

Código de biopilas	Día 34		Día 86		Día 120	
	UFC/g	TPH mg/kg	UFC/g	TPH mg/kg	UFC/g	TPH mg/kg
C1	3.15E+05	20971	6.15E+05	10843	2.80E+05	2168
CB1	4.00E+05	20971	8.55E+05	3008	3.70E+05	1914
CB2	3.40E+05	36771	8.70E+05	4310	4.45E+05	4633
C2	3.05E+05	36771	6.15E+05	3879	3.30E+05	2084
C3	2.85E+05	36771	5.15E+05	6146	2.50E+05	4459

Se observa en la Figura 57 que a los 86 días hubo un aumento en la densidad poblacional de bacterias y una disminución con el nivel de TPH; y a los 120 días el nivel de TPH estuvo por debajo de los 5000 mg/kg y una poca disminución de la densidad poblacional.

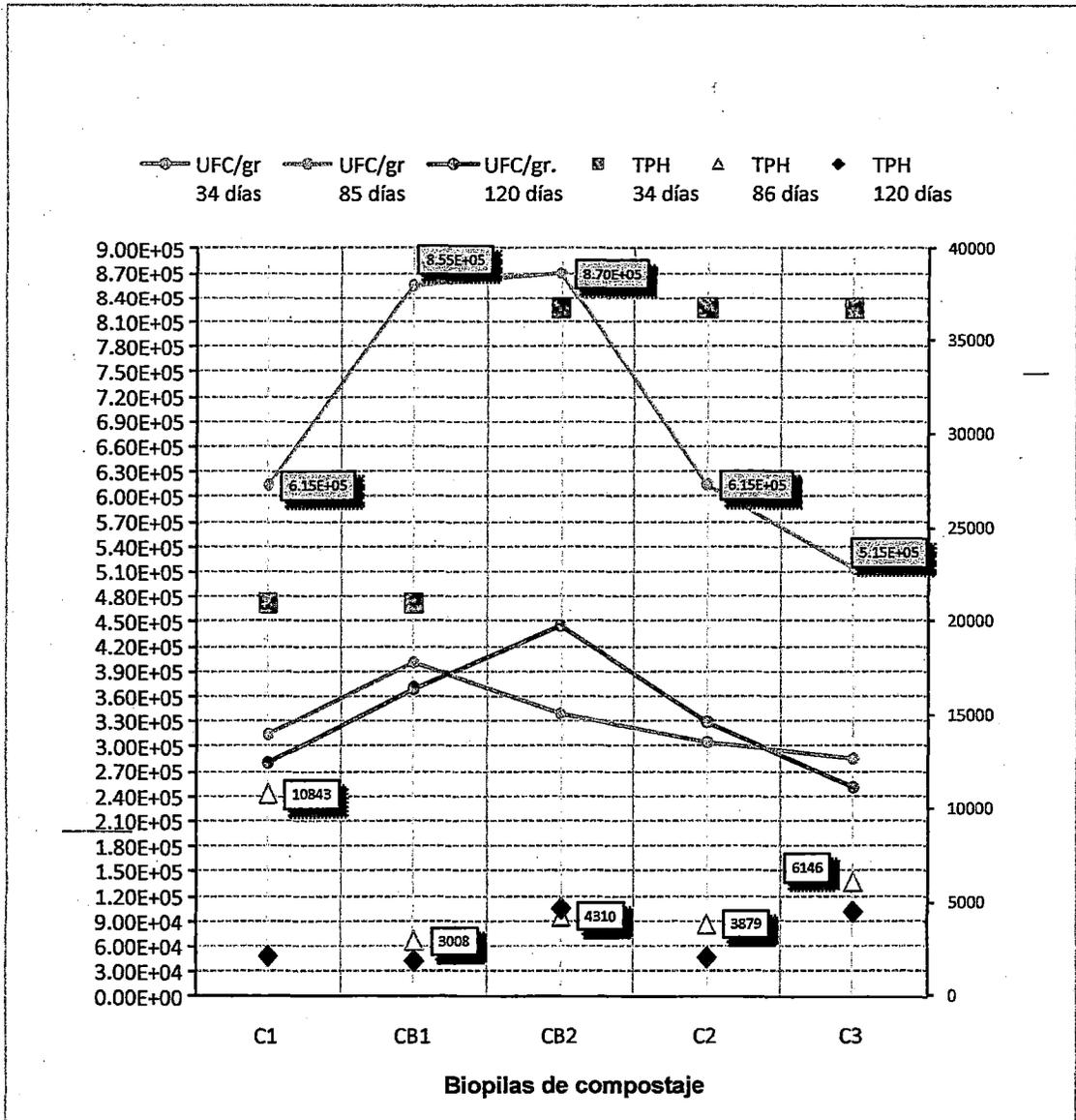


Figura 57: Evaluación de la concentración de TPH y la variación de crecimiento de bacterias durante las tres etapas del proceso de compostaje

4.5.5 RESULTADO DE LA VARIACIÓN TEMPORAL DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH EN CADA BIOPILA DE COMPOSTAJE

En la Figura 58 se observa que a los 31 días la concentración de TPH se encontró muy por encima del nivel de intervención normado por la DGAA (5000 mg/kg), ver el Anexo 10. A los 86 días se observó que los niveles de TPH disminuyeron sólo en tres biopilas: la biopila CB1, biopila C2 y biopila CB2 y a los 120 días se observó una disminución de TPH en todas las biopilas.

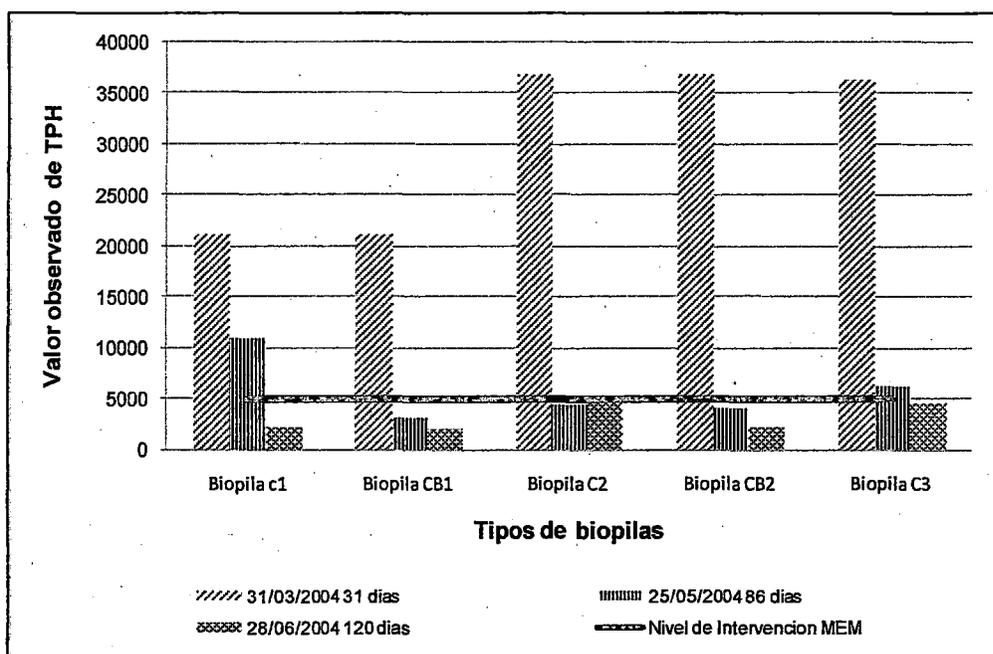


Figura 58: Variación temporal de la concentración de TPH en cada biopila de compostaje

A los 31 días del proceso de desarrollo del compostaje se observó que el porcentaje de remoción estuvo de 84 a 91 %. A los 86 días oscilo entre 95 hasta 99 % y a los 120 días estuvo entre 98 a 99 % (Ver Figura 59).

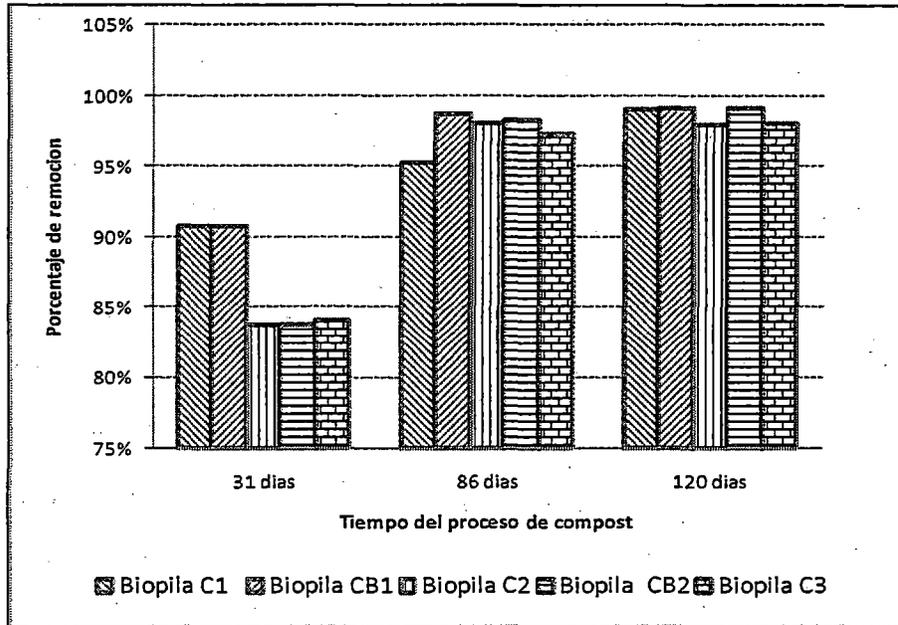


Figura 59: Porcentaje de remoción de TPH en cada biopila

V. DISCUSIÓN

Se aislaron bacterias y hongos de tres muestras de borra sólida, borra líquida y borra con arena, obtenidas de dos pozas de hidrocarburos ubicadas por muchos años en la Refinería Conchán. La sobrevivencia de bacterias puras en la fase de selección en condiciones de laboratorio sugiere que poseen capacidad para utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos como donadores de electrones (Madigan *et al.*, 1998). En el caso de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere de una concentración mínima de microorganismos específicos degradadores 10×10^3 a 10×10^4 UFC/g de suelo y de organismos heterótrofos totales de 10×10^5 a 10×10^6 UFC/g de suelo (Ercoli, 1995, 1999).

Para determinar si las cepas bacterianas pueden usarse en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se evaluó su capacidad emulsificante y su actividad degradativa mediante la prueba en medio Bushnell Haas. Se obtuvieron cuatro cepas bacterianas (cepa B9.2; cepa B1; cepa B9.1 y cepa B15) con mayor actividad degradativa las cuales también presentaron mayor actividad emulsificante, lo cual fue determinado cuantitativamente a través de la conversión de la adsorbancia en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE / mL) (Trejo, 1996).

Trejo (1996) obtuvo dos cepas bacterianas del genero *Chryseomonas* que mostraron mejor actividad emulsificante con 0,51 y 0,48 UAE/mL respectivamente, por otro lado, en la tesis "Aislamiento e identificación de cepas bacterianas biorremediadoras y su evaluación sobre suelo contaminado con petróleo crudo" de Prudencio (2002), se obtuvieron seis cepas con mayores valores de actividad emulsificante: tres cepas de *Bacillus* con 0.718, 0.679, 0.679 UAE/mL, una cepa de *Pseudomonas* con 0.683 UAE/mL, una de *Acinetobacter* con 0.707 UAE/mL, y una cepa no identificada con 0.683 UAE/mL.

En esta investigación se obtuvieron tres (03) cepas con valores mayores de actividad emulsificante que fueron identificadas según su taxonomía: cepa de *Brevundimonas vesicularis* (cepa B9.2) con 1.397 UAE/ml; cepa *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida / achromogenes* (cepa B1) con 1.029 UAE/mL y cepa *Agrobacterium radiobacter* (cepa B15) con 0.909 UEA/mL. Así como una (01) cepa no identificada (cepa B9.1) con 0.936 UAE/mL. No se evaluó la actividad emulsificante de los hongos porque no presentaron actividad degradativa en borras.

De las 27 cepas bacterianas aisladas de la borra se seleccionaron 13 cepas bacterianas con mejor actividad degradativa y emulsificante las cuales fueron sometidas a la prueba de degradación de borras en terrarios y la prueba de degradación de borras con compost sin bioaumentación y con bioaumentación. La prueba de los terrarios con arena determinó, en las 13 cepas bacterianas, una óptima actividad degradativa, donde luego de 90 días, se redujo considerablemente la concentración de TPH en la arena, sin embargo, los PAH aún se encuentran presentes, produciendo un nivel de exposición de riesgo correspondiente a suelos ligeramente contaminados

El tratamiento que dio mejores resultados en la disminución de TPH fue el método de bioaumentación en compostaje. Al agregar microorganismos autóctonos provenientes especialmente de la borra líquida con una adecuada actividad degradativa y emulsificante el consumo del hidrocarburo fue visible a los 31 días y a los 86 días ya los niveles de TPH se encontraron por debajo de los establecidos por la DGAA. Por tanto, una aproximación muy interesante fue combinar la bioestimulación con la utilización de microorganismos autóctonos, previamente aislados desde el medio contaminado, para ser reintroducidos masivamente (Viñas *et al.*, 2002).

El incremento en la densidad poblacional se considera una medida indirecta de la actividad metabólica de la población (Atlas, 1984; Bartha, 1986), debido a que los hidrocarburos constituyen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento microbiano, tal como lo señala Yerushalmi (2003), quién evaluó la capacidad de degradación de hidrocarburos provenientes del petróleo mediante bioestimulación.

La disminución del contenido de los hidrocarburos totales se corresponde con el incremento de la densidad poblacional de los heterótrofos mesófilos en los tratamientos (Atlas, 1981). Es así que la densidad poblacional evaluada durante las tres etapas del proceso de compostaje permitió confirmar el aumento poblacional de las bacterias con la disminución de TPH a los 85 días de transcurrido el proceso de compostaje.

Se puede dar una aproximación, según los resultados obtenidos en la presente tesis, que con la incorporación de 75 kg de borra para 1 m³ de biopila a los 120 días se obtuvo un nivel de TPH de 4 459 mg/kg lo cual está por debajo aunque muy cerca de los niveles establecidos como mínimos por la normativa de la DGAA. Es importante destacar que si se utilizara mayor cantidad en kilogramos de borra para un tratamiento mediante compostaje, de las mismas dimensiones, podría sobrepasar los límites mínimos establecidos por dicha entidad (5000 mg/kg).

VI. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a la escala de clasificación por gravedad API el hidrocarburo "borra" esta en promedio de 17 a 19 grados API y el análisis gravimétrico que se obtuvo fue de 382 006 mg/kg (38 %) y el cromatográfico con 151 495 (15 %), lo cual confirma que contiene hidrocarburos pesados. Considerándose el parámetro de viscosidad del hidrocarburo se observa que existe mayor viscosidad en la profundidad de las pozas que en la zona de superficie; y la cantidad de agua y sedimentos es alta. Asimismo la borra contiene alto porcentaje de azufre y presencia de metales pesados (níquel, vanadio, sílice y aluminio).

2. Se observó en el primer recuento de bacterias una dinámica poblacional en la muestra de borra líquida de 1.89×10^5 UFC/g hasta 2.50×10^5 UFC/g y en la muestra de borra sólida de 1.51×10^5 UFC/g hasta 1.93×10^5 UFC/g. Asimismo, se observó en el segundo recuento de bacterias una dinámica poblacional en la muestra de borra líquida de 1.00×10^5 UFC/g hasta 1.83×10^6 UFC/g y en la muestra de borra sólida de 7.30×10^5 UFC/g hasta 1.74×10^6 UFC/g.

3. La mayor población bacteriana estuvo aislada de la muestra de borra líquida con un coeficiente de variación de 50 % y en muy menor cantidad de borra sólida con un coeficiente de variación de 35 %. La población de hongos fue mucho menor a las registradas en el recuento de bacterias.

4. Se identificaron seis cepas de hongos, según sus características macroscópicas y microscópicas, hasta género taxonómico, determinándose su pertenencia a sólo dos géneros: *Rhizopus* (cepa h33, h38 y h39) y *Aspergillus* (cepa h28, h36 y h30).

5. La prueba de actividad degradativa para bacterias fue mayor cuando se inoculó 100 uL de cepas bacterianas en medio de cultivo Bushnell Haas, de las cuales se seleccionaron 13 cepas bacterianas con mayor actividad degradativa y emulsificante identificadas como “consorcio bacteriano selecto”.

6. La actividad emulsificante presentó valores mayores en tres (03) cepas que según su taxonomía son: cepa de *Brevundimonas vesicularis* (cepa B9.2) con 1.397 UAE/mL; cepa *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida* / *achromogenes* (cepa B1) con 1.029 UAE/mL y cepa *Agrobacterium radiobacter* (cepa B15) con 0.909 UEA/mL. Así como una (01) cepa no identificada (cepa B9.1) con 0.936 UAE/mL.

7. La técnica API 20 NE sólo identificó taxonómicamente cinco (05) cepas bacterianas por especie: *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida* / *achromogenes* (cepa B1), *Brevundimonas vesicularis* (cepa B 9.2), *Agrobacterium radiobacter* (cepa B15) y *Burkholderia cepacia* (cepa B5 y cepa B35), que también presentaron alta a mediana actividad emulsificante.

8. En la prueba de terrarios no se logró disminuir a los 90 días los niveles de TPH para obtener un saneamiento menor a los 5000 mg/kg según la normativa peruana para suelos contaminados con aceites y grasas. Por tanto el único terrario que presentó una mayor disminución de TPH fue el terrario “T5” con 5600 mg/kg, que contenía la inoculación del consorcio bacteriano selecto.

9. Los niveles más altos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en terrarios fue para el fenantreno (0.29 mg/kg) lo que hace considerar al suelo como ligeramente contaminado, según los criterios para terrenos contaminados de la normativa peruana del Ministerio de Energía y Minas.

10. Utilizando el consorcio bacteriano selecto se observó que en la prueba de compostaje a los 86 días se obtuvo entre 95 a 99 % de remoción del hidrocarburo y en la prueba de terrarios a los 90 días sólo se obtuvo entre 75 a 79 % de remoción del hidrocarburo.

11. En la prueba de compostaje la mayor dinámica poblacional se registró en las biopilas CB1 ($4.73 \times 10^2 + 1.08 \times 10^6$) y CB2 ($1.62 \times 10^3 + 1.10 \times 10^6$), hecho comprobado por presentar el mayor consumo de TPH final, con CB1 (1 914 mg/kg) y CB2 (2084 mg/kg).

12. En las biopilas de compostaje se observó que, pasados los 86 días de la prueba, la biopila C1 registró 10 843 mg/kg de TPH, mientras que la biopila C2, 4 310 mg/kg de TPH. La mayor cantidad de TPH removido resultó en la biopila CB1 (3 008 mg/kg) y en la biopila CB2, 3 879 mg/ kg. A los 120 días todos los niveles de TPH estuvieron por debajo de los límites de aceites y grasas propuestos por la DGAA. Por lo tanto, la cantidad de hidrocarburos (borra) presentes en las biopilas y el uso del consorcio bacteriano determinaron el tiempo de degradación en el compostaje.

13. En el transcurso de la prueba de compostaje la temperatura osciló entre 29 °C a 35 °C en fase mesófila, de 42 °C a 68 °C en fase termófila y a los 120 días de culminado el proceso de compostaje osciló de 22 °C a 23 °C.

14. Durante la prueba de compostaje, el pH estuvo de 6.7 a 7.2 en el inicio del proceso, luego bajo entre 5.9 a 6.5 y finalmente quedó de 6.7 a 7.2 de pH. El porcentaje de humedad estuvo en el rango de 45 y 60 %, garantizando las condiciones requeridas (Levin & Gealt, 1997, Eweis *et al.*, 1999).

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda contar con las precauciones necesarias a la hora de manipular el suelo contaminado con hidrocarburos durante el desarrollo de un proyecto de investigación, por lo que se deberá usar: guantes, mascarillas y lentes de seguridad. Asimismo por contener el hidrocarburo compuestos muy volátiles y al estar continuamente la persona expuesta, podría provocarle dolores de cabeza, náuseas, cansancio y luego de varios años problemas a la piel y hasta cáncer.
2. Se recomienda trabajar con mucho cuidado durante el uso de los equipos de laboratorio, ya que el hidrocarburo es un compuesto orgánico muy sucio y puede teñirlos o malograrlos.
3. Se recomienda utilizar lentes especiales con filtro UV, a la hora de trabajar con luz ultravioleta, durante las evaluaciones microbiológicas.
4. Se recomienda que acerca de la remoción (oxigenación) del suelo con hidrocarburo en tratamiento, esta debe ser realizada como mínimo cada dos días con movimientos envolventes en contra del viento, utilizando el material de protección personal para proteger la vista, el olfato, las manos y utilizar un mandil que evite ensuciar la ropa.
5. Se recomienda controlar durante la prueba de compostaje los parámetros importantes como: la temperatura, humedad y pH del suelo que se está tratando, especialmente cuando es época de verano.

6. Se recomienda tener en cuenta una adecuada gestión integral de los residuos sólidos peligrosos, durante y después de las investigaciones que se proyecten ejecutar, esto permitirá que exista un mejor manejo y disposición final de estos residuos y prevenir que se produzca contaminación dentro o fuera de los ambientes donde se desarrolle el proyecto de investigación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón, F. M. 2004. Evaluación de uso de diferentes técnicas biotecnológicas para la producción de composta. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú. UNALM.

Alexander, M. 1981. Microbiología del Suelo, Informe del trabajo realizado para la Evaluación Ambiental y Diseño Inventario de las Obras de Remediación Ambiental del Sector Pirin, Puno. 1 ed. Lima, Perú. Ministerio de Energía y Minas.

Andersen, S. I.; Birdi, K. S. 1990. Fuel. Sci. Tech. Int. 8: 593-615.

Arenas, S. 1999. Aislamiento y caracterización de bacterias de ambiente contaminados por petróleo en la Refinería La Pampilla. Lima, Perú. UNMSM.

Atlas, R. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. Microbial Rev. 45 (1): 180-209.

Atlas, R. 1984. Petroleum Microbiology. New York. Macmillan Publishing, 691p.

Bartha, R. 1986. Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. Microbiol. Ecol. 12: 155-172.

Belloso, C., Carrario, J.; Viduzzi, D. 1998. Biodegradación de hidrocarburos en suelos contenidos en terrarios. *In* 26° Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (26, San Lorenzo).

Bushnell, L.D.; Haas, H.F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriology* 41: 653-673.

Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology. 1991. Vol. 1. Ed. Copyright.

Cabrera, A. 2003. Caracterización Bioquímica de Cepas Nativas con Capacidad Hidrocarburofítica y Determinación de algunos Parámetros que contribuyan a la Biorremediación de Ambientes Contaminados con Hidrocarburos Pesados. Tesis Biólogo. Lima, Perú. UNALM.

Córdova, Ch. 2007. Evaluación de parámetros físicos y biológicos para el compostaje de los lodos residuales de la industria del papel. Tesis Ing. Ambiental. Lima, Perú. UNALM.

Didyk B. M.; Costa, M. 1978. Biorremediación de derrames de petróleo en La Refinería Talara. Informe presentado a PETROPERÚ S.A.

DGAA (Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas, PE). 1994. Guía Ambiental para la Restauración de Suelos en Instalaciones de Refinación y Producción Petrolera, v. 15: 52-60, 80-97, 114-124.

DGAA (Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas, PE). 1994. Guía Ambiental Para la Disposición de Desechos de Perforación en la Actividad Petrolera, v. 10: 35-36, 95-124.

DGAA (Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas, PE). 1994. Guía para el Muestreo y Análisis de Suelos, v. 17: 11-13, 17.

DGAA (Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas, PE). 1994. Guía para el Manejo de Desechos de las Refinerías de Petróleo, v. 7: 70-78, 84-89, 139-147, 165-177.

Ercoli, E.; Fuentes, B.; Gilbert, H.; Arreghini, M.; Galvez, J. 1995. Tratamiento Biológico de Lodos de Refinería. *In* 2º Simposio de Producción de Hidrocarburos. Instituto Argentino del Petróleo, 1: 497- 506.

Ercoli, E.; B. Fuentes; H. Gilbert; Galvez, J. 1994. Tratamiento biológico de lodos de refinería DFTI. Facultad de Ingeniería, Universidad de Cuyo.

Ercoli, E.; Gálvez, J.; Aranzadi, E. 1994. Degradación biológica en suelos contaminados con hidrocarburos. Laboratorio de bioprocesos. Facultad de Ingeniería, Universidad de Cuyo.

Ercoli, E.; Gálvez, J.; Aranzadi, E., Santos, A.; Cantassano, P. 1995. Tratamiento biológico ex situ de residuos semisólidos de oleoductos. *In* 1º Encuentro Latinoamericano para la Calidad en la Industria Petrolera. Mendoza, Argentina. 311-318.

Escalante, R. M. 2002. Biodegradación de Crudo de Petróleo en terrarios. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú. UNMSM.

Eweis, J.B.; Ergas, S. J.; Chang, D. P. Y.; Schroeder, E.D. 1999. Principios de Biorrecuperación. Madrid, España. McGraw Hill.

Fernández, C. L.; Rojas, N. G.; Roldán, T. G.; Ramírez, M. E.; Zegarra, H. G.; Uribe, R.; Reyes, R. J.; Flores, D.; Arce, J. M. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. 1 ed. México. s.e.

García, C. s.f. Experiencia de Repsol YPF en biorremediación de suelos (en línea). Repsol YPF, Refino y Logística Europa. Consultado 20 mar. 2010, en http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/experiencia_repsol_biorremediacion.pdf

Hueseman M.H., More, K.O. 1994. The effects of oil type and loading, oxygen and comercial bacteria on crude oil bioremediation. USA. CRC, 58-71.

Hurtado, J. E.; Díaz, A. M.; Cañari, A. R.; Alegre, L. M. 2002. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos empleando microorganismos: Estudio a nivel de columnas. Lima, Perú. Laboratorio de Biotecnología Ambiental, LID, UPCH, A.P.: 4313.

Levin, M. A.; Gealt, M. A. 1997. Visión general del biotratamiento y su futuro. In Levin M. A.; Gealt, M. A. eds. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Madrid, España. McGraw Hill, p. 1 - 19.

Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2000. Biology of Microorganisms, 9 ed. Upper Saddle River, NJ. Prentice Hall.

Merino, F.; Velasco, C.; Azafiero, L. 1996. Evaluación de un medio de cultivo para la producción de emulsificantes por vía microbiana. Laboratorio de Fisiología y Genética y Ecología Microbiana. Lima, Perú. UNMSM, 92 p.

Morris, L.; Gealt, M. A. 1997. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. 1 ed. McGraw Hill.

Müller-Hurtig, R.; Felge, I. and Wagner, F. 1993. Hydrocarbon Degradation in Aerated Soil Fixed Bed Reactors: Effect of Homogenization. In Arendt, F. ed. Contaminated soil. Springer, v.1, p. 529-530.

Prudencio, G. C. 2002. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas biorremediadoras y su evaluación sobre suelo contaminado con petróleo crudo. Tesis Biólogo. Lambayeque. Universidad Pedro Ruiz Gallo.

Refinería Talara. s.f. Informe del trabajo realizado para el tratamiento de Borrás (Biorremediación de Suelos) en el Relleno Industrial de Milla Seis - Trabajo a Cargo de la Cia. PTI.

Riser-Roberts, E. 1998. Bioremediation of petroleum contaminated soils. Chelsea, MI, EEUU. Lewis, p. 232-249.

Rivera, M. C.; Ferrera, R.; Volke, V.; Rodríguez, R.; Fernández, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo Terra. México, Universidad Autónoma Chapingo.

Rodríguez, J. 2004. Tratamiento de residuos de refinería mediante técnica de biorremediación. Tesis Doctor. España. Universidad de Oviedo.

Scragg, A. 1999. *Biotecnología Medioambiental*. Zaragoza, España. Acribia.

Sharabi, E. D.; Bartha, R. 1993. Testing some assumptions about biodegradability in soil measured by carbon dioxide evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1201-1205.

Speight, J. G.; Long, R. B.; Trowbridge, T.D. 1984. Factors influencing the separation of asphaltenes from heavy petroleum feed stocks. *Fuel* 63: 616-620.

Tojima, M.; Suhara, S.; Imamura, M.; Furuta, A. 1998. Effect of heavy asphaltene on stability of residual oil. *Catal. Today* 43: 347-351.

Trejo, C. 1996. Aislamiento de bacterias degradantes y emulsificantes de petróleo, de ambiente no contaminados por hidrocarburos. Tesis Microbiología y Biotecnología. Lima, Perú. UNMSM, 124p.

Yen, T. F.; Chilingarian, G. V. 1994. Asphaltenes and asphalts 1: Elsevier's Developments in Petroleum Science: 40A.

Yerushalmi, L. 2003. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. *Biotechnology Journal* 7(1): 37-51.



ENVIROLAB-PERU S.A.C.

Environmental Laboratories, PERU S.A.C.

INFORME DE ENSAYO

N° 309150

Solicitante: CAREC
Domicilio Legal: Av. Las Aves N°260
San Borja
Tipo de Muestra: Borra
Plan de Muestreo: —
Solicitud de Análisis: SET-150
Procedencia de la Muestra: Lurin
Fecha de Ingreso: 03/09/23
Código ENVIROLAB-PERU: 309150
Referencia: Cotización 7U2/03/CG

Análisis: Hidrocarburos Totales (C ₉ -C ₄₀)			Método: EPA 8015-M			
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
309150-01	Poza N°1 - Superficie	03/09/23	8	268676	mg/Kg	03/09/23
309150-02	Poza N°1 - Medía Profundidad	03/09/23	8	257186	mg/Kg	03/09/23
309150-03	Poza N°1 - Fondo	03/09/23	8	151495	mg/Kg	03/09/23

Condición y Estado de la Muestra Ensayada: Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.

Nota: Las muestras son composites de dos submuestras tomadas en el lado sur y norte de la poza.

Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (C₉-C₄₀)
Cromatografía

LUIS BUENO CARBAJAL
Gerente General
C.L.P. N° 6618
Lima, Perú. 03/10/13



Nota: - Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
- Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto.

Page 1/5

Av. La Marina 3059 San Miguel - Lima 32 PERU
Telf.: (51) 578-1186 Telefax: (51) 578-1063 E-Mail: envirolab@envirolabperu.com.pe Web: www.envirolabperu.com

Anexo 2(a): Resultado del análisis inicial de hidrocarburo total de petróleo (TPH) realizado al hidrocarburo “borra”, según el método cromatográfico en el laboratorio ENVIROLAB



ENVIROLAB-PERU S.A.C.

Environmental Laboratories Peru S.A.C.

INFORME DE ENSAYO

N° 309150

Solicitante: CAREC
Domicilio Legal: Av. Las Artes N°260
San Borja
Tipo de Muestra: Borra
Plan de Muestreo: —
Solicitud de Análisis: SET-150
Procedencia de la Muestra: Luján
Fecha de Ingreso: 03/09/23
Código ENVIROLAB-PERU: 309150
Referencia: Colización 702/03/CG

Análisis: Hidrocarburos Totales (C ₉ -C ₄₀)				Método: EPA 8015-M		
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
309150-01	Poza N°1 - Superficie	03/09/23	8	268676	mg/Kg	03/09/23
309150-02	Poza N°1 - Media Profundidad	03/09/23	8	257186	mg/Kg	03/09/23
309150-03	Poza N°1 - Fondo	03/09/23	8	151495	mg/Kg	03/09/23

Condición y Estado de la Muestra Ensayada: ***
Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.

Notas: Las muestras son compositas de dos submuestras tomadas en el lado sur y norte de la poza.

Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (C₉-C₄₀) Cromatografía.

LUIS BUENO CARBAJAL
Gerente General
C.I.P. N° 6618
Lima, Peru. 03/10/13



Nota: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto.

Page: 1 / 5

Av. La Marina 3059 San Miguel - Lima 32 PERU
Telf.: (511) 578-1186 Telefax: (511) 578-1053 E-Mail: envirolab@envirolabperu.com.pe Web: www.envirolabperu.com

Anexo 2(b): Resultado del análisis inicial de hidrocarburo total de petróleo (TPH) realizado al hidrocarburo "borra", según el método gravimétrico en el laboratorio ENVIROLAB



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMÍA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANÁLISIS DE SUELOS : CARACTERIZACIÓN

Procedencia :
 Departamento : LIMA Provincia : LIMA Distrito : LURIN
 Fundo :
 Referencia : H.R. 5174-005C-04 Solicitante : CAREC

Número de Muestra		pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
Lab	Campo							Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
0071		7.3	1.11	0.00	0.1	8.4	124	98	2	0	A.	2.88	1.81	0.58	0.19	0.30	0.00	2.88	2.88	100

A = arena ; A.Fr. = arena franca ; Fr.A. = franco arenoso ; Fr. = franco ; Fr.L. = franco limoso ; L = limoso ; Fr.Ar.A. = franco arcillo arenoso ; Fr.Ar. = franco arcilloso ; Fr.Ar.L. = franco arcillo limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = arcillo limoso ; Ar. = Arcilloso

La Molina 22 de Enero de 2004



Ing. Rubén Bazán Tapia
 Jefe del Laboratorio

/pdt

Av. La Universidad s/n. La Molina. Campus UNALM - Telfs.: 349-5669 349-5647 Anexo 222 Telefax: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Anexo 3(a): Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina
 "Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes"



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS - ESPECIAL EN SUELO

SOLICITANTE : CAREG
 MUESTRA : SUELO
 PROCEDENCIA : LIMALIMA/LURIN
 REFERENCIA : H R. 5174
 FECHA : 20/01/04

Número Muestra	% Arena (2 - 0.05mm)	% Arena muy Gruesa (2.00 - 1.00mm)	% Arena Gruesa (1.00 - 0.05mm)	% Arena Media (0.05 - 0.25mm)	% Arena Fina (0.25 - 0.10mm)	% Arena muy Fina (0.10 - 0.05mm)	% Limo (0.05 - 0.002mm)	% Arcilla (< 0.002mm)
Lab	CLAVE							
0071		98	8.38	46.42	36.52	9.30	2	0



Dg. Rubén Bazan Tapia
 Jefe del Laboratorio

Av. La Universidad s/n. La Molina. Campus UNALM - Telfs.: 349-5669 349-5647 Anexo 222 Telefáx: 349-5622 e-mail: lab.suelo@lamolina.edu.pe

**Anexo 3(b): Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina
 "Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes"**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMÍA
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS - ESPECIAL EN SUELO

SOLICITANTE : CAREC
 MUESTRA : SUELO
 PROCEDENCIA : LIMAJLIMAJLURIN
 REFERENCIA : H.R. 5174
 FECHA : 27/01/04

LAB	Número Muestra CLAVE	Cl Sol ppm	SO ₄ Sol ppm	NST ppm	B Sol ppm	Cu Disp. ppm	Fe Disp. ppm	Mn Disp. ppm	Zn Disp. ppm	Pb ppm	Cd ppm	Cr ppm
0071		380.0	345.0	1191.0	3.4	0.7	10.8	3.3	3.9	3.28	1.25	1.25



Ing. Rubén Bazán Tapia
 Jefe del Laboratorio

ipdf

Av. La Universidad s/n. La Molina. Campus UNALM
 Telf.: 349-5669 349-5647 Anexo 222 Telefax: 349-5622
 e-mail: lab.suelo@lamolina.edu.pe

Anexo 3(c): Resultado de la caracterización textural de la arena realizada por el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina "Laboratorio de análisis de suelo, plantas, agua y fertilizantes".

**LECTURA DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS CEPAS DE LA
SEÑORITA PIERINA DE LA UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

CEPA	ABSORVANCIA	U.A.E./ml
1	0.640	1.029
2	0.558	0.683
5	0.380	0.466
7	0.175	0.214
9.1	0.764	0.936
9.2	1.140	1.397
10	0.72	0.088
11	0.64	0.078
12	0.245	0.300
14	0.90	0.110
15	0.742	0.909
24	0.170	0.208
35	0.430	0.527

Fernando Merino Rafael

Anexo 4(a): Resultado del análisis de la actividad emulsificante de las bacterias realizada en el laboratorio de biología de la Universidad Nacional de San Marcos

a) Cultivo Bushnell Haas, para 1000 mL

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- se necesita 0.2 g
- K_2HPO_4 ----- se necesita 1.0 g
- KH_2PO_4 ----- se necesita 1.0 g
- CaCl_2 ----- se necesita 0.02 g
- FeCl_3 al 60 % ----- se necesita 2 gotas
- Agua destilada

b) Solución salina, al 0.85 %

- 0.85 g de cloruro de Na en 100 mL de agua destilada
- caldo nutritivo

c) Medio Mínimo de Goldman

- Fosfato ácido dipotásico 18 g
- fosfato diácido de potasio 6 g
- sulfato de magnesio 0.02 g
- sulfato diamónico 4 g
- etanol 20 mL
- agua destilada 1000 mL
- pH final 7
- esterilización a 121 °C por 15 minutos
- extracto de levaduras al 3 %

Anexo 4(b): Receta de la preparación de los medios de cultivo Bushnell Haas, solución salina al 0.85 % y el Medio Mínimo de Goldman

api 20 NE

CE REF: C85

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprijndelse / Pochodzenie

PIRELLA GÖTTSCHE LOWE

24 h	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
48 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	NU	TRP	DEL	DEL	ESC	DEL	PRG	IGLU	LABA	WASH	OX							
24 h	2	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
48 h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Outros testes / Altri test / Outros testes /
 Άλλα εξετάσεις / Άλλα tester /
 Andre tests / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση:
 Αγία, μαρτυρία

api 20 NE

CE REF: C85

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprijndelse / Pochodzenie

PIRELLA GÖTTSCHE LOWE

24 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	NU	TRP	DEL	DEL	ESC	DEL	PRG	IGLU	LABA	WASH	OX							
24 h	2	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
48 h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Outros testes / Altri test / Outros testes /
 Άλλα εξετάσεις / Άλλα tester /
 Andre tests / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση:
 Βουκάλι, σερπικό

api 20 NE

CE REF: C85

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprijndelse / Pochodzenie

PIRELLA GÖTTSCHE LOWE

24 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	NU	TRP	DEL	DEL	ESC	DEL	PRG	IGLU	LABA	WASH	OX							
24 h	2	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
48 h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Outros testes / Altri test / Outros testes /
 Άλλα εξετάσεις / Άλλα tester /
 Andre tests / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση:
 Βουκάλι, σερπικό

Anexo 5(a): Resultado de la Prueba de API 20 NE

API 20 NE

REF: CB 32

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

NUMERICUM

	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+		
24 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
48 h	1			4			2			0			2			4			4		
	1						2			0			0			0			4		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andere testar /
 Andre teste / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση:

Brevun vesicularis

API 20 NE

REF: CB 1

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

NUMERICUM

	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
24 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
48 h	1			0			2			0			0			0			4		
	1			0			2			0			0			0			4		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andere testar /
 Andre teste / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση:

Aer. salm. mass/achro

Anexo 5(b): Resultado de la prueba de API 20 NE



ENVIROLAB-PERU SAC.

Environmental Laboratories Peru SAC

INFORME DE ENSAYO N° 40583

Solicitante: C A R E C

Domicilio Legal: Av. Las Amas 240
San Borja

Tipo de Muestra: Suelo

Plan de Muestreo: LM-24-01 (ENVIROLAB)

Solicitud de Análisis: MAY-063

Procedencia de la Muestra: Pozas Refinería Conchán.

Fecha de Ingreso: 04/05/20

Código ENVIROLAB-PERU: 40583

Referencia: Cotización 475/04/GG

Análisis : Hidrocarburos Totales **Método de Referencia:** SM 5520F

Código de Laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Hora de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
40583-01	Pta. 1	04/05/20	12:10	20	3019	mg/Kg	04/05/26
40583-02	Pta. 2	04/05/20	12:10	20	2418	mg/Kg	04/05/26
40583-03	Pta. 3	04/05/20	12:10	20	3648	mg/Kg	04/05/26
40583-04	Pta. 4	04/05/20	12:10	20	2609	mg/Kg	04/05/26
40583-05	Pta. 5	04/05/20	12:10	20	2008	mg/Kg	04/05/26
40583-06	Pta. 6	04/05/20	12:10	20	2479	mg/Kg	04/05/26
40583-07	Pta. 7	04/05/20	12:10	20	1769	mg/Kg	04/05/26
40583-08	Pta. 8	04/05/20	12:10	20	2619	mg/Kg	04/05/26
40583-09	Pta. 9	04/05/20	12:10	20	2268	mg/Kg	04/05/26
40583-10	Pta. 10	04/05/20	12:10	20	2769	mg/Kg	04/05/26
40583-11	Pta. 11	04/05/20	12:10	20	4049	mg/Kg	04/05/26
40583-12	Pta. 15	04/05/20	12:10	20	3159	mg/Kg	04/05/26
40583-13	Pta. 17	04/05/20	12:10	20	4269	mg/Kg	04/05/26
40583-14	Pta. 18	04/05/20	12:10	20	3729	mg/Kg	04/05/26
40583-15	Pta. 19	04/05/20	12:10	20	3220	mg/Kg	04/05/26
40583-16	Pta. 20	04/05/20	12:10	20	3487	mg/Kg	04/05/26

Condición y Estado de la Muestra Ensayada: Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.
Hidrocarburos: SM 5520.F. Hidrocarburos (Método Gravimétrico).
 "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater".
 20th. Ed 1998.

JAIS BUENO CARRERA
 Gerente General
 C.I.P. N° 6618
 Lima, Peru, 04/05/20

Nota:
 - Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
 - Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto.

Página 1/1

Av. La Marina 3059 San Miguel - Lima 32 PERU

Tel: (51) 576-1185 Telefax: (51) 576-1093 E-Mail: envirolab@envirolabperu.com.pe Web: www.envirolabperu.com

Anexo 6: Resultado del análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) por el método gravimétrico para la Prueba de degradación en terrarios, realizado en el laboratorio ENVIROLAB



ENVIROLAB-PERU S.A.C.

Environmental Laboratories Peru S.A.C.

INFORME DE ENSAYO N° 40294

Solicitante: CAREC
 Domicilio Legal: Av. Las Armas N°260
 San Borja
 Tipo de Muestra: Arena Preparada (1)
 Plan de Muestreo: ---
 Subcódigo de Análisis: 1523-094
 Procedencia de la Muestra: Clonchun
 Fecha de Ingreso: 04/02/19
 Código ENVIROLAB PERU: 40294
 Referencia: Muestra preparada por el cliente

Código de Lab.: 40294-01 Fecha de Muestreo: 04/02/19
 Descripción: MUESTRA PILOTO

Determinación	Método	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (PAH's)					
Naftaleno	EPA 8100	0.05	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Acenafteeno	EPA 8100	0.03	0.04	mg/Kg	04/02/19
Acenafteeno	EPA 8100	0.05	0.06	mg/Kg	04/02/19
Fluorcen	EPA 8100	0.02	0.12	mg/Kg	04/02/19
Fenaceno	EPA 8100	0.02	0.20	mg/Kg	04/02/19
Acrideno	EPA 8100	0.02	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Fluoranteno	EPA 8100	0.02	0.05	mg/Kg	04/02/19
Pireno	EPA 8100	0.02	0.05	mg/Kg	04/02/19
Benzo(a)piraceno	EPA 8100	0.02	0.02	mg/Kg	04/02/19
Crineno	EPA 8100	0.03	0.03	mg/Kg	04/02/19
Benzo(b)fluoraceno	EPA 8100	0.05	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Benzo(k)fluoraceno	EPA 8100	0.04	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Benzo(a)pireno	EPA 8100	0.05	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Indeno(1,2,3-c)pireno	EPA 8100	0.32	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Dibenz(a,h)piraceno	EPA 8100	0.12	N.D.	mg/Kg	04/02/19
Benzo(g,h,i)periceno	EPA 8100	0.11	N.D.	mg/Kg	04/02/19

Condición y Estado de la Muestra Ensayada: La muestra llegó a temperatura ambiente al Laboratorio.
 Nota: La fecha de muestreo, es dato proporcionado por el cliente.
 Muestra Piloto: (1) Composición: 3Kg de Arena Limpia mezclada con 75g de Brea.
 Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (PAH's): EPA 8100 "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons",
 "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes".

LUIS BLANCO CARBAJAL
 Gerente General
 C.I.P. N° 6671
 Lima, Perú.
 04/02/2019

Nota: Los resultados, expresados en este informe, sólo se refieren a la muestra indicada.
 Estos resultados no sirven para utilizarlos como una certificación de conformidad con normas del producto

Av. La Marina 3039 San Miguel - Lima 32 PERU
 Telf: (51) 578-1186 Telefax: (51) 578-1053 E-Mail: envirolab@envirolabperu.com.pe Web: www.envirolabperu.com

Anexo 7: Resultado del análisis de hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH), presentes en la Prueba de degradación en terrarios

Anexo 8: Relación de la temperatura de las biopilas en la Prueba de compostaje

Días de compostación	T° promedio (°C) biopila de control
1	25
10	59.1
22	42.7
24	40.4
29	38.5
31	69.8
38	42.5
45	40.4
52	37.4
59	35.4
66	45.7
73	33.6
75	26.6
87	24.9
94	27.3
101	26.8
108	24.9
115	28.3
122	23.2

Días de compostación	Temperatura promedio en °C de las biopilas				
	Biopila C1	Biopila CB1	Biopila CB2	Biopila C2	Biopila C3
1	26	29	29.5	29.7	29.5
8	59.9	63	59.3	57.57	61.7
15	52	54.6	51.4	47.03	51.9
22	39.2	41.7	44.3	45.6	44.6
29	41	39.6	40.5	41.2	44.3
34	38	39.9	42.8	61.97	41.9
41	43	51.2	52	61.97	50.6
43	47	53.7	52.9	46.03	49.2
50	58	68.7	65.7	34.47	61.4
54	42.1	44	42.5	35.1	41.9
57	37.6	42.6	43.7	33.83	39.9
64	34.4	41.5	36.4	47.67	42.4
71	29.6	37.2	44	34.47	38.5
78	49.1	32.6	38.7	25.87	33.9
85	34.5	33.5	47.7	26.2	30.1
92	27.5	39.8	31.1	24.7	31.3
99	23.7	27.8	28	25.27	28.3
106	21.9	28.1	25.3	26.37	23.3
113	21.9	24.1	24.6	28	23.2
120	19.6	22.5	23.2	23.73	

INFORME DE ENSAYO
N° 403202

Solicitante: CAREC
 Domicilio Legal: Av. Las Artes N°260
 San Borja
 Tipo de Muestra: Botta
 Plan de Muestreo: ---
 Solicitud de Análisis: MAR-202
 Procedencia de la Muestra: ---
 Fecha de Ingreso: 04/03/21
 Código ENVITOLAB-PRU: 403202
 Referencias: Convención 298/04/CIG

Análisis:		Hidrocarburos Totales (C ₆ -C ₁₀)		Método:		EPA 8015-M	
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis	
403202-01	M-1	---	8	20971	mg/Kg	04/04/21	
403202-02	M-2	---	8	36271	mg/Kg	04/04/21	
403202-03	M-3	---	8	36083	mg/Kg	04/04/21	

Condición y estado de la muestra entregada: LAS MUESTRAS FREGARON A TEMPERATURA AMBIENTE DE LABORATORIO.
 Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (CO-C10) Cromatográfico.

LUIS HUENO CARBAJAL
 Gerente General
 C.I.P. N° 6618
 Lima, Perú. 02/04/16

Nota: - Los resultados presentados corresponden solo a la muestra indicada.
 - Estos resultados no deben ser utilizados como una sustitución de certificación con fines del producto.

Anexo 9(a): Resultado del análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de marzo



ENVIROLAB-PERU S.A.C.

Environmental Laboratories Peru S.A.C.

INFORME DE ENSAYO

N° 405128

Solicitante: CAREC
Domicilio Legal: Av. Las Artes N°260
San Boja
Tipo de Muestra: Suelo
Plan de Muestreo: —
Solicitud de Análisis: MAY-128
Procedencia de la Muestra: —
Fecha de Ingreso: 04/05/28
Código ENVIROLAB-PERU: 405128
Referencia: Muestra proporcionada por el cliente

Análisis :		Hidrocarburos Totales (C ₉ -C ₄₀)	Método de Referencia:		EPA 8015-M	
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
405128-01	2.5 % Bio	—	—	3008	mg/Kg	04/05/28
405128-02	5.0 % Pila	—	—	3879	mg/Kg	04/05/28
405128-03	5.0 % Pila	—	—	4310	mg/Kg	04/05/28
405128-04	7.5 %	—	—	6145	mg/Kg	04/05/28

Condición y Estado de la Muestra Ensayada: Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.
Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (C₉-C₄₀) Cromatografía

LARS BUENO CARBAJAL
Gerente General
C.I.P. N° 6618
Lima, Perú. 04/06/02

Nota: - Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
- Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto.

Page 1 of 1

Av. La Marina 3059 San Miguel - Lima 32 PERU
Telf.: (51) 578-1186 Telefax: (51) 578-1063 E-Mail: envirolab@envirolabperu.com.pe Web: www.envirolabperu.com

Anexo 9(b): Resultado del análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de mayo

INFORME DE ENSAYO
N° 406158

Solicitante: C A R E C
 Domicilio Legal: Av. Los Andes N° 266
 San Borja
 Tipo de Muestra: Suelo
 Plan de Muestreo: ---
 Solicitud de Análisis: JLN-158
 Procedencia de la Muestra: ---
 Fecha de Ingreso: 04/06/25
 Código ENVIROLAB-PERÚ: 406158
 Referencia: Cruzación 298/04/GG

Análisis : Mercurio		Método de Referencia:			CVAFS	
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
406158-01	2.5 %	04/05/26	0.010	0.196	mg/Kg	04/07/03
406158-02	2.5 %	---	0.010	0.305	mg/Kg	04/07/03
406158-03	2.0 %	04/06/25	0.010	0.154	mg/Kg	04/07/03
406158-04	5.0 %	2 Meses	0.010	0.507	mg/Kg	04/07/03

Análisis : Hidrocarburos Totales (C ₇ -C ₂₄)		Método de Referencia:			EPA 8015-M	
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
406158-05	2.5 %	04/05/26	8	10543	mg/Kg	04/06/28

Condición y Estado de la Muestra: Ensayada: Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.
 Nota: Las fechas de muestreo son datos proporcionados por el cliente.
 Resultados de Mercurio, expresados en peso húmedo.
 Mercurio: CVAFS Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry.
 Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (C₇-C₂₄) Cromatografía

LUIS BUENO CARBAJAL
 Gerente General
 C.I.R. N° 6618
 Lima, Perú. 01697307

Nota: - Los resultados proporcionados con respecto sólo a la muestra analizada.
 - Estos resultados no deben ser utilizados como un certificado de conformidad con normas del producto.

Anexo 9(c): Resultado del análisis de hidrocarburo total de petróleo (TPH) del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de junio y julio

INFORME DE ENSAYO
N° 40790

Solicitante: CAREC
 Domicilio Legal: Av. Las Artes N°260
 San Boja
 Tipo de Muestra: Arena
 Plan de Muestreo: ---
 Solicidad de Análisis: JH -090
 Procedencia de la Muestra: ---
 Fecha de Ingreso: 04/07/22
 Código ENVITROLAB-PERU: 40790
 Referencia: Cotización N° 686/04/GG

Análisis:		Hidrocarburos Totales C ₉ -C ₄₀		Método de Referencia:		EPA 8015-M	
Código de laboratorio	Descripción de muestra	Fecha de Muestreo	Límite de detección	Resultado	Incertidumbre (±)	Unidad	Fecha de Análisis
40790-01	2.5 % Inicial	---	8	2168	208	mg/Kg	04/07/22
40790-02	5.0 % Inicial	---	8	4653	445	mg/Kg	04/07/22
40790-03	7.5 % Inicial	---	8	4459	428	mg/Kg	04/07/22
40790-04	2.5 % Botta	---	8	1914	184	mg/Kg	04/07/22
40790-05	5.0 % Botta	---	8	2084	200	mg/Kg	04/07/22
40790-06	7.5 % Botta	---	8	1007	97	mg/Kg	04/07/22
40790-07	M.?	---	8	2472	237	mg/Kg	04/07/22

La incertidumbre de la medición ha sido calculada con un factor de cobertura k = 2 para un nivel de confianza aproximado del 95%.
 Condiciones y Estado de la Muestra Ensayada: Las muestras llegaron a temperatura ambiente al Laboratorio.
 Hidrocarburos Totales Extraíbles: EPA 8015-M Hidrocarburos Totales Extraíbles (C₉-C₄₀) Cromatografía

LUIS BUENO-CARRATAL
 Gerente General
 C.I.P. N° 0616
 Lima, Peru. 04/07/22

Nota: - Los resultados presentados corresponden solo a la muestra indicada.
 - Estos resultados no deben ser utilizados como una verificación de conformidad con normas del producto.

Anexo 9(c): Resultado del análisis de hidrocarburo total de petróleo (TPH) del compost obtenido de la Prueba de compostaje en el mes de junio y julio (...continuación)

ANEXO CUADRO 5, Criterios para terrenos contaminados, MEM.

ELEMENTOS	SUELO mg/kg (ppm) de materia seca		
	A	B	C
METALES PESADOS			
Arsénico	5	30	50
Bario	200	500	2000
Cadmio	1,0	5	20
Cromo	20	250	800
Cobalto	15	50	300
Cobre	30	100	500
Plomo	50	500	1000
Mercurio	0,1	2	10
Molibdeno	4	10	40
Niquel	20	100	500
Selenio	2	3	10
Plata	2	20	40
Estaño	5	50	300
zinc	80	500	1500
OTROS INORGANICOS			
Bromuro (libre)	20	50	300
Cianuro (libre)	1	10	100
Cianuro (libre) (Cn total)	5	50	500
Fluoruro (libre)	200	400	2000
Azufre (total)	500	1000	2000
HIDROCARBUROS AROMATICOS MONOCICLICOS (HAMs)			
Benceno	0,1	0,5	5
Etil-benceno	0,1	5	50
Tolueno	0,1	3	30
Clorobenceno	0,1	1	10
1,2-diclorobenceno	0,1	1	10
1,3-diclorobenceno	0,1	1	10
1,4-diclorobenceno	0,1	1	10
Xileno	0,1	5	50
estireno	0,1	5	50
COMPUESTOS FENOLICOS			
Fenoles no clorados (cada uno) (2)	0,1	1	10
Clorofenoles (cada uno) (3)	0,1	0,5	5
Clorofenoles (total)	0,1	1,0	10
HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS (HAPs)			
Benzo (a) antraceno (4)	0,1	1	10
1,2-benzotraceno	0,1	1	10
7,2-dimetil	0,1	1	10
Dibenzo (a,h) antraceno (4)	0,1	1	10
Criseno	0,1	1	10
3-metilcolantreno	0,1	1	10

Anexo 10: Normativa peruana de la Dirección General de Asuntos Ambientales del Ministerio de Energía y Minas de Perú (DGAA-MINEM) "Criterios para terrenos contaminados"

Benzo (b) fluoranteno (4)	0.1	1	10
Benzo (j) fluoranteno	0.1	1	10
Benzo (k) fluoranteno (4)	0.1	1	10
Benzo (g,h,i) pirileno	0.1	1	10
Benzo (c) penantreno	0.1	1	10
Pireno (4)	0.1	10	100
Benzo(a)pireno (4)	0.1	1	10
Dibenzo(a,h)pireno	0.1	1	10
Dibenzo(a,i)pireno	0.1	1	10
Dibenzo(a,l)pireno	0.1	1	10
Indenol(1,2,3-cd)pireno(4)	0.1	1	10
Acenapteno	0.1	10	100
Acenaptileno	0.1	10	100
Antraceno	0.1	10	100
Fluoranteno	0.1	10	100
Fluoreno	0.1	10	100
Naftaleno (4)	0.1	5	50
Fenantreno	0.1	5	50
HAPs (total)	1	20	200
HIDROCARBUROS CLORINADOS			
Alifatico (cada uno) (5)	0.3	5	50
(total) (5)	0.3	7	70
Clorobenceno (6) (cada uno)	0.1	2	10
(total)	0.1	4	20
Hexaclorobenceno	0.1	2	10
Bifenilos policlorinados (7)	0.1	5	50
PARAMETROS GENERALES (8)			
Aceite mineral y grasa	100	1000	5000
Hidrocarburos alifaticos livianos	100	150	800

Notas al pie de pagina-cuadro I

- 3.2.7.1.1 para utilizarse como criterio minimo
- 3.2.7.1.2 los compuestos fenolicos no clorinados incluyen:
- 2,4-dimetilfenol,
 - 2,4-dinitrofenol,
 - 2-metil-4,6-dinitrofenol
 - 2-nitrofenol,
 - 4 nitrofenol
 - fenol
 - cresol
 - (orto, meta y para).
- 3.2.7.1.3 Clorofenoles que incluyen:
- Ortoclorofenol
 - Metaclorofenol
 - Paraclorofenol
 - 2,6-diclorofenol

Anexo 10: Normativa peruana de la DGAA "Criterios para terrenos contaminados"
 (...continuación)

2,5-diclorofenol
2,4-diclorofenol
3,5-diclorofenol
2,3-diclorofenol
2,4-diclorofenol
2,4,6-triclorofenol
2,3,6-triclorofenol
2,4,5-triclorofenol
2,3,5-triclorofenol
2,3,4-triclorofenol
3,4,5-triclorofenol
2,3,5,6-tetraclorofenol
2,3,4,5-tetraclorofenol
2,3,4,6-tetraclorofenol
pentaclorofenol

3.2.7.1.4 Si un lugar se contamina con alquitran mineral, se deberán aplicar estos criterios.

3.2.7.1.5 Los hidrocarburos alifáticos clorinados volátiles que incluyen:

Cloroformo
1,1-dicloroetano
1,2-dicloroetano
1,1-dicloroetileno
1,2-dicloroetileno
diclorometano
1,2-dicloropropano
1,2-dicloropropano (cis y trans)
1,1,2,2-tetracloroetano
tetracloroetano
tetracloruro de carbon
1,1,1-tricloroetano
1,1,2-tricloroetano
tricloroetileno

3.2.7.1.6 Clorobenceno que incluyen:

Triclorobencenos (todos los isómeros)
Tetraclorobencenos (todos los isómeros)
pentaclorobenceno

3.2.7.1.7 Bifenilos policlorinados que incluyen:

Arocloros 1242, 1248, 1254 y 1260

3.2.7.1.8 Solo para uso como criterio de investigación.

- A : Límites aproximados de detección analítica para niveles de línea base natural y orgánica para metales e inorgánicos
B : Por debajo de esta cifra el suelo está ligeramente contaminado y se encuentra contaminado si la supera.
C : El suelo se encuentra considerablemente contaminado.

**Anexo 10: Normativa peruana de la DGAA "Criterios para terrenos contaminados"
(...continuación)**