



# BIORREMEDIACIÓN AMBIENTAL

---

“La Biodiversidad al  
Servicio del Ambiente”



TANIA OÑA  
MIGUEL GUALOTO





# BIORREMEDIACIÓN AMBIENTAL

---

“La Biodiversidad al  
Servicio del Ambiente”

TANIA OÑA  
MIGUEL GUALOTO



# BIORREMEDIACIÓN AMBIENTAL

## “La Biodiversidad al servicio del ambiente”

### **Editor de la serie:**

Créditos fotográficos: Julio Rondal, Ronald Lavigne, Jorge Mideros, Francisco Caicedo, Andrés Gómez, Pablo Molina, Danny Reascos.

**Diseño y Diagramación:** Editorial UTN

**Número de páginas:** 433

**ISBN:**



### **Revisores:**

Dr. Modesto Correoso Rodríguez

Docente Investigador Dpto. Ciencias de la Tierra y la Construcción, Ciencias de la Vida Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Dr. Juan Manuel Cevallos

Docente Investigador del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Escuela Politécnica del Litoral ESPOL

Publicación de la Universidad Técnica del Norte, Ibarra – Ecuador. Todos los derechos están reservados. Se prohíbe la reproducción y venta.



El activista no es quien dice que el río está sucio.

El activista es quien limpia el río.

Ross Perot.

# AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo fue factible gracias a la Universidad Técnica del Norte y sus autoridades, por su constante apoyo la investigación, con sus laboratorios, docentes y estudiantes, un reconocimiento por hacernos partícipes de su visión en el desarrollo de la investigación en el norte del país.

Al Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada (INOCAR), por apoyar los trabajos de investigación en la Estación Pedro Vicente Maldonado en Isla Greenwich (Península Antártica) y el uso de esa información para este libro.

A todos los profesionales, estudiantes e investigadores que participaron en la ejecución de los trabajos de biorremediación de campo y laboratorio, cuyo trabajo permitió levantar la información que compartimos hoy en el presente libro.



# ÍNDICE

PREFACIO	14
<b>CAPÍTULO I BIORREMEDIACIÓN</b>	<b>18</b>
1. HISTORIA	19
1.1. Edad antigua	19
1.2. Edad media: Renacimiento	20
1.3. Edad moderna: Revolución industrial	21
1.4. Tiempo actual	24
1.5. Alternativas de solución a la polución	26
1.6. Bibliografía	30
<b>CAPÍTULO II GENERALIDADES SOBRE BIORREMEDIACIÓN</b>	<b>32</b>
2.1. Definición	33
2.2. Campos de aplicación	34
2.2.1. Tratamiento de residuos industriales	36
2.2.2. Tratamiento de metales pesados	36
2.2.3. Minería	37
2.2.4. Tratamiento de suelos contaminados con pesticidas e hidrocarburos	38
2.2.5. Tratamiento de residuos agroindustriales	42
2.2.6. Tratamiento de aguas residuales urbanas	42
2.2.7. PCBs	43
2.2.8. Compuestos organoclorados y organofosforados	46
2.2.9. Cortes y rípios de perforación	48
2.2.10. Lodos residuales industriales aceitosos	49
2.3. Factores que inciden sobre la biorremediación	50
2.3.1. Temperatura	51
2.3.2. Potencial de hidrógeno	54
2.3.3. Conductividad	55
2.3.4. Humedad	58
2.3.5. Aireación	58
2.3.6. Tipo y concentración de Contaminante	59
2.3.7. Estado físico del contaminante	60
2.3.8. Tipo de suelos y propiedades mecánicas del sustrato	61

2.3.9. Influencia de las propiedades del suelo	62
2.3.10. Nutrientes	62
2.3.11. Concentración de sales	65
2.3.12. Presencia de metales pesados	66
2.3.13. Efecto de la intemperie	66
2.4. Procedimientos para realizar una biorremediación	67
2.4.1. Visita e inspección al sitio afectado por contaminación	67
2.4.2. Muestreo y análisis de suelos	68
2.4.3. Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos in situ	72
2.4.4. Pruebas de biodegradación	73
2.4.5. Elección de la metodología de tratamiento	73
2.4.6. Definición del equipo profesional que ejecute el trabajo	74
2.4.7. Definición de las normativas de Bioseguridad aplicarse en el campo y en laboratorio	74
2.4.8. Marco legal e institucional bajo cuya óptica se ejecutará en trabajo	75
2.5. Estrategias de Biorremediación	76
2.5.1. Estabilización	76
2.5.2. Deshidratación	76
2.5.3. Cambio de estructura	77
2.5.4. Maduración	77
2.5.5. Bioaumentación	78
2.5.6. Bioestimulación	80
2.5.7. Control de parámetros de proceso	81
2.5.8. Conclusiones y perspectivas futuras	81
2.5.9. Bibliografía	82
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>92</b>
<i>ORGANISMOS EMPLEADOS EN BIORREMEDIACIÓN</i>	92
3.1. Introducción	92
3.2. Bacterias	94
3.3. Actinomyces	101
3.4. Cianobacterias	105
3.5. Hongos y levaduras	108
3.6. Plantas	114

3.6.1. Macrófitos emergentes	117
3.6.2. Macrófitos sumergidos	119
3.6.3. Macrófitas flotantes	121
3.6.3.1. Flotantes libres	121
3.6.3.2. Plantas macrófitas arraigadas	122
3.7. Otros organismos	123
3.7.1. Algas	123
3.7.2. Organismos genéticamente modificados en Biorremediación	128
3.8. Conclusiones y perspectiva futuras	132
3.9. Bibliografía	133
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>150</b>
<i>METODOLOGÍAS DE TRATAMIENTO</i>	<i>150</i>
4.1. Compostaje	150
4.1.1. Pila estática	154
4.1.2. Pila venteada	157
4.1.3. Pilas con volteo	159
4.1.4. Compostaje anaeróbico	161
4.2. Landfarming	165
4.2.1. Requisitos para los sitios elegidos para Landfarming	167
4.2.2. Operaciones unitarias de un trabajo de Landfarming	168
4.2.3. Esquema de un sitio de landfarming	169
4.2.4. Particularidades operativas de landfarming	171
4.2.5. Landfarming en plataforma cubierta	177
4.2.6. Landfarming en piscina	181
4.3. Bioventing	192
4.4. Bioflushing	195
4.5. Biorreactores	196
4.6. Fitorremediación	198
4.6.1. Procesos de fitorremediación	199
4.6.2. Fitorremediación de metales pesados	201
A. Especies vegetales empleados en la fitorremediación de metales pesados	202
B. Especies utilizadas en fitorremediación de aguas residuales	205
C. Fitorremediación de suelos	207
D. Fitorremediación de residuos mineros	209
4.7. Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales	211

4.7.1. Tipos de humedales	213
4.7.1.1. Humedales artificiales de flujo superficial libre	215
4.7.1.2. Humedales de flujo horizontal subsuperficial	216
4.7.1.3. Humedales de flujo vertical subsuperficial	217
4.7.1.4. Humedales híbridos (HH)	218
4.7.1.5. Humedales de tratamiento flotante	219
4.8.2. Diseño y construcción	220
4.8.2.1. Ventajas	221
4.8.2.2. Materiales de construcción	222
4.8.2.3. Parámetros de diseño	222
4.9. Conclusiones y perspectivas futuras	232
4.10. Bibliografía	233
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>246</b>
<i>CINÉTICA DE LA BIORREMEDIACIÓN Y BALANCE DE MASAS</i>	246
5.1. Introducción	246
5.2. Curva de crecimiento microbiano	247
5.3. Tasa de crecimiento microbiano	250
5.4. Tasa de Biodegradación	251
5.5. Tiempo de vida media	252
5.6. Eficiencia	252
5.7. El rendimiento	252
5.8. Balance de masa	253
5.9. Ecuación estequiométrica	255
5.10. Pruebas de tratabilidad	257
5.11. Protocolo de pruebas de biorremediación de suelos y material vegetal contaminados con hidrocarburos, lodos residuales aceitosos	257
5.12. Bibliografía	270
<b>CAPÍTULO VI</b>	<b>274</b>
<i>BIOSEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL</i>	274
6.1. Antecedentes	276
6.2. Marco legal	277
6.3. Normativa para trabajos de remediación en campo	281
6.3.1. Control de vehículos	281

6.3.2. Operadores de la estación de trabajo	282
6.3.3. Visitas	282
6.3.4. Gestión de equipos de protección personal	283
6.3.5. Gestión de los Equipos de Protección Individual frente al riesgo biológico	284
6.3.6 Normalización Interna de uso	288
6.3.7. Adquisición y distribución	289
6.3.8. Supervisión e implantación	290
6.4. Gestión de equipos de protección ambiental (EPA)	291
6.5. Gestión integral de residuos	294
6.6. Manejo de muestras	295
6.6.1. Recipientes para muestras	295
6.6.2. Transporte de muestras dentro de la instalación	296
6.6.3. Recepción de las muestras	296
6.6.4. Apertura de los envases/embalajes	297
6.7. Manejo de cultivos	297
6.7.1 Preparación de pool microbiano	298
6.7.2 Transporte de pool microbiano	298
6.7.3 Descarga en tanques	299
6.7.4 Aplicación del pool en unidades de tratamiento	300
6.8. Control y monitoreo	300
6.8.1 Lixiviados	300
6.8.2 Microorganismos	301
<i>Laboratorio</i> (World Health Organization, 2005)	301
<i>Campo</i>	301
6.8.3 Monitoreo de residuos	301
6.8.4 Monitoreo del tratamiento de aguas	302
6.8.5 Monitoreo del tratamiento biológico de residuos	302
6.9 Comité de Bioseguridad	302
6.9.1 Conformación	303
6.9.2 Funciones	303
6.10 Bibliografía	304
<b>CAPÍTULO VII</b>	<b>308</b>
<i>ESTUDIO DE CASOS</i>	308
7.1 Estudio de caso: Tratamiento biológico de cortes y rios de perforación de la Qmax Ecuador	309
7.1.1. Objetivos de Qmax-Ecuador	311

7.1.2. Objetivos de los trabajos previos	311
7.1.3. Ejecución de los trabajos	312
7.1.4. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas	312
7.1.5. Resultados de Qmax-Ecuador	314
7.1.6. Análisis de resultados de Qmax-Ecuador	319
7.1.7. Fase de campo Bloque Tarapoa	322
7.1.8. Resultados de Bloque Tarapoa	328
Bibliografía	329
7.2. Caso de estudio dos: Tratamiento de lodos residuales industriales hidrocarburíferos mediante Landfarming en Plataforma cubierta	332
7.2.1. Introducción caso de estudio dos	333
7.2.2. Objetivo caso de estudio dos	335
7.2.3. Metodología caso de estudio dos	335
7.2.5. Resultados caso de estudio dos	340
7.2.6. Análisis y discusión de resultados caso de estudio dos	345
7.2.7. Conclusiones caso de estudio dos	348
7.2.8. Bibliografía	349
7.3. Estudio de caso tres: Tratamiento de lodos residuales de planta de tratamiento de aguas industriales	352
7.3.1. Antecedentes	352
7.3.2. Introducción	352
7.3.3. Objetivos caso estudio tres	354
7.3.4. Metodología caso de estudio tres	355
7.3.5. Resultados y discusión	359
7.3.6. Conclusiones	368
7.3.7. Recomendaciones	368
7.3.8. Bibliografía	369
7.4. Caso de estudio cuatro: Biorremediación de hidrocarburos utilizando cepas antárticas	372
7.4.1. Resumen	372
7.4.2. Materiales y métodos	372
7.4.3. Resultados caso cuatro	376
7.4.4. Discusión	385
7.4.5. Conclusiones caso cuatro	388
7.4.6. Bibliografía	390

7.5. Caso de estudio cinco: Tratamiento de suelos contaminados por derrame de la línea de flujo del pozo Shushuqui 13	394
7.5.1. Introducción	394
7.5.2. Antecedentes	395
7.5.3. Objetivo General	395
7.5.4. Objetivos Específicos	395
7.5.5. Metodología	296
7.5.6. Resultados y discusión caso cinco	403
7.5.7. Conclusiones y recomendaciones caso cinco	412
7.5.8 Bibliografía	412
7.6 Estudio de caso seis: Biorremediación de residuos de Hidrocarburos de piscinas de residuos de hidrocarburos de TECP-Ecuador	416
7.6.1. Antecedentes	416
7.6.2. Objetivo general del caso seis	417
7.6.3. Objetivos específicos caso seis	417
7.6.4. Metodología	417
7.6.5 Resultados y discusión caso seis	419
7.6.6 Conclusiones caso seis	428
7.6.7 Recomendaciones	429
7.6.8 Bibliografía	429

# PREFACIO

Los microorganismos son los primeros organismos vivos que surgieron en el planeta hace miles de millones de años; desde su surgimiento han venido transformado al planeta en forma conjunta con los fenómenos geológicos, muchos de los recursos naturales que la humanidad aprovecha ahora, son producto de su actividad metabólica. Los detritos de organismos vivos que surgieron posteriormente y la materia orgánica creada por los organismos fotosintéticos, ha sido permanentemente reciclada por la actividad biológica de los microorganismos, permitiendo el flujo permanente de la materia y energía entre los sistemas vivos y el ambiente.

Durante la historia evolutiva del planeta, este proceso natural fue suficiente para garantizar los ciclos biogeoquímicos de los elementos biogénicos; sin embargo, con el surgimiento de la especie humana y su desarrollo, su continuidad se ha puesto en riesgo, en especial por el surgimiento en grandes cantidades de sustancias sintéticas creadas por el hombre. Por su naturaleza química, estas sustancias no son biodegradables o son poco biodegradables, razón por la que se acumulan en los componentes biótico y abiótico de los ecosistemas, generando toxicidad y la consecuente pérdida de biodiversidad.

Bajo estas circunstancias de contaminación masiva a escala mundial, se hace necesario brindar una ayuda a la naturaleza, para que esta elimine la contaminación generada por el hombre y con ello se recupere el equilibrio ecológico del planeta y se garantice la sobrevivencia de la humanidad. La Biorremediación surge como una herramienta dirigida a resolver los problemas de contaminación ambiental, generando las condiciones idóneas para el desarrollo y crecimiento de microorganismos capaces de metabolizar los xenobioticos ambientales.

En el presente libro se abordará en el capítulo I, una breve historia del surgimiento de la biorremediación, señalando los puntos claves de la historia de la humanidad, que han marcado tendencias con relación al control de la contaminación, se señalan las alternativas existentes de lucha contra la contaminación.



El capítulo II, aborda los campos de aplicación de la Biorremediación y la gama de sustancias que puede ser sometida a degradación biológica, detalla los factores de los cuales depende el éxito de la biorremediación, describe las operaciones unitarias necesarias para ejecutar dichos trabajos y las estrategias operativas para mejorar sus resultados.

En el capítulo III, se estudian a los organismos empleados en trabajos de Biorremediación, desde microorganismos hasta macroorganismos: Bacterias, hongos, levaduras, actinomicetos, algas (microalgas), cianobacterias, plantas emergentes, arbustos y especies arbóreas. Especial atención se brinda al empleo de Organismos modificados genéticamente.

El capítulo IV, trata de las metodologías de Biorremediación existentes, detalla sus características operativas (operaciones unitarias), sus ventajas y desventajas, así como el tipo de residuo que mejor degradan, Se describe detalladamente el diseño de sistemas de tratamiento por humedales artificiales. Cada metodología es ilustrada con experiencias propias de los autores.

En el capítulo V, se aborda la cinética y balance de masas en biorremediación, se describen cada uno de los parámetros cinéticos, su importancia y relaciones. Se presenta un protocolo de pruebas de biorremediación, desarrollado a partir de los requisitos planteados por el Ministerio del Ambiente de Ecuador (MAE) a los gestores ambientales para emitir la licencia ambiental de operación.

El capítulo VI, aborda el tema de la bioseguridad, para todos los trabajos campo, especial a atención presta a los riesgos ligados a la producción masiva de microorganismos y al empleo de organismos modificados genéticamente en biorremediación. Resalta la falta de referencias bibliográficas de protocolos de bioseguridad para trabajos de biorremediación a gran escala. No aborda la normativa de bioseguridad de laboratorio.

Finalmente, el capítulo VII, recoge el estudio de casos ejecutados por nuestro equipo desde los años 2002 hasta el 2015, en el territorio ecuatoriano, describe la problemática y las estrategias metodológicas implementadas para solucionar los problemas ambientales de nuestro entorno. Los resultados obtenidos evidencian que las estrategias empleadas fueron las co-

rrectas, muchas de nuestras iniciativas y resultados, han sido ratificadas en estudios de micro y mesocosmos en artículos científicos publicados en esta última década.

Estamos conscientes de que expertos y especialistas en la materia, potenciales lectores de nuestro trabajo pudieran encontrar falencias técnicas y metodológicas, por lo que debemos aclarar que el 90% de las experiencias analizadas, no fueron planteadas como investigaciones científicas, sino como, una respuesta a problemas específicos. Primero se ejecutaron los trabajos de campo (basados en pruebas preliminares de mesocosmos que constituyeron una guía) y solamente después de su entrega exitosa, se realizaron las interpretaciones del caso, contrastando los resultados de campo con los de laboratorio.

El presente Libro, "La Biodiversidad al servicio del ambiente", está dirigido a estudiantes, docentes y especialistas en ingeniería ambiental, recursos naturales, ciencias biológicas, conservación ambiental, desarrollo sustentable, minas y petróleo y Gestión ambiental.



# • CAPÍTULO I •

## BIORREMEDIACIÓN

# CAPÍTULO I

## BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización o una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de metales.

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80. Los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos.

***“La Biorremediación es un proceso natural desarrollado a lo largo de toda la historia evolutiva de la Biosfera; como mecanismo de autodepuración y de recuperación de nutrientes, para mantener los ciclos biogeoquímicos, responsables del equilibrio de los ecosistemas”<sup>1</sup>.***

La biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el empleo de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el ambiente.

La Biorremediación es una biotecnología, porque emplea organismos vivos, sus enzimas o metabolitos para un determinado fin, apoyado por la tecnología (métodos de análisis instrumental). En general sus técnicas son específicas para casos particulares, porque dependen directamente de las condiciones del ecosistema a recuperar.

A veces, biorremediar un ambiente contaminado puede requerir de la creación de un microorganismo genéticamente modificado (OGMs), que sea eficiente para eliminar algún contaminante específico; su creación, se apoya en la ingeniería genética y en la Biología molecular de amplio desarrollo. El empleo de OGMs en biorremediación enfrenta serios problemas de carácter ético moral, jurídicos y legales por el riesgo asociado a su liberación en el entorno natural, en ecosistemas sensibles y de amplia biodiversidad

<sup>1</sup> Definición propuesta por el autor

como los ecosistemas ecuatorianos. Por otro lado, el Ecuador carece de un marco regulatorio de protección y uso racional de la diversidad genética, factor que constituye una gran limitante, para iniciar estudios serios y sustentados de Biorremediación ambiental con empleo de organismos modificados genéticamente

## 1. HISTORIA

### 1.1. Edad antigua

Desde el surgimiento de la sociedad humana, sus actividades cotidianas se limitaban a la búsqueda de alimentos y a la lucha por la sobrevivencia. Su modo de vida nómada desperdigó los residuos generados en sus actividades cotidianas en amplias zonas, permitiendo su biodegradación natural, sin llegar a acumularse en grandes cantidades y constituirse en un problema ambiental. Con la invención (descubrimiento) de la agricultura, la sociedad humana cambió el modo de vida nómada por el sedentarismo, que permitió el surgimiento de asentamiento humanos (ciudades estados), cuya población crecía a medida que se mejoraban sus condiciones de vida.

Estas ciudades generaron importantes volúmenes de residuos, los mismos que eran dispuestos en zonas establecidas para su incineración<sup>2</sup>. En todo caso la naturaleza empleando sus mecanismos propios se encargaba de transformar los residuos en elementos simples y mantener los ciclos Biogeoquímicos, que son una expresión del flujo permanente de materia y energía entre los sistemas vivos y el ambiente, conocido como Metabolismo. En resumen, la Edad antigua se caracterizó por:

- Recolección (alimentos)
- Agricultura (subsistencia)
- Todos los residuos eran orgánicos (biodegradables)
- No existía exceso de producción

---

<sup>2</sup> La biblia nos ofrece detalles de la costumbre de las ciudades estado de acumular sus residuos en un lugar denominado el Gehena, que significa “sitio de destrucción permanente”, por cuanto la basura estaba quemándose en él en forma permanente. (Josué 15:8 y 18:16, II Reyes 23:10, II Crónicas 28:3 y 33:6, Nehemías 11:30, Jeremías 7:31~32, y 19:2, 19:6 y 32:35).

## 1.2. Edad media: Renacimiento

El renacimiento se caracterizó por un auge en el desarrollo de las artes, los grandes descubrimientos geográficos, las expansiones territoriales y el desarrollo de la Alquimia, a más de una desmesurada tendencia al lucro y enriquecimiento de la sociedad europea.

Los descubrimientos geográficos, pusieron a disposición de las sociedades medievales y renacentistas, enormes cantidades de recursos naturales, materias primas y fabulosas riquezas insospechadas. Esto motivo el desarrollo de actividades comerciales, artesanales, productivas y la concentración de la población en los centros urbanos.

El incremento poblacional trajo consigo problemas en el abastecimiento de servicios básicos, como el agua y saneamiento ambiental. La gestión de residuos y excretas generadas por la población se convirtió en un problema de salud pública. En el renacimiento fueron frecuentes grandes epidemias que diezmaron la población de Europa, así la peste negra (1346-1353), generó un total de muertes de 75 millones de personas <sup>3</sup>.

Pese a ser orgánicos, la cantidad de residuos generados en los centros poblados superaba la capacidad natural de biodegradarlos, convirtiéndose en focos de contaminación del suelo y aguas, con efectos negativos sobre la población. La época en cuestión se caracterizó por:

- Producción para comercialización (alimentos, fibras naturales, maderas, metales)
- Los residuos eran un problema de salud pública, pero todos eran biodegradables.
- Se desarrollaron grandes ciudades (París, Roma, Londres)
- Grandes epidemias: peste bubónica, peste negra, proliferación de vectores.
- Los centros rurales seguían siendo sustentables.

---

<sup>3</sup> <http://www.allabouthistory.org/spanish/historia-de-la- peste-negra.htm# sthash.hoo-q6yN9.dpuf> )

### 1.3. Edad moderna: Revolución industrial

En 1882, Dr. Angus Smith, demuestra que las aguas residuales municipales pueden ser estabilizadas mediante aireación. Para 1914, Ardern y Lockett inventaron el proceso de lodos activados para el tratamiento de aguas residuales municipales, proceso que fue usado por primera vez en Salford, Inglaterra, (Alleman y Prakasam 1983). Imhoff, desarrolló el primer test para procesos con lodos activados en 1924 y la primera planta a escala industrial fue construida en 1926 en Essen-Rellinghausen, Alemania.

En 1900 ya se habían desarrollado procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales municipales y sedimentos. En 1950 se desarrollan los procedimientos de tratamiento de aguas residuales industriales, empleando la hipótesis de la infalibilidad microbiana propuesta por Gayle en 1952, nacida fuera de estudios aeróbicos de laboratorio. En 1960 se realizan investigaciones de biodegradación de sustancias orgánicas sintéticas, presentes como micro contaminantes en aguas residuales.

En la década de los 70, las presiones sociales sin precedentes sobre la problemática ambiental culminan con la generación de un marco regulatorio (1976 RCRA y TSCA, 1980 CERCLA- El Súper fondo) (Russi y Muradian, 2002), que estimularon el desarrollo de tecnologías de remediación. La biorremediación es empleada eficientemente en la limpieza de acuíferos contaminados con gasolina y la primera patente es concedida a Richard Raymond (1974). La adición de microorganismos aclimatados a sitios contaminados se transformó en una actividad común (Online Course. 2017).

En 1972, la ingeniería en biorremediación es usado por primera vez para la limpieza de derrames de oleoductos en Ambler, Pennsylvania. En 1974, Dick Raymond patenta a método de biorremediación basado en la recirculación de nutrientes en calidad de enmienda en aguas subterráneas (Suthersan y Paine, 2004).

En 1980 estaban claros los mecanismos hidrogeológicos y biogeoquímicos inherentes a la biorremediación y se hacía necesario el desarrollo de tecnologías, las mismas que fueron auspiciadas por el estado financiando las investigaciones para la resolución de problemas ambientales.

Para 1990 muchas tecnologías de biorremediación exitosas (incluyen técnicas *ex situ*) y tecnologías híbridas químico-biológicas, fisicoquímicas y biológicas. En 1994, estudios reportan el empleo de tecnologías convencionales en restauración de fuentes de aguas subterráneas hasta estándares regulatorios con pobres rendimientos, donde la atenuación natural y las acciones correctivas desempeñaron un rol importante (Ellis et al., 2000).

A partir del 2000 se desarrollan trabajos de biorremediación *in situ* con monitoreo de la atenuación natural y constituyeron las tecnologías de mayor aceptación por su eficiencia y costo operativo, con bioaumentación que incrementa la extracción de componentes recalcitrantes persistentes (Alvarez, e Illman, 2005).

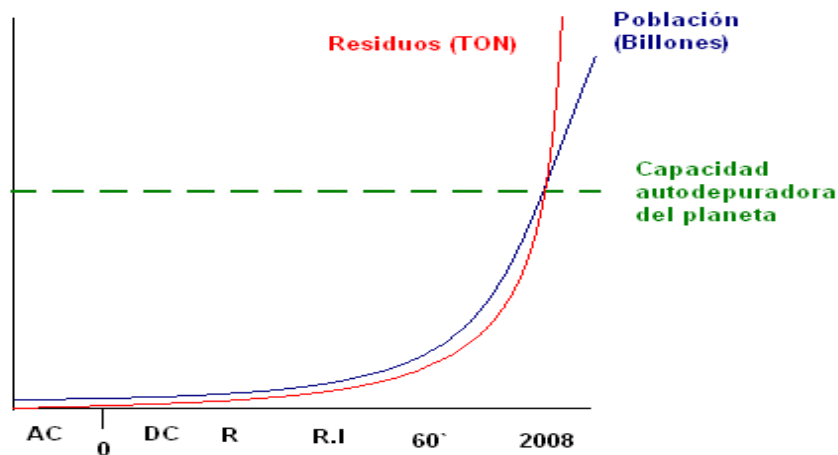
El advenimiento de la Revolución industrial con la invención de la máquina de vapor constituyó el punto de quiebre ambientalmente hablando, en la problemática de la Gestión de residuos a nivel mundial. Fue un periodo histórico comprendido entre la segunda mitad del siglo XVIII y principios del XIX, en el que Gran Bretaña en primer lugar y el resto de Europa continental después, sufren el mayor conjunto de transformaciones socioeconómicas, tecnológicas y culturales de la historia de la humanidad.

La revolución industrial, permitió obtener excedentes en la producción de alimentos, bienes y servicios, que se convirtieron en mercancías. Se produjo el Incremento de las fuerzas productivas. Los centros poblados crecieron forma desmesurada, debido a la migración de la población rural a las ciudades en búsqueda de mejores condiciones de vida.

En esta etapa de la historia surge la clase obrera y las contradicciones del sistema capitalista, que prioriza el consumo y el mercado al bienestar social. Esta nueva realidad económica y política produjo un incremento del consumo, la creación de nuevos materiales y servicios.

Consecuencia lógica de esto fue el Incremento de la generación de residuos, los mismos que ahora tenían otras características, eran sintéticos (artificiales), no biodegradables. La revolución industrial puso en marcha un proceso lento pero sostenido de contaminación ambiental que se mantiene hasta nuestros días.





**Figura 1. 1** crecimiento poblacional Vs generación de residuos a través de la historia. AC, antes de Cristo, DC, después de Cristo. R, renacimiento, RI, revolución industrial

La figura 1.1 muestra la dinámica del crecimiento poblacional y de la generación de residuos a lo largo de la historia. En ella se puede ver que la generación de residuos ha superado los límites de la capacidad de autodepuración natural del planeta. De mantenerse esta tendencia, en dos décadas la humanidad estará al frente de su propia destrucción (Kumar y Kumar, 2018). Otros hechos que han aportado a la generación de enormes cantidades de nuevos residuos y que deben mencionarse son:

- La Revolución Socialista en la Unión Soviética 1917 (confrontación Este Oeste). La producción en masa, para en un acto de fuerza demostrar con cifras la prevalencia de un sistema sobre otro.
- El desarrollo de la Física, que permitió la creación de la bomba atómica y la construcción de reactores nucleares con actividades intensivas de enriquecimiento de uranio, asociado a la generación de grandes cantidades de residuos radiactivos. La guerra fría y el peligro de una guerra nuclear entre las grandes potencias.

La carrera espacial iniciada con el lanzamiento del Sputnik por parte de la URSS. (Carrera espacial EEUU-URSS). La contaminación no solo está dentro del planeta, sino también fuera de él. Según el doctor Walter Flury, experto en basura espacial de la “ESA” Agencia Espacial Europea, la com-

posición de los objetos artificiales que orbitan la Tierra es aproximadamente la siguiente: Naves operativas 7%, Naves obsoletas 22%, Restos de cohetes 17%, Objetos relacionados con las misiones 13%, Otros fragmentos 41%<sup>4</sup> (Flury, 1995).

- La descripción de la doble estructura del ADN (desarrollo de Biología Molecular, Genética y Biotecnología).
- 1960, creación del microchip y el acelerado desarrollo de la cibernética y TICs
- A fines de la década de los 70, el descubrimiento de las enzimas de restricción y transcriptasa inversa (desarrollo de la Ingeniería genética, clonación).
- En siglo XXI, el Proyecto Genoma Humano y el desarrollo de la Biotecnología y nanotecnología.

Todos estos hechos han contribuido a la generación de enormes cantidades de nuevos residuos, para cuya gestión en la actualidad la humanidad aún no ha encontrado metodología viable de tratamiento y eliminación.

### 1.4. Tiempo actual

Los eventos y desarrollos antes mencionados han producido en la biósfera altas concentraciones de xenobióticos en el agua, suelo y aire, además de alimentos y tejidos vivos.

En todos los países de mundo, grandes volúmenes de residuos no biodegradables esperan ser procesados para eliminar su toxicidad ambiental. La presencia de pasivos ambientales y espacios degradados es un constante (Figura 1.2), en especial en los países pobres, en los cuales empresas transnacionales han desarrollado actividades extractivas, dejando una estela de contaminación y deterioro ambiental.

---

<sup>4</sup> <http://www.astropractica.org/tact/basesp/basesp.htm>



**Figura 1. 2.** Zonas degradadas y pasivos ambientales que se observa en la amazonia de Ecuador

Este es el caso de la Amazonía ecuatoriana, donde la empresa TEXACO y otras empresas privadas internacionales, han dejado huellas imborrables de su presencia en forma de pasivos ambientales que han sido causa de enfermedades, pérdida de biodiversidad, aculturación, pérdida de identidad, pobreza y corrupción.

*“Ese tiempo cuando llegó Texaco, hicieron piscinas y botaban aguas residuales. Por ejemplo, para hacer una perforación en pozos meten muchos químicos y esta agua de formación, botaban a los ríos y los animales tomaban esta agua y se morían. Entonces eso afectó a las especies. Entrevista a Domingo Sahuanda, Shuar, Yamanunka (Beristain et al., 2009).*

En Ecuador, los primeros trabajos reales de biorremediación se iniciaron en el año 2000, con el proyecto de Landfarming en Tarapoa Bloque 18 de ENCANA, ejecutado por la Universidad Católica. Este inicio dejó un sabor amargo, porque no culminó con los resultados que se esperaban y condenó a las tecnologías de biorremediación al olvido, por considerarlas como ineficientes, demoradas y de alto costo. Varias empresas privadas

del Ecuador iniciaron pseudo procesos de Biorremediación, que terminaron convirtiéndose en simples trabajos de desalojo y confinamiento, por los costos irrisorios definidos por el estado para este tipo de tecnologías y porque en efecto sus propuestas eran poco eficientes. Prueba de ello es el juicio seguido por la EMAAPQ a la empresa que ejecutó la remediación del derrame de OCP en la laguna de Papallacta en el año 2007.

Es justo rescatar los trabajos de biorremediación ejecutados por dos o tres universidades, trabajos de investigación financiados por el PRAS-MAE, quien invitó a las universidades del país a presentar propuesta de remediación ambiental eficientes (se detallarán estas experiencias en los estudios de caso).

A nivel internacional es rescatable la experiencia de la remediación del derrame EXXON-Valdez, cuyos detalles se pueden conocer en la red y que han sido publicitados en todo foro y medio disponible. Existen muchas publicaciones y libros dedicados a técnicas de biorremediación, desarrollo de protocolos de biorremediación, desarrollo de consorcios microbianos, estudios de cinética y biología molecular de microorganismos con capacidad para degradar contaminantes ambientales incluso de microorganismos genéticamente modificados, cuya información será considerado como referencia de los contenidos que desarrollaremos en el presente trabajo.

### 1.5. Alternativas de solución a la polución

El problema de la polución ambiental mundial y nacional, se pretende enfrentar con un conjunto de alternativas, estrategias, políticas y tecnologías, entre las cuales se vienen empleando:

- Incineración (La metodología más empleada, donde el principal problema es el control de emisiones gaseosa y material particulado)
- Confinamiento en rellenos sanitarios, rellenos de seguridad (Para residuos tóxicos y peligrosos) y Sistemas de almacenamiento profundo (para residuos radiactivos)
- Tratamiento físico – químico (oxidaciones químicas, en especial para el tratamiento de aguas residuales de distinto origen)
- Biorremediación (complemento de los sistemas anteriores, que aún no es considerada como una metodología viable en muchos países, incluyendo el Ecuador)

La incineración es la metodología de mayor empleo en Latinoamérica y el Ecuador, preferida por su rapidez y aparente sencillez. Sin embargo, pocos pueden financiar sus elevados costos. A manera de ejemplo, la Compañía Weatherford- Ecuador (Empresa de servicios petroleros, acantonada en El Coca), gastaba un promedio de 750 USD/tonelada. La mitad de dicha suma se gastaba en transporte y el otro 50% en la incineración en una empresa cementera de Guayaquil<sup>5</sup>.

Otro problema ligado a la incineración de residuos es la calidad de la combustión, que impida la generación de Dioxinas (cuando la temperatura es superior a la ideal) y de monóxido de carbono y material particulado (cuando la temperatura es inferior a la ideal).

En el Ecuador, solo las empresas cementeras disponen de hornos adecuados para la incineración de residuos aceitosos, tóxicos y recalcitrantes. Sin embargo, existe otro problema ligado a la incineración de residuos, la producción de escorias y cenizas altamente contaminantes, que deben ser gestionadas en forma eficiente para evitar que causen daños considerables en el ambiente. Entre las alternativas de gestión están el vidriado, hormigonado y confinamiento en celdas de seguridad.

El confinamiento, es una de las metodologías más empleadas en la gestión de residuos tóxicos y peligrosos en la industria petroquímica. Residuos como sosa gastada, dietanolamina, catalizadores, slop, asfáltenos, entre otros. El confinamiento requiere la construcción de sistemas de ingeniería de elevado costo de construcción y operación, tales como los vertederos de seguridad, sarcófagos y sistemas de almacenamiento subterráneo. Estos sistemas deben disponer mecanismos de aireación, control de emisiones, lixiviados, zonas de seguridad, todos ellos automatizados y computarizados.

El confinamiento no constituye una solución al problema de la acumulación de residuos tóxicos y peligrosos, tan solo es una medida temporal, que deja para las futuras generaciones la responsabilidad de resolver el problema de su gestión segura y eficiente.

<sup>5</sup> Plan de Gestión Integral de Residuos Industriales del campamento Base de Weatherford, desarrollado por Miguel Gualoto. 2005.

Tratamiento fisicoquímico, Actualmente existe una enorme variedad de reagentes químicos, materiales y equipos sofisticados para el tratamiento fisicoquímico de los residuos, sólidos, líquidos y gaseosos. Entre las tecnologías existentes podemos mencionar:

Óxido reducción, ósmosis inversa, intercambio iónico, polimerización, encapsulamiento, metamorfización, precipitación, electromagnetismo, floculación, filtración, electrodiálisis, radiación UV, Acelerador de electrones, ozonificación, neutralización, salificación transmutación, etc. Cada una de las metodologías mencionadas, presentan un determinado porcentaje de efectividad y se especializan en el tratamiento de residuos específicos. Muchas veces algunos residuos requieren la aplicación de algunas metodologías conjuntas para su inertización.

La Biorremediación, por muchos años ignorada y considerada como una metodología ineficiente y poco segura, es hoy quizá la mejor alternativa para el tratamiento de residuos, aunque presenta algunas limitaciones en cuanto a la gama de residuos que puede procesar.

Sin embargo, el empleo conjunto de técnicas fisicoquímicas, con biorremediación puede facilitar el proceso de degradación de contaminantes por parte de microorganismos autóctonos, que poseen los genes necesarios para producir fermentos capaces de hidrolizar los xenobiontes. Entre los contaminantes recalcitrantes y difíciles de biodegradar podemos mencionar a los derivados hidrocarbúricos poli aromáticos, como el naftaleno, antraceno, fenantreno y otros más complejos (figura 1.3 y 1.4).

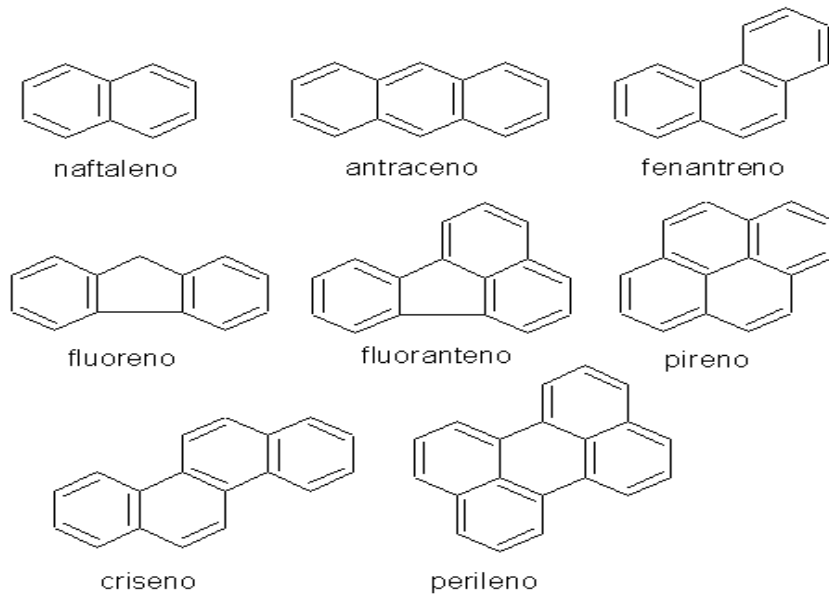


Figura 1.3. Compuestos aromáticos recalcitrantes<sup>6</sup>

También pertenece a este grupo de sustancias los PCBs, los compuestos órgano clorados y fosforados, dioxinas y furanos<sup>7</sup>.

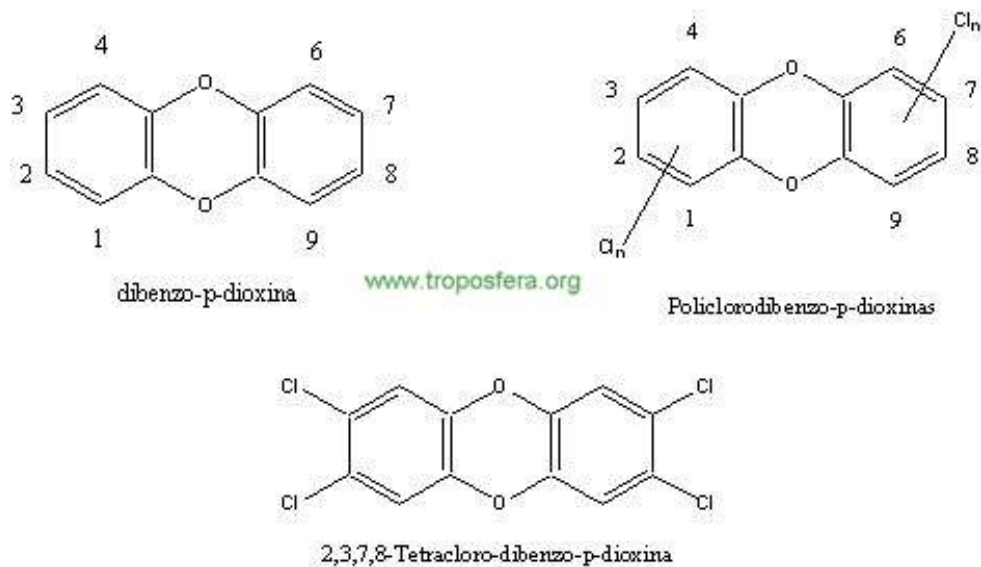


Figura 1.4. Estructura de dioxinas

Otro grupo de importancia ambiental y de alta toxicidad es el de los metales pesados, como: Cd, Hg, Pb, Cr, Ni, V, Ba.

<sup>6</sup> <http://ramanujan25449.blogspot.com/2012/03/la-sorprendente-quimica-del-espacio.html>

<sup>7</sup> <http://www.troposfera.org/conceptos/contaminantes-quimicos-de-la-atmosfera/dioxinas-etc/>

## 1.6. Bibliografía

1. Alleman, J. E., y Prakasam, T. B. S. (1983). Reflections on seven decades of activated sludge history. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 55(5), 436-443.
2. Alvarez, P. J., y Illman, W. A. (2005). *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models (Vol. 27)*. John Wiley & Sons.
3. Beristain, C. M., Páez Rovira, D., y Fernández, I. (2009). *Las palabras de la selva: Estudio psicosocial del impacto de las explotaciones petroleras de Texaco en las comunidades amazónicas de Ecuador*. Bilbao [Spain]: Instituto de Estudios sobre Desarrollo y Cooperación Internacional, [2009].
4. Ellis, D. E., Lutz, E. J., Odom, J. M., Buchanan, R. J., Bartlett, C. L., Lee, M. D., ... y DeWeerd, K. A. (2000). Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. *Environmental science & technology*, 34(11), 2254-2260.
5. Flury, W. (1995). The space debris environment of the earth. *Earth, Moon, and Planets*, 70(1-3), 79-91.
6. Gualoto M. (2005). *Plan de Gestión Integral de Residuos Industriales del campamento Base de Weatherford*.
7. Kumar, P., y Kumar, V. (2018). *Textbook of Environmental Biotechnology*. Woodhead Publishing India.
8. Russi, D., y Muradian, R. (2002). Gobernanza global y responsabilidad ambiental. *Ecología política*, (24), 95-106.
9. Suthersan, S. S., y Payne, F. C. (2004). *In situ remediation engineering*. CRC Press.

### Fuentes de internet

1. <http://www.allabouthistory.org/spanish/historia-de-la- peste-negra.htm#sthash.hooq6yN9.dpuf>
2. <http://www.astropractica.org/tact/basesp/basesp.htm>
3. <http://ramanujan25449.blogspot.com/2012/03/la-sorprendente-quimica-del-espacio.html>
4. <http://www.troposfera.org/conceptos/contaminantes-quimicos-de-la-atmosfera/dioxinas-etc/>





# • CAPÍTULO II •

## GENERALIDADES DE LA BIORREMEDIACIÓN

## CAPÍTULO II

### GENERALIDADES SOBRE BIORREMEDIACIÓN

El presente capítulo describe las técnicas de biorremediación, los factores que inciden sobre el proceso, los microorganismos que se emplean y las tareas o trabajos que se deben ejecutar previamente, para garantizar el éxito de estos trabajos. Describe las operaciones unitarias implementadas por nosotros, las estrategias y las particularidades de nuestra experiencia de campo, en la Amazonía ecuatoriana y en ciudades del Ecuador, donde hemos tenido el privilegio de brindar nuestro contingente al sector privado como público.

Mucho de lo ejecutado, fue producto de un descubrimiento en pruebas de error y acierto, nuestros hallazgos hallan confirmación en un sin número de trabajos de investigación internacionales, pese a que la mayoría se limitan a pruebas piloto y de microcosmos (laboratorio).

Mucha de las aseveraciones de este documento, no necesariamente deben ser confirmadas por otros investigadores, son simplemente nuestros resultados y han mostrado su eficiencia bajo las condiciones ambientales en las que se ejecutaron. Más que un libro técnico de alta rigurosidad científica es un guía de cómo hacer un trabajo de Biorremediación en condiciones reales de campo, sin perder su valor técnico- científico, con un nivel de rigurosidad de un dígito. A manera de ejemplo, en un estudio de laboratorio donde se controlan en forma absoluta los parámetros de proceso y las variables, se espera una rigurosidad de datos hasta con tres dígitos, diseño experimental con análisis estadístico. En condiciones reales de campo y a gran escala, estos aspectos no son considerados. Cuando el objetivo de los trabajos es bajar los niveles de contaminación hasta valores inferiores a los límites establecidos en la legislación ambiental, es indiferente si el resultado final es 700 ppm ó 700,2312 ó 701,0012 ppm, de TPHs; si el límite máximo de concentración final es 1000 ppm, porque ya se ha cumplido con la ley.

Sin embargo, los estudios de laboratorio ejecutados con la rigurosidad del caso sirven para predecir el comportamiento del sistema durante la Bio-

rremediación, establecer la cinética del proceso e inferir los tiempos de tratamiento. El simple proceso de aireación que en laboratorio se ejecuta en forma automática por sistemas inteligentes, en campo se ejecuta con ayuda de excavadoras o manualmente.

Esperamos que la información disponible en el presente libro se constituya en una fuente valiosa para la ejecución de trabajos de biorremediación, que oriente su toma de decisiones y brinde los conocimientos teóricos indispensables, para sustentar sus iniciativas.

## 2.1. Definición

La biorremediación se define como, el uso de organismos vivos para reducir o eliminar los riesgos ambientales de la acumulación de sustancias químicas tóxicas u otros residuos peligrosos, es una opción que ofrece la posibilidad neutralizar varios contaminantes empleando la actividad biológica (Gibson y Sayler, 1992).

Las definiciones son muchas y enfocan, algunos de los aspectos relacionados con el proceso de biorremediación, sin embargo, todas coinciden con el hecho de que es una Biotecnología, porque utiliza organismos vivos o sus metabolitos en la degradación de contaminantes ambientales.

La Biorremediación presenta varias ventajas y limitaciones comparadas con las técnicas tradicionales de remediación, siendo la principal su bajo costo y su habilidad de eliminar contaminantes *in situ* transformándolos en compuesto inocuos como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Las desventajas principales son los costos elevados asociados al transporte, el tiempo necesario para su degradación y la disponibilidad de espacio de almacenamiento de residuos peligrosos para trabajo *ex situ*.

En términos generales la *Biorremediación es un proceso natural, que surgió con el planeta, como mecanismos de reciclaje de nutrientes que permite al planeta, sustentar las distintas formas de vida, mantener la homeostasis planetaria y garantizar el flujo permanente de materia y energía entre los organismos vivos y el ambiente; flujo conocido como metabolismo.*

### 2.2. Campos de aplicación

La remediación ambiental es una de las tareas prioritarias para el mundo moderno, en vista que son innumerables los espacios degradados y los pasivos ambientales diseminados en el planeta. La biorremediación a criterio de algunos entendidos<sup>8</sup>, es la mejor alternativa tecnológica para la eliminación de pasivos ambientales y la rehabilitación de espacios degradados.

Pese a no existir una demanda de servicios en este sentido por parte de empresas privadas y estatales, particularmente y por iniciativa privada, se han emprendido trabajos de investigación y aplicación práctica<sup>9</sup>, dirigidos a biorremediar residuos industriales de distinta naturaleza. Los resultados de dichas investigaciones demuestran la versatilidad de la Biorremediación para degradar una amplia gama de contaminantes ambientales. Sin lugar a duda aún falta mucho que investigar y desarrollar para posesionar a la Biorremediación como la tecnología ambiental de descontaminación eficiente. Por otro lado, son innumerables los estudios de laboratorio y a escala de planta piloto; que demuestran la versatilidad de la biorremediación (Solanas, 2009; Loick et al., 2009), entre otros.

Al efecto se hace evidente la falta de apoyo estatal y privado para llevar a cabo amplios programas de investigación, que permitan brindar al sector productivo nacional, soluciones integrales a la gestión de los residuos, que generen productos y servicios con un valor agregado de calidad, “el ambiental”.

La práctica nacional de control de la contaminación y descontaminación ambiental desarrollada en los últimos 30 años deja un saldo negativo para la Biorremediación y técnicas afines. Los pseudotrabajos de biorremediación ejecutados en el Distrito Amazónico por parte de empresas privadas y públicas, han puesto en tela de juicio la versatilidad, viabilidad técnica y económica de esta biotecnología.

Las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador iniciaron a finales de los 60, sin embargo, la legislación ambiental, llamada a regular su actividad,

<sup>8</sup> Seminario Ambiental “Días de Sol”, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería en Minas Petróleos y Ambiental, Quito. 2008.

<sup>9</sup> En el presente libro se detallan los resultados de los trabajos de investigación y aplicación desarrollados por el autor.

fue aprobada tan solo en el año 2000, luego de permanecer archivada por más de 20 años en el Congreso Nacional. Como es lógico, mucho de lo propuesto entonces; ha caducado y es evidente la falta de entendimiento de la problemática por parte de los legisladores y su equipo asesor. Si bien ahora contamos con un marco regulatorio; los reglamentos de aplicación y la interpretación de los marcos legales, está sujeta, a la voluntad de la autoridad o funcionario de turno, que con frecuencia; no tiene ni idea sobre el tema de la Biorremediación.

La autoridad ambiental, carece de especialistas en el área que puedan monitorear, certificar, opinar sobre trabajos de biorremediación ejecutados. No disponen de un listado de microorganismos aptos para trabajos de biorremediación en los distintos ecosistemas nacionales. No disponen de un marco regulatorio de Bioseguridad para trabajos de campo, se limitan a comprobar, que los análisis entregados por la empresa remediadora; muestren que se ha llegado al límite de concentración exigido por la ley; sin ninguna observación en relación con: ¿cómo se llegó a esos resultados?, ¿qué normas de bioseguridad se emplearon?, ¿cuál fue la cinética del proceso? y ¿cómo se controlaron todos los efluentes generados en los trabajos?

A manera de ejemplo, en el litigio entre la EMAPQ y la empresa remediadora contratada, para remediar un derrame del sistema de oleoductos el año 2003, en la laguna de Papallacta; el informe pericial, presentó 32 observaciones a los procedimientos, medidas de bioseguridad, cinética microbiana, metodologías de análisis y sus resultados, ubicación de las zonas de tratamiento, documentación de descargo presentada y sustentación técnica de los trabajos ejecutados y concluye que:

- Los cálculos de cinética microbiana realizados por el perito, empleando los datos aportados por la compañía, demuestran que es imposible que el pool microbiano empleado pudiese degradar los contaminantes en 25 días. Los cálculos demuestran que el tiempo de vida media de los residuos es de 97 días. En consecuencia, existen serias dudas sobre los trabajos realizados.
- No existe manera de comprobar lo actuado por la empresa, por cuanto esta se ampara en el secreto tecnológico y no detalla el procedimiento seguido para la ejecución de los trabajos.

- Los resultados presentados o fueron modificados o simplemente no se llevaron a cabo<sup>10</sup>.

Un agravante es la suma que finalmente se pagó por los trabajos realizados. La licitación inicial de los trabajos fue por 1'200.000 USD, sin embargo, se terminó pagando una suma sustancialmente mayor.

Hablar de este tipo de trabajos ocuparía cientos de páginas, sitios, personas y casos, para los cuales sería necesario un estudio detallado y profesional, que permita identificar las causas del fracaso. A pesar de todo esto, la Biorremediación es una tecnología versátil para tratar una amplia gama de residuos, los cuales detallamos a continuación.

### **2.2.1. Tratamiento de residuos industriales**

Existe una amplia gama de residuos industriales, cuyas características y composición dependen de las fuentes de generación. Los residuos generados por las plantas de tratamiento de aguas de ensambladoras automotrices, aguas y residuos sólidos de la industria maderera y aglomerados, residuos sólidos con alto contenido orgánico de distintas actividades productivas, son biodegradados con alta eficiencia, con ayuda de microorganismos especializados aislados en la fuente o introducidos de fuentes afines, hasta productos inertes o de baja actividad biológica. En el presente libro se analizará los trabajos de biorremediación de los lodos residuales de la Planta de Aymesa Quito, y Weatherford en El Coca.

### **2.2.2. Tratamiento de metales pesados**

El Tratamiento de metales pesados reviste importancia cada vez más relevante, tan solo en los Estados Unidos más del 40% de los sitios de almacenamiento de residuos están contaminados por metales y compuestos orgánicos (Sandrin et al., 2000). Los metales pesados son xenobióticos comunes en los residuos industriales en especial en los residuos hidrocarbúricos, aguas de formación, residuos de la industria metal mecánico, electrónico y minera. Su transformación a formas biológicamente inactivas es una tarea difícil, en especial en trabajos de biorremediación.

---

<sup>10</sup> Informe pericial de los trabajos de biorremediación Ambiental de la Laguna de Papallacta. Juicio por daños ambientales EMAAPQ, contra Ecuavital- Petroecuador. 2005.

Felizmente existe un pequeño grupo de bacterias capaces de oxidar y bio-transformar algunos metales pesados como: Hg, V, Cr, Pb, Ni, Cd, etc. La mayoría de las veces antes de iniciar la biorremediación de residuos que contienen elevadas concentraciones de metales pesados, es necesario reducir su concentración mediante quelación, encapsulamiento u oxidación, para eliminar su toxicidad sobre los microorganismos; esta es una práctica rutinaria empleada en nuestros trabajos y recomendada por algunos autores (Baker y Bryson, 2002).

En el tratamiento de metales pesados se acostumbra a emplear tamices moleculares como: zeolitas, puzolanas, marga halófana, arcillas modificadas, resinas de intercambio iónico, humatos, ácidos húmicos, carbón activado, cascarilla de arroz, etc. La capacidad de adsorber, quelar e intercambiar iones de metales pesados depende del grado de activación del tamiz (de su isoterma de absorción) y de la forma en la que se encuentre el metal.

El trabajo de tratamiento de residuos industriales de la planta de Waterford en la ciudad de el Coca, en la Provincia de Orellana, muestra la efectividad de *Shewanella crussi* para, oxidar vanadio y eliminarlo de la fase acuosa del suelo. El trabajo fue facilitado por la acción conjunta de zeolitas y puzolanas (Naranjo y Gualoto, 2008), el fenómeno de tolerancia, poli tolerancia y la capacidad de interactuar con metales pesados ha sido enunciado por varios autores (Lemire et al., 2013; Liu et al., 2017).

### 2.2.3. Minería

La minería, es una actividad productiva altamente contaminante, que genera graves impactos ambientales, sobre el suelo, aire y agua, consecuentemente sobre el componente biótico de las zonas de explotación minera y ecosistemas aledaños.

Los contaminantes característicos de las actividades mineras son el mercurio, cianuro, material pétreo, silicatos, sales y minerales, residuos de hidrocarburos entre otros. En la actualidad se disponen de bacterias capaces de biotransformar el cianuro y mercurio a formas biológicamente inactivas; sin embargo, no son empleadas en forma masiva en el tratamiento de los escombros, suelos y aguas contaminadas por la actividad minera. Su empleo, plantea retos operativos, tecnológicos y económicos que las empresas no

desean asumir; sin embargo, las presiones del mercado mundial permitirán que pronto esto sea una práctica común.

### **2.2.4. Tratamiento de suelos contaminados con pesticidas e hidrocarburos**

Tanto las actividades agrícolas como las de explotación de hidrocarburos, generan ingentes cantidades de contaminantes que afectan a todos los componentes de los ecosistemas. Por su magnitud y frecuencia, la contaminación edáfica por hidrocarburos es la de mayor importancia. Existen amplias zonas afectadas por derrames de hidrocarburos a lo largo y ancho del Ecuador, siendo las zonas de mayor afectación, la región amazónica y las zonas de influencia de oleoductos, estaciones de almacenamiento y refinerías.

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es quizá la única actividad de biorremediación donde se han obtenido resultados aceptables, sin embargo, poco se conoce sobre los procedimientos empleados, las cepas microbianas aisladas y sobre la metodología de monitoreo y seguimiento aplicada.

En el presente libro se analizarán los estudios de caso de remediación de suelos de los pasivos ambientales en la Provincia de Sucumbíos, cuyos resultados muestran la efectividad de la biorremediación para descontaminar y rehabilitar suelos agrícolas, permitiendo su reincorporación a las actividades productivas.<sup>11</sup>

Los suelos contaminados con pesticidas y agroquímicos por las actividades productivas, especialmente en cultivos intensivos y extensivos como: banano, café, cacao, palma, rosas y otros; también son sujetos de trabajos de biorremediación, empleando micorrizas, bacterias, tamices moleculares y humatos. Especial atención se debe dar al empleo de humatos de sodio y potasio, que son tamices orgánicos naturales que inmovilizan los residuos de pesticidas, metales pesados y otros contaminantes facilitando la acción microbiana y su degradación (Makuzhev, 2009).

---

<sup>11</sup> Estudio de Pasivos Ambientales para generar una propuesta de remediación integral del cantón Gonzalo Pizarro. Miguel Gualoto. 2008.



*Alcanos*: son los mayores constituyentes de los hidrocarburos de petróleo, que pueden ser degradados por microorganismos autóctonos o introducidos. El petróleo liviano contiene entre 10 al 40% de alcanos normales, sin embargo, el hidrocarburo itemperizado, puede contener tan solo una fracción de este porcentaje. Los alcanos de alto peso molecular constituyen entre el 5 y 20% de los aceites livianos, alcanzando hasta un 60% en peso de los aceites pesados y betunes.

Entre los más abundantes de la serie de los alcanos, que más fácilmente pueden ser degradados, están aquellos que poseen cadenas de 44 átomos de carbón, estos pueden ser metabolizados por microorganismos, sin embargo, alcanos con 10 a 24 carbonos, son más fácilmente degradados. Alcanos con cadenas de carbono de 8 átomos, se evaporan con facilidad. Solo unas pocas especies, pueden emplear carbono, de C<sub>4</sub> alcanos y C<sub>5</sub> a C<sub>9</sub> alcanos, a pesar de ser más tóxicos que otros.

Entre los alcanos frecuentemente degradados por microorganismos, están los n- alcanos y alcanos isoprenoides. Los alcanos policíclicos de los esteranos, triterpenos, son persistentes a la biodegradación, este es el caso de los naftenos, que originalmente se derivan de los n-alcanos. En conclusión, la degradación de contaminantes de petróleo, bajo condiciones naturales, está restringida a los n-alcanos e isoprenoides (Antic et al., 2006).

En sistemas acuosos la bioaumentación, incrementa la biodegradación de hidrocarburos. Los hidrocarburos disueltos son más disponibles para la degradación microbiana, la aplicación de dispersantes y surfactantes incrementa la biodisponibilidad en forma significativa y amplía la biodegradación de aceites (Mohn y Stewart, 2000; Zhang y Bennet, 2005; Zahed et al., 2010).

En condiciones anaeróbicas, la efectividad de la degradación bacteriana de hidrocarburos no depende del número de átomos de carbono en el compuesto (Stroud, 2007). Los hidrocarburos ramificados, son biodegradados más fácilmente, en forma similar a la degradación de los n- alcanos, estos últimos son preferidos como fuente de carbono, en su presencia la degradación microbiana de n-alcanos es más lenta. Los ciclos alcanos son degradados bajo condiciones aeróbicas, por consorcios microbianos en co-metabolismo, así como por cepas bacterianas individuales, sin em-

bargo, la degradación de ciclo alcanos con alto número de anillos en sus moléculas se degradan lentamente (Klimiuk y Łebkowska, 2005).

*Degradación de HAPs:* Las propiedades químicas de HAPs individuales, dependen de su tamaño molecular (del número de anillos aromáticos, así como por su topología molecular (patrón de linkage del anillo). Un incremento en el tamaño molecular resulta en el incremento de la hidrofobidad y la estabilidad electroquímica, que contribuyen a su persistencia ambiental. Los HAPs son conocidos por mostrar efectos tóxicos y propiedades cancerogénicas, teratogénicas y mutágenas, razón por la cual han sido clasificados en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental Americana EPA (Kanaly y Harayama, 2000).

La biodegradación ambiental de hidrocarburos es un proceso complejo. Los aspectos cualitativos y cuantitativos de los procesos de biodegradación dependen de una serie de factores entre los cuales podemos mencionar.

- La cantidad y la naturaleza de los hidrocarburos presentes.
- Las condiciones ambientales
- La composición y tamaño de la comunidad microbiana y
- El crecimiento de los microorganismos en dependencia de las condiciones favorables en respuesta a la presencia de hidrocarburos.

Cuando se realiza el co- compostaje de suelos contaminados con HAPs, ciertos microorganismos pueden degradar HAPs con mayor facilidad, bajo condiciones favorable como aireación, temperatura adecuada y mezclado (Loick et al., 2009).

Pequeñas moléculas de hidrocarburos aromáticos (dos o tres anillos), pueden ser biodegradados por bacterias edáficas, así como por varios géneros de hongos, ejemplo. *Hisopos*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Psilocybe*, y *Smittum*. A su vez la capacidad de degradar grandes moléculas de hidrocarburos aromático (cuatro o más anillos), es bastante raro en bacterias como: *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. saccharophila*, *Flavobacterium* sp., *Burkholderia cepacia*, *Rhodococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., y *Mycobacterium* sp. Estas especies son frecuentemente degradadas por hongos lignolíticos como: *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera* sp., *Pleurotus ostreatus*, y *nonlygninolytic*, hongos

como *Cunninghamella elegant*, *Penicillium janthinellum*, and *Syncephalastrum* sp. (Austin et al., 1977; Wolicka et al., 2009).

La degradación de hidrocarburos aromáticos con cinco o más anillos depende de la actividad de consorcios microbianos. El metabolismo de los sistemas simbióticos puede ser la única forma de metabolizar estos compuestos. Hasta ahora, se ha informado de que la biotransformación de benzo [a] pireno por bacterias, se llevó a cabo en condiciones de co-metabolismo (Bogan et., al, 2003).

Un microorganismo capaz de crecer en medios con moléculas de hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular es *Mycobacterium*. Esta propiedad se ha observado en varias especies *M. flavescens* y *M. vanbaalenii* sp, muchas de estas especies también pueden degradar hidrocarburos alifáticos (Romero, 2014).

La biodegradación en condiciones anaeróbicas es comúnmente conocida desde finales de los años 80 (Widdel y Rabus, 2001; Meckenstock et al., 2004). Microorganismos anaeróbicos emplean hidrocarburos aromáticos mono cíclicos, como el benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX), hexadecano y naftaleno, como única fuente de carbono. Cepas de RCB y JJ de *Dechloromonas* ( $\beta$ -*Proteobacteria*), oxidan completamente el benceno en condiciones anaeróbicas, empleando el nitrato como aceptor de electrones. *Geobacter metallidurans* y *G. grabicium*, son capaces de degradar tolueno en condiciones anaeróbicas hasta CO<sub>2</sub> con reducción de Fe (III). Algunas especies repostadas pueden degradar tolueno en la respiración de nitratos (*Thauera aromatica* cepas K172 y I1, *Azoarcus* sp. cepa T, *A. tolulyticus* cepa To14 y Td15, *Dechloromonas* cepas RCB and JJ). Respiración de percloratos (*Dechloromonas* cepas RCB y JJ), respiración de sulfatos (*Desulfobacterium cetonicum*, *Desulfobacula toluolica*) (Chakraborty y Coates; 2004).

Un consorcio microbiano compuesto por especies *Archea* relacionadas con *Methanosaeta* and *Methanospirillum*, y dos especies bacterianas, una de las cuales *Desulfotomaculum*, tiene la capacidad de degradar tolueno (Beller et al., 1992). Mediante FISH hibridación de desnitrificadores degradadores de alquilbencenos y n-alcanos, la cepa *Azoarcus Thaureas*, puede utilizar benceno, tolueno, etilbenceno y xileno como única fuente de

carbono (Coates et al., 2002; Kniemeyer et al., 2003; Ribeiro de Nardi et al., 2007).

Los HAPs también pueden ser degradados bajo condiciones aeróbicas, solamente moléculas con dos anillos, bajo reducción de sulfatos. Los estudios metabólicos se han centrado en el naftaleno y 2-metil naftaleno. El fenantreno de tres anillos se puede degradar por cometabolismo, así del benzotiofeno es degradado en presencia del naftaleno, en calidad de cosustrato. La degradación anaeróbica también es factible para compuestos heterocíclicos como indo y quinolina (Meckenstock et al., 2004; Widdel y Rabus, 2001).

### **2.2.5. Tratamiento de residuos agroindustriales**

El tratamiento de residuos agroindustriales es una tarea fácil de realizar, debido a que está compuesta de materia orgánica biodegradable, que sirve de fuente de nutrientes para los microorganismos. Tradicionalmente la materia orgánica es procesada en forma aeróbica, por compostaje en pilas aireadas, con ventilación forzada o mediante pilas estáticas. Otra alternativa aeróbica es la lombricultura, para obtener humus de alto valor nutritivo para los cultivos. De igual forma mediante descomposición anaeróbica, para obtener Bioles y compost (Shah et al., 2017).

Estos dos procesos se realizan empleando la microflora presente en los residuos, sin la necesidad de introducir microorganismos exógenos, tan solo generando las condiciones ambientales ideales de humedad, pH, temperatura, conductividad, concentración de NPK, entre otros. La producción de biocombustibles a partir de residuos agroindustriales es una de las áreas de mayor perspectiva e investigación en todo el mundo (Basso et al., 2015; Maragkaki et al., 2017). La recuperación energética de residuos es una prioridad.

### **2.2.6. Tratamiento de aguas residuales urbanas**

El tratamiento biológico de aguas residuales urbanas e industriales es una de las metodologías que habitualmente se ha venido realizando en todo el mundo. Las plantas de tratamiento de aguas convencionales incluyen una fase de tratamiento biológico, sea esta aeróbica o anaeróbica (o combinada), según las características de las aguas a tratar.

El tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados es la metodología más empleada, sin embargo, también se emplean los reactores de película, la biofiltración por materiales porosos, que sirven de matriz para la fijación de los microorganismos. Recientemente se ha incorporado a todo el arsenal disponible los Pantanos Secos Artificiales (PSA) o Biofiltros de lecho Sumergido (BLS), que serán descritos en la sección correspondiente del presente libro, Fitorremediación.

### **2.2.7. PCBs**

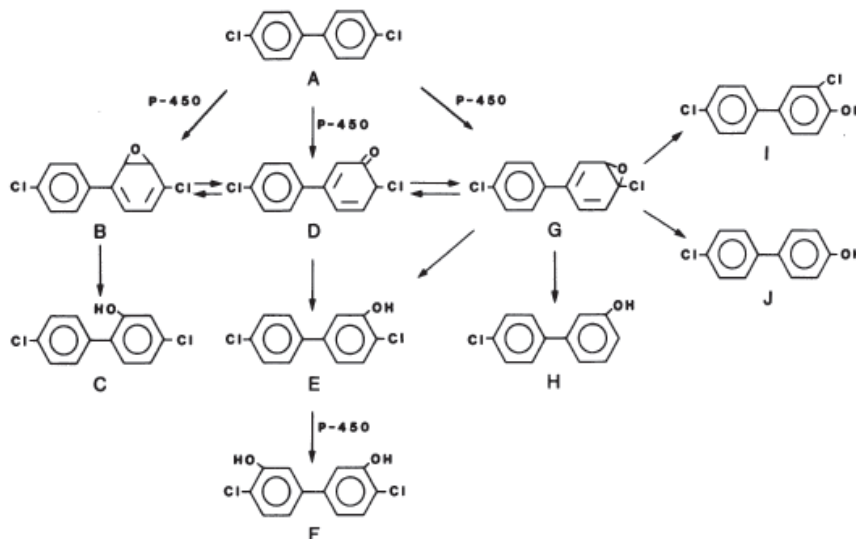
Los PCBs (Bifenilos policlorados), son ampliamente usados en calidad de aditivos de aceites en equipos eléctricos (transformadores y capacitadores), máquinas hidráulicas, adhesivos, textiles, materiales de impresión. Los PCBs no ortho y mono ortho, son altamente tóxicos, por cuanto producen compuestos como 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzodioxina (2, 3, 7, 8-TCDD o dioxina).

Se estima que cerca de 1,5 millones de toneladas de PCBs son producidas en el mundo, una fracción importante de ella es liberada en el ambiente. Los PCBs han sido detectados en zonas remotas del planeta como la Antártida, Norte de Groenlandia (Riseborough et al., 1968). Se les ha detectado en las capas de sedimentos desde los años 30, con un pico en los años 70 a partir del cual se ha evidenciado una declinación (Venkatesan et al., 1999). Usualmente la concentración de PCBs es baja, debido a su alta hidrofobidad, los PCBs son acumulados en grasas y mediante estas en las cadenas alimenticias.

La producción industrial de PCBs genera un complejo de congéneres que comúnmente se agrupan de acuerdo con el número de átomos de cloro que poseen y poseen diferentes nombres en USA (Aroclor), Japón (Kaneclor) y en Europa (Clophen), en USA se producen mezclas de 40 PCBs, con un grado clorinación del 42%, por su estabilidad química y bioamplificación, son compuestos altamente contaminantes y de difícil biodegradación (Stapleton et al., 2002).

**Degradación microbiana de PCBs**

Para la biorremediación de PCBs, transcurre en dos fases una anaeróbica, seguida de una fase aeróbica. El ataque anaeróbico es una dechlorinación reductiva, que resulta de la sustitución el átomo de cloro por un átomo de hidrógeno. El ataque aeróbico ocurre en el anillo, con su ruptura posterior y su transformación en un derivado de policlorobifenilo, que posteriormente se destruye vía aeróbica. La degradación de PCBs y sus congéneres pueden agruparse en dos etapas. La primera es el ataque al anillo de bifenilo y la degradación de uno de los anillos, la segunda etapa es la degradación del segundo anillo con la formación frecuente de benzoatos. El metabolismo de Bifenilos y de los congéneres de PCBs bajamente clorinados, se muestra en la siguiente figura (2.1):



**Figura 2. 1.** Metabolitos y posibles vías de degradación de 4,4'-diclorobifenilo por las microsomas de hígado humanos (Sipes y Schnellmann, 1987)

- El sistema aromático es activado por la oxidación del doble enlace y la introducción de dos átomos de hidrógeno vecinales.
- El diol resultante es ulteriormente oxidado por una deshidrogenasa hasta el correspondiente catecol.
- El clivaje del anillo aromático. Ocurre después de su activación
- Mediante la hidrólisis de los productos del clivaje del anillo, se producen benzoatos por la introducción de dos átomos de hidrógeno.
- Otro producto es un ácido alifático carboxílico.

La mayoría de las cepas aisladas pueden ejecutar una de las dos etapas, en consecuencia, se necesita de la participación de consorcios microbianos y de una fase anaeróbica y otra aeróbica (Stapleton y Singh, 2002).

Los primeros reportes de degradación de PCBs fueron recibidos de cepas de *Achromobacter*, que crecen a expensas de Bifenilos y 4- clorobifenilo (Ahmed y Focht, 1973), estas cepas transforman algunos congéneres de PCBs, pero no los declorinan. Otras Fuentes muestran la capacidad de *Nocardia* y *Pseudomonas*, de degradar PCBs hasta en un 95% y 85%, respectivamente, en 100 días de tratamiento (Baxter et al., 1975), la capacidad de degradación depende de la mezcla de congéneres de los PCBs.

Otra especie reportada *Alcaligenes* sp., (Furukawa y Matsumura, 1976), aislada de sedimentos lacustres, degradan PCBs en cloro benzoatos, sus congéneres con cloro en un solo anillo, más fácilmente de aquellos con cloro en ambos anillos. Otra cepa identificada es *Acinetobacter* sp., P6 (Furukawa, et al., 1978; Furukawa, 1994) y *Rhodococcus globerulus* P6 (Asturias et al., 1994), estas bacterias son unas de las pocas capaces de degradar PCBs y sus congéneres (Kohler et al., 1988), esto es posible gracias a que las mencionadas cepas disponen de una nueva ruta de degradación que usa la enzima estradiol Dioxigenasa.

Según el estudio “Inventario Preliminar de Bifenilos Policlorados PCB´s, 2003, citado por El Comercio en su edición del 10 de noviembre de 1998, informa que se produjo un derrame de 150 galones de PCB´s, en el Coto-paxi en febrero de 1995, sin embargo, no señala el sitio exacto. La cantidad estimada de aceite contaminada fue de 5.472.805 litros equivalentes a 1.445.919 galones americanos (1 galón = 3,785 litros).

El mencionado estudio evidencia que no se dispone de planes de emergencia y de gestión para residuos peligrosos. Los trabajadores de las Estaciones eléctricas que las operan desconocen los riesgos ligados a la manipulación de PCBs o los extrapolan, creen que si tocan el aceite les producirá cáncer, y otros manipulan sin ninguna protección. No existen responsables directos para tratar el tema de los PCBs y en general de productos químicos peligrosos o compuestos persistentes. No tienen claras directrices de qué hacer, y algunas de ellas ya han iniciado algunas gestiones: capacitación, señalización, designación de jefaturas. Si la gestión de los PCBs no

se ha iniciado en forma segura, peor aún la implementación de trabajos de remediación y biorremediación de suelos y aguas contaminadas con PCBs.

### **2.2.8. Compuestos organoclorados y organofosforados**

Los compuestos organoclorados son contaminantes con persistencia ambiental (COP), estos han sido incluidos en la lista de COP de la convención de Estocolmo (Stockholm Convention, 2001). Estos compuestos sintetizados químicamente son altamente lipofílicos, resistentes a la degradación, razón por la que se acumulan en el ambiente, con graves efectos sobre la salud humana (Porta et al., 2008; Bush et al., 1986).

Compuestos organoclorados como DDE, DDT, PCBs y otros compuestos relacionados, son responsables de la baja productividad agrícola e infertilidad de los suelos, del desarrollo de cáncer y daños neurológicos en los humanos y animales. Los pesticidas organoclorados (POC) e Hidroxi- PCBs son moduladores endocrinos (disruptores endocrinos), (McKinlay, et al., 2008; Varayoud et al., 2008. Milesi et al., 2012), se ha demostrado que bajas dosis de exposición neonatal al endosulfan, afecta a las funciones uterinas en las personas adultas.

La toxicidad de estos compuestos puede ser reducida mediante biorremediación, que emplea la capacidad natural de plantas y microorganismos para la descontaminación. Teóricamente estos compuestos pueden ser biomineralizados en vapor de agua y dióxido de carbono (Rayu et al., 2012). La biorremediación puede ser exitosamente empleada en trabajos de campo en la degradación de este tipo de compuestos, con resultados efectivos y a bajo costo, sin embargo, aún es largo el camino por recorrer para el perfeccionamiento de estas tecnologías (Singh y Walker, 2006).

Son muchas las rutas metabólicas bacterianas identificadas de degradación de COPs, oxidación, fermentación, deshalogenación reductiva (Smidt y de Vos 2004). Especial atención se presta a la deshalogenación reductora, que desempeña un rol preponderante de compuestos orgánicos altamente clorados como PCDDs, PCDFs, y PCE, que son recalcitrantes y tienden a acumularse en sedimentos acuáticos y suelos en condiciones anaeróbicas (Bunge y Lechner 2009).



En el Ecuador la cantidad de pesticidas organoclorados empleados en el sector palmicultor, bananero, cafetero y agrícola en general es importante, razón por la que muchos de los suelos actualmente en explotación presentan graves problemas de fertilidad y baja calidad de producción agrícola, debido a la acumulación de estos compuestos en los suelos.

El Diagnóstico de plaguicidas 1A y 1B en el Ecuador, señala que la floricultura emplea en forma intensa alrededor de 80 tipos de plaguicidas, cuya aplicación se realiza cada 2 o 3 días en una misma área, algunos de ellos prohibidos en sus países de origen. La selección de los productos para su aplicación se hace por consejo del vendedor de agroquímicos, el promotor de productos de la zona, por amigos o vecinos del agricultor y en algunos casos por los extensionistas del MAG.

Existe un cierto conocimiento general de los riesgos que existen en el uso de plaguicidas, pero se desconocen por completo las medidas preventivas. El carbofurán y monocrotofos son plaguicidas ampliamente usados en el cultivo de la papa. Más de 1.662.460 han sido contaminadas por el uso de plaguicidas debido a las actividades agrícolas principalmente<sup>12</sup>: plátano, cacao, papa, flores, frutas (cítricos, manzanas, uvas, naranjilla, mora, tomate de árbol), verduras (brócoli, tomate riñón) ajo, flores, nabo, algodón, forestales, palma africana, arroz, frejol, papa, banano, pera, bleado, girasol, pimienta, cacao, granadilla, café, remolacha, caña de azúcar, hortalizas, sandía, caucho, hule, soya, cebolla, lechuga, tabaco, ciruelo, legumbres, té, maíz, cocoteros, mango, uvas, col, maní, verdolaga, coliflor, durazno, melón, etc.

Según el diagnóstico de plaguicidas 1A y 1B del 2007, los pesticidas de mayor uso son:

**Tabla No. 2.1.** Pesticidas de mayor uso en el Ecuador

NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO
Monitor	Metamidofos
Furadán	Carbofurano
Manzate	Mancozeb
Malatión	Malatión
Nuvacrón	Monocrotofos

<sup>12</sup> Diagnóstico de la situación de los plaguicidas 1A y 1B en el Ecuador. Boletín de acción Ecológica. No.151. 2007

### **2.2.9. Cortes y rípios de perforación**

La actividad extractiva de hidrocarburos genera un sin número de contaminantes ambientales cuya naturaleza química es muy variada, con frecuencia constituyen cocteles de sustancias químicas de alta toxicidad ambiental.

Los lodos de perforación y residuos asociados como los cortes y rípios de perforación son un ejemplo de estos cocteles. Los cortes y rípios de perforación son los materiales pétreos extraídos de la perforación de un pozo exploratorio, de inyección o de producción. Estos materiales vienen impregnados de crudo y del lodo de perforación que es el agente lubricante y que químicamente es un coctel de detergentes, antimicrobianos, tensos activos, lubricantes, bentonita, lignosulfonatos, poliaminas, poliamidas y otros polímeros complejos, a más de agentes inhibidores del hinchamiento de arcillas (Neff, J. M. 2005).

En dependencia del diámetro y la profundidad del pozo, la cantidad de cortes y rípios es variable, pero en promedio es de 1200-1500 m<sup>3</sup>/pozo. En campos productivos, una empresa operadora perfora en promedio 10 a 15 pozos por mes, esto significa que se generan de 12.000 a 22.500 m<sup>3</sup>/campo/mes.

Tanto la composición y propiedades fisicoquímicas de los lodos, así como de los cortes y rípios de perforación, dependen de la profundidad del pozo y de la formación geológica. Se distinguen cortes, rípios y lodos de superficie, parte intermedia y de profundidad.

Las metodologías de gestión de estos materiales, empleadas durante décadas y en la actualidad en orden de importancia son: Estabilización y confinamiento en piscinas. La reinyección en la formación a través de pozos de inyección (práctica empleada también para las aguas de formación), tratamiento con agentes desengrasantes en especial si el lodo empleado es base aceite, la incineración para lodos base aceite y la Biorremediación.

La primera metodología es la más extendida, durante 40 años de actividad petrolera en el Ecuador ha generado ciento de miles de pasivos ambientales en forma de piscinas. Es una metodología ineficiente porque no resuelve el problema de la toxicidad de estos materiales, solo los esconde, dejan-

do a las futuras generaciones o a la naturaleza luchar contra sus efectos. No es sustentable, porque cada vez se requieren más tierras para seguir almacenando estos materiales, simplemente no existe más espacio.

La segunda técnica es la reinyección, que tiene altos costos, genera residuos secundarios y por ello no es sostenible. La tercera, también es de alto costo, en especial si se emplea conjugada con la incineración. Finalmente, la biorremediación; metodología que por su naturaleza no es de la preferencia de las operadoras; pero que con costos comparativos promedios modestos en comparación con las otras metodologías, no solo degrada los contaminantes presentes, sino que también, permite reincorporar los cortes y ripios de perforación a actividades productivas en calidad de sustrato para recuperar suelos erosionados, como material de cobertura de rellenos sanitarios, como base y subbase de carreteras, etc.

En dependencia de la formación geológica, de la que proceden los cortes y ripios de perforación, estos pueden contener altas concentraciones de metales pesados incluso de radionúclidos, factor que incrementa su peligrosidad y toxicidad ambiental. El tratamiento de estos residuos representa un reto tecnológico, que implica combinar eficientemente técnicas fisicoquímicas con biológicas, el uso masivo de tamices moleculares y de consorcios microbianos complejos.

De nuestra experiencia, se desprende que, en virtud de las diferencias en las propiedades físico- químicas y composición, estos materiales deben tratarse por separado, para evitar contaminación cruzada e incrementar el volumen a tratar. En los estudios de caso describiremos nuestra experiencia en el tratamiento de este tipo de residuos.

#### **2.2.10. Lodos residuales industriales aceitosos**

Son innumerables las industrias que generan ingentes cantidades de este tipo de residuos, bien sea como productos de las actividades productivas, así como derivadas de plantas de tratamiento de aguas residuales. Su complejidad, apariencia física y propiedades químicas varían en función del tipo de actividad productiva. En consecuencia, no existen recetas mágicas para su tratamiento, tan solo metodologías comunes, cuya secuencia y combinación, dependerá del tipo de lodo a tratar. Los lodos más comunes, que

requieren tratamiento, son los lodos residuales de tanques de almacenamiento de combustibles que incluyen arenas y sedimentos. Los lodos residuales de las operaciones de plantas de metalmecánica, refinado de crudo, petroquímicas, estaciones de mantenimiento vehicular y maquinaria, etc.

Especial atención reviste el tratamiento de lodos derivados de plantas de tratamiento de aguas residuales, cuya complejidad y toxicidad depende de la actividad productiva que la genera. Las características más relevantes de los lodos residuales son: su alta concentración de residuos recalcitrantes, su alta densidad (hidratación, para algunos tipos), insolubilidad, baja biodisponibilidad, su alta toxicidad, inflamabilidad y alto contenido de sustancias volátiles; que dificultan su manipulación, reducen la eficiencia del tratamiento e incrementan los costos operativos de su gestión.

El tratamiento de este tipo de residuos exige el empleo de estrictas normas de seguridad industrial y estrictos protocolos de Bioseguridad, en especial si se realizan a escala industrial. En el tratamiento de este tipo de residuos, se hace inevitable el uso de tamices moleculares para generar estructura, captar metales pesados, inmovilizar contaminantes, proveer el agua necesaria para el proceso de biorremediación y servir de superficie para el desarrollo microbiano.

### 2.3. Factores que inciden sobre la biorremediación

El éxito de un trabajo de biorremediación depende del control irrestricto de algunos parámetros de proceso (Speihgt et al., 2012). Los valores típicos de los parámetros de proceso son los ilustrados en la tabla 2.2.

**Tabla No. 2.2.** Condiciones típicas de los factores que inciden sobre el proceso de Biorremediación (Varjani, y Upasani, 2019).

<b>FACTOR</b>	<b>CONDICIONES ÓPTIMAS</b>
Población microbiana	Clase adecuadas capaces de degradar los contaminantes específicos
Oxígeno	Cerca del 2% de oxígeno en la fase gaseosa, ó 0,4 mg/litro en la solución del suelo
Agua	El agua debe ocupar el 50-70% de la capacidad de campo del suelo

Nutrientes	N, P, S y otros nutrientes necesarios para soportar una buena tasa de crecimiento microbiano
Temperatura	La temperatura apropiada para el crecimiento es de 0-40°C
pH	El mejor rango de 6,5 a 7,5

De nuestra experiencia personal se desprenden otros valores, mucho más específicos, que no contradicen los sugeridos por el autor usado como referencia, simplemente los valores fueron establecidos bajo distintas condiciones experimentales y ambientales<sup>13</sup>.

### 2.3.1. Temperatura

La temperatura determina la velocidad de crecimiento microbiano y del transcurso de las reacciones bioquímicas. La velocidad de una reacción química es función de la temperatura, y sigue la Ley de Arrhenius:

$$\log_{10} V = -\frac{AH}{2.303RT} + C$$

Por cada 10°C de incremento de la temperatura, la velocidad de las reacciones bioquímicas se duplica.

Los trabajos de biorremediación ejecutados en el Ecuador, en la región amazónica y la costa, muestran que las temperaturas imperantes en dichas zonas son las adecuadas para garantizar una buena tasa de biodegradación y crecimiento microbiano, el rango de temperaturas observadas coincide con la curva tipo de crecimiento óptimo microbiano en función de la temperatura, descrita en la figura 2.2.

<sup>13</sup> Estos valores varían en función a las condiciones ambientales de los sitios donde se ejecutaron los trabajos de Biorremediación.

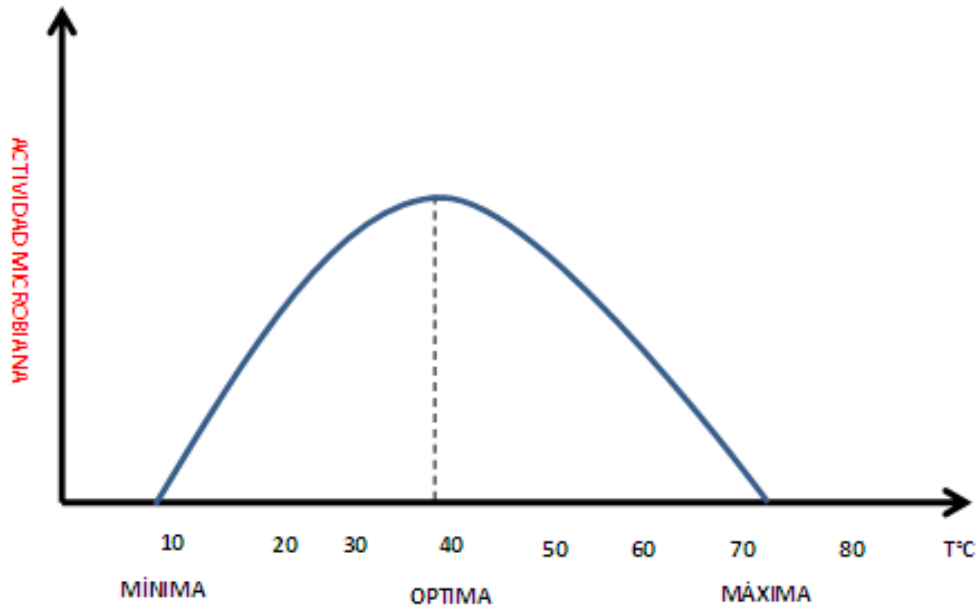


Figura 2.2. Dinámica de crecimiento microbiano en función de la temperatura<sup>14</sup>

No existen referencias de estudios de biorremediación a temperaturas inferiores a 15 °C, en fase de laboratorio ni de campo. Recientemente el programa antártico, ha permitido estudiar la posibilidad de emplear microorganismos psicrófilos de la Antártida para la biorremediación de espacios alto andinos afectados por derrames de hidrocarburos (Gualoto, 2009).

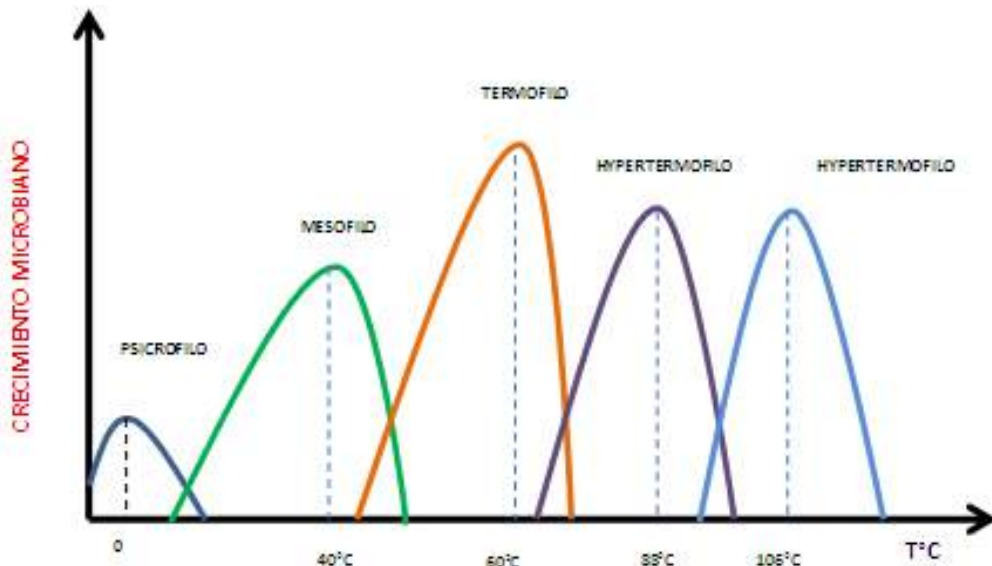


Figura 2.3. Tipo de microorganismo según la temperatura (Madigan et al., 2004)

<sup>14</sup> Gualoto Miguel. Curso de Biorremediación. Presentación Powerpoint. UDLA. 2009.

Según la figura 2.3 los microorganismos que se desarrollan dentro de los rangos de temperatura entre  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $+12^{\circ}\text{C}$ , son psicrófilos. Mesófilos son los microorganismos que crecen en el rango de temperatura  $+8^{\circ}\text{C}$  a  $+48^{\circ}\text{C}$ . Los microorganismos considerados termófilos crecen de  $+40$  a  $+70^{\circ}\text{C}$ . Los microorganismos que crecen a temperaturas superiores se denominan Hipertermófilos, hasta  $+115^{\circ}\text{C}$ .

Como puede verse de la figura cada especie de microorganismo tiene un rango de temperatura dentro del cual es activo y su metabolismo le permite reproducirse, fuera de este rango el microorganismo muere o cae en un estado de inactividad en espera de condiciones ambientales favorables (anabiosis). Según varios autores, la biodegradación de petróleo ocurre a temperaturas bajo los  $80^{\circ}\text{C}$  (Connan, 1984): a altas temperaturas los microorganismos existentes son termofílicos y muchos de los microorganismos involucrados en la degradación superficial de hidrocarburos están ausentes.

La temperatura ambiental ejerce efectos sobre las propiedades del petróleo y sus derivados (Speight, 2007), y sobre la actividad de las poblaciones microbianas empleadas en la biodegradación (Venosa and Zhu, 2003). A bajas temperaturas la viscosidad del crudo incrementa, mientras que la volatilidad de los hidrocarburos tóxicos de bajo peso molecular se reduce, generando un retraso en el inicio de la degradación (Atlas, 1981), de esto se evidencia, en trabajos de biorremediación de hidrocarburos en regiones frías como la Antártida y zona andina de Ecuador<sup>15</sup>. Adicionalmente la temperatura ejerce efectos sobre la solubilidad de los hidrocarburos (Foght et al., 1996).

Aunque la degradación de hidrocarburos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, la tasa de degradación generalmente decrece con la reducción de la temperatura. Altas tasas de degradación se obtienen en los rangos de temperatura de  $30$  a  $40^{\circ}\text{C}$ , en el ambiente edáfico,  $20$  a  $30^{\circ}\text{C}$ , en ambientes de agua dulce y  $15$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , en ambientes marinos (Bossert y Bartha, 1984).

La biorremediación de hidrocarburos es altamente dependiente no solo de su composición, sino también, de la temperatura de incubación microbiana

---

<sup>15</sup> Los trabajos de biorremediación en zonas alto andinas y Antárticas se ven limitadas por las bajas temperaturas.

(Atlas, 1975); a temperatura de 20°C, el petróleo convencional presenta altas pérdidas abióticas y es más susceptible de biodegradación que los crudos pesados. La tasa de mineralización de las fracciones pesadas es significativamente lenta a 20°C, en comparación con el crudo convencional (Speight, 2007).

### 2.3.2. Potencial de hidrógeno

El pH es uno de los parámetros de proceso de mayor influencia sobre el sistema de tratamiento, si consideramos que los fermentos producidos por los microorganismos solo se activan a un pH específico (Figura 2.4) Durante la degradación el pH de un sistema de tratamiento debe ser adecuado y mantenerse durante todo el período de crecimiento. La fermentación de carbohidratos libera ácidos orgánicos al medio, con la consiguiente acidificación y detención del crecimiento. La utilización de proteínas libera  $\text{NH}_4^+$  al medio produciendo su alcalinización. Los cambios de pH producidos durante el proceso de biorremediación deben ser controlados para evitar la detención del proceso de destrucción del contaminante mayoritario presente en los residuos, como TPHs, HAPs, metales pesados, etc.

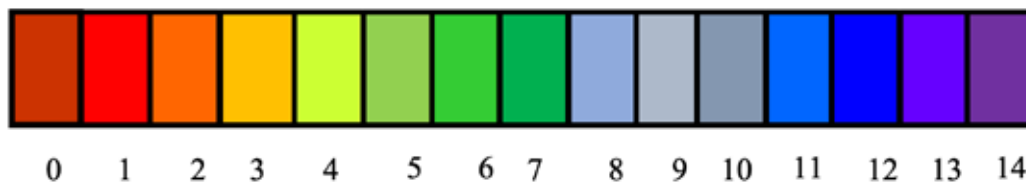


Figura 2.4. Escala de pH

Los trabajos prácticos ejecutados en el campo muestran que los valores de pH adecuados para la degradación de la mayoría de los contaminantes varían de 4,5 a 6,5; aunque también puede ocurrir a valores de pH superiores a 7.



**Tabla No 2.3.** Relación del pH y microorganismos específicos<sup>16</sup>.

ORGANISMO	HÁBITAT	MÍNIMO PH	ÓPTIMO PH	MÁXIMO PH
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Áreas ricas en sulfuro, frecuentemente ácidos	0.5	2.0-2.8	4.0-6.0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Fuentes de ácido sulfúrico	1.0	2.0-3.0	5.0
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Fuentes calientes acidificadas	2.0	4.0	6.0
<i>Zymomonas lindneri</i>	Ambientes con alta concentración de azúcares	3.5	5.5-6.0	7.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Animales, plantas, Roca degradada	4.0-4.6	5.8-6.6	6.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Superficie de animales, cavidad nasal, piel.	4.2	7.0-7.5	9.3
<i>Escherichia coli</i>	Intestinos de animales	4.4	6.0-7.0	9.0
<i>Clostridium sporogenes</i>	Suelos y sedimentos que son anaeróbicos.	5.0-5.8	6.0-7.6	8.5-9.0
<i>Erwinia carotovora</i>	Patógenos vegetales	5.6	7.1	9.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cosmopolitas	5.6	6.6-7.0	8.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Patógenos de animales	6.5	7.8	8.3
<i>Nitrobacter</i> spp.	Cosmopolitas	6.6	7.6-8.6	10.0

### 2.3.3. Conductividad

El control de la conductividad eléctrica de los residuos en el sistema de tratamiento biológico es un parámetro clave para asegurar el éxito del tratamiento. La presencia o ausencia de iones, puede inhibir los procesos de intercambio iónico entre las partículas del suelo y los residuos y entre los microorganismos y los residuos.

La conductividad eléctrica se mide en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  o  $\text{mS}/\text{cm}$ , siendo los valores ideales para la biorremediación de 0,5 - 6  $\text{mS}/\text{cm}$ . A valores superiores los gradientes y potenciales de membrana se alteran y el metabolismo micro-

<sup>16</sup> Gualoto M. Curso de Biorremediación. Presentación Powerpoint, UDLA. 2009.

biano, así como las propiedades del suelo (residuos) se alteran, deteniendo el proceso de biorremediación. El suelo, al igual que cualquier material conductor eléctrico, se opone al paso de la corriente eléctrica y ofrece una resistencia que puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$R = \rho \frac{L}{A}$$

Dónde:

R = Resistencia ( $\Omega$ ).

$\rho$  = Resistencia específica ( $\Omega \cdot m$ ).

L = Longitud (m).

A = Superficie ( $m^2$ ).

La resistencia específica ( $\rho$ ) también se denomina resistividad del conductor o, en nuestro caso, resistividad del suelo. Para el caso de un suelo o sustrato homogéneo (suelo en tratamiento), la resistencia específica depende al menos de tres factores:

- a) La matriz que lo constituye, que a su vez depende de otros factores tales como, la composición química, la textura, la estructura y la porosidad; especial atención reviste la composición de los contaminantes sujetos a remediación impregnados en el suelo.
- b) El contenido en electrolitos susceptibles de conducir la corriente eléctrica, esto es necesario considerar, por cuanto con frecuencia los suelos han recibido descargas de aguas de formación ricas en metales pesados.
- c) El contenido en humedad, factor a considerar cuando se somete a tratamiento sedimentos y lodos residuales que con frecuencia está altamente hidratados. Para la medición de este parámetro con frecuencia se emplea la conductividad específica (K),

$$K = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{A}$$

Dónde:

K = Conductividad específica ( $S \cdot m^{-1}$ )

R = Resistencia ( $\Omega$ ).

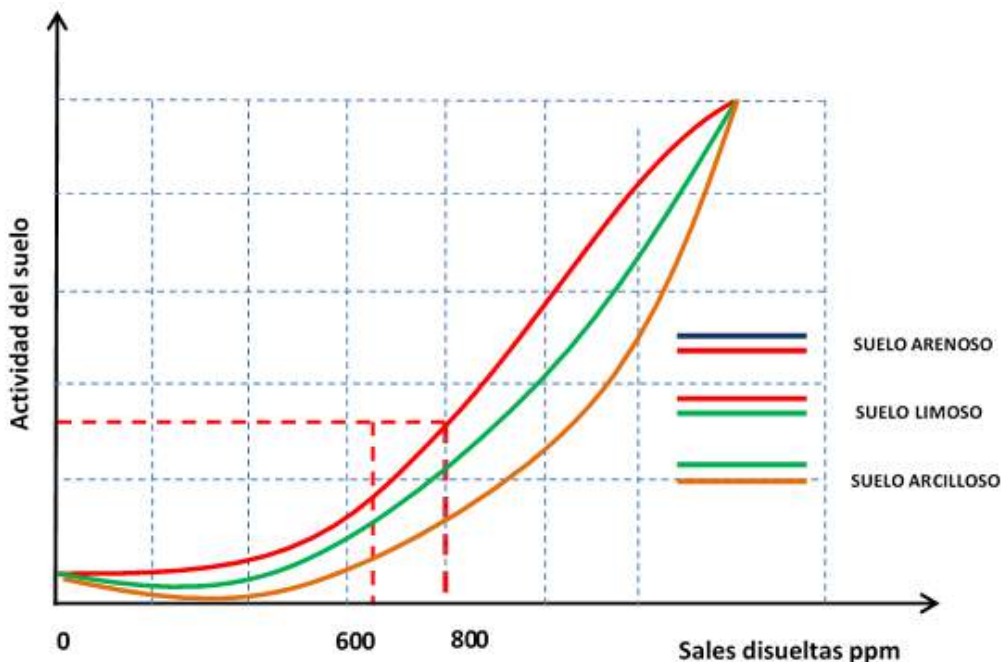
L = Longitud (m).

A = Superficie ( $m^2$ ).

La conductividad eléctrica de un conductor y especialmente de una diso-

lución, varía con la temperatura, de igual forma de la temperatura de la solución edáfica.

En general, para disoluciones acuosas, al aumentar la temperatura aumenta la conductividad, además depende del voltaje aplicado, del tipo, número, carga y movilidad de los iones presentes y de la viscosidad del medio en el que éstos han de moverse. La distribución de los electrolitos que existen en el suelo varía ampliamente en función de la presencia y actividad de las raíces (en suelos agrícolas) y de los microorganismos empleados, en los trabajos de Biorremediación. A mayor resistencia hay menor conductividad y viceversa (Richards, 1972).



**Figura 2.5** relación entre la actividad del suelo y la concentración de sales disueltas para suelos con diferentes texturas.

La actividad eléctrica del suelo en tratamiento varía ampliamente en función de la distribución de las sales disueltas (Figura 2.5); de los nutrientes intencionalmente adicionados al sistema de tratamiento, de la mineralización de los contaminantes, de los iones aportados con el agua de riego, la lluvia u otras aportaciones (purines, estiércoles, humus, etc.). Por ello, es necesario realizar varias medidas en distintas zonas del área en tratamiento, para tomar como referencia la más representativa.

### 2.3.4. Humedad

El grado de humedad de un sistema de tratamiento es vital, por cuanto los microorganismos requieren la disponibilidad de agua como medio donde se realizan las reacciones bioquímicas catalizadas por sus fermentos. Para tratamientos aeróbicos, se recomienda un porcentaje de humedad equivalente a 60% (bacterias). Esto no significa que a porcentajes mayores o menores de humedad la biodegradación no se produce, sino que, es el valor ideal.

Para el caso de bacterias (la mayoría), los rangos de humedad relativa de los sistemas de tratamiento varían entre 40 y 60%. Valores superiores generarían condiciones anaeróbicas, por cuanto la humedad satura los poros del suelo y residuos, bajando la temperatura drásticamente. Valores inferiores de humedad, inactivarían a los fermentos microbianos.

Los hongos en cambio prefieren sustratos con baja humedad (son tolerantes a la sequía). Normalmente los hongos empleados en biorremediación trabajan bajo concentraciones de humedad entre 20 y 40%, este es el caso de *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillum* (Cabrera y Gualoto 2007).

### 2.3.5. Aireación

Siendo la Biorremediación un proceso predominantemente aeróbico, la disponibilidad de oxígeno en los sistemas de biorremediación es fundamental. La degradación de contaminantes por vía aeróbica evita la formación de gases altamente peligrosos como: COVs, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, RS (Mercaptanos), CH<sub>4</sub>, dioxinas y furadanos.

De acuerdo con su respuesta frente al O<sub>2</sub> las bacterias se clasifican como:

- Aerobias, cuyo metabolismo depende del O<sub>2</sub>.
- Microaerófila, que prefieren concentraciones bajas (2%).
- Anaerobias facultativas: que utilizan O<sub>2</sub> si está presente, pero pueden crecer en su ausencia
- Anaerobias: que no pueden utilizar O<sub>2</sub>. Pueden ser: estrictas: el O<sub>2</sub> es tóxico, aerotolerantes: toleran el O<sub>2</sub>.

Los sistemas de tratamiento deben ser aireados frecuentemente para garantizar las condiciones aeróbicas óptimas. La aireación de los sistemas de tratamiento puede efectuarse por volteo manual, por ventilación forzada o mediante la adición de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5%.

El volteo manual (ventilación), permite airear el sistema y regular la temperatura del proceso, evitando auto incineraciones que son muy frecuentes en los sistemas de compostaje (en especial cuando se degradan hidrocarburos). La asimilación microbiana de hidrocarburos requiere de un aceptor externo de electrones, la primera etapa el aceptor de electrones es el oxígeno, posteriormente, en ausencia del oxígeno, el aceptor de electrones puede ser una molécula parcialmente oxigenada como nitratos y sulfatos.

La degradación de hidrocarburos ocurre con mayor eficiencia y rapidez bajo condiciones aeróbicas. El oxígeno es el factor limitante en la biorremediación aeróbica, consecuentemente la adición de oxígeno puede incrementar sustancialmente la tasa de biodegradación. La adición de oxígeno está direccionada a la fase disuelta de los contaminantes en la zona de capilares edáficos y es eficiente si no existe una limitación de nutrientes (fuentes de N; P, K), (Speight y Arjoon, 2012).

### **2.3.6. Tipo y concentración de Contaminante**

Considerar la concentración de contaminantes presentes en los sistemas de tratamiento, es fundamental para el éxito de la biorremediación. Elevadas concentraciones del contaminante pueden ser inhibitorias para el crecimiento microbiano, por esta razón se debe bajar la concentración de estos antes de iniciar el tratamiento insertando microorganismos. De nuestra experiencia profesional hemos establecido experimentalmente y mediante trabajos de campo que concentraciones superiores a 40.000 ppm son inhibitorias, la biodegradación se detiene completamente y se observa alta mortandad microbiana (Gualoto, 2008a).

La legislación ambiental ecuatoriana, prohíbe explícitamente diluir los residuos con materiales limpios (aguas, suelos), por esta razón es prudente emplear para la dilución otros residuos, empleados en calidad de fuente adicional de carbono (cosustrato) o a su vez, otros suelos o residuos contaminados con mayor volumen, pero con concentraciones de contaminantes más bajas.

Una estrategia frecuentemente empleada en el tratamiento de suelos contaminados con derrames de hidrocarburos es el lavado. Para el efecto se emplean desengrasantes biodegradables, que permiten recuperar los hidrocarburos y de esta manera reducir su concentración en los suelos a tratar. Los desengrasantes más conocidos en el mercado nacional son: Orange Touch, Tech 90, Disper oil, TQ flock, entre otros. Más detalles al respecto se darán en el estudio de casos.

La composición de los contaminantes y su inherente biodegradabilidad es la más importante cuestión por considerar, cuando se avalúa la posibilidad de limpiar una zona contaminada (Atlas, 1975). El petróleo crudo pesado es más difícil de degradar que el crudo liviano, de igual forma degradar compuestos organoclorados, es más difícil de gradar que, compuestos organofosforados. La cantidad de crudo pesado metabolizado por algunas especies bacterianas aumenta con el decremento de la concentración del contaminante, mientras que las tasas de degradación pueden parecer más pronunciadas, dentro de un rango específico de concentración (Okoh et al., 2002; Rahman et al., 2002).

### **2.3.7. Estado físico del contaminante**

El estado físico de los contaminantes y su forma química, son de vital importancia para su disponibilidad ambiental, así la mayoría de los contaminantes ambientales sujetos a remediación se hallan en solución, en las descargas de aguas residuales, en fuentes naturales lacustres, ríos, aguas subterráneas y mares y en la solución del suelo.

Para que un contaminante ambiental sea disponible, debe estar en solución, esto es en forma iónica. A manera de ejemplo si en un sustrato se encuentra  $Hg^0$  metálico, su toxicidad ambiental es baja, sin embargo, en forma de  $Hg^{1+}$  o  $Hg^{2+}$ , su toxicidad incrementa, peor aún si se halla metilado como metil mercurio o dimetil mercurio.

La biorremediación de contaminantes ambientales gaseosos presenta un reto tecnológico y de seguridad, siendo su masa molecular una de sus propiedades más importantes, porque está relacionada directamente con su movilidad ambiental. Adicionalmente, su reactividad química y toxicidad genera dificultades adicionales para su tratamiento seguro y sustentable, a

manera de ejemplo se puede mencionar el tratamiento de las emisiones de H<sub>2</sub>S de la industria hidrocarburífera y de NH<sub>3</sub> de la industria de los abonos, entre otros.

### 2.3.8. Tipo de suelos y propiedades mecánicas del sustrato

Las bacterias edáficas están asociadas principalmente a las partículas del suelo, que constituye su hogar y que reúnen todas las condiciones para su desarrollo, el grado de su asociación depende de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la superficie<sup>17</sup>. Los contaminantes interactúan con los suelos en formas complejas a través de adsorción y la resistencia a la transferencia de masa que generalmente impiden su disponibilidad para los organismos (Singh et al., 2009).

Los distintos tipos de suelo se distinguen por sus propiedades mecánicas y físico químicas tales como: tamaño de partícula, tamaño de poro, red cristalina, capacidad de campo, color, contenido de materia orgánica, régimen térmico, conductividad, alcalinidad, que a su vez definen la diversidad microbiana y abundancia relativa.

Los suelos arenosos tienen una capacidad de campo baja, factor que hace que estos no puedan retener la humedad necesaria para garantizar el metabolismo microbiano durante la biorremediación, retienen muy poco la materia orgánica y sus nutrientes, quienes migran juntamente con los contaminantes hasta los niveles freáticos. Las características de los suelos arcillosos y arenosos se detallan en la Tabla No. 2.4.

**Tabla No. 2.4.** Características del suelo para una efectiva biorremediación

TIPO DE SUELO	TASA DE APLICACIÓN DE AGUA	CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE HUMEDAD	PERMEABILIDAD	CAPACIDAD DE CAMPO % en eso	PUNTO DE MARCHITEZ % en peso
Arcilloso	10-12 pulgadas	Alta	baja	9-25	3-10
Arenoso	8-9 pulgadas	baja	Alta	38-43	25-28

*Adaptado de Speight y Arjoon, 2012, página 323.*

Los suelos arcillosos en cambio son altamente compactados, factor positivo porque evita la migración de contaminantes ambientales. Sus pequeños biopelícula.

poros están saturados de agua, razón por la que generan condiciones estrictamente anaerobias, aspecto que es desfavorable para la Biorremediación que es preponderantemente aeróbica.

### **2.3.9. Influencia de las propiedades del suelo**

Las condiciones físicas del suelo también pueden contribuir a la reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes. El enlace de los contaminantes puede ser una de las razones principales de que su biodisponibilidad se reduzca, los contaminantes hidrofóbicos están atrapados físicamente dentro de los microporos edáficos, donde la partición de contaminantes entre la fase sólida y líquida reduce la tasa de difusión. Las moléculas de contaminantes deben sortear un tortuoso flujo desde el microporo hasta la partícula de suelo del exterior.

Los diámetros de los microporos son varían entre 1.0 nm, hasta 20 nm; en consecuencia, los materiales atrapados pueden no estar disponibles para los microorganismos. Las raíces vegetales tienen la capacidad de penetrar estos poros pequeños, destruyendo los agregados edáficos, amplificando la superficie de exposición de los contaminantes, consecuentemente incrementando la degradación de contaminantes atrapados, mediante la biomasa radicular, que puede ser superior a 20g /kg de suelo, con una longitud total radicular de hasta 100 m/kg de suelo (Banks et al., 2003).

### **2.3.10. Nutrientes**

Para lograr una adecuada tasa de crecimiento microbiano, es necesario introducir en los sistemas de tratamiento, fuentes de elementos biogénicos. N, P, K, a más de una fuente de carbono orgánico, que por lo general son los mismos residuos para tratar. La relación óptima de C, N y P debe ser de 3:1:1. Esta recomendación es de carácter general, para cada tipo (o consorcio) de residuos a tratar, y para cada tipo de consorcio microbiano a emplear; se deben hacer estudios de cinética, que permitan definir las cantidades necesarias de cada elemento nutritivo, para garantizar una eficiente biorremediación. En forma general se debe establecer el Balance de masas y energía.

Según Das (2014), la relación de nutrientes que garantiza un óptimo de crecimiento es C: N: P= 120:10:1. Adicionalmente, los microorganismos

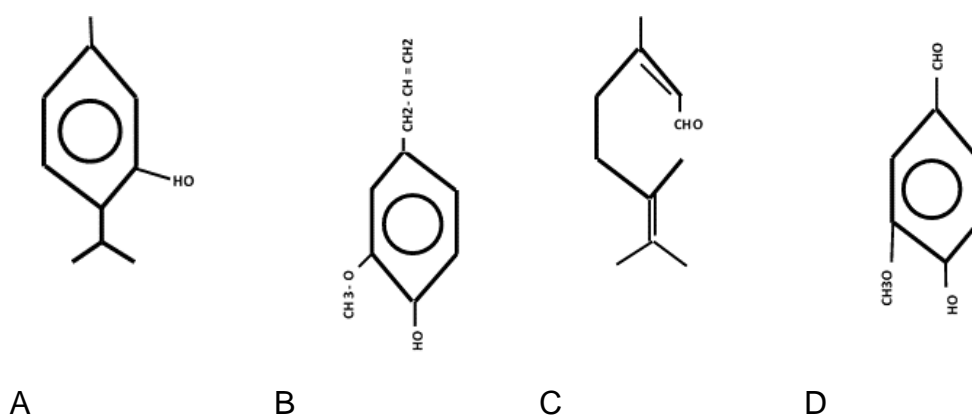


para la activación de sus sistemas fermentativos requieren una serie de microelementos tales como: B, Co, Mn, Cu, Mg, Zn y Fe. Estos microelementos pueden adicionarse en forma de quelatos o en forma de compuestos organominerales (Humatos de sodio y potasio con microelementos), disponibles en el mercado nacional.

En casos particulares se hace necesario adicionar estimulantes de crecimiento de carácter hormonal, como ácido oxálico, ácido cítrico, ácido glutárico, ácido glucurónico, adenosínfosfato cíclico, etc. Las fuentes de nutrientes pueden ser muy variadas, desde abonos químicos, hasta residuos carbonados de otras actividades productivas, tales como, cítricos, hortalizas, aceites, bagazo, estiércol, zumos, entre otros. Con el propósito de acelerar el proceso de biodegradación de un contaminante poco biodegradable, se sugiere el empleo de Cosustratos; que son sustancias que poseen una similitud estructural con el contaminante, pero que, a diferencia de éste, son de fácil degradación. A manera de ejemplo ilustrativo, podemos mencionar a los aceites esenciales cuya estructura molecular es similar a los compuestos aromáticos derivados de hidrocarburos.

Bajo esta óptica se viene empleando *Penicillium* y *Aspergillus*, que crecen en los residuos de cítricos a expensas de limoneno, citral y otros aceites esenciales (Figura 2.6.). Al introducirlos en un sistema de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados, juntamente con residuos de cítricos, son capaces de biodegradar hidrocarburos aromáticos por la similitud estructural de los Isoprenoides con los anillos aromáticos (Gualoto, 2009).

Otro ejemplo es el empleo de DDT en calidad de cosustrato para la biodegradación del bifenilo. Diferentes tipos de nutrientes (abonos primarios de N, P) han sido aplicados para la degradación de hidrocarburos, incluyendo abonos hidrosolubles y liposolubles. La biodisponibilidad de los contaminantes es el factor más importante de la biodegradación, por cuanto estos, al ser hidrofóbicos, se disuelven poco en el agua siendo adsorbidos por las partículas de suelo y la fracción húmica de los mismos, factor que retarda su paso a la fase acuosa donde son disponibles para los microorganismos.



**Figura 2.6.** Cosustratos de los hidrocarburos aromáticos A= Timol (mandarinas), B= Cotral (limón), C= Eugenol (plátano), D= Vanilina (vainilla)

Las ciclodextrinas son componentes naturales que forman complejos solubles con las moléculas hidrofóbicas incrementando sustancialmente la tasa de degradación de hidrocarburo y otros compuestos hidrofóbicos. Trabajos de este tipo se han desarrollado *in vitro*, su aplicación en trabajos *in situ*, ha mostrado la capacidad de reducir la elución, esto es la movilidad lateral de los contaminantes en el suelo y su percolación posterior por el agua pluvial, reduciendo sustancialmente los riesgos de contaminación de aguas subterráneas (Sivaraman et al., 2010).

Adicionalmente se ha evidenciado que la combinación de la bioaumentación con el uso de ciclodextrinas incrementa la biodisponibilidad de contaminantes y su tasa de degradación (Bardi et al., 2003). Por lo tanto, la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos puede ser mejorada por el aumento de las poblaciones microbianas degradadoras y por el aumento de la biodisponibilidad de hidrocarburos (Bardi et al., 2007).

Una inadecuada disponibilidad de nutrientes minerales, en especial N y P; con frecuencia limita el crecimiento de microorganismos degradadores y reduce la tasa de biodegradación de los contaminantes. El hierro (Fe) es reportado como factor limitante solo en aguas limpias, y en agua marina en alta mar (Swannell et al., 1996). El azufre en forma de iones de sulfato es abundante en agua de mar, pero podría ser limitante en algunos ambientes de agua dulce. El pH alcalino leve del agua de mar es favorable para la degradación de hidrocarburos, en tanto que, en suelos ácidos, el encalado a pH 7,8-8,0 tiene un efecto estimulante.

### 2.3.11. Concentración de sales

La presencia de sales en el sistema de tratamiento biológico debe ser controlada y mantenida en valores específicos, por cuanto las sales alteran la presión osmótica de las células microbianas, generando fenómenos de contracción y lisis celular, con efectos negativos sobre la población microbiana y el avance del proceso de Biorremediación (Figura 2.7).

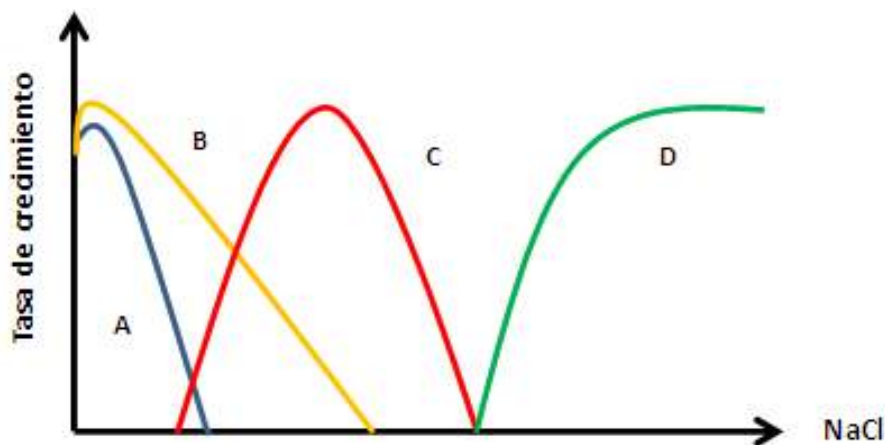


Figura 2.7. Relación crecimiento microbiano salinidad. A. *Bacillus*, B. *Staphylococcus*, C. *Vibrio*, D. *Halobacterium*.

Los microorganismos que necesitan sales para su crecimiento se denominan halófilos, en tanto que aquellos que pueden crecer en ausencia o presencia de estos se denominan halotolerantes. Un amplio rango de contaminantes orgánicos requiere la presencia de sales para ser mineralizados o transformados por los microorganismos (Margesin and Schinner, 2001b).

Tabla No 2.5. Actividad del agua requerida por los microorganismos

ORGANISMO	HÁBITAT	MÍNIMO DE ACTIVIDAD ACUOSA PARA EL CRECIMIENTO
<i>Caulobacter</i>	Agua fresca y marina diluida	1.00
<i>Pseudomonas</i>	Ambientes con bajo nivel salino	0.91
<i>Salmonella/E. coli</i>	Animales	0.91
<i>Lactobacillus</i>	Animales y plantas	0.90
<i>Bacillus</i>	Suelo	0.90
<i>Staphylococcus</i>	Animales	0.85
<i>Halobacterium</i>	Lagos salados, mar muerto	0.75

### **2.3.12. Presencia de metales pesados**

Como se mencionó ya, los metales pesados son inhibidores del crecimiento microbiano por su toxicidad, debida a la capacidad de interactuar con componentes celulares específicos (Freedman, 1995), por esta razón antes de iniciar un proceso de Biorremediación, se debe reducir la concentración de estos hasta niveles tolerables, esto se logra con la ayuda de tamices moleculares, como zeolitas, puzolanas y carbones activados<sup>18</sup> o empleando organismos capaces de biotransformarlos. La Fito estabilización es una alternativa de fitorremediación mediante la cual, las plantas reducen la toxicidad de los metales pesados (Raskin y Ensley, 2000), el mecanismo es la biosorción, esto es su acumulación pasiva en el interior de sus tejidos; en este proceso juegan un rol preponderante la temperatura, pH, la presencia de otros metales y compuestos orgánicos (Violante et al. 2010, Narang et al., 2011). Los microorganismos poseen un conjunto de enzimas capaces de ejecutar reacciones de oxidación, reducción, metilación y alquilación de metales (Valls y De Lorenzo, 2002).

Varios estudios muestran que la mejor alternativa para tratar problemas de contaminación ambiental por metales pesados, a bajas concentraciones es la biorremediación, por su fácil ejecución, confiabilidad y no producción de contaminantes secundarios (Chen et al., 2005; De et al., 2008).

La gama de metales pesados sujetos a control, dependen de la legislación ambiental bajo la cual se valorarán los trabajos de remediación y de los riesgos ambientales asociados a su presencia en suelos, aguas y residuos. Para fines prácticos los metales pesados de relevancia en trabajos de biorremediación son: Hg, Cd, V, Cr (VI), Zn, Ni, Ba, etc.

### **2.3.13. Efecto de la intemperie**

El petróleo derramado y sus derivados son sometidos a oxidación, evaporación, pérdida de sus propiedades fisicoquímicas y composición originales; proceso conocido como intemperación. Estos cambios presentan desafíos para los esfuerzos de remediación. Por un lado la evaporación transporta los contaminantes volátiles a la atmósfera generando problemas de conta-

---

<sup>18</sup> Existen múltiples estudios que certifican la eficiencia de estos materiales en la captación de metales pesados.

minación del aire y formación de mezclas explosivas en especial en zonas alto andinas, donde es frecuente la formación de neblinas; por otro lado, la evaporación hace que en el suelo se incremente la cantidad de fracciones pesadas de los hidrocarburos que consecuentemente hacen más difíciles y prolongados los trabajos de biorremediación; de esto atestiguan las bajas tasas de degradación en suelos contaminados con hidrocarburos intemperados (Trindade et al., 2005), en comparación con la degradación de hidrocarburos en derrames frescos. La aplicación de las estrategias de bioestimulación y bioaumentación, en el tratamiento de crudos frescos, es aproximadamente dos veces más eficiente en comparación con el tratamiento de crudos intemperados. Espacios con un largo historial de contaminación como refinerías estaciones de servicios pueden ser manipulados para mejorar la biorremediación y acelerar las tasas de degradación de los contaminantes.

## 2.4. Procedimientos para realizar una biorremediación

Con frecuencia en la ejecución de trabajos de biorremediación de campo, el investigador o la empresa, encargada de ejecutar los trabajos, se plantea la pregunta ¿por dónde empezar? El responder a esta pregunta en forma correcta, define el éxito o fracaso de los trabajos. Basados en nuestra experiencia de campo, recomendamos la siguiente secuencia de eventos y actividades, que han mostrado su eficiencia independientemente del sitio donde se ha implementado.

### 2.4.1. Visita e inspección al sitio afectado por contaminación

Es absolutamente indispensable realizar la visita al sitio objeto de estudio afectado por contaminación, por causa de un derrame, descarga, pasivo ambiental o actividad productiva en ejecución; por cuanto nos permite levantar información válida para:

- Conocer la naturaleza, cantidad, magnitud y el alcance del problema.
- Conocer las condiciones ambientales imperantes en la zona de estudio.
- Evaluar los riesgos ambientales del problema.
- Dimensionar el sistema de tratamiento, en cuanto a tamaño, complejidad y tiempo de funcionamiento.

- Evaluar costos operativos, y ambientales del programa de remediación.
- Conocer la existencia de facilidades operativas, logísticas y servicios básicos indispensables para el éxito del proyecto de remediación ambiental.
- Conocer la problemática socio ambiental de la zona de influencia directa e indirecta.

Para la visita es indispensable seleccionar el personal técnico y equipos, que permitan con criterio levantar la información relevante anteriormente citada.

### **2.4.2. Muestreo y análisis de suelos**

Para determinar la cantidad, naturaleza química (composición, estado, propiedades) y riesgos potenciales de los contaminantes, se deben tomar muestras de suelos, sedimentos, aguas o residuos, objeto de estudio. Para el muestreo de suelos, se recomienda un muestreo preliminar exploratorio con sondas manuales o barrenas, o mediante la exposición de la parte superior del suelo con una pala (calicatas), que permiten evidenciar la antigüedad del proceso de contaminación y el tipo de uso de suelo (Robertson et al., 1999).

#### **a) Determinación del número de muestras**

El número de muestras se determina por la profundidad alcanzada por el/ los contaminantes y el tiempo transcurrido desde que se produjo la contaminación. Se deberá tomar como mínimo cinco y máximo 20 muestras, cuando el contaminante no ha alcanzado una profundidad mayor a 80 centímetros. Cuando la profundidad de afectación alcance niveles superiores a los 80 centímetros, el número de muestras a coleccionar dependerá del criterio de la entidad ambiental de control y del técnico encargado de la toma de muestras (Buduba, 2004).

El número de muestras requeridas, por lo tanto, depende de la rigurosidad de la prueba. Como un criterio de muestreo se recomienda tomar de 8 a 10 muestras para la caracterización del área mediante muestras compuestas con un porcentaje de variación no mayor que 10% alrededor de la media

(Benedetto et al., 2008). En general se recomienda el uso de las metodologías de SOIL Estándar Method, siempre y cuando no exista una normativa local nacional que defina el criterio de muestreo.



A

B

**Figura 2.8.** Toma de muestras por cuarteo a) muestra previa, b) toma de muestra según la metodología

Fotos tomadas por el autor

Independientemente del tipo de muestreo empleado, la toma de la muestra debe realizarse por cuarteo (figura 2.8), así del sitio elegido para el muestreo, se toman submuestras, que deben tener un volumen similar, se colocan sobre una lona o material (no plástico para hidrocarburos) plástico limpio, se mezclan profusamente eliminando el material pétreo y materia orgánica, se divide la mezcla en cuatro partes iguales y se procede a eliminar dos de ellas, este proceso se repite varias veces hasta que se obtenga una masa fina de 0,5 – 1 Kg (Buduba, 2004).

### ***Toma de la muestra***

Una vez definidas las características de las muestras a obtener y el instrumento de muestreo a utilizar, la extracción de las submuestras deberá realizarse con los siguientes criterios (Pennock, 2004).

- a. Los recipientes por utilizar deberán estar convenientemente limpios y etiquetados.
- b. Si al punto de muestreo se va a acceder vadeando, esta aproximación deberá hacerse contra corriente para evitar la perturbación de los sedi-

mentos que se van a muestrear.

c. El muestreador deberá manejarse siguiendo siempre las instrucciones que el fabricante para su uso. Además:

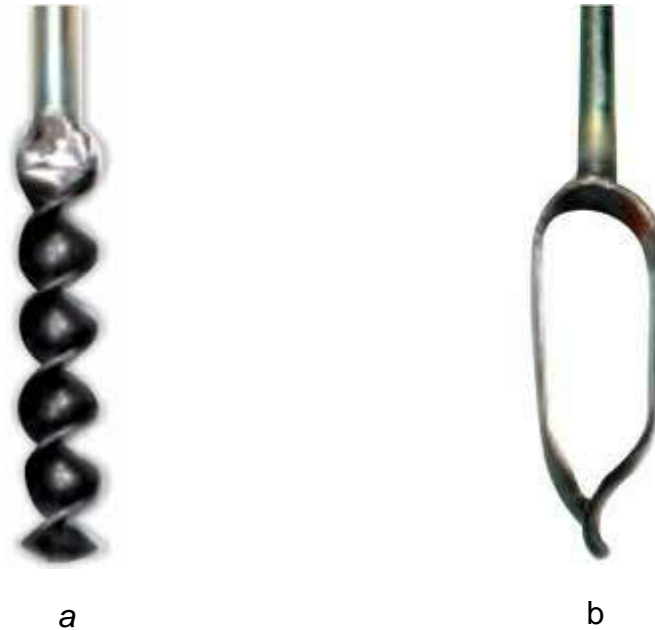
- Deberá asegurarse de que se recoge la muestra de la profundidad requerida.
- Si el instrumento es de tipo “cilindro”, deberá asegurarse de que la penetración en el sedimento se realiza de forma perpendicular.
- Si el instrumento es de tipo “recogedor”, deberá asegurarse de que el contacto con el sedimento se realiza suavemente para minimizar las posibles perturbaciones.
- Repetir la penetración y extracción tantas veces como sea necesario hasta alcanzar la cantidad de muestra requerida y un mínimo de cuatro veces.

### ***Materiales y equipos de muestreo***

La selección de los materiales y equipos adecuados para el muestreo es importante para la garantizar la calidad de las muestras, un listado preliminar se sugiere a continuación:

- Envases para la recolección de la muestra: frascos estériles
- Hieleras de plástico o de otro material aislante con tapa (Coolers).
- Bolsas refrigerantes (“Blue Ice”) o bolsas de plástico impermeables con hielo cerradas.
- Solución de alcohol etílico al 70 %.
- Gasas o cotonetes de algodón, estériles.
- Muestreadores de agua.
- Mandil, cofia, mascarilla y guantes estériles desechables.
- Marcadores indelebles.
- Barrenos (Figura 2.9.)





**Figura 2.9.** Tipos de barrenos a) barreno espiral b) barreno para arcillas

### ***Muestreo de sedimentos***

El muestreo de sedimentos que son muestras de material particulado precipitado por gravedad, de estructura y composición compleja, representa una serie de retos debido a las dificultades operativas, generalmente estas se encuentran a cierta profundidad, que requiere su medición exacta, la elección de la herramienta adecuada y de habilidades y destrezas de parte del personal responsable de dicha tarea.

Para el muestreo de sedimentos, se han establecido varias técnicas, teniendo en cuenta principalmente las características físicas del medio como son la profundidad y granulometría del fondo, posibilidad de penetración de los equipos de muestreo, presencia de vegetales, piedras grandes, etc., así como el destino de las muestras, ya sean para un análisis fisicoquímico, evaluación del contenido de compuestos orgánicos o metales pesados (Bortolon et al., 2009). Entre los equipos empleados para el muestreo de sedimentos podemos mencionar a:

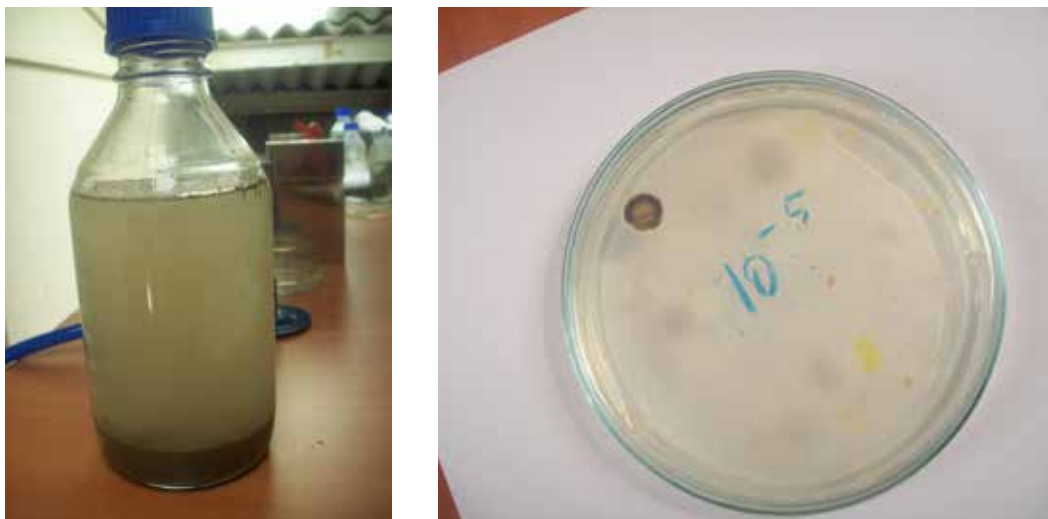
- Draga Van Veen para sedimentos
- Muestreador de Ekman
- Corer de gravedad

- Corer de pistón

Más información sobre las técnicas de muestreo puede hallarse en: Conklin, 2004 y en Carter, 2008.

### 2.4.3. Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos *in situ*

La obtención de microorganismos debe realizarse *in situ*, esto es, los microorganismos se deben aislar de la misma fuente de contaminación (Figura 2.10.). Si se trata de un proceso de contaminación reciente (como un derrame), es permitido identificar y aislar microorganismos de sitios cercanos que posean condiciones ambientales similares al área de estudio.



a

b

**Figura 2.10.** Cultivo de microorganismos. a) Dilución de suelo b) cultivo de microorganismos en desarrollo

La legislación ambiental ecuatoriana es muy clara al respecto, prohíbe la introducción de organismos exóticos a ecosistemas sensibles como las fuentes de agua, selva amazónica, páramos, etc.

Lamentablemente en la práctica ambiental nacional, esta prohibición ha sido sistemáticamente ignorada por empresas biorremediadoras, que han operado en el Distrito Amazónico en los últimos 30 años, quienes han realizado la introducción masiva de microorganismos importados desde el Canadá, Estados Unidos y Europa en los trabajos de biorremediación que

han ejecutado. No existe la seguridad de que las cepas importadas sean eficientes bajo las condiciones ambientales locales y que no hayan sido genéticamente modificadas. Los organismos de control no disponen del personal y equipos necesarios para su comprobación y control. Queda tan solo, apelar a la ética ambiental y honradez de las compañías biorremediadoras.<sup>19</sup>

#### 2.4.4. Pruebas de biodegradación

Una vez aislados los microorganismos existente *in situ*, se procede con la ejecución de pruebas experimentales de biodegradabilidad, en tal forma que se identifiquen las cepas capaces de biodegradar los contaminantes. Las pruebas se efectúan en medios nutritivos que poseen pequeñas cantidades del contaminante o contaminantes específicos que se desean eliminar (en concentraciones de 20 a 100 ppm), estas demostrarán cuáles de todas las cepas aisladas, tienen la capacidad de degradarlos y sus tasas de degradación. Adicionalmente, estas pruebas permitirán calcular los parámetros cinéticos, como: Tasa de reproducción, el tiempo de vida media de los residuos, así como las condiciones ambientales ideales para lograr altos índices de biodegradación.

#### 2.4.5. Elección de la metodología de tratamiento

Con los resultados de las pruebas de biodegradación, la elección de la metodología de tratamiento a aplicarse en campo es más fácil. Sin embargo, es necesario recordar que las pruebas de laboratorio son una buena guía o aproximación de lo que se obtendrá en el campo. Hay que considerar que los parámetros de proceso sujetos a control exhaustivo en el laboratorio no son factibles de controlar en condiciones de campo, en consecuencia, estarán sujetos a la influencia de las condiciones ambientales de la zona de estudio, factor que debe ser considerado en la elección de la metodología de tratamiento.

Muchas veces la metodología elegida para el tratamiento de un contaminante o grupo de contaminantes específicos, probada bajo unas condiciones ambientales específicas, no es viable bajo otras condiciones ambien-

<sup>19</sup> Este es un tema preocupante, porque al parecer los intereses de empresas transnacionales se sobrepone a la normativa nacional, con el silencio de los organismos de control.

tales, razón por la que, para cada caso específico, se recomienda analizar su pertinencia.

### **2.4.6. Definición del equipo profesional que ejecute el trabajo**

El empleo masivo de microorganismos en trabajos de biorremediación ambiental genera riesgo biológico considerable para el personal, instalaciones y ambiente; razón por la que se hace necesario la observancia de estrictas normas de Bioseguridad, las mismas que dependerán de la cantidad, tipo y mecanismos de reproducción microbiana.

Por esta razón, todo trabajo de Biorremediación debe contar con el personal capacitado y con experiencia en la ejecución de trabajos similares, con conocimiento pleno de los riesgos asociados a su trabajo. Adicionalmente debe contar con un manual de Bioseguridad para los trabajos de laboratorio y campo, que garantice la integridad del personal, equipos, instalaciones y ambiente (Gualoto, 2008b). La disponibilidad de una manual de Bioseguridad no es una opción, es un imperativo, ¡sin el cual, ningún trabajo de biorremediación debería ser autorizado!

Parte del equipo profesional requerido para este tipo de trabajos son: un microbiólogo, Ing. Ambiental, un Especialista en Seguridad industrial, bioseguridad y ocupacional, un Epidemiólogo, aparte de especialistas para la ejecución de las operaciones unitarias de Biorremediación y manejo de maquinaria y equipamiento especializado.

### **2.4.7. Definición de las normativas de Bioseguridad aplicarse en el campo y en laboratorio**

El empleo masivo de microorganismos en trabajos de biorremediación ambiental, fuera de las condiciones controladas de laboratorio, genera un elevado riesgo biológico cuya gestión requiere la participación de un equipo profesional altamente capacitado, conocedor de la fisiología de los microorganismos empleados, su comportamiento ambiental y de las características del ecosistema de la zona de estudio.

Con frecuencia en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, se emplean cepas patógenas para el hombre y animales, tales

como: *Pseudomona aeruginosa*, *Mucor* sp., *Cándida* sp., *Streptococos* sp. Debido a su eficiencia, no es recomendable su eliminación pese a los riesgos asociados a su empleo masivo. Incluso cepas microbianas como *Pseudomona* sp., *Bacillus* sp., y *Rhodococcus* sp., que no son patógenas para el hombre, pueden generar problemas de septicemia, debido al elevado volumen de empleo de pool bacteriano. En la definición de las normativas de bioseguridad de campo, se deberá considerar:

- Las condiciones ambientales imperantes.
- El personal técnico disponible y el grado de instrucción del personal operativo.
- La disponibilidad de equipos de bioseguridad, personal, colectivo y ambiental.
- La disponibilidad (construcción) de barreras físicas de contención.
- Disponibilidad de Planes de contingencias, emergencias y cuarentena.
- Cercanía de centros poblados.
- Cercanía de fuentes de agua.<sup>20</sup>

#### **2.4.8. Marco legal e institucional bajo cuya óptica se ejecutará en trabajo**

Finalmente, se debe definir el marco legal, bajo el cual se ejecutarán los trabajos de remediación ambiental. Al efecto se debe identificar el ámbito legal, esto es, la pertenecía a una u otra actividad productiva regulada por un marco legal específico. Así, en caso de problemas ambientales relacionados a actividades que giran en torno a los hidrocarburos, el marco legal a aplicar es el Reglamento Sustitutivo 1215 para las Operaciones Hidrocarbúferas en el Ecuador.

Si un derrame de hidrocarburos ocurre dentro de una zona protegida, a más del reglamento mencionado se deberá considerar la Ley de Áreas Protegidas, la Ley de Aguas y ordenanzas ambientales del municipio, cantón o provincia donde se halle el área afectada. Puede suceder que el avance en las tecnologías y la creación de nuevas sustancias, generen un vacío legal, por cuanto la ley no contempla su existencia y consecuentemente

<sup>20</sup> Cabe señalar que, al respecto, no existe normativa escrita, en la legislación ambiental, por lo que las normas sugeridas son producto de la experiencia del autor.

sus efectos dañinos; en estos casos se aplicará la legislación internacional que más se aproxime y en los que se hayan sentado precedentes jurídicos.

### 2.5. Estrategias de Biorremediación

Las estrategias sugeridas en el presente libro. Son el producto de décadas de experimentación y de ejecución de trabajos de Biorremediación en el campo y laboratorio. Estas se describen en forma secuencial, tal como se han empleado en dichos trabajos.

#### 2.5.1. Estabilización

Con frecuencia los residuos (sustratos) a ser tratados, son de naturaleza inestable (volátiles, altamente hidratados, inflamables, altamente densos, etc.), por esta razón en nuestra práctica cotidiana hemos entendido la necesidad de estabilizar previamente a los residuos antes de tratarlos, como una condición sin la cual es imposible garantizar su transporte, almacenamiento y tratamiento exitoso.

La estabilización consiste en eliminar esas características indeseables de los residuos, para facilitar su manipulación y hacerla segura para el personal, instalaciones y ambiente. Con frecuencia hemos recurrido a la adición de tamices moleculares (zeolitas, puzolanas, margas, humatos y carbones naturales), quienes interaccionan con grupos funcionales presentes en las moléculas de los residuos, tales como: RH, COOH, NH, OH, SH, COH, etc., participando en reacciones de intercambio iónico, hidratación (solvatación), complejación, quelación, adsorción, entre otras. Estas interacciones permiten, estabilizar a los residuos y facilitan su manipulación, reduciendo su movilidad ambiental y por ende su peligrosidad.

#### 2.5.2. Deshidratación

El agua es el principal vehículo de contaminación ambiental, la gran mayoría de residuos y contaminantes ambientales eliminados al ambiente, tienden a hidratarse o por su procedencia (lodos residuales de plantas de tratamiento), están compuestos por un alto porcentaje de agua, hasta un 90%. Esto dificulta muchos su transporte incrementando los riesgos de derrames, por accidentes de carácter involuntario. Con frecuencia los resi-

duos se tienden en plataformas de hormigón cubierta, para facilitar su deshidratación y evaporación a expensas de la radiación solar. Esta estrategia es factible siempre y cuando el contenido de sustancias tóxicas volátiles (COVs) presentes en los residuos no sea elevada.

Nosotros hemos optado por emplear cantidades específicas de zeolitas o bentonita (en función del grado de hidratación de los residuos), para en combinación con el tendido, estimular la deshidratación de los residuos. Esto es importante en especial cuando es imposible hacer la Biorremediación *in situ* y es necesario transportar los residuos a otro sitio.

### 2.5.3. Cambio de estructura

Otra estrategia ampliamente utilizada en biorremediación es el cambio de la estructura de los residuos a tratar, esto se logra por la adición de materiales como: Residuos agroindustriales (cascarilla de arroz, café, cacao, caña, madera, etc.).

La adición de este material contribuye a generar poros (burbujas) llenas de aire, a disminuir el grado de compactación del residuo, consecuentemente a generar las condiciones para procesos eminentemente aeróbicos. Adicionalmente estos materiales brindan a los microorganismos la superficie necesaria de adhesión, para su proliferación (biopelícula) y metabolismo normal, además de servir como microfiltros a través de los cuales muchos de los contaminantes son inmovilizados. **Condición para que un contaminante ambiental sea sujeto a degradación es su inmovilización.**

El efecto estructurador de la materia orgánica es incrementado por la presencia de Zeolitas, quienes contribuyen a la formación de los coloides edáficos, captan metales pesados tóxicos para los microorganismos, retienen agua necesaria para el metabolismo microbiano e inmovilizan contaminantes cargados de numerosos grupos funcionales.

### 2.5.4. Maduración

Una vez cumplidas las estrategias anteriores, es necesario dejar reposar a los residuos, por un tiempo no menor a dos semanas, con el propósito de que la mezcla de residuos, tamices moleculares, material estructurante y

microorganismos presentes en los materiales, conformen una unidad dinámica y estable. El tiempo necesario para la maduración varía en dependencia de las propiedades iniciales de los residuos a tratar, su composición y cantidad.

Durante la maduración terminan de producirse las reacciones de estabilización, adaptación de los microorganismos al nuevo medio, se libera el excedente de humedad, se capta los metales pesados e inmovilizan los contaminantes. Con las condiciones micro ambientales estables (pH, temperatura, conductividad, humedad), es factible iniciar un proceso de biorremediación evitando el estrés y mortandad de los microorganismos empleados.

### 2.5.5. Bioaumentación

La Bioaumentación<sup>21</sup> es una estrategia dirigida a incrementar el número de microorganismos por unidad de volumen o masa de residuos o sustrato en tratamiento. Esto se logra, inyectando microorganismos en el sistema de tratamiento. Los microorganismos inyectados deben haber sido obtenidos *in situ*. Cuando en la fuente no existe la cepa necesaria para la degradación de un contaminante específico o cuando la tasa de biodegradación de la cepa local es muy baja, se emplearán microorganismos aislados *Ex situ*.

Al proceso que involucra la importación de microorganismos a uno sitio contaminado para incrementar la degradación, se denomina Bioaumentación (Speight y Arjoon 2012).

Sin contradecir la definición dada por Speight y Arjoon (2012), es necesario considerar que para la realidad ecuatoriana y en concordancia de su legislación, no es factible la importación de microorganismos no aislados *in situ* a no ser que, estos correspondan a ecosistemas similares al objeto de estudio y cuya capacidad para degradar el contaminante en tratamiento sea plenamente demostrada.

Las prácticas de importación de microorganismos procedentes del exterior Europa o Norte América, deben ser descartadas por completo, porque ponen en riesgo la biodiversidad y equilibrio de nuestros ecosistemas. La

<sup>21</sup> Para muchos autores la Bioaumentación es una metodología, nosotros consideramos que es una estrategia, porque independientemente de la metodología de tratamiento que se ejecute, la bioaumentación es necesaria para incrementar la eficiencia del tratamiento.



introducción de microorganismos a ecosistemas naturales o artificiales no es una práctica nueva, ha sido practicada frecuentemente en la agricultura, en el tratamiento de algunos residuos y en la biorremediación de sitios contaminados. La práctica de bioaumentación ha sido exitosa mediante la introducción repetida de cepas de microorganismos altamente especializados, adaptados al residuo y a las condiciones ambientales del sitio (Singh y Ward, 2009).

El potencial de éxito de la bioaumentación puede ser incrementado, empleando suelos que contienen microorganismos autóctonos, expuestos previamente al contaminante; sin embargo, es necesario recalcar que esta práctica tiene su limitante en cuanto a la relación de volumen suelo expuesto/ suelo contaminado, por cuanto se puede violentar la legislación ambiental que prohíbe la dilución, como estrategia de remediación de suelos contaminados. La relación ideal de suelo expuestos vs suelos contaminados no debe superar 1/100 partes respectivamente. Así la introducción de consorcios microbianos naturalmente formados puede ser más efectiva en comparación con la aplicación de cepas aisladas y aplicadas en forma de cultivos puros. Muchos estudios de biorremediación han sido realizados con bioaumentación con especies Gram negativas como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, (Singh et al. 2004; El Fantroussi y Agathos, 2005).

Con especies Gram positivas como: *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Bacillus sp*, de igual forma el empleo de cepas fúngicas de los géneros: *Absidia*, *Achremonium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, and *Mucor* Todas estas cepas demuestran la eficiencia en la degradación de hidrocarburos en forma de consorcios (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

Una de las tareas de importancia en los trabajos de biorremediación con la introducción de especies exógenas, es el control del número de UFCs de los microorganismos introducidos. Una estrategia empleada en la bioaumentación es el empleo de microorganismos inmovilizados. Existen varios portadores bacterianos, como el alcohol polivinílico, quitina y quitosanos, vermiculita, bagazo de caña, (Singh et al., 2011), cascarilla de arroz y portadores organominerales como zeolitas (clinoptilolita), ácidos húmicos y fúlvicos Humatos y carbones activados de palmiste (Gualoto, 2009, Singh et al., 2011).

La supervivencia de las bacterias introducidas, así como su desempeño en la biorremediación, puede ser incrementada con la introducción de una fuente de carbono, localizada en la matriz de inoculación, que en forma simultánea puede ser el promotor de inmovilización de las bacterias no autóctonas en la población microbiana del suelo. La combinación de la bioaumentación con la bioestimulación es una estrategia prometedora para incrementar la tasa de biorremediación. Tanto las bacterias autóctonas como las introducidas reciben beneficios de la bioestimulación, por la adición de nutrientes y aceptores de electrones (Singh et al., 2011).

### **2.5.6. Bioestimulación**

La Bioestimulación al igual que la Bioaumentación es una estrategia mediante la cual se adicionan nutrientes tales como el fósforo y nitrógeno a un ambiente contaminado, para estimular el crecimiento de los microorganismos (Speight y Arjoon, 2012).

La Bioestimulación consiste en introducir en los sistemas de tratamiento fuentes adicionales de carbono, fósforo, nitrógeno, azufre, microelementos, Ca, K, Na, para que los microorganismos asimilen mejor los contaminantes y el proceso de biorremediación sea efectivo. En calidad de bioestimulantes pueden actuar, los abonos orgánicos;  $\text{KNO}_3$ , urea, KCl superfosfato, fosfato de amonio. Materia orgánica, como: restos de vegetales, frutas (cítricos). Microelementos, como: Co, Mn, Mg, Cu, B, etc.

El tipo y cantidad de material bioestimulante depende de la cinética de la cepa o pool microbiano utilizado. La tendencia general es la búsqueda de fuentes alternativas de bajo costo, frente a los preparados estandarizados de laboratorio de alta efectividad, pero de elevado costo.

Para la biorremediación de suelos contaminados con HAPs, se debe implementar estrategias activas como la adición de enmiendas (bioestimulación) que provean de oxígeno y nutrientes que incrementen la actividad microbiana autóctona y la biodegradación (Bamforth y Singleton, 2005, Mohan et al., 2006). Los beneficios de la adición de oxígeno y nutrientes para la biodegradación de HAPs ha sido reportada por varios autores (Breedveld y Sparrevik, 2000; Eriksson et al., 2000), sin embargo, pocos estudios están enfocados solo en los efectos de la bioestimulación sobre la comunidad mi-

crobiana autóctona y sobre las bacterias degradadoras de HAPs (Viñas et al, 2005). Adicionalmente es necesario recalcar que se deben generar las condiciones micro ambientales ideales para que el efecto beneficioso de la bioestimulación sea evidente.

### **2.5.7. Control de parámetros de proceso**

Una vez iniciados los trabajos de biorremediación con la aplicación de cualquier metodología de tratamiento, se debe ejecutar el control rutinario de los parámetros de proceso que garantizan el éxito de la Biorremediación y reducen los tiempos de tratamiento, consecuentemente los costos.

Entre los parámetros, que usualmente se controlan en forma rutinaria en trabajos de campo, mencionamos a: Temperatura, conductividad, humedad, pH, aireación, nutrientes, UFCs y la aireación (la cantidad de oxígeno disponible), que frecuentemente se realiza mediante volteo, manual o mecanizado. Parámetros que han sido detalladamente explicados en este capítulo.

### **2.5.8. Conclusiones y perspectivas futuras**

Es indudable que el control de los parámetros de proceso juega un rol determinante en el éxito de los trabajos de biorremediación, que ejerce influencia no solo en su eficiencia, sino también en sus costos operativos. Sin embargo, el solo control exhaustivo de estos parámetros, sin un proceso metodológico y oportuno de muestreo, análisis e interpretación de resultados; no puede garantizar un trabajo seguro. Las investigaciones que se vienen desarrollando en todo el mundo, sin lugar a duda permitirán mejorar la eficiencia, con la introducción de estrategias como el empleo de tamices moleculares, cosustratos, activadores organominerales y aceptores adicionales de electrones. Confiamos que las investigaciones ambientales que se desarrollen en nuestro país, también asuman esta ruta y de esta forma contribuyan al desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de Biorremediación, debido a la enorme cantidad de pasivos ambientales generadas por las actividades hidrocarburíferas.

### 2.5.9. Bibliografía

1. Ahmed, M., y Focht, D. D. (1973). Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Canadian Journal of Microbiology*, 19(1), 47-52.
2. Antic, M. P., Jovancicevic, B., Vrvic, M. M., y Schwarzbauer, J. (2006). Petroleum Pollutant Degradation by Surface Water Microorganisms (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research International*, 13(5), 320.
3. Asturias, J. A., Moore, E., Yakimov, M. M., Klatte, S., y Timmis, K. N. (1994). Reclassification of the polychlorinated biphenyl-degraders *Acinetobacter* sp. strain P6 and *Corynebacterium* sp. strain MB1 as *Rhodococcus globerulus*. *Systematic and applied microbiology*, 17(2), 226-231.
4. Atlas, R. M. (1975). Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied microbiology*, 30(3), 396-403.
5. Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180.
6. Austin, B.; Calomiris, J. J. Walker, J. D. y Colwell R. R. (1977). Numerical taxonomy of *Mycobacterium austroafricanum*. *J. App. Microbiol.* 94, pp. 230-239
7. Bamforth, S. M., y Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80(7), 723-736.
8. Banks, M. K., Schwab, P., Liu, B., Kulakow, P. A., Smith, J. S., y Kim, R. (2003). The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. In *Phytoremediation* (pp. 75-96). Springer, Berlin, Heidelberg.
9. Bardi, L., Martini, C., Opsi, F., Bertolone, E., Belviso, S., Masoero, G., ... y Marsan, F. A. (2007). Cyclodextrin-enhanced in situ bioremediation of polyaromatic hydrocarbons-contaminated soils and plant uptake. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1-4), 439-444.
10. Bardi, L., Ricci, R., y Marzona, M. (2003). In situ bioremediation of a hydrocarbon polluted site with cyclodextrin as a coadjuvant to increase bioavailability. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 3(3), 15-23.
11. Barker, A. V., y Bryson, G. M. (2002). Bioremediation of heavy metals

- and organic toxicants by composting. *TheScientificWorldJournal*, 2, 407-420.
12. Basso, D., Weiss-Hortala, E., Patuzzi, F., Castello, D., Baratieri, M., y Fiori, L. (2015). Hydrothermal carbonization of off-specification compost: A byproduct of the organic municipal solid waste treatment. *Biore-source technology*, 182, 217-224.
  13. Baxter, R. A., Gilbert, P. E., Lidgett, R. A., Mainprize, J. H., y Vodden, H. A. (1975). The degradation of polychlorinated biphenyls by micro-organisms. *The Science of the total environment*, 4(1), 53.
  14. Beller, H. R.; Grabić- Galić, D. y Reinhard, M. (1992). Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of ion on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, pp. 786-793
  15. Benedetto, J. L., Sorrentino, L., Cech, N., y Sánchez, T. M. (2008). Functional morphology of the Ordovician plectambonitoid brachiopod *Inversella* (*Reinversella*) *arancibiai* Herrera & Benedetto from the San Juan Formation, Argentine Precordillera. *Alcheringa*, 32(1), 53-63.
  16. Bogan, B. W., Lahner, L. M., Sullivan, W. R. y Paterek, J. R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austro-africanum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 230-239.
  17. Bortolon, L., Gianello, C., Conte, O., Oliveira, E. S., y Levien, R. (2009). Equipamento para coleta de amostras indeformadas de solo para estudos em condições controladas. *Revista brasileira de ciência do solo*. Campinas. Vol. 33, n. 6 (nov./dez. 2009), p. 1929-1934.
  18. Bossert, I., y Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. (Editor). Macmillan, New York. pp. 453-473.
  19. Breedveld, G. D., y Sparrevik, M. (2000). Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, 11(6), 391-399.
  20. Brock, T. D., y Martinko, J. M. (1998). Brock biología de los microorganismos (No. 576 B7Y 1997).
  21. Buduba, C. (2004). Muestreo de suelos. Criterios básicos. *Patagonia Forestal*, 10(1), 9-12.
  22. Bunge, M., y Lechner, U. (2009). Anaerobic reductive dehalogenation of polychlorinated dioxins. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(3), 429-444.
  23. Bush, B., Bennett, A. H., y Snow, J. T. (1986). Polychlorobiphenyl congeners, p, p'-DDE, and sperm function in humans. *Archives of Environ-*

- mental Contamination and Toxicology, 15(4), 333-341.
24. Cabrera R, Gualoto M. (2007). Biorremediación de lodos industriales de una planta ensambladora de vehículos. Ponencia. AEISA. Cuenca.
  25. Carter, M. R. (2008). Soil Sampling and Methods of Analysis. (eds Carter, MR & Gregorich, EG) <https://doi.org/10.1201/9781420005271>.
  26. Chakraborty, R. y Coates, J.D. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol Ecol., 49, pp. 27-36
  27. Chen, X. C., Wang, Y. P., Lin, Q., Shi, J. Y., Wu, W. X., y Chen, Y. X. (2005). Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 46(2), 101-107.
  28. Coates, J. D.; Chakraborty R. y Mc Inerney. (2002). Anaerobic benzene biodegradation – a new era. Research in Microbiology, 153, 621-628.
  29. Conklin Jr, A. R. (2004). Field sampling: Principles and practices in environmental analysis. CRC Press.
  30. Connan, J. (1984). Biodegradation of crude oils in reservoirs. Advances in petroleum geochemistry, 1, 229-335.
  31. De, J., Ramaiah, N., y Vardanyan, L. (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Marine Biotechnology, 10(4), 471-477.
  32. Das, S. (Ed.). (2014). *Microbial biodegradation and bioremediation*. Elsevier.
  33. El Fantroussi, S., y Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Current opinion in microbiology, 8(3), 268-275.
  34. Eriksson, M., Dalhammar, G., y Borg-Karlson, A. K. (2000). Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. Applied Microbiology and Biotechnology, 53(5), 619-626.
  35. Foght, J. M., Westlake, D. W., Johnson, W. M., y Ridgway, H. F. (1996). Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. Microbiology, 142(9), 2333-2340.
  36. Freedman, B. (1995). Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses. Elsevier.
  37. Furukawa, K. (1994). Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. Biodegradation 5, 289–300. <https://doi.org/10.1007/BF00166888>.

- org/10.1007/BF00696466
38. Furukawa, K., Tonomura, K., y Kamibayashi, A. (1978). Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(2), 223-227.
  39. Furukawa, K., y Matsumura, F. (1976). Microbial metabolism of PCBs. Studies on the relative degradability of PCB components by *Alkaligenes* sp. *Agricultural and Food Chemistry*, 24, 251-255.
  40. Gibson, D. T., y Sayler, G. S. (1992). Scientific foundations of bioremediation: current status and future needs.
  41. Gualoto M. (2005). Informe pericial de los trabajos de biorremediación Ambiental de la Laguna de Papallacta. Juicio por daños ambientales, EMAAPQ, contra Ecuavital. Petroecuador.
  42. Gualoto M. (2008 a). Curso de Bioseguridad Ambiental. Universidad de las Américas.
  43. Gualoto M. (2008 b). Estudio de Pasivos Ambientales para generar una propuesta de remediación integral del cantón Gonzalo Pizarro.
  44. Gualoto M. (2008 c). Tratamiento de residuos industriales hidrocarburo-ríferos mediante landfarming en plataforma. Weatherford Ecuador. Ponencia. III Congreso Interamericano de Salud Ambiental, AEISA “Salud ambiental en América, pasado, presente y futuro, un espacio para la reflexión e intercambio de conocimientos y experiencias en el campo de la salud ambiental en América” AIDIS- UDLA, Quito. Del 14 al 18 de mayo del 2008.
  45. Gualoto M. (2009). Curso de Biorremediación. UDLA.
  46. Inventario Preliminar de Bifenilos Policlorados PCB'S. (10 de noviembre de 1998). *El Comercio*. Pp 77,78
  47. Kanaly, R.A., y Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182, 2059–2067
  48. Klimiuk E. y Łebkowska M. (2005). *Biotechnology in protection of environmental* (in Polish). Wydawnictwo Naukowe PWN S.A, Warszawa.
  49. Kniemeyer, O.; Fischer, T. Wilkes, H. Glockner, F. O. y Widdel F. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate – reducing bacterium ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, pp. 60-68
  50. Kohler, H. P., Kohler-Staub, D., y Focht, D. D. (1988). Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8),

- 1940-1945.
51. Lemire, J. A., Harrison, J. J., y Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, moleculares targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371-384.
  52. Liu, S. H., Zeng, G. M., Niu, Q. Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L. H., ... y Cheng, M. (2017). Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Biore-source technology*, 224, 25-33.
  53. Loick, N., Hobbs, P. J., Hale, M. D., & Jones, D. L. (2009). Bioremediation of poly-aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil by composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(4), 271-332.
  54. Madigan M., Martinko J., Jack P. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*. 8va.ed. Madrid: Prentice Hall
  55. Makuzhev Yuriy. *Todo sobre los humatos*. Traducido por Miguel Gualoto. 2009.
  56. Maragkaki, A. E., Fountoulakis, M., Gypakis, A., Kyriakou, A., Lasaridi, K., y Manios, T. (2017). Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants. *Waste management*, 59, 362-370.
  57. Margesin, R., y Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
  58. McKinlay, R., Plant, J. A., Bell, J. N. B., y Voulvoulis, N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment international*, 34(2), 168-183.
  59. Meckenstock, R. U.; Safinowski, M. y Griebler C. (2004). Anaerobic degradation of Hydrocarbons. *Biotechnology*, 12, pp. 259-276
  60. Milesi, M. M., Varayoud, J., Bosquiazzo, V. L., Muñoz-de-Toro, M., y Luque, E. H. (2012). Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reproductive Toxicology*, 33(1), 85-93
  61. Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A., y Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(4), 347-374.
  62. Mohn, W. W., y Stewart, G. R. (2000). Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Bio-*



- chemistry, 32(8-9), 1161-1172.
63. Mrozik, A., y Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research*, 165(5), 363-375.
64. Narang, U., Bhardwaj, R., Garg, S. K. y Thukral, A. K. (2011). Phytoremediation of mercury using *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Environment and Waste Management*, 8(1-2), 92-105.
65. Naranjo J., Gualoto M. (2008). Eliminación Biológica de vanadio de lodos residuales tratados mediante Landfarming., Weatherford. Tesis de Maestría en Medio Ambiente.
66. Neff, J. M. (2005, January). Composition, environmental fates, and biological effect of water based drilling muds and cuttings discharged to the marine environment: A synthesis and annotated bibliography. In Report prepared for the Petroleum Environmental Research Forum (PERF). Washington DC: American Petroleum Institute.
67. Okoh, A. I., Ajisebutu, S., Babalola, G. O., y Trejo-Hernandez, M. R. (2002). Biodegradation of Mexican heavy crude oil (Maya) by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Trop. Biosci*, 2(1), 12-24.
68. Pennock, D. J. (2004). Designing field studies in soil science. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(1), 1-10.
69. Porta, M., Puigdomènech, E., Ballester, F., Selva, J., Ribas-Fitó, N., Llop, S., y López, T. (2008). Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. *Environment international*, 34(4), 546-561.
70. Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., y Banat, I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85(3), 257-261.
71. Raskin, I., y Ensley, B. D. (2000). *Phytoremediation of toxic metals*. John Wiley and Sons.
72. Rayu, S., Karpouzias, D. G., y Singh, B. K. (2012). Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities. *Biodegradation*, 23(6), 917-926.
73. Resource Futures International for CIDA and the World Bank Group. (2001). *Persistent Organic Pollutants and the Stockholm Convention: A Resource Guide*.
74. Ribeiro de Nardi, I. Zaiat, M. y Foresti E. (2007). Kinetics of BTEX degradation in a packed –bed anaerobic reactor. *Biodegradation*, 18, pp.

- 83-90
75. Richards, L. Suelos salinos y sódicos. Editorial Limusa S.A. 1972. México.P-5.
76. Risebrough, R. W., Rieche, P., Peakall, D. B., HERMAN, S. T., y Kirven, M. N. (1968). Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature*, 220(5172), 1098-1102.
77. Robertson, G. P., Wedin, D., Groffmann, P. M., Blair, J. M., Holland, E. A., Nadelhoffer, K. J., y Harris, D. (1999). Soil carbon and nitrogen availability: nitrogen mineralization, nitrification, and soil respiration potentials. In *Standard soil methods for long-term ecological research* (pp. 258-271). Oxford University Press.
78. Romero, A. R. I. (2014). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo: análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
79. Sandrin, T. R., Chech, A. M., y Maier, R. M. (2000). A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4585-4588.
80. Shah, G. M., Tufail, N., Bakhat, H. F., Imran, M., Murtaza, B., Farooq, A. B. U., ... y Rashid, M. I. (2017). Anaerobic degradation of municipal organic waste among others composting techniques improves N cycling through waste-soil-plant continuum. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(2), 529-542.
81. Singh, A., Kuhad, R. C., Shareefdeen, Z., y Ward, O. P. (2004). Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes. In *Biodegradation and bioremediation* (pp. 279-304). Springer, Berlin, Heidelberg.
82. Singh, B. K., y Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 428-471
83. Singh, A., Kuhad, R. C., y Ward, O. P. (Eds.). (2009). *Advances in applied bioremediation* (pp. 1-19). Springer Berlin Heidelberg.
84. Singh, A., y Ward, O. P. (2009). *Molecular methods for monitoring environmental contaminants and bioremediation*. Text book on molecular biotechnology. IK International, New Delhi, 1265-1274.
85. Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R. C., y Ward, O. P. (2011). Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil biology. In *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol* (pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
86. Sipes, I. G., y Schnellmann, R. G. (1987). Biotransformation of PCBs:

- metabolic pathways and mechanisms. In Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology (pp. 97-110). Springer, Berlin, Heidelberg.
87. Sivaraman, C., Ganguly, A., y Mutnuri, S. (2010). Biodegradation of hydrocarbons in the presence of cyclodextrins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 227-232.
  88. Smidt, H., y de Vos, W. M. (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 43-73.
  89. Solanas, A. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la zona no saturada del suelo*, 9.
  90. Speight, J. G. (2007). Liquid fuels from oil sand. *Handbook of Alternative Fuel Technologies*, 197-222.
  91. Speight, J. G., y Arjoon, K. K. (2012). *Bioremediation of petroleum and petroleum products*. John Wiley & Sons.
  92. Stapleton Jr, R. D., y Singh, V. P. (Eds.). (2002). *Biotransformations: bioremediation technology for health and environmental protection*. Elsevier.
  93. Stroud, J. L., Paton, G. I., y Semple, K. T. (2007). Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1239-1253.
  94. Swannell, R. P., Lee, K., y McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological reviews*, 60(2), 342-365.
  95. Trindade, P. V. O., Sobral, L. G., Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., y Soriano, A. U. (2005). Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, 58(4), 515-522.
  96. Valls, M., y De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS microbiology Reviews*, 26(4), 327-338.
  97. Varayoud, J., Monje, L., Bernhardt, T., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., y Ramos, J. G. (2008). Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17 $\beta$ -estradiol. *Reproductive toxicology*, 26(2), 138-145.
  98. Varjani, S. y Upasani, V. N. (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of environmental management*, 245, 358-366.

99. Venkatesan, M. I., De Leon, R. P., Van Geen, A., y Luoma, S. N. (1999). Chlorinated hydrocarbon pesticides and polychlorinated biphenyls in sediment cores from San Francisco Bay. *Marine Chemistry*, 64(1-2), 85-97.
100. Venosa, A. D., y Zhu, X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2), 163-178.
101. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., y Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7008-7018.
102. Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A. G., y Pigna, M. (2010). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 268-292.
103. Widdel, F. y Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic Hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, pp. 437-446
104. Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A., y Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresour. Technol.*, 100: 3221-3227.
105. Zahed, M. A., Aziz, H. A., Isa, M. H., y Mohajeri, L. (2010). Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude oil contaminated seawater.
106. Zhang, C., y Bennett, G. N. (2005). Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 600-618.



# • CAPÍTULO III •

**ORGANISMOS EMPLEADOS EN  
BIORREDIACIÓN**

## CAPÍTULO III

### ORGANISMOS EMPLEADOS EN BIORREMEDIACIÓN

#### 3.1. Introducción

La biorremediación como metodología de tratamiento y eliminación de contaminantes ambientales del suelo, agua y aire; se sustenta en las capacidades metabólicas extraordinarias de organismos vivos y específicamente microorganismos, plantas e invertebrados, para utilizar en calidad de fuente de energía y carbono, a contaminantes ambientales; permitiendo de esta forma que los ecosistemas naturales puedan recuperar sus propiedades físico químicas, el equilibrio ecológico y el restablecimiento del flujo de materia y energía reflejada en los ciclos biogeoquímicos, que permanentemente transforman al planeta.

Especial atención se presta en este libro al empleo de microorganismos en Biorremediación. Para el Ecuador, un país de mega biodiversidad, le es propio también una mega diversidad microbiana, que no ha sido estudiada aún<sup>22</sup>. La diversidad genética microbiana, constituye una poderosa herramienta biotecnológica para solucionar una amplia gama de problemas de carácter tecnológico, ambiental, salud, industrial, alimenticio, farmacológico, etc.

En Ecuador el empleo de microorganismos en trabajos de biorremediación ambiental, se dio inicio a fines del siglo pasado, siendo el primer trabajo documentando de campo de biorremediación, la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante la técnica de Landfarming, ejecutado por la Universidad Católica del Ecuador PUCE, en Tarapoa Provincia de Sucumbíos. No conocemos el tipo de microorganismos identificados empleados en dichos trabajos, pero consideramos que debieron ser microorganismos aislados *in situ*.

Trabajos de biorremediación ejecutados por nosotros en el Ecuador, han permitido identificar bacterias y hongos de algunos géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, y *Acinetobac-*

<sup>22</sup> La macro biodiversidad es proporcional a la micro biodiversidad, que sustenta a la primera.

ter, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cándida*, *Cladosporium*, *Chrysosporium* y *Fusarium* (Ver tabla 3.1), respectivamente. Durante nuestra participación en el Programa Antártico Ecuatoriano, hemos podido identificar algunas cepas que se han empleado en estudios de degradación de hidrocarburos, a bajas temperaturas, en laboratorio y en campo en la Estación Pedro Vicente Maldonado- Antártida (Gualoto, 2011).

Se han iniciado trabajos de Bioprospección de microorganismos en la zona interandina, a 4020 metros de altura en el páramo de Papallacta, sector “La Virgen”, los primeros trabajos ejecutado en los laboratorios LABINAM de la Universidad Técnica del Norte UTN, han permitido evidenciar la existencia de microorganismos resistentes a altas concentraciones de metales pesados, como el Cr (VI), Cu, Fe, hasta 10.000 ppm. Estudios similares realizados por científicos de la Academia Nacional de Ciencias de Ucrania, muestran microorganismos híper resistentes a metales como Cd, Hg y Pb (más de 25.000 ppm). Estos microorganismos fueron aislados de suelos tomados de las faldas del volcán Tungurahua (Tazhyrev et al., 2014).

**Tabla No. 3.1.** Microorganismos identificados en suelos contaminados con hidrocarburos en el Archipiélago de las Islas Shetland del Sur, península Antártica. XVI Expedición Científica Ecuatoriana a la Antártida. 2012.

CÓDIGO	GÉNERO	ESPECIE
BM7	Pseudomonas	<i>Pseudomona sp</i>
BM6	Rhodococcus	<i>Rhodococcus sp</i>
MM2	Pseudomonas	<i>Pseudomona putida</i>
PM5	Bacillus	<i>Bacillus sp</i>
MM1	Clostridium	<i>Clostridium perfringens</i>
PAM4	Aspergillus	<i>Aspergillum niger</i>
BM7	Penicillum	<i>Penicillum chrysogenum</i>
BM6	Micrococcus	<i>Micrococcus antarticus</i>
PM5	Sphingomonas	<i>Sphingomonas sp</i>

Sin lugar a duda el potencial genético de nuestra biodiversidad microbiana es enorme. Consideramos que la diversidad genética del Ecuador es la garantía futura de su desarrollo y prosperidad, una vez que se hayan explotado todos los recursos no renovables; no obstante, para que esto sea una realidad, hay que iniciar con un programa de investigación minucioso (Bioprospección), con la participación de investigadores ecuatorianos,

universidades públicas y privadas y el apoyo de centros de investigación nacional e internacional.

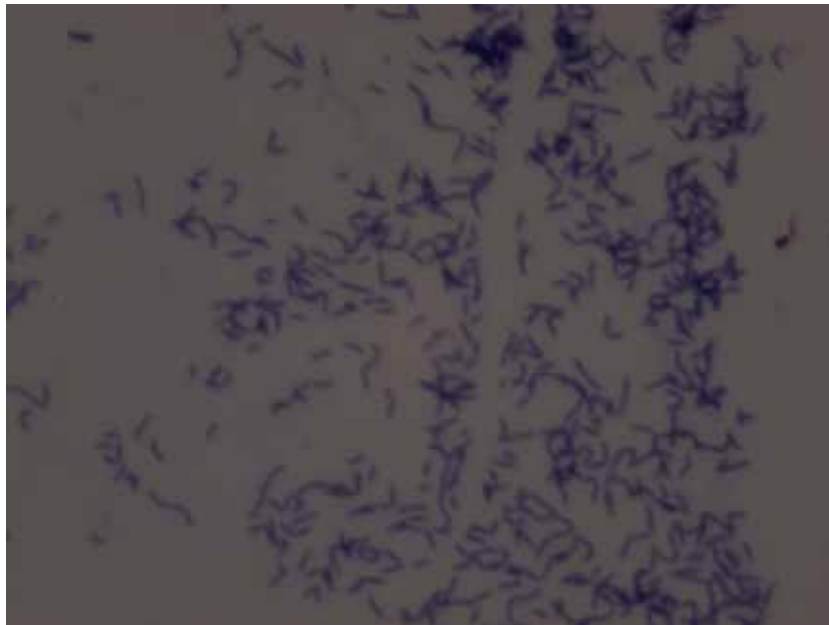
En este capítulo abordaremos en forma breve la descripción de los organismos empleados en biorremediación, empezando por los microorganismos, plantas hasta describir la importancia y riesgos ambientales ligados al empleo de organismos modificados genéticamente en remediación ambiental.

### 3.2 Bacterias

Las bacterias son organismos procariotas, que se caracterizan por su extraordinario y variado metabolismo. Constituyen los primeros organismos que poblaron la tierra y que crearon las condiciones para el surgimiento de todas las demás especies vivas. Son los responsables del permanente flujo de elementos en la naturaleza, expresado en los ciclos biogeoquímicos. Estos ciclos benefician a la humanidad, en la remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, en el procesamiento de los compuestos nitrogenados, que de otra forma podrían generar óxidos de nitrógeno que destruyen la capa de ozono de la atmósfera (Ravishankara et al., 2009).

El mayor efecto indirecto de los microorganismos ambientales es la influencia de los microorganismos edáficos en el calentamiento global, que aún se encuentra en discusión por la comunidad científica (Rice, 2006). El suelo es considerado como una fuente de gases de invernadero, como el CO<sub>2</sub>, metano, y óxido de nitrógeno debido a la respiración microbiana, es un sumidero de carbono producto de la actividad fotosintética y el secuestro de carbono, por plantas hace millones de años y que hoy permanecen en su interior en forma de hidrocarburos, carbono mineralizado y metano. Los datos disponibles confirman que cualquier cambio en este almacenamiento puede ejercer influencia sustancial en el calentamiento global.





**Figura 3.1.** Bacterias bajo tinción Gram

Las bacterias del ambiente ejercen influencia decisiva sobre la calidad de las aguas. Pueden tener efectos adversos cuando microorganismos patógenos contaminan las aguas superficiales o subterráneas. Las bacterias pueden incrementar los efectos de la contaminación del agua causada por el arsénico, por cuanto muchas bacterias emplean arsenatos en calidad de aceptores de electrones, bajo condiciones anaeróbicas. Los arsenatos se transforman en arsenitos que son más móviles ambientalmente hablando y más tóxicos razón por la que con frecuencia contaminan aguas subterráneas (National Research Council, 2007).

Muchas bacterias que son patógenas para el hombre y los animales están presentes en los alimentos, materiales y agua contaminada que usa el hombre en su vida cotidiana, ejemplos típicos son los agentes del *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetani*, *Treponema palidum*, *Gonococos*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Otros microorganismos producen antibióticos como un mecanismo de inhibición del crecimiento de otros microorganismos o de defensa, ejemplos típicos son *Penicillium notatum*, *Streptomyces griseus* y especies edáficas del género actinomicetos.

Las bacterias son microorganismos complejos, que disponen de una alta flexibilidad metabólica, que les ha permitido en forma exitosa poblar todas

las zonas disponibles en la Biosfera, desde las zonas polares hasta las zonas tropicales. Se desarrollan en los ambientes más extremos, allí donde otras especies no sobreviven, por esta razón muchas de las bacterias son extremófilas. Basados en el análisis de secuencias conservativas de ARNs 16S, se estima que existen 50 familias de bacterias (Schloss y Handelsman, 2004). Gracias a su gran capacidad metabólica, pueden degradar toda clase de material natural y una amplia gama de sustancias artificiales, por vía anaeróbica como aeróbica.

La importancia de las bacterias se evidencia por la posibilidad de emplearlas para descontaminar suelos, aguas y ambientes contaminados por petróleo y derivados de hidrocarburos, siendo de particular atención los denominados TPHs y HAPs. Un gran número de bacterias son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre las estudiadas están: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas* (Atlas, 1981; Bossert y Bartha, 1984; Bodour et al., 2003; Leahy y Colwell, 1990). Géneros bacterianos como *Afiplia*, *Janthinobacterium*, *Leptothrix*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Thiobacillus* han sido identificadas con capacidad para degradar fenantreno (Bodour et al., 2003). Nuestros trabajos han permitido identificar cepas de *Rhodococcus* y de *Sphingomonas* (Gualoto, 2011).

La población de microorganismos que degradan HAPs, varía en el transcurso de la biorremediación, seguramente debido a que a medida que se eliminan los HAPs menos recalcitrantes se van quedando los de mayor resistencia ambiental, esto posiblemente genere un cierto grado de especialización en los microorganismos participantes<sup>23</sup>.

Los estudios de empleo bacteriano en biorremediación se inician con frecuencia con su aislamiento de las muestras ambientales cultivadas en medios nutritivos, que contienen una fuente específica de carbono y energía. Una vez que se han aislado, se las somete a pruebas de degradabilidad de un contaminante específico, que el microorganismo puede emplear como

---

<sup>23</sup> Los trabajos ejecutados en campo nos muestran este comportamiento.

fuelle de energía y carbono. Esta estrategia permite hacer un estudio detallado de su metabolismo y fisiología, llegando incluso a identificar los genes responsables de las rutas metabólicas expresadas por el microorganismo (Watanabe, 2001). De esta forma se han identificado un sin número de rutas metabólicas que actualmente tienen aplicaciones industriales (Parales y Ditty, 2005); Watanabe y Hamamura, (2003) afirman que estas rutas no desempeñan un rol importante en la biodegradación de sustancias orgánicas, a no ser que se las someta a las condiciones especiales creadas por la experimentación. Muchas de las bacterias implicadas en los procesos de degradación de fenoles en los sedimentos, ni siquiera pueden ser aisladas y no crecen en medios enriquecidos en cultivos *in vitro* (Watanabe et al., 1998).

Este hecho pone en evidencia, las dificultades de obtener consorcios microbianos específicos de los cuales se conozca con precisión su fisiología y metabolismo. Muchas de las bacterias poseen apenas una porción de los genes necesarios para cubrir ciertas rutas metabólicas de degradación (Uchiyama et al., 2005), en consecuencia, se requiere el empleo de varias cepas, que trabajen en forma secuencial para completar exitosamente la biodegradación de un contaminante ambiental específico. Cada cepa bacteriana contribuye parcialmente en los procesos de biodegradación ambientales, para realizar una degradación completa hasta CO<sub>2</sub> o metano (Schink, 2006).

En la evaluación de la capacidad bacteriana para remediar sitios contaminados, es necesario considerar según Das y Dash (2014) algunos factores:

- La magnitud, toxicidad, y la movilidad de los contaminantes: El sitio debe ser debidamente investigado y caracterizado para determinar la (i) extensión horizontal y vertical de la contaminación; (ii) los tipos y concentraciones de contaminantes en el lugar; (iii) la movilidad probable de los contaminantes en el futuro, que depende de las características geológicas del sitio.
- La proximidad de los receptores humanos y ambientales
- La degradabilidad de contaminantes depende de la ocurrencia del compuesto en la naturaleza, de la estructura molecular del compuesto (aromático, halogenado, de alto peso molecular o ramificado). La velocidad y extensión a la que el compuesto se metaboliza en el en-

torno se determina por la disponibilidad de aceptores de electrones y otros nutrientes.

- Las condiciones ambientales del sitio elegido para la biorremediación, así como las propiedades fisicoquímicas de los suelos.
- Capacidad para vigilar adecuadamente, los parámetros del proceso de biorremediación y regularlos: pH, temperatura, humedad, aireación, nutrientes, UFCs, etc.

Entre las bacterias marinas capaces de degradar hidrocarburos poliaromáticos, se han identificado a: *Cycloclasticus spirillensus*, *Lutibacterium anuloederans*, *Neptunomonas naphthovorans* (Chung y King, 2001), en tanto que especies tales como *Achromobacter denitrificans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium renale*, *Cyclotrophicus* sp., *Moraxella* sp., *Mycobacterium* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas paucimobilis*, *P. putida*, *Brevundimonas vesicularis*, *Comamonas testosteroni*, *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., y *Vibrio* sp., presentan capacidad para degradar naftaleno y mineralizarlo. La tabla 3.2 muestra un listado de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos.

**Tabla 3.2.** Bacterias que degradan HAPs (Chauhan et al., 2008)

Cepa	HAPs	Enzima
<i>P. putida</i>	Naftaleno	Reductasa Catecol oxigenasa Dioxigenasa
<i>P. putida</i> OUS82	Fenantreno	Dioxigenasa
<i>P. stutzeri</i> AN10	Naftaleno	Naftaleno-salicilato 1-hidroxilasa
<i>A. faecalis</i> AKF2	Fenantreno	Dihidroxifenantreno Dioxigenasa
<i>Nocardiodetes</i> sp KP7	Fenantreno	Unidad alfa de Dioxigenasa
<i>Mycobacterium</i> sp PYR-1	Pireno	Dioxigenasa
<i>Sphingomonas pausimobilis</i> var EPA505	Fenantreno, antraceno, benzo b fluoranteno	Dioxigenasa, ruptura del anillo
<i>Burkholderia</i> sp RP007,	Naftaleno, Fenantreno, antraceno	Dioxigenasa
<i>Rhodococcus</i> sp NCIMB 12038	Naftaleno	Cis-naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa

Algunas cepas bacterianas son capaces de degradar plástico, así, los géneros *Shewanella*, *Moritella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, y *Staphylococcus*, degradan plástico hasta un 20% (Kathiresan, 2003).

Las bacterias al igual que otros microorganismos son capaces de generar biosurfactantes y con su ayuda participar en la biorremediación de metales pesados y otros contaminantes xenobioticos. Según Das y Dash (2014), las especies bacterianas en las que se ha detectado la producción de biosurfactantes son: *Pseudomonas* sp, *P. aeruginosa*, *Bacillus* sp, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, *Acinetobacter* sp, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter venetianus*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubidaea*, *S. marcescens*. En la figura 3.1., adaptado de Obayori et al., 2009, se evidencia la participación de los exudados (biosurfactantes), en biorremediación.



Figura 3.1. Funciones de los biosurfactantes

La biodegradación microbiana de hidrocarburos y otros contaminantes xenobióticos, depende en gran medida de la disponibilidad de aceptores de electrones. La respiración es el mecanismo principal de obtener energía que tiene los microorganismos, cuando la cantidad de oxígeno disponible es un limitante, no es significativa (Skaare et al., 2011). La degradación

aeróbica es más rápida y eficaz; y requieren menos energía libre para la iniciación y producir más energía (Wentzel et al., 2007). Los tiempos de duplicación de bacterias aeróbicas están en el rango de varias horas con alta densidad celular.

Otro mecanismo de obtención de energía es la fermentación, que transcurre bajo condiciones anaeróbicas; en presencia de nitratos, sulfatos, hierro, manganeso, o dióxido de carbono como aceptores de electrones. Estos aceptores están presentes tanto en los hidrocarburos, así como en las aguas derivadas de los procesos de extracción de hidrocarburos, los mismos que son reducidos mediante procesos de, metanogénesis, fermentación y homoacetogénesis (Ollivier y Alazard, 2010):

- Reducción de sulfatos:  $\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$
- Metanogénesis hidrogenotrófica:  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
- Metanogénesis acetoclástica:  $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
- Homoacetogénesis:  $2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$

El cultivo de microorganismos bajo condiciones anaeróbicas es más exigente y su tasa de degradación es menor, en comparación con el de los cultivos anaerobios convencionales que crecen junto con microorganismos aerobios facultativos. Por otro lado; los tiempos de duplicación de las bacterias anaeróbicas que degradan hidrocarburos están en el orden de un día e incluso semanas (Widdel y Grundman, 2010; Widdel, 2015).

Las bacterias degradan hidrocarburos, con diferente eficiencia y facilidad en dependencia de la estructura y longitud de la cadena hidrocarbonada, siendo los más fáciles de degradar los hidrocarburos de cadena lineal n-alcanos, seguidos por los acíclicos ramificados, los hidrocarburos monocíclicos, hidrocarburos esteroideos, triterpenoides policíclicos, y algunos hidrocarburos aromáticos (Galperin y Kaplan, 2011).

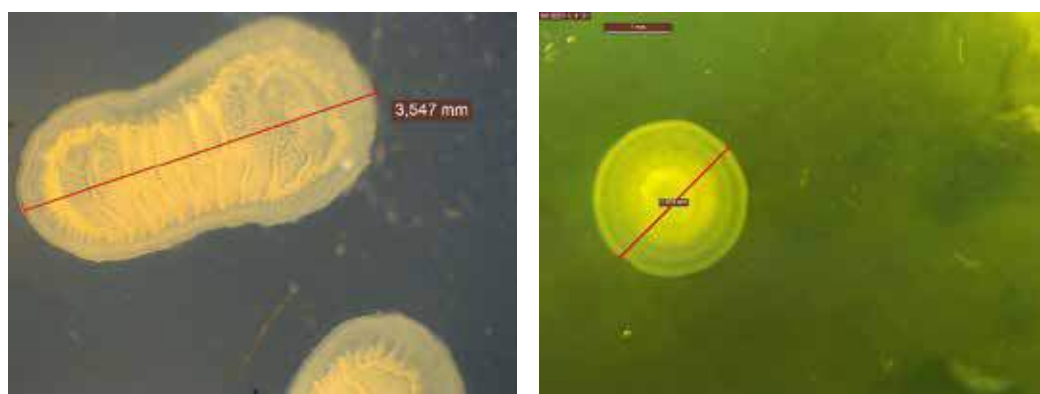
La biorremediación transcurre naturalmente en el ambiente sin intervención humana, donde innumerables microbios coexisten e interactúan entre sí en forma sintrópica; formando consorcios que ejecutan varias vías metabólicas en forma simultánea, donde el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente. Así la degradación de 4-cloro dibenzofurano, ejecutada por *Sphingomonas sp.* RW1, que produce el 3,5-diclorosalicílico, se comple-

ta con la inoculación de *Burkholderia sp.* JWS (Arfmann et al., 1997). La degradación de paratión se logra eficientemente por la acción sintrófica de cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, sin acumulación de intermedios tóxicos (Gilbert et al., 2003). Esta es la razón por la que, en biorremediación ambiental, se emplean preferentemente consorcios bacterianos, fúngicos y mixtos.

### 3.3. Actinomycetos

Los actinomycetos son clasificados como bacterias en un grupo individual, que se diferencia de las bacterias por su capacidad de ramificarse en filamentos o hifas, similares las hifas fúngicas, pero de menor tamaño. La mayoría de los actinomycetos son habitantes típicos del suelo, Gram positivos, productores de antibióticos, productores de geoesmina, sustancia responsable de malos olores en el agua potable. Los filamentos de las colonias se distribuyen en las pilas de compostaje realizando la ruptura de los contaminantes, materia orgánica de naturaleza polimérica como lignina, celulosa, proteínas y quitina (Yusri et al., 1995).

Varias especies de actinomycetos como *Streptomyces sp.*, *Nocardioides sp.*, y *hermoactinomyces sp* (Hubbe et al., 2010), son termófilas, en las pilas de compostaje soportan temperaturas superiores a los 75°C, otras especies en cambio se desarrollan en la fase de enfriamiento, donde participan en la formación de agregados orgánicos.



**Figura 3.2.** Actinomycetos aislados del suelo

Fotos de: Andrés Gómez

El uso de cepas de actinomicetos indígenas para la biorremediación de suelos es la mejor alternativa, por cuanto están adaptados a las condiciones edáficas. Especies de *Streptomyces* se han empleado en la biodegradación de lindano (Benimeli et al., 2007). Otros *actinomicetos* se han empleado para la degradación de organoclorados, s-triazinas, triazinonas, carbamatos, organofosfatos, acetanilidas y sulfonilúreas, en consorcio con bacterias. Existen referencias bibliográficas sobre actinomicetos degradadores de pesticidas que pertenecen a los subórdenes *Micrococcineae* (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*), *Corynebacterineae* (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*), *Micromonosporineae* (*Micromonospora*), *Propionibacterineae* (*Nocardioideae*), y *Streptomycineae* (*Streptomyces*) (Vaze, V. K. 2017; Elgueta, S et al., 2017).

Asimismo, se ha reportado que una cepa de *Arthrobacter* que degrada el herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético también puede usar los herbicidas ácido 4- clorofenoxiacético (4-CPA) y ácido 2 metil 4 clorofenoxiacético (MCPA) como única fuente de carbono (Bernilla, 2010).

Autores como Amoroso et al., (2013), señalan la capacidad de *Streptomyces*, para degradar aldrin, clordano, DDD, DDE, DDT, dieldrina, heptacloro y epóxido de heptacloro, lindano y metoxicloro, y Cd. Según Ahmad et al., (2003 a, b) los hongos y actinomicetos producen nanopartículas extracelulares, que estabilizan a los metales pesados, razón por la cual se los emplea en la biorremediación de metales pesados (Kapoor, R. T., et al 2021). Los actinomicetos son buenos degradadores de hidrocarburos, sin embargo, solo unas pocas cepas bacterianas, son capaces de metabolizar pireno, escualeno y copoliésteres aromáticos por vía termófila en compostaje.

Adicionalmente los actinomicetos producen Biosurfactantes, que son compuestos tensoactivos anfífilos de naturaleza glicolípida, glicoproteína, glicopéptida, lipopéptida, lipoproteínica, otros son, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos neutros, lipopolisacáridos (Banat et al., 2010), estos biosurfactantes son empleados como detergentes, emulsificantes, dispersantes, secuestrantes de metales, radionuclidos y en la recuperación mejorada de hidrocarburos. Actinomicetos como *Nocardia* pueden metabolizar los esteroides, esteroides, caucho y otros hidrocarburos complejos de los desechos industriales (McKinney, 2004).



Los actinomicetos son antagonistas naturales de las bacterias, debido a su capacidad de producir antibióticos; sin embargo, se ha demostrado que el género *Streptomyces* puede actuar como un promotor del crecimiento natural bacteriano en el guisante y posiblemente en otras leguminosas (Tokala et al., 2002). Los actinomicetos constituyen el 20% de las bacterias del sistema radicular vegetal, consecuentemente son de vital importancia en la fitorremediación, en especial gracias a su capacidad para solubilizar fosfatos en sistemas de compostaje que ofrecen la temperatura ideal para este proceso bioquímico (Hamdali et al., 2008). La tabla 3.4, muestra un listado de actinomicetos empleados en biorremediación.

Los actinomicetos pueden crecer bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en una amplia gama de sustratos: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y compuestos aromáticos complejos, compuestos lignocelulósicos y humus, porque son organismos facultativos. Los actinomicetos desarrollan sus hifas en el suelo, contribuyendo a su estabilización y a la formación de los coloides edáficos que son los precursores de la fertilidad de los suelos, gracias a que estos liberan nutrientes y los hacen disponibles para las plantas y microorganismos. Especial atención se debe dar a la solubilización de metales, en especial de microelementos (Patel, K. B., y Thakker, J. N. 2019), necesarios para el funcionamiento de los sistemas enzimáticos microbianos en calidad de cofactores.

La Rizosfera es la unidad de remediación ecológica para el tratamiento de suelos contaminados, donde las enzimas y exudados microbianos de alto y bajo peso molecular, alcoholes, ácidos orgánicos y otros compuestos son fundamentales para la biorremediación. En la Rizosfera las bacterias, hongos y actinomicetos forman una asociación simbiótica, que garantiza la degradación completa de los contaminantes presentes en el suelo (Zinta, G., Mousa, A. S., y Hozzein, W. N. 2020).

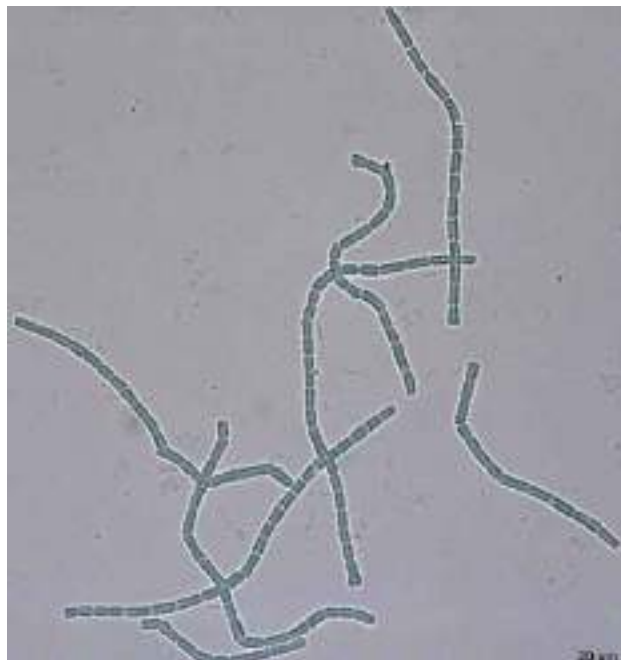
**Tabla 3.4.** Listado de actinomicetos empleados en Biorremediación (Moraga et al., 2013).

CONTAMINANTE	CEPA ACTINOMYCETOS	CONTAMINANTE	CEPA ACTINOMYCETOS
Cypermctrina	<i>Streptomyces sp.</i>	Cromatos	<i>Anthrobacer sp. SUK 1201, Streptomyces sp. MC1</i>
Carbofurán	<i>Streptomyces alanonosinicus</i>	Cd	<i>Streptomyces</i> genus <i>S. tendae</i>
	<i>Streptoverticillium album</i>	n-Alcanos	<i>R. opacus, R. erythropolis, R. ruber, R. fascians, R. baikonurensis, R. sp</i>
	<i>Nocardia farcinia</i>	Fenil alcanos	<i>R. opacus, R. erythropolis</i>
	<i>Nocardia vaccini</i>	Monoaromáticos	<i>R. aetherivorans</i>
	<i>S. atratus</i>	Poliaromáticos	<i>R. jostii, R. opacus, R. erythropolis, R. fascians, R. sp.</i>
Lindano	<i>Micromonospora sp.</i>	Halo alcanos	<i>R. rhodochrous, R. sp.</i>
Clordano	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Micromonospora sp.</i>	Hidrocarburos policlorados	<i>R. jostii, R. aetherivorans, R. sp</i>
Metoxicloro	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Micromonospora sp</i>	Nitrilos	<i>R. ruber, R. rhodochrous</i>
Clorpirifos	<i>Streptomyces radiopugnans</i>	Esteroides	<i>R. rhodochrous, R. jostii, R. ruber</i>
Fenamifos	<i>Microbacterium sp.</i>	Diesel, gasolina	<i>R. aetherivorans, R. wratislaviensis, R. erythropolis, R. sp</i>
Boro	<i>S. achromogenes, S. griseosporeus, S. albogriseolus, S. iakyrus, S. fradiae, S. polychromogenes, S. lincolnensis*</i>	Ni	<i>S. mirabilis</i>
Cu, Cr (VI)	<i>Streptomyces coelicolor</i> y <i>S. lividans</i>	Ni, Zn	<i>S. mirabilis</i> <i>S. Streptomyces, R. Rhodococcus</i>

### 3.4. Cianobacterias

Las cianobacterias son bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica; son los únicos procariontes que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis, disponen de clorofila a, pigmentos biliprotéicos como ficobilinas y ficocianinas, responsables de su coloración típica y todo el complejo fermentativo de ATP sintetasa (Figura 3.2). Su pared celular no posee celulosa, secreta mucilago que les protege de los predadores, sus membranas plasmáticas disponen de ácidos grasos insaturados (dos o tres dobles enlaces). En cuanto a su pared celular no contiene celulosa, pero es muy resistente debido a la presencia de polisacáridos unidos a polipéptidos. Además, secretan una sustancia mucilaginoso que les confiere la defensa contra predadores ya que puede ser tóxica. Por otra parte, unen grupos de células formando filamentos (cianobacterias filamentosas) (Shah et al., 2017).

Es importante anotar que en su membrana plasmática están presentes ácidos grasos con dos o más enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada a diferencia de los demás procariontes, que poseen ácidos grasos saturados. Las especies planctónicas poseen vesículas de gas en su citoplasma que los mantienen en flotación, cercana a la zona fótica.



**Figura 3.2.** Fotografía de cianobacterias (*Pseudanabaena* sp)

Autor Francisco Caicedo

Estudios recientes demuestran que, en sitios afectados por derrames de hidrocarburos, se evidencia la presencia de consorcios de cianobacterias que los emplean como fuente de carbono; estas cianobacterias proveen a las bacterias el oxígeno necesario y nitrógeno fijado en su metabolismo. Las cianobacterias también se utilizan en la acuicultura, en el tratamiento de aguas residuales, en consorcio con bacterias. Cianobacterias como: *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corion*, son capaces de degradar n-alcanos, *Oscillatoria* sp., y *Agmenellum cuadruplicatum* degradan naftaleno a 1-naftol, fenantreno en trans-9,10-dihidroxi-9,10 dihidrofenantreno. Sin embargo, estudios recientes señalan que esta capacidad se debe a las bacterias aeróbicas organotróficas asociadas (Sánchez et al., 2005).

El consorcio de especies *Oscillatoria*- Gammaproteobacteria, es capaz de degradar Fenantreno, dibenzotiofeno y n-octadecano (Pathak, J., et al 2018). De igual forma *Microcoleus chthonoplastes*, asociado con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico puede degradar compuestos alifáticos, heterocíclicos y órganos sulfurados, así como hidrocarburos alquil monocíclicos y policíclicos (Sánchez et al., 2005). Las cianobacterias son acumuladoras y degradadoras efectivas de pesticidas, crudo, fenol, Fenantreno, naftaleno, metales pesados, Catecol y xenobióticos, sus formas libres o fijas pueden ser empleadas para tales objetivos; su empleo presenta ciertas ventajas en relación al empleo de otros microorganismos; son autótrofos, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico que es un factor limitante en todo proceso de biorremediación, especies como *Spirulina platensis*, *Anabaena doliolum*, *Spirulina máxima*, *Synechococcus* sp, *Phormidium subfuscum*, *Oscillatoria* sp., remueven eficientemente del agua nutrientes como: amonio, nitratos, fosfatos y urea (Mandal y Rath, 2014). La capacidad de *Anabaena azotica*, de degradar organoclorados por dechlorinación le hace potencialmente promisorio para la biorremediación de suelos contaminados (Whitton, 2012). Las cianobacterias marinas de los géneros *Microcoleus* y *Phormidium* contribuyen a la biorremediación de derrames mediante la catálisis de la degradación de alcanos (Chauvat y Cassier-Chauvat, 2013).

Estudios profundos de la simbiosis de cianobacterias a nivel fisiológico, bioquímico y molecular ayudará a comprender con exactitud, este proceso, del cual depende la lucha contra la desertificación, y su empleo en biorremediación de ambientes contaminados (Zhu et al., 2021). Su capacidad de crecer bajo condiciones controladas en un amplio rango de condiciones

ambientales los convierte en una herramienta importante para la remediación en especial de adsorción de metales pesados gracias a que son ricos en exopolisacáridos con gran capacidad para enlazar iones metálicos (Urrutia, 1997; Kumar y Gaur, 2011), oxianiones y transformar radionuclidos ( $U^{6+}$  a  $U^{4+}$ ), en 6-8 días de crecimiento (Bender et al., 2000).

Estudios experimentales demuestran la capacidad de las cianobacterias para reciclar del agua  $Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , con concentraciones de 1 a 10mg/l., en un 100% (Bender et al., 1997). Las biopelículas remueven metales pesados mediante adsorción superficial, precipitación como sulfuros o fosfatos, hidróxidos y precipitación reductiva microbiana (Mehta y Gaur, 2005). Los exopolisacáridos producidos por la biopelícula, tienen carácter aniónico, razón por la que participan en la biomineralización de cationes metálicos; adicionalmente poseen una gran cantidad de grupos funcionales con carga. Un listado de cianobacterias con capacidad para adsorber metales pesados se presenta en la tabla 3.7.

La afinidad de enlace del ión metálico depende de: Tamaño, radio de la carga, composición del exopolisacárido, pH, etc.; valores bajos de pH producen la liberación de los iones metálicos (Wilson et al., 2001). En general las biopelículas son altamente resistentes a los metales pesados razón por la que pueden ser usados para remover y concentrar metales pesados de las aguas residuales (White et al., 2003).

**Tabla 3.7.** Cianobacterias que adsorben metales pesados, adaptado de (Srivastava et al., 2013)

CIANOBACTERIA	METAL	CAPACIDAD DE ADSORCIÓN MMOL/G
<i>Phormidium sp</i>	$Pb^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Cd^{2+}$	1,38-0,88-0,78
<i>Oscillatoria sp</i>	$Pb^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Cd^{2+}$	0,48-0,42-0,39
<i>Aphanothece sp</i>	$Hg^{2+}$	2,27
<i>Spirulina Platensis</i>	$Hg^{2+}$ ,	2,12
<i>Synechococcus sp</i>	$Cu^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Cr^{3+}$	0,17-0,15-0,064-0104
<i>Anabaena spiroides</i>	$Mn^{2+}$	0,15
<i>Cyanothece sp</i>	$Cu^{2+}$	2,25
<i>Gloethece magna</i>	$Cd^{2+}$ , $Mn^{2+}$	0,0037-0,0043
<i>Calothrix machica</i>	$Pb^{2+}$	0,357
<i>Cyanospira capsulata</i>	$Cu^{2+}$	1,15

### 3.5. Hongos y levaduras

Los hongos son organismos eucariotas, que poseen una estructura compleja y la capacidad de construir tejidos y órganos similares a los observados en organismos superiores.

La contribución de los hongos al desarrollo de la humanidad es enorme, desde tiempos remotos la sociedad lo ha empleado en la fabricación de pan, alcohol, bebidas fermentadas, cerveza, quesos, yogurt, café chocolate y más recientemente, en la producción de antibióticos, polisacáridos, pigmentos y esteroides (Hyde et al., 2018). Sin embargo, los hongos no solo son benéficos para el hombre, son también fuente de enfermedades de cultivos, animales de corral y humanos. Adicionalmente son responsables de la degradación de infraestructuras productivas, vivienda, materiales y maquinarias. Las pérdidas de cultivos de cereales causadas por hongos pueden alcanzar hasta el 50%, generando grandes daños a la industria alimenticia. Las infecciones oportunistas de hongos afectan a pacientes hospitalarios inmunodeprimidos, incrementando el tiempo de convalecencia y los costos de hospitalización (Rodríguez, y Nosanchuk, 2020).

Tan solo el 1% de los hongos identificados, habitan ambientes marinos (Carlile et al., 2001). En el agua dulce crecen gran cantidad de mohos, pero la mayoría de los hongos crecen asociados al suelo, en su interior o en su superficie, en la superficie de plantas y animales muertos, donde participan en su biodegradación (Figura 3.3). Los micólogos consideran que existen 1,5 millones de especies, de ellos solo 98.000 especies, han sido aisladas y descritas (Hawksworth, 1997).



**Figura 3.3.** Hongos creciendo sobre madera descompuesta

La distribución de los hongos en el suelo está relacionada con su participación en el reciclamiento de biomasa (liberación de nutrientes), su participación en las cadenas alimenticias, en transformaciones biogeoquímicas a pequeña y a gran escala en ambientes acuáticos y edáficos (Moor et al., 2011). Los procesos en los cuales los hongos tiene importancia crucial son:

- Ciclaje y transformación de sustancias orgánicas e inorgánicas
- Transformación de rocas y minerales
- Biointemperación
- Formación de minerales
- Interacción fúngica con arcillas
- Interacción fúngica con metales

Muchas de estas cualidades son relevantes para la Biotecnología ambiental, como para la Biorremediación (Burford et al., 2003; Gadd, 2007). Los hongos también afectan a la estructura del suelo en escala espacial, mediante las cargas electrostáticas, mecanismos de mezcla y adhesión, generando sustancias extracelulares, como polisacáridos y sustancias hidrofóbi-

cas que alteran las propiedades de infiltración del suelo. Estas sustancias estimulan la adhesión de partículas de suelo, que en conjunto con la materia orgánica forman los coloides edáficos, o destruyen la estructura del suelo alterando los procesos de agregación (Yang et al., 2017). A su vez, la estructura del suelo afecta a los hongos, los hongos filamentosos están perfectamente adaptados a la vida en medios heterogéneos como el suelo, sin embargo, el laberinto de los poros edáficos define el crecimiento del micelio y su función en el interior del suelo. En consecuencia, el carácter del crecimiento del micelio fúngico, en distintos tipos de suelo, será distinto.

Los hongos son empleados en trabajos de biodegradación de contaminantes ambientales como hidrocarburos y sus derivados, pesticidas, herbicidas, explosivos, materia orgánica derivada de las actividades agroindustriales y pecuarias.

- **Degradación de compuestos alifáticos**

Por varias décadas se han reportado trabajos de degradación de compuestos alifáticos con hongos, muchas de las especies mencionadas crecen en medios enriquecidos con etanol, alcanos, aldehídos, entre otras. Ejemplos de algunos de estos se pueden ver en la tabla No.3.2, la mayoría de ellos emplean estas sustancias como única fuente de carbono, otras en calidad de cometabolitos.

**Tabla No. 3.2** Especies fúngicas que degradan compuestos alifáticos (Shree, 2012)

Espece fúngica	Sustrato	Referencias
<i>Paecilomyces variotii</i>	Metanol	Sakaguchi et al. (1975)
<i>Gliocladium deliquescens</i>	Metanol	Sakaguchi et al. (1975)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Formaldehído	Sakaguchi et al. (1975)
<i>Gliocladium deliquescens</i>	Formaldehído	Sakaguchi et al. (1975)
<i>Acremonium sp</i>	C <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> Alcanos	Davies et al. (1973)
<i>Cladosporium resinae</i>	C <sub>6</sub> -C <sub>19</sub> Alcanos	Cofone et al. (1973)
<i>Scedosporium sp</i>	C <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> Alcanos	Onodera et al. (1983)
<i>Graphium sp</i>	n. butano	Hardison et al. (1997)



<i>Trichosporom veenshuisii</i>	n- hexadecano	Middelhoven et al, (2000)
<i>Graphium sp</i>	Di etil éter	Hardison et al. (1997)
<i>Graphium sp</i>	Metil, tert-butil- éter	Hardison et al. (1997)

Cuando se tratan mezclas de hidrocarburos, como los existentes en el crudo, muchas levaduras y hongos filamentosos degradan fácil y rápidamente las cadenas cortas de hidrocarburos, en tanto que las cadenas largas, se degradan más lentamente, mientras que los hidrocarburos aromáticos pueden permanecer sin degradarse por períodos de tiempo prolongados (Lindley and Heydeman 1986 a; Lindley et al., 1986 b).

En nuestros trabajos hemos empleado en forma conjunta, especies fúngicas como: *Penicillium Chrysognum*, *Aspergillum niger* y *Mucor sp*, para tratar crudo intemperado, extraído de piscinas y suelos contaminados con petróleo. El crecimiento de los hongos puede ser estimulado con la adición de glucosa en calidad de cosustrato, en presencia de compuestos alifáticos, pero su crecimiento decrece en presencia de compuestos aromáticos. Esta capacidad ha sido descrita en algunos hongos mesofilos, psicrófilos y psicrotolerantes (Hughes et al., 2007).

### Degradación de compuestos aromáticos HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, son contaminantes ambientales hidrofóbicos recalcitrantes, compuestos por muchos anillos benzenicos, presentes en el petróleo en conjunto con otra gama de hidrocarburos (Kennes y Lema 1994a). Una amplia gama de hongos tiene la capacidad de degradar compuestos aromáticos policíclicos HAPs, hongos de los géneros: *Agrocybe*, *Bjerkandera*, *Corioloopsis*, *Crinipellis*, *Flammulina*, *Kuehneromyces*, *Laetiporus*, *Marasmiellus*, *Naematoloma*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ramaria*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Trametes*, y *Trichosporon* (Srivastava y Kumar, 2019). El phylum Basidiomycota, que incluye a simbióticos (mutualistas, comensales y parásitos) y saprofitos degradadores de material orgánica muerta (lignolíticos), que desempeñan un rol importante el ciclo del carbono (Swann y Hibbett, 2003).

Otros hongos capaces de degradar HAPs, son miembros de los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Penicillium*,

*Saccharomyces*, y *Trichoderma*, que pertenecen al phylum Ascomycota (Gualoto, 2011). También se incluyen representantes del grupo de los Basidiomicetes y Zygomycetos, con sus géneros *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, y *Syncephalastrum*, (Alexopoulos et al., 1996). Los hongos de la pudrición blanca son lignolíticos e incluyen a miembros de los Phylo Ascomycota y Basidiomycota, son capaces de degradar HAPs presentes en suelos y sedimentos, degradan compuestos altamente recalcitrantes que forman parte de la estructura de la lignina, tales como diéteres, alquil arenos y bifenilos (Deacon, 2005; Yateem et al., 1998).

La similitud estructural de la lignina, frente a los HAPs, permite a los hongos degradar en forma eficiente empleando los mismos sistemas enzimáticos movilizados para la degradación de lignina, en consecuencia, para obtener buenos resultados en la biodegradación de suelos y sedimentos contaminados con HAPs, es necesario el uso masivo de hongos lignolíticos. Referencias de que las especies lignolíticas *Phanerochaete chrysosporium* o *Trametes versicolor* tienen la capacidad de degradar HAPs, se recibieron ya en los años 90, adicionalmente esta capacidad fue identificada en hongos no lignolíticos como *Fusarium solani* (Rafin et al., 2000). Las cepas fúngicas son más eficientes que las bacterianas para degradar HAPs, así lo demuestran los trabajos ejecutados por nosotros en el Distrito amazónico el Ecuador en el Campo Libertador.

Los hongos ejecutan la degradación de HAPs, gracias a la participación del sistema enzimático Citocromo P-450, de una enzima extracelular lignolítica, como lignino oxidasa, manganeso peroxidasa, o lacasa (Yadav et al. 2006; Tortella et al., 2005). Estas enzimas, son inespecíficas y muy versátiles en su capacidad de degradación, pudiendo degradar HAPs, presentes en el sustrato en forma simultánea. Esta capacidad evidencia la importancia de la similitud estructural de la lignina con los HAPs.

Otras cepas pueden degradar otros residuos, así *Cunninghamella elegans*, es una cepa fúngica lignolítica identificada con capacidad para degradar bifenilos (Dodge et al., 1979), igual capacidad se ha evidenciado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Wiseman et al., 1975), *Candida lipolytica* (Cerniglia y Crow, 1981), *Trichosporon mucoides* (Sietmann et al., 2001), que tiene la capacidad para degradar éter difenílico.

Los hongos desempeñan un importante rol en la formación del compost, por cuanto su actividad contribuye a la degradación y fraccionamiento de residuos orgánicos complejos. La mayoría de los hongos participan en la fase mesofílica y termofílica del compostaje, las hifas fúngicas mantienen al compost particulado, drenado y aireado (Aona et al., 2017). La tabla 3.3., muestra algunos hongos con capacidad para degradar HAPs.

**Tabla 3.3.** Hongos con capacidad de degradar HAPs (Shree, 2012)

ESPECIE FÚNGICA	SUSTRATO	REFERENCIAS
<i>Trichosporom cutaneum</i>	fenol	Neujahr y Varga, 1970
<i>Aspergillus japonicus</i>	fenol	Milstein et al., 1983
<i>Penicillum spp</i>	fenol	Scow et al., 1990; Hofrichter et al., (1993)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	fenol	Kennes y Lema, 1994b
<i>Trichosporom guehoae</i>	fenol	Middelhoven et al., 1990
<i>Trichosporom veenhuisii</i>	fenol	Middelhoven et al., 2000
<i>Trichosporom cutaneum</i>	Fenol fluorinado	Peelem et al., 1995
<i>Trichosporom cutaneum</i>	O,m,p-cresol	Hasegawa et al., 1990
<i>Aspergillus fumigatus</i>	p-cresol	Jones et al., 1993
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	p-cresol	Kennes y Lema, 1994b
<i>Penicillum frequentans</i>	o-cresol	Hofrichter et al., 1995
<i>Trichosporom guehoae</i>	m-cresol	Middelhoven et al., 1990
<i>Trichosporom veenhuisii</i>	m-cresol	Middelhoven et al., 2000

Especies como *Aspergillus* sp. (Peh et al. 2001), *Aspergillus fumigates* (Silva et al., 2009), participan en la fase final del compostaje, al igual que las cepas *Emericella* sp. *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium oxalicum* (Dias et al., 2008),

En nuestra práctica profesional hemos recurrido al empleo de residuos orgánicos (restos de cítricos), en calidad de cosustrato, para introducir cantidades importantes de *Penicillum chrysogenum* y *Aspergillus niger*, además de residuos de pan, para introducir *Mucor* sp., con excelentes resultados en la biorremediación de suelos con elevados contenidos de HAPs (Gualoto, 2008).

### 3.6. Plantas

Según Schnoor et al., (1995), las plantas pueden interactuar con los contaminantes orgánicos peligrosos, la toma de contaminantes a través del sistema radicular depende de la concentración del contaminante en el suelo o el agua, adicionalmente depende del tipo y forma química del contaminante en el medio (Figura 3.4). Otro factor relevante es la superficie activa radicular que ejecuta la partición química del contaminante, el enlace e inmovilización del contaminante por medio de los grupos funcionales activos de la molécula del xenobiótico.

La inmovilización es la condición fundamental para que se inicie el proceso de biodegradación microbiana. Los contaminantes asimilados, pueden almacenarse en la planta en forma de residuos y conjugados extraíbles, o enlazados al material vegetal, en forma de residuos no extraíbles incorporados en los tejidos vegetales (Bell y Failey, 1991). Otros contaminantes son acumulados en la raíz y no son translocados a otros tejidos (Bell, 1992).

Para evidenciar el rol de las plantas en el proceso de biorremediación, se compara la cantidad de microorganismos presentes en el suelo adyacente a la raíz, y la cantidad de microorganismos de la rizosfera, los estudios muestran que la cantidad presente en la rizosfera es 20 veces superior que en el suelo circundante (Rovira, 1974).



**Figura 3.4.** Planta papiro usada en depuración de aguas

Esta abundancia se explica por la presencia de exudados vegetales que sirven como fuentes de energía, carbono, nitrógeno, o factores de crecimiento, para el desarrollo microbiano de especies como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*, que son muy comunes en la rizosfera. La actividad de los microorganismos en la zona radicular estimula exudación radicular que a su vez estimula más la actividad microbiana. Saad et al., (2009) y Enrique et al (2013) nos muestran un conjunto de plantas que se presentan en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Plantas empleadas en Biorremediación. Adaptado de Saad et al (2009) y Enrique et al (2013)

ESPECIE VEGETAL	NOMBRE COMÚN	CONTAMINANTE
<i>Agropyrum cristatum</i>	Agropyrum	Fenilciclohexilpiperidina PCP y Polihidroxialcanoatos PAH
<i>Alyssum spp</i>	Broqueletes blanquecinos	Acumula Ni
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Amaranto	Acumula <sup>137</sup> Cs
<i>Armería maritima</i>	Clavelina de mar	Acumula Pb
<i>Armoracea rustica</i>	Rábano picante	Metales mesados
<i>Asthenatherum forsskalii</i>	Centropodia	Hidrocarburos de petróleo
<i>Atriplex prostrata</i>	Acelga falsa, armuelle, armuelle silvestre	Elimina sal del suelo
<i>Azolla pinnata</i>	Helecho mosquito, helecho de pato, helecho de agua	Acumula: Pb, Cu, Cd, Fe
<i>Bracharia brizantha</i>	Brizanta	Petróleo
<i>Brassica canola</i>	Nabo forrajero	<sup>137</sup> Cs, del suelo
<i>Brassica juncea</i>	Mostaza castaña	1,1,1-tricloro-2,2-bis-(4-clorofeniletano). Hiperacumulador de metales pesados
<i>Cannabis sativa</i>	Marihuana	Hiperacumulador de metales pesados
<i>Cardamonopsis hallerii</i>	Arabidopsis	Hiperacumulador de metales pesados
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Cola de zorro	Acumulador de metales, TNT.
<i>Cichorium intybus</i>	Achicoria común	1,1,1-tricloro-2,2-bis-(4-clorofeniletano)
<i>Cyperus aggregatus, C. conglomeratus</i>	Cyperus	Petróleo e hidrocarburos
<i>Datura innoxia</i>	Tártago o yerba del disco	Ba
<i>Eichornia crassipes</i>	Jacinto de agua común	Acumula: Pb, Cu, Cd, Fe
<i>Eucalyptus spp.</i>	Eucalipto	Na y As
<i>Helianthus annuus</i>	Girasol	Acumula Pb, U, <sup>137</sup> Cs, <sup>90</sup> Sr.
<i>Hydrocotyle umbellata</i>	-----	Acumula: Pb, Cu, Cd, Fe
<i>Juncus effusus</i>	Junco de esteras	Atrazinas y λ cihalotrim
<i>Kochia scoparia</i>	Morenita, alfalfa criolla, alfalfa de los pobres, yuyo volador	<sup>137</sup> Cs, y otros radionuclidos
<i>Lemna minor</i>	Lenteja de agua	Acumula: Pb, Cu, Cd, Fe
<i>Lolium perenne L.</i>	Césped inglés	Pentaclorofenol
<i>Ludwigia peploides</i>	Enramada de las tarariras	Atrazinas y λ cihalotrim

<i>Lupinus arboreus</i>	Lupino Amarillo	Soventes orgánicos, tolueno
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Cola de zorro acuática	2,4,6-trinitrotolueno
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Filigrana mayor, fontanera, milenrama	TNT
<i>Nicotiana tabacum</i>	Hierba santa	Herbicidas
<i>Oryza sativa L.</i>	Arroz	Metolacoloro
<i>Phaseolus acutyfolius</i>	Frijol tépari	Acumula <sup>137</sup> Cs
<i>Pisun sativus</i>	Arveja	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	Pentaclorofenol
<i>Salix babylonica L.</i>	Sauce llorón	Metil-ter butyl-éter
<i>Salix exigua</i>	Especie de Sauce	Atrazinas y metacloro
Tabaco	Tabaco	2,3-dihidroxifenil (2,3 DHB)
<i>Zea mays</i>	Maiz	Herbicidas

Apenas el 1% de las plantas (angiospermas) y menos del 2% de las pteridofitas, se han adaptado y especializado para la vida en el agua; esta es la razón por la que la abundancia de plantas de humedales es relativamente baja (Richardson y Vymazal, 2001), al igual que la población de plantas flotantes (Wetzel, 2001). Las plantas empleadas en Biorremediación son muy variadas; en relación con las plantas empleadas en humedales artificiales, se distinguen: Macrófitos emergentes, macrófitos sumergidas, macrófitos flotantes, macrófitos arraigados.

### 3.6.1. Macrófitos emergentes

Las macrófitas emergentes son las formas vegetales dominantes en los humedales y pantanos a profundidades que varían entre 0,5 a 1,5 m. Estas plantas desarrollan hojas aéreas y un sistema radicular profuso (rizomas), las hojas aéreas presentan gran similitud morfológica y anatómica con las hojas de las plantas terrestres. La celulosa de la pared celular proporciona la rigidez necesaria a las hojas de plantas emergentes como *Phragmites* y *Typha* (Wetzel, 2001). El rizoma de estas plantas está sumergido en los sedimentos anaeróbicos, el oxígeno necesario para su metabolismo lo reciben de las hojas, sin embargo, las hojas tiernas sumergidas pueden respirar anaeróticamente (Figura 3.5).

Una vez que el follaje ha alcanzado la superficie, los canales intracelulares y lagunas incrementan su tamaño, facilitando el intercambio gaseoso

entre los tejidos de enraizamiento y la atmósfera (Wetzel, 2001). Parte del oxígeno puede filtrarse en la rizosfera circundante, generando condiciones aeróbicas y estimulando la oxidación de materia orgánica, sin embargo, en sus inmediaciones subsisten condiciones anaeróbicas que facilitan el crecimiento de bacterias nitrificantes (Brix y Schierup, 1990).



*Bolboschoenus maritimus*

*Bolboschoenus (Scirpus)*

*Typha spp*

**Figura 3.5** Macrófitos emergentes (fotos de Julio Rondal)

En calidad de ejemplos representativos de este tipo de plantas (Figura 3.6), tenemos a: *Acorus calamus* (cálamo aromático), *Baumea articulata* (Zacate de agua), *Schoenoplectus californicus* (Totora) *Bolboschoenus* (Papyrus), *Eleocharis* spp., *Glyceria maxima* (Pasto dulce), *Juncus* spp. (Junco), *Phalaris arundinacea* (Hierba cinta) *Phragmites australis* (Caña común), *Panicum hemitomon* (Maidencane), *Pontederia cordata* (espiga de agua), *Sagittaria* spp. (Puntas de flecha), *Scirpus* spp. (Junquillo), *Sparganium* spp. (cañas de arroz).



*Phalaris arundinacea**Phragmites australis***Figura 3.6.** Macrófitos emergentes (fotos de Julio Rondal)

### 3.6.2 Macrófitos sumergidos

Los macrófitos sumergidos se encuentran a profundidades dentro de la zona fótica, en tanto que las angiospermas vasculares se desarrollan hasta 10 m. bajo una presión hidrostática de una atmósfera (Figura 3.7). Estas plantas presentan un conjunto de modificaciones y adaptaciones fisiológicas y morfológicas, así sus tallos, peciolo y hojas poseen poca lignina; debido a la poca iluminación, la cutícula es poco desarrollada, con un gran número de cloroplastos en la capa epidérmica (Wetzel, 2001).



*Elodea* spp

*Myriophyllum* spp

*Hydrilla verticillata*

Figura 3.7. Plantas emergentes sumergidas (fotos de Julio Rondal)

Ejemplos de plantas macrófitas sumergidas son: *Cacomba caroliniana* (ortiga acuática), *Ceratophyllum* spp. (Coontails), *Eggeria densa* (maleza acuática brasileña), *Elodea* spp. (elodea), *Hydrilla verticillata* (Hydrilla), *Isoetes* spp., *Myriophyllum* spp. (Watermilfoils), *Najas* spp. (Nimfa acuática), *Potamogeton* spp. (Mala Hierba de estanque), *Utricularia* spp. En la Figura 3.8, se muestran algunas plantas emergentes de amplio uso para biorremediación.



a) *Vallisneria americana*



b) Sombrilla de agua (*Hydrocotyle ranunculoides*)

Figura 3.8. Plantas emergentes sumergidas

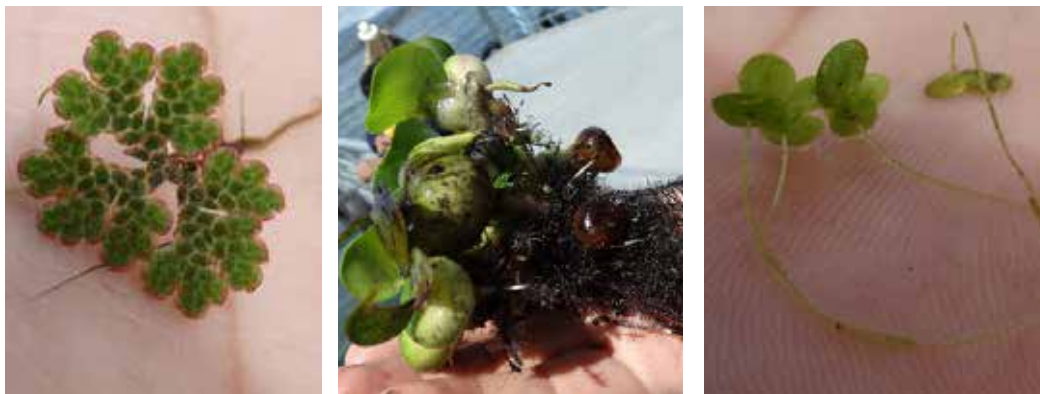
(fotos de Julio Rondal)

### 3.6.3. Macrófitas flotantes

Se dividen en tres grupos explicados a continuación.

#### 3.6.3.1. Flotantes libres

Las plantas macrófitas flotantes, presentan una gran diversidad de formas, desde plantas con antenas de roseta, plantas con hojas flotantes bien desarrolladas, plantas con raíces sumergidas, tal como se puede ver en *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua), *Pistia stratiotes* (lechuga de agua). También existen plantas flotantes con pocas o ninguna raíz, como *Lemna minor*, *L. gibba*, *L. trisulca*, *Salvinia natans*, *Wolffia* spp. (Brix y Schierup, 1990). En la Figura 3.9, se muestran tres macrófitas flotantes más empleadas.



a) *Azolla foliculoides*

b) *Eichhornia crassipes*

c) *Lemna minor*

**Figura 3.9.** Plantas macrófitas flotantes libres (fotos de Julio Rondal)

Varias de estas plantas se desarrollan profusamente en lagos, estanques y canales, impidiendo su uso comercial, especial atención se debe prestar al desarrollo de *Eichhornia crassipes*, que puede convertirse en una verdadera plaga y es una de las plantas de mayor distribución a nivel mundial. Los macrófitos flotantes adsorben los nutrientes directamente desde el agua, muchas de ellas se desarrollan bien en aguas ricas en sales disueltas (Wetzel, 2001), y con altas cargas orgánicas. Un reducido número de plantas flotantes son angiospermas, tal es el caso de *Lemna* sp, que emplea fuentes de carbono atmosférico y acuático (Filbin y Hough, 1985).

### 3.6.3.2. Plantas macrófitas arraigadas

Los macrófitos de hojas flotantes-enraizadas son principalmente las angiospermas que se desarrollan unidas a los sedimentos, sumergidos a profundidades de 0,5 a 3,0 m. Algunas especies (heterófilas), poseen hojas sumergidas y hojas flotantes. Sus órganos reproductivos flotantes, están rodeados por hojas flotantes con pecíolos largos y flexibles, como se puede observar en, *Nuphar* o *Nymphaea*, o pecíolos cortos como en, *Brassenia*, *Potamogeton natans* (Wetzel, 2001).

Las plantas flotantes experimentan constantemente estrés mecánico por acción del viento y el movimiento permanente del agua, estas condiciones desfavorables son superadas con el desarrollo de hojas palmadas fuertes, correosas y de bordes redondeados, sus superficies son hidrofobas y pecíolos de alta flexibilidad. Sin embargo, el crecimiento y desarrollo de estas plantas está restringido a sitios (hábitat) protegidos contra el viento y de baja velocidad de flujo del agua.

- **Rhizodegradación**

Las plantas y la rizosfera desempeñan un rol importante en la disipación de los contaminantes en el suelo, estudios realizados con carbono  $^{14}\text{C}$ , muestran que la degradación de hidrocarburos es mayor en suelos con vegetación que en suelos sin ella, lo que indica que la biodisponibilidad de los contaminantes se incrementa en la rizosfera (Ferro et al., 1994; Anderson y Walton, 1995; Banks et al., 1999).

Las raíces fibrosas ofrecen una mayor superficie para el desarrollo microbiano, por esta razón los pastos perennes como (*Andropogon gerardii*), hierba indio (*Sorghastrum nutans*), pasto varilla (*Panicum virgatum*), centeno silvestre de Canadá (*Elymus canadensis*), el pequeño tallo azul (*Schizachyrium scoparium*), grama avena (*Bouteloua curtipendula*), hierba de trigo occidental (*Agropyron smithii*), y navajita (*Bouteloua gracilis*), son mejores para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La mineralización del pentaclorofenol (PCF) y fenantreno en suelo de la rizosfera fue evaluada con el empleo de  $^{14}\text{C}$  (Ferro et al., 1994), en Agro-

piro crestado (*Agropyron desertorum*), el 20% de la concentración inicial de PCF, se convirtió en  $^{14}\text{CO}_2$  en 155 días en el suelo con vegetación, en tanto que solo el 5% fue mineralizado en el suelo sin vegetación. Algo similar sucede con la biorremediación de HAPs (Banks y Schwab, 1999). La degradación de HAPs depende de la solubilidad de sus componentes. En biorremediación (fitorremediación), se emplea ampliamente la alfalfa (*Medicago sativa*), festuca (*Festuca arundinacea*), el tallo azul (*Andropogon gerardii*), y el pasto del Sudán (*Sorghum vulgare sudanés*).

Las plantas emergentes tienen sus raíces en el suelo, sus porciones basales crecen debajo de la superficie del agua, en tanto que las hojas, tallos (partes fotosintéticas), y órganos reproductivos son aéreos. La mayoría de las plantas de este grupo son herbáceas, pero también se incluyen especies arbóreas de los humedales (Masarovičová y Kráľová, 2018). Entre las especies leñosas empleadas en biorremediación se incluyen árboles y arbustos que se encuentran en los humedales ribereños, tierras bajas boscosas, bosques pantanosos y turberas. Especies de árboles forestales de pantano típicas en los E.E.U.U, que incluyen a *Taxodium distichum* (ciprés de los pantanos) y *Nyssa*.

### 3.7. Otros organismos

#### 3.7.1. Algas

Las algas son organismos eucariotas que disponen de organelos celulares delimitados por membranas. En la actualidad las algas no son una categoría taxonómica, para algunos autores son considerados protistas, (son organismos eucariotas), para otros son plantas. Las algas son organismos simples, muchos de ellos son unicelulares, otros multicelulares y aún más complejos, todo ellos poseen tejidos de conducción rudimentarios (Belanger, 2020).

Adicionalmente presentan una gran variedad morfológica y reproductiva. Desde el punto de vista fisiológico y bioquímico son muy similares a las plantas; las algas como euglenofitas, ochonofitas y dinofitas, han perdido su capacidad para realizar fotosíntesis y viven como saprofitos o parásitos. Otro grupo representativo de las algas son las algas pardas, con más de 100 especies heterótrofas. La característica esencial de las algas, que las

diferencian de las plantas, es la falta de un embrión multicelular y la ausencia de una envuelta multicelular alrededor de los gametangios y esporangios (a excepción en algas de agua dulce, algas verdes, carofitas) (Anand et al., 2019). Se estima que existen entre 30.000 a un millón de especies, cuya mayoría son marinas (Guiry, 2012). Las algas son organismos cosmopolitas que viven en prácticamente todos los ecosistemas, desde los ecosistemas acuáticos, suelo, material vegetal muerto, sedimentos, hasta en ecosistemas extremos como: nieve, hielo (Antártida, Andes, Ártico), fuentes termales, salinas, y a grandes profundidades. En los ecosistemas acuáticos, constituyen la base de la cadena alimenticia (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Algas de la zona intermareal en isla Greenwich, península Antártica

El uso de microalgas, como sistema biológico alternativo para el tratamiento de las aguas domésticas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su capacidad de remover cantidades significativas de nitratos, fosfatos y materia orgánica. Según Dueñas et al (2014), la bioacumulación de Arsénico III (As III) en la microalga *Chlorella vulgaris*, evaluada mediante la concentración de clorofila “a” y mediante la concentración residual de As, en el efluente; es de 60,05%.

El estudio realizado por Parra y Villanueva (2013), con *Scenedesmus in-crassatulus* inmovilizado en alginato de calcio, se evaluó la remoción de

nitratos y fosfatos del medio de cultivo Bold. Los resultados muestran que en 8 días de tratamiento se obtuvo una remoción del 60% de la cantidad inicial de nitratos, mientras que los fosfatos disminuyeron en un 47%.

Entre las microalgas que presentan la capacidad de remediar metales pesados, tenemos a: *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella miniata*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*. Estas especies disponen de una alta superficie de intercambio y alta afinidad para enlazar metales pesados, razón por la que crecen bien en medios contaminados (Chong et al., 2000). Los metales pesados se incorporan en el cuerpo de las algas y son recuperados, cuando se recolecta biomasa. La capacidad de remediar metales pesados está relacionada con la composición bioquímica de los polisacáridos de la pared celular (Harun et al., 2010).

Las microalgas como *C. vulgaris*, se han empleado para tratar aguas residuales con altas concentraciones de níquel, procedentes de la minería, metalurgia del acero, electrosoldado, baterías y acumuladores, rectificadoras. También se han empleado consorcios de microalgas nativas para tratar residuos mineros (Orandi y Lewis, 2013). El consorcio empleado contenía a *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Franceia*, *Mesotaenium*, y *Cyanobacteria* (Orandi y Lewis, 2013).

Las algas marinas, también pueden ser empleadas en biorremediación, la contaminación marina por descargas industriales, mineras, urbanas y derrames de petróleo puede ser eliminada con el empleo de algas, que pueden acumular metales pesados, tomar nutrientes y metabolizar a los componentes del petróleo (Pereira y Neto, 2014). Las altas concentraciones de nutrientes en el medio acuoso son promotoras del crecimiento exponencial de microalgas y algas marinas, que conducen a la eutrofización de las aguas. Para evitar la eutrofización, se recomienda el tratamiento el tratamiento de estas descargas antes de que ingresen a los cuerpos receptores.

Las microalgas son las más indicadas para este tipo de tratamiento, la biomasa generada se puede emplear para a producción de biocombustibles, debido a que varias de ellas producen grandes cantidades de aceites (Rawat et al., 2016). Las macroalgas no son empleadas para este tipo de tratamiento, a no ser que estas crezcan cerca de las zonas rivereñas donde existen industrias que realizan descargas con alto contenido de nutrientes.

Un ejemplo práctico de esta recomendación es la producción de peces, donde las heces y los alimentos no consumidos, producen altas concentraciones de nutrientes en los efluentes; su tratamiento con microalgas reducirá la contaminación antes que ingrese al mar.

*Nitzschia sp.*, es una microalga bentónica, que desarrolla biopelículas en sedimentos enriquecidos con materia orgánica, contribuyendo a su recuperación, no solo por la asimilación de materia orgánica, sino también, por la producción de oxígeno que promueve la degradación bacteriana aeróbica (Yamamoto et al., 2008). A más de la producción de O<sub>2</sub>, las algas también contribuyen a la reducción de CO<sub>2</sub>, contribuyendo a generar un ambiente más sano para el crecimiento y desarrollo de los peces.

Se ha demostrado la capacidad de las algas para degradar lindano, en el alga *Desmodesmus intermedius*, que es capaz de adaptarse y crecer bajo altas concentraciones de lindano y de metabolizarlo (González et al., 2012). El naftaleno y floroglucinol, son degradados por *Navicula sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia sp.*, y *Synedra sp.* (*Bacillariophyceae*), que son algas de agua dulce y que además pueden degradar herbicidas; esta capacidad también se ha evidenciado en la diatomea marina *Skeletonema costatum* (Yang et al., 2015).

Los hidrocarburos producto de derrames en los cuerpos de aguas, son difíciles de biodegradar, en especial si su concentración es alta y cubre la superficie del agua impidiendo el ingreso de luz. Adicionalmente, la toxicidad es tan alta que la biodiversidad se reduce drásticamente y se necesitan años antes de que el ecosistema local se restaure. Mediante adaptación fisiológica, las algas pueden constituirse en herramientas naturales para la biorremediación, de este tipo de contaminantes, siempre y cuando no se impida el acceso de luz, necesaria para la fotosíntesis.

¿Cuáles son los mecanismos mediante los cuales, las algas movilizan a los metales pesados? Los estudios realizados a través de los años muestran que los mecanismos son:

- Intercambio iónico: considerado el mecanismo predominante de Biosorción de metales pesados (Herrero et al., 2006), donde la interacción física elemental se expresa mediante fuerzas electrostáticas de



Van del Waals o química, por la formación de enlace iónico o covalente. Así la Biosorción de metales pesados como Pb (II), Cd (II), Cu (II), Zn (II), etc., en *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa*, ocurre predominantemente por intercambio iónico (Zhou et al., 2012; Mirghaffari et al., 2015).

- **Formación de complejos:** Otro mecanismo que puede ocurrir a la par con el intercambio iónico, es la formación de complejos, en la superficie celular, entre el ión metálico de la solución acuosa y los grupos funcionales de la microalga, así la Biosorción del Cu (II) iónico, por *Chlorella vulgaris*, ocurre con la formación de un enlace coordinado entre el ión metálico y el grupo carboxilo de los polisacáridos de la pared celular. Este enlace en comparación con el anterior es más estable.
- **Micro precipitación:** Este proceso puede ocurrir bajo cambios incrementos bruscos del pH, durante la Biosorción, o cuando la concentración del ión incrementa hasta la saturación. Bajo estas circunstancias el metal se precipita y deposita en la superficie celular. Otro factor de cual depende la micro precipitación es la naturaleza de la microalga (Singh, y Saini, 2020). En la tabla 3.6, se pueden ver algunas microalgas empleadas en remediación de metales pesados.

**Tabla 3.6.** Microalgas que remedian metales pesados. Adaptado de Kim (2015)

MICROALGA	METAL PESADO	PH	REFERENCIA
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	6.0 -7.0 5.0-7.0	Monteiro et al (2011) Kumar et al (2014)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	5.0	Mirghaffari et al (2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cr <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	2.0 5.0-6.0	Arica et al (2005) Bayramoglu et al (2006)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	4.0	Aksu and Donmes, (2006)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cr <sup>3+</sup>	4.0 – 5.0	Akthar et al (2008)
<i>Odeogonium hatei</i>	Cr <sup>6+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	2.0 – 5.0	Gupta and Rastogi (2009) Gupta et al (2010)

### 3.7.2. Organismos genéticamente modificados en Biorremediación

El continuo crecimiento de los agentes contaminantes de origen sintético que se descargan a los ecosistemas, constituye una de las principales preocupaciones y motivaciones del desarrollo de microorganismos genéticamente modificados para emplearlos en la remediación de la polución ambiental; especial atención se presta a los contaminantes orgánicos como los bifenilos policlorados PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs, y pesticidas que son resistentes a la degradación y que constituyen un riesgo toxicológico para la diversidad biológica de los ecosistemas afectados.

Debido a su naturaleza artificial, estos xenobióticos se acumulan en los ecosistemas ya que los microorganismos autóctonos no pueden biodegradarlos eficientemente, sin embargo, el potencial de la microflora autóctona representa una gran ventaja, por cuanto estos microorganismos interactúan con los componentes del medio en forma equilibrada, sin generar estrés en las poblaciones (Singh et al., 2011).

Aunque el número de microbios genéticamente modificados (GEMS) para su uso potencial en la biodegradación no es grande, estos microbios recombinantes funcionan en pruebas de microcosmos. La supervivencia y el destino de los microbios recombinantes en diferentes nichos ecológicos en condiciones de laboratorio es similar a lo que se ha observado para las cepas parentales no modificados, cepas modificadas sobreviven en ambientes contaminados, pero mueren cuando se elimina la sustancia química objetivo (Kumar et al., 2018).

El empleo de OGMs en biorremediación en trabajos de campo, presenta una serie de riesgos, en especial para países con alta biodiversidad como Ecuador y en países de la cuenca amazónica. Según Davison (2005) se han reportado efectos negativos sobre los ecosistemas por el empleo de microorganismos genéticamente modificados, en remediación ambiental, este es el caso de *Burkholderia cepacia*, empleada en la degradación de compuestos nitro, y *Pseudomonas*, que degrada tolueno; que presentan resistencia múltiple a los antibióticos.

Otro factor de riesgo es la transferencia horizontal de genes Inter especie (María et al., 2011). La transferencia de factores de resistencia a los antibió-

ticos desde especies modificadas a especies naturales es indeseable para la seguridad ambiental, su transferencia puede generar el desplazamiento de microorganismos autóctonos y la pérdida de la diversidad microbiana autóctona.

La competencia de los OGMs por los nutrientes y otros recursos, con los microorganismos autóctonos, ejerce presiones sobre los factores bióticos y abióticos de los ecosistemas (Singh et al., 2011), generando cambios sustanciales en la dinámica de los nutrientes.

Adicionalmente a estos factores, para países como Ecuador, los riegos se incrementan debido a la falta de personal técnico científico capacitado para evaluar los potenciales daños del uso de OGMs en el ambiente, la falta de un sistema normativo local, de protocolos de estudio y pruebas experimentales estandarizadas. La ausencia de laboratorios de análisis, desarrollo e investigación de OGMs hace imposible la ejecución de planes de monitoreo y seguimiento ambiental de los OGMs en sistemas de biorremediación a campo abierto.

Desde la década de los noventa del siglo anterior, se han diseñado varios microorganismos genéticamente modificados para degradar una gama de contaminantes ambientales, desde metales pesados, hidrocarburos, pesticidas y compuestos orgánicos complejos. La tabla 3.8 ilustra la variedad de microorganismos creados y los residuos tratados. Entre los microorganismos modificados empleados, se pueden encontrar, bacterias, levaduras, microalgas y hongos.

**Tabla 3.8.** Microorganismos genéticamente modificados empleados en bio-remediación. Adaptado de Kumar Rama et al., (2017), Saxena et al (2020), Gupta and Singh (2017).

MICROORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO	CONTAMINANTE	REFERENCIA
<i>Brassica juncea</i> , modificada en <i>E. coli</i> <i>gshI</i>	Cd tolerancia	(Fulekar et al., 2009).

<i>Mesorhizobium huakuii</i> subsp. <i>rengel</i> strain B3 introducida en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Alta captación y resistencia Cd <sup>2+</sup>	(Sriprang et al., (2003)
<i>AtNramps</i> , de <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>gshI</i> , <i>gshII</i>		(Thomine et al., 2000), (Zhu, 1999a),
<i>Alamo Transgénico</i> y plantas de tabaco que sobreexpresan un citocromo de mamífero P450 2E1, (CYP2E1) y el citocromo P450 2E1 humano se desarrollaron con la capacidad de	<i>metabolismo del tricloroetileno (TCE)</i>  Remediación de explosivos	(Wang et al., 2008).
Introducción del gen <i>pnrA</i> que codifica nitroreductasa de <i>Pseudomonas putida</i> al tabaco		(James and Strand, 2009)
Introducción del plásmido PaW340( <i>pDH5</i> en <i>Pseudomonas putida</i> )	Ácido 4-chlorobenzoico	(Massa et al., 2009)
Introducción del gen de Cytochrome P450 monooxygenasa en <i>Rhodococcus rhodochrous</i> XplA, XplB	RDX	(Jackson et al., 2007)
Introducción del gen de Nitroreductase, en <i>E. coli</i> NfsA	TNT	(Kurumata et al., 2005)
Introducción de genes <i>CrR</i> genes para Cr (VI) actividad de reductasa en <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	Cr (VI) (Asociado celular, removido en condiciones de laboratorio)	(Al Hasin et al., 2010)
Introducción de proteína enlazadora de mercurio ( <i>MerP</i> ), en <i>Bacillus megaterium</i> strain MB1	Hg	(Hsieh et al., 2009)
Introducción del gen <i>tzn1</i> , de <i>Neurospora crassa</i> , en <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Cd, Fe, Ni, Cu, Mn y Pb	(Dixit et al., 2010)
Introducción del gen <i>GSH1</i> y <i>AsPCS1</i> , de <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. sativum</i> , en <i>A. thaliana</i> L.	Cd y As	(Guo et al., 2008)
Introducción del gen <i>GstI-6His</i> , de <i>Zea mays</i> , en <i>N. tabacum</i>	Alachlor	(Karavangeli et al., 2005)
Introducción del gen <i>atzA</i> , de Bacteria, en <i>Medicago sativa</i> , <i>N. tabacum</i>	Atrazine	(Wang et al., 2005)
Expression of <i>merA</i> gene from <i>Escherichia coli</i> BL308, en <i>Deinococcus radiodurans</i>	Mezclas de residuos radioactivos y Hg	(Brim et al., 2000).

<p>Desarrollo de una cepa cojugante de <i>Cupriavidus metallidurans</i> MSR33, empleando <i>Cupriavidus metallidurans metal</i> resistente cepa CH34 con dos plásmidos largos, pMOL28 and pMOL30, que contienen el plásmido del operon merRTPADE</p>	<p>Remoción de Hg de agua</p>	<p>(Mergeay et al., 2003).</p>
<p>Clonado del gen arsM de <i>Sphingomonas desiccabilis</i> y <i>Bacillus idriensis</i> en, <i>Thermus thermophilus</i> HB8. adicionalmente posee los genes TTHB128 y TTHB127 asociados con la producción de arsenito oxidasa.</p>	<p>Emisión de gas As metilado capaz de oxidar tóxicas de As a no tóxicas</p>	<p>(Yang, 2010)</p>
<p>Clonado en un vector pBBR1MCS Codificación del gen del metallothioneina bacteriana (smt A y tAB) de microorganismos como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  cepa 4EA y <i>Salmonella choleraesuis</i> cepa 4<sup>a</sup>, en la cepa <i>Proteus penneri</i> GM10</p>	<p>Resistencia al Pb</p>	<p>(Naik y Dubey 2013)</p>

La cepa modificada de *Pseudomonas sp. B13* empleados en Biorremediación, puede sobrevivir bien en pruebas de microcosmos, de remediación de benzoatos sustituidos en lodos activados; incluso su descendencia presenta un alto nivel de persistencia con poblaciones hasta de 10<sup>5</sup> bacterias /ml (Dwyer et al., 1988).

Debido al riesgo ambiental que representa la transferencia horizontal de genes, ha sido necesario hacer investigaciones detalladas para evaluar este riesgo; así el estudio realizado por Ravant et al (1988), analiza los efectos de los sustratos selectivos sobre la supervivencia, crecimiento y transferencia de genes entre bacterias que degradan contaminantes aromáticos en un ecosistema de aguas residuales.

La supervivencia y el destino de los microbios recombinantes en diferentes nichos ecológicos en condiciones de laboratorio es similar a lo que se ha observado para las cepas parentales no modificados, cepas modificadas sobreviven en ambientes contaminados, pero mueren cuando se elimina la sustancia química objetivo (Ramos et al., 1994). La supervivencia de los microorganismos se puede predecir mediante el uso de sistemas de contención biológica activos, así en cepas *Pseudomonas putida* que degradan

alquilbencenos, se ha introducido un gen killer que se halla encendido o apagado por la ausencia o presencia de benzoatos de alquilo, en el microcosmos que no contienen alquil benzoatos la sobrevivencia de las bacterias es mínima (Ronchel et al., 1995).

La gran mayoría de los estudios relacionados con la biorremediación microbiana manipulada genéticamente está soportada por datos experimentales basadas en el laboratorio. Existen relativamente pocos ejemplos de aplicaciones de OGMs en pruebas de campo, en consecuencia, es difícil predecir los verdaderos efectos de la introducción de OGMs en los ecosistemas naturales (Sayler y Ripp, 2000). Para el efecto, solo los resultados de laboratorio son esgrimidos cuando se trata de evaluar los riesgos ambientales de su empleo, situación que de ninguna forma es satisfactoria, en especial para ecosistemas sensibles como los ecuatorianos y amazónicos. Por esta razón, Gorlach (1994), afirma que solo la evaluación completa de riesgos ecológicos y ambientales, con el empleo de herramientas modernas de ingeniería genética, pueden constituir una garantía para su introducción y empleo masivo a escala ambiental.

La preocupación se extiende no solo a los microorganismos, sino también, al empleo de plantas modificadas, empleadas para biorremediación, con las cuales los temas de bioseguridad han sido subvalorados. El empleo de técnicas genéticas que permiten la escisión específica de sitio de ADN innecesario, genes suicidas condicionales que pueden ser activados bajo ciertas condiciones. Estos métodos actúan para prevenir la propagación y la supervivencia de las bacterias o plantas transgénicos en el ambiente y para evitar el flujo horizontal de genes a parientes silvestres o cultivadas (Davison, 2005).

### 3.8. Conclusiones y perspectivas futuras

Hemos visto que la gama de organismo vivos que tienen la capacidad de emplear como fuente de carbono xenobióticos ambientales, crece constantemente, a medida que las investigaciones se desarrollan. La interacción de rutas metabólicas de distintos grupos taxonómicos de organismos vivos, perfeccionan los procesos de degradación, permitiendo su mineralización completa, hasta elementos inocuos seguros.

La interacción de organismos eucariotas como las algas, plantas y hongos con procariotas, como las bacterias y sus distintas familias; constituye una estrategia fundamental desarrollada por la naturaleza a lo largo de su proceso evolutivo, que le ha permitido mantener constante el flujo de materia y energía entre los sistemas vivos y el medio externo.

En la búsqueda de nuevas rutas metabólicas, que permitan degradar la creciente masa de contaminantes artificiales generadas por las actividades humanas, el papel de los organismos genéticamente modificados, sin lugar a duda será predominante. En este contexto, el desarrollo de programas de investigación nacional, pueden ser gran relevancia no solo científica, sino también práctica, debido a que el Ecuador es uno de los países es de mayor biodiversidad genética del planeta, cuyo potencial no se ha descubierto y puede constituirse en el medio para salir del subdesarrollo. Disponer de bancos de cepas y genes útiles, para el ambiente y la biotecnología en general, debe ser una de las metas futuras de la academia nacional.

### 3.9. Bibliografía

1. Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003b). Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir*, 19(8), 3550-3553.
2. Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V., & Sastry, M. (2003 a). Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology*, 14(7), 824.
3. Akhtar, N., Iqbal, M., Zafar, S. I., y Iqbal, J. (2008). Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III). *Journal of Environmental Sciences*, 20(2), 231-239.
4. Al Hasin, A., Gurman, S. J., Murphy, L. M., Perry, A., Smith, T. J., & Gardiner, P. H. (2010). Remediation of chromium (VI) by a methane-oxidizing bacterium. *Environmental science & technology*, 44(1), 400-405.
5. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., y Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology* (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.
6. Amoroso, M. J., Benimeli, C. S., y Cuozzo, S. A. (Eds.). (2013). *Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial*

- enzymes. CRC Press.
7. Anand, N., Thajuddin, N., & Dadheech, P. K. (2019). Cyanobacterial taxonomy: Morphometry to molecular studies. In *Cyanobacteria* (pp. 43-64). Academic Press.
  8. Anderson, T. A., y Walton, B. T. (1995). Comparative fate of [14C] trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(12), 2041-2047.
  9. Aona, D., Yaning, L., & Jun, Q. (2017). Life Cycle Assessment of Edible Fungi Residue Compost-A Case Study of Beijing. *Nature Environment and Pollution Technology*, 16(2), 643.
  10. Aprill W, Sims RC (1990) *Chemos* 20:253
  11. Arfmann, H., Timmis, K. N., y Wittich, R. (1997). Mineralization of 4-Chlorodibenzofuran by a Consortium Consisting of *Sphingomonas* sp. Strain RW1 and *Burkholderia* sp. Strain JWS. *Applied and environmental microbiology*, 63(9), 3458-3462.
  12. Arica, M. Y., Tüzün, İ., Yalçın, E., İnce, Ö., y Bayramoğlu, G. (2005). Utilisation of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparations for biosorption of Cr (VI) ions. *Process Biochemistry*, 40(7), 2351-2358.
  13. Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180.
  14. Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... y Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.
  15. Banks, M. K., Lee, E., y Schwab, A. P. (1999). Evaluation of dissipation mechanisms for benzo [a] pyrene in the rhizosphere of tall fescue (Vol. 28, No. 1, pp. 294-298). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
  16. Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., y Arica, M. Y. (2006). Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing*, 81(1), 35-43.
  17. Belanger, S. E., Barnum, J. B., Woltering, D. M., Bowling, J. W., Ventullo, R. M., Schermerhorn, S. D., & Lowe, R. L. (2020). Algal periphyton structure and function in response to consumer chemicals in stream mesocosms. In *Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment*



- (pp. 535-568). CRC Press
18. Bell R. M. (1992). Higher Plant Accumulation of Organic Pollutants from Soils. U.S. Environmental Protection Agency Document EPA/600/SR-92/138.
  19. Bell, R. M, Failey R. A (1991). Organic Contaminants in the Environment, Jones KC (editors), Elsevier Science, New York, NY, p 189
  20. Bender, J., Phillips, P., Lee, R., McNally, T., Rodriguez-Eaton, S., y Félix, C. (1997). Rapid heavy metal removal in a continuous-flow batch reactor by microbial mat. *Situ and On-Site Bioremediation*, 3, 373-378.
  21. Benimeli, C. S., Castro, G. R., Chaile, A. P., y Amoroso, M. J. (2007). Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7. *International biodeterioration & biodegradation*, 59(2), 148-155.
  22. Bernilla, M. S. (2010). Degradación de pesticidas por Actinomicetos. *UCV-SCIENTIA*, 2(1), 34-37.
  23. Bodour, A. A., Wang, J. M., Brusseau, M. L., y Maier, R. M. (2003). Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environmental Microbiology*, 5(10), 888-895.
  24. Bossert, I., y Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.). *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan, 435–473.
  25. Brim, H., McFarlan, S. C., Fredrickson, J. K., Minton, K. W., Zhai, M., Wackett, L. P., y Daly, M. J. (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature biotechnology*, 18(1), 85-90.
  26. Brix, H., y Schierup, H. H. (1990). Soil oxygenation in constructed reed beds: the role of macrophyte and soil-atmosphere interface oxygen transport. In *Constructed wetlands in water pollution control* (pp. 53-66). Pergamon.
  27. Burford, E. P., Kierans, M., y GADD, G. M. (2003). Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist*, 17(3), 98-107.
  28. Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
  29. Cerniglia, C. E., y Crow, S. A. (1981). Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Archives of Microbiology*, 129(1), 9-13.
  30. Chauhan, A., Oakeshott, J. G., y Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 95-113.

31. Chauvat, F., & Cassier-Chauvat, C. (2013). ADVANCES IN BOTANICAL RESEARCH Genomics of Cyanobacteria PREFACE.
32. Chong, A. M. Y., Wong, Y. S., y Tam, N. F. Y. (2000). Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*, 41(1-2), 251-257.
33. Chung, W. K., & King, G. M. (2001). Isolation, characterization, and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5585-5592.
34. Das, S., y Dash, H. R. (2014). *Microbial biotechnology-A laboratory manual for bacterial systems*. Springer.
35. Davison, J. (2005). Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 639-650.
36. Deacon, J. (2005). *Wood decay and wood-rotting fungi*. University of Edinburgh.
37. DIAS, E. S., GUIMARÃES, S. E., de SIQUEIRA, F. G., da Silva, R., y BATISTA, L. R. (2009). Allergenic and toxigenic fungi in the compost of cultivation of *Agaricus brasiliensis*. *Scientia Agraria*, 10(6), 507-511.
38. Dixit, P., Singh, S., Vancheeswaran, R., Patnala, K., y Eapen, S. (2010). Expression of a *Neurospora crassa* zinc transporter gene in transgenic *Nicotiana tabacum* enhances plant zinc accumulation without cotransport of cadmium. *Plant, cell & environment*, 33(10), 1697-1707.
39. Dodge, R. H., Cerniglia, C. E., y Gibson, D. T. (1979). Fungal metabolism of biphenyl. *Biochemical Journal*, 178(1), 223-230.
40. Dueñas, A., Huarachi, R., Yapo, U., Apfata, P., y Gonzalez, R. (2014). Bioacumulación de arsénico en *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta: Chlorellaceae) en efluente de Parque Industrial Rio Seco (PIRS) y toxicidad aguda sobre *Daphnia Magna* (Crustacea: Daphniidae), Arequipa, Perú. *The Biologist*, 12(1), 9-22.
41. Dwyer, D. F., Hooper, S. W., Rojo, F., & Timmis, K. N. (1988). Fate of genetically-engineered bacteria in activated sludge microcosms. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Luft Hygiene*, 78, 267-276.
42. Elgueta, S., Correa, A., Campo, M., Gallardo, F., Karpouzas, D., & Diez, M. C. (2017). Atrazine, chlorpyrifos, and iprodione effect on the biodiversity of bacteria, Actinomycetes, and fungi in a pilot biopurification system with a green cover. *Journal of Environmental Science and Health, Part*

- B, 52(9), 651-657.
43. Enrique, P. S., Carlos, M. P., Jesús, S., y Javier, M. V. (2013). Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: caso *Heliconia psittacorum* (heliconiaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 37(145), 469-481.
  44. Feng, J., Liu, R., Chen, P., Yuan, S., Zhao, D., Zhang, J., & Zheng, Z. (2015). Degradation of aqueous 3, 4-dichloroaniline by a novel dielectric barrier discharge plasma reactor. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4447-4459.
  45. Ferro, A. M., Sims, R. C., y Bugbee, B. (1994). Hycrest crested wheat-grass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil (Vol. 23, No. 2, pp. 272-279). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
  46. Filbin, G. J., y Hough, R. A. (1985). Photosynthesis, photorespiration, and productivity in *Lemna minor* L. 1. *Limnology and oceanography*, 30(2), 322-334.
  47. Fulekar, M. H., Geetha, M., y Sharma, J. (2009). Bioremediation of Trichloropyr Butoxyethyl Ester (TBEE) in bioreactor using adapted *Pseudomonas aeruginosa* in scale up process technique. *Biology and Medicine*, 1(3), 1-6.
  48. Gadd, G. M. (2007). Presidential address geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res*, 3, 3-49.
  49. Galperin, Y., y Kaplan, I. R. (2011). Review of microbial processes in the near-surface environment and their implications for the chemical fingerprinting of hydrocarbon fuels. *Environmental Forensics*, 12(3), 236-252.
  50. Gaur, J.P. and Kumar, D., (2011). Metal biosorption by two cyanobacterial mats in relation to PH, biomass concentration, pretreatment and reuse, *Bioresour Technol.* 2011.102, 2529.
  51. Gilbert, E. S., Walker, A. W., y Keasling, J. D. (2003). A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(1), 77-81.
  52. González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., Lopez-Rodas, V., y Costas, E. (2012). Adaptation of microalgae to lindane: a new approach for bioremediation. *Aquatic toxicology*, 109, 25-32.
  53. Gorlach, K. (1994). Problems in the introduction of genetically engineered microorganisms into the environment. *Acta Microbiologica Polonica*, 43(2), 121-131.

54. Gualoto M. (2011). Biorremediación de hidrocarburos utilizando cepas Antárticas. Ponencia, Seminario “Ecuador en la Antártida: Historia, Perspectivas y Proyecciones” Instituto de Altos Estudios Nacionales.
55. Gualoto M., (2008). Tratamiento de residuos industriales hidrocarbúricos mediante landfarming en plataforma. Weatherford Ecuador. Ponencia. III Congreso Interamericano de Salud Ambiental, “Salud ambiental en América, pasado, presente y futuro, un espacio para la reflexión e intercambio de conocimientos y experiencias en el campo de la salud ambiental en América” AIDIS- UDLA, Quito. Del 14 al 18 de mayo del 2008.
56. Guo, J., Dai, X., Xu, W., & Ma, M. (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72(7), 1020-1026.
57. Gupta, S., y Singh, D. (2017). Role of genetically modified microorganisms in heavy metal bioremediation. In *Advances in Environmental Biotechnology* (pp. 197-214). Springer, Singapore.
58. Gupta, V. K., Rastogi, A., y Nayak, A. (2010). Biosorption of nickel onto treated alga (*Oedogonium hatei*): application of isotherm and kinetic models. *Journal of colloid and interface science*, 342(2), 533-539.
59. Gupta, V. K., y Rastogi, A. (2009). Biosorption of hexavalent chromium by raw and acid-treated green alga *Oedogonium hatei* from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 396-402.
60. Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2008). Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied soil ecology*, 38(1), 12-19.
61. Hardison L.K, Curry S.S, Ciuffetti L.M, Hyman M.R (1997) Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl tert-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl Environ Microbiol* 63:3059–3067
62. Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., y Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037-1047.
63. Hasegawa, Y., Okamoto, T., Obata, H., & Tokuyama, T. (1990). Utilization of aromatic compounds by *Trichosporon cutaneum* KUY-6A. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69(2), 122-124.
64. Hawksworth, D. L. (1997). The fascination of fungi: exploring fungal diversity. *Mycologist*, 11(1), 18-22.
65. Hofrichter, M., y Scheibner, K. (1993). Utilization of aromatic compounds

- by the Penicillium strain Bi 7/2. *Journal of basic microbiology*, 33(4), 227-232.
66. Hsieh, J. L., Chen, C. Y., Chiu, M. H., Chein, M. F., Chang, J. S., Endo, G., & Huang, C. C. (2009). Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals. *Journal of hazardous materials*, 161(2-3), 920-925.
  67. Hubbe, M. A., Nazhad, M., & Sánchez, C. (2010). Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: A review. *BioResources*, 5(4), 2808-2854.
  68. Hughes, K. A., Bridge, P., y Clark, M. S. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 372(2-3), 539-548.
  69. Hyde, K. D., Al-Hatmi, A. M., Andersen, B., Boekhout, T., Buzina, W., Dawson, T. L., ... & Tsui, C. K. (2018). The world's ten most feared fungi. *Fungal Diversity*, 93(1), 161-194.
  70. Jackson, R. G., Rylott, E. L., Fournier, D., Hawari, J., y Bruce, N. C. (2007). Exploring the biochemical properties and remediation applications of the unusual explosive-degrading P450 system XplA/B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 16822-16827.
  71. Jones, K. H., Trudgill, P. W., & Hopper, D. J. (1993). Metabolism of p-cresol by the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 1125-1130.
  72. Kapoor, R. T., Salvadori, M. R., Rafatullah, M., Siddiqui, M. R., Khan, M. A., & Alshareef, S. A. (2021). Exploration of Microbial Factories for Synthesis of Nanoparticles—A Sustainable Approach for Bioremediation of Environmental Contaminants. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1404.
  73. Karavangeli, M., Labrou, N. E., Clonis, Y. D., & Tsaftaris, A. (2005). Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomolecular engineering*, 22(4), 121-128.
  74. Kathiresan, K. (2003). Polythene and plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Revista de biologia tropical*, 51(3-4), 629-633.
  75. Kennes, C., y Lema, J. M. (1994a). Degradation of major compounds of creosotes (PAH and phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, 16(7), 759-764.
  76. Kennes, C., y Lema, J. M. (1994b). Degradation of major compounds of creosotes (PAH and phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, 16(7), 759-764.

77. Kim, S. K. (Ed.). (2015). Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances. Academic Press.
78. Kumar, D., y Gaur, J. P. (2011). Metal biosorption by two cyanobacterial mats in relation to pH, biomass concentration, pretreatment, and reuse. *Bioresource technology*, 102(3), 2529-2535.
79. Kumar, K., Banerjee, D., & Das, D. (2014). Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource technology*, 152, 225-233.
80. Kumar, N. M., Muthukumaran, C., Sharmila, G., & Gurunathan, B. (2018). Genetically modified organisms and its impact on the enhancement of bioremediation. In *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management* (pp. 53-76). Springer, Singapore.
81. Kumar, R., Sharma, A. K., & Ahluwalia, S. S. (Eds.). (2017). *Advances in Environmental Biotechnology*. Springer Singapore.
82. Kurumata, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Ramos, J. L., Nepovim, A., Vanek, T., ... y Morikawa, H. (2005). Tolerance to, and uptake and degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(3-4), 272-278.
83. Leahy, J.G., and Colwell, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54, 305–315.
84. Lindley N. D, Heydeman MT (1986). The uptake on n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus *Cladosporium resinae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:384–388
85. Lindley N. D, Pedley J. F, Kay S. P, Heydeman M. T (1986b). The metabolism of yeasts and filamentous fungi which degrade hydrocarbon fuels. *International Biodeterioration Bulletin* 22, 28 1-390.
86. Mandal, S., y Rath, J. (2014). *Extremophilic cyanobacteria for novel drug development*. Springer.
87. Massa, V., Infantino, A., Radice, F., Orlandi, V., Tavecchio, F., Giudici, R., ... & Barbieri, P. (2009). Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 112-115.
88. Masarovičová, E., & Král'ová, K. (2018). Woody species in phytoremediation applications for contaminated soils. In *Phytoremediation* (pp. 319-373). Springer, Cham.
89. McKinney, R. E. (2004). *Environmental pollution control microbiology: a fifty-year perspective*. CRC Press.

90. Mehta, S. K., y Gaur, J. P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 25(3), 113-152.
91. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., ... & Wattiez, R. (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 385-410.
92. Middelhoven, W. J., Scorzetti, G., y Fell, J. W. (1999). *Trichosporon guehoae* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *Canadian journal of microbiology*, 45(8), 686-690.
93. Middelhoven, W. J., Scorzetti, G., y Fell, J. W. (2000). *Trichosporon veenhuisii* sp. nov., an alkane-assimilating anamorphic basidiomycetous yeast. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 381-387.
94. Milstein, O., Vered, Y., Shragina, L., Gressel, J., Flowers, H. M., y Hüttermann, A. (1983). Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. *Archives of microbiology*, 135(2), 147-154.
95. Mirghaffari, N., Moeini, E., y Farhadian, O. (2015). Biosorption of Cd and Pb ions from aqueous solutions by biomass of the green microalga, *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of applied phycology*, 27(1), 311-320.
96. Monteiro, C. M., Castro, P. M., y Malcata, F. X. (2011). Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Chemistry Letters*, 9(2), 169-176.
97. Moore, D., Robson, G. D., y Trinci, A. P. (2020). *21st century guidebook to fungi*. Cambridge University Press.
98. Moraga, N. B., Amoroso, M. J., y Rajal, V. B. (2013). *Streptomyces* from soils contaminated with boron compounds. *Actinobacteria. Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes*; Amoroso, MJ, Benimeli, CS, Cuozzo, SA, Eds, 136-164.
99. Naik, M. M., y Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and bio-monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1-7.
100. National Research Council. (2007). *Earth materials and health: Research priorities for earth science and public health*. National Academies Press.
101. Neujahr, H. Y., y Varga, J. M. (1970). Degradation of phenols by intact cells and cell-free preparations of *Trichosporon cutaneum*. *Europe-*

- an journal of biochemistry, 13(1), 37-44.
102. Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebusoye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., y Amund, O. O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1615-1623.
  103. Ollivier B, Alazard D. (2010). The oil reservoir ecosystem. In: Timmis KN (ed.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Heidelberg, pp 2261–2269
  104. Orandi, S., y Lewis, D. M. (2013). Synthesising acid mine drainage to maintain and exploit indigenous mining micro-algae and microbial assemblies for biotreatment investigations. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 950-956.
  105. Patel, K. B., & Thakker, J. N. (2019). Growth promotion and biocontrol activity of *Nocardiosis dassonvillei* strain YM12: an isolate from coastal agricultural land of Khambhat. *Vegetos*, 32(4), 571-582.
  106. Parales, R. E., y Ditty, J. L. (2005). Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Current opinion in biotechnology*, 16(3), 315-325.
  107. Parra, A. L. R., y Villanueva, R. O. C. (2013). Bioremediacion de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 71-79.
  108. Pathak, J., Maurya, P. K., Singh, S. P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2018). Cyanobacterial farming for environment friendly sustainable agriculture practices: innovations and perspectives. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 7.
  109. Peelen, S., Rietjens, I. M., Boersma, M. G., y Vervoort, J. (1995). Conversion of phenol derivatives to hydroxylated products by phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*: A comparison of regioselectivity and rate of conversion with calculated molecular orbital substrate characteristics. *European journal of biochemistry*, 227(1□2), 284-291.
  110. Peh, K. L., Kadir, J., Othman, R., y Ting, A. S. Y. (2011). Fungal species from compost of oil palm Empty Fruit Bunches (EFB) and their lignin-degrading potential. In *Proceedings of the International Congress of the Malaysian Society for Microbiology*, Penang, December 8–11, 2011, Malaysia (pp. 61-64).
  111. Pereira, L., y Neto, J. M. (Eds.). (2014). *Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press.



112. Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Sahraoui A, L. H., & Sancholle, M. (2000). Degradation of benzo [a] pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 21(1/4), 311-330.
113. Ramos, J. L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O’Gara, F., ... & Timmis, K. N. (1994). The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology*, 12(12), 1349-1356.
114. Ravatn, R., Zehnder, A. J., y van der Meer, J. R. (1998). Low-Frequency Horizontal Transfer of an Element Containing the Chlorocatechol Degradation Genes from *Pseudomonas* sp. Strain B13 to *Pseudomonas putida*F1 and to Indigenous Bacteria in Laboratory-Scale Activated-Sludge Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2126-2132.
115. Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., & Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *science*, 326(5949), 123-125.
116. Rawat, I., Gupta, S. K., Shrivastav, A., Singh, P., Kumari, S., & Bux, F. (2016). Microalgae applications in wastewater treatment. In *Algae Biotechnology* (pp. 249-268). Springer, Cham.
117. Rice, C. W. (2006). Introduction to special section on greenhouse gases and carbon sequestration in agriculture and forestry. *Journal of Environmental Quality*, 35(4), 1338.
118. Richardson, C. J., y Vymazal, J. (2001). Sampling macrophytes in wetlands. In *Bioassessment and management of North American freshwater wetlands* (pp. 297-337). John Wiley and Sons New York.
119. Rodrigues, M. L., & Nosanchuk, J. D. (2020). Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(2), e0007964.
120. Ronchel, M. C., Ramos, C., Jensen, L. B., Molin, S., & Ramos, J. L. (1995). Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2990-2994.
121. Rovira, A. D. (1974). *Biology of the rhizosphere. The plant root and its environment*, 153-204.
122. Saad, I., Castillo, J. I., y Rebolledo, D. (2009). Fitorremediación: estudio de inteligencia tecnológica competitiva. In *Memorias del 4 Congreso Internacional de Sistemas de Innovación para la Competitividad: Hacia la Inteligencia Competitiva*. León, Guanajuato, México.

123. Sánchez, O., Diestra, E., Esteve, I., y Mas, J. (2005). Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microbial ecology*, 50(4), 580-588.
124. Saxena, G., Kishor, R., y Bharagava, R. N. (2020). *Bioremediation of industrial waste for environmental safety*. Springer Singapore.
125. Sayler, G. S., y Ripp, S. (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 286-289.
126. Schink, B. (2005). Syntrophic associations in methanogenic degradation. In *Molecular basis of symbiosis* (pp. 1-19). Springer, Berlin, Heidelberg.
127. Schloss, P. D., y Handelsman, J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 686-691.
128. Schnoor, J. L., Light, L. A., McCutcheon, S. C., Wolfe, N. L., y Carreira, L. H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental science & technology*, 29(7), 318A-323A.
129. Schwab A.P, Banks MK (1994) *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. In: Anderson T, Coats J (editors) *American Chemical Society Symposium Series*, p 132
130. Scow, K. M., Li, D., Manilal, V. B., y Alexander, M. (1990). Mineralization of organic compounds at low concentrations by filamentous fungi. *Mycological research*, 94(6), 793-798.
131. Shah, S. A. A., Akhter, N., Auckloo, B. N., Khan, I., Lu, Y., Wang, K., ... & Guo, Y. W. (2017). Structural diversity, biological properties and applications of natural products from cyanobacteria. A review. *Marine drugs*, 15(11), 354.
132. Sietmann, R., Hammer, E., Specht, M., Cerniglia, C. E., y Schauer, F. (2001). Novel ring cleavage products in the biotransformation of biphenyl by the yeast *Trichosporon mucoides*. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 4158-4165.
133. Silva, C. F., Azevedo, R. S., Braga, C., Silva, R. D., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2009). Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 590-600.
134. Singh, A., & Saini, P. (2020). Biosorption: A Novel Biotechnological Application for Removal of Hazardous Pollutants. In *Innovations in Food Technology* (pp. 341-360). Springer, Singapore.
135. Singh, J. S., Abhilash, P. C., Singh, H. B., Singh, R. P., y Singh, D. P.

- (2011). Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene*, 480(1-2), 1-9.
136. Singh, S. N., Kumari, B., & Mishra, S. (2012). Microbial degradation of alkanes. In *Microbial degradation of xenobiotics* (pp. 439-469). Springer, Berlin, Heidelberg.
137. Skaare, B. B., Kihle, J., & Torsvik, T. (2011). Biodegradation of crude oil as potential source of organic acids in produced water. *Produced Water*, 115-126.
138. Sriprang, R., Hayashi, M., Ono, H., Takagi, M., Hirata, K., y Murooka, Y. (2003). Enhanced accumulation of Cd<sup>2+</sup> by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1791-1796.
139. Srivastava, A. K., Rai, A. N., & Neilan, B. A. (Eds.). (2013). *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. CRC Press.
140. Srivastava, S., & Kumar, M. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A sustainable approach. In *Sustainable Green Technologies for Environmental Management* (pp. 111-139). Springer, Singapore.
141. Tashyrev, O. B., Pidgorskyi, V. S., Toro, M. N., Gualoto, M., Gladka, G. V., Tashyreva, H. O., ... & Romanovskaya, V. A. (2014). Autecology of microorganisms of typical Ecuador biotopes. *Мікробіологічний журнал*, (76, № 6), 2.
142. Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., y Schroeder, J. I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4991-4996.
143. Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., ...y Morra, M. J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2161-2171.
144. Tortella, G. R., Diez, M. C., & Durán, N. (2005). Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical reviews in microbiology*, 31(4), 197-212.
145. Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., y Watanabe, K. (2005). Sub-

- strate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature biotechnology*, 23(1), 88-93.
146. Urrutia, M. M. (1997). General bacterial sorption processes. *Biosorbents for metal ions*, 39-66.
  147. Vaze, V. K. (2017). Biodegradation of pesticide cypermethrin by phosphatase and esterase enzymes produced by actinomycetes. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(2), 445-448.
  148. Wang, K. S., Huang, L. C., Lee, H. S., Chen, P. Y., y Chang, S. H. (2008). Phytoextraction of cadmium by *Ipomoea aquatica* (water spinach) in hydroponic solution: effects of cadmium speciation. *Chemosphere*, 72(4), 666-672.
  149. Wang, L., Samac, D. A., Shapir, N., Wackett, L. P., Vance, C. P., Olszewski, N. E., y Sadowsky, M. J. (2005). Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene. *Plant Biotechnology Journal*, 3(5), 475-486.
  150. Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 237-241.
  151. Watanabe, K., y Hamamura, N. (2003). Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 289-295.
  152. Watanabe, K., Yamamoto, S., Hino, S., y Harayama, S. (1998). Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1203-1209.
  153. Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1209-1221.
  154. Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. gulf professional publishing.
  155. White, C. and Gadd, G.M., (1998). Accumulation and effects of cadmium on sulfate reducing bacterial biofilms, *Microbiology*.1998.144, 1407.
  156. White, C., Dennis, J. S., y Gadd, G. M. (2003). A mathematical process model for cadmium precipitation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *Biodegradation*, 14(2), 139-151.
  157. Whitton Brian A. Editor. *Ecology of Cyanobacteria II Their Diversity in Space and Time*. Springer Science Media B.V. 2012. Pp. 25

158. Whitton, B. A. (Ed.). (2012). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Springer Science & Business Media.
159. Widdel, F. (2015). Cultivation of anaerobic microorganisms with hydrocarbons as growth substrates. In Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols (pp. 131-142). Springer, Berlin, Heidelberg.
160. Widdel, F, y Grundmann, O. (2010). Biochemistry of the anaerobic degradation of non-methane alkanes. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.
161. Wilson, A. R., Lion, L. W., Nelson, Y. M., Shuler, M. L., y Ghiorse, W. C. (2001). The effects of pH and surface composition on Pb adsorption to natural freshwater biofilms. Environmental science & technology, 35(15), 3182-3189.
162. Wiseman, A. L. A. N., Gondal, J. A., y Sims, P. A. U. L. (1975). 4'hydroxylation of biphenyl by yeast containing cytochrome P-450: radiation and thermal stability, comparisons with liver enzyme (oxidized and reduced forms).[Gamma radiation]. Biochem. Soc. Trans.:(United Kingdom), 3(2).
163. Yadav, J. S., Doddapaneni, H., y Subramanian, V. (2006). P450ome of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters.
164. Yamamoto, T., Goto, I., Kawaguchi, O., Minagawa, K., Ariyoshi, E., y Matsuda, O. (2008). Phytoremediation of shallow organically enriched marine sediments using benthic microalgae. Marine pollution bulletin, 57(1-5), 108-115.
165. Yang, Y., Dou, Y., Huang, Y., & An, S. (2017). Links between soil fungal diversity and plant and soil properties on the Loess Plateau. Frontiers in microbiology, 8, 2198.
166. Yang, C., Xu, L., Yan, L., & Xu, Y. (2010). Construction of a genetically engineered microorganism with high tolerance to arsenite and strong arsenite oxidative ability. Journal of Environmental Science and Health Part A, 45(6), 740-745.
167. Yateem, A., Balba, M. T., Al-Awadhi, N., & El-Nawawy, A. S. (1998). White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. Environment International, 24(1-2), 181-187.
168. Yusri, A., Mat, R. A., Mohammed, O., Azizah, H., Tamikazu, K., & Shoji, H. (1998). Biodegradation of oil palm empty fruit bunch by composite micro-organisms. Jurnal Sains Nuklear Malaysia, 16(1), 91-105.
169. Zhou, H. C., Long, J. R., y Yaghi, O. M. (2012). Introduction to metal-

- organic frameworks. *Chemical reviews*, 112(2), 673-674.
170. Zhu, Q., Wu, L., Li, G., Li, X., Zhao, C., Du, C., ... & Zhang, L. (2021). A novel of transforming wastewater pollution into resources for desertification control by sand-consolidating cyanobacteria, *Scytonema javanicum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(11), 13861-13872.
171. Zhu, Y. L. (1999). Overexpression of glutathione synthetase in *Brassica juncea* enhances cadmium tolerance and accumulation. *Plant Physiol.*, 119, 73-79.
172. Zinta, G., Mousa, A. S., & Hozzein, W. N. (2020). Actinomycetes Enrich Soil Rhizosphere and Improve Seed Quality as well as Productivity of Legumes by Boosting Nitrogen Availability and Metabolism.



# • CAPÍTULO IV •

**METODOLOGÍAS DE TRATAMIENTO**

## CAPÍTULO IV

### METODOLOGÍAS DE TRATAMIENTO

La biorremediación como biotecnología, dispone de varias metodologías de tratamiento cada una de las cuales presenta ventajas y desventajas operativas, variación de costos y eficiencia relativa para el tratamiento de uno u otro residuo específico.

El presente capítulo hará una descripción detallada de las características de cada una de las metodologías analizadas, describirá las condiciones necesarias para que la metodología muestre eficiencia. Entre las metodologías analizadas, están: Compostaje (y sus variantes), Landfarming (y sus variantes), Bioventing, Bioflushing, Fitorremediación, biorreactores (aeróbicos y anaeróbicos).

#### 4.1. Compostaje

Esta metodología de Biorremediación se realiza en camas (surcos) o pilas, donde los residuos a tratar (suelos), se mezclan con nutrientes (abono orgánico o mineral), microorganismos aislados *in situ* y apropiados para la degradación de residuos específicos.

Las pilas son mezcladas periódicamente en forma manual o mecanizada, según corresponda al tipo de contaminante, cantidad y condiciones ambientales, paralelamente al volteo, se realizan trabajos de humectación, aportación adicional de nutrientes (Bioestimulación) e inyección de microorganismos (bioaumentación). Las pilas pueden ser estáticas o venteadas. Las pilas estáticas disponen de tubos de ventilación para disipar el excedente de calor generado por la degradación, ubicados en posición vertical sobre la pila (figura 4.2)

Se cree que la práctica de convertir el estiércol y otros residuos biodegradables para el compost que se originó ya en la agricultura (Fitzpatrick et al., 2005). La primera referencia escrita conocida de compostaje se encuentra en tablillas de arcilla que datan del imperio acadio, hace unos 4.300 años (Rodale et al., 1960), pero se cree que el valor fertilizante de la materia



orgánica aeróbicamente degradada, que ahora llamamos el compost, fue reconocido mucho antes.

Hay evidencia de que los romanos, griegos y los Bani Israel sabía de compost. La Biblia y el Talmud ambos contienen numerosas referencias al uso de la paja del estiércol descompuesto, y la mención del compost se produce en los estudiantes de 10<sup>o</sup> y escritos del siglo 12 árabes, en los textos de la Iglesia medieval, y en la literatura renacentista (Smith et al., 2007).

En los términos más amplios, sistemas de compostaje se dividen en dos categorías: los sistemas de “total o parcialmente abiertos al aire” y los sistemas “en vasos”. En la primera categoría son los sistemas que se usan desde la prehistoria hasta la actualidad como la hilera, pila estática y sistemas domésticos. En la segunda categoría se incluyen los sistemas de “túnel”, y otros, o sistemas de “reactores” “en vasos” de varios diseños. Dependiendo de la cantidad y ubicación, del sustrato, se emplea la maquinaria disponible, se define la escala de operación en uno u otro sistema de compostaje.

Otra forma de clasificar el sistema de compostaje es sobre la base de los medios de aireación: la agitación o la estática (Tchobanoglous et al., 1993). En el primero, el material a compostar se agita mecánicamente para introducir oxígeno, controlar la temperatura y mezclar el material. En el segundo, el sustrato permanece estático y se sopla aire a través de él.

Para la biorremediación de contaminantes peligrosos como los hidrocarburos y derivados mediante compostaje, con frecuencia se debe construir plataformas de hormigón (si se trata de áreas de tratamiento continuo), que disponen de canales que recogen los lixiviados generados. Una alternativa más barata, es la disposición de un liner (geomembrana), o una capa de arcilla compactada que evite la migración de los lixiviados al nivel freático.

Las dimensiones de las pilas de compostaje dependen de:

- La cantidad de materiales disponibles a tratar.
- El espacio disponible para el tratamiento.
- Estructura y propiedades fisicoquímicas de los residuos.
- Tipo de residuo y grado de humedad.

Las dimensiones tipo de una pila de compostaje son: Ancho (A) 3m., altura (h) 1,5m., longitud (l) de 5 a n metros. La longitud es variable, con frecuencia las pilas son de 100 m y más. Estas medidas son sugeridas para pilas con volteo manual o con ayuda de un volteador mecánico (Figura 4.1.) Las dimensiones pueden ser distintas para pilas estáticas con ventilación forzada, según recomendaciones de la US EPA, las dimensiones de pilas empleadas para el tratamiento de residuos hidrocarburíferos es de 12,5 x 18,3 m con una altura que va desde 1,43 a 1,76 m.

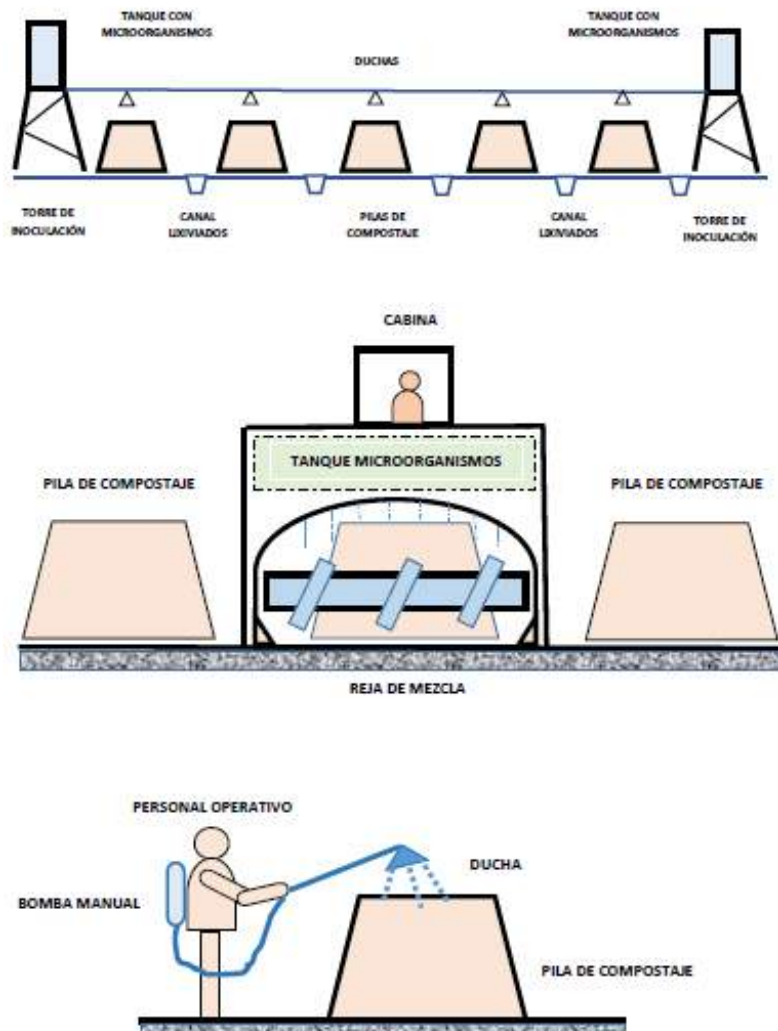
Para garantizar el libre flujo de los lixiviados, en las pilas se estila dotar a la base de una pendiente de 1%. Todos los canales de recolección de lixiviados deben estar conectados a un tanque de almacenamiento de hormigón, a partir del cual, los lixiviados pueden ser bombeados hasta el sistema de tratamiento convencional (químico). Adicionalmente se recomienda la construcción de una berma perimetral en el área dedicada al emplazamiento de Biopilas, que delimite el acceso y garantice la seguridad de los espacios circundantes (Biopile design and construction manual, 1996).

**La adición de nutrientes** (Bioestimulación): durante el compostaje es importante para el desarrollo de los microorganismos, la relación típica de nutrientes según Davis et al., 1995, es de 100:10:1 a 100:10:0.5 de C: N: P. Los nutrientes pueden ser adicionados al inicio durante la conformación de las Biopilas o posteriormente diluidos durante la humectación de las pilas. Con frecuencia los nutrientes se lavan juntamente con los lixiviados, por esta razón se recomienda su recirculación en las pilas de compostaje.

Para mejorar y estimular los procesos degradativos, al sistema se puede adicionar cosustratos, como acetato, etanol, glicerol, glucosa y citrato, para estimular una tasa de crecimiento microbiano adecuada. De igual forma se deben incluir fuentes solubles de microelementos, indispensables para el funcionamiento de los sistemas fermentativos microbianos involucrados en la degradación de contaminantes.

Si la adición de nutrientes se ejecuta por tubería (ducha), es recomendable no emplear el mismo sistema para la introducción microorganismos, para evitar la formación de biopelícula en la tubería, que se vería taponada por su desarrollo.

**Adición de microorganismos (bioaumentación):** Con frecuencia el número de microorganismos degradadores presentes en los residuos es bajo, razón por la que se hace necesario su multiplicación en medios nutritivos en condiciones de laboratorio para su reintroducción en las pilas de compostaje, especial atención reviste la introducción de hongos lignolíticos (hongos de podredumbre blanca), especializados en la degradación de compuestos recalcitrantes como los HAPs; en todo caso los microorganismos introducidos deben ser indígenas. Con frecuencia para adicionar los microorganismos a las pilas se recurre, a las siguientes técnicas: Duchas, mezcladora, inyección manual y mediante portadores de naturaleza lignocelulósica (Figura 4.1)



**Figura 4.1.** Métodos de introducción de microorganismos en las pilas de compostaje

**Preparación de la mezcla:** Los suelos contaminados suelen presentar diferentes características fisicoquímicas que dependen del tipo de suelos, grado de hidratación, tamaño de partícula y contenido de materia orgánica. Con frecuencia para adecuar los suelos sujetos a tratamiento se deben realizar trabajos de:

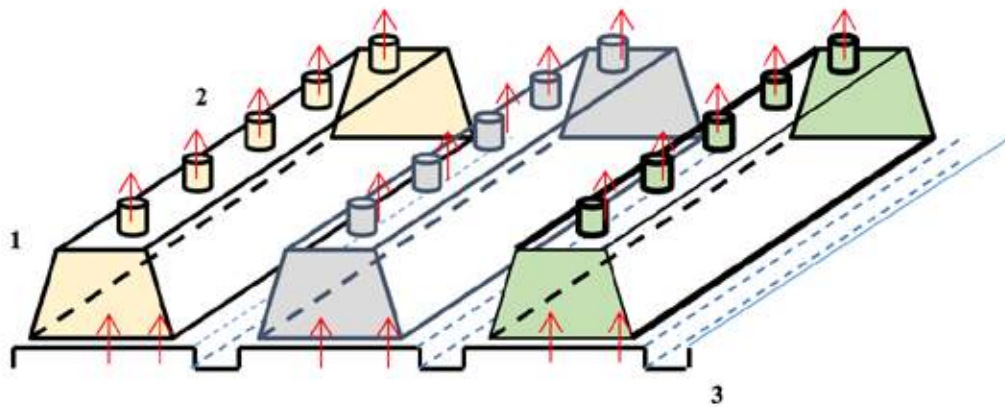
- Retiro de piedras, restos vegetales grandes y basura de distinta naturaleza
- Cambio de las propiedades mecánicas del suelo: grado de humedad, porosidad, estructura. Esto se consigue con la ayuda de tamices moleculares y materiales generadores de poro.
- Reducir la concentración de contaminantes (para reducir la toxicidad de estos para los microorganismos).
- Control de emisiones gaseosas.
- Homogenizar la distribución de los contaminantes (mediante mezcla profusa)
- Adición de nutrientes y microorganismos, mediante irrigación.

Estas actividades requieren de la disponibilidad de espacios operativos adecuados y de maquinaria que facilite su ejecución (Figura 4.3).

### 4.1.1. Pila estática

Se considera que este sistema es muy apropiado, el análisis coste/eficacia de dicho sistema comparado con otros como aireación forzada o pilas con volteo. Para favorecer la ventilación natural de la pila, se emplea en la base material poroso (grava, cascajo), que permite el flujo del aire desde abajo hacia arriba, la salida de lixiviados, hasta los canales perimetrales impermeabilizados. En la parte superior se colocan tubos de evacuación para disipar el exceso de calor que se genera en las pilas de compostaje, adicionalmente para humectar las pilas y adicionar nutrientes.

Las pilas son ventiladas por convección natural (Figura 4.2). El aire caliente que sube desde el centro de la pila crea un vacío parcial que aspira el aire de los lados. La forma y tamaño óptimo de la pila depende del tamaño de partícula, contenido de humedad, porosidad y nivel de descomposición, todo lo cual afecta el movimiento del aire hacia el centro de la pila.



**Figura 4.2.** Sistema de Pila estática. 1.- Pila estática, 2.- Tubos de ventilación, 3.- Plataforma con canales para lixiviados.

*Esquema elaborado por el autor*

El compostaje en pilas simples es un proceso muy versátil y con escasas complicaciones. Se ha usado con éxito para compostar estiércol, restos de poda, fangos y residuos sólidos urbanos. El proceso logra buenos resultados con una amplia variedad de residuos orgánicos y funciona satisfactoriamente mientras se mantienen las condiciones aerobias y el contenido de humedad. Las operaciones de compostaje pueden continuar durante el invierno, pero se ralentizan como resultado del frío. Una alternativa para estos casos es, la cobertura de las pilas con material plástico, que aíslen al material en compostaje de las lluvias y conserve la temperatura.

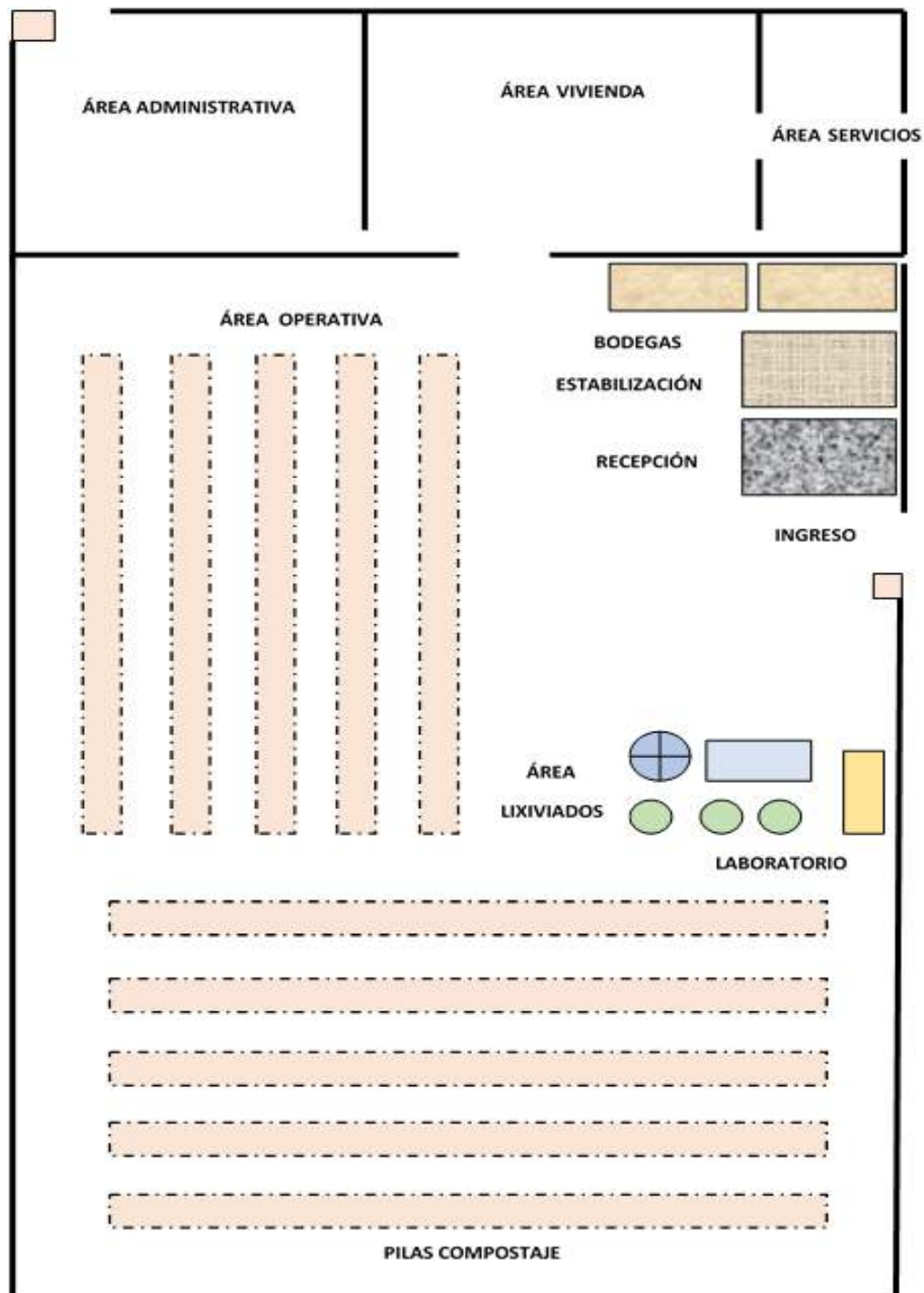


Figura 4.3. Áreas operativas para el compostaje

A.- Área administrativa: Guardianía, patio de reuniones, QHSE, Oficinas, parqueadero y servicio médico. Paso al área B.

B.- Área de servicios: B1: Camper vivienda, Camper comedor, Camper baños, duchas y lavandería. B2: Planta de agua potable, Planta de genera-

ción de energía, Planta de tratamiento de aguas residuales y gestión de RSU. Paso al área C.

C.- Área Operativa: Plataformas de Compostaje, Bodega de materiales y herramientas, plataforma de mezcla y estabilización, plataforma de recepción y deshidratación, Parqueadero de maquinarias, Taller de mantenimiento y reparación, Planta de tratamiento de lixiviados, entrada y salida de materiales y maquinaria, báscula, control de entrada (guardianía).

Para evitar el proceso natural de compactación de los residuos en tratamiento y la generación de condiciones anaeróbicas indeseables, se recomienda acondicionar a los residuos con material esponjoso que genere poros, tales como materia orgánica de rechazo, aserrín, cascarilla de arroz, residuos de cultivos (leñosos).

#### **4.1.2. Pila venteada**

Estos sistemas permiten tener un mayor control de la concentración de oxígeno y mantenerla en un intervalo apropiado (15-20 %) para favorecer la actividad metabólica de los microorganismos aerobios que desarrollan el proceso.

Una vez que se construye la pila, no se toca, hasta que la etapa activa de compostaje sea completa. El aporte de oxígeno se realiza por vía de bombeo forzado o insuflado, en forma continua, o a intervalos o ligados a un termostato que, cuando la temperatura del sistema alcanza determinada temperatura (aprox. 60°C) acciona el mecanismo de inyección de aire hasta que la temperatura desciende hasta el valor deseado. El aire procedente de un compresor ingresa por un sistema de tuberías perforadas distribuidas en el interior de la pila. Estas pilas no se someten a volteo, pero si a humectación, adición de nutrientes y microorganismos a través de tubo de ventilación colocados en la parte superior de la pila (Figura 4.4 y 4.5).

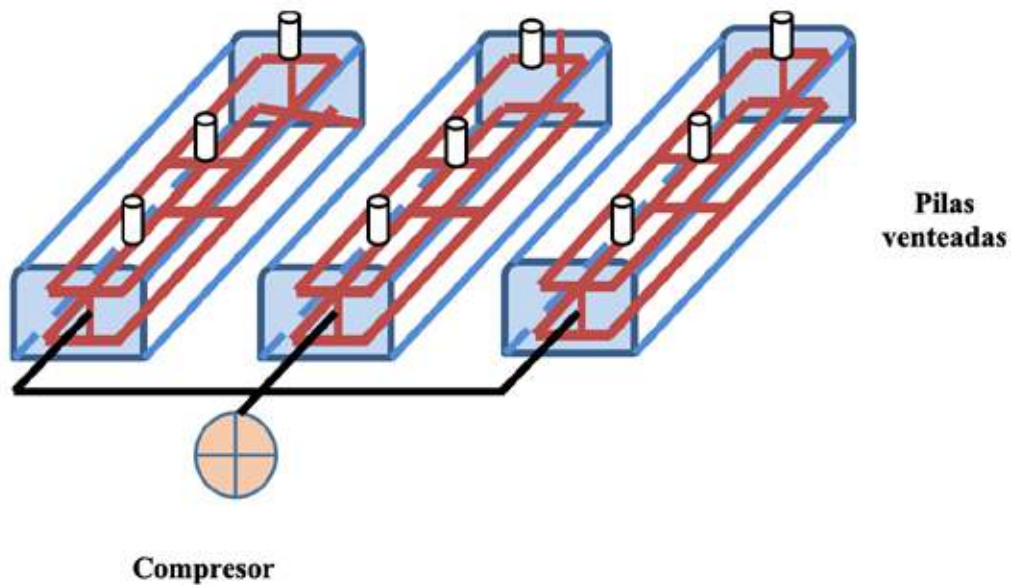


Figura 4.4. Pilas ventiladas de compostaje

Línea roja: tubería perforada de distribución de aire

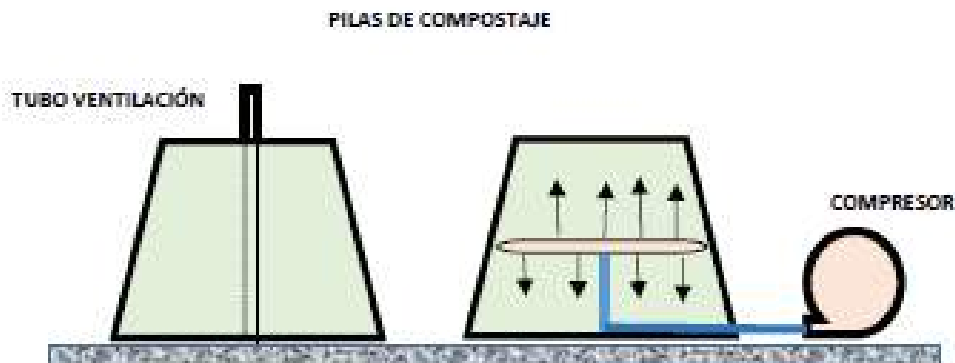
Línea negra: tubería de conducción de aire desde el compresor a las pilas

La cobertura de las pilas es fundamental por las siguientes razones:

- Retención de calor
- Retención de la mezcla (acción del viento)
- Previene la hidratación excesiva por acción de las lluvias.
- Previene la pérdida de calor por acción del viento
- Impide la compactación

El área de compostaje dispone de canales perimetrales impermeabilizados para la recolección de lixiviados generados en el proceso de biodegradación, de igual forma el piso debe ser de hormigón o a su vez debe ser impermeabilizado con geomembrana, o arcilla compactada, sellada con bentonita.





**Figura 4.5.** Pilas venteadas por convección y bombeo

Esquema elaborado por el autor

### 4.1.3. Pilas con volteo

Es uno de los sistemas más sencillos y económicos. Esta técnica de compostaje se caracteriza por el hecho de que la pila se remueve periódicamente para homogeneizar la mezcla y su temperatura, a fin de eliminar el excesivo calor, controlar la humedad y aumentar la porosidad de la pila para mejorar la ventilación. Después de cada volteo, la temperatura desciende del orden de 5 o 10 °C, volviendo a subir si el proceso no ha terminado.

La frecuencia del volteo depende del tipo de material, de la humedad y de la rapidez con que deseamos realizar el proceso, siendo habitual realizar un volteo cada 6 - 10 días. Normalmente se realizan controles automáticos de temperatura, humedad y oxígeno para determinar el momento óptimo para efectuar el volteo. Es muy usual que los volteos se lleven a cabo con una simple pala cargadora, recogiendo y soltando del material para posteriormente reconstruir la pila, tal y como se muestra en las figuras 4.6. y 4.7. Sin embargo, para materializar esta técnica de compostaje, existe maquinaria específicamente diseñada para conseguir un mezclado del compost de máxima eficiencia (Figura 4.7).

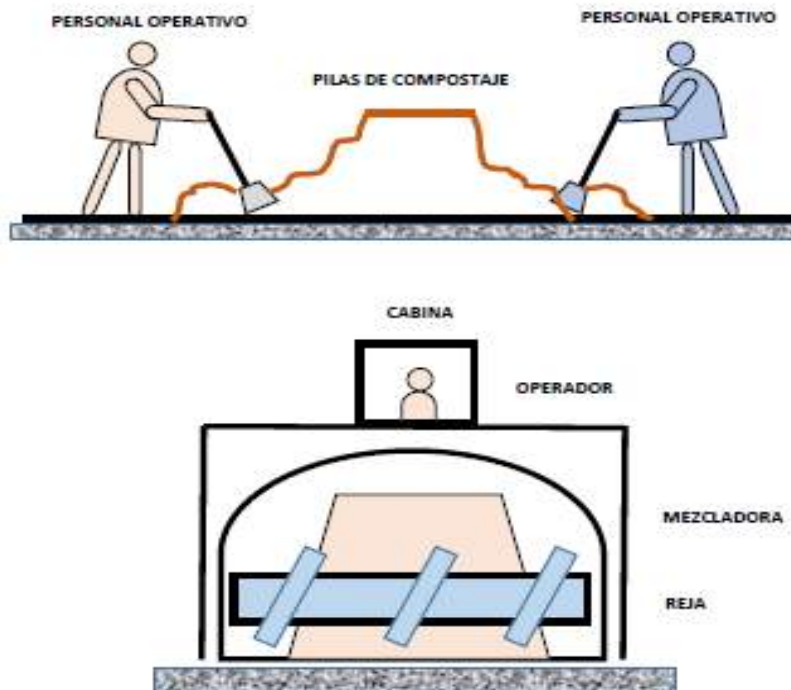
En las pilas estáticas, ya sea con volteo o sin él, cobra gran importancia el tamaño de las pilas, por un lado, para permitir una correcta aireación y por otro para que no haya excesivas pérdidas de calor.



A

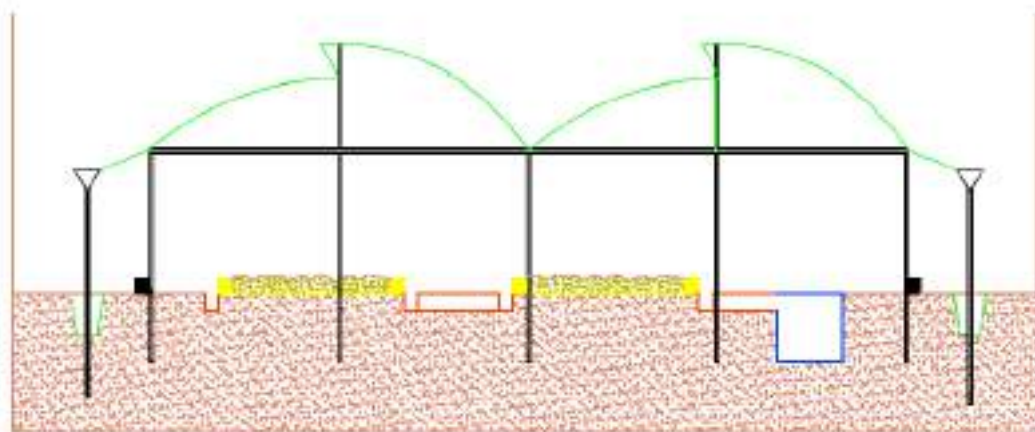
B

**Figura. 4.6.** Pilas de compostaje de materia orgánica, con volteo. a) pilas terminadas, b) mezcla de materiales en la pila



**Figura. 4.7.** Volteo mecánico y manual de pila de compostaje

Para trabajo a gran escala en condiciones de campo se puede recurrir a volteo mecánico empleando maquinaria especializada que reduce el uso de mano de obra, mejora localidad del volteo (mezcla), y reduce los tiempos empleados en el volteo, lo que se revierte en el costo del tratamiento.



**Figura 4.8.** Esquema de plataformas de compostaje cubierto  
Elaborado por Danny Reascos y Pablo Molina

#### 4.1.4. Compostaje anaeróbico

Los métodos de compostaje anaeróbico comúnmente utilizados incluyen el compostaje de zanja o pozo y el compostaje de bolsa. El compostaje de pozo requiere que se cave un hoyo en la tierra para depositar la basura orgánica; cava un hoyo circular pequeño si sólo tienes una pequeña cantidad de residuos, pero sigue con una zanja larga y estrecha si necesitas deshacerte de una gran cantidad de materiales orgánicos. Luego de depositar los residuos en el hoyo del compostaje, deben ser humectados con agua corriente y cubiertos con 10 a 20 cm., de tierra para generar las condiciones anaeróbicas necesarias.

En caso de tratar anaeróbicamente residuos tóxicos, peligrosos que se degradan vía anaeróbica, como el hexano, tolueno, naftaleno entre otros hidrocarburos aromáticos, el canal o fosa deben impermeabilizarse por completo y ser sellados herméticamente para garantizar las condiciones ideales anaeróbicas y evitar la lixiviación de los contaminantes fuera del área de tratamiento.

Como todo sistema anaeróbico, generan gases que representan un riesgo ambiental, tales como el metano (Figura 4.9.), amoníaco, gas sulfhídrico, monóxidos de carbono y mercaptanos; todos estos deben ser captados y tratados para evitar su eliminación a la atmósfera.

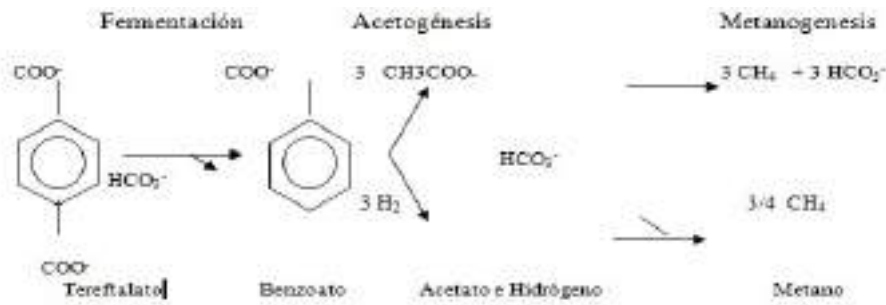


Figura 4.9. Reacciones de degradación anaeróbica

Los métodos anaeróbicos de compostaje funcionan especialmente bien cuando no se quiere invertir mucho tiempo o esfuerzo en el proceso. A diferencia del compostaje aeróbico, que exige la aireación y mantenimiento regular de la humedad, el compostaje anaeróbico requiere solamente la preparación del lecho del compost. Para los residuos orgánicos domésticos sirve como un primer método de compostaje que elimina la biomasa maloliente en forma eficiente.

Según Widdel y Rabus (2001), la secuencia de reacciones en la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos es la siguiente:

- A. n-hexano → Succinato
- B. Tolueno/xileno → Benzilsuccinato
- C. 2- Metilnaftaleno → 2-Naftil metilsuccinato
- D. Etilbeneceno → 1-fenilsuccinato
- E. Etilbeneceno → 1. Feniletanol
- F. Nafataleno → 2. Naftoato

Estudios con cultivos puros de microorganismos anaerobios han mostrado la capacidad de estos para remover hidrocarburos monoaromáticos (HMA) y poliaromáticos (HAPs). Las enzimas microbianas involucradas en la degradación de los HAPs y HMA, como bencil succinato sintetasa, benzoil CoA ligasa y benzoil CoA reductasa, participan en la activación y reducción del anillo aromático (Villarreal et al., 2013). En la tabla 4.1, se muestran algunos microorganismos anaeróbicos y los sustratos sobre los cuales actúan.

Para el caso de compostaje anaeróbico de residuos hidrocarbúricos, los costos de generación de las condiciones anaeróbicas son elevados, requieren más tiempo que los métodos de compostaje aeróbico para descomponer completamente los residuos hasta compuestos inocuos, además que se deben incurrir en gastos sustanciales en la reposición de los accesorios corroídos por los gases generados.

**Tabla 4.1.** Sustancias y microorganismos involucrados en la degradación anaeróbica (Villareal et al; 2013).

Hidrocarburo contaminante	Concentración	Microorganismo	Eficiencia en %	Tiempo (días)	Referencia
Tolueno	0,5mM	Consorcio metanogénico ( <i>Desulfosporocinus sp.</i> )	99	200	Xin et al., 2012.
	0,0208-1,08mM	Consorcio bacteriano	99	13	Xin et al., 2012.
	0,217mM	Consorcio bacteriano	100	4	Chen et al., 2001
	0,04µM/l	Consorcio bacteriano ( $\delta$ -proteobacteria)	97,7	80	Kasai y col., 2001
	0,15 µM	Consorcio sulforeductor (clonaZ2Bs1.4)	100	21	Kleinsteu-ber, 2012
	60 µM	Consorcio sulfato reductor ( <i>Desulfosporosinus sp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> )	100	33	Morales, et al., 2014

<i>Benceno</i>	0,32mM	Cultivo sulfato-reductor (clona BznS295)	95	45	Xin et al., 2012.
	0,217mM	Consortio bacteriano	97	4	Chen et al., 2001
	35 µM	Consortio bacteriano ( <i>Pseudomonas</i> sp, δ- Proptobacterias)	71,4	90	Musat, y Widdel, 2008
	500 µM	Consortio bacteriano	99	23	Laban et al., 2009
	0,04 µM/l	Consortio bacteriano (δ- Proptobacterias)	67,4	80	Kasai y col., 2001
	0,23 µM	Consortio sulfato reductor (clona Z2Bs1.4.)	100	46	Kleinsteuber, 2012
<i>Naftaleno</i>	7,8 mM	Consortio bacteriano ( <i>Deltaprotobacteria</i> sp.)	62,82	60	Musat, y Widdel, 2008
	0,223mM	Consortio bacteriano	100	20	Morales, et al., 2014
<i>Fenantreno</i>	0,713mg/kg	Consortio bacteriano	9	30	Xin et al., 2012.
	7,5 mg/kg	Consortio bacteriano	93,3	240	Yanet al., 2012.
	0,6mM	Consortio bacteriano	60,7	21	Tsai, et al., 2009
<i>Pireno</i>	4mg/kg	Consortio sulfato reductor	75	240	Yanet al., 2012.
<i>Fluoreno</i>	0,061mM	Consortio sulfato reductor	74,5	21	Tsai, et al., 2009
	0,036mM	Consortio sulfato reductor	83,3	21	Kumar et al 1995

- **Bokashi**

El Bokashi es una forma de fermentación anaeróbica que utiliza un grupo específico de microorganismos para fermentar la materia orgánica, procedente de un producto terminado que puede ser digerida rápidamente por la biota del suelo. El proceso no requiere la mezcla de materiales verdes y marrones, no genera calor o gases de invernadero, todos los subproductos están contenidos dentro de un sistema cerrado por lo que los nutrientes no se pierdan. Esta metodología es adecuada para residuos orgánicos no tóxicos ni peligrosos, frecuentemente de origen doméstico, agroindustrial y pecuario.

Dado que el sistema es cerrado, el sistema no genera olores desagradables ni proliferación de vectores (insectos o roedores). Todas estas ventajas hacen del bokashi una buena opción para cuando no se cuenta con el espacio adecuado para un compostaje tradicional. La fermentación de la materia orgánica ocurre en un ambiente anaeróbico ácido durante un período determinado de tiempo utilizando un grupo específico de los microbios microorganismos indígenas beneficiosos, extraídos del medio silvestre, del aire, el suelo o mantillo (Footer, 2014).

Esta metodología se emplea para el procesamiento de materia orgánica de las actividades agropecuarias, en agricultura, para obtener una fuente barata y eficiente de nutrientes para los cultivos. En remediación ambiental, no se ha empleado; a no ser que se emplee el bokashi, en calidad de fuente de nutrientes (bioestimulación) en la degradación de contaminantes ambientales.

## 4.2. Landfarming

Es la técnica más usada para la Biorremediación de los lodos contaminados con hidrocarburos y de otros desechos de la industria petrolera. La gama de residuos que se pueden degradar mediante esta metodología es muy variada, siendo empleado para pesticidas, explosivos, colorantes, suelos contaminados, etc.

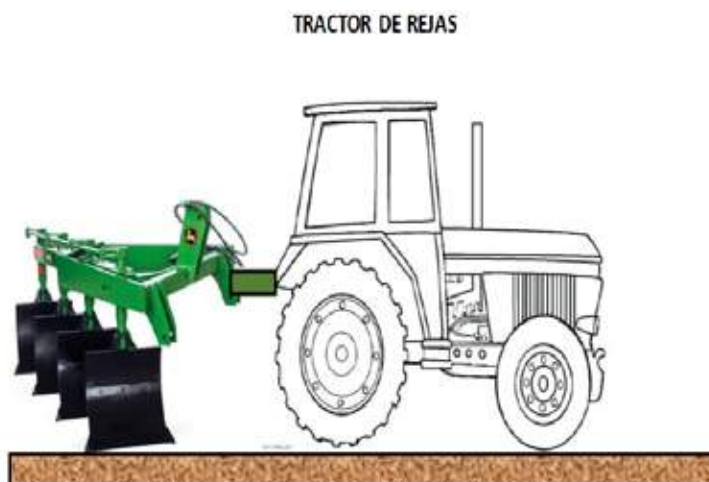
Landfarming consiste en tender los residuos a tratar, sobre el suelo, formando una capa fina cuyo espesor no supera la relación 1/3 de suelo natu-

ral; seguidamente con ayuda de un tractor de discos o rejas (Figuras 4.10 y 4.11), se realiza la mezcla (arado), procurando la formación de una mezcla lo más homogénea.



**Figura 4.10.** Arado mediante discos

Los residuos mezclados, se dejan reposar por un tiempo para su estabilización y se procede con la inoculación de nutrientes en forma de abono mineral (NPK) o de abono orgánico (compost o estiércol). La bioestimulación está dirigida a activar a los microorganismos presentes en el suelo de tratamiento. Solo en caso de no existir microorganismos adecuados, se recurre a adicionar (inocular) microorganismos degradadores para quienes previamente se estableció su cinética y condiciones óptimas de crecimiento, en pruebas de laboratorio.



**Figuras 4.11.** Arado mediante rejas



Al igual que con un cultivo, el suelo debe mezclarse (ararse periódicamente), para estimular su aireación y evitar la generación de condiciones anaerobias por compactación natural. Adicionalmente los residuos en tratamiento deben ser humedecidos hasta un nivel de humedad adecuada para garantizar la buena marcha del proceso de biodegradación. Este proceso se repite periódicamente hasta que los análisis de alícuotas del sistema de landfarming en tratamiento, muestren la reducción de la concentración de contaminantes hasta valores inferiores a los exigidos por la normativa ambiental del ramo vigente.

Existen variantes de este tratamiento; pudiendo ejecutarse en plataformas de hormigón cubiertas y en piscinas impermeabilizadas cubiertas de plantas especializadas de tratamiento de residuos.

#### **4.2.1. Requisitos para los sitios elegidos para Landfarming**

Los sitios escogidos para la ejecución de trabajos de landfarming deben cumplir con algunos requisitos que aseguren no solo el éxito, sino la seguridad de entorno inmediato al área de tratamiento. Muchas de las veces, en la práctica ambiental ecuatoriana, los trabajos de landfarming se han implementado en el mismo sitio del derrame o contaminación. Las razones que han motivado esta decisión principalmente son económicas y legales.

El transporte de los suelos contaminados hasta un sitio de tratamiento (instalaciones de una gestora ambiental calificada), son muy elevados; representan hasta el 50% de los costos de biorremediación. Por otro lado, las restricciones ambientales para la transportación encarecen y retardan sustancialmente el inicio de los trabajos de biorremediación.

El factor socio ambiental, es otro elemento delicado que dificulta la ejecución de trabajos de landfarming *in situ*; normalmente las comunidades se oponen a este tipo de trabajos alegando potenciales daños a sus ecosistemas y daños a la salud pública. Adicionalmente, los sitios afectados por procesos de contaminación ambiental con frecuencia no cumplen los requisitos exigidos para garantizar la seguridad de las operaciones, sin embargo, los intereses económicos de las empresas priman frente a los ambientales.

### **Requisitos**

- Nivel freático profundo (más de 10 m.)
- Condiciones topográficas adecuadas (no más de un 4% de pendiente)
- Vías de acceso
- Dotación de servicios (agua, luz, recolección de basura, alcantarillado, teléfono)
- Alejado de centros poblados.
- Condiciones ambientales adecuadas (baja pluviosidad, baja velocidad del viento, etc.)
- Disponibilidad de espacio para área logístico-administrativa.
- Cercanía a fuentes de abastecimiento de materias primas (tamices moleculares, materia orgánica, residuos vegetales, combustibles, etc.)

### **4.2.2. Operaciones unitarias de un trabajo de Landfarming**

Las operaciones unitarias de un trabajo de Landfarming, son de fácil ejecución y no requieren de equipos y tecnología avanzada. De nuestra experiencia, podemos sugerir la siguiente secuencia de operaciones unitarias.

#### **Trabajos previos:**

- Establecimiento de la línea base ambiental del área elegida
- Caracterización de los contaminantes.
- Limpieza y desbroce del sitio sujeto a tratamiento.
- Delimitación del área operativa.
- Construcción de facilidades operativas, administrativas y logísticas.
- Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos con capacidad para degradar los contaminantes sujetos a tratamiento. Definición de parámetros cinéticos.
- Selección del equipo profesional, administrativo y operativo que ejecute el trabajo.
- Adquisición de materiales y equipos.
- Obtención de permisos y licencias
- Socialización de los trabajos (si se ejecutan *in situ*)

**Trabajos de ejecución:**

- Construcción de fosa y berma perimetral.
- Construcción de pozos de control
- Tendido de residuos en una capa homogénea.
- Mezclado con ayuda de un tractor de rejas o de discos.
- Adición de nutrientes (NPK), abono químico, estiércol, compost o humus.
- Humectación y mezcla.
- Mezcla rutinaria cada semana.
- Control de parámetros de proceso: T, pH, conductividad, humedad, nutrientes, UFCs, cada 72 horas.
- Adición de nutrientes, cada vez que los análisis así lo determinen.
- Humectación, cada vez que la humedad descienda bajo el 40%.
- Muestreo para análisis de concentración de contaminantes.
- Control de lixiviados en los pozos y fosa perimetral.

Landfarming es una técnica que estimula a la microflora autóctona edáfica para degradar los contaminantes incorporados al suelo, sin embargo, la compleja composición de los residuos a tratar hace necesario la introducción de microorganismos exógenos, cuya eficiencia en el tratamiento es comprobada. Bajo estas circunstancias, los microorganismos empleados deben, ser aislados en sitios cercanos con condiciones ambientales similares, para evitar daños potenciales a la diversidad microbiana natural del sitio de tratamiento.

**4.2.3. Esquema de un sitio de landfarming**

Los trabajos de landfarming requieren la presencia de personal técnico operativo en forma permanente, aspecto que se contrapone a la práctica de trabajo aplicada por varias operadoras, de iniciar el trabajo y dejarlo abandonado en espera de que los procesos naturales del suelo hagan el trabajo; esta actitud ha puesto en tela de juicio a las tecnologías de tratamiento biológico, que han sido consideradas por muchos años como ineficientes.

Siendo una técnica que requiere el control permanente del proceso, el área de tratamiento debe contar con las siguientes áreas operativas.

- Área de tratamiento
- Área administrativa: Oficinas, camper vivienda, camper comedor, camper baños y duchas, parqueaderos, sitio de reunión, guardianía.
- Área logística: Bodegas para materiales, reactivos y equipos, camper laboratorio, estacionamiento para maquinaria, generador de energía, planta de tratamiento de aguas residuales, planta de potabilización de agua (Figura 4.12).

El área operativa debe estar separada mediante cercas vivas del área administrativa y logística. Todo el sitio debe tener cerramiento y la señalización de seguridad adecuada (riesgo biológico). Las vías interiores deben tener las características adecuadas para la circulación de maquinaria; ancho de vía, espesor de carpeta de rodaje, longitud, pendiente y cunetas laterales.

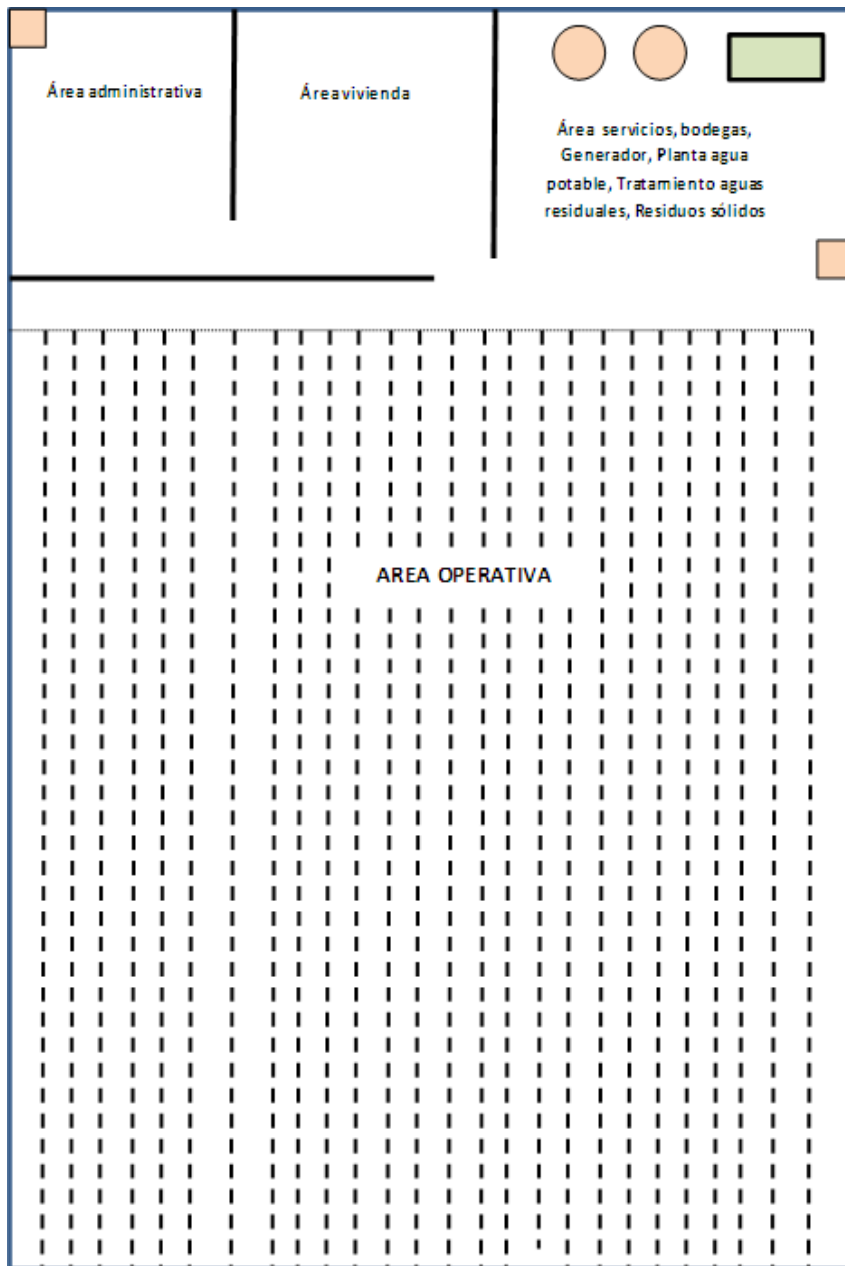
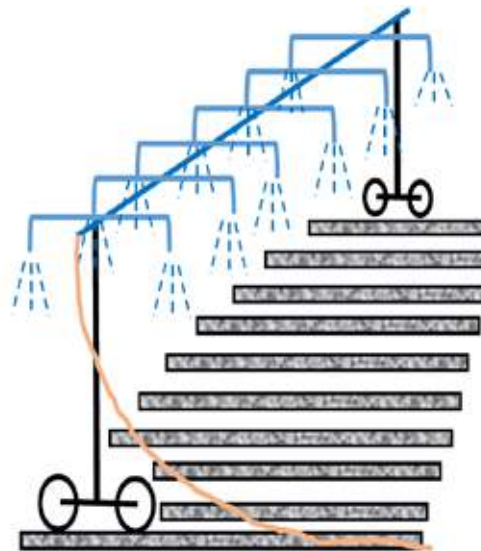
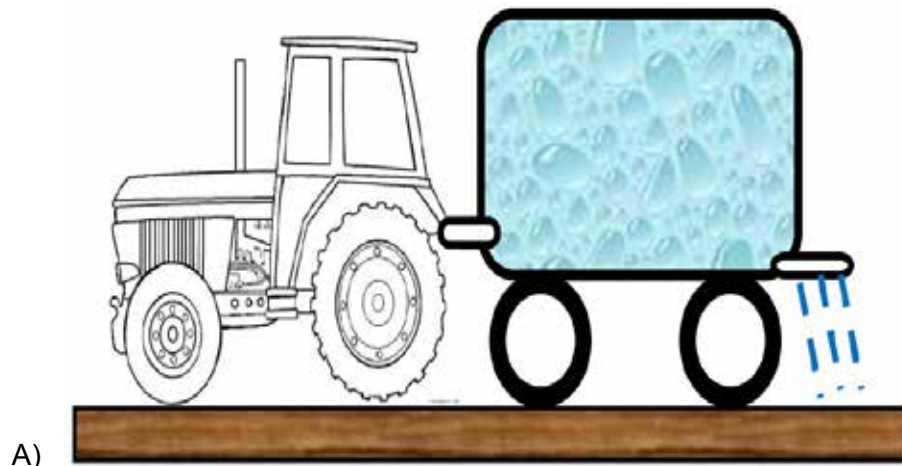


Figura 4.12. Esquema del sitio de landfarming

#### 4.2.4. Particularidades operativas de landfarming

**A. Adición de microorganismos.** - Como se acotó anteriormente en trabajos de landfarming, suele ser necesaria la bioaumentación; en estas circunstancias, es indispensable elegir una metodología de aplicación del fluido microbiano que genere el menor riesgo para el personal operativo y al ambiente. La mejor forma experimentalmente comprobada es

la incorporación del fluido bacteriano en forma simultánea a las labores de volteo con ayuda de un tractor, sobre el cual se monta el tanque dispensador, que distribuye el fluido a medida que el tractor avanza (Figura 4.13, a)



B)

SISTEMA DE DUCHAS MÓVILES

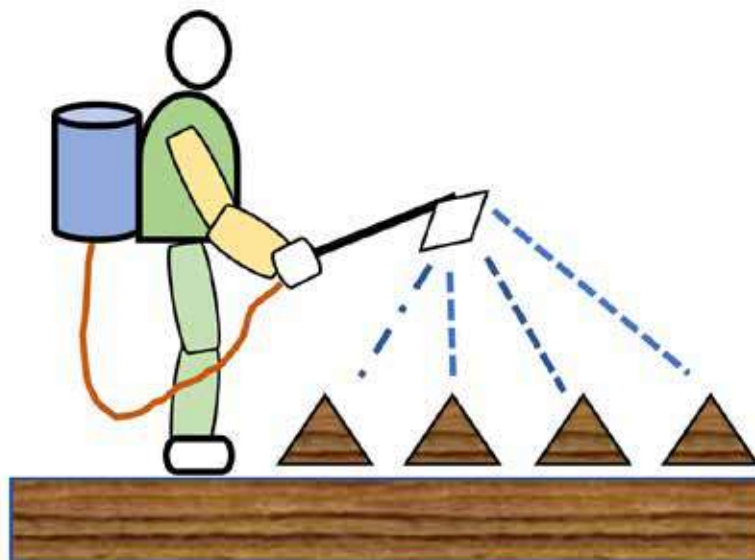
**Figura 4.13.** Aplicación mecanizada de fluido microbiano. A) ducha simple. B) sistema de duchas móviles

La aplicación microbiana debe realizarse en los días en que las condiciones ambientales sean favorables, ausencia de lluvias, baja velocidad de viento, temperatura ambiental adecuada (18-27°C). Adicionalmente el personal debe emplear el equipo de bioseguridad personal correspondiente, durante todo el proceso de aplicación. Este método de aplicación presenta

ventajas operativas, por su rapidez, porque permite en forma simultánea voltear el suelo y aplicar el fluido microbiano, reduce el empleo de mano de obra y con ellos el riesgo asociado a la aplicación del fluido microbiano.

Cuando no se dispone de un sistema acoplado de inyección de fluido microbiano en el tractor, se recurre al empleo de duchas móviles (Figura 4.13, b), similar al empleado en la irrigación de cultivos. Otra alternativa es la aplicación manual, con ayuda de personal operativo dotado de un equipo de protección personal y una bomba lo ejecuta (Figura 4.14.). Esta metodología presenta desventajas operativas tales como:

- Elevado riesgo para el personal que puede aspirar o impregnarse de fluido microbiano por acción del viento.
- Lentitud del proceso que con frecuencia requiere la participación de varios operarios.
- Se produce un pisoteo innecesario y la consecuente impregnación del calzado con fluido microbiano.
- Dificultad para transportar el recipiente que contiene el fluido microbiano y
- La necesidad de generar presión para su aplicación, factor que podría incidir negativamente sobre la sobrevivencia de los microorganismos.



**Figura 4.14.** Aplicación manual de fluido microbiano

**B. Aplicación de nutrientes:** Para mejorar la disponibilidad de los nutrientes y evitar pérdidas por volatilización, se recomienda aplicar nutrientes en solución, en forma mecanizada en un proceso similar a la aplicación de microorganismos, que puede o no ser combinado con volteo del suelo (Ver Figura 4.15).

A falta de nutrientes en solución, puede aplicarse nutrientes en estado sólido o lechada. Con frecuencia se aplica estiércol (porcinasa, gallinaza, bokashi), que, a más de nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, aportan con una importante carga microbiana que contribuye a la biodegradación. En dependencia del sitio pueden ser de fácil adquisición y bajo costo. La mayoría de los trabajos de landfarming realizados en Ecuador, emplean abono mineral.



Figura 4.15. Aplicación mecanizada de nutrientes en solución

**C. Muestreo de suelos para análisis:** La toma de muestras (alícuotas) para análisis y control de la concentración de contaminantes se debe realizar siguiendo la normativa ambiental vigente. Se debe tomar mínimo 10 muestras por hectárea, por el método de cuarteo para obtener una muestra representativa. Con el propósito de reducir costos de análisis, se suele recurrir a la toma de muestras combinadas; cinco de dos o dos de cinco. Para la definición de puntos de muestreo se trazan cuadrículas uniformemente distribuidas en el área de muestreo (Ha). La mejor alternativa es definir los puntos de muestreo y su número en función de la pluma de contaminación del sitio previamente establecida (Figura 4.16).



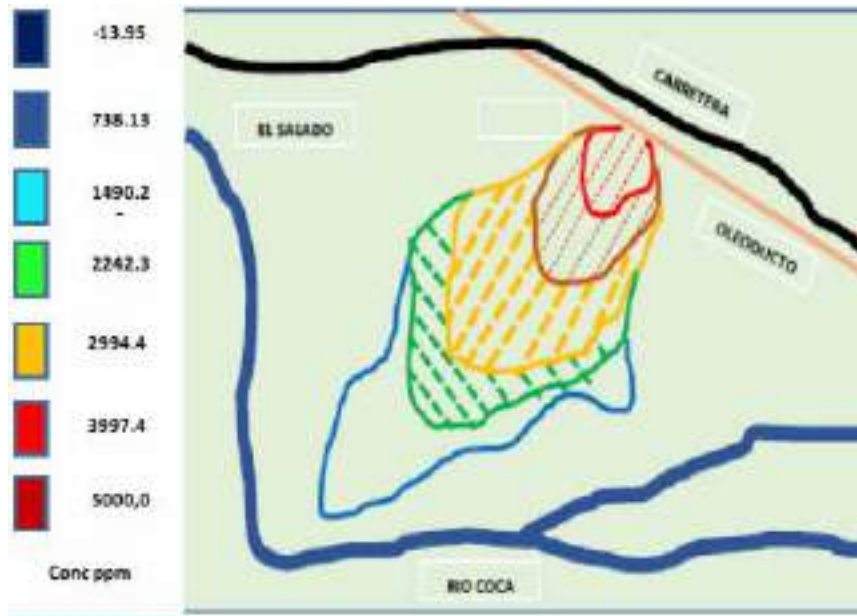


Figura 4.16. Pluma de contaminación

**D. Pozos de control de lixiviados.** - Los pozos de control de los lixiviados, deben construirse una vez que se han iniciado los trabajos de tratamiento, el número de pozos se estima en función del área de tratamiento, considerando el diámetro de cobertura de cada pozo, que es aproximadamente 10-12 m., en función de las propiedades mecánicas de suelo. Los pozos se distribuyen de tal forma que sus áreas de influencia se sobrepone, de tal forma que no queda ni un solo espacio del área de tratamiento sin cobertura (Figura 4.17).

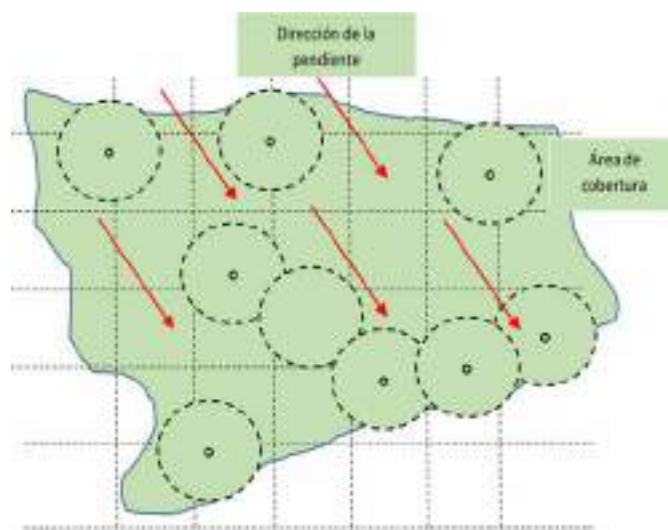


Figura 4.17. Distribución de los pozos de control

Con frecuencia la mayoría de los pozos se ubican en el sitio de mayor pendiente, construyéndose algunos en la parte más alta.

### **E. Estructura de un pozo de control**

El diámetro del tubo del pozo debe ser de 3-4 pulgadas, de tal forma que permita la introducción de un muestreador de lixiviados. El tubo debe sobresalir de la superficie hasta unos 50.60 cm, para facilitar los trabajos de muestreo. El tubo debe contar con una tapa, para evitar el ingreso de aguas lluvias, polvo o basura, que podrían alterar los resultados del muestreo (Figura 4.18).

Para proteger al tubo de golpes, que pudieran dañarlo, se debe colocar a su alrededor una barrera metálica o un tubo de mayor diámetro sujeto al piso con hormigón. El diámetro del pozo debe ser ligeramente más ancho que el diámetro del tubo, para facilitar su introducción y el taponamiento del área perforada. Para sujetarlo se emplea un anillo de sellado con bentonita en el primer tercio de la profundidad del pozo.

El tubo debe ser sumergido hasta llegar al nivel freático del sitio de tratamiento, Con frecuencia el extremo inferior del tubo cuenta con una rejilla que evita el ingreso de material grueso, que podría dificultar el muestreo de aguas subterráneas. De igual forma el área perforada del tubo puede estar provista de una rejilla, que cumple el mismo objetivo que la reja del extremo inferior.

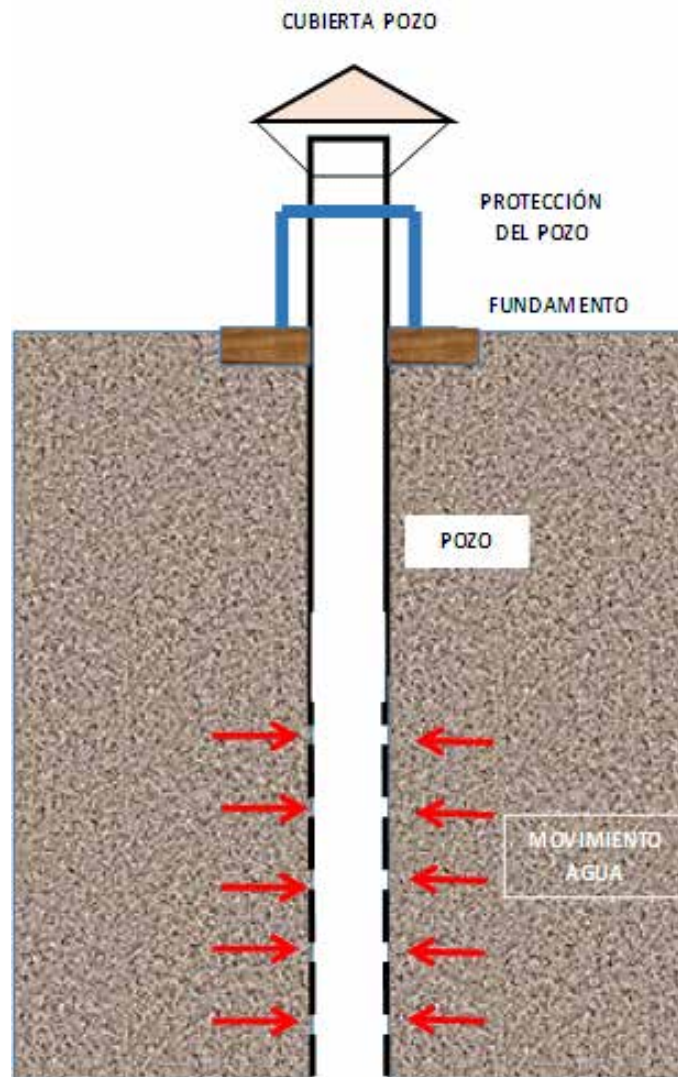


Figura 4.18. Pozo de control

#### 4.2.5. Landfarming en plataforma cubierta

Esta variante de tratamiento se aplica para residuos con alto poder contaminante, cuyo volumen no es elevado, tales como lodos residuales aceitosos, sedimentos de tanques de almacenamiento de combustibles e hidrocarburos, lodos residuales industriales de varias ramas de la producción, lodos residuales de plantas de tratamiento de aguas residuales (Figura 4.19).

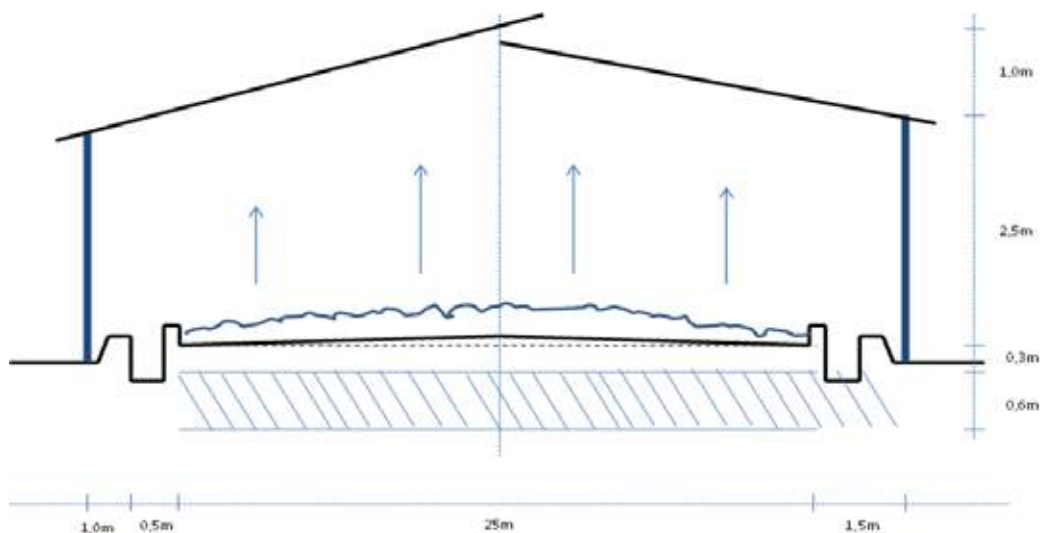


A)

B)

**Figuras 4.19** Plataforma de landfarming en Waterford Ecuador<sup>24</sup>. A) Sección de la estructura con material en tratamiento. B) vista general de la toda la estructura

En la práctica se efectúan las mismas operaciones unitarias que para landfarming en terreno a campo abierto, con la particularidad de que el área de tratamiento es de hormigón y cuenta con un sistema de evacuación y recolección de lixiviados, una cubierta, para evitar el acceso de aguas lluvias, bermas perimetrales u otro mecanismo para evitar el ingreso al área operativa de aguas de escorrentía superficial (Figura 4.20). Adicionalmente cuenta con un sistema de señalización y áreas de almacenamiento de materiales (materia orgánica, tamices moleculares y herramientas).



**Figura 4.20.** Dimensiones de la plataforma de landfarming

<sup>24</sup> Waterford Ecuador. Empresa de servicios petroleros, dedicada al mantenimiento, reparación y venta de tubería y herramienta de perforación.

La hidratación de los residuos en tratamiento se puede efectuar con ayuda de aspersores, riego por goteo o en forma manual con regaderas.

Estos sistemas son muy versátiles y fáciles de operar debido a su tamaño, generalmente son construidos *in situ*, en las empresas que generan los residuos, en consecuencia, cuentan y con todos los servicios necesarios para que la plataforma opere con seguridad. Los lixiviados de la plataforma son recolectados y enviados al sistema de tratamiento de aguas residuales de la operadora.

Para la mayoría de los lodos aceitosos, es característico el alto contenido de humedad, debido a que generalmente se obtienen de las operaciones de limpieza de instalaciones, cisternas de almacenamiento de hidrocarburos, lavado de taladrinas (aceites de corte) y aceites lubricantes, limpieza de tuberías, herramientas de perforación, etc. Estos residuos requieren como primera estrategia su deshidratación, tarea que se puede lograr por evaporación de la humedad (tendido en plataformas de secado), uso de filtros de presión (de elevado costo), o por adición de tamices moleculares desecantes, siempre y cuando el porcentaje de humedad no sea superior al 70%, o por combinación de algunos de las metodologías.

A igual que se procede con los suelos contaminados sujetos a tratamiento en compostaje, los lodos residuales deben ser estabilizados, para evitar que lixivien y se desperdigen por áreas aledañas al sitio de su almacenamiento temporal. Los microorganismos necesitan una base física a la cual adherirse, la adición de tamices crea las condiciones ideales para su asentamiento y formación de biopelícula. Para evitar la compactación de esta mezcla, se debe adicionar materia estructurante como cascarilla de arroz, aserrín, bagazo o residuos agrícolas finamente fragmentados.

En caso de emplear aserrín, se necesario verificar su fuente, porque ciertas plantas producen taninos y fitoncitos (coníferas, eucalipto, etc.), que ejercen efectos adversos sobre a diversidad microbiana llegando a matarlos. Una vez estabilizados los residuos se trasladan a la plataforma para su maduración y posterior inicio de la biorremediación.

Los lodos residuales aceitosos se generan en forma permanente y en cantidades pequeñas; una estrategia para su recolección, almacenamiento y

estabilización es el empleo de tanques metálicos (abundantes en las empresas de servicios petroleros), tal como se muestra en la Figura 4.21.



**Figura 4.21** Almacenamiento y estabilización de lodos residuales en tanques.

Adicionalmente esta metodología presenta otra ventaja, los lodos tratados pueden ser evacuados en forma segura dentro de las propias instalaciones de la empresa que los genera, en la conformación de jardines y áreas verdes (Figura 4.22).

La ausencia completa de suelo constituye una desventaja, por cuanto no existen reservas de nutrientes ni microorganismo edáficos propios, razón por la que la adición de nutrientes (bioestimulación) y de microorganismos (bioestimulación) es indispensable para el éxito de los trabajos de degradación de lodos residuales aceitosos.



**Figura 4.22.** Tratamiento de lodos. A) Lecho para disposición final de lodos residuales  
B) vegetación crecida sobre los lodos residuales tratados

Detalles sobre esta metodología se analizan en el capítulo de estudio de casos.

#### 4.2.6. Landfarming en piscina

La metodología de landfarming en piscina, se ha empleado en Ecuador para el tratamiento de cortes y ripios de perforación obtenidos con lodos base agua y con agente inhibidor de arcillas de nitrato de potasio.

Como se detallará más adelante en el capítulo de estudio de casos, los cortes y ripios de perforación se disponen en piscinas impermeabilizadas con arcilla y selladas con bentonita o con geomembrana. El volumen promedio de cortes y ripios generados por un pozo de 10.000 pies es de 1200-1500 m<sup>3</sup>, en dependencia del diámetro de la tubería. El tiempo promedio de perforación por pozo es de 11-12 días, pudiendo una operadora, perforar entre 3 a 4 pozos por mes, por taladro.

Especial atención reviste, el control de cortes y ripios en el taladro (Figura 4.23), donde el personal debe corregir errores en el sistema de dewatering, zarandas y control de sólidos. Del correcto funcionamiento de estas operaciones unitarias depende la calidad y características de los ripios y cortes de perforación que llegan al sitio de tratamiento. El control en taladro permite que los materiales tengan un pH y porcentaje de humedad adecuados.

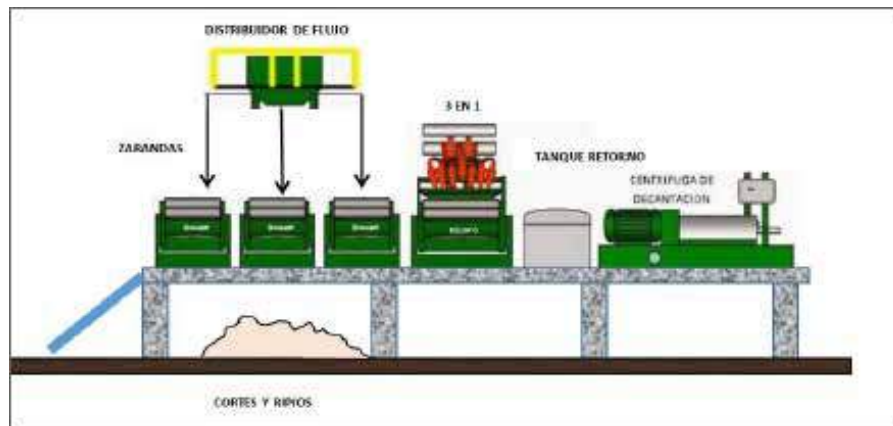


Figura 4.23. Sistema de control de sólidos en un taladro

Esto facilita los trabajos de transportación de cortes desde el taladro hasta el sitio de tratamiento (no se producen derrames), garantiza la estabilidad del pH, para la actividad microbiana empleada en el tratamiento. El pH de los cortes suele alterarse frecuentemente por trabajos de cementación que se realizan en los pozos; bajo estas circunstancias el personal de taladro debe notificar al campamento para que se prepare una piscina independiente para su disposición.

#### A. Requisitos para un sitio destinado a landfarming en piscina

Al igual que los trabajos de landfarming, en suelo a campo abierto, los sitios elegidos deben cumplir con una serie de requisitos, para su ejecución eficiente.

- Nivel freático profundo (más de 10 m.)
- Condiciones topográficas adecuadas (no más de un 4% de pendiente)
- Vías de acceso
- Cercanía a los taladros (para reducir costos de transportación)
- Dotación de servicios (agua, luz, recolección de basura, alcantarillado, teléfono)
- Alejado de centros poblados.
- Condiciones ambientales adecuadas (baja pluviosidad, baja velocidad del viento, etc.)
- Disponibilidad de espacio para área logístico-administrativa.
- Cercanía a fuentes de abastecimiento de materias primas (tamices moleculares, materia orgánica, residuos vegetales, combustibles, etc.).



## **B. Operaciones unitarias de un trabajo de Landfarming en piscina**

Las operaciones unitarias de un trabajo de Landfarming en piscina, son de fácil ejecución, sin embargo, requieren de equipos y tecnología especializada. Las operaciones unitarias sugeridas son:

### **Trabajos previos:**

- Levantamiento de la Línea base ambiental del área elegida
- Limpieza y desbroce del sitio.
- Delimitación del área operativa.
- Construcción de facilidades operativas, administrativas y logísticas.
- Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos con capacidad para degradar los contaminantes sujetos a tratamiento.
- Selección del equipo profesional, administrativo y operativo que ejecute el trabajo.
- Adquisición de materiales y equipos.
- Obtención de permisos y licencias
- Socialización de los trabajos (en caso de que los cortes y ripios sean transportados y pasen por centros poblados)

### **Trabajos de ejecución:**

- Construcción de piscinas
- Construcción de pozos de control
- Instalación de equipos y accesorios
- Transporte cortes y ripios
- Disposición de cortes y ripios en las piscinas
- Adición de nutrientes (NPK), en solución
- Adición de microorganismos, por gravedad
- Mezcla rutinaria cada 24 horas, con ayuda de una retroexcavadora
- Control de parámetros de proceso: T, pH, conductividad, humedad, nutrientes, UFCs, cada 72 horas
- Adición de nutrientes, cada vez que los análisis así lo determinen.
- Muestreo para análisis de concentración de contaminantes.
- Control de lixiviados en los pozos y fosa perimetral

Landfarming en piscina trabaja con residuos con alto porcentaje de hidratación, por cuanto se ejecutan a la intemperie, sin cobertura que evite el ingreso de aguas lluvias. Carecen casi por completo de microorganismos especializados en la degradación de los contaminantes presentes en los cortes, razón por la que deben ser introducidos en forma masiva. Sin embargo, se debe respetar la prohibición de introducir microorganismos exóticos para el ecosistema del lugar donde se ejecutan los trabajos.

### **C. Esquema de un sitio de landfarming**

Los trabajos de landfarming en piscina al igual que otras metodologías, requieren la presencia de personal técnico operativo en forma permanente, en consecuencia, es necesario la construcción de facilidades para el personal que participan en los trabajos. Las facilidades para construir son:

- Área de tratamiento
- Área administrativa: Oficinas, camper vivienda, camper comedor, camper baños y duchas, parqueaderos, sitio de reunión, guardianía.
- Área logística: Bodegas para materiales, reactivos y equipos, estacionamiento para maquinaria, Generador de energía, planta de tratamiento de aguas residuales, planta de potabilización de agua.

El área operativa debe estar separada mediante cercas vivas del área administrativa y logística. Todo el sitio debe tener cerramiento y la señalización de seguridad adecuada (riesgo biológico). Las vías interiores deben tener las características adecuadas para la circulación de maquinaria; ancho de vía, espesor de carpeta de rodaje, longitud, pendiente y cunetas laterales.

En forma similar a la distribución de landfarming a campo abierto, el área de tratamiento de landfarming en piscina, dispone de áreas administrativa, logística y operativa. Sin embargo, tiene una marcada diferencia en el área operativa, que dispone a más de las piscinas, de laboratorio, sistema de biorreactores, planta de tratamiento de aguas y un área de disposición final de cortes tratados (Figura 4.24).

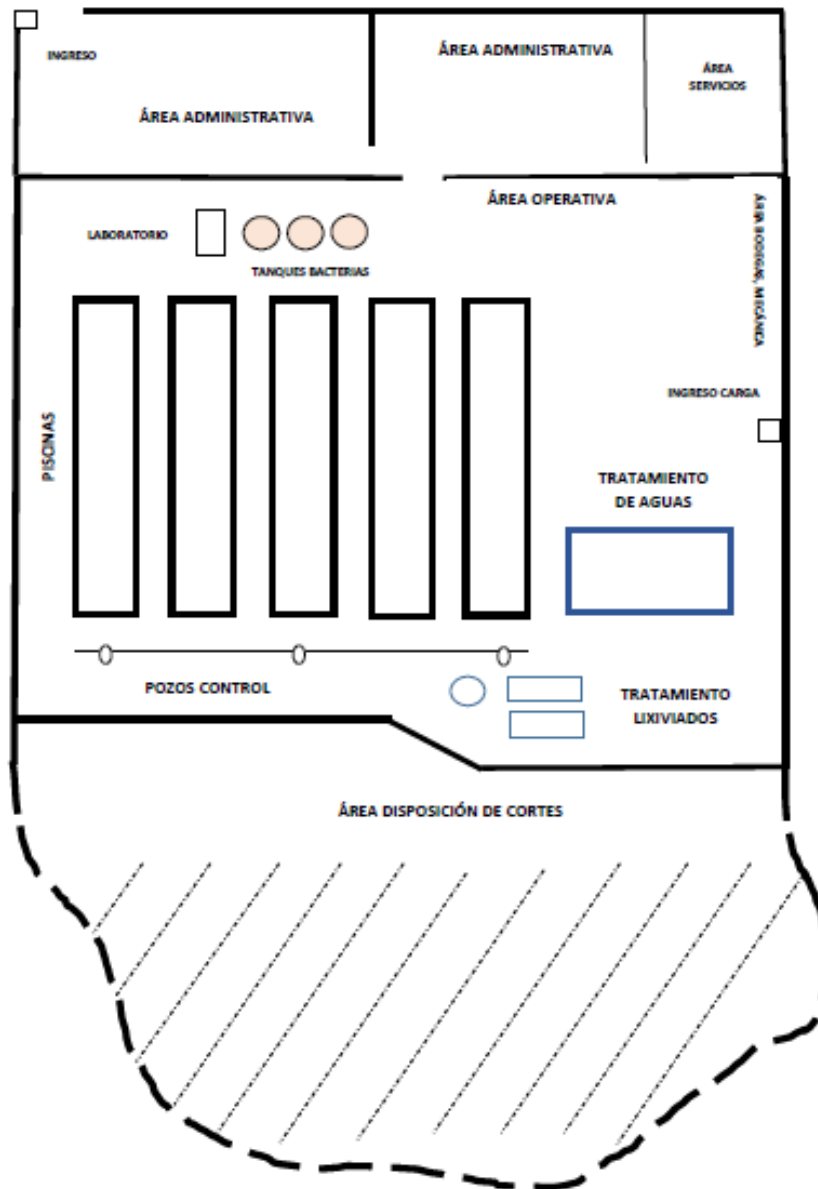


Figura 4.24. Distribución de áreas de trabajo en landfarming en piscinas

**D. Sistema de producción y distribución de fluido microbiano**

El fluido microbiano seleccionado para el trabajo produce en el campo laboratorio, en un reactor adaptado de 1000 litros, del cual es bombeado con ayuda de una bomba sumergible de ½ HP, hasta los tanques de propagación de 70 barriles, que contienen un medio de propagación a base de melaza, y extractos vegetales (plantas medicinales y otras ricas en N<sub>2</sub> y P).

De los tanques por gravedad el fluido bacteriano se distribuye mediante tuberías hasta las piscinas de landfarming. Junto a la berma de la piscina, se colocan acoples rápidos, que permiten conectar duchas o mangueras para la aplicación del fluido microbiano. La tubería se entierra pegada a lo largo de berma, para evitar roturas durante el trabajo de la retroexcavadora.

Cada tanque de propagación dispone de una válvula que regula el flujo del consorcio microbiano, en función de las necesidades operativas. Las tuberías se disponen para que sirvan para irrigar dos piscinas, optimizando de esta forma el tiempo operativo de la aplicación de fluido microbiano.

El volumen de fluido microbiano por metro cúbico varía en función de las características de los cortes y ripios a tratar, de la composición del lodo de perforación empleado. Para cortes base agua con nitrato de potasio, se emplean de 3,5 litros/m<sup>3</sup> a 15 litros m<sup>3</sup>.

### **E. Sistema de tratamiento de agua**

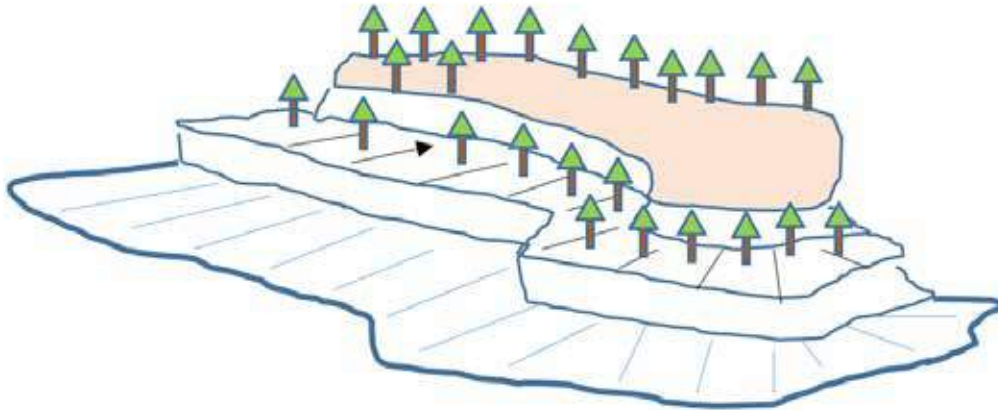
Las aguas sujetas a tratamiento son las que se acumulan sobre los cortes en tratamiento por efecto de las lluvias, en especial en las zonas productoras de hidrocarburos que se caracterizan por las altas tasas de pluviosidad.

Las aguas que se contaminan con los contaminantes presentes en los ripios y cortes son bombeadas hasta la piscina impermeabilizada para su almacenamiento y posterior tratamiento. Cuando el agua ocupa las dos terceras partes de la piscina, se inicia el tratamiento, así se justifica la operación del equipo y el trabajo del personal. El sistema de tratamiento es convencional (químico), sus etapas pueden variar en función de las características de las aguas, una vez tratadas se evacúan en un cuerpo receptor cercano.

### **F. Área de disposición de cortes y ripios tratados**

Los cortes y ripios que han culminado el tratamiento son evacuados con ayuda de la retroexcavadora, y cargados en camiones para ser transportados hasta la zona de disposición final. En esta zona (si es

definitiva), se tienden y forman plataformas, que posteriormente serán forestadas. Existe la posibilidad de que los cortes y ripios tratados (inocuos), se empleen para reconfiguración topográfica (Figura 4.25), de sitios afectados por excavaciones. Para recuperar zonas sujetas a procesos erosivos agresivos o en calidad de material de cobertura para rellenos sanitarios.



**Figura 4.25.** Conformación topográfica con cortes de perforación

### **G. Diseño de las piscinas**

Las dimensiones de las piscinas empleadas para el tratamiento de cortes y ripios de perforación son de 4m., de profundidad, 8 m., de ancho y 50 m., de largo. Las bermas perimetrales de 40cm., de ancho y 40 cm de alto. La superficie de las paredes está recubierta por arcilla compactada y sellada con bentonita, o si se dispone de recursos, con geomembrana (Figura 4.26).

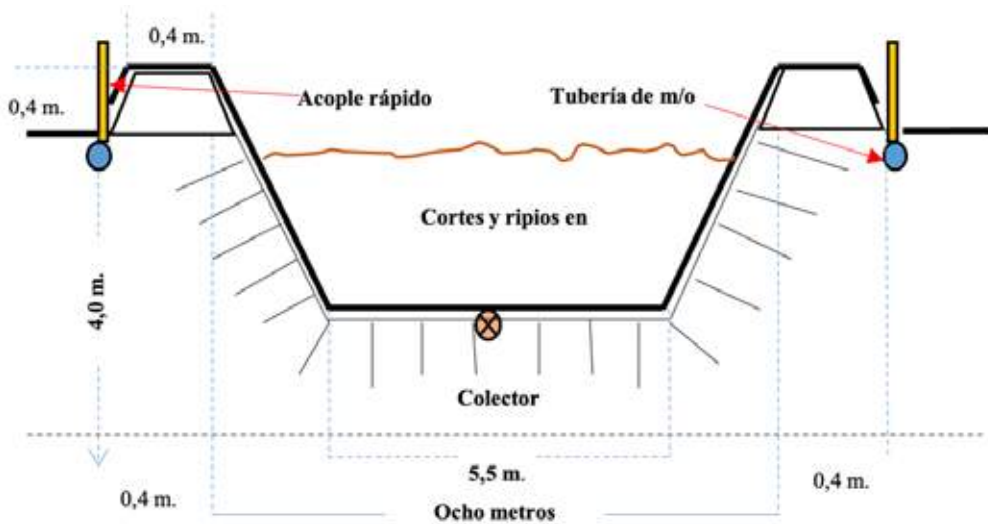


Figura 4.26. Corte transversal de una piscina de tratamiento

La profundidad y ancho de la piscina son ideales para la operación de una retroexcavadora 320, que no logra rasgar la geomembrana o la capa de arcilla de sellado del fondo (Figura 4.27).

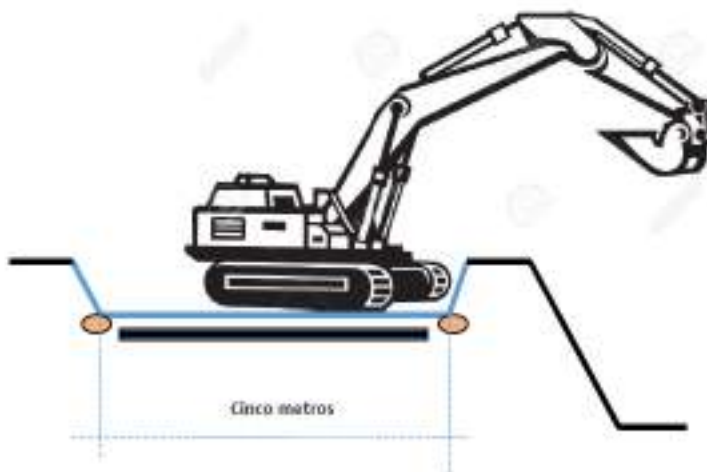


Figura 4.27. Operación de la retroexcavadora

## H. Tratamiento de residuos hidrocarbúricos líquidos

Estos se almacenan en piscinas impermeabilizadas cubiertas para ser sometidos a trabajos de recuperación a través de un sistema tipo Alfa Laval, que permite su reinyección a los sistemas de oleoducto. Productos de este sistema son, crudo recuperado, aguas residuales y sedimentos.

El almacenamiento de este tipo de residuos requiere la construcción de infraestructura operativa de elevado costo y la observancia irrestricta de medidas de seguridad industrial y ocupacional (Figura 4.28). Con frecuencia la cantidad de esos residuos es abundante, haciéndose necesario el empleo de tanques metálicos de para su almacenamiento.



A)

B)

**Figura 4.28.** Almacenamiento de residuos. A) Piscina y B) tanques de almacenamiento de residuos líquidos aceitosos

*Fuente. Jorge Mideros*

El sistema de recuperación Alfa Laval, consta de varias etapas:

**Etapa 1:** Bombeo de slop fresco desde un pontón que se encuentra sobre la piscina de slop oil, por medio de una Bomba Sumergible, con toberas que inyectan vapor para facilitar el bombeo, el sistema cuenta con una malla alrededor de la bomba y serpentín de calentamiento con agua caliente a 90°C para mejorar el bombeo del slop oil.

**Fase 2:** El slop oil bombeado desde el pontón entra a un intercambiador de calor en espiral, que calienta el slop utilizando agua caliente a 90° C, luego que el slop oil es calentado, entra a un sistema de pre-proceso con zaranda, donde es filtrado para retirar los sólidos mayores hasta de 80 micras por medio de un conjunto de zarandas, acopladas a un sistema de vibración.

**Fase 3:** El slop filtrado entra a un tanque de 12.5 metros cúbicos, donde existe un sistema de calentamiento por medio de un serpentín de agua caliente para mantener la temperatura de 70°C a 80°C y un sistema de do-

sificación de demulsificantes, el tanque está equipado con un agitador para facilitar el calentamiento y la mezcla con el slop oil fresco liviano, en una proporción de 30% de slop fresco y 70% de slop oil, dependiendo el tipo de slop que tenga, la viscosidad de la mezcla será 180 cSt a 70°C.

**Fase 4:** Bombeo de slop oil mejorado a un intercambiador de calor en espiral, que utiliza 7 metros cúbicos de agua caliente a 90°C, proveniente de un intercambiador a placas, que calienta el agua y utiliza 1,100 Kg. /h de vapor a 134°C.

**Fase 5:** Ingreso de slop oil al DECANTER DE TRES FASES LYNX 35 que puede separar los sólidos, la fase líquida (crudo) y la fase pesada líquida (agua). El LYNX 35 puede operar con un contenido de hasta 30% de sólidos en suspensión y una mezcla de agua crudo en cualquier porcentaje, con un flujo que va desde los 5 metros cúbicos por hora hasta los 30 metros cúbicos por hora, con una variación en los paring disc del equipo. Los sólidos separados tienen una sequedad del 35%, que pueden ser enviados para la biorremediación.

En las fases líquidas separadas se obtiene aguas aceitosas con menos del 2% de aceite y el crudo con el 1% de BS&W.

**Fase 6:** Ingreso del crudo con menos del 1% BS&W a un tanque pulmón con capacidad de 12.5 metros cúbicos, para ser tratados con demulsificantes y dispersantes. Se tratan 40 metros cúbicos de slop con 25 galones de demulsificantes, esta mezcla variará dependiendo de la calidad del slop y el tipo de emulsificación que se tenga al momento. Las aguas aceitosas con menos del 2% de aceite se bombean a un vaccum para su traslado y posterior tratamiento.

**Fase 7:** Bombeo del crudo con menos del 1% BS & W tratado hacia un intercambiador de calor en espiral, que utiliza 7 metros cúbicos de agua caliente a 90°C, proveniente de un intercambiador de calor a placas.

**Fase 8:** Ingreso del crudo con menos del 1% BS&W al módulo de separación centrífuga FOX 15, donde se puede tratar el slop con contenido de sólidos hasta 4% y un contenido de agua de 0 a 100%, esto se logra mediante el sistema OPTIPHASER que puede censar y controlar la interface de separación mediante la importación o exportación de agua, lo que le



permite asegurar que la separación sea eficiente sin importar los porcentajes de agua o crudo que tenga el flujo que entra a la separadora centrífuga. El esquema técnico de la planta de recuperación de slop se muestra en la figura 4.29.

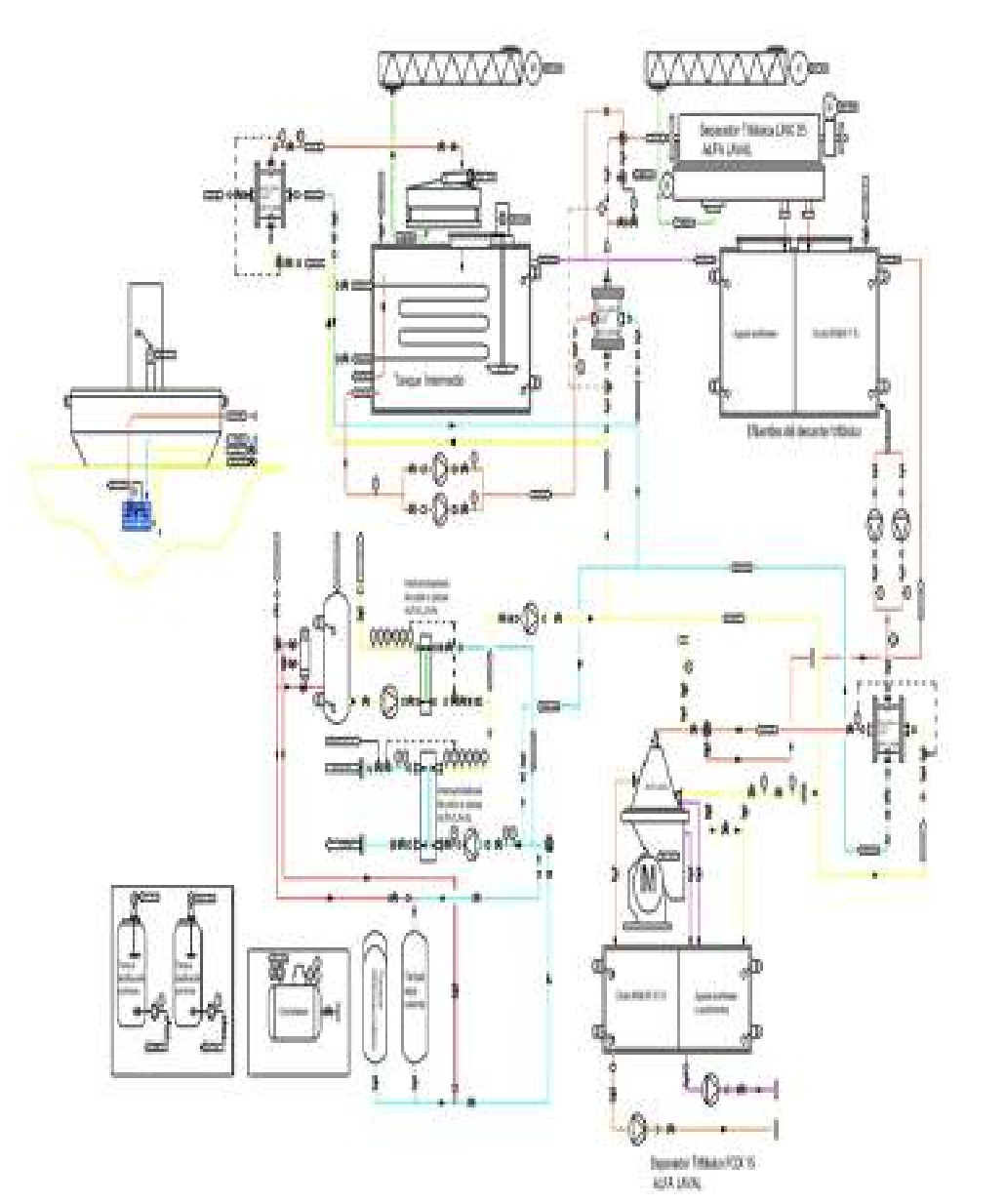


Figura 4.29. Esquema del sistema de recuperación de slop oil

Fuente: ALFA LAVAL

El crudo recuperado se obtiene con las siguientes especificaciones de 0.1 a 0.5 BS&W, con una capacidad de flujo de 15 metros cúbicos por hora. Las

aguas aceitosas separadas tendrán menos del 1% de contenido de aceite que pueden ser transportadas y tratadas en la biorremediación al igual que los sólidos separados que saldrán con 5% de sequedad. Las aguas son enviadas a tratamiento convencional y los sedimentos a tratamiento mediante compostaje u otra metodología si su cantidad es apreciable.

Procedimiento similar se sigue para la recuperación de piscinas, en las cuales primero se retira el material grueso, se lava los materiales retirados. Si es material vegetal, se somete a triturado y se envía a tratamiento biológico juntamente con suelos y sedimentos. Materiales plásticos y otros se someten a incineración con un gestor ambiental calificado. Los metales son reciclados y los suelos de paredes y fondo son sometidos a lavado con agentes desengrasantes (limoneno), obteniéndose tres fases, suelos que van a tratamiento, aguas que son tratadas mediante sistemas convencionales y el hidrocarburo que pasa por el sistema de recuperación antes descrito.

Una alternativa es la entrega del hidrocarburo en calidad de combustible en cementeras e incineradoras. En conclusión, *el tratamiento técnico y económico de residuos hidrocarbúferos líquidos, pasa por una fase de recuperación, lavado y finalmente tratamiento del remanente, por cualquier metodología de biorremediación existente.*

### 4.3. Bioventing

Bioventing es una técnica de tratamiento biológico *“in situ”*, que evita el traslado de los residuos o materiales contaminantes a otros sitios. Se aplica cuando los contaminantes han migrado al interior del suelo formando burbujas (depósitos). Consiste en la construcción de pozos de recuperación de contaminantes, pozos de inyección de aire, para estimular el crecimiento de los microorganismos autóctonos, que emplearán como única fuente de carbono al contaminante la eficiencia de este método es relativa porque, presupone que los microorganismos presentes en el suelo tienen la capacidad de degradar los contaminantes derramados. Con frecuencia se recurre a la Bioaugmentación y Bioestimulación para garantizar el éxito de este tipo de trabajos (Figura 4.30).

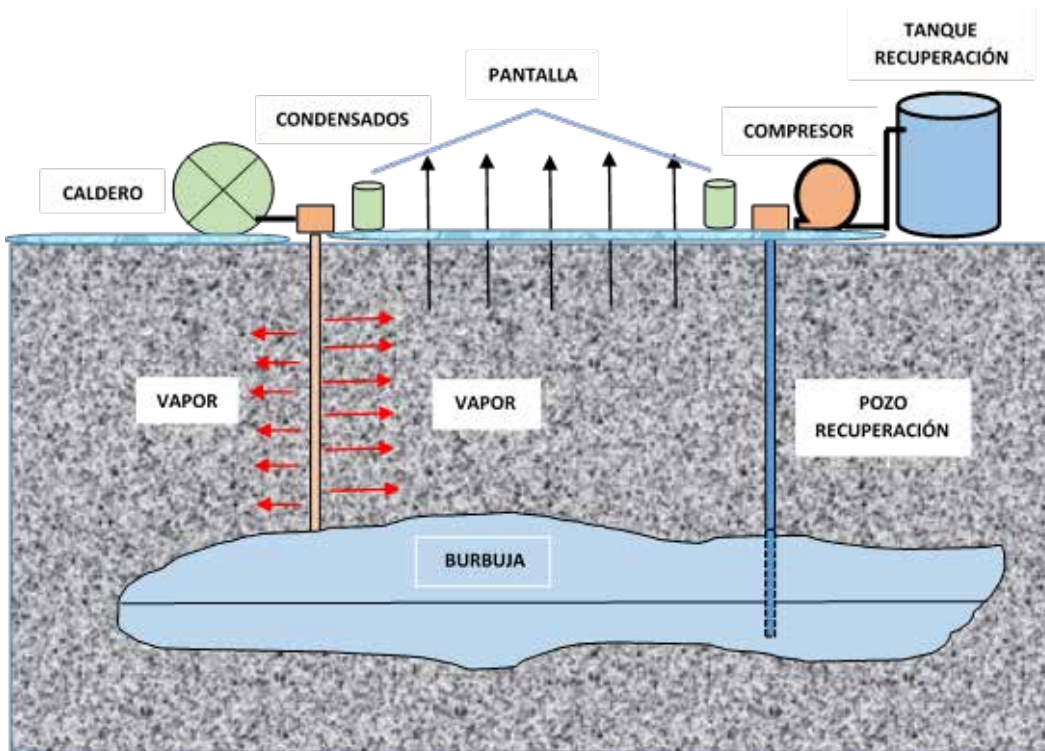


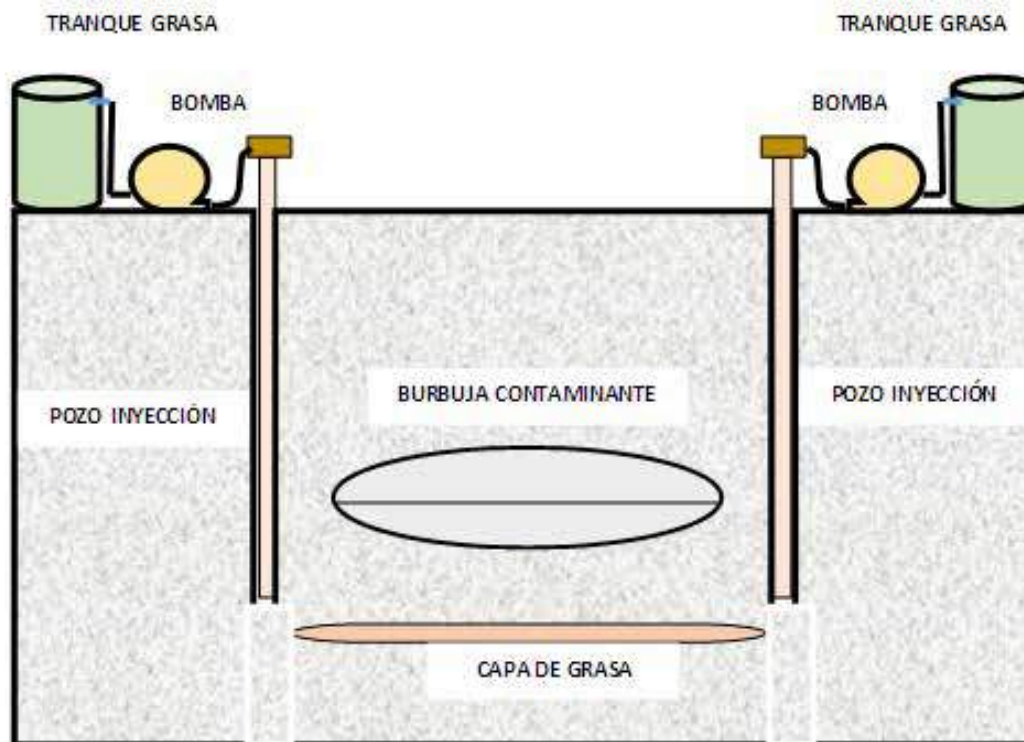
Figura 4.30. Esquema del tratamiento por Bioventing

Por los pozos de recuperación se extraen los contaminantes y se los almacena en recipientes adecuados. Esta metodología requiere un control eficiente de los vapores y gases que se eliminan para evitar la contaminación atmosférica y los riesgos para la seguridad del personal operativo y ambiente circundante (Maroto y Rogel, 2000).

Es la tecnología de mayor uso para el tratamiento de la zona vadosa de suelos contaminados por hidrocarburos (Reisinger et al., 1995). Por las bombas de inyección, se bombea vapor de agua que estimula la salida de las fracciones volátiles de los hidrocarburos (COVs), los mismos que son succionados por la bomba de succión y son conducidos a un sistema de tratamiento donde los gases  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{R-S}$  y fracciones livianas de los hidrocarburos, son neutralizados, para evitar la migración de la contaminación a la atmósfera. Una vez que han dejado de generarse COVs, las bombas se emplean para el bombeo de oxígeno, para estimular la generación de condiciones aeróbicas y reducir la generación de gases peligrosos.

Los sistemas pueden contar con bombas de inyección dedicadas para la inyección de nutrientes y fluido microbiano y agua cuando las mediciones del tensiómetro ubicado en el interior de los pozos así lo determinan.

Al igual que en las metodologías antes analizadas, se realiza un control del avance de la descontaminación, por tomas de alícuotas periódicas y su análisis en un laboratorio especializado, Adicionalmente se ejecuta un control de UFCs, nutrientes y los demás parámetros de proceso que inciden sobre la biorremediación. Adicionalmente los espacios dedicados a Bioventing deben contar con pozos de control de migración de lixiviados al nivel freático. Una estrategia empleada para evitar la migración de los contaminantes al nivel freático es la inyección de grasa vegetal y su saturación bajo la burbuja de contaminación (Figura 4.31).



**Figura 4.31.** Saturación con grasa para evitar contaminación de aguas subterráneas

A pesar de la inyección de oxígeno, se producen condiciones anaeróbicas que generan gases peligrosos. Bajo condiciones anaeróbicas ocurren las siguientes reacciones:

- $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$  Metano génesis
- $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$  Reducción de sulfatos
- $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$  Reducción de hierro
- $\text{MnO}_2 \rightarrow \text{Mn}^{2+}$  Reducción de manganeso
- $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$  Reducción de nitratos

Los sistemas también cuentan con pozos de recuperación, donde debido al vacío generado, el contaminante líquido se desplaza al interior del pozo y se almacena en la superficie del agua, con ayuda de una bomba se succiona el hidrocarburo; de esta forma se recupera la mayor parte del contaminante; tal como se detalla en la siguiente metodología.

El objetivo principal del Bioventing, es la recuperación del contaminante, no la biorremediación. Tan solo el remanente que queda impregnado en los poros del suelo, son sometidos a biorremediación.

#### 4.4. Bioflushing

Consiste en la construcción de pozos de recuperación de contaminantes, pozos de inyección de vapor de agua con agentes lavantes o desengrasantes, pozos de inyección de aire, pozos de inyección de nutrientes y microorganismos y pozos de control de niveles freáticos.

El Bioflushing, consiste en operaciones de lavado de los suelos contaminados con agentes desengrasantes para recuperar la mayor cantidad de contaminante, y posterior lavado con fluido microbiano con capacidad para degradar los contaminantes presentes en los suelos en tratamiento; de esta forma se recupera el residuo se almacena en recipientes adecuados.

Una alternativa es la inyección de vapor de agua para estimular la evacuación del contaminante remanente (en caso de ser hidrocarburo) por evaporación o por separación en la columna de agua. Esta tarea puede hacerse también por inyección de agua caliente con un agente de lavado idóneo para el contaminante. Una vez recuperado la mayor cantidad posible del contaminante, se procede en forma simultánea a inyectar fluido microbiano

y solución nutritiva para estimular la biodegradación. Finalmente se deberá inyectar en forma periódica aire para garantizar las condiciones aeróbicas del proceso.

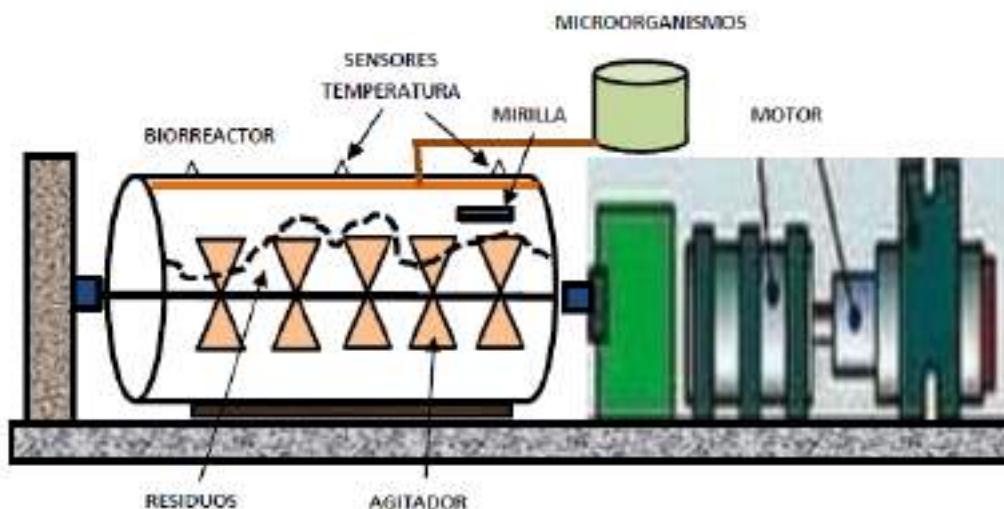
### 4.5. Biorreactores

Los biorreactores son equipos donde se efectúa la transformación biológica, de un sustrato específico y el crecimiento celular, de los microorganismos empleados en su transformación. Este tipo de equipos se emplean en condiciones de laboratorio para la reproducción masiva de los microorganismos necesarios para los trabajos de biorremediación ambiental.

No existen experiencias de biorreactores donde se ejecute trabajos de biorremediación a gran escala, debido a las dificultades tecnológicas y operativas que implica remediar suelos contaminados, en biorreactores; peor aún de corte o ripios de perforación.

El uso de biorreactores en la biorremediación de suelos, cortes, ripios y sedimentos contaminados enfrenta una serie de problemas entre los cuales podemos mencionar:

- Los procesos abrasivos de estos materiales sobre la estructura del biorreactor.
- Su alta densidad y viscosidad exige el consumo de grandes cantidades de energía.
- Los niveles de ruido son elevados,
- El peso de los biorreactores es elevado por cuanto deben construirse con acero inoxidable de al menos 8-10 mm factor que incide sobre sus costos.
- Los biorreactores deben ser diseñados para ser esterilizados y mantener la esterilidad durante su operación, esterilizar un equipo tan grande presenta grandes dificultades operativas, aunque existen sistemas abiertos como diques, fosas y demás obras civiles de gran escala empleadas comúnmente para sistemas de tratamiento de aguas u otras aplicaciones en las que no es necesario mantener poblaciones puras.



**Figura 4.32.** Biorreactor para biorremediación

La Figura 4.32 muestra un esquema de un biorreactor que puede ser empleado para el tratamiento masivo de residuos de distinta naturaleza, al igual que los biorreactores empleados en la producción masiva de microorganismos, dispone de los siguientes componentes:

- Barreras físicas que garantizan la contención biológica (filtros, empaques, sellos, trampas de vapor, etc.);
- Sistema de transferencia de oxígeno (difusores de gases e impulsores);
- Sistema de transferencia de energía calorífica o calor para esterilización y/o enfriamiento (chaqueta o serpentín);
- Sistema de transferencia de momento para mantener la homogeneidad (impulsores, deflectores y difusores de gases);
- Puertos para la inoculación, la toma de muestra, la adición de reactivos (nutrientes, antiespumante, base, ácido) y la inserción de dispositivos y sensores de medición;
- Mirillas y equipo de seguridad (válvulas de alivio, discos de ruptura). Además, los biorreactores tienen múltiples conexiones a instrumentación y equipo de medición para control.

Los biorreactores pueden ser anaerobios si es que los microorganismos empleados en un proceso son anaerobios. En Ecuador su empleo en biorremediación ambiental a gran escala es nulo.

### 4.6. Fitorremediación

La fitorremediación es una técnica emergente de Biorremediación que se ha mostrado efectiva para el tratamiento de una amplia gama de residuos y contaminantes orgánicos e inorgánicos. Los sistemas de fitorremediación emulan a los sistemas naturales (humedales) en el tratamiento de aguas residuales de distinta fuente. En los últimos años se emplea la fitorremediación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, metales pesados, pesticidas, explosivos, etc., además de suelos que han pasado por una etapa previa de lavado o tratamiento biológico (Belimov et al., 2005).

Según Merkl et al., (2004), la fitorremediación es una tecnología *in situ* no destructiva y de bajo costo, basada en la estimulación de microorganismos degradadores autóctonos. Dentro de las técnicas de restauración de suelos afectados por la contaminación, la fitorremediación ha adquirido auge por ser un procedimiento pasivo, estéticamente agradable, útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes (Frick et al., 1999).

En la fitorremediación, las plantas y sus microorganismos o enzimas asociadas, en conjunto con técnicas agronómicas, realizan la degradación, la rizo remediación, fitoadsorción, fitoextracción, fitoacumulación, intercambio radicular, mineralización, y fito evaporación de contaminantes (Bruns-Nagel, et al., 2000). La fitorremediación presenta ventajas económicas, técnicas y ambientales, superiores a las técnicas tradicionales de remediación físicas, químicas, y técnicas de remediación térmica. Sin embargo, la fitorremediación, presenta limitaciones que impiden que esta técnica sea ampliamente explotada. Entre las desventajas podemos nombrar a:

- La necesidad de grandes espacios para su ejecución. Para el caso de aguas residuales 2m<sup>2</sup>/ habitante.
- Evaluación ambiental y de riesgo de que alguna de las plantas empleadas se convierta en plaga.
- La falta de investigación científica y técnica, para la Bioprospección



de plantas idóneas para la biorremediación y el conocimiento de su fisiología y ciclo reproductivo.

- La falta de regulaciones por parte de la autoridad competente para el uso y comercialización de estas plantas.
- La aceptación del público, como metodología ecoeficiente.

Con frecuencia, las plantas se utilizan para evaluar la toxicidad de los xenobióticos ambientales, mediante la cuantificación de su absorción en la planta o la observación de síntomas de su presencia. Pese a que aún se conoce poco sobre los efectos negativos o positivos de las raíces, sobre la biodisponibilidad de los contaminantes, la fitorremediación se muestra como una tecnología de amplias posibilidades en la descontaminación ambiental.

#### **4.6.1. Procesos de fitorremediación**

Los mecanismos bioquímicos que posibilitan el empleo de las plantas en el tratamiento de contaminantes ambientales son muy variados; cada uno presenta un potencial para degradar contaminantes específicos, tal como podemos verlo en la tabla 4.2, donde se detallan sus características.

- a) Fitoextracción.** - Las plantas que tienen su biomasa por encima del suelo de tamaño considerable y que se cosechan varias veces por temporada son los mejores candidatos para eliminar elementos tóxicos, por Fito extracción. Estas plantas, acumulan elementos tóxicos en el orden de 2-5% en peso seco dentro de sus tejidos (Brown et al., 1995).

Para Chaney et al., (1995) la capacidad de una especie de planta para fitorremediar con éxito un sitio contaminado con metales depende de la cantidad de metales que puede ser acumulado en la parte aérea de las plantas, de la tasa de crecimiento de la planta en cuestión, y de la densidad de siembra.

La fitoextracción debe considerarse como una tecnología de largo plazo, que puede requerir de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración de los contaminantes a niveles aceptables. El tiempo requerido para su eliminación, depende de la concentración y tipo

de contaminante(s), de la duración del periodo de crecimiento y de la eficiencia de remoción de la especie utilizada y puede tomar entre uno y 20 años (Vara Prasad y de Oliveira Freitas, 2003).

Para mejorar el proceso de fitoextracción, la biodisponibilidad del contaminante hacia las raíces puede facilitarse a través de la adición de agentes acidificantes, fertilizantes o quelantes (Vara Prasad y de Oliveira Freitas, 2003).

- b) Biosorción.** - es otra forma de Fito extracción, que emplea materiales biológicos (no necesariamente en todos los organismos vivos), entre los que podemos mencionar a varios grupos de algas que tienen paredes celulares con alta capacidad de adsorción de metales pesados (Kim et al., 1995; Wilson MW y Edyvean RG, 1995). Algunas especies de plantas con flores pueden actuar como biosorbentes muy eficientes, un ejemplo de estas es hediondilla (*Larrea tridentata*) que es empleado como material filtrante, tiene una alta capacidad para eliminar Cu (Gardea -Torresdey et al., 1996).
- c) Rizofiltración,** es el empleo de plantas cuyas raíces, que tienen la capacidad de absorber y precipitar los contaminantes del agua. Las plantas más eficientes son las herbáceas, que tienen raíces que se regeneran rápidamente y tienen gran área superficial. La Rizo filtración funciona mejor, cuando contaminantes están presentes en bajas concentraciones y en grandes volúmenes de efluente. Algunas plantas son capaces de concentrar metales tóxicos, sobre una base de peso en seco, a valores que van desde 131 hasta 563 veces su concentración en la fuente contaminante (Kumar et al., 1995).
- d) Fitoestabilización,** es el uso de plantas para estabilizar el sitio de las posibles vías de migración, incluso si las plantas eliminan físicamente poco o nada contaminantes, son útiles como agentes de Fito estabilización siempre que toleren y se desarrollen en sitios contaminados. Esta capacidad depende de la tolerancia de las plantas a los contaminantes. Con el propósito de maximizar la capacidad de Fito estabilización, se añaden enmiendas orgánicas al suelo y con ello se promueve el crecimiento exuberante de las plantas.

- e) **Fitoimmobilización** – que es la reducción de la “disponibilidad” de los metales en el suelo, mediante adsorción o absorción, y la precipitación o quelación en las raíces o en la rizosfera.

La tabla 4.2, ilustra el proceso de fitorremediación involucrado y el tipo de contaminante tratado.

**Tabla 4.2.** Procesos de fitorremediación (Golubev, 2011)

TIPO	PROCESO INVOLUCRADO	CONTAMINACIÓN TRATADA
Fitoextracción	Concentración de contaminantes en la parte aérea de la planta	Aguas contaminadas con Cd, Ni, Co, Cr, Hg, Pb, Se, Zn, etc.
Rizofiltración	Absorción radicular, concentración y precipitación de contaminantes de efluentes líquidos.	Aguas contaminadas con Cd, Ni, Co, Cr, Hg, Pb, Se, Zn, isótopos radioactivos y compuestos fenólicos
Fitoestabilización	Reducción de la movilidad de los contaminantes por plantas tolerantes.	Lagunas de desechos mineros, aguas residuales, con compuestos fenólicos y clorados
Fitoestimulación	Estimulación del crecimiento microbiano con exudados radiculares	Hidrocarburos y derivados, HAPs, benceno, tolueno, atrazina, aguas residuales agropecuarias.
Fitovolatilización	Captación y modificación de contaminantes y su liberación a la atmósfera por transpiración	Aguas residuales agropecuarias, solventes clorados Hg, Se.
Fitodegradación	Captación, almacenamiento y degradación de contaminantes y generación de metabolitos menos tóxicos.	Aguas residuales agropecuarias, explosivos, residuos clorados, pesticidas, fosfatos, nitratos

#### 4.6.2. Fitorremediación de metales pesados

La contaminación ambiental por metales pesados es muy común, en especial en los últimos años, gracias al incremento en la producción de bienes y servicios (en especial tecnológicos) que emplean como materias primas a estos elementos, o que simplemente son productos derivados de otros procesos productivos (minería, hidrocarburos). La lucha contra la contaminación por metales pesados enfrenta serios problemas, debido a la alta to-

xicidad de estos metales sobre los ecosistemas. Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo según Sauquillo et al., (2003), son:

- Características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de cambio, presencia de carbonatos, materia orgánica, textura; naturaleza de la contaminación.
- Origen de los metales y forma de deposición y
- Condiciones medioambientales: acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad.

La aplicación de las tecnologías de fitorremediación de suelos contaminados por metales como As, Cd, Cu, Pb y Zn, cuyos efectos negativos se ven agravados por la acidificación del suelo causada por la oxidación de los sulfuros metálicos, permite la Fitoextracción, esto es, la acumulación de los metales en las partes cosechables de las plantas y su eliminación del medio. En la fitorremediación activa, se ejecuta la introducción de enmiendas orgánicas que contribuyen a disminuir las formas disponibles de Zn, Cd, Fe y Mn en el suelo, debido a los cambios en el pH, tal como ocurre con el aporte de sales inorgánicas (principalmente fósforo) con el estiércol, y a la transformación de la materia orgánica (Clemente et al., 2006).

### **A) Especies vegetales empleadas en la fitorremediación de metales pesados**

La especie ***Brassica juncea***, es capaz de acumular Zn y, en especial, Pb gracias a la habilidad de las raíces y/o los microorganismos asociados para impedir el movimiento de los contaminantes en el suelo y su transferencia a la parte aérea de la planta. Los mecanismos involucrados incluyen la precipitación de los contaminantes en formas insolubles en el suelo y su acumulación en las vacuolas de las raíces (ver tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Plantas con capacidad de acumular metales pesados (Mc Intyre, 2004) A=acumulador, H= hiperacumulador, P= precipitador y T= tolerante

Nombre científico	Nombre común	Origen y características	Elementos	Elemento y grado de acumulación
Plantas acuáticas de humedales				
<i>Azolla foliculoides</i>	Helecho acuático	África, flotante	4	Cu <sup>A</sup> , Ni <sup>A</sup> , Mn <sup>A</sup> , Pb <sup>A</sup>
<i>Acopa monnieri</i>	Hisopo de agua	India, emergente	5	Cd <sup>H</sup> , Cr <sup>H</sup> , Cu <sup>H</sup> , Hg, Pb <sup>A</sup>
<i>Eichhornia crassipes</i>	Jacinto de agua	Planta tropical	6	Cd <sup>H</sup> , Cr <sup>A</sup> , Cu <sup>A</sup> , Hg <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn
<i>Hydrilla verticillata</i>	Hydrilla	Sudeste asiático	4	Cd <sup>H</sup> , Cr <sup>A</sup> , H <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup>
<i>Lemna minor</i>	Lenteja de agua	Norte América	4	Cd <sup>H</sup> , Cu <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn <sup>A</sup>
<i>Pistia stratiotes</i>	Lechuga de agua	Estados Unidos	4	Cd <sup>T</sup> , Cr <sup>H</sup> , Cu, Hg <sup>H</sup>
<i>Salvinia molesta</i>	Helecho acuático	India	4	Cr <sup>H</sup> , Ni <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn <sup>A</sup>
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Lenteja de agua gigante	Norte América	5	Cd <sup>H</sup> , Cr <sup>H</sup> , Ni <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn <sup>A</sup>
<i>Vallisneria americana</i>	Hierba cinta	Europa y norte de África	4	Cd <sup>H</sup> , Cr <sup>A</sup> , Cu <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup>
Plantas cultivadas				
<i>Brassica juncea</i>	Mostaza india		7	Cd <sup>A</sup> , Cr <sup>A</sup> , Cu <sup>H</sup> , Ni <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , U <sup>A</sup> , Zn <sup>H</sup>
<i>Heliantus annuus</i>	Giradol		4	Cs <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Sr <sup>H</sup> , U <sup>H</sup>
Plantas terrestres				
<i>Agrostis caltellana</i>	Pasto alemán	Portugal	5	Al <sup>A</sup> , As <sup>H</sup> , Mn <sup>A</sup> , Pb <sup>A</sup> , Zn <sup>A</sup>
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Pennicres alpino	Europa	7	Cd <sup>H</sup> , Co <sup>H</sup> , Cr <sup>A</sup> , Cu <sup>H</sup> , Ni <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn <sup>H</sup>
<i>Anthyrium yokoscense</i>	Helecho	Japón	4	Cd <sup>A</sup> , Cu <sup>H</sup> , Pb <sup>H</sup> , Zn <sup>H</sup>

Según Chen et al., (2001), las plantas que pueden tolerar, absorber y translocar altos niveles de ciertos metales, recibe el nombre de hiperacumuladoras (más de 0.1% de Ni, Co, Cu, Cr y Pb o 1% de Zn en peso seco de sus hojas. Las primeras plantas hiperacumuladoras identificadas pertenecen a las familias *Brassicaceae* y *Fabaceae*.

Los pastos son especies que se adaptan a una amplia variedad de condiciones edáficas y climáticas (Singh et al. 2003), razón por la cual, son el género más adecuado para la fitorremediación de formas orgánicas e inorgánicas de metales. En las *Asteraceae* se ha reportado la tolerancia al plomo en *Sonchus oleraceus*. La especie *Thlaspi caurulencens* de suelos contaminados con zinc y cadmio, logra eliminar más de 8 mg/Kg de cadmio y 200 mg/Kg de zinc, representado estos valores el 43 y 7 % de estos metales en un suelo agrícola, respectivamente (Lombi et al., 2001).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) (figura 4.33) es una especie que absorbe metales pesados acumulándolos más en sus raíces que en sus brotes; se caracteriza por ser híper acumuladores de Cd, Zn, Pb y elementos radiactivos por fitoextracción (Christie et al., 2004). De igual forma, otros autores han identificado la capacidad para la fitoextracción de un complejo de metales de suelos contaminados, en el maíz y girasol (Baldantoni et al., 2014).



Figura 4.33. *Helianthus annuus* (girasol)

## B. Especies utilizadas en fitorremediación de aguas residuales

Las especies de *Juncos Scirpus* sp se utilizan principalmente en humedales artificiales de flujo subsuperficial, el papel principal de los *Scirpus* en los humedales es el de actuar de filtro, potenciando los mecanismos de sedimentación-separación (Reyes-Luz et al., 2011). Su productividad es baja en relación con las eneas o los carrizos; aproximadamente es de 5-12 t m/ha/año, repartida prácticamente a partes iguales entre la biomasa aérea y la subterránea. Los contenidos en N y P de parte aérea y parte subterránea son, respectivamente del orden de 1.6% N y 0.12% P, y 1.2% N y 0.18% P. Poseen baja tolerancia a la inundación permanente, su aportación a la remoción de nutrientes es baja.

En Ecuador se los emplea para la remoción de P en plantaciones florícolas, así como en sistemas de tratamiento de aguas residuales orgánicas (camales, mercados). También se los ha empleado en el tratamiento de suelos contaminado con hidrocarburos, en el distrito amazónico (Derrame, Línea de flujo pozo Shushuqui 13)<sup>25</sup>

***Phragmites australis***, el carrizo, es una planta empleada en el tratamiento de aguas no contaminadas, así como en aguas contaminadas de naturaleza orgánica, alcalina o salina. En aguas no contaminadas su crecimiento es mayor, pero en esos medios resulta frecuentemente desplazado por otras especies más competitivas. Debido a su alta tolerancia a la contaminación, desplaza muy eficazmente a otras especies, y se propaga rápidamente, razón por la que muestran potencial de convertirse en una especie invasiva no deseable. Su expansión se relaciona con el incremento en la contaminación mineral de las aguas (especialmente, nitratos), y el aumento de su salinidad. Este factor es fundamental considerar, para eliminar las condiciones que facultan su expansión fuera del área de tratamiento; en consecuencia, se debe considerar en el Estudio de Impacto Ambiental de la implementación de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales (Wetzel, 2001).

La eficiencia de remoción de P puede llegar hasta el 90%. En cuanto a su tolerancia a la contaminación, soportan bien los niveles normales de

<sup>25</sup> Estudio realizado por la Universidad Técnica del Norte para el PRAS del Ministerio del Ambiente. 2010.

contaminación orgánica de las aguas residuales domésticas, siendo más eficientes en la remoción de N y P, que *Typha latifolia* (Curt, 2011). En el Ecuador se ha empleado exitosamente *Phragmites australis*, en el sistema de tratamiento de aguas residuales de la ciudad y el camal de Shushufindy, construido por el Dr. Ronald Lavigne con financiamiento del Banco Mundial y el Consejo Provincial de Sucumbíos; de igual forma en el Proyecto de vivienda COVIPRO del Consejo Provincial de Pichincha, en Santo Domingo de los Colorados.

***Typha spp.*** *Typha* se emplea ampliamente en sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas de flujo superficial, aprovechando su condición de halófito (planta sumergida), optimizando el papel filtrante de su sistema radicular. Los resultados de diferentes experiencias indican que, en comparación con otras plantas utilizadas para tratamiento de aguas (*Scirpus validus* y *Juncus effusus*, entre otras) las eneas son las plantas más utilizadas para tratamiento secundario (remoción de materia orgánica) y terciario (remoción de N y P) en climas templados. Su eficacia dependerá de los factores condicionantes del crecimiento de las plantas como la temperatura y la radiación. Las eneas, en medios naturales y en humedales artificiales, son plantas altamente productivas hasta 13 kg de biomasa total (aérea + sumergida, materia seca) por m<sup>2</sup> y año. Las extracciones se estiman en función de los contenidos de nutrientes en las distintas fracciones de la planta; pueden llegar a ser del orden de 180 g N/m<sup>2</sup> y 27 g P/ m<sup>2</sup>. (Wetzel, 2001).

***Eichhornia crassipes***, El jacinto de agua se utiliza en sistemas acuáticos de tratamiento de aguas residuales domésticas de climas cálidos, siendo el principal parámetro de diseño la carga orgánica. En estos sistemas, la profundidad recomendada para los estanques de tratamiento es del orden de 1 metro, a fin de que toda el agua bañe el sistema radicular de las plantas.

En tratamientos secundarios no aireados la carga típica de DBO<sub>5</sub> está en el intervalo de 40-80 kg/ha/día. También puede aplicarse como tratamiento terciario para la remoción de nitrógeno y fósforo. Su eficacia dependerá del grado de cobertura alcanzado, es decir, de su rendimiento en biomasa. *Eichhornia crassipes*, es una planta muy productiva, que en condiciones apropiadas alcanza rendimientos medios cercanos a 100 t de materia seca por hectárea y año, pero hay citas de incluso a 154 t/ha/año. El contenido



medio en nitrógeno y fósforo de la planta se puede estimar en 4% y 0.4%, respectivamente, por lo que potencialmente se podrían eliminar del influente del orden de 2000-6000 y 300-600 kg de nitrógeno y fósforo, respectivamente, por ha y año (Jayaweera, M. W., & Kasturiarachchi, J. C. 2004). También es eficaz para la remoción de sólidos en suspensión, y es utilizado para corregir los problemas derivados del desarrollo incontrolado de algas de las lagunas de oxidación.

***Lemna spp. (Lenteja de agua).*** Las *lentejas de agua* se pueden utilizar en sistemas acuáticos de tratamiento de aguas residuales, de modo semejante a la aplicación de los jacintos de agua. Estos sistemas suelen desarrollarse para el tratamiento de efluentes de lagunas facultativas, ya que permiten reducir eficazmente la concentración de algas del efluente, a consecuencia del efecto de sombreo creado por la cobertura de la lámina de agua. En Estados Unidos se han llevado a cabo eficazmente instalaciones de tratamiento de influentes de alta carga contaminante (420 mg/L de DBO<sub>5</sub> y 364 mg/L de sólidos en suspensión) con *Lemnaceae* (Leblebici, Z., & Aksoy, A. 2011). En relación con la remoción de nutrientes hay que indicar que el cuerpo vegetativo de las *Lemnaceae* tiene un alto contenido en nitrógeno total (4.6% de media y 7% máximo, sobre peso seco), por lo que, si se obtiene una alta productividad en biomasa y se retira del medio acuático periódicamente, pueden removerse del agua cantidades significativas de nitrógeno (Wetzel, 2001).

Con respecto al fósforo, hay que indicar que el contenido medio en la biomasa de *Lemnaceae* es del orden del 0.8%; la remoción de este contaminante dependerá igualmente de la productividad del sistema. Aproximadamente, un metro cuadrado de superficie de lámina de agua cubierta con *Lemna* equivale a 25 g de peso seco de biomasa. Suponiendo que se mantenga un ritmo de colonización de que cada 4 días se duplique la superficie, se podría remover del sistema mediante la cosecha periódica de la biomasa producida en la mitad de la superficie 1.16 g de N y 0.2 g de P cada cuatro días (Verma, R., & Suthar, S. 2014).

### C. Fitorremediación de suelos

Los suelos contaminados son ecosistemas complejos; que requieren de la selección de una combinación apropiada de planta-microorganismo, de

la interacción entre los componentes del suelo, de la optimización de la productividad de las comunidades microbianas que influyen positiva o negativamente sobre la eficacia de la fitorremediación y de las condiciones ambientales del sitio sometido a fitorremediación (Liu, C., et al 2020). Adicionalmente desempeña un rol importante el acondicionamiento de los suelos a tratar mediante la adición de tamices moleculares y fuentes solubles de nutrientes.

Entre los microorganismos del suelo, los microorganismos relacionados a la rizosfera proporcionan un enlace directo entre el suelo y las raíces y desempeñan un importante papel en la fitoextracción y Fitoestabilización de suelos contaminados. Teniendo en cuenta que los microorganismos asociados al sistema radicular vegetal son simbiotes específicos, se debe prestar atención especial a los mecanismos de cómo estos están involucrados en la absorción y el transporte metales pesados en las plantas y a la tolerancia de las plantas a los metales (Chen et al., 2003; Göhre y Paszkowski, 2006).

En la fitorremediación, la selección de las especies de plantas apropiadas es el primer paso para una fitoextracción exitosa de metales pesados, en especial del Cd, varias fuentes evidencian la acumulación de Cd en los brotes; sin embargo, desde el punto de vista ambiental, es más importante la capacidad de remoción total (Cd g/planta), ya que la planta puede acumular altas concentraciones de este metal. Sin embargo, la concentración de Cd biodisponible en el suelo no es una constante y disminuye con el tiempo (Vig, K., et al 2003). Esto hace evidente la necesidad de realizar más estudios para determinar los cambios en biodisponibilidad de los metales, bajo condiciones ambientales en constante cambio y la influencia de distintos tipos de suelos, tal como ocurre en las distintas regiones del Ecuador.

**Marismas:** Son ecosistemas húmedos con plantas herbáceas que crecen sobre el agua marina o una mezcla de agua dulce y marina (salobre), suelen estar asociados a estuarios. La sal influye en la dinámica de la vegetación del Pantano del ecosistema estuarino y retiene eficazmente metales antropogénicos liberados en el sistema. Las plantas vasculares de marismas son determinantes en la dinámica del ecosistema estuarino, influyen fuertemente los procesos de acumulación y retención de metales pesados, en los tejidos vegetales y por sobre todo en el sistema radicular, la tempo-

rada de crecimiento a partir de los sedimentos (Li, X., et al 2014) Por esta razón las plantas vasculares pueden actuar como sumideros temporales para los metales pesados.

Debido a la liberación de oxígeno y compuestos orgánicos de la rizosfera de las plantas de marismas, la biogeoquímica de los sedimentos se modifica sustancialmente, así como la especiación de metales y su biodisponibilidad. En consecuencia, la captación o liberación de metales pesados varía, en especial por la senescencia y la generación de tejidos narcotizados, con la consecuente re-entrada de los metales para al ambiente circundante en una forma química diferente de la absorción (Koop-Jakobsen, K., et al 2018). Adicionalmente, el ciclo biogeoquímico de la comunidad microbiana que habita en la rizosfera, la descomposición de materia orgánica y los vínculos que esta establece con los metales pesados, el proceso se mejora o se retrasa y se reinicia. Por todos estos fenómenos las marismas son ecosistemas ideales para estudiar la fitorremediación y sus posibilidades de aplicación en otras áreas contaminadas (Caçador y Duarte, 2011).

El fitotratamiento de suelos contaminados con metales pesados, es hasta el momento, la opción comercial más viable, de menor costo en comparación con el tratamiento químico, sin embargo, existe preocupación por la ulterior liberación de especies metálicas solubles al suelo y su posterior lixiviación a las aguas subterráneas (Khan, N., & Bano, A. 2018). No obstante, la persistencia de quelantes biodegradables en el suelo saneado es otro motivo de preocupación. Estas preocupaciones se justifican por su amplio empleo masivo en Fitominería, durante la fitorremediación de un sitio contaminado con metales, el comportamiento eventual de los agentes quelantes depende de la concentración del metal y de la posible interacción entre los metales y quelantes. Indudablemente que existen muchos factores que considerar y estudiar para asegurarse de que la utilización de fitorremediación para la limpieza de suelos contaminados no termine en la creación de otro problema (Ismail, 2011).

#### **D. Fitorremediación de residuos mineros**

En la fitorremediación de residuos mineros se han empleado dos especies: *Cattails* (typha) y turba (*Sphagnum*) (Kadlec et al., 2000; Witthar, 1993;). Ambas especies se caracterizan por ser tolerantes al ácido y por prosperar

bajo una variedad de condiciones ambientales. *Typha* es de fácil propagación, produce gran biomasa puede crecer en aguas con concentraciones del hierro de hasta 100 mg/l. Existe en la mayoría de los sistemas de humedales con densidades de la planta de 0,5 a 1,0 por pie cuadrado en la mayoría de los humedales (Witthar, 1993). Esta versatilidad y resistencia, junto con su capacidad de fijar el hierro y el manganeso por adsorción, le hacen una excelente opción vegetativa para remediar el drenaje de ácido de la minería.

Estudios realizados en *Sphagnum* muestran la influencia significativa del pH en la eliminación de los metales (Witthar, 1993). Los estudios muestran que el empleo de *Sphagnum* es desventajoso debido a que el pH es difícil de mantener (Kadlec et al., 2000), en virtud de los cambios de acidez, es susceptible a acumular Fe, reacciona negativamente a los cambios en la carga de sedimentos, al clima, a la química del agua, a la profundidad y velocidad de flujo “ (Witthar, 1993), razón por la que *Sphagnum* es menos viable al uso del *Thypha*. (Gamonal, 2010).

Para la ejecución de investigaciones de tratamiento de suelos mediante fitorremediación, las pruebas de microcosmos resultan de gran ayuda por ser un puente entre la teoría de laboratorio y la realidad de campo (Fraser, 1999). Según autores como Cuadrado, 2009; Merini y Giulietti 2009, la presencia de los cuatro elementos: suelo, planta, microflora y contaminante, convierte al microcosmos en un sistema experimental útil para determinar el papel de los factores bióticos y abióticos en un proceso de fitorremediación, así como sus interacciones.

En relación con los microorganismos asociados a plantas empleadas en fitorremediación, la mayoría de los aislados no han sido aún identificados, sin embargo, se han caracterizado a cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Methanococcus*, bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno, asociadas a plantas que crecen en humedales naturales, de igual forma cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos (Reyes-Luz et al., 2010).

En la degradación de pesticidas, se han identificado especies bacterianas como *Micrococcus sp.* cepa SC 1204, *M. sigmoidal*, *M. luteus*, aisladas del agua de un humedal empleado en tratamiento de aguas residuales

agrícolas; estas cepas han mostrado su capacidad para degradar acetamiprid (ACE), bajo condiciones optimizadas a escala de laboratorio, hasta un 69,84%, con mayor efecto degradador después de 24 h a 40°C, en presencia de 70 mg L<sup>-1</sup> de concentración inicial de ACE (Kanjilal, et al., 2015).

Los taxones como  $\Delta$  proteobacteria (*Desulfobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, y *Desulfobulbaceae*), y *Clostridios*, *peptococcaceae*, y las cepas de los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfosporosinus*, son capaces de degradar sulfatos y tolueno (Winderl et al., 2010). Estas bacterias son las más abundantes de la zona anóxica de la rizosfera, son Grampositivas, formadoras de esporas, anaerobios obligados con una amplia capacidad metabólica (Paredes et al., 2005).

La capacidad para degradar pesticidas clorados identificada en la clase clostridio, ha sido confirmada por varios autores (Lauga et al., 2013), en especial lindano y DDT, bajo condiciones anaeróbicas (Bao et al., 2012). Una segunda clase bacteriana de importancia en la degradación de pesticidas es Actinobacteria, que posee especies tanto anaeróbicas facultativas como aeróbicas (Fuentes et al., 2010). Un sin número de estudios demuestran la importancia del metabolismo de las poblaciones bacterianas Grampositivas en zonas anóxicas en el metabolismo de pesticidas clorados (Elsayed et al., 2015).

#### 4.7. Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales

Son sistemas, que emulan los pantanos o humedales naturales en el tratamiento de aguas residuales industriales, negras y lixiviados. Están diseñados para imitar los procesos que ocurren en los pantanos naturales. Utilizan plantas y suelos propios de pantanos naturales. Emplean microorganismos asociados a las plantas para el tratamiento de aguas.

El tratamiento tiene tres componentes básicos:

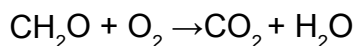
1. Remoción de sólidos.
2. Tratamiento biológico.
3. Deshidratación de lodos orgánicos

La remoción de sólidos se produce en tanques de sedimentación de hormi-gón armado, con capacidad variable que depende del volumen de aguas a tratar y del tipo de aguas residuales (Moreira, F. D., & Dias, E. H. O. 2020). Los tanques retienen alrededor del 65% de los sólidos suspendidos que posteriormente se tratarán en los reed beds. El 35% restante es retenido en la fase piedra arena, en las líneas de distribución.

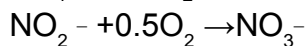
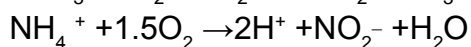
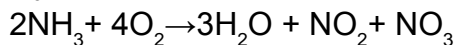
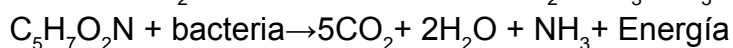
El tratamiento biológico se produce gracias a la participación de bacterias asociadas a las plantas de pantano, quienes les proveen de oxígeno a través de sus raíces. La degradación aeróbica coexiste con la anaeróbica a corta distancia de las raíces. Las plantas absorben materiales por sus raíces y los utilizan para el crecimiento y almacenamiento en raíces, tallos, hojas).

La degradación biológica ocurre en dos lechos: Uno de lijado y otro de pu-lido. Los tiempos de retención requeridos se mantienen y controlan en una caja de salida diseñada para proveer rangos de carga variable desde cero hasta uno. Los procesos bioquímicos que se operan en el microambiente radicular son:

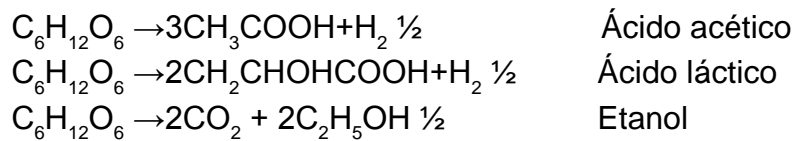
Oxidación carbonácea



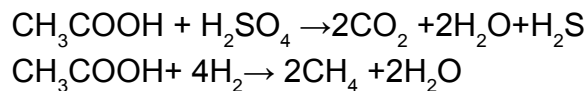
Nitrificación



La deshidratación de lodos orgánicos se produce en lechos de junquillos (Reed Beds). Los lechos de secado se construyen a continuación de los decantadores y pueden almacenar materia sólida. Los líquidos que se producen caen al fondo y por gravedad entran al sistema de tratamiento (Stefanakis et al., 2014).



En la segunda etapa los productos son transformados por vía anaerobia (Stefanakis et al., 2014)



#### 4.7.1. Tipos de humedales

Los humedales pueden clasificarse en función del objetivo para el cual son diseñados.

- **Humedales artificiales para el control de inundaciones:** Estos sistemas de humedales se construyen para recibir la escorrentía superficial durante eventos de inundación (Tsihrintzis et al., 1998), reduciendo así el volumen de aguas pluviales que llegan al sistema de alcantarillado y a las plantas de tratamiento.

Según Shutes et al., (2010), estos sistemas pueden contribuir a la Gestión integral del Agua Urbana, incrementando la capacidad de reciclar el volumen de agua almacenada.

- **Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales:** El propósito de estos humedales es, recibir y tratar las aguas residuales de diversos tipos, basado en los procesos de tratamiento de origen natural. Estos humedales se clasifican a su vez en función del tipo de flujo del agua a través del sistema de tratamiento y del tipo de vegetación empleada. En función del flujo, existen dos sistemas (Vymazal, 2007; Kadlec, 2009).

**A. Humedales flujo superficial de agua libre,** en HFSL, el agua fluye lentamente por encima de un medio filtrante, creando así una superficie de agua libre con una profundidad de columna de agua por lo general de unos pocos centímetros.

**B. Humedales del flujo subsuperficial.** En HFSS, el agua fluye dentro de un sustrato poroso; esto es, no existe espejo de agua libre. Dependiendo de la dirección de la trayectoria de flujo, HFSS puede subdividirse en de flujo horizontal (HFSSH) o de flujo vertical (HFSSV).

En dependencia de las características de crecimiento de la vegetación, se distinguen:

- a) Humedales de plantas flotantes (HPF) (Figura 4.34)
- b) Humedales con macrófitas Emergente (HME) y
- c) Humedales con macrófitas Sumergidos (HMS) (Figura 4.35)



Figura 4.34. Esquema humedal con plantas flotantes

Según Vymazal et al., (1998); los sistemas los humedales para tratamiento de aguas se construyen con especies de macrófitas emergentes enraizadas.

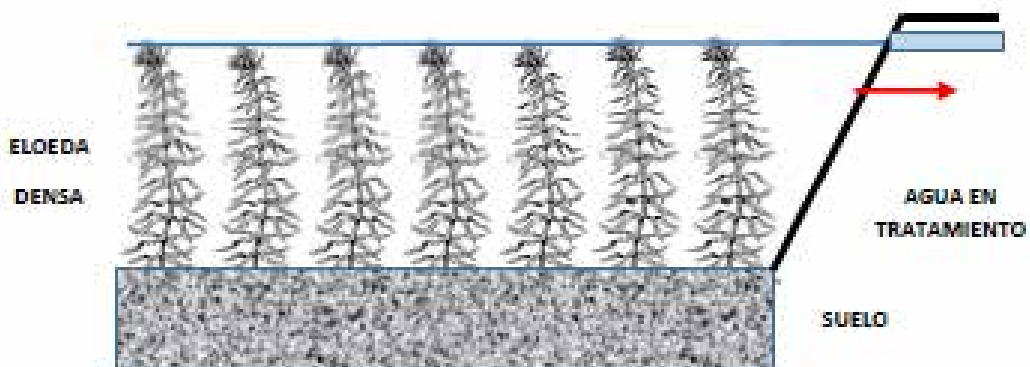


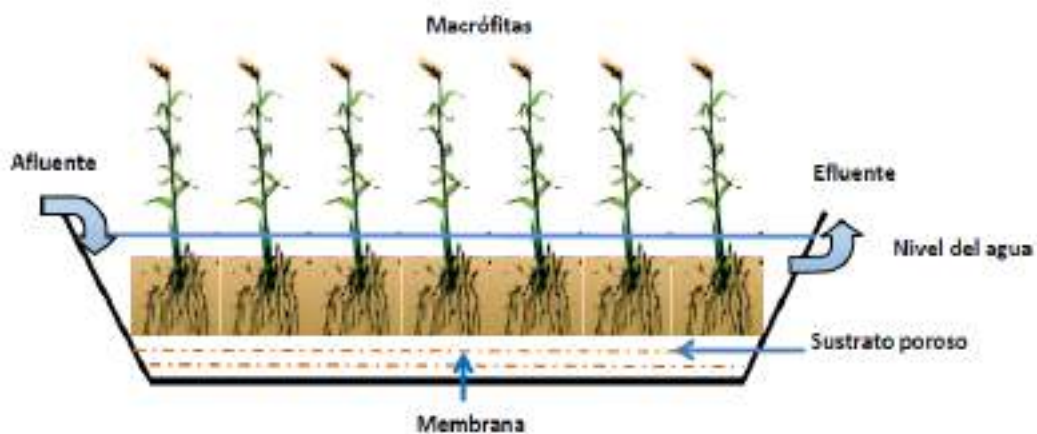
Figura 4.35. Esquema de humedal con plantas sumergidas



#### 4.7.1.1. Humedales artificiales de flujo superficial libre

El uso de los sistemas HFSL es más común en América del Norte, donde se los utiliza casi exclusivamente para el tratamiento de aguas residuales municipales (Kadlec, 2009). Los sistemas HFSL disponen de canales poco profundos o cuencas, con fondos impermeabilizados con geotextil o arcilla, para evitar la infiltración de aguas residuales a los niveles freáticos.

Disponen de una capa de suelo de hasta 40 cm de espesor, donde los macrófitas (generalmente emergentes, sumergidas o flotantes) se plantan. El agua fluye horizontalmente a baja velocidad por encima de la capa de suelo a lo largo del sistema, creando una profundidad columna de agua de unos 20-40 cm (Vymazal et al., 2006) o incluso hasta 80 cm (Akratos et al., 2006); por lo tanto, existe espejo de agua libre expuesto a la atmósfera y a la luz solar parcial. Este es un factor negativo por cuanto permite la reproducción de mosquitos y la generación de malos olores. Estos humedales se parecen más a los humedales naturales y, por lo tanto, proporcionan más hábitat a la vida silvestre (figura 4.36).



**Figura 4.36.** Humedal de flujo libre horizontal superficial

El nivel del agua sobre el humedal se mantiene con un nivel de control de salida apropiada. El agua entra en contacto con los granos del suelo y partes de las plantas, y los contaminantes presentes en ella son sometidos a una serie de procesos físicos, biológicos y químicos, mediados por los

microorganismos asociados a las plantas y los microorganismos presentes en el sustrato poroso de los lechos del humedal.

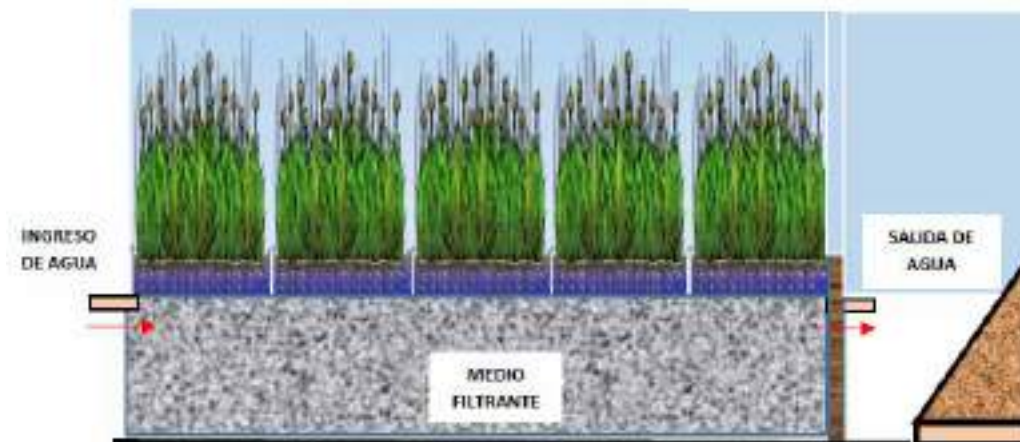
Estos humedales han mostrado eficiencia en la eliminación de sólidos suspendidos (SS) y de la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ). Adicionalmente la eliminación de nitrógeno (N), patógenos y otros contaminantes, como metales pesados; es alta, mientras que la eliminación del fósforo (P) es limitado (Kotti et al., 2010; Tsihrintzis y Gikas, 2010). La concentración del oxígeno disuelto (OD) en la columna de agua, varía de alta (cerca de la superficie) a cero (en la parte inferior).

Las aplicaciones típicas de HFSL incluyen, el tratamiento avanzado de efluentes secundarios y el tratamiento de aguas pluviales. Con frecuencia, antes del tratamiento de aguas residuales crudas, están equipados con un sistema de pretratamiento, además requieren una superficie de tratamiento mayor que otros tipos de humedales y su eficiencia depende de las características de las aguas residuales y del área específica de contacto ofrecida por el medio poroso y las raíces de las plantas del humedal (Wetlands, 2000; Kotti et al, 2010).

### **4.7.1.2 Humedales de flujo horizontal subsuperficial**

Los humedales de flujo horizontal superficial (HFHS), son lechos de grava o tierra plantados con cañas comunes. El agua fluye horizontalmente a lo largo del lecho debajo de la superficie del sustrato a través de los poros del medio filtrante y de las raíces de las plantas. Al no existir espejo de agua, no se desarrollan mosquitos, ni se generan malos olores. El medio filtrante es una mezcla de arena y grava, cuyo espesor varía entre 30 y 80 cm (Crites, 1988; Crites et al, 2006; Akrotos y Tsihrintzis, 2007), al igual que el sistema anterior el fondo del lecho está impermeabilizado con geomembrana. El piso del lecho tiene una pendiente equivalente del 1-3%, que garantiza la direccionalidad del movimiento de los líquidos (Figura 4.37).

El agua se mantiene bajo la superficie a unos 5-15 cm de profundidad, el afluente se distribuye en forma uniforme a través de tubería de PVC perforada dispuesta en forma de espina de pescado a lo largo y ancho de todo el lecho. En Ecuador se ha construido humedales con niveles de agua a 30 cm de la superficie y un espesor total del lecho filtrante de 80 cm.



**Figura 4.37.** Humedal de flujo horizontal subsuperficial

Este tipo de humedales presentan costos de inversión mayores a los anteriores. Son eficaces en el tratamiento de aguas residuales municipales. El material poroso y el biofiltro formado por las raíces de las plantas estimulan la formación de la biopelícula, encargada de la degradación de los contaminantes y los SS por vía anaerobia, en tanto que el N y P se eliminan por vía anaerobia en los niveles más profundos de los lechos (Stefanakis et al., 2011).

Según investigaciones las mejoras en la eficiencia de esos sistemas de tratamiento, han permitido la recirculación del efluente y el uso de las aguas residuales tratadas en la alimentación (Stefanakis y Tsihrintzis, 2009); esta posibilidad es vital para sitios donde el agua dulce es escasa y los costes de producción y conducción son elevados.

#### **4.7.1.3. Humedales de flujo vertical subsuperficial**

Estos humedales, fueron desarrollados inicialmente, como una etapa intermedia después de un tanque séptico anaeróbico y antes de un HFHS. Este tipo de humedales a diferencia de HFHS, tiene altos valores de CTO (capacidad de transferencia de oxígeno), valores que amplifican el nitrógeno amoniacal (Cooper, 1999). Adicionalmente los HFVSS, requieren áreas más pequeñas (hasta 2m<sup>2</sup>/hab), en comparación de los sistemas HFSL, que requieren de 5-10 m<sup>2</sup>/hab, en dependencia de las características de las aguas a tratar.

Este tipo de humedales han sido construidos en Dinamarca, Austria, Alemania, Francia y el Reino Unido, pero también en los Estados Unidos, (Davis et al., 1995), de igual forma en Colombia y Ecuador en la Provincia de Sucumbíos ciudad de Shushufindy. Los lechos, se llenan con capas de material pétreo, cuya granulometría incrementa con la profundidad. La profundidad del lecho varía entre 0,45 a 1,20 m., la pendiente de 1-2% del fondo permite la recogida de agua tratada y el drenaje fuera de la unidad. Al igual que en los otros sistemas el fondo del lecho está cubierta por una geomembrana o puede estar hecho de hormigón armado (Figura 4.38).

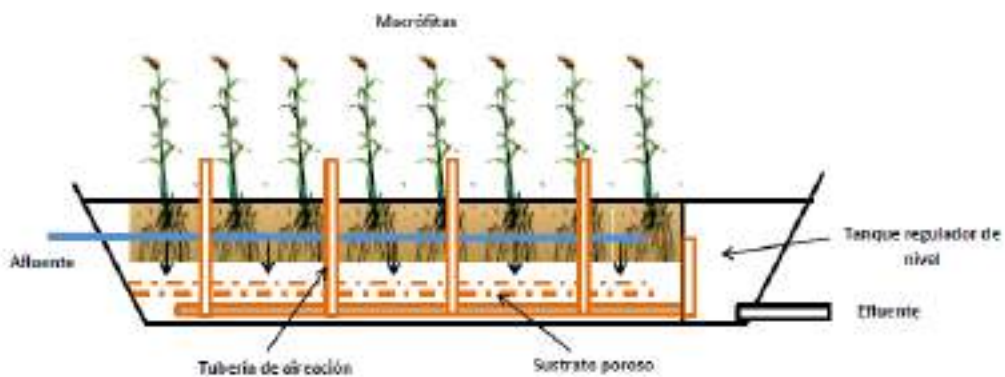


Figura 4.38. Humedal de flujo horizontal subsuperficial

La planta empleada con preferencia en este tipo de humedales es *Phragmites australis*, y los medios porosos empleados en Francia, son de granulometría diferente siendo más gruesa en los primeros (lechos de lijado), y más fina en los segundos lechos (lechos de pulido) en comparación con el diseño común en otros países europeos y los Estados Unidos (Molle et al., 2005). Igual característica presentan los lechos de los sistemas construidos en Ecuador.

#### 4.7.1.4. Humedales híbridos (HH)

Los sistemas híbridos son combinaciones de diferentes tipos de humedales destinadas a mejorar la eficiencia global (Vymazal, 2011), de los humedales. El problema de los HFS de valores bajos de CTO, que generan una baja tasa de nitrificación, puede ser compensado con HH que son más

eficaz en la nitrificación (por su superior CTO). Las combinaciones más comunes implementadas son:

(a) una etapa con unidades de HFVSS seguidos por unidades de HFSL en serie y (b) una Etapa HFSL seguido por unidades de FHVSS.

La primera combinación, es diseñada para proporcionar buenas condiciones oxidativas (nitrificación) para el nitrógeno de amoníaco. En el sistema de HFSL que sigue, las formas oxidadas de nitrógeno se transforman por desnitrificación, también se elimina la materia orgánica y sólidos solubles (Cooper, 2001). Variantes de esta combinación incluyen varias unidades de HFVSS que funcionan en paralelo, seguido por una tercera etapa de dos o tres unidades de HFSL (Vymazal, 2005). Varios otros autores han realizado un sin número de combinaciones, con diferente número de etapas, con distintos medios filtrantes, para distintos tipos de aguas (Ovel et al, 2007; Molle et al., 2008; Melian et al., 2010; Wen et al., 2012).

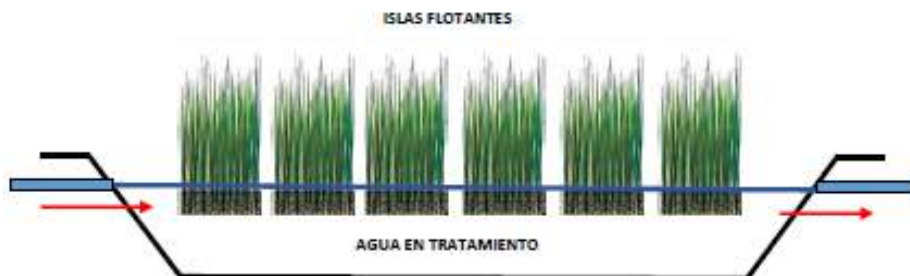
En la segunda combinación, el sistema HFSL, se coloca primero para eliminar MO y SS, y posteriormente el sistema HFVSS para la desnitrificación (Xinshan et al., 2010). Debido al incremento de la concentración de nitrato en el efluente, este tiene que ser recirculado de nuevo al pretratamiento (tanque de sedimentación), con el fin de lograr una mayor eliminación total de nitrógeno (Cui et al., 2006; Masi et al., 2007).

Existen combinaciones que emplean de 1-4 etapas de tratamiento en serie, para aguas de uso doméstico (Gaboutloeloe et al., 2009; Seo et al., 2008). Estos sistemas se han estudiado en zanjas hidropónicas con diferentes profundidades (Ren et al., 2011), con un reactor anaeróbico para el tratamiento de aguas residuales domésticas (Singh et al., 2009), con filtros de escoria de acero para el tratamiento de aguas residuales lácteas (Lee et al., 2010).

#### **4.7.1.5. Humedales de tratamiento flotante**

Este sistema conocido como “islas flotantes” (Figura 4.39), representan un nuevo desarrollo en la construcción de humedales. Por sus características, son una combinación los HFS y HFVSS y sistemas de lechos (Van de Moortel et al., 2010). La diferencia básica con los anteriores es que las

plantas no están establecidas en medios porosos o el suelo, sino en un elemento que flota sobre el agua (Tanner y Headley, 2011).



**Figura 4.39.** Humedales con islas flotantes

La plataforma de sustentación vegetal está hecha de plástico, material que soporta la carga hidráulica y los factores ambientales. Las plantas flotantes desarrollan un extenso y denso sistema de raíces debajo de la plataforma y dentro del agua. (De Stefani et al., 2011). En el sistema radicular se desarrolla el biofilm que degrada los contaminantes y la planta toma los nutrientes necesarios para su crecimiento directamente de la columna de agua (Xin et al., 2012).

Este tipo de humedales se han aplicado para el tratamiento de aguas pluviales (Headley y Tanner, 2012), aguas residuales domésticas (Van de Moortel et al., 2010), aguas residuales agrícolas y municipales (De Stefani et al., 2011), aguas de río y de lagos (Hubbard, 2010), y aguas eutrofizadas (Zhao et al, 2012).

### 4.8.2. Diseño y construcción

Cada sistema de tratamiento debe ser diseñado para un residuo líquido específico, por lo general incluye la impermeabilización del fondo y taludes de los lechos. El empleo de un sistema de capas de material poroso filtrante con granulometría creciente, sobre el cual crecen plantas de pantano. El sistema reticular (biofiltro) formado por las raíces de las plantas, que proveen de oxígeno para el desarrollo microbiano que ejecuta la degradación de contaminantes.

El empleo de tuberías válvulas y accesorios que permiten el ingreso, salida y caudal de flujo de las aguas en tratamiento. Debido a que la arena, grava, el material de impermeabilización, tuberías, válvulas y accesorios de PVC, son virtualmente indestructibles, la vida de los SBS es teóricamente infinita. Los humedales de flujo subsuperficial también son conocidos como Pantanos secos artificiales (PSA) o Biofiltros de lecho sumergido (BLS), trabajan bajo condiciones adversas en ambientes extremadamente fríos y calurosos.

#### **4.8.2.1. Ventajas**

Los PSA o BLS, presentan un sin número de ventajas ambientales, económicas y operativas

##### **Ventajas ambientales**

- a) No generan malos olores, debido a que los procesos bioquímicos de degradación son aeróbicos; sus productos son CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub>, etc.
- b) No existe espejo de agua libre, razón por la cual, no generan mosquitos y enfermedades propagadas por estos vectores.
- c) Presentan altos rendimientos de tratamiento, hasta el 98% del DBO<sub>5</sub>
- d) Posibilidad de reutilizar las aguas en otras actividades (agrícola, piscicultura, lavado, etc.)
- e) En su construcción se utilizan materiales naturales (grava, arena, piedras, plantas)
- f) Se adapta a cualquier relieve del terreno.
  - g) El área del pantano puede ser utilizada para recreación.

##### **Ventajas operativas**

- a) Muy poca o ninguna energía eléctrica.
- b) No necesita bombeo, trabaja por gravedad
- c) Poco personal de mantenimiento y operación.
- d) Su construcción es modular.
- e) Un incremento de volumen de aguas residuales a tratar se cubre con la construcción de un nuevo módulo.

### **Ventajas económicas**

- a) Bajos costos operativos.
- b) No requiere químicos.
- c) Las plantas que crecen sobre el pantano pueden tener valor económico (albahaca).
- d) Costo de metro cubico tratado con reducción anual.

#### **4.8.2.2. Materiales de construcción**

Desde el punto de vista económico y ambiental, la construcción de los PSA o BLS, presentan ventajas únicas, por cuanto la mayoría de los materiales empleados son de fácil acceso, de costos medios y de alta durabilidad. Exceptuando la tubería de PVC y la geomembrana, todos son materiales naturales. Los materiales empleados en los sistemas construidos en Ecuador son: Arena (30cm), tubería de distribución de 20 cm. Grava de 5/8, (10 cm.), Grava de 3/4, (10cm.), Piedra bola (30 cm.), tubería de recolección de 315mm y Arcilla roja impermeabilizante (25cm), o geomembrana.

#### **4.8.2.3. Parámetros de diseño**

Para el diseño se debe considerar a los humedales como biorreactores que trabajan por flujo de pistón, observando la ley de Darcy a través de un medio poroso. Los parámetros de diseño que se deben tomar en cuenta son:

- Cálculo del área necesaria.
- Profundidad del humedal.
- Pendiente.
- Sustrato.
- Relación, largo – ancho

En el dimensionamiento de los humedales, los valores de SS <math>DBO\_5</math> <math>nitrógeno</math> <math>fósforo</math> son fundamentales y tiene que guardar la relación definida para garantizar la eliminación efectiva de los diversos contaminantes (Kadlec y Knight, 1996). En el diseño se puede considerar los parámetros de volumen y el de área (Wallace y Knight., 2006), al considerar el volumen, es necesario emplear el tiempo de retención hidráulica como garantía de eficiencia del tratamiento, al considerar el área se debe aplicar un modelo  $k-C^*$  (Economopoulou y Tsihrintzis, 2004).



**Para Humedales de flujo horizontal libre**

- **Cálculo del área superficial**

El cálculo del área superficial se realiza en función al parámetro contaminante que se desea disminuir o remover, generalmente los diseños se realizan para disminución de la DBO<sub>5</sub>. El área superficial se calcula a través de la ecuación.

$$\ln [(C_o - C^*)/C_i - C^*] = -kA/q \quad (\text{Ec.1})$$

Donde Co = Concentración afluente (mg/l)

Ci = concentración efluente (mg/l)

C\* = Concentración de fondo (mg/l)

kA = Constante de velocidad superficial de primer (m/d)

q = Tasa de carga hidráulica (m/d)

La carga hidráulica, también puede ser expresada por:

$$q = Q/A \quad (\text{Ec.2})$$

Donde, Q = caudal medio de aguas residuales (m<sup>3</sup>/d)

A = Área del humedal (m<sup>2</sup>)

Combinando las dos ecuaciones, el área del humedal puede ser calculada como:

$$A = Q \ln [(C_i - C^*)/C_o - C^*] / kA \quad (\text{Ec.3})$$

La constante kA es dependiente de la temperatura (Kadlec, 1994):

$$kA = k_{20} \Theta^{(T-20)} \quad (\text{Ec.4})$$

Donde, k<sub>20</sub> = constante de velocidad superficial de primer orden a 20 ° C (m/d)

Θ = coeficiente de temperatura para la constante de velocidad

La ecuación puede tener la forma siguiente:

$$AS = \frac{Q \cdot L N \frac{C_o}{C}}{KT \cdot h \cdot \eta} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde:

Q= caudal de diseño del humedal (m<sup>3</sup>/día)

- C= concentración efluente (mg/l)
- Co= concentración afluente (mg/l)
- KT= Constante de reacción de primer orden dependiente de la temperatura ( $d^{-1}$ )
- h= profundidad del humedal (m)
- $\eta$ = porosidad del medio granular (porcentaje expresado en fracción)

La constante de reacción de primer orden se calcula mediante la Ecuación:

$$KT = 1,104 * 1,06^{T2-20} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde:

T2= temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ )

La profundidad del humedal generalmente varia de 0,3 a 1 m (valor usual 0,6m), con una pendiente de 0,1 a 1%, siendo el valor usual de 0,5%.

- **Ancho**

Para calcular el ancho del humedal consideramos la ley de Darcy, para flujo en medio poroso.

$$Ac = \frac{Q}{(Ks * S)} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde:

Ac= área vertical en  $m^2$

Q= caudal medio en  $m^3/s$

Ks= Conductividad hidráulica (m/s)

S = pendiente (m/m)

El ancho del humedal (m) se determina en función al área vertical y la profundidad del nivel de agua a tratar.

$$W = \frac{Ac}{h} \quad (\text{Ec.8})$$

- **El largo** del humedal se determina en función al ancho y al área superficial como se muestra en la ecuación.

$$L = \frac{As}{W} \quad (\text{Ec.9})$$

Donde:

As= Área superficial del humedal ( $m^2$ )

W= ancho del humedal (m)

- **La relación largo-ancho (L/A):**

Mientras mayor es la relación largo-ancho se tiene mejor depuración de las aguas, pero se pueden presentar problemas de flujos preferenciales, presencia de agua sobre el lecho de grava y otros. Para evitar esto, se recomienda una relación; largo – ancho de: 2 a 1, 3 a 1 y 4 a 1.

- **Sustrato o medio filtrante:**

Es el medio donde crecen las plantas, los microorganismos y se realizan los principales procesos de depuración. Para el diseño se recomienda utilizar grava con menos de 30 mm (3/4”) de diámetro que parece ser la que funciona mejor. Mayores diámetros, incrementan la velocidad del paso del agua y la producción de turbulencias impidiendo el cumplimiento de la ley de Darcy. Diámetros menores en cambio, reducen la velocidad del paso de agua y originan zonas con presencia de agua en la superficie y flujos preferenciales, pero tienen la ventaja de proporcionar una mayor área superficial para la actividad microbiana y la adsorción.

Los suelos empleados como sustrato poroso son arcillas, para adsorber metales pesados, fosfatos, etcétera; sin embargo, estos presentan el inconveniente de la reducción de la velocidad de paso del agua.

En la tabla 4.4, se muestran los materiales empleados en la construcción de humedales. Antes del inicio del diseño se recomienda realizar pruebas de conductividad y porosidad del sustrato (grava), de esta manera se selecciona el sustrato adecuado. Se recomienda multiplicar el valor de la conductividad por 1/3 o bien por 0.1 (10%) para evitar problemas de atascamiento por acumulación de lodos, raíces y otros. Con relación a la uniformidad del material este debe tener un coeficiente de uniformidad entre 1 y 6.

**Tabla 4.4.** Materiales empleados en la construcción de humedales de flujo horizontal

Tipo de material	Tamaño efectivo D10 (mm)	Conductividad hidráulica, Ks (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /d)	Porosidad, n %
Arena gruesa	2	100-1.000	28-32
Arena gravosa	8	500-5.000	30-35
Grava fina	16	1.000-10.000	35-38
Grava media	32	10.000-50.000	36-40
Roca gruesa	128	50.000-250.000	38-45

En la tabla 4.5., se muestra un resumen de los principales parámetros de diseño de los humedales subsuperficiales de flujo horizontal.

**Tabla 4.5.** Parámetros de diseño de un humedal de flujo horizontal (Delgado, 2010)

Parámetros	Unidad	Intervalo	Valor usual
Tiempo de retención hidráulico	días	4-15	7
Profundidad del agua	m	0.1-0.8	0.6
Área	m <sup>2</sup> /heq	2,5-5	
Carga orgánica	gDBO <sub>5</sub> /m <sup>3</sup> día	3-7,5	<11
Carga orgánica	kgDBO <sub>5</sub> /heq.día	<70	
Carga hidráulica	m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> . día	0,1-0,2	
<b>Características constructivas</b>			
Grava ingreso salida	mm	50-100	50
Grava media	mm	3-6	19
		5-10	
		6-12	
Coeficiente uniformidad		3-5	<5
Profundidad del medio	m	0,70-1,5	0,7
Pendiente	%	0-1	0,5
Relación largo ancho		2:1-7:1	3:1
<b>Drenaje</b>			
Tubería perforada tamaño	pulgada	3-4	4
<b>Distribución del agua</b>			
Tubería perforada- canal	pulgada	2-4	3

**Para Humedales subsuperficiales de flujo vertical**

Los cálculos de diseño de este tipo de humedales se basan en el número de usuarios (población). El agua se aplica, a través de unas tuberías que se colocan encima del lecho de grava o arena. Para un mejor funcionamiento

de estos humedales, se debe considerar siempre en el diseño, la construcción de dos humedales para que operen en paralelo, es decir, que cada humedal tenga un periodo de reposo y un periodo de aplicación de agua. El periodo de reposo óptimo es que por cada periodo de alimentación se tenga dos periodos de reposo.

Generalmente se emplean dos tipos de lechos uno de lijado y otro de pulido, pudiendo en función del volumen de agua a tratar y de sus características ( $DBO_5$ , SS, etc.), disponer de varios lechos de lijado y varios lechos de pulido, trabajando en paralelo o en forma secuencial.

La tubería de distribución del agua a tratar se dispone a 30 cm bajo el nivel superior del lecho. La tubería está perforada y dispuesta en forma de espinazo de pez. Cubriendo toda el área operativa del lecho del humedal. La tubería de recolección (evacuación) del agua que ha pasado por el biofiltro, se dispone en la base del lecho, en medio del material pétreo de mayor diámetro (piedra bola).

Esta tubería al igual que la tubería de distribución tiene la forma de espina de pez, con tubos respiradores que salen hasta la superficie del lecho a lo largo del perímetro (Figura 4.39 y 4.40).



**Figura 4.39.** Distribución de la tubería. A) y B) Tubería de evacuación de humedales construidos en Ecuador

*Fotos de Ronald Lavigne*

Adicionalmente cada tubo respirador dispone de tapones, para evitar el ingreso de aguas lluvias o basura.

Los tubos de respiración se emplean para oxigenar los lechos y realizar trabajos de limpieza y mantenimiento de la tubería del humedal.



**Figura 4.41.** Tubería de distribución y humedal para aguas residuales en Shushufindi Ecuador

*Fotos de Ronald Lavigne*

Para evitar que el nivel de agua supere la altura de la tubería de distribución, los lechos disponen de tanque reguladores de caudal, con un sifón que libera el exceso de agua de los lechos y conduce el agua al siguiente lecho de tratamiento.

Para el diseño de este tipo de humedales se deben calcular:

- El área necesaria.
- Profundidad del humedal.
- Pendiente.
- Sustrato.

### • **Cálculo del área necesaria**

El cálculo del área del humedal se realiza en función de la población equivalente y del régimen de tratamiento del humedal primario o secundario.

La población equivalente se puede expresar en función de la carga orgánica biodegradable, en términos de demanda biológica de oxígeno ( $DBO_5$ ), de 60 g de oxígeno por día. La carga contaminante de las aguas grises viene determinada por la suma de los habitantes (usuarios) de las industrias asentadas en el municipio y que vierten a la red de colectores municipales.

$$\frac{\text{Población equivalente}}{(\text{hab})} = \frac{DBO_5 \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) * \text{Caudal} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{d}}\right)}{60 \frac{\text{g} DBO_5}{\text{día}} * \text{hab}} \quad (\text{Ec.9})$$

El humedal trabaja como tratamiento primario cuando se aplica aguas residuales pretratadas, es decir, aguas que fueron sometidas a un pretratamiento físico (rejillas de desbaste y desarenador).

El humedal trabaja como tratamiento secundario, cuando las aguas residuales a aplicarse al humedal ya recibieron un tratamiento primario, en un tanque séptico, reactor UASB, IMHOFF, lagunas anaerobias, u otro método. Para ambos casos existen ecuaciones que determinan las áreas superficiales de los humedales.

- **Humedal como tratamiento primario**

1,2 m<sup>2</sup> / P para sistemas de alcantarillado separativo

1,5 m<sup>2</sup> / P para sistemas de alcantarillado unitario.

$$As = \frac{Q}{THA} \quad (\text{Ec.10})$$

- **Humedal como tratamiento secundario**

0,8 m<sup>2</sup> / Hab, para sistemas de alcantarillado separativo

1,0 m<sup>2</sup> / hab, para sistemas de alcantarillado unitario

Según Crites et al., (2000) el área se calcula en base en la tasa hidráulica de aplicación.

La tasa hidráulica de aplicación se calcula con la ecuación

$$THA = \frac{TCH}{F} \quad (\text{Ec.11})$$

Donde:

Q = caudal m<sup>3</sup>/día

THA= Tasa hidráulica de aplicación (mm/dosis)

TCH= Tasa de carga hidráulica (mm/día)

F = Frecuencia de dosificación (dosis/día)

- **Profundidad del humedal**

La profundidad del humedal suele ser de unos 60 a 80 cm. El agua fluirá a través del medio poroso y se recogerá en una red de tuberías de drenaje situada en el fondo del lecho.

- **Pendiente**

La pendiente de la superficie del humedal es plana (0%), este debe ser realizado con mucho cuidado para evitar que se formen charcos de agua sobre la superficie. La pendiente del fondo o lecho del humedal varía de 0.5 a 2% pero generalmente se utiliza una pendiente ligera del 1%.

- **Sustrato**

El sustrato está conformado por varias capas de material según el tipo de uso que se le dará al humedal (tratamiento primario o secundario) como se observa en la tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Características del sustrato para diseño de humedales verticales

Capa	Tratamiento primario	Tratamiento secundario
Capa superficial	h>30cm grava fina, diámetro efectivo de 2-10 mm.	h>30cm de arena fina, diámetro efectivo de 25 a 40mm.
Intermedia	h de 10 a 15 cm grava fina diámetro efectivo 5 a 20 mm.	h 10-20 cm de grava fina, diámetro efectivo de 3 a 10 mm.
Drenaje	h de 10 cm, grava de diámetro efectivo de 20 a 40 mm.	h de 10 cm, grava de diámetro efectivo de 20 a 40 mm.

**H= altura**

Para el diseño de este tipo de humedales se requieren las siguientes condiciones. Para humedales que funcionaran como tratamiento primario: coeficiente de uniformidad menor a 5; el caudal de aplicación del agua residual debe ser mayor al caudal de infiltración; el agua residual contiene partículas suspendidas, por ende, la conductividad hidráulica se reduce, teniéndose la expresión en la ecuación.

$$K_{sf} = 0,6 * K_s \quad (\text{Ec.12})$$

De la misma forma el cálculo del caudal de infiltración se muestra en la ecuación.

$$Q_i = A_s * K_{sf} * 3600 \quad (\text{Ec.13})$$

Para humedales que funcionaran como tratamiento secundario la condición es que el caudal de aplicación sea mayor al caudal de infiltración y la fórmula del caudal de infiltración se reduce a:



$$Q_i = A_s * K_s * 3600 \quad (\text{Ec.14})$$

Donde:

Qi= caudal de infiltración (m<sup>3</sup>/h)

As= area superficial (m<sup>2</sup>)

Ks= conductividad hidráulica (m/s)

En la tabla 4.7., se muestra las principales características de los sustratos empleados para el diseño y construcción de humedales verticales.

**Tabla 4.7.** Materiales empleados en el diseño y construcción de humedales verticales

Tipos	Tamaño efectivo D <sub>10</sub> (mm)	Conductividad hidráulica, ks (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /d)
Arena gruesa	2	100-1.000
Arena gravosa	8	500-5.000
Grava fina	16	1.000-10.000
Grava media	32	10.000-50.000
Roca gruesa	128	50.000-250.000

La única condición de estos humedales es mantener una simetría rectangular o cuadrada, que la superficie del humedal tenga una pendiente de 0%. Las principales características de estos humedales se muestran en la tabla 4.8.

**Tabla 4.8.** Parámetros de diseño de un humedal de flujo vertical (Delgadillo, 2010)

Parámetros	Unidad	Intervalo	Valor usual
Medio filtrante			
Arena fina lavada (secundario)	mm	0,25-0,75	0,35
Grava fina (primario)	mm	2.00-8,00	2-5 mm
Profundidad	cm	45-90	60
Coefficiente de uniformidad	%	3-6	<4
Porcentaje de finos	%	2-5	<4
		<4	<4
Drenaje			

Tubería perforada			
Tamaño	Pulg	3-4	4
Pendiente	%	0,-1	0,5
Grava drenaje	mm	20-40	40
<b>Distribución de agua</b>			
Diámetro de tubería	pulg	1-2	1,5
Distancia entre tuberías	m	0,5-1,2	0,6
Orificio distribución	mm	3-8	6
Distancia entre orificios	m	0,5-2	0,6
<b>Parámetros de diseño</b>			
Carga hidráulica	l/m <sup>2</sup> *d	40-60	50<0,005
Carga orgánica	kgDBO <sub>5</sub> /m <sup>2</sup> . d	0,0025- 0,01	
<b>Dosificación</b>			
Frecuencia	Veces/d	4-24	12
Volumen orificio	l/orif.*dosis	0,6-1,1	0,9
Tiempo aplicación	minutos	2-15	5

Además del diseño hidráulico, se tiene que considerar el diseño de las tuberías de aplicación de agua, potencia de bomba, el diseño de la red de tuberías de drenaje, tiempo de operación y aplicación de las aguas residuales al humedal.

#### **4.9. Conclusiones y perspectivas futuras**

Desde el punto de vista profesional, vemos a la fitorremediación como una de las técnicas que mayor desarrollo recibirán en el futuro, no solo por su versatilidad en cuanto a la capacidad para degradar una amplia gama de contaminantes ambientales, sino también por la gran diversidad genética de organismos fotosintéticos cuyo metabolismo ofrece ventajas evolutivas frente al trabajo frecuentemente aislado de cepas bacterianas o fúngicas. La capacidad para establecer nexos de cooperación simbiótica incrementa en gran medida sus potencialidades.

Para Ecuador, poseedor de toda la gama de pisos climáticos y una enorme biodiversidad genética asociada, la fitorremediación abre un campo promi-

sorio, que no solo permitirá resolver los problemas de contaminación ambiental que le aquejan, sino que también, le permitirán brindar soluciones ecológicas a las ciudades agobiadas por la falta de espacios públicos y de recreación. El diseño paisajístico y de conservación ambiental de los humedales artificiales, ofrece a las ciudades espacios de sano esparcimiento y saneamiento ambiental, permitiendo recuperar las aguas residuales para otros usos productivos, regeneración y revegetación urbana, a más de labores de riego y recreación.

#### 4.10. Bibliografía

1. Abu Laban, N., Selesi, D., Jobelius, C., & Meckenstock, R. U. (2009). Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 68(3), 300-311.
2. Akrotos, C. S., Tsihrintzis, V. A., Pechlivanidis, I., Sylaios, G. K., y Jerrentrup, H. (2006). A free-water surface constructed wetland for the treatment of agricultural drainage entering Vassova Lagoon, Kavala, Greece. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15(12), 1553-1562.
3. Akrotos, C. S., y Tsihrintzis, V. A. (2007). Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecological engineering*, 29(2), 173-191.
4. Arroyo, M. A. R. O. T. O., Quesada, J., Quesada, R., y Geocisa, J. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México, 4(5), 297-305.
5. Baldantoni, D., Cicatelli, A., Bellino, A., & Castiglione, S. (2014). Different behaviours in phytoremediation capacity of two heavy metal tolerant poplar clones in relation to iron and other trace elements. *Journal of environmental management*, 146, 94-99.
6. Bao, P., Hu, Z. Y., Wang, X. J., Chen, J., Ba, Y. X., Hua, J., ... y Wu, C. Y. (2012). Dechlorination of p, p'-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. *Environmental pollution*, 162, 303-310.
7. Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V., Piluzza, G., Bullitta, S., y Glick, B. R. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 241-

- 250.
8. Bernal, I. S., Arias, M. C., Domínguez, M. D. C. D., Oviedo, R., Valdés, M. E. C., y Sardiñas, A. M. (2010). Bacterias como herramientas potenciales en el mejoramiento de humedales artificiales para el tratamiento de aguas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-10.
  9. BIOPILE DESIGN AND CONSTRUCTION MANUAL. Naval Facilities Engineering Service Center Port Hueneme, California. BATTELLE Environmental Restoration Department 505 King Avenue Columbus, Ohio 43201. Technical Memorandum TM-2189-ENV.1996. p:6-10.
  10. Brown, K. S. (1995). The green clean. *Bioscience*, 45(9), 579-582.
  11. Bruns-Nagel, D., Knicker, H., Drzyzga, O., Bütehorn, U., Steinbach, K., Gemsa, D., y von Löw, E. (2000). Characterization of 15N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state 15N NMR spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environmental science & technology*, 34(8), 1549-1556.
  12. Caçador, I., y Duarte, B. (2011). Salt marshes: an interesting ecosystem to study phytoremediation. *Handbook of Phytoremediation: Nova Science Publishers, Inc.*
  13. Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., y Baker, A. J. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current opinion in Biotechnology*, 8(3), 279-284.
  14. Chen, B. D., Li, X. L., Tao, H. Q., Christie, P., y Wong, M. H. (2003). The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, 50(6), 839-846.
  15. Chen, B., Christie, P., y Li, X. (2001). A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*, 42(2), 185-192.
  16. Christie, P., Li, X., y Chen, B. (2004). Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil*, 261(1), 209-217.
  17. Clemente, R., Escolar, Á., y Bernal, M. P. (2006). Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology*, 97(15), 1894-1901.
  18. Cooper, P. (1999). A review of the design and performance of vertical-flow and hybrid reed bed treatment systems. *Water Science and*

- Technology, 40(3), 1-9.
19. Cooper, P. F. (2001). Nitrification and denitrification in hybrid constructed wetlands systems. Transformations of nutrients in natural and constructed wetlands, 257-270.
  20. Crites, R. W. (1988). Design manual: constructed wetlands and aquatic plant systems for municipal wastewater treatment. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Center for Environmental Research Information.
  21. Crites, R. W., Middlebrooks, E. J., & Bastian, R. K. (2014). Natural wastewater treatment systems. CRC press.
  22. Crites, R., Tchobanoglous, G., Camargo, M., Pardo, L., y Mejia, G. (2000). Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. McGraw-Hill.
  23. Cuadrado, V. (2009). Estudios de rizorremediación de suelos contaminados con herbicidas organoclorados.
  24. Cui, L. H., Liu, W., Zhu, X. Z., Ma, M., Huang, X. H., y Xia, Y. Y. (2006). Performance of hybrid constructed wetland systems for treating septic tank effluent. Journal of Environmental Sciences, 18(4), 665-669.
  25. Curt, M. (2011). Macrofitas de interés en fitodepuración. Manual de fitodepuración. Filtros de macrofitas en flotación. Pp 101
  26. Davis, L., Edwards, R., Garber, L., y Isaacs, B. (1995). A handbook of constructed wetlands, Volume 1: General considerations. US Environmental Protection Agency (EPA). Washington DC.
  27. De Stefani, G., Tocchetto, D., Salvato, M., y Borin, M. (2011). Performance of a floating treatment wetland for in-stream water amelioration in NE Italy. Hydrobiologia, 674(1), 157-167.
  28. Delgadillo, O. (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Nelson Antequera.
  29. Economopoulou, M. A., y Tsihrintzis, V. A. (2004). Design methodology of free water surface constructed wetlands. Water resources management, 18(6), 541-565.
  30. Elsayed, O. F., Maillard, E., Vuilleumier, S., Millet, M., y Imfeld, G. (2015). Degradation of chloroacetanilide herbicides and bacterial community composition in lab-scale wetlands. Science of the total environment, 520, 222-231.
  31. Fitzpatrick, G. E., Worden, E. C., y Vendrame, W. A. (2005). Historical development of composting technology during the 20th century. HortTechnology, 15(1), 48-51.

32. Footer, A. (2013). *Bokashi Composting: Scraps to Soil in Weeks*. New Society Publishers.
33. Fraser, L. H. (1999). The use of microcosms as an experimental approach to understanding terrestrial ecosystem functioning. *Advances in Space Research*, 24(3), 297-302.
34. Frick, C. M., Germida, J. J., y Farrell, R. E. (1999, December). Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. In technical seminar on chemical spills (pp. 105a-124a). Environment Canada; 1998.
35. Fuentes, M. S., Benimeli, C. S., Cuozzo, S. A., y Amoroso, M. J. (2010). Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(6), 434-441.
36. Gaboutloeloe, G. K., Chen, S., Barber, M. E., y Stöckle, C. O. (2009). Combinations of horizontal and vertical flow constructed wetlands to improve nitrogen removal. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 9(3), 279-286.
37. Gamonal, P. (2012). Tratamiento de drenaje de ácidos de minas en humedales construidos. *Biofilms*, 16.
38. Gardea-Torresdey, J. L., Bibb, J., Tiemann, K. J., Gonzalez, J. H., y Arenas, J. L. (1996). Adsorption of copper ions from solution by heavy metal stressed *Larrea tridentata* (creosote bush) biomass. Erickson, LE Erickson, DL Tillson, SC Grant, JP McDonald.
39. Gikas, G. D., Tsihrintzis, V. A., Chatzigeorgiou, G., y Kapollas, D. (2010, May). Constructed wetlands for wastewater treatment of Kyprinos settlement. In Proceedings of the Conference “Small Scale Water and Wastewater Treatment Facilities”, 14-15 May, Skiathos Island (pp. 25-31).
40. Göhre, V., y Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223(6), 1115-1122.
41. Golubev, I. A. (2011). *Handbook of phytoremediation*. New York: Nova Science Publishers.
42. Headley, T. R., y Tanner, C. C. (2012). Constructed wetlands with floating emergent macrophytes: an innovative stormwater treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(21), 2261-2310.
43. Hubbard, R. K. (2010). Floating vegetated mats for improving surface

water quality. In *Emerging environmental technologies*, Volume II (pp. 211-244). Springer, Dordrecht.

Internet

44. Jayaweera, M. W., & Kasturiarachchi, J. C. (2004). Removal of nitrogen and phosphorus from industrial wastewaters by phytoremediation using water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). *Water Science and Technology*, 50(6), 217-225.
45. Kadlec, R. H. (2009). Comparison of free water and horizontal subsurface treatment wetlands. *Ecological engineering*, 35(2), 159-174.
46. Kadlec, R. H. (81), Knight, RL (1996) *Treatment Wetlands*. Lewis Publishers, New York
47. Kadlec, R., Knight, R., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., y Haberl, R. (2000). *Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation*. IWA publishing.
48. Kanjilal, T., Bhattacharjee, C., y Datta, S. (2015). Bio-degradation of acetamiprid from wetland wastewater using indigenous *Micrococcus luteus* strain SC 1204: Optimization, evaluation of kinetic parameter and toxicity. *Journal of Water Process Engineering*, 6, 21-31.
49. Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K., y Harayama, S. (2001). Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil spill accident. *Environmental Microbiology*, 3(4), 246-255.
50. Khan, N., & Bano, A. (2018). Role of PGPR in the phytoremediation of heavy metals and crop growth under municipal wastewater irrigation. In *Phytoremediation* (pp. 135-149). Springer, Cham.
51. Kim, Y. H., Yoo, Y. J., y Lee, H. Y. (1995). Characteristics of lead adsorption by *Undaria pinnatifida*. *Biotechnology Letters*, 17(3), 345-350.
52. Kleinstuber, S., Schleinitz, K. M., & Vogt, C. (2012). Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(4), 851-873.
53. Knicker, H., Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., von Löw, E., & Steinbach, K. (1999). Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters. *Environmental science & technology*, 33(2), 343-349.
54. Koop-Jakobsen, K., Mueller, P., Meier, R. J., Liebsch, G., & Jensen, K. (2018). Plant-sediment interactions in salt marshes—an optode imaging study of O<sub>2</sub>, pH, and CO<sub>2</sub> gradients in the rhizosphere. *Frontiers in*

- plant science, 9, 541.
55. Kotti, I. P., Gikas, G. D., y Tsihrintzis, V. A. (2010). Effect of operational and design parameters on removal efficiency of pilot-scale FWS constructed wetlands and comparison with HSF systems. *Ecological Engineering*, 36(7), 862-875.
  56. Kumar, P. N., Dushenkov, V., Motto, H., y Raskin, I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental science & technology*, 29(5), 1232-1238.
  57. Lauga, B., Girardin, N., Karama, S., Le Ménach, K., Budzinski, H., y Duran, R. (2013). Removal of alachlor in anoxic soil slurries and related alteration of the active communities. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1089-1105.
  58. Leblebici, Z., & Aksoy, A. (2011). Growth and lead accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): interactions with nutrient enrichment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214(1), 175-184.
  59. Lee, M. S., Drizo, A., Rizzo, D. M., Druschel, G., Hayden, N., y Twohig, E. (2010). Evaluating the efficiency and temporal variation of pilot-scale constructed wetlands and steel slag phosphorus removing filters for treating dairy wastewater. *water research*, 44(14), 4077-4086.
  60. Li, X., Ren, L., Liu, Y., Craft, C., Mander, Ü., & Yang, S. (2014). The impact of the change in vegetation structure on the ecological functions of salt marshes: the example of the Yangtze estuary. *Regional environmental change*, 14(2), 623-632.
  61. Liu, C., Lin, H., Li, B., Dong, Y., & Yin, T. (2020). Responses of microbial communities and metabolic activities in the rhizosphere during phyto-remediation of Cd-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110958.
  62. Lombi, E., Zhao, F. J., Dunham, S. J., y McGrath, S. P. (2001). Phyto-remediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 30(6), 1919-1926.
  63. Masi, F., Martinuzzi, N., Bresciani, R., Giovannelli, L., y Conte, G. (2007). Tolerance to hydraulic and organic load fluctuations in constructed wetlands. *Water science and technology*, 56(3), 39-48.
  64. Melián, J. H., Rodríguez, A. M., Araña, J., Díaz, O. G., y Henríquez, J. G. (2010). Hybrid constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in the Canary Islands. *Ecological Engineering*, 36(7), 891-899.
  65. Merini, L. J., y Giulietti, A. M. (2009). Fitorremediación de herbicidas



- organoclorados: Diseño de estrategias biotecnológicas para su aplicación en la producción agrícola.
66. Merkl, N., Schultze-Kraft, R., y Infante, C. (2004). Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics-Pre-selection of plant species from eastern Venezuela. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 78(3), 185-192.
  67. Molle, P., Liénard, A., Boutin, C., Merlin, G., & Iwema, A. (2005). How to treat raw sewage with constructed wetlands: an overview of the French systems. *Water Science and Technology*, 51(9), 11-21.
  68. Molle, P., Prost-Boucle, S., y Lienard, A. (2008). Potential for total nitrogen removal by combining vertical flow and horizontal flow constructed wetlands: a full-scale experiment study. *Ecological engineering*, 34(1), 23-29.
  69. Morales, S. L. V., Balagurusamy, N., Herrera, R. R., Noé, C., González, A., yChávez, J. A. M. (2014). Biodegradación Anaerobia de Hidrocarburos Aromáticos Contaminantes del Medio Ambiente y Alimentos Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbon Pollutants of the Environment and Food. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11).
  70. Moreira, F. D., & Dias, E. H. O. (2020). Constructed wetlands applied in rural sanitation: A review. *Environmental Research*, 110016.
  71. Moshiri, G. A. (2020). *Constructed wetlands for water quality improvement*. CRC Press.
  72. Musat, F., y Widdel, F. (2008). Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environmental Microbiology*, 10(1), 10-19.
  73. Öövel, M., Tooming, A., Muring, T., y Mander, Ü. (2007). Schoolhouse wastewater purification in a LWA-filled hybrid constructed wetland in Estonia. *Ecological Engineering*, 29(1), 17-26.
  74. Paredes, C. J., Alsaker, K. V., y Papoutsakis, E. T. (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 969-978.
  75. Rahman, I. M. M., Hossain, M. M., Begum, Z. A., Rahman, M. A., & Hasegawa, H. (2011). Eco-environmental consequences associated with chelant-assisted phytoremediation of metal-contaminated soil. *Handbook of phytoremediation*, 709-722.
  76. Reisinger, H. J., Mountain, S. A., Hullman, A. S., Darnall, A. W., y Montney, P. A. (1995). Pressure dewatering: An extension of bioventing te-

- chnology. In *In situ aeration: Air sparging, bioventing, and related remediation process*.
77. Ren, Y. X., Zhang, H., Wang, C., Yang, Y. Z., Qin, Z., y Ma, Y. (2011). Effects of the substrate depth on purification performance of a hybrid constructed wetland treating domestic sewage. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 46(7), 777-782.
  78. Reyes-Luz, M. I., Guido-Zárate, A., Bernal-González, M., Ramírez-Burgos, L. I., Padrón-López, R. M., Salgado-Bernal, I., ... y Durán-de-Bazúa, C. (2011). REMOCIÓN DE FÓSFORO DE AGUAS RESIDUALES EN UN SISTEMA DE HUMEDALES ARTIFICIALES A ESCALA DE LABORATORIO PHOSPHORUS REMOVAL FROM WASTE WATERS IN AN ARTIFICIAL WETLANDS SYSTEM AT LAB SCALE.
  79. Rodale, J. I. (Ed.). (1960). *The complete book of composting*. Rodale Books.
  80. Sahuquillo, A., Rigol, A., y Rauret, G. (2003). Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(3), 152-159.
  81. Schleinitz, M., & Vogt, C. (2012). Sabine Kleinsteuber, Kathleen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94, 851-873.
  82. Seo, D. C., Hwang, S. H., Kim, H. J., Cho, J. S., Lee, H. J., DeLaune, R. D., ... y Heo, J. S. (2008). Evaluation of 2-and 3-stage combinations of vertical and horizontal flow constructed wetlands for treating greenhouse wastewater. *Ecological engineering*, 32(2), 121-132.
  83. Shutes, R. B. E., Revitt, D. M., y Scholes, L. N. (2010). *Constructed wetlands for flood prevention and water reuse*.
  84. Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., y Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 405-412.
  85. Singh, S., Haberl, R., Moog, O., Shrestha, R. R., Shrestha, P., y Shrestha, R. (2009). Performance of an anaerobic baffled reactor and hybrid constructed wetland treating high-strength wastewater in Nepal—A model for DEWATS. *ecological engineering*, 35(5), 654-660.
  86. Smith, M., Friend, D., and Johnson, H. (2007). *Composting for the homeowner*, University of Illinois Extension, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign. [web.extension.uiuc.edu/homecompost/history.html](http://web.extension.uiuc.edu/homecompost/history.html)
  87. Stefanakis, A. I., Akrotos, C. S., y Tsihrintzis, V. A. (2011). Effect of was-

- tewater step-feeding on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37(3), 431-443.
88. Stefanakis, A. I., y Tsihrintzis, V. A. (2009). Effect of outlet water level raising and effluent recirculation on removal efficiency of pilot-scale, horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Desalination*, 248(1-3), 961-976.
  89. Stefanakis, A., Akrotos, C. S., y Tsihrintzis, V. A. (2014). Vertical flow constructed wetlands: eco-engineering systems for wastewater and sludge treatment. Newnes.
  90. Tanner, C. C., y Headley, T. R. (2011). Components of floating emergent macrophyte treatment wetlands influencing removal of stormwater pollutants. *Ecological Engineering*, 37(3), 474-486.
  91. Tchobanoglous, G., Theisen, H., y Vigil, S. (1993). *Integrated solid waste management: Engineering principles and management Issues*. McGraw-Hill.
  92. Tsai, J. C., Kumar, M., & Lin, J. G. (2009). Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 847-855.
  93. Tsihrintzis, V. A., John, D. L., y Tremblay, P. J. (1998). Hydrodynamic modeling of wetlands for flood detention. *Water resources management*, 12(4), 251-269.
  94. Tsihrintzis, V. A., y Gikas, G. D. (2010). Constructed wetlands for wastewater and activated sludge treatment in north Greece: a review. *Water Science and Technology*, 61(10), 2653-2672.
  95. USEPA, (1988). *Design Manual. Constructed Wetlands and Aquatic Plant Systems for Municipal Wastewater Treatment*. U.S. Environmental Protection Agency: Office of Research and Development, Cincinnati, OH, USA.
  96. USEPA, 2000b. *Wastewater Technology Fact Sheet: Free Water Surface Wetlands*. EPA 832-F-00-024; U.S. Environmental Protection Agency: Office of Water, Washington, D.C., USA. wetlands
  97. Van de Moortel, A. M., Meers, E., De Pauw, N., y Tack, F. M. (2010). Effects of vegetation, season and temperature on the removal of pollutants in experimental floating treatment wetlands. *Water, Air, & Soil Pollution*, 212(1), 281-297.
  98. Vara Prasad, M. N., y de Oliveira Freitas, H. M. (2003). Metal hyp-

- raccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic journal of biotechnology*, 6(3), 285-321.
99. Verma, R., & Suthar, S. (2014). Synchronized urban wastewater treatment and biomass production using duckweed *Lemna gibba* L. *Ecological Engineering*, 64, 337-343
100. Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*, 8(1), 121-135.
101. Vymazal, J. (2005). Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological engineering*, 25(5), 478-490.
102. Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the total environment*, 380(1-3), 48-65.
103. Vymazal, J. (2011). Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environmental science & technology*, 45(1), 61-69.
104. Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. F., Haberl, R., Perfler, R., y Laber, J. (1998). Removal mechanisms and types of constructed wetlands. *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*, 17-66.
105. Vymazal, J., Greenway, M., Tonderski, K., Brix, H., y Mander, Ü. (2006). Constructed wetlands for wastewater treatment. In *Wetlands and natural resource management* (pp. 69-96). Springer, Berlin, Heidelberg.
106. Wallace, S. D., y Knight, R. L. (2006). *Small-scale constructed wetland treatment systems: feasibility, design criteria and O & M requirements*. IWA Publishing.
107. Wen, Y., Xu, C., Liu, G., Chen, Y., y Zhou, Q. (2012). Enhanced nitrogen removal reliability and efficiency in integrated constructed wetland microcosms using zeolite. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 6(1), 140-147.
108. Wetlands, F. W. S. (2000). *Technology Fact Sheet*.
109. Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. gulf professional publishing.
110. Widdel, F., y Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259-276.
111. Winderl, C., Penning, H., Von Netzer, F., Meckenstock, R. U., & Lueders, T. (2010). DNA-SIP identifies sulfate-reducing *Clostridia* as im-

- portant toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment. The ISME Journal, 4(10), 1314-1325.
112. Xin, Z. J., Li, X. Z., Nielsen, S., Yan, Z. Z., Zhou, Y. Q., Jia, Y., ... y Sun, Y. G. (2012). Effect of stubble heights and treatment duration time on the performance of water dropwort floating treatment wetlands (FTWs). *Ecological Chemistry and Engineering S*, 19(3), 315-330.
113. Xinshan, S., Qin, L., y Denghua, Y. (2010). Nutrient removal by hybrid subsurface flow constructed wetlands for high concentration ammonia nitrogen wastewater. *Procedia Environmental Sciences*, 2, 1461-1468.
114. Yan, Z., Song, N., Cai, H., Tay, J. H., & Jiang, H. (2012). Enhanced degradation of phenanthrene and pyrene in freshwater sediments by combined employment of sediment microbial fuel cell and amorphous ferric hydroxide. *Journal of hazardous materials*, 199, 217-225.
115. Zhao, F., Xi, S., Yang, X., Yang, W., Li, J., Gu, B., y He, Z. (2012). Purifying eutrophic river waters with integrated floating island systems. *Ecological Engineering*, 40, 53-60.

### Fuentes de internet

116. <http://www.compostandociencia.com/2015/02/sistemas-de-compostaje/>
117. [http://www.desleronline.com/html/espanol/residuos\\_peligrosos/landfarming.html](http://www.desleronline.com/html/espanol/residuos_peligrosos/landfarming.html)
118. [http://www.erp.com.pe/erp/es/productos\\_detalle.php?ai=003&ci=009&pi=0000000065](http://www.erp.com.pe/erp/es/productos_detalle.php?ai=003&ci=009&pi=0000000065)
119. <http://www.medicalexpo.es/prod/sartorius-group/product-69922-508790.html>
120. <http://www.payer.de/amarakosa7/amara215c.htm>
121. <http://www.planthogar.net/enciclopedia/fichas/556/girasol-helianthus-annuus.html>
122. [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0021\\_Talajvizvedelem/ch04s02.ht](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0021_Talajvizvedelem/ch04s02.ht)
123. [http://www.teamanalysis.com/model\\_type/icer/page/3/](http://www.teamanalysis.com/model_type/icer/page/3/)
124. <https://sites.google.com/site/mehdidastgheib/bioremediation>





# • CAPÍTULO V •

**CINÉTICA DE LA BIORREMEDIACIÓN  
Y BALANCE DE MASAS**

## CAPÍTULO V

### CINÉTICA DE LA BIORREMEDIACIÓN Y BALANCE DE MASAS

#### 5.1. Introducción

Todo trabajo de Biorremediación que pretenda el éxito debe ejecutar estudios preliminares de cinética microbiana en condiciones laboratorio, cuyos resultados son de importancia, para:

- a) Definir las tasas de crecimiento de las cepas individuales empleadas o del consorcio microbiano en su conjunto.
- b) Definir las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas o del consorcio.
- c) Determinar los tiempos de tratamiento, basados en el tiempo de vida media del residuo a tratar. Este valor permite estimar el tiempo necesario de tratamiento en condiciones de campo, que es aproximado ya que no se factible controlar todos los parámetros en condiciones de ambientales.
- d) Calcular la tasa de degradación (eliminación de contaminantes) de las cepas individuales o del consorcio empleado; esto es la cantidad de contaminante en mg/kg/día.
- e) Determinar la eficiencia del sistema de tratamiento implementado en porcentaje.
- f) Determinar la tasa de consumo de nutrientes, necesarios para garantizar una buena tasa de degradación de contaminantes.

Para la comprensión de este capítulo, es necesario refrescar nuestra memoria con contenidos vistos en el curso de microbiología universitario, que nos señala la dinámica de crecimiento microbiano en condiciones de laboratorio.



## 5.2. Curva de crecimiento microbiano

La dinámica de crecimiento microbiano describe una curva característica, que evidencia el crecimiento de su población (número de células) en el tiempo. En la ilustración 5.1 se distinguen la curva típica de crecimiento microbiano, donde se resaltan varios segmentos: Lag Fase (1), Fase de crecimiento logarítmico (2), Fase de crecimiento estacionario (3) y Fase de muerte (4).

**Lag Fase (1).** - Esta fase se caracteriza por un crecimiento nulo o casi nulo de los microorganismos, quienes se hallan en una fase de alta actividad metabólica de síntesis de materiales de construcción (biomoléculas) y especialmente enzimas que le permitirán iniciar la fase de crecimiento exponencial. Esta fase puede durar desde una hora hasta varios días en dependencia del tipo de microorganismo, de las condiciones del cultivo y de la disponibilidad de nutrientes. Lag fase, constituye un período de adaptación de los microorganismos al medio de cultivo.

En condiciones ambientales, donde no existen las condiciones ideales para el crecimiento microbiano, los microorganismos se hallan en lag fase, su número es muy reducido, desde unas pocas células, hasta varios cientos (Figura 5.1). El número de microorganismos y su variedad, depende de la disponibilidad de nutrientes, humedad y condiciones físico químicas adecuadas, en el medio natural. Así en suelos ricos en materia orgánica el número y diversidad microbiana es abundante en relación con los suelos arenosos, quienes se caracterizan por su bajo contenido de materia orgánica, sequedad y poca capacidad de retención. El número de microorganismos propios de cada suelo, se denomina “**población ecológica**”, que gráficamente corresponde al punto de corte de la sección 1 de la curva de crecimiento, sobre la vertical N (número de microorganismos).

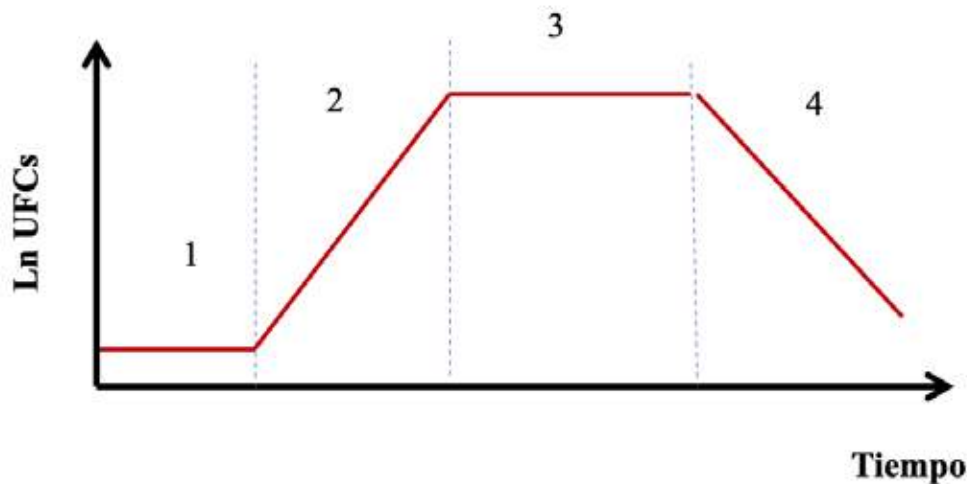


Figura 5.1. Curva de crecimiento bacteriano ideal (Tortora et al., 2010)

**Fase crecimiento exponencial (2).** - En la fase de crecimiento exponencial, los microorganismos se reproducen con gran velocidad (tasa de crecimiento microbiano), su dinámica se corresponde con el incremento de la actividad fermentativa, que emplea el sustrato presente en el medio de cultivo en forma directamente proporcional. Este crecimiento exponencial se caracteriza por que el número de microorganismos que se reproducen es infinitamente mayor al número de microorganismos que mueren, la cantidad de productos y toxinas, derivadas del metabolismo es pequeña, como para inhibir su crecimiento. Cada microorganismo se caracteriza por su tasa de crecimiento microbiano.

**Fase de crecimiento estacionario (3).** - En esta fase el número de células que se duplican se iguala al número de células que mueren, el crecimiento microbiano llega a ser una constante, el mismo que se mantiene hasta cuando se empiezan acumular los productos del metabolismo y sus toxinas que ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento microbiano y los nutrientes del medio se agotan. En trabajos de biorremediación, es necesario crear las condiciones para que la fase estacionaria sea la más prolongada, esto se logra mediante la adición continua de nutrientes que compensan las pérdidas y la extracción de los productos (toxinas) del sistema de tratamiento. En la práctica, en trabajos de biorremediación se emplean consorcios microbianos que incluyen a bacterias y a hongos, cada una de las cuales describe su propia curva de crecimiento, (ver la Figura 5.2), la estrategia; es lograr que las curvas se acoplen en tal forma que la curva de cre-

cimiento global sea lo más cercana a la ideal y que la fase de crecimiento estacionaria sea lo más prolongada posible.

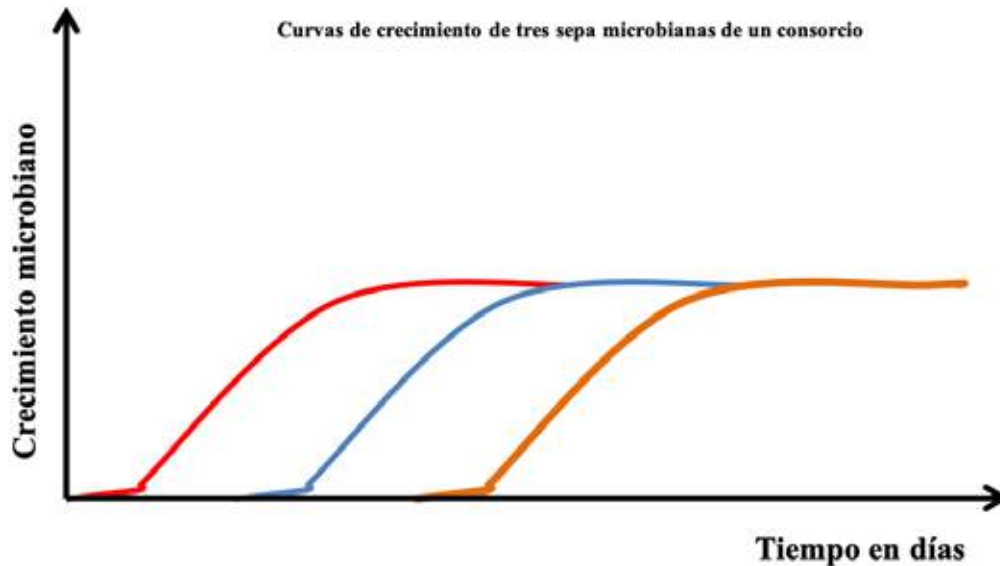


Figura 5.2. Acoplamiento de curvas de crecimiento de un consorcio microbiano

Los consorcios microbianos deben ser elaborados tomando en cuenta este principio, que el producto del metabolismo de la cepa A sea el sustrato de la cepa B y así sucesivamente. Con frecuencia en trabajos de biorremediación de hidrocarburos, los microorganismos empleados en la fase primera son los hongos, en especial si el contenido de HAPs es abundante.

**Fase de muerte (4).** - En esta fase el número de células que muere excede grandemente al número de células que se duplican, la cantidad de nutrientes disminuye drásticamente y los productos del metabolismo (toxinas) se han acumulado llegando a ser inhibitorias. Esta etapa puede durar varios días hasta el agotamiento total del sustrato sujeto de degradación. La población de los microorganismos llega a ser la misma que existía antes del inicio de los trabajos de biorremediación (población ecológica natural del medio específico).

Entre los parámetros cinéticos que se deben determinar podemos citar: Tasa de crecimiento microbiano, tasa de biodegradación, tiempo de vida media del residuo, eficiencia.

### 5.3. Tasa de crecimiento microbiano

Esto es el número de células o unidades formadoras de colonia en función del tiempo. La ecuación más empleada para su determinación es:

$$K = \frac{\text{Ln}N_2 - \text{Ln}N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Dónde:  $\text{Ln}N_2$  es el logaritmo del número de colonias (células), medidas en el tiempo  $t_2$ .  $\text{Ln}N_1$ , es el logaritmo del número de colonias medidas en el  $t_1$  y  $k$ , es la constante de crecimiento específico de la bacteria o del consorcio empleado.

En la determinación de este parámetro se debe considerar el número de células presentes a las cuatro horas después de la inoculación en las celdas experimentales ( $N_1$ ). La cantidad de UFCs, a las 24 horas de la siembra ( $N_2$ ). En la tabla 5.1, se ilustra los tiempos de duplicación y  $\mu_{\text{max}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), de algunos microorganismos obtenidos en laboratorio (Crueger, 1993).

**Tabla 5.1.** Tasa de crecimiento de algunas cepas en glucosa

ORGANISMO	T°C	$\mu_{\text{MAX}}$ (H <sup>-1</sup> )	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (H)
<i>Aspergillus niger</i>	30	0,20	3,46
<i>Aspergillus nidulans</i>	20	0,090	7,72
	25	0,148	4,68
	30	0,215	3,23
	37	0,360	1,96
<i>Penicillium Chrysogenum</i>	25	0,123	5,65
<i>Mucor hiemalis</i>	25	0,17	4,1
<i>Fusarium ovanaceum</i>	25	0,18	3,8
<i>Fusarium graminearum</i>	30	0,28	2,48
<i>Verticillium agaricinum</i>	25	0,24	2,9
<i>Geotrichum candidum</i>	25	0,41	1,7
	30	0,61	1,1
<i>Neurospora sitophila</i>	30	0,40	1,73

De los datos de la tabla 5.1, se evidencia que a temperatura es un factor que incide sobre la tasa de crecimiento, así lo demuestran los valores establecidos para *Aspergillus nidulans*. Sobre la tasa de crecimiento también

incide la estructura (complejidad) del sustrato empleado en calidad de fuente de carbono, tal como se muestra en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Influencia de la longitud de la cadena del sustrato sobre la tasa de crecimiento (Crueger, 1993).

SUSTRATO	NÚMERO DE UNIDADES DE GLUCOSA	$\mu_{MAX}$	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (H)
Glucosa	1	0,28	2,48
Maltosa	2	0,22	3,15
Maltotriosa	3	0,18	3,85

### 5.4. Tasa de Biodegradación

Es la cantidad en gramos de contaminante que se eliminan por día. La tasa de biodegradación se debe calcular con ayuda de la fórmula modificada de Monod, que considera al proceso de biorremediación como una reacción de primer orden (Rittmann et al., 2001).

$$\frac{\ln C_0}{C} = \frac{m \text{Max.Bo}}{Y * t} = kt \quad (2)$$

Cuya fórmula simplificada es:

$$\frac{\ln C_0}{C} = kt \quad (3)$$

Dónde:  $\ln$ , es el logaritmo natural de la concentración inicial del contaminante  $C_0$ ,  $C$ , es la concentración final del contaminante,  $k$ , es la constante de crecimiento específica y  $t$  es el tiempo transcurrido.

$$\text{Pendiente} = Y_2 - Y_1 / X_2 - X_1 \quad \text{ó}$$

$$\frac{\ln C_0}{C} = t_2 / t_1 \quad (4)$$

## 5.5. Tiempo de vida media

El cálculo del tiempo de vida media no es factible si no se disponen de los cálculos anteriores (Rittman et al., 2007). Su determinación es importante para saber el tiempo que se demora un contaminante (o contaminantes) en ser degradados por la bacteria o consorcio microbiano específico. Señala el tiempo necesario para que la mitad de los contaminantes presentes en el sistema sean eliminados.

$$t = -\ln(0,5)/k$$

Con este valor es fácil estimar el tiempo necesario para el tratamiento de los contaminantes objeto de estudio y en consecuencia los costos.

## 5.6. Eficiencia

Con fines prácticos la eficiencia se determina en porcentaje de material descontaminado con relación al volumen de material inicial que ingreso al tratamiento. Este parámetro se estima a partir de los datos obtenidos de los análisis de laboratorio, considerando el valor inicial y el final. Cada sistema de tratamiento y consorcio microbiano (cepa individual) se caracteriza por una eficiencia específica, que depende de las condiciones del tratamiento y del tipo de contaminante a tratar. Con la fórmula de Kanjilal, et al., (2015)

$$E = \frac{C_2 \times 100}{C_0} \quad \text{ó} \quad E = 100 \times \left( \frac{C_0 - C_f}{C_0} \right)$$

Donde  $C_2$ ,  $C_0$  son la concentración final e inicial del contaminante.  $C_0$  y  $C_f$  las concentraciones inicial y final de contaminante.

## 5.7. El rendimiento

Es la relación de células producidas a sustrato consumido. Los coeficientes no son constantes, por cuanto dependen de parámetros biológicos ( $X$ ,  $\mu$ ) y de parámetros químicos ( $pO_2$ , relación C/N y contenido de P del medio).

$$dX/dt = -Y dS/dt \quad \text{ó}$$

$$Y_s = \text{Biomasa (g)} / \text{Consumo de sustrato (g)}$$

Los coeficientes de rendimiento pueden ser diferenciados para cada componente.

$$Y_s^{CO_2} = \text{Mol CO}_2 \text{ formado} / \text{Mol de Sustancia consumida}$$

Se puede calcular el rendimiento de la utilización del sustrato en función de la cantidad de sustrato añadido al cultivo, o en función de la cantidad de carbono presente en ese sustrato (por ejemplo). Asimismo, podemos calcular la cantidad de biomasa total (gramos de células, por ejemplo) o de carbono presente en las células (aproximadamente el 50% de la masa celular corresponde a carbono).

Haciendo las transformaciones sobre la fórmula que relaciona la variación de biomasa con la de sustrato, llegamos a la definición de un nuevo concepto denominado *tasa específica de consumo de sustrato por el organismo* (Yegorov, 2000).

$$\frac{dN}{dt} = - Y_s \frac{dS}{dt} \quad \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = - Y_s \frac{dS}{dt} \frac{1}{N}$$

$$\mu = Y_s q_s$$

La tasa específica de consumo de sustrato la podemos considerar la “velocidad” con la que el organismo consume el sustrato. Evidentemente, cuanto mayor sea la tasa de consumo mayor será la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). Asimismo, cuanto mayor sea el rendimiento del sustrato consumido, también mayor será la tasa de crecimiento.

### 5.8. Balance de masas

El balance de materia es el concepto de mayor importancia en la ingeniería de diseño para procesos biotecnológicos a gran escala, en especial para trabajos de biorremediación de campo. Para una cantidad dada de sustrato (contaminante), es necesario determinar la cantidad de productos químicos necesarios para cubrir las necesidades de energía, nutrientes y el entorno de los microorganismos, a más de estimar la cantidad de productos generados.

Las ecuaciones químicas equilibradas se basan en el concepto de estequiometría, sin embargo, en Biorremediación, es necesario considerar una serie de complicaciones generadas por las reacciones microbianas, que hacen complicada su estequiometría y la imposibilidad de controlar los fac-

tores ambientales. Entre los aspectos de consideración podemos mencionar:

- Las reacciones microbianas suponen la oxidación o reducción simultánea de más de dos sustratos, este es el caso de los residuos ambientales que constituyen una mezcla compleja de sustancias de muy variada naturaleza química.
- Los microorganismos trabajan en posta, durante la biorremediación de contaminantes, los productos constituyen la materia prima de la siguiente reacción química mediada por otra cepa de microorganismos.
- Los microorganismos captan la energía liberada en las reacciones químicas precedentes, para incrementar su actividad. Por esta razón, debemos tomar en cuenta las reacciones energéticas, así como su equilibrio para elementos, electrones y carga.
- Los factores ambientales como: temperatura, humedad pH, conductividad, inciden grandemente sobre el proceso de biorremediación y sobre el balance de materia. Por esta razón, el balance de masas establecido en la tabla 2 del Ministerio de Ambiente y Agua, no tiene sentido para un programa de Biorremediación a nivel de meso cosmos o macrocosmos (en condiciones de campo).
- Por otro lado, el escalado de los procesos de micro a meso y macrocosmos no son confiables, por el hecho de que no se pueden controlar los factores ambientales al gusto del experimentador, en consecuencia, la determinación del balance de masas es irreal.
- En todo caso el balance de masas aproximado solo se podrá hacer una vez que se cuente con la caracterización específica del residuo (fórmula del residuo y bacteriana) y tendrá el carácter de aproximado, orientador (Figura 5.3.)



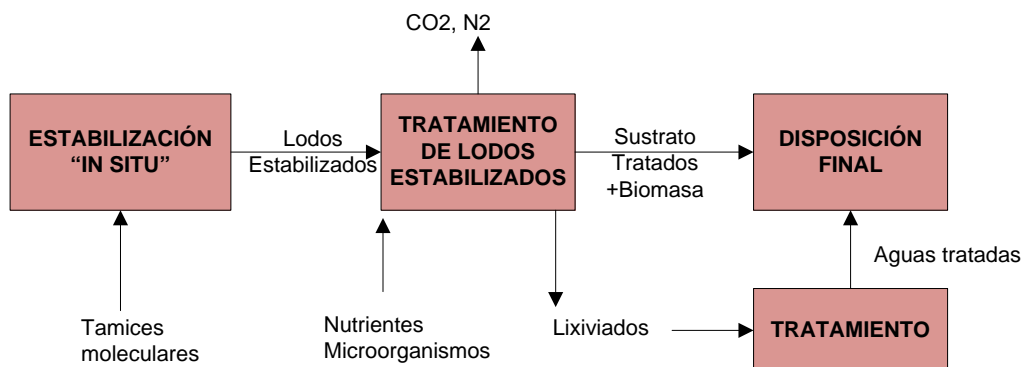
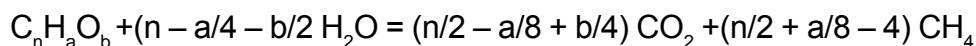
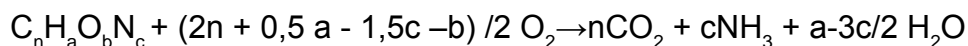


Figura 5.3. Balance de masas

- Para procesos anaeróbicos

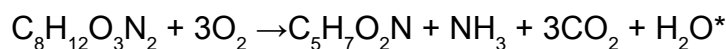


- Para procesos aeróbicos (Rittmann et al. 2007).



### 5.9. Ecuación estequiométrica

Para ilustrar el desarrollo del balance de masas, empleamos, la ecuación presentada en 1956 por Porges, Jasewicz y Hoover, para la biodegradación de la caseína.



Caseína

células bacterianas

$$\text{Peso fórmula } 184 + 26 \rightarrow 113 + 17 + 132 + 18$$

$$\Sigma = 280 \qquad \Sigma = 280$$

La fórmula empírica de la ecuación representa al contenido total de proteína contenida en la caseína, fórmula obtenida por análisis elemental a partir de su porcentaje en la muestra seca.

De igual forma se establece la fórmula de las células bacterianas. Aunque estos contienen muchos más elementos la ecuación estructurada con estos cuatro elementos, constituye una buena aproximación para establecer la estequiometría de una reacción. Sin embargo, considerando la necesidad que tiene los microorganismos de otros elementos, es bueno conocer que el P representa aproximadamente el 2% del peso seco orgánico de las bacterias, mientras que el N representa en promedio el 12% (Rittmann, 2001).

Este parámetro tiene importancia técnica, por cuanto, pone en evidencia el conocimiento del especialista en Biorremediación del proceso estequiométrico de las reacciones Bioquímicas. Los cálculos de cinética son una herramienta valiosa para demostrar técnicamente la ejecución real de un trabajo de remediación y Biorremediación, independientemente de la metodología implementada. Permite superar los problemas ligados a usos de patentes y de secretos industriales empresariales, porque independientemente de la metodología los parámetros sujetos a control y su valides son de carácter universal. A manera de ejemplo se presentan las fórmulas empíricas celulares, empleadas para proceso biotecnológicos, en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Fórmulas empíricas de células procariontas (Pidello, A. 2014).

Formula empírica	Peso fórmula	COD/peso	%N	Sustrato y condiciones de entorno
$C_5H_2N$	113	1,42	12	Caseína, anaerobio
$C_2H_{12}O_4N$	174	1,33	8	Acetato, N amoniacal, aerobio
$C_9H_{15}O_5N$	217	1,40	6	Acetato N nitrato, aerobio
$C_9H_{16}O_5N$	218	1,43	6	Acetato N nitrato, aerobio
$C_{4,9}H_{9,4}O_{2,9}N$	129	1,26	11	Acetato metanogénico
$C_{4,7}H_{7,7}ON$	112	1,38	13	Octanoato, metanogénico
$C_{4,9}H_9O_3N$	130	1,21	11	Glicina, metanogénico
$C_5H_{8,8}O_{3,2}N$	134	1,16	10	Leucina, metanogénico
$C_{4,1}H_{6,8}O_{2,2}N$	105	1,20	13	Caldo nutriente, metanogénico
$C_{5,1}H_{8,5}O_{2,5}N$	124	1,35	13	Glucosa, metanogénico
$C_{5,3}H_{9,1}O_{2,5}N$	127	1,41	11	Almidón metanogénico
$C_5H_8O_2N$	114	1,47	12	Bacterias, acetato aerobio
$C_5H_{8,33}O_{0,81}N$	95	1,99	15	Bacterias, no definido
$C_4H_8O_2N$	102	1,33	14	Bacterias, no definido
$C_{4,17}H_{7,25}O_{1,38}N$	94	1,57	15	<i>Acetobacter aerogenes</i> , no definido

$C_{4'54}H_{7'91}O_{1'95}N$	108	1,43	13	<i>Klebsiella aerogenes</i> , glicerol $\mu=0,1h$
$C_{4'117}H_{7'21}O_{1'79}N$	100	1,39	14	<i>Klebsiella aerogenes</i> , glicerol $\mu=0,85h$
$C_{4'16}H_8O_{1,25}N$	92	1,67	14	<i>Escherichia coli</i> , no definido
$C_{3'85}H_{6'69}O_{1'78}N$	95	1,37	15	<i>Escherichia coli</i> , no definido

## 5.10. Pruebas de tratabilidad

Para la realización de trabajos de Biorremediación ambiental, que garanticen el uso de microorganismos autóctonos, en consonancia con la legislación ambiental ecuatoriana, es necesario que los microorganismos se aislen del sustrato (*in situ*) sujeto a tratamiento, empleando técnicas estándares de microbiología, que son rutinarias.

Las cepas aisladas deben ser sometidas a pruebas de degradación de contaminantes, por cuanto, no todos los microorganismos aislados tienen la capacidad de emplear los contaminantes como fuente de carbono, en consecuencia, metabolizarlos. Del conjunto de microorganismos aislados, tan solo un pequeño grupo será el elegido para los trabajos posteriores de Biorremediación de los contaminantes en estudio. Esos trabajos se realizan en condiciones de laboratorio, bajo condiciones controladas. Con las cepas que manifestaron la capacidad de metabolizar el sustrato, se organiza un consorcio para ser empleado en forma conjunta en los trabajos de biorremediación de campo. A manera de ejemplo, ponemos a consideración del lector un modelo de protocolo de pruebas solicitado por la autoridad ambiental ecuatoriana.

## 5.11. Protocolo de pruebas de biorremediación de suelos y material vegetal contaminados con hidrocarburos, lodos residuales aceitosos

El Protocolo está estructurado de las siguientes partes:

### 5.11.1 Resumen ejecutivo (así lo estipula el documento oficial)

El tratamiento de suelos contaminados, lodos residuales aceitosos, material vegetal contaminado con hidrocarburo, procedentes de estaciones de servicio, gasolineras, plantas industriales, empresas de servicios petrole-

ros, derrames serán recibidas en las instalaciones de la empresa gestora ambiental.

Cada residuo será analizado para su caracterización siguiendo un programa de muestreo y una cadena de custodia acorde a la normativa ambiental del ramo. Los análisis se realizarán en un laboratorio certificado de experiencia.

En base a los resultados se definirá la metodología de tratamiento, los microorganismos, los materiales a emplear y el tamaño de la muestra. Las pruebas de biorremediación para los residuos ante mencionados se efectuarán en condiciones de meso cosmos. Para el establecimiento específico de la cinética microbiana se realizarán pruebas paralelas de microcosmos.

Estrategias fundamentales de nuestros sistemas de tratamiento son:

- Empleo de tamices moleculares.
- Empleo de compuestos organominerales, como activadores microbianos.
- Empleo de microorganismos autóctonos aislados de la misma fuente de residuos.
- Empleo de cosustratos orgánicos en calidad de fuentes alternativas de carbono.
- Control de todos los parámetros de proceso.
- Tratamiento de todos los efluentes.
- Procesos totalmente aeróbicos.
- Observancia de estrictas normas de Bioseguridad para laboratorio y campo (Gualoto, 2008).

Las metodologías de tratamiento pueden ser:

- Landfarming; en plataforma cubierta, en piscina, a campo abierto.
- Compostaje aeróbico.
- Pila venteada.
- Bioventing.
- Pila estática.
- Fitorremediación

Todas estas combinadas con adsorción, encapsulamiento, quelación, complejación y biomineralización.

### 5.11.2 Caracterización de los residuos a tratar

Las características de los lodos residuales aceitosos, suelos contaminados y materia vegetal contaminado, puede efectuarse mediante la toma de muestras representativas de los mismos y su análisis químico en laboratorios certificados, bajo técnicas y procedimientos estandarizados definidos en el Reglamento 1215 para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador.

Los parámetros principales de análisis son:

- TPHs; en ppm.
- HAPs; en ppm
- Pb; en mg/kg;
- Ni; en mg/kg;
- Cd; en mg/kg,
- V; en mg/kg
- Humedad en %<sup>26</sup>

### 5.11.3 Materiales y métodos

#### Materiales

Los materiales para emplearse en las pruebas y en los trabajos de biorremediación en condiciones de campo son:

- Tamices moleculares.
- Materiales esponjantes o estructurantes.
- Cosustratos.
- Microbianos autóctonos.
- Compuestos organominerales (Pinos, 2010).

Las cantidades de cada uno de ellos dependen de las características de los residuos a tratar, principalmente de:

<sup>26</sup> Esto es solo uno de los posibles parámetros a medir, su variedad dependerá del tipo de contaminante y del tipo del uso de suelo.

- Concentración de contaminantes.
- Tipo de contaminantes.
- Humedad de los residuos
- Plasticidad (propiedades mecánicas, estado físico).

Relación de componentes de los sistemas experimentales

Las variantes sugeridas por el Ministerio de Ambiente y Agua del Ecuador no tienen lugar para el caso de trabajos de biorremediación, específicamente los literales B, C y D. El diseño experimental para biorremediación se plantea variando las variables del proceso, lo más frecuente es la variación en la proporción de tamices moleculares, materiales estructurantes, cosustratos y materia orgánica (Tabla 5.4.). Para condiciones de microcosmos (laboratorio), donde se controlan todas las condiciones ambientales se acostumbra a variar, los parámetros de proceso, tales como: T, pH, Humedad, conductividad, O<sub>2</sub>, nutrientes, etc.

**Tabla 5.4.** Fórmulas empíricas de células procariotas

COMPONENTE	TESTIGO	VARIANTE 1	VARIANTE 2	VARIANTE 3	PRINCIPAL*
Residuos (m <sup>3</sup> )	X	X	X	X	X
Tamices (Kg)	-	2nkg/xm <sup>3</sup> .	½n kg/xm <sup>3</sup> .	¼nkg/xm <sup>3</sup> .	nkg/xm <sup>3</sup>
Material estructural (kg).	-	½mkg/xm <sup>3</sup> .	¼ mkg/xm <sup>3</sup> .	2mkg/xm <sup>3</sup> .	mkg/xm <sup>3</sup> .
Materia orgánica (kg)	-	¼ ykg/xm <sup>3</sup>	2ykg/xm <sup>3</sup>	½ykg/xm <sup>3</sup>	ykg/xm <sup>3</sup>
Microorganismos (litros)	-	Z litros/xm <sup>3</sup> .	Z litros/xm <sup>3</sup> .	Z litros/xm <sup>3</sup> .	Z litros/xm <sup>3</sup> .

\*Las cantidades de la muestra principal se definen en base a la experiencia acumulada de trabajos realizados en dependencia del tipo y estado de residuos a tratar y su concentración.

Dónde:

X= Cantidad de residuo a tratar en m<sup>3</sup>.

n= Cantidad de tamices moleculares en kg.

m= Cantidad de materiales estructurantes en kg.

y= Cantidad de materia orgánica en kg.

z= cantidad de microorganismos en litros.

Las pruebas de biorremediación se efectúan a escala de laboratorio y máximo a escala de mesocosmos con cantidades no superiores a dos metros cúbicos de residuos.

### Labores culturales

Los programas de biorremediación no emplean combustibles de ningún tipo, al contrario, degradan los residuos de hidrocarburos presentes en los residuos.

- La humectación de los lodos en tratamiento puede efectuarse con Biol procedente de biodigestores de granjas porcinas o vacunas, hasta lograr una humedad relativa total del 40-50%.
- La adición de cosustratos (Bioestimulación), se realiza cada vez que los análisis determinen la falta de nutrientes específicos.
- La bioaumentación (adición de microorganismos), se efectúa cuando el conteo de UFCs descienda de  $1 \times 10^4$ .
- Aireación, por volteo manual o mecánico (excavadora).
- Control de lixiviados y su tratamiento o recirculación.

### Descripción de la metodología

El tratamiento de los lodos aceitosos inicia con su caracterización, ejecutada por el cliente o por la Gestora ambiental.

Se observa una cadena de custodia que permite asegurar la calidad de las muestras y la representatividad de la muestra tomada.<sup>27</sup>

Luego de transportar los residuos a las instalaciones del Gestor ambiental, se procede de la siguiente manera:

- *Estabilización.* Se efectúa con tamices moleculares y materiales estructurantes. Esto les da maniobrabilidad, adicionalmente se extraen de la fase soluble a metales presentes mediante adsorción por parte de los tamices moleculares.

<sup>27</sup> Metodología desarrollada por Miguel Gualoto; 2005.

- *Deshidratación.* El exceso de humedad se elimina por deshidratación de los lodos estabilizados. Los lixiviados se almacenan y se recirculan o se tratan químicamente o biológicamente en dependencia de la disponibilidad de recursos.
- *Maduración.* Se deja reposar los lodos deshidratados durante dos semanas para que el sistema se estabilice y los microorganismos autóctonos se adapten a las nuevas condiciones. En esta etapa se inician los primeros procesos naturales de biooxidación.
- *Adición de nutrientes.* Se adicionan los nutrientes conforme a lo establecido en el protocolo de pruebas. Los nutrientes pueden ser de origen orgánico (Bioles, estiércol, residuos vegetales, frutas), o mineral (abonos sintéticos).
- *Adición de microorganismos.* Los microorganismos aislados e identificados en la fuente de residuos se reproducen en medios orgánicos de bajo costo y se adicionan a los residuos en tratamiento a razón de 5-12 litros/m<sup>3</sup>.
- *Control de parámetros de proceso.* Los parámetros sujetos a control durante el proceso de biorremediación son:
  - Ufcs
  - Temperatura
  - Humedad
  - Conductividad
  - Aireación
  - N, P, K.
  - Control de lixiviados
- *Muestreo y análisis.* A más de la muestra de partida realizada *in situ*, se efectuarán al menos tres muestras más para obtener una curva de degradación satisfactoria, que permita determinar la eficiencia de la metodología de tratamiento.

### Diagrama de flujo de operaciones unitarias.<sup>28</sup>

El diagrama de operaciones unitarias muestra la relación de dependencia de cada una de ellas y las distintas alternativas de uso e implementación.

---

<sup>28</sup> Metodología desarrollada por el autor.



Interpretación de resultados

La interpretación de los datos permitirá procesar los resultados y calcular los parámetros cinéticos del proceso de biorremediación, los mismos que se compararán con los resultados de las pruebas de microcosmos.

**Analizamos estos parámetros empleando como ejemplo el estudio del tratamiento biológico de lodos residuales industriales de la planta de AYMESA, ejecutado por el autor. Los datos que se emplearán son parte de ese trabajo<sup>29</sup>.**

**Tasa de crecimiento específica** (Rittmann, 2001)

Luego de realizadas las siembras, a las 4 horas se ejecuta el primer conteo, obteniéndose un total de 370 UFCs y a las 24 horas un total de 0,82x10<sup>6</sup>UFCs.

Se emplea el promedio las siembras de las diluciones 10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>, expresado en 10<sup>6</sup>.

$$K = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

$$K_1 = \ln 0,82 \times 10^6 - \ln 370 / 24 - 4$$

$$K_1 = 13,64 - 5,91 / 20$$

$$K_1 = 7,8487 / 20$$

$$K_1 = 0,39 / \text{día} \text{ (Cabrera. 2011)}$$

**Conteo de Ufcs**

Datos de trabajos ejecutados a manera de ejemplo de cálculo.

FECHA	Tiempo (días)	Ufcs	Ln UFCs
03/10/2008	0	370	0,00
08/10/2008	10	8200000	10,0061417
23/10/2008	20	7400000	9,90348755
01/11/2008	30	40100000	11,5933839
28/11/2008	40	88500000	12,3850101
04/12/2008	50	172700000	13,0535635
17/01/2009	60	185800000	13,1266784

<sup>29</sup> Trabajo ejecutado en el año 2009 por Cabrera R & Gualoto M.

31/01/2009	70	167800000	13,0247803
05/02/2009	80	191800000	13,1584607
15/02/2009	90	128900000	12,7610445



**Figura 5.4.** Curva de crecimiento

**Constante de biodegradación**

$$\frac{\ln Co}{C} = \frac{mMax.B}{Y * t} = k$$

Datos de cálculo de la constante de degradación de TPHs.

Tiempo (días)	lnCo/C	TPH ppm
0	0,00	32,88
30	0,48	20,27
60	0,53	19,22
90	1,03	11,73

*Cinética de primer orden*  $\ln Co/C = kt$

$$\ln 32,88 / 20,27 = 0,48$$

$$\ln 32,88 / 19,22 = 0,53$$

$$\ln 32,88 / 11,73 = 1,03$$

$$Pendiente = Y_2 - Y_1 / X_2 - X_1$$

$$K = 1,03 - 0,48 / 1 - 90$$

$$K = 0,55 / 89$$

$$K = 0,0061$$

Este valor señala que cada día desaparece 0,0061 partes de contaminante.

**Tiempo de vida**

Se Calcula mediante la ecuación  $t = \frac{-1}{K * \ln \frac{C}{Co}}$  (Gamazo et al., 2005)

t= -ln (0.5)/0,0061

t= 0.693/0,0061

t= 113,6 /dia

Cabe señalar que los lodos industriales de AYMESA no tienen problemas con los TPHs, sin embargo, la metodología se muestra eficiente para degradarlos. El tiempo de vida media sería de 3,7 meses.

**Rendimiento**

De los resultados obtenidos en el sistema de tratamiento biológico de los lodos industriales se establece que el rendimiento del sistema es 64,32%, en 90 días de pruebas

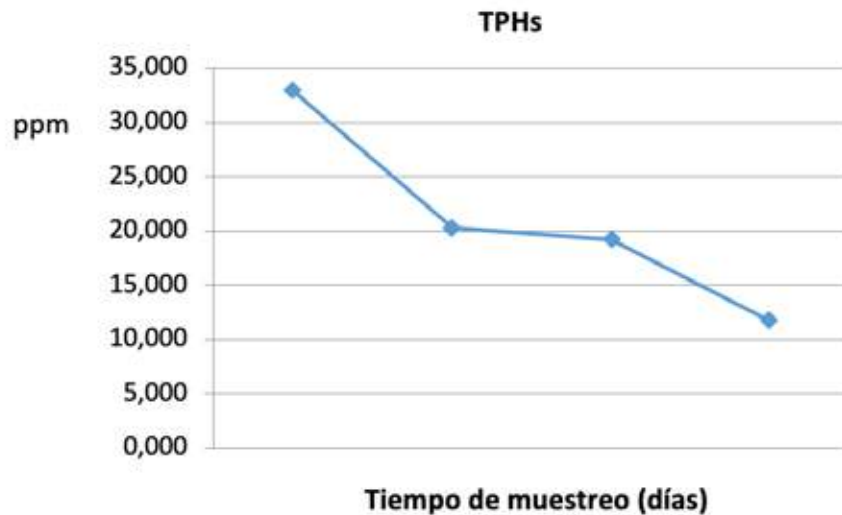


Figura 5.5. Tasa de crecimiento

Igual procedimiento para HAPs y fenoles.

#### **5.11.4 Disposición final**

Una vez que los parámetros de los residuos en tratamiento sean menores a los límites establecidos en la legislación ambiental vigente, se procederá a:

1. Evacuar en un relleno sanitario en calidad de material de cobertura.
2. Disponer en una escombrera.
3. Depositar en áreas y espacios de regeneración urbana.
4. Disponerlos en suelos erosionados para su recuperación.

Para la determinación de la concentración de metales pesados, sugerimos su análisis en los lixiviados, por cuanto la metodología propuesta se sustenta en la adsorción de estos por tamices moleculares, en tanto que la legislación exige métodos extractivos.

En el caso de los TPHs consideramos emplear la metodología de cromatografía de flama de ionización, que hace distinción entre enlaces C-C de materia orgánica introducida para la biorremediación y los enlaces C-C de hidrocarburos sujetos a degradación.

#### **5.11.5 Emisiones del proceso**

Las metodologías de tratamiento biológico son aeróbicas, en consecuencia, las únicas emisiones gaseosas son: Vapor de agua, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. De igual forma se generarán lixiviados, los mismos que serán sometidos a tratamiento químico o biológico en dependencia de su cantidad y calidad.

No existen descargas de efluentes o residuos generados en el proceso, que no sean tratados, tanto las aguas como los lixiviados generados serán tratados y descargados dentro de los límites de concentración establecidos en la legislación ambiental del ramo. Las metodologías de análisis son las establecidas en los cuerpos legales ambientales del Ecuador y comúnmente empleadas en trabajos similares.

### 5.11.6 Balance de masas

Las pruebas de biorremediación en condiciones de meso cosmos, se efectúan bajo condiciones ambientales, cuyas variaciones no se las puede controlar, en consecuencia, la determinación del balance de masas es irreal. Solo si las pruebas se hacen en condiciones de microcosmos se pueden controlar todos los procesos y hacer un balance de masas específico.

Por otro lado, el escalado de los procesos de micro a meso y macrocosmos no son confiables, aunque constituyen una guía de cómo se efectuarán los trabajos en condiciones de campo. El esquema del balance de masas para biorremediación se presenta a continuación:

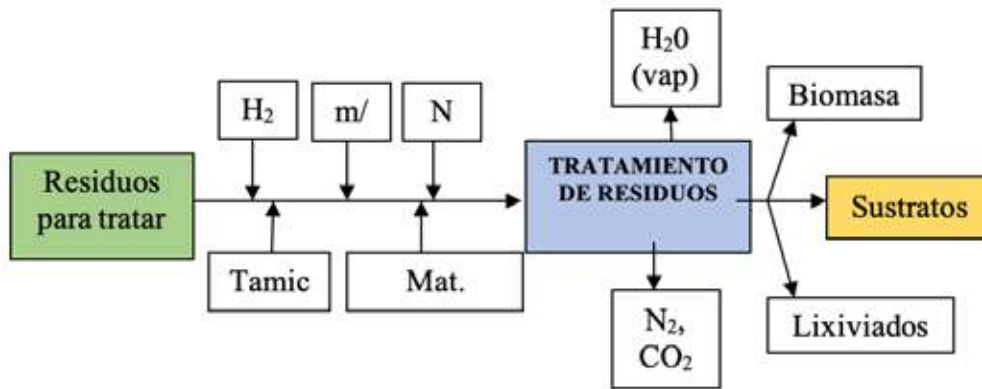
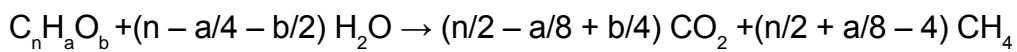
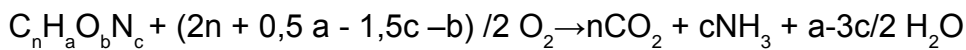


Figura 5.5. Balance de masas

Para procesos anaeróbicos



Para procesos aeróbicos



**CRONOGRAMA DE PRUEBAS**

Actividad	MES												
	I			II			III			IV			
Muestreo	x												
Análisis laboratorio	x					x			x			x	
Transporte de residuos	x												
Estabilización		x											
Deshidratación		x	x										
Maduración				x									
Adición de nutrientes				x									
Adición de microorganismos					x								
Control de parámetros					x	x	x	x	x	x	x	x	x
Labores culturales					x	x	x	x	x	x	x	x	x
Muestreos							x					x	
Control/tratamiento de efluentes						x	x	x	x	x	x	x	x
Interpretación de resultados/cinética												x	x
Disposición final													x

Con frecuencia los funcionarios del MAE (Ministerio del Ambiente de Ecuador) requieren la presentación de un diagrama de flujo de las operaciones unitarias a implementarse en un trabajo de biorremediación, cuyo modelo se adjunta (figura 5.3).

Para finalizar el presente capítulo, es necesario señalar la relevancia que estos cálculos tienen para la validación de un trabajo de biorremediación, en especial durante trabajos de peritaje ambiental.

Los cálculos de tasa de crecimiento microbiana, tasa de degradación, eficiencia y tiempo de vida media son una sugerencia personal a la autoridad competente. Personalmente siempre adjunto estos parámetros en los informes, independientemente de si la autoridad lo solicita o no. Su cálculo permite evidenciar matemáticamente que los datos levantados y presentados en el informe, tienen concordancia plena con la cinética del proceso, con la fisiología de los microorganismos, que es influenciada por los factores ambientales, que han sido controlados y generados por la empresa remediadora.

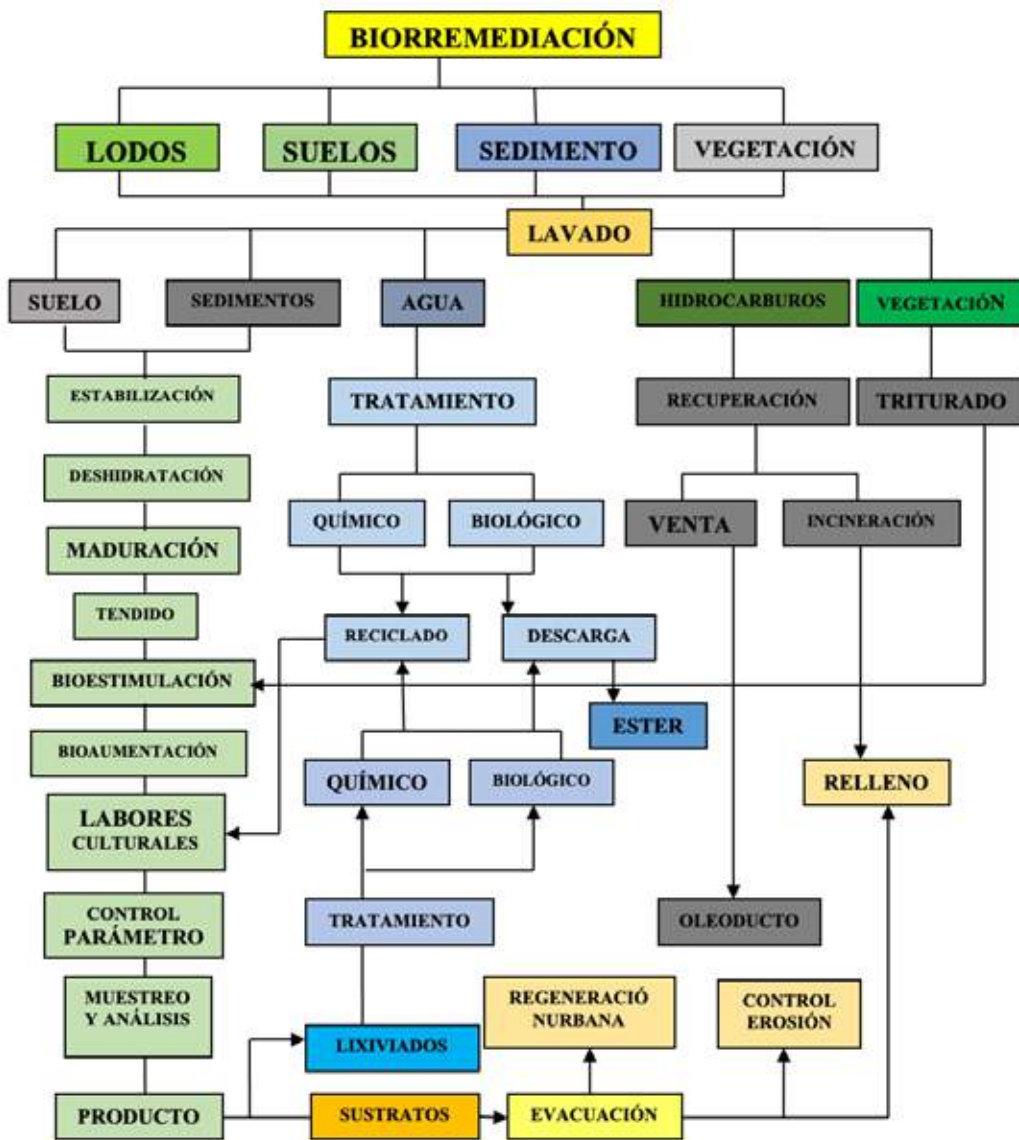


Figura 5.6: Diagrama de flujo de operaciones unitarias

## 5.12. Bibliografía

1. Demain, A. L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology advances*, 18(6), 499-514.
2. Cabrera R., Gualoto M. (2011). Tratamiento biológico de lodos industriales de una planta ensambladora de vehículos con tamices moleculares y cepas microbianas autóctonas. Ponencia. XIV Congreso Bolivariano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, región 3. XV Congreso Nacional AEISA. “Sostenibilidad vulnerabilidad y Cambio climático”. Cuenca. 23 al 25 de noviembre 2011.

3. Crueger, W., y Crueger, A. (1993). *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*. Editorial Acribia.
4. Gamazo, C., López-Goñi, I., y Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología* (No. 579 G186m). Elsevier.
5. Gualoto, M. (2008). *Manual de Biorremediación*. Materiales del curso de Biorremediación UDLA.
6. Kanjilal, T., Bhattacharjee, C. y Datta, S. (2015). Biodegradación de acetamiprid de aguas residuales de humedales utilizando cepa autóctona de *Micrococcus luteus* SC 1204: Optimización, evaluación de parámetros cinéticos y toxicidad. *Revista de Ingeniería de Procesos de Agua*, 6, 21-31.
7. Krishnan, M. R. V. “Citric acid, processes”; en M. C. Flickinger y S. W. Drew (eds.); “*Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*”; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 651-661 (1999).
8. Ladisch, M. R. “*Bioseparations engineering: Principles, practice, and economics*”; Wiley Interscience, New York, USA; (2001).
9. Miller, J. B. “Antibiotics and isotopes”; en “*The pharmaceutical century; ten decades of drug discovery*”; American Chemical Society, Washington D.C., USA 53-67 (2000).
10. Palomares, L. A., O.T. Ramírez; “*Bioreactor Scale-down*” In: *The Encyclopedia of Cell Technology*; Spier, R.E. (ed), John Wiley and Sons, Inc., New York, USA 174-201 (2000).
11. Pidello, A. (2014). *Principes de chimie redox en écologie microbienne*. Editions Quae.
12. Pinos Dueñas, A. C. (2010). *Biorremediación de suelos sedimentos contaminados por el derrame de la línea del pozo Shushuqui 13 mediante la técnica de Landfarming campo libertador Sucumbíos-Ecuador* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2010).
13. Porges, N., Jasewicz, L., y Hoover, S. R. (1956). Principles of biological oxidation. *Biological Treatment of Sewage and Industrial Wastes*, 1, 35-48.
14. Ramírez, O. T. “Nuevos bioprocesos”; en Módulo 7 “*Ingeniería celular: Biodiversidad e industria*”, Fronteras de la Biología en los inicios del siglo XXI. F. Bolívar y A. López-Munguía (coordinadores); El Colegio Nacional, México; pp. 93-121 (2003).
15. Rittmann, B. E., & Garralda de Roda, F. (2001). *Biotecnología del medio ambiente principios y aplicaciones* (No. 660.6 R5).



16. Roels, J. A. “Energetic and kinetics in biotechnology”; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands; (1983).
17. Tech, M. DEPARTMENT OF BIO-ENGINEERING BIRLA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, MESRA, RANCHI.
18. Tortora, G., Berdell F., y Case C., (2010). Microbiology an introduction. Benjamín Cummings. Pag 173
19. Vázquez Duhalt, R. “Termodinámica biológica”; AGT Editor S.A., México (2002).
20. Yegorov N. S. Microbiología industrial. Editorial Escuela Superior. Moscú. 2000. p.217





# • CAPÍTULO VI •

**BIOSEGURIDAD Y SALUD  
OCUPACIONAL**

## CAPÍTULO VI

### BIOSEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

La seguridad biológica, o bioseguridad, es un componente importante de la seguridad ambiental y está referida a los riesgos a que se encuentran expuestas las personas, equipos, instalaciones y ambiente, cuando se manipulan microorganismos o sus productos a gran escala. Los riesgos pueden ir desde las alteraciones en el equilibrio natural de los ecosistemas, efectos nocivos en la salud e incluso a provocar la muerte. El empleo de técnicas microbiológicas apropiadas y el uso correcto del equipo de bioseguridad por parte del personal bien adiestrado siguen siendo los pilares de la bioseguridad en el laboratorio. Así otro componente importante de la seguridad biológica es el empleo de los mecanismos de contención física, tal como lo estipula el manual de Bioseguridad de la OPS/OMS que involucra a:

- Normas y procedimientos.
- Equipos de protección personal, colectiva y ambiental.
- Diseño de instalaciones

El desarrollo de la Biotecnología y la ampliación de sus campos de aplicación, han permitido su empleo eficaz en procesos de remediación ambiental, donde se emplean en forma masiva y extensiva microorganismos especializados en la degradación de contaminantes específicos que son la fuente de carbono orgánico para su metabolismo. Muchas de las cepas microbianas empleadas en dichos trabajos son introducidas, e incluso patógenas para el hombre, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mucor* sp; sin embargo no se puede prescindir de su uso debido a su alta eficiencia en la degradación de hidrocarburos, por esta razón se hace necesaria la asunción de normas estrictas de bioseguridad para su aislamiento, reproducción y aplicación a gran escala; cuyo carácter supera las exigencias de bioseguridad recomendadas para el manejo y reproducción de otros tipos de microorganismos.

Son innumerables las fuentes de consulta en cuanto a normativas de Bioseguridad para laboratorios de microbiología, hospitales, manejo de resi-

duos infecciosos e industria alimenticia; sin embargo, información técnica de Bioseguridad ambiental, para trabajos de remediación a gran escala, no existen. Esto motiva a desarrollar el presente material de bioseguridad para garantizar la seguridad de las operaciones de biorremediación, que abarca las fases de laboratorio y campo.

El presente material constituye una adaptación de las normativas básicas sugeridas por la OPS/OMS, a la realidad operativa y ambiental de los trabajos de biorremediación en el campo; normativa que está sujeta a ratificación, mejora, modificación y validación. Además, detalla las normas a seguir durante los procesos de aislamiento, identificación, transporte, utilización y liberación de los microorganismos a fin de disminuir los riesgos de contaminación biológica y garantizar la seguridad del personal, instalaciones y ambiente.

La necesidad de disponer de una normativa eficiente de Bioseguridad crece, con el desarrollo de organismos modificados genéticamente para trabajos de remediación ambiental. En la actualidad, Ecuador no cuenta con normativas explícitas para el aislamiento, identificación, reproducción y empleo masivo de microorganismos autóctonos, exógenos y genéticamente modificados, en trabajos de campo a gran escala. La ausencia de mecanismos de control, protocolos de empleo de microorganismos, perfiles microbianos de cepas idóneas para biorremediación, de laboratorios y personal capacitado para el control del empleo y proliferación de microorganismos propios y exógenos por parte del organismo de control, hacen prioritaria la necesidad de contar con un manual de Bioseguridad, que se constituya en una herramienta eficiente, oportuna y práctica para la ejecución de trabajos de remediación ambiental a pequeña, mediana y gran escala.

Cabe recalcar que la biorremediación es un término relativamente nuevo, que se acuñó por primera vez en la década de los 80's, cuando los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos. De la capacidad intrínseca que posee la naturaleza de superar algunos desequilibrios originados en sus ecosistemas surge la biorremediación, como una nueva tecnología que emplea elementos biológicos, microorganismos o plantas, para eliminar contaminantes específicos.

Debido al enorme interés surgido por la Biorremediación y sus potenciales aplicaciones, en muchas partes del mundo al igual que en nuestro país, se han fundado compañías dedicadas a la gestión biológica de residuos, no obstante, la legislación y los mecanismos de control por parte del estado, van rezagadas sensiblemente y no acompañan al desarrollo de técnicas, procedimientos y metodologías de biorremediación, con instrumentos de evaluación técnica, validación, comprobación y Bioseguridad. Estos instrumentos son necesarios para sistematizar los trabajos y generar sistemas integrados de técnicas y procedimientos eficientes y seguros desde el punto de vista ambiental, social, y económico.

### 6.1. Antecedentes

Desde 1983 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la seguridad y, en particular, la seguridad biológica son importantes cuestiones de interés internacional, por lo que publicó la primera edición del Manual de bioseguridad en el laboratorio. Alentando a los países a aceptar y aplicar conceptos básicos en materia de seguridad biológica y a elaborar códigos nacionales de prácticas para la manipulación sin riesgo de microorganismos patógenos en los laboratorios que se encuentran dentro de sus fronteras nacionales. Desde 1983, muchos países han seguido la orientación especializada que se ofrece en el manual para elaborar esos códigos de prácticas.

En 1993 se publicó una segunda edición del manual y en el 2005 se publicó una tercera edición donde la OMS sigue proporcionando liderazgo internacional en materia de bioseguridad al abordar aspectos de la seguridad y la protección biológica que se plantean en el nuevo milenio, incluyendo las tecnologías de ADN recombinante (Organización Mundial de la Salud, 2005).

A nivel internacional se encuentran los manuales de bioseguridad para laboratorios de la OMS, sin embargo, continúan siendo generales y lo que se pretende con este material es contar con procedimientos totalmente específicos para biorremediación, tanto para los procedimientos a nivel de laboratorio como para aquellos realizados en el campo.

En la literatura nacional, no existe ninguna referencia a un manual de Bioseguridad para trabajos de Biorremediación ambiental, peor aún en la web, donde proliferan los manuales de bioseguridad aplicada a hospitales laboratorios farmacéuticos, industria alimenticia, laboratorios de microbiología, camales y otras dependencias públicas y privadas. En su mayoría tratan sobre el manejo de residuos infecciosos y restos anatómico-patológicos (Abbott, 1995; Garrity, 2007)

Nuestra búsqueda de un modelo de Manual de Bioseguridad para trabajos de Biorremediación ha sido infructuosa y frente a nosotros se presenta un reto de gran envergadura, que esperamos superar con trabajo, iniciativa y consulta multilateral, que nos permita cometer el mínimo de errores y nos deje grandes aprendizajes. Aspiramos a que la presente propuesta de Manual de Bioseguridad pueda ser sometida al escrutinio de especialistas, organismos de control y público en general, para que con sus conocimientos, ideas y recomendaciones se perfeccione y se constituya en una herramienta versátil, eficiente y segura para todo tipo de trabajo de Biorremediación ambiental, que se ejecute dentro y fuera del territorio nacional (Andina, 2003).

Es importante recalcar, además, la importancia que tiene la preservación de la Naturaleza, siendo esta el pilar de las políticas internas de nuestro país, la constitución ecuatoriana en algunos de sus artículos menciona el derecho de los ecuatorianos a vivir en un ecosistema equilibrado y sano, y reconoce además a la Naturaleza como un sujeto de ley dándole el derecho de ser defendida y confiriéndole garantías para su preservación. Esto invita a investigadores de la nación a desarrollar tecnologías dirigidas al control, preservación y recuperación de todo ambiente que de alguna forma ha sido afectado por actividades humanas.

## 6.2. Marco legal

La normativa de Bioseguridad surge de la necesidad de implementar medidas que eliminen o reduzcan al mínimo los riesgos de afectación a equipos, instalaciones, personal y ambiente de la manipulación microorganismos y/o sus derivados, en actividades de investigación, producción industrial, modificación genética y aplicación en trabajos de campo dirigidas a la descontaminación de espacios degradados por las actividades humanas (Biorremediación).

La Constitución de la República del Ecuador, vigente a partir de Julio del 2008, alberga dentro de sus mandatos, el mandato cuidado de preservar la naturaleza, salud y bienestar de los trabajadores; no obstante, no existe una legislación específica de Bioseguridad para el desarrollo de la Biotecnología ambiental a escala de laboratorio y campo, pero aún, para la manipulación genética de microorganismos con potencial ecológico ambiental y de interés económico comercial.

La constitución de la República del Ecuador en su Artículo décimo reconoce a la naturaleza como sujeto de ley, gozando de derechos de bienestar y protección, Art. 10 “Las personas, comunidades, pueblos, nacionalidades y colectivos son titulares y gozarán de los derechos garantizados en la Constitución y en los instrumentos internacionales. La naturaleza será sujeto de aquellos derechos que le reconozca la Constitución”.

Conjuntamente, en su artículo 27, la constitución, especifica “El derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza”. La legislación ecuatoriana, de tendencia ecologista, dedica el capítulo séptimo a establecer los derechos de la naturaleza, especificados en sus artículos 71 al 74.

La ley de gestión Ambiental puesta en vigencia desde 1999, establece en el Capítulo II “De la evaluación de impacto ambiental y del control ambiental” en el Art. 20 establece la exigencia de la licencia Ambiental previa para toda actividad que implique riesgo ambiental, que va en conformidad con lo que dicta la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida silvestre en su Art. 27 “La utilización con fines científicos de los bosques estatales requerirá únicamente la autorización o licencia otorgada por el Ministerio del Ambiente”. Esta ley también estipula el control de ingreso a áreas protegidas, y su sanción de incumplimiento en sus artículos 72 y 84.

“Art. 72.- En las unidades del patrimonio de áreas naturales del Estado, que el Ministerio del Ambiente determine, se controlará el ingreso del público y sus actividades, incluyendo la investigación científica. En los reglamentos se fijarán las tarifas de ingresos y servicios y los demás requisitos que fueren necesarios”.

“Art. 84.- Quien ingrese sin la debida autorización al patrimonio de áreas naturales del Estado, o realice actividades contraviniendo las disposi-



ciones reglamentarias pertinentes, será sancionado administrativamente con multa equivalente de uno a tres salarios mínimos vitales generales”.

De igual manera el Ecuador cuenta con un libro de legislación Secundaria del Ministerio de Ambiente, quienes en su título II del libro IV mencionan:

“Art. 8.- Los proyectos deberán contener la siguiente información:

- Nombre del proyecto
- Área precisa donde se llevará a cabo la investigación
- Justificación
- Objetivos
- Técnicas de observación
- Sitios de muestreo y toma de muestras
- Justificación de la cantidad de especies y especímenes a colectarse
- Tipos de manipulación
- Tipo de marcas
- Métodos de transporte de los especímenes
- Museo o herbario en el cual se depositarán los duplicados.
- Tipo y forma de manejo del hábitat
- Materiales y equipos
- Resultados esperados
- Impactos ambientales potenciales del proyecto
- Hoja de vida de los investigadores principales
- Cronograma de trabajo, incluyendo fecha de entrega de los informes parciales, cuando la investigación tiene más de un año de duración, y del informe final

“Art. 9.- Además del proyecto, los requisitos que deben cumplir tanto investigadores nacionales como extranjeros, para realizar actividades de investigación con el recurso flora y fauna silvestre son los siguientes:

- a) Solicitud del investigador dirigida al director del Distrito Regional correspondiente, conteniendo datos generales como nombres completos, número de cédula de identidad, pasaporte, domicilio y objetivos de la investigación.
- b) Aceptación del compromiso de entregar al Ministerio del Ambiente dos copias en formato impreso, disquete o disco compacto de los resultados de la investigación, en idioma castellano. Para los estudios

de tesis de licenciatura, doctorados u otros títulos profesionales, de investigadores nacionales, se deberá entregar el informe final de los resultados correspondientes. Adicionalmente, el investigador deberá entregar una copia de los resultados de su trabajo, a cada una de las Áreas Protegidas o Distritos Regionales donde se realizó la investigación. La falta en la entrega de los resultados finales o informes parciales de avance será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar sus actividades de investigación en el país.

- c) Los investigadores extranjeros no residentes en el Ecuador, adicionalmente a los requisitos anteriormente señalados presentarán la siguiente documentación:
- Compromiso de incorporar a un investigador ecuatoriano quien actuará como contraparte nacional en el proyecto de investigación en todas sus fases.
  - Carta de auspicio al investigador, conferida por una universidad, escuela politécnica o institución de investigación de su país, de reconocida trayectoria en la investigación del recurso silvestre.
  - Certificación de auspicio al investigador, otorgada por una universidad, escuela politécnica o institución de investigación nacional de reconocida trayectoria en la investigación del recurso silvestre, que tendrá responsabilidad por el cumplimiento de los compromisos asumidos por el investigador.
- d) El investigador se compromete entregar al Ministerio del Ambiente el registro de las especies objeto de su investigación, en formato digital, incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o colectados, con las coordenadas geográficas y otra información según el formato de la base de datos del Ministerio del Ambiente.

En cuanto a la salud y protección de los trabajadores la constitución también ofrece garantías, como en su Art. 33, donde menciona que el trabajador tiene derecho a un trabajo saludable. Existen otras instancias legales más específicas que protegen la salud y seguridad del trabajador.

El reglamento de seguridad y salud de los trabajadores y mejoramiento del ambiente de trabajo en su capítulo V “Medio Ambiente y riesgos labores por factores Físicos, Químicos y Biológicos” En sus artículos 53 al 68 conciertan garantías de seguridad para el desempeño de distintas actividades de los trabajadores.

Otra instancia que vela por la seguridad es el Instrumento Andino de Seguridad y Salud en el Trabajo. En su capítulo III “Gestión de la seguridad y salud en los centros de trabajo obligaciones de los empleadores”, el artículo 11, literales a, b, c, d, e, f, g, h, i, k; donde menciona que en toda instancia de debe precautelar la seguridad en el desarrollo de las actividades de los trabajadores. Los artículos 12 y 14, por su parte reiteran las responsabilidades de los empleadores para garantizar la seguridad y salud de los trabajadores.

Si bien existe información abundante sobre la bioseguridad en trabajos de laboratorio a nivel mundial y regional, nada existe de Bioseguridad en trabajos de biorremediación de campo, en forma escrita, peor aún documentos oficiales aprobados. En el Ecuador ni siquiera el Ministerio del Ambiente, dispone de un listado formal de microorganismos idóneos para biorremediación

### **6.3. Normativa para trabajos de remediación en campo**

Presenta varios componentes:

#### **6.3.1. Control de vehículos**

Se establecerá en el área de influencia del proyecto dos áreas para estacionamiento de vehículos:

Parqueadero A: será ubicado en la parte baja aledaña al área de tratamiento (o bioensayo). En esta solo ingresarán vehículos asignados por el proyecto para la movilización de muestras equipos y personal técnico, la cual deberá cumplir con todas las normas de seguridad establecidas en el capítulo 2.

Parqueadero B: Será ubicado en la parte junto a la caseta de control, a este espacio solo ingresarán los vehículos del personal administrativo, visitas, técnicos y autoridades que visiten el proyecto. La zona designada para este fin deberá cumplir con todas las normas de seguridad para la movilización de vehículos, establecida en la Ley orgánica de transporte terrestre y seguridad vial.

### **6.3.2. Operadores de la estación de trabajo**

- Aplicar las normas de Bioseguridad estándar.
- Utilizar el EPP dentro del área de las unidades experimentales.
- No ingerir alimentos ni bebidas durante las operaciones en la estación experimental.
- Recogerse el cabello con gorro de cirugía para Mujeres y caballeros con pelo largo.
- En lo posible sujetarse a un horario específico de ingesta de alimentos, en los espacios destinados para el efecto dentro del Campamento, previo al aseo y desinfección de manos y rostro.
- Lavar y desinfectar las herramientas empleadas después de un día de trabajo en la estación en el sitio destinado para tal efecto.
- Antes de la aplicación del consorcio bacteriano, se hará sonar una alarma para que todo el personal permanezca dentro de sus puestos fuera de las inmediaciones de las unidades de tratamiento.
- Durante los trabajos de aplicación del consorcio microbiano y nutriente, el personal de plataforma empleará el equipo de protección tipo escafandra.
- Para evitar la diseminación de microgotas de pool microbiano, la estación deberá contar con un sistema de cortinas de plástico, las mismas que se bajarán durante su aplicación.
- Al entrar y salir de las unidades de tratamiento, se deberá limpiar el calzado en un paso de seguridad líquido para la eliminación de contaminantes en el calzado.
- Dejar los EPP dentro del espacio destinado al tratamiento. Por ningún concepto el personal podrá salir del lugar ocupando la indumentaria de protección personal.

### **6.3.3. Visitas**

- Cualquier funcionario que desee realizar inspecciones o visitas deberá solicitar una cita previa, con la finalidad de brindar las seguridades necesarias durante su inspección.
- Asistir a la inducción de seguridad
- El personal no autorizado, no podrá ingresar bajo ningún precepto a las unidades operativas de la instalación.
- Se implementará señalética de prohibición de ingreso al área para per-

sonal no autorizado.

- Identificar el símbolo de riesgo biológico y mantenerse alejado de las zonas delimitadas.
- No ingerir alimentos durante la inspección

#### **6.3.4. Gestión de equipos de protección personal**

Cuando los riesgos no se puedan evitar o no se puedan limitar en forma eficiente por medios técnicos de protección colectiva o medidas y procedimientos organizacionales del trabajo, durante ensayos de tratamiento biológico, se deberá proporcionar a sus trabajadores equipos de protección individual adecuados para el desempeño de sus funciones y velar por el uso efectivo de los mismos.

En este contexto el personal de QHSE, debe garantizar la disponibilidad de equipos de protección personal, en cantidad y calidad necesarias, para las operaciones en la estación de tratamiento y laboratorio y para situaciones de riesgo inusuales (visita de funcionarios, estudiantes, prensa, etc.)

El bodegaje de dichos equipos se realizará en un sitio claramente señalado de la estación. Los equipos deben mantenerse secos y limpios; bajo inventario en bodega, no solo los nuevos, sino también los que están en uso, en reparación o mantenimiento y dañados (desechados). Se dispondrá de alternativas de equipos en marcas, calidad y precio, esto viabilizará su adquisición en caso de que los equipos en uso, no respondan a las especificaciones de seguridad esperadas.

Los equipos de protección individual proporcionarán una protección eficaz frente a los riesgos que motivan su uso, sin generar u ocasionar por sí mismos riesgos adicionales ni molestias. Por esta razón los EPP deben:

- Responder a las condiciones existentes en el lugar de trabajo.
- Adecuarse a las características anatómicas, fisiológicas y el estado de salud del trabajador.
- Adecuarse al usuario, tras los ajustes necesarios. En el caso de que existan riesgos múltiples que exijan la utilización simultánea de varios equipos de protección individual, éstos deberán ser compatibles entre sí y mantener su eficacia en relación con el riesgo o riesgos correspondientes.

### **6.3.5. Gestión de los Equipos de Protección Individual (EPP) frente al riesgo biológico**

Antes de la implantación de una prenda de protección individual frente a una determinada situación de riesgo, debe tenerse en cuenta una serie de aspectos para que la utilización de dicha protección sea lo más acertada posible (Leslie, 1996; Kiely, 2003).

#### **Elección de equipos adecuados**

Para la elección de equipos adecuados, se debe establecer el grado de protección necesario, para diferentes situaciones de riesgo y el grado de protección que ofrecen los distintos equipos frente a estas situaciones. En este contexto, se debe verificar la disponibilidad de esos equipos en el mercado, con el fin de garantizar su compra, mantener una reserva o a su vez, buscar otros que reúnan los niveles de seguridad exigidas. Los trabajadores y sus representantes deben ser consultados antes de la adquisición de EEP nuevos. La práctica indica que la aceptación de un modelo determinado por parte del usuario es fundamental para garantizar su uso posterior (SIMONDS, 1996).

Los equipos de protección personal se clasifican en:

#### ***Protección a la Cabeza***

Los elementos de protección a la cabeza, se refiere a cubiertas de seguridad que proveen protección contra casos de impactos, penetración de objetos que caen sobre la cabeza, así como también pueden proteger contra choques eléctricos y quemaduras o adhesión de partículas al cabello.

- Se contará con cofias (para laboratorio) y cascos de seguridad (para campo)

#### ***Protección de ojos***

Todos los trabajadores que ejecuten operaciones que generan riesgo para los ojos, deberán disponer de un equipo de protección apropiada. Para trabajos con cultivos microbianos en laboratorio y campo se requiere gafas

protectoras, de igual forma para quienes emplean sustancias químicas corrosivas o similares, Las gafas serán fabricadas de material blando que se ajuste a la cara, resistente al ataque de dichas sustancias.

### **Protección Respiratoria**



**Figura 5.1** mascarillas

Los equipos de protección respiratoria reducen la entrada de microorganismos y aerosoles biológicos por las vías respiratorias. Los microorganismos pueden ingresar a las vías respiratorias asociados a gotas de fluidos biológicos o partículas, por esta razón se debe elegir equipos de protección frente a partículas.

Para trabajos de laboratorio con cultivos deberá emplearse mascarillas N95 ó N100, 3M con carbón activado (mascarilla autofiltrante), que brindan protección respiratoria contra microorganismos que se transmiten por aerosoles.

De igual forma en el campo en forma conjunta con overoles (-ISO 22611), resistentes a la penetración de aerosoles que contienen bacterias. Las mascarillas autofiltrantes para partículas FFP3 es la que ofrece la eficacia de filtración más elevada (superior al 98%, factor de protección nominal 50)<sup>30</sup>.

El uso inadecuado del respirador puede ocasionar una sobre exposición a los contaminantes provocando enfermedades e incluso la muerte. En la estación se contará con los siguientes protectores respiratorios: Mascarillas desechables y Mascarillas con filtro de carbono.

### **Protección Facial**



**Figura 5.2** protección rostro

Para la protección del rostro se emplea pantallas faciales transparentes para reducir la contaminación en la zona frontal de la cara y cuello o para proteger el rostro contra impactos de partícula, salpicaduras de gotas que pueden llegar a los ojos o a otras zonas del rostro. La pantalla facial se coloca por encima de las gafas panorámicas y mascarilla.

Estas pantallas deben usarse tanto en trabajos de laboratorio como en trabajos de campo durante la aplicación de microorganismos a los sistemas de tratamiento.

<sup>30</sup> <https://www.interempresas.net/Proteccion-laboral/Articulos/212159-Equipos-de-proteccion-frente-al-riesgo-biologico.html>



**Protección de Pies y Piernas****Figura 5.3** botas de caucho

El calzado de seguridad debe proteger las extremidades de los trabajadores contra riesgos de humedad, sustancias o superficies calientes, contra superficies ásperas, contra pisadas sobre objetos filosos y agudos y contra caída de objetos, así mismo debe proteger contra el riesgo eléctrico. Las Botas de caucho con punta de acero son una elección adecuada.

Las botas de caucho son adecuadas para los trabajos de campo en plataforma de tratamiento, pueden lavarse y desinfectarse fácilmente, deben usarse en forma conjunta con overoles. Para el laboratorio, se recomienda un calzado cómodo bajo cubierto con sobre bota desechable.

**Protección de manos**

Para los trabajos de laboratorio con microorganismos se contará con guantes desechables de látex. Guantes de nitrilo para trabajos de aplicación de microorganismos, operación, limpieza y mantenimiento de la plataforma de tratamiento. En caso de necesidad se contará con guantes diseñados para altas, y bajas temperaturas, así como contra descargas eléctricas.



Figura 5.4. tipos de guantes a) para bajas temperaturas, b) guantes de nitrilo

### 6.3.6 Normalización Interna de uso

Para la correcta utilización de los EPP adquiridos interesa, además de seguir las instrucciones contenidas en el folleto informativo, entregado por la casa proveedora del equipo, (pasaporte del producto); establecer un procedimiento normalizado de uso, que informe de manera clara y concreta sobre los siguientes aspectos:

- Zonas o tipo de operaciones en que debe utilizarse
- Instrucciones sobre su correcto uso
- Limitaciones de uso, en caso de que las hubiera
- Instrucciones de almacenamiento
- Instrucciones de limpieza
- Instrucciones de esterilización de indumentaria, semanal.
- Instrucciones de conservación
- Fecha o plazo de caducidad del EPP o de sus componentes
- Criterios, si los hubiere, de detección del final de su vida útil

Las normas generales de uso de elementos barrera en Plantas de tratamiento biológico de residuos, se describen en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Normas generales de utilización de los elementos de barrera en las operaciones de la Plataforma de remediación (Estación experimental)

Equipos de Protección Personal EPP	Riesgo identificado
Guantes	Contacto con residuos Sólidos, lixiviados o percolados
Protección ocular	Contacto con partículas de polvo Aerosoles o salpicaduras líquidos
Mascarilla	Contacto con polvo, aerosoles salpicaduras
Ropa de protección	En dependencia de la actividad, Delantales, overoles, botas.

### 6.3.7. Adquisición y distribución

Los EPP deben ajustarse a las características anatómicas de cada trabajador, factor que ha de considerarse en el momento de su adquisición. A su vez, cada usuario debe ser informado e instruido sobre las características y uso de este, además ser responsable del mantenimiento y conservación del equipo que se le entrega. Esto es posible si la asignación de los equipos es personalizada y se establece un mecanismo de seguimiento y control. En caso de que algunos equipos deban utilizarse por varias personas a la vez, deberán tomarse las medidas necesarias para que no origine problemas de salud o de higiene a los distintos trabajadores. Cuando esto no pueda garantizarse, se sustituirán aquellas partes de este que sean necesarias, como sería el caso del grupo D de la tabla 6.2.

**Tabla 6.2.** Clasificación de equipos de protección considerando el carácter personalizado o no de su utilización

	CLASE	EPP
A	Desechables	Guantes de un solo uso.
B	Reutilizables de asignación personal	Gafas, mascarillas autofiltrantes y batas.
C	Reutilizables e intercambiables con control general	Equipos de uso específico y esporádico. Su intercambio no representa un riesgo para la salud: delantales, mandiles, pantallas faciales.

D	Reutilizables e intercambiables con control específico	Equipos de uso específico y esporádico. Su intercambio puede representar un riesgo para la salud: máscaras, equipos autónomos y semiautónomos.
---	--	--

- Los equipos de uso general (como los guantes de látex): se distribuirán por todas las unidades de la Estación, una vez que se hallen en uso, se considerarán asignados de forma personalizada.
- Gafas de seguridad: se recomienda su asignación personalizada a todo el personal de la planta, disponiéndose siempre de un excedente para el personal eventual. Es importante que quede claramente establecida la protección que ofrecen.
- Viseras, delantales y ropa de protección específica: suelen tener un uso frecuente en los trabajos de campo, en la desinfección de materiales equipos y autos. Por esta razón se deberá disponerse de un stock suficiente en un almacén centralizado y su asignación tendrá carácter personal.
- Equipos de protección respiratoria: tendrán siempre una asignación personalizada. Las mascarillas autofiltrantes desechables se guardarán en un almacén centralizado; pero conforme vayan solicitándose se considerarán de uso personalizado.

### 6.3.8. Supervisión e implantación

Es necesaria la intervención del Comité de Bioseguridad en todo el proceso, desde su elección hasta la correcta utilización y posterior mantenimiento de los EPP.

La implantación satisfactoria de un programa de gestión de equipos de protección individual en una planta de tratamiento biológica de residuos debe considerar, los siguientes aspectos:

- Mantenimiento de un stock mínimo de todos los EPP, ya que cuando se requiere su utilización no se puede recurrir a otro sistema de protección.
- Facilitar una formación e información en materia de uso adecuado de EPP a todo el personal sujeto a riesgo biológico. Para ello se realizarán actividades formativas e informativas en las que se darán

a conocer los diferentes equipos disponibles, tanto de uso personalizado como colectivo y ambiental, la obligatoriedad de utilización, recomendaciones y mantenimiento de estos.

- Todo el personal deberá conocer y disponer por escrito de un documento en el cual se indique el número y tipo de equipos disponibles, además de los que se entreguen personalmente, las situaciones y operaciones en las que es obligatorio su uso, las condiciones de utilización y mantenimiento, el lugar de almacenamiento y todos aquellos procedimientos necesarios para su gestión.
- Los equipos deben entregarse con acuse de recibo, adjuntando por escrito las instrucciones de utilización cuando se considere necesario.
- A fin de aumentar la eficacia en el uso de estos equipos en especial cuando el usuario no es un profesional experto (por ejemplo, personal en prácticas, estudiantes, personal nuevo), es necesario que, en los diferentes ambientes de la Planta de tratamiento, existan recordatorios escritos y señalización.
- La capacitación e información, del personal expuesto a riesgo biológico quien debe distinguir claramente entre los equipos de protección individual y los equipos de protección colectiva (ambiental).

#### 6.4. Gestión de equipos de protección ambiental (EPA)

Los equipos de protección ambiental son para empleo en condiciones de campo, esto es fuera de laboratorio, en estaciones de tratamiento, áreas conexas y operaciones *in situ* a campo abierto (Kiely,2003; Niven, 1997; Storch,1998).

- **Pantallas de duchas:** En caso de emplear duchas, para la aplicación del fluido microbiano, estas dispondrán de pantallas de plástico plegables, que limiten la diseminación del fluido microbiano nebulizado.
- **Láminas de plástico:** Otra alternativa es el empleo de láminas de plástico, con orificio de entrada para las duchas. El plástico deberá cubrir el área operativa (plataforma, surco o pila) y será retirado, lavado y desinfectado una vez concluida la aplicación microbiana, para las operaciones de mezclado.
- **Equipo de control de derrames:** En los trabajos de remediación ambiental, son frecuentes los derrames (micro y macro), para su control

eficiente se emplearán: bombas, recipientes de recogida, materiales adsorbentes, barreras, estabilizantes, trampas de grasa y equipos de tratamiento de aguas portátil. Cada uno de ellos contará con un manual de operaciones, mantenimiento y limpieza.

- **Sistemas de ventilación.** Para operaciones en plataforma cubierta, es probable la necesidad de emplear ventiladores del área operativa. El ventilador debe garantizar la renovación del aire de plataforma. Si los trabajos se ejecutan en instalaciones cerradas, la salida del aire será controlada por filtros especializados para retener COVs, material particulado o aerosoles microbianos.
- **Equipos para tratamiento de efluentes:** Las operaciones de tratamiento de residuos generan lixiviados que requieren un tratamiento. En operaciones de campo abierto en especial en zonas de alta pluviosidad el volumen de aguas a tratar es considerable, para evitar que estas abandonen la zona de tratamiento llevando contaminantes y microorganismos a zonas aledañas y esteros, debe ser tratada con ayuda de un equipo portátil de tratamiento químico convencional.

Adicionalmente, para asegurar al máximo la reducción de posibles riesgos ambientales, las plataformas de tratamiento (Compostaje, landfarming), deberán contar con:

- **Bermas perimetrales**, que impidan la salida del agua de escorrentía, fuera de la zona de tratamiento.
- **Fosas perimetrales**, que eviten la entrada de aguas de escorrentía procedente de áreas aledañas a la zona de tratamiento.
- **Impermeabilización** de la base con geomembrana o arcilla sellada con bentonita, para evitar la lixiviación de contaminantes y microorganismos a los niveles freáticos.
- Siempre que sea posible, dispondrán de una **cubierta** tipo invernadero o liner, para evitar los efectos negativos de las lluvias y viento.
- Dispondrán de equipos de bombeo (aguas lluvias, lixiviados). Sistema de introducción automática de microorganismos (duchas, goteo, aspersión). Materiales adsorbentes para control de derrames y microderrames. Sustancias desinfectantes para materiales, equipos y herramientas, así como para el personal operativo.

En la tabla 6.3. se muestra la relación entre la actividad de trabajo, el riesgo biológico y los equipos de protección recomendados.

**Tabla 6.3.** Protecciones recomendadas en función de las áreas de trabajo y el riesgo biológico existente

AREA DE TRABAJO y ACTIVIDAD	RIESGO BIOLÓGICO	PROTECCIÓN RECOMENDADA
Control de entrada de vehículos	Derrames, formación de aerosoles, inhalación	Uso de mascarilla, gafas y guantes
Descarga de residuos, lixiviados	Derrames, formación de aerosoles, inhalación, salpicaduras.	Ropa de trabajo, Uso de mascarilla, gafas y guantes
Tendido y estabilización	Derrames, formación de aerosoles	Uso de mascarilla, gafas y guantes
Almacenamiento	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras, derrames y lixiviados	Gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad, ropa de trabajo
Tratamiento	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras	Gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad. Protector auricular
Adición de pool microbiano	Inhalación de aerosoles, salpicaduras. Derrames	Traje tipo escafandra
Adición de nutrientes (bioles)	Inhalación de aerosoles, salpicaduras. Derrames	Traje tipo escafandra
Aireación y mezclado	Generación de vapores, aerosoles e inhalación. Salpicaduras	Overol, guantes, mascarilla, gorro y gafas de seguridad
Muestreo	Inhalación de aerosoles y vapores	Mascarilla, gorro, guantes y gafas de seguridad
Control de parámetros de proceso.	Inhalación de aerosoles y vapores	Mascarilla, gorro, guantes y gafas de seguridad
Operadores de excavadora	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras	Gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad. Protector auricular. Ropa de trabajo.
Supervisores de seguridad	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras, derrames	gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad, ropa de trabajo
Tratamiento de aguas y lixiviados	Riesgo de pinchazos o cortes. Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras	Utilizar doble guante gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad ropa de trabajo

Evacuación de lodos del tratamiento de aguas	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras Riesgo de pinchazos o cortes.	gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad Utilizar doble guante Ropa de trabajo
Operaciones de limpieza y desinfección	Salpicaduras Inhalación de aerosoles y polvo Riesgo de pinchazos o cortes.	gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad Utilizar doble guante Ropa de trabajo
Salida de vehículos, desinfección	Derrames, formación de aerosoles, inhalación	gafas protectoras herméticas y mascarilla, o preferiblemente pantallas de seguridad
Baños, sanitarios y vestidores	Caídas, cortes, pinchazos Ingestión accidental	Utilizar doble guante Uso de mascarilla
Oficinas	Riesgo de pinchazos o cortes	Minimizar el uso de corto punzantes
Comedor	Ingestión accidental Riesgo de pinchazos o cortes	Lavado de manos Ingreso restringido para personal con equipo contaminado.
Talleres de mantenimiento	Ingestión accidental Caídas, cortes, pinchazos	Utilizar doble guante Calzado de seguridad antideslizante Uso de mascarilla
Visitantes	Inhalación de aerosoles y polvo Salpicaduras, ingestión accidental	Uso de mascarilla, gafas, casco de seguridad.

Las normas a observarse en los trabajos de laboratorio, pueden tomarse del libro MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO Tercera edición ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS, 2005).

### 6.5. Gestión integral de residuos

En las estaciones de tratamiento deberá adoptarse un sistema de identificación y separación del material infeccioso y sus recipientes. Para el efecto, se seguirán las normas nacionales e internacionales y se tendrán en cuenta las siguientes categorías:

- **Desechos no contaminados** (no infecciosos) que puedan reutilizarse, reciclarse o eliminarse como si fueran «basura» en general.
- **Objetos cortantes y punzantes** contaminados (infecciosos): agu-



jas hipodérmicas, bisturís, cuchillas, vidrio roto; se recogerán siempre en recipientes a prueba de perforación dotados de tapaderas y serán tratados como material infeccioso (generalmente originados en el laboratorio)

- **Material contaminado** destinado al tratamiento en autoclave que después pueda lavarse y volverse a utilizar o reciclarse (laboratorio).
- **Material contaminado** destinado al tratamiento en autoclave y a la eliminación (materiales generados en plataforma de tratamiento).
- **Material contaminado** destinado a la incineración directa (materiales generados en plataforma de tratamiento).

Para la eliminación de basuras, se emplearán las Normas internacionales por medio de bolsas de colores:

- Color verde: desechos ordinarios, inertes, no peligrosos, biodegradables
- Color rojo: Desechos que implique riesgo biológico (generados en laboratorio y plataforma)
- Color gris: Domésticos, Reciclables, vidrio, chatarra, plástico, papel y cartón (generados en las áreas administrativas del Campamento).

## 6.6. Manejo de muestras

### 6.6.1. Recipientes para muestras

- Los recipientes para muestras de suelos, sedimentos y materiales contaminados con hidrocarburos deben ser de vidrio color ámbar. Comúnmente se utilizan sobres de papel de aluminio, que se introducen dentro de fundas con cierre etiquetadas. No se admiten recipientes de plástico por cuanto alteran los resultados de TPHs y HAPs.
- Los recipientes para muestras biológicas pueden ser de vidrio o, preferiblemente, de plástico esterilizados.
- Deben ser fuertes y no permitir fugas cuando la tapa o el tapón estén correctamente colocados.
- En el exterior del recipiente no debe quedar ningún material.
- Los recipientes han de estar correctamente rotulados para facilitar su identificación.

- Los formularios de la muestra no se colocarán alrededor de los recipientes, sino por separado, en sobres impermeables.

### **6.6.2. Transporte de muestras dentro de la instalación**

- Para evitar fugas o derrames accidentales, utilizar envases/embalajes secundarios (por ejemplo, cajas) equipados con gradillas, de modo que los recipientes que contienen las muestras se mantengan en posición vertical.
- Los envases/embalajes secundarios pueden ser de metal o de plástico, pero deben poderse tratar en autoclave o ser resistentes a la acción de agentes desinfectantes químicos.
- Las muestras deben transportarse bajo refrigeración (4°C), con ayuda de geles. ¡No usar bolsas de hielo!
- Las muestras contarán con la cadena de custodia correspondiente, que asegure la integridad de las mismas durante el transporte desde el campamento de tratamiento, hasta el laboratorio certificado elegido para su análisis.
- Las muestras deberán ser entregadas en el laboratorio en un plazo máximo de 24 horas, para evitar alteraciones sensibles, que generen resultados adversos.

### **6.6.3. Recepción de las muestras**

- La recepción de muestras de material biológico se deberá sujetar a las especificaciones técnicas de Bioseguridad diseñadas por el laboratorio.
- Si el número de muestras de residuos o sustratos para tratamiento es elevado, el laboratorio deberá disponer de un refrigerador dedicado para su almacenamiento temporal, mientras se van evacuando las primeras.
- La entrega de muestras se efectuará en la recepción del laboratorio, con toda la información de la procedencia, tipo, cantidad, ubicación, responsable, hora y fecha de muestreo (cadena de custodia).
- El personal técnico de laboratorio será el encargado de recibir las muestras, por ningún concepto personal no autorizado podrá ingresar al laboratorio con las muestras de estudio.

#### 6.6.4. Apertura de los envases/embalajes

- El personal que recibe y desempaqueta las muestras debe conocer los riesgos para la salud que entraña su actividad y debe estar capacitado para adoptar precauciones
- Se dispondrá de desinfectantes, materiales adsorbentes y de limpieza en caso de ocurrir derrames.
- Las prácticas y los procedimientos básicos de contención del nivel de bioseguridad 2 deben ser el requisito mínimo para la manipulación de muestras.

#### 6.7. Manejo de cultivos

- Cada cultivo antes de ser identificado debe ser tratado como mínimo dentro del grupo de riesgo 2. El personal del laboratorio debe usar el EPP completo.
- Todos los recipientes (tubos, cajas petri, etc.) que contengan cultivos microbianos deben llevar etiquetas bien claras con el nombre científico del contenido, la fecha de almacenamiento y el nombre de la persona que los cultivó y almacenó.
- Cualquier cultivo que no se encuentre debidamente identificado será autoclavado.
- Se debe trabajar con cada cultivo por separado para evitar contaminación cruzada entre los cultivos que se tenga en el laboratorio.
- A fin de garantizar una carga microbiana durante la siembra se emplearán asas microbiológicas de un diámetro de 2–3 mm con un anillo completamente cerrado. Los mangos no deben tener más de 6 cm de longitud para reducir la vibración al mínimo.
- Una vez utilizada el asa bacteriológica debe ser correctamente esterilizada con el mechero bunsen incluido el mango.
- Una vez inoculada la caja petri se debe cubrir sus bordes con Parafilm y colocarla con el medio, boca abajo en la incubadora.
- Para el caso de tubos, después de inocularlos además de esterilizar el asa, se esteriliza la boca del tubo y para colocarlos en la incubadora se puede usar gradillas o envases resistentes al calor.

### 6.7.1 Preparación de pool microbiano

- Las medidas de Bioseguridad a aplicarse dependerán del tipo de microorganismo, según los grupos de riesgo de la OPS/OMS.
- Las pruebas de compatibilidad y antagonismo deben realizarse con antelación a la preparación del pool, en tal forma que se optimicen materiales, reactivos y tiempo operativo.
- En la preparación del pool microbiano, el personal empleará el EPP completo y todas las operaciones se efectuarán dentro de la cámara de flujo laminar.
- Una vez preparado el pool, identificarlo creando un código en el cual estén contenidos los nombres de los microorganismos, además del código se debe anotar en la etiqueta la fecha de preparación y el nombre del encargado.
- Una vez terminado el trabajo con el pool se debe desinfectar las mesas de trabajo y equipos utilizados.
- Se debe llevar un registro donde consten todos los pools microbianos preparados, los microorganismos que los integra, la fecha en la que fueron preparados y cualquier particularidad de este.

### 6.7.2 Transporte de pool microbiano

Esta operación es necesaria cuando las zonas en tratamiento están alejadas del laboratorio (trabajo a campo abierto). Para garantizar la seguridad del personal, equipo empleado y el ambiente, se considerarán las siguientes normas:

- **Transporte de Vacuum.** Se empleará cuando no se dispongan de tanques de propagación *in situ*, en tal forma que el Vacuum hará la descarga directa del pool microbiano con ayuda de inyectores, duchas u otras de las alternativas de aplicación.
- **Transporte en tanque biorreactor** (1000 litros). Esta alternativa se empleará cuando la zona de tratamiento cuenta con tanques de propagación. Una vez en el sitio, el pool se bombeará con ayuda de una bomba de inmersión de 1HP, evitando en lo posible el contacto directo del personal con el pool.
- **Bombeo del pool en plataforma.** Para trabajos en plataforma dentro del Campamento Base, el pool será bombeado en circuito

cerrado desde el laboratorio hasta los tanques de propagación, empleando el sistema de circulación instalado. La mejor alternativa es la aplicación del pool microbiano por gravedad.

Para el transporte del pool, los vehículos deberán cumplir con los siguientes requisitos:

- El vehículo deberá contar con los permisos correspondientes para la realización de dichos trabajos.
- Deberá portar el símbolo de riesgo biológico a los costados y parte trasera del tanque.
- La ruta y horario de transportación, deberá contar con la aprobación del organismo de control.
- Los vehículos deberán contar con materiales y herramientas para el control de posibles derrames o fugas durante el transporte.
- Las operaciones de transporte serán monitoreadas por radio. En lo posible los vehículos contarán con un sistema de GPS, para su ubicación y asistencia oportunas.
- Los vehículos serán acompañados por una camioneta con personal de seguridad, quienes velarán porque las rutas estén expeditas y no exista contratiempos.
- El personal implicado en las operaciones de transporte deberá emplear el EPP, compuesto de:
  - a) Casco de seguridad + cofia.
  - b) Mascarilla
  - c) Overol.
  - d) Delantal impermeable.
  - e) Botas de caucho.
  - f) Guantes de vinilo.
  - g) Pantalla facial

### **6.7.3 Descarga en tanques**

- Para las operaciones de descarga, se deberán emplear mangueras y tuberías de unión rápida.
- La descarga empezará una vez que todas las tuberías estén perfectamente ensambladas y verificado el estado funcional de llaves, válvulas y compuertas.

- El personal encargado del transporte del pool será quien realice la descarga.
- En caso de derrames, el personal dispondrá de suficiente cantidad de material desinfectante, adsorbente, estabilizante y herramientas para su control y retiro.
- Si el pool se derrama sobre la ropa de protección, terminar la descarga y cambiarse y desinfectar el equipo en conformidad con el protocolo aprobado.

### **6.7.4 Aplicación del pool en unidades de tratamiento**

- El personal encargado de la aplicación del pool en las unidades de tratamiento debe utilizar el equipo de protección personal (traje tipo escafandra), independientemente de la metodología de aplicación.
- Emplear todas las barreras disponibles para evitar la diseminación del pool nebulizado (ver barreras).
- Delimitar con cinta de seguridad el área de aplicación.
- Emplear una señal audible de prevención unos minutos antes de la aplicación del pool.
- Mantener el control de todos los efluentes de la plataforma de tratamiento durante la aplicación.
- No comer, beber ni fumar, durante los trabajos de aplicación y dentro del área de tratamiento.

## **6.8. Control y monitoreo**

### **6.8.1 Lixiviados**

- Para el control de lixiviados de debe construir canales perimetrales en las plataformas de almacenamiento, tratamiento, espacios en tratamiento al aire libre.
- Se cuantificará el volumen de lixiviados generados y se empleará como un indicador de la calidad y velocidad del proceso de biorremediación (en plataforma).
- En operaciones de campo abierto los lixiviados se controlarán mediante pozos de control construidos en la zona de mayor pendiente del área de tratamiento (Landfarming).

- Todos los lixiviados serán bombeados a la planta de tratamiento de aguas residuales.

### 6.8.2 Microorganismos

**Laboratorio** (World Health Organization, 2005).

- Se debe realizar un control de las cepas aisladas en el laboratorio, cambiándolas de medio de cultivo periódicamente y observaciones al microscopio.
- De igual forma se debe realizar el mismo control de las cepas con los consorcios o pools que proceden de las plataformas de tratamiento.

### **Campo**

- Se deben realizar conteos periódicos de microorganismos en áreas aledañas a las plataformas o zonas de tratamiento, con el propósito de verificar la presencia de fugas o derrames (contaminación microbiana).
- Las aguas y lixiviados de las zonas de tratamiento son portadoras de microorganismos, los mismos que deberán monitorearse en forma mensual, para su evaluación, eliminación y control.
- El control de microorganismos degradadores empleados en la biorremediación debe realizarse cada semana, independientemente de la metodología de tratamiento usada.

### 6.8.3 Monitoreo de residuos

Los residuos generados en las operaciones del Campamento base (plataformas de almacenamiento, tratamiento, oficinas, áreas administrativas y recreacionales), serán cuantificados periódicamente (trimestralmente), con el propósito de generar metodologías y procedimientos para su reducción y manejo integral (Brunklaus, 2008; Tchobanoglous, 1998). Se identificará el área operativa de mayor generación y la operación unitaria responsable, con el propósito de introducir mejoras operativas, que tiendan a reducir su cantidad.

#### **6.8.4 Monitoreo del tratamiento de aguas**

Las operaciones de tratamiento de aguas se monitorearán trimestralmente, para corregir falencias operativas, mejorar los parámetros de calidad de las aguas y lixiviados tratados. Se revisará semanalmente el sistema de conducción de aguas residuales y toda infraestructura anexa que garantice la integridad del sistema de tratamiento. Trimestralmente se evaluará la calidad de las aguas que se descargan, mediante la toma de muestras y su envío para análisis a un laboratorio certificado independiente, cuyos resultados serán reportados al organismo de control, en cuanto a su calidad microbiológica.

#### **6.8.5 Monitoreo del tratamiento biológico de residuos**

El monitoreo de los parámetros de tratamiento biológico es una actividad rutinaria detallada en el manual de operaciones; sin embargo, para fines de control de la autoridad competente, el proceso de tratamiento de evaluará mensualmente, sus resultados se incorporarán en el reporte al cliente y a los organismos de control.

El personal de seguridad monitoreará permanentemente la observancia de las normativas de Bioseguridad durante todas las operaciones de tratamiento en campo y en plataforma cubierta del Campamento Base. Emitirá un informe mensual con las novedades.

### **6.9. Comité de Bioseguridad**

Toda instalación, donde se manipulen agentes biológicos en forma de cultivos puros, extractos, derivados y residuos, requieren la implementación de un Comité de Bioseguridad que se encargue de diseñar los procesos, normativas y seleccionar los equipos idóneos que garanticen la seguridad del personal frente a la exposición accidental de agentes biológicos, potencialmente infecciosos.

Las plantas de tratamiento biológico de residuos, donde se emplean considerables volúmenes de cultivo microbiano, materia orgánica (bioles), restos de cultivos, residuos domésticos y estiércol, portadores de microorganismos potencialmente patógenos; deben en forma obligatoria conformar un Comité de Bioseguridad.



El Comité de Seguridad Biológica, agrupa por regla general a personal técnico multidisciplinario: ambientalistas, microbiólogos, médicos, ingenieros químicos, epidemiólogos, ingenieros electrónicos, mecánicos entre otros. Considerando la especificidad de las labores de la Planta de tratamiento biológico, se sugiere la siguiente composición.

### 6.9.1 Conformación

El Comité de Bioseguridad se integrará de la siguiente manera:

- Gerente de Operaciones
- Gerente de QHSE (Quality Health Security and Environment)
- Técnico de laboratorio
- Supervisores

### 6.9.2 Funciones

- Revisión periódica y actualización del Programa de Seguridad Biológica de la Planta.
- Capacitación permanente y actualizada del personal propio y ajeno, en temas de Seguridad Biológica.
- Evaluar riesgos biológicos de la introducción de cambios operativos en la Planta.
- Seleccionar, adquirir y dotar equipos de protección al personal de la Planta.
- Determinar cambios de las sustancias utilizadas en calidad de desinfectantes, desodorizantes, en caso de que su acción no sea eficiente.
- Organizar un programa de inmunizaciones para el personal de la Planta.
- Evaluar el nivel de riesgo de las operaciones unitaria de la plataforma y desarrollar la normativa adicional correspondiente en caso de no hallarse en el presente manual.
- Vigilancia médica integral del personal de la planta de tratamiento.
- Llevar un registro de frecuencia de incidencia de enfermedades, digestivas, respiratorias, de la piel y otras atribuibles a las operaciones.
- Establecer las Políticas de Bioseguridad de la Planta.

En la tabla 6.4, se definen los aspectos de capacitación requeridos para el personal en las plataformas de tratamiento biológico.

**Tabla 6.4.** Temas de capacitación al personal operativo

<b>CAPACITACIÓN DE SEGURIDAD EN</b>	<b>BIOSEGURIDAD</b>	<b>MEDIDA EQUIPO</b>
Transporte	De consorcio microbiano. De muestras para análisis. De control, de UFCs. De desinfección vehicular. De área de recepción	Refrigeración cooler 4°C Sello de seguridad Equipos de seguridad personal (EPP) Guía MAE Ruta- horario/kit limpieza
Propagación	m/o en tanques	EPP completo Pantalla facial Desinfección de frascos Fundas ziplock / sellado cooler
Aplicación	m/o en unidades experimentales	Aplicación por goteo, por gravedad. EPP. Permatex para sellado. Limpieza y desinfección. Herramientas Kit de limpieza.
Volteo y aireación	Semanal Manual o mecanizada	EPP Desinfección de calzado Limpieza y desinfección de herramientas y materiales Kit de limpieza
Control de parámetros de proceso	T, Conductividad, Humedad, pH, nutrientes	EPP Equipos de medición. Reactivos Limpieza y desinfección de equipos. Recipientes para infecciosos.

## 6.10. Bibliografía

1. Abbott, L. (1995). The use and effects of glutaraldehyde: a review. Occupational health; a journal for occupational health nurses, 47(7), 238-239.
2. Andina, C. (2003). Decisión 584: Sustitución de la Decisión 547, Instrumento Andino de Seguridad y Salud en el Trabajo. Guayaquil, Ecuador:

- Sistema de Información sobre Comercio Exterior, Organización de los Estados Americanos. Recuperado de: <http://www.sice.oas.org/trade/junac/decisiones/DEC584s.asp>.
3. Brunklaus, B. (2008). Organising matters for the environment: Environmental studies of housing management and buildings. Chalmers University of Technology.
  4. Del Ecuador, A. C. (2008). Constitución de la República del Ecuador, Última modificación: 12 de marzo de 2020.
  5. en el Laboratorio, M. D. B. (2005). Organización Mundial de la Salud. OMS. Tercera Edición. Ginebra.
  6. Garrity, G. (2007). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
  7. Kiely, G., & Veza, J. M. (2003). Ingeniería Ambiental: Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión (No. 620.8 K5.). Bogotá: McGraw-Hill.
  8. Leslie, G. B. (1996). The toxicologic importance of formaldehyde and glutaraldehyde in the hospital environment. *Indoor and Built Environment*, 5(3), 132-137.
  9. Niven, K. J., Cherrie, J. W., & Spencer, J. (1997). Estimation of exposure from spilled glutaraldehyde solutions in a hospital setting. *The Annals of occupational hygiene*, 41(6), 691-698.
  10. SIMONDS, G. (1996). La seguridad industrial. Ediciones KLM.
  11. Storch de Gracia, J. M. (1998). Manual de seguridad industrial en plantas químicas y petroleras: fundamentos, evaluación de riesgos y diseño. Editorial Alfa y omega México.
  12. Tchobanoglous, G. (1998). Gestión integral de residuos sólidos: volumen 1. Mexico. Mc Graw Hill.
  13. TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA DE MEDIO AMBIENTE. Decreto Ejecutivo 3516. Registro Oficial Edición Especial 2 de 31-mar.-2003. Última modificación: 29-mar.-2017. Estado: Reformado
  14. World Health Organization. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
  15. <https://www.interempresas.net/Proteccion-laboral/Articulos/212159-Equipos-de-proteccion-frente-al-riesgo-biologico.html>





# • CAPÍTULO VII •

ESTUDIO DE CASOS

## CAPÍTULO VII

### ESTUDIO DE CASOS

Con frecuencia la bibliografía especializada en la temática, cita trabajos de biorremediación ejecutados en Europa, Asia o los Estados Unidos. Un 90 % de las citas bibliográficas corresponden a investigaciones de microcosmos y mesocosmos realizadas en condiciones de laboratorio, el 10% restante recoge información muy general sobre trabajos ejecutados en campo, sin ofrecer detalles de cómo se ejecutaron, las dificultades operativas, tecnológicas y logísticas que se presentaron. En consecuencia, los programas de remediación ambiental a gran escala que se implementan en América Latina tienen pocas referencias técnicas de cómo ejecutarlas exitosamente, empleando una u otra técnica de Biorremediación. Especial preocupación reviste, la falta de información en relación con las medidas de Bioseguridad empleadas en dichos trabajos.

El presente capítulo recoge las experiencias de biorremediación ejecutadas por nuestros profesionales en el Ecuador, en el sector hidrocarburífero e industrial que constituyen un aporte al conocimiento práctico de cómo ejecutar trabajos de biorremediación de campo. Con seguridad el lector podrá decir que se pudieron hacer mejor las cosas, incluso hallarán errores en la concepción de estos, sin embargo; y pese a las limitaciones de experiencia y conocimientos teóricos, resultaron exitosos, porque permitieron cumplir con los objetivos planteados por los clientes.

Es necesario recalcar que las experiencias que se discutirán en este capítulo no fueron planteadas previamente como trabajos de investigación científica, es más, ni siquiera estuvo en nuestras mentes la posibilidad de escribirlas, ni presentarlas en ponencias académicas.

Ahora que tenemos el privilegio de ser docentes en la academia, vemos la necesidad de ponerlos por escrito y compartir nuestra modesta experiencia con estudiantes, profesionales, especialistas y aficionados que se interesan por la temática de la biorremediación.

## 7.1. Estudio de caso: Tratamiento biológico de cortes y ripios de perforación de la Qmax Ecuador

Los lodos de perforación de la empresa lodera Qmax Ecuador son de base agua, y tienen como agente inhibidor de arcillas al  $\text{KNO}_3$ ; razón por la que los cortes y ripios de perforación, poseen altos contenidos de nitratos, que alcanzan valores superiores a 45.000ppm, factor que los hace tóxicos y no adecuados para su libre disposición ambiental; no solo por los nitratos sino también por la gran cantidad de otros componentes que le dan alta toxicidad (Caenn, 2017) para la biodiversidad del suelo y agua.

En cumplimiento a sus políticas ambientales de explotación petrolera, Qmax Ecuador en el 2000, emprende un programa de investigación, dirigida a eliminar los altos niveles de nitratos en los cortes y ripios generados en la perforación de pozos petroleros. Este programa fue aprobado por la DINAPA (Dirección de Protección Ambiental del Ministerio de Energía y Minas), se ejecutó en tres años. En el primero; se realizaron estudios básicos de laboratorio, dirigidos a aislar los microorganismos adecuados para la eliminación de nitratos y de otros contaminantes presentes en los ripios y cortes de perforación. Adicionalmente se ejecutaron pruebas de definición de la relación óptima de Biosoil<sup>31</sup>/cortes, que garanticen una adecuada estabilización.

Los resultados fueron presentados a la DINAPA y aprobados para su implementación en campo en el año 2003. En la ejecución participó la empresa DISCAL, que fabricó el producto BIOSOIL, empleado en la estabilización de los cortes y ripios de perforación como una estrategia previa al tratamiento biológico, para captar, inmovilizar los contaminantes, adsorber metales pesados, regular su pH, conductividad y humedad.

BIOSOIL, es una mezcla compleja de tamices moleculares, activadores organominerales, aceptores alternativos de electrones, fuente de microelementos necesarios para la actividad enzimática microbiana, y nutrientes.

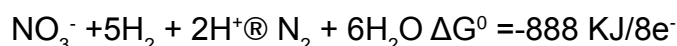
---

<sup>31</sup> Biosoil, producto diseñado para la estabilización de cortes y ripios de perforación, producido por DISCAL SA, con aprobación de Qmax Ecuador.

Los cortes y ripios generados en el taladro, luego del proceso de dewatering, fueron transportados a las piscinas de landfarming<sup>32</sup> en el pozo Fanny 18B3 de Tarapoa, Provincia de Sucumbíos- Ecuador. La estabilización de los cortes se efectuó en las piscinas de la zona de tratamiento a razón de 2 sacos de 50kg/m<sup>3</sup> de cortes y ripios de perforación. La mezcla se realizó con ayuda de una retroexcavadora 320, adecuada para las dimensiones de las piscinas.

#### • Denitrificación

La denitrificación es un proceso metabólico que emplea nitrato en calidad de aceptor de electrones, bajo condiciones anaeróbicas, (aunque no siempre). Los nitratos se reducen hasta nitrógeno molecular, pasando por nitritos, óxido nítrico y óxido nitroso. Entre los microorganismos capaces de reducir nitratos están: *Alcaliigenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Rhizobium* y *Thiosphaera*. *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter* sp, *Propionibacterium* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Staphylococcus coagulasa* negativa, *Corynebacterium* sp, *Clostridium* sp y *Actinomyces* sp (de Mesa, 2006) según el siguiente esquema:



Para llevar a cabo la denitrificación estos microorganismos pueden emplear fuentes de carbono adecuadas de fácil asimilación como metanol, etanol, glucosa, acetato, ácido aspártico y ácido fórmico, entre otros, de igual forma, pueden servir compuestos como hidrocarburos, materia orgánica compleja, glicol, compuestos aromáticos y celulosa<sup>33</sup>.

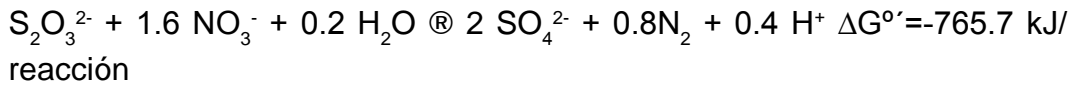
Sin embargo, los hidrocarburos pueden ser limitantes en el proceso de denitrificación, razón por la que es desfavorable su presencia en los cortes y

<sup>32</sup> Denominamos a la metodología empleada, landfarming en piscina, por cuanto se repiten todas las labores características de esta metodología.

<sup>33</sup> Biosoil posee en su formulación ácido cítrico.



ripios de perforación. La tasa de desnitrificación incrementa en presencia de S inorgánico resultando ser mejor el tiosulfato, después el sulfhídrico y por último el azufre elemental (Cardoso, 2006).



El producto empleado para la estabilización de los cortes y ripios de perforación posee como fuente de S, lignosulfonato de calcio.

Microorganismos anaerobios facultativos utilizan la desnitrificación porque el nitrato, tiene un bajo potencial de reducción. Muchas bacterias desnitrificadoras pueden también utilizar el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y algunos compuestos orgánicos como receptores de electrones (Zumft, 1997). Biosoil dispone de una fuente de sulfato férrico.

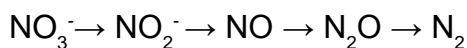
La desnitrificación como proceso natural, puede emplear un sustrato oxidable de naturaleza orgánica o inorgánica, en calidad de fuente de energía, por lo que la desnitrificación puede llevarse a cabo tanto por bacterias heterótrofas como autótrofas.

Reducción fermentativa del nitrito (Pepper, 2011).



La reducción fermentativa del nitrito es realizada por especies microbianas como: *enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Clostridium*.

Reducción desasimilatoria de nitrato



En tanto que la reducción desasimilatoria de nitrato es realizado por especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Spirillum*, *Moraxella*, *Thiobacillus*.

### 7.1.1. Objetivos de Qmax-Ecuador

Remediar los cortes y ripios de perforación con altas concentraciones de nitratos, para su disposición segura en el ambiente.

### 7.1.2. Objetivos de los trabajos previos

- Aislar los microorganismos adecuados para la eliminación de nitratos y otros contaminantes ambientales, presentes en los ripios y cortes de perforación.
- Establecer la relación óptima, kg., Biosoil/m<sup>3</sup> de cortes, que garantice la estabilización completa de los residuos a tratar.
- Ejecutar pruebas de mesocosmos en laboratorio para determinar la efectividad de la propuesta de desnitrificación biológica.

### 7.1.3. Ejecución de los trabajos

Para la ejecución de los trabajos se realizaron una serie de actividades previas que nos permitieran afrontar con éxito el reto planteado por el cliente. Entre las actividades realizadas están, la revisión bibliográfica sobre la temática, la adquisición de materiales y equipos, la definición de protocolos de laboratorio y campo y la definición de las normativas de bioseguridad a emplearse en cada una de las etapas. La recopilación bibliográfica, se realizó en artículos científicos y materiales escritos, libros monografías, fuentes de internet, documentación oficial del Ministerio del Ambiente.

### 7.1.4. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

- **Muestreo de corte y ripios:** Para el efecto se tomaron tres alícuotas (1kg) de los cortes y ripios de perforación, impregnados con lodos base agua, cuyo agente inhibidor es el nitrato de potasio. Las muestras contienen cortes de superficie, parte media y profunda, cuyas características son distintas no solo por la distinta composición de los lodos de perforación empleados, sino también, por la naturaleza distinta de las capas geológicas, de las cuales se han extraído. Estos materiales estuvieron almacenados en el Campo Bermejo (Sucumbíos), durante nueve meses a la intemperie (figura 7.1.1).

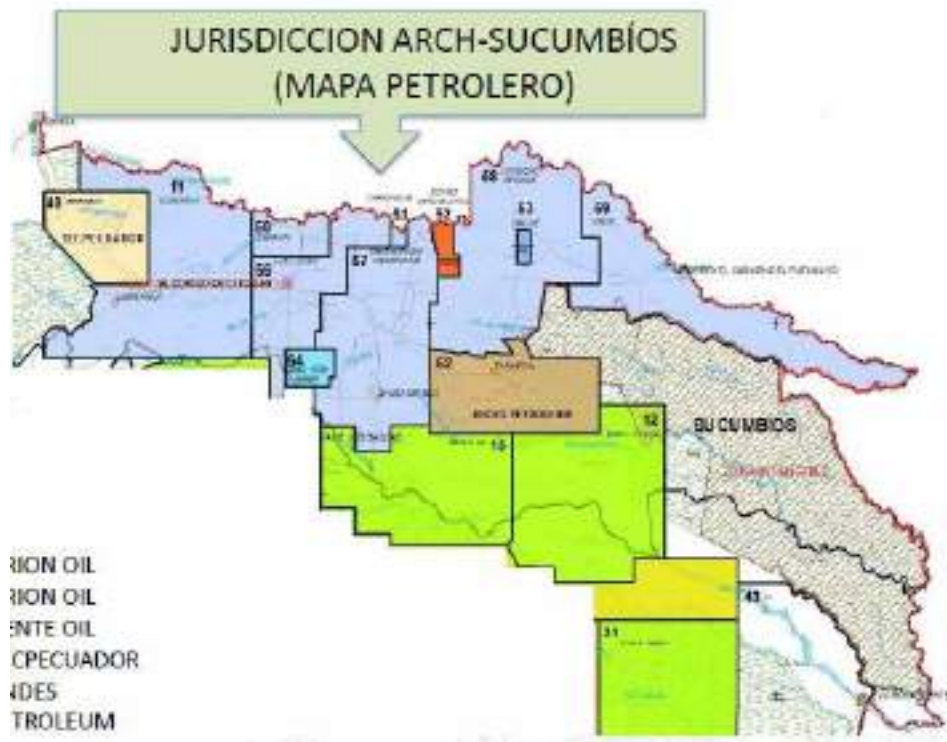


Figura 7.1.1. Campos petroleros del distrito amazónico

- **Aislamiento e identificación de cepas:** Los microorganismos se aislaron de las muestras tomadas en el campo Bermejo, para el efecto se utilizó Agar nitrato; y para demostrar la reducción de nitratos por las bacterias aisladas, se utilizó Caldo nitrato. Para el mantenimiento de las cepas bacterianas aisladas, se utilizó Agar nutritivo (AN-Merck), y para la preparación del inóculo se utilizó Caldo Soya tripticasa Merck. La identificación de las bacterias se realizó la prueba de Gram y se empleó el reactivo de GRIESS-ILOSVAY y Zinc en polvo, para la identificación de microorganismos reductores de nitrato.

Para evaluar la capacidad de degradar nitratos presentes en los cortes y ripios de perforación, se emplearon celdas de plástico con capacidad para 10kg. Los cortes tenían una concentración inicial de 45.000ppm. Se emplearon tres variantes de concentración de Biosoil 0,5 - 0,25 y 0,125 kg / 10kg de cortes y ripios. Cada una con tres repeticiones, con un testigo por cada variante, para un total de 17 celdas experimentales.

Se inyectaron en cada unidad experimental un volumen de consorcio microbiano de 15ml/u con una concentración de UFCs de  $1.8 \times 10^8$  según

McFarland. Las muestras fueron incubadas bajo 37°C, durante 21 días, período de tiempo en el cual, se tomaron siete muestras para el análisis de nitratos presentes. Cada celda fue cubierta con plástico de polietileno, para generar las condiciones anaeróbicas necesarias.

- **Control de parámetros:** La temperatura se mantuvo constante a 37°C, durante todo el proceso, la humedad del sistema se mantuvo al 60%. El control de UFCs, se realizó por siete veces, en las mismas fechas de toma de muestras para análisis de nitratos, adicionalmente se midió el pH y la conductividad de las alícuotas. La determinación de nitratos se ejecutó, por el método del ácido cromotrópico hach, 1999.

### 7.1.5 Resultados de Qmax-Ecuador

Las bacterias aisladas fueron identificadas con ayuda de baterías bioquímicas API: *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus licheniformis*. *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas stutzeri*, es una bacteria desnitrificante no fluorescente ampliamente distribuida en el ambiente, se ha propuesto como organismo modelo para estudios de desnitrificación. *P. stutzeri* pertenece al grupo de Gamma Proteobacterias, sus células tienen forma bastonada, 1 a 3 µm de longitud y 0.5 µm de ancho, y tienen un solo flagelo polar. Presentan una tinción de Gram negativa, pruebas positivas de catalasa y oxidasa, y un metabolismo estrictamente respiratorio. Pueden crecer en almidón y maltosa y tienen una reacción negativa en las pruebas de hidrólisis de arginina dihidrolasa y glucógeno (Lalucat et al., 2006).

*Bacillus licheniformis* es una bacteria de tipo Gram positiva, habita en agua y en suelo, forma esporas. Es un bacilo anaerobio facultativo, Representa una bacteria de importancia industrial debido al uso comercial y agrícola de algunos de sus productos extracelulares utilizados para la producción de enzimas, antibióticos y productos químicos (Veith et al., 2004). Los conteos presentaron los siguientes resultados Tabla 7.1.1.

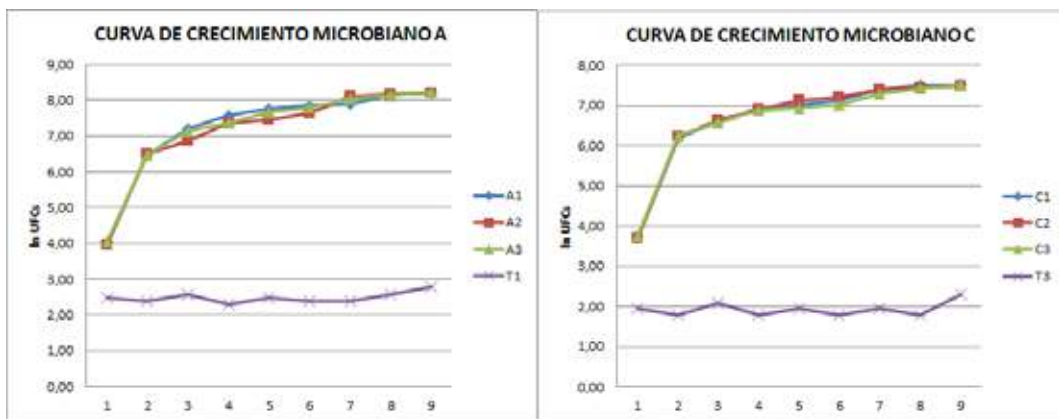
Tabla 7.1.1. El conteo de UFCs

TIEMPO (horas)	0,5 Kg/UFC				0,25 kg/UFC				0,125 kg/UFC			
	A1	A2	A3	T	B1	B2	B3	T	C1	C2	C3	T
4	56	52	57	12	48	42	45	9	41	40	43	7
24	650	657	648	11	520	538	532	7	490	498	512	6
72	1368	974	1256	13	960	760	830	8	746	756	724	8
144	1934	1580	1600	10	1156	1430	1014	8	980	1010	974	6
216	2380	1740	2140	12	1637	1650	1760	10	1116	1240	1016	7
288	2600	2080	2400	11	2125	2000	2000	7	1254	1364	1120	6
360	2632	3280	3100	11	2240	2042	1980	7	1625	1628	1482	7
432	3580	3562	3428	13	2204	2011	2012	9	1804	1710	1690	6
404	3621	3649	3713	16	2100	2084	2016	12	1820	1790	1812	10

*Pseudomonas fluorescens* es un bacilo Gram negativo, saprófito, habita en el suelo y agua. Bacteria que puede crecer aeróbicamente, posee flagelos polares, pigmento fluorescente, puede crecer en un medio mineral con  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Rich et al., 2003).

*Acinetobacter* sp. Las especies de *Acinetobacter* se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza, siendo el agua y el suelo sus principales nichos ecológicos. Son bacilos cortos Gram negativos (1.5 a 2.5 $\mu$  por 1.0 a 1.5 $\mu$ ), son inmóviles y no forman esporas (Bergogne-Bérézín, 1996).

Con los valores logarítmicos se construyeron las curvas de crecimiento microbiano de cada variante experimental (figura 7.1.2).



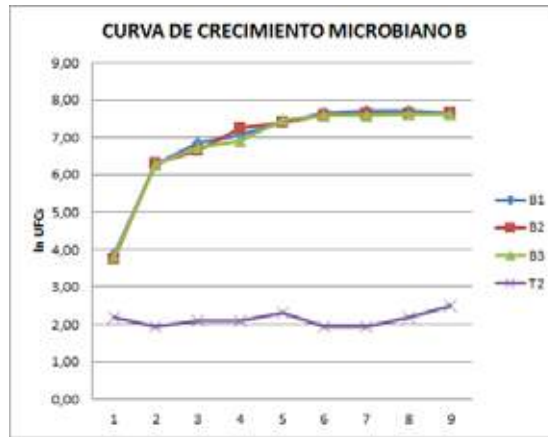


Figura 7.1.2. Curvas de crecimiento microbiano de las unidades experimentales a, b, c. T-testigo

• **Tasa de crecimiento del consorcio empleado**

$$\mu = \frac{\ln N2 - \ln N1}{t2 - t1}$$

$$\mu = \ln(3621) - \ln(56) / 21 - 1$$

$$\mu = 8,19 - 4,03 / 20$$

$$\mu = 0,208/\text{día}$$

• **Degradación de nitratos**

Se realizaron un total de nueve análisis de concentración de nitratos en las celdas experimentales, los mismos que presentaron los siguientes resultados Tabla 7.1.2.

Tabla 7.1.2. Descenso de la concentración de nitratos en las unidades experimentales

TIEMPO	0,5 Kg				0,25 kg				0,125 kg			
	A1 ppm	A2 ppm	A3 ppm	T1 ppm	B1 ppm	B2 ppm	B3 ppm	T2 ppm	C1 ppm	C2 ppm	C3 ppm	T3 ppm
4	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000	45000
24	12400	12680	13120	44938	28600	27430	28312	44860	37940	38240	38600	44912
72	10100	9740	9230	44900	21480	22022	21750	44600	30140	31210	32000	44800
144	8400	8100	7984	44870	18640	18320	18112	42100	24200	23000	25700	44710
216	4650	8200	8452	43800	11800	12000	11900	44000	15780	15000	15400	44620
288	3128	5840	5130	43100	9432	8980	9024	43999	13500	11980	12600	44320
360	1270	2700	1830	42700	6348	6238	6113	43910	7960	8260	8480	44010
432	980	870	920	42310	3987	4012	4322	43890	7122	7312	7200	44100
404	700	810	720	42000	2340	2120	2280	43800	6500	6200	6380	44000

En la figura 7.1.3, se muestra las curvas de descenso de la concentración de nitratos promedio comparativas de las unidades experimentales.



Figura 7.1.3. Curvas comparativas de descenso de nitratos

Como es conocido, la concentración del sustrato varía en forma inversamente proporcional al crecimiento microbiano. Para evidenciar esta correspondiente se construyeron las curvas de cada unidad experimental (figura 7.1.4).

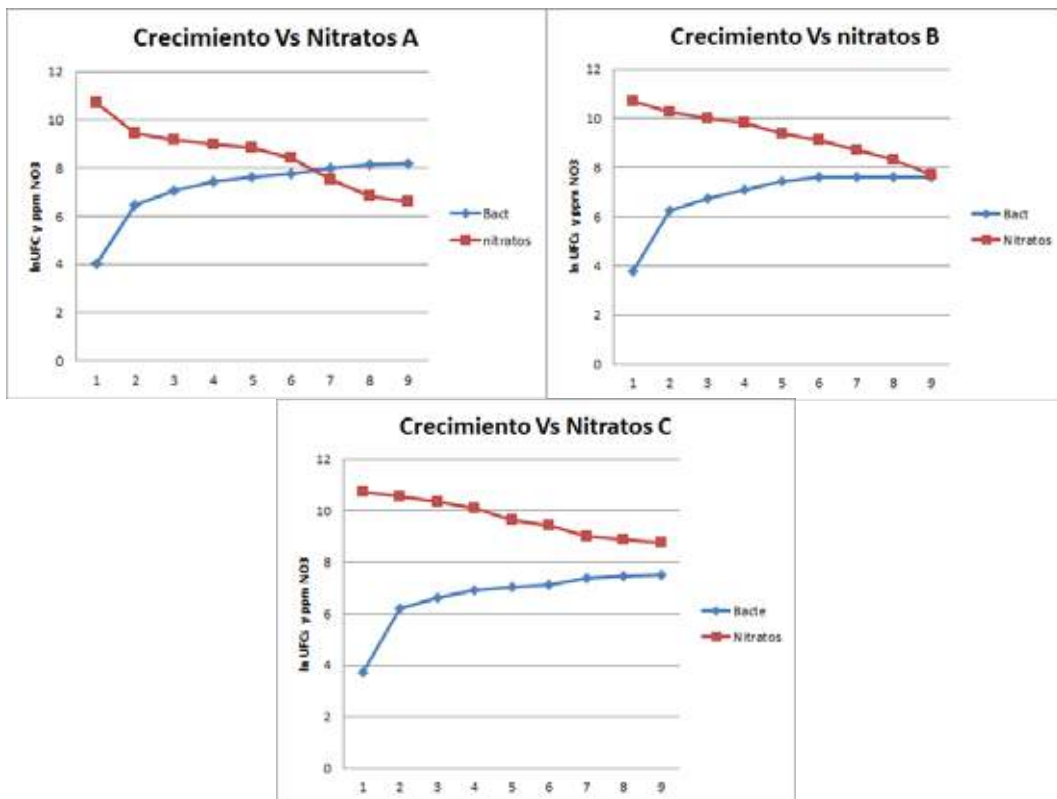


Figura 7.1.3. Curvas de crecimiento microbiano Vs descenso de la concentración de nitratos

Los valores de concentración de nitratos en los testigos varían en forma no significativa en apenas 400-800 ppm, a expensas de la atenuación natural.

• **Tasa de degradación de nitratos**

$$\frac{\ln C_0}{C} = \frac{m \text{Max. } B_0}{Y \cdot t} = kt$$

Los resultados de cálculo se muestran en la tabla 7.1.3.

**Tabla 7.1.3.** Variación de lnCo/C en las unidades experimentales

A	B	C
lnCo/C	lnCo/C	lnCo/C
0,0	0,0	0,0
1,26	0,47	0,16
1,54	0,73	0,37
1,71	0,90	0,62
1,85	1,33	1,07
2,26	1,59	1,27
3,15	1,98	1,70
3,89	2,39	1,83
4,10	3,00	1,96

$$K = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

$$K = \frac{4,10 - 1,26}{20}$$

$$K_A = 0,142 \text{ ppm/día}$$

$$K_B = 0,126 \text{ ppm/día}$$

$$K_C = 0,090 \text{ ppm/día}$$



**Figura 7.1.4.** Tasa de degradación comparativa



En la figura 7.1.4, puede observarse las curvas de degradación comparativas.

- **Tiempo de vida media**

$$t = -\ln(0,5)/k$$

$$T_A = -\ln(0,5) / 0,142$$

$$T_A = 0,69/0,142$$

$$T_A = 4,88 \text{ días.}$$

$$T_B = 5,5 \text{ días}$$

$$T_C = 7,70 \text{ días}$$

Las mediciones de T, pH y conductividad en todas las unidades experimentales vario de la siguiente manera:

Temperatura, fue de 37°C, La conductividad varió entre 0,98 y 1,46 mS/cm, en cuanto al pH, varió entre 5,7 y 7,8. La humedad varía entre 47 y 60%.

- **Eficiencia**

$$Y = \frac{Cf \times 100}{C_0}$$

Las eficiencias calculadas para las unidades experimentales son de:

$$Y = 700 \times 100/45000$$

$$Y_A = 98,35\%$$

$$Y_B = 95,01\%$$

$$Y_C = 85,87\%$$

### 7.1.6. Análisis de resultados de Qmax-Ecuador

El consorcio empleado presenta una tasa de crecimiento  $\mu$  de 0,208 UFC/día, valor que en comparación con datos teóricos de cultivos microbianos bajo condiciones controladas son relativamente buenos, así para la desnitrificación se muestran valores de  $\mu$  0,7 (Rittmann y Garrada de Roda, 2001). Según otros estudios las tasas llegan hasta valores de 0,95, para la eliminación de  $\text{NO}_3$  de aguas residuales (Dapena).

En relación con la tasa de desnitrificación, todas las variantes experimentales cumplen el objetivo de disminuir la concentración de nitratos en los cortes y ripios de perforación, sin embargo, la variante A presenta la mayor tasa de degradación de nitratos  $K=0,142\text{ppm/día}$ , para la variante B  $0,126\text{ppm/día}$  y para C un valor de  $0,090\text{ppm/día}$ .

El tiempo de vida media calculado para las celdas experimentales es de 4,8 días para la variante A. La variante B 5,5 días y la variante C 7,7 días. Esto significa que para la eliminación de  $\text{NO}_3$ , hasta niveles equivalentes a los encontrados en suelos abonados (239ppm), en la variante A, se requieren un total de 43,2 días. Para B 49,5 días y para C 69,3 días. Estudios de nutrición edáfica con estiércol, muestran concentraciones de  $\text{NO}_3$  en el suelo de 239 ppm (Salazar-Sosa, 2009), los tubérculos de papa analizados muestran concentraciones de nitratos de 175 mg/kg, cuyo valor es admisible ya que la concentración de nitrato máxima permisible es de 350 mg/kg en tubérculos frescos, según la norma de la CE (Comisión Europea).

Al trazar las curvas de crecimiento y de descenso de la concentración de nitratos, solo la variante A cumple con el modelo teórico, a partir del día 18. En B las curvas se encuentran solo al final del experimento y en C, estas no se encuentran, sin embargo, las tres cumplen con la relación de inversamente proporcional.

La eficiencia de las tres variantes experimentales es alta, en especial en la primera con un 98,35%, para la variante B 95,01% y para la variante C una eficiencia de 85,87%.

- **Análisis estadístico de Qmax-Ecuador**

El análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas entre las tres variantes, por cuanto el valor p es igual a 0,27, que es mayor a 0,05; para un nivel de confianza del 95% (tabla 7.1.4).

Como se comprenderá, el trabajo se ejecutó con el objetivo fue degradar los nitratos presentes en los cortes en el menor tiempo posible, con el menor costo. Como estadísticamente no existen diferencias significativas, para la fase de campo se escogió a relación de componentes que menos costos operativos genera.

**Tabla 7.1.4.** Análisis estadístico

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	9	90984,6667	10109,4074	188185780		
Columna 2	9	146854	16317,1111	189407440		
Columna 3	9	188568	20952	206875492		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Suma de los cuadrados de libertad	df	MS	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	532738783	2	266369392	1,36723858	0,273952052	3,402826105
Dentro de los grupos	4675749700	24	194822904			
Total	5208488483	26				

• **Pruebas de inocuidad de cortes para cultivos**

Una interrogante de relevancia planteada por la investigación fue, ¿pueden los cortes y ripsos de perforación tratados, sustentar vida y ser empleados en calidad de sustrato para siembra de especies forestales, decorativas y el restablecimiento de espacios afectados por erosión?

En condiciones de laboratorio, se realizaron siembras de plantas de ciclo corto tales como *Raphanus sativus* (rábano), *Daucus carota* (zanahoria), y *Solanum Lycopersicum* (tomate). Las semillas se hidrataron durante 24 horas, a 27°C, se sembraron 30 semillas de cada especie. El porcentaje de germinación fue del 85%. El 78% superó los primeros 15 días de crecimiento y un 48,5% llegó a la madurez.

Con estos resultados, se planificó una modificación en la formulación de BIOSOIL, para las pruebas de campo, que consistió en:

- Cambiar el componente leonardita, por Humatos (sales de ácidos húmicos y fúlvicos de Na y K), en la misma concentración establecida para la leonardita.
- Efectuar pruebas con distintas concentraciones de humatos (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 veces más).
- Someter a landfarming, todos con estas nuevas formulaciones.

- Efectuar pruebas aisladas de solubilidad de humatos, con el propósito de determinar la solubilidad de estos y obtener soluciones concentradas.
- Investigar la estabilidad y la variación de las propiedades físicas en el tiempo y bajo la acción de factores como temperatura y luz.

### **7.1.7 Fase de campo Bloque Tarapoa**

**Bloque Tarapoa:** Se ubica en la provincia de Sucumbíos, noreste de la Cuenca Oriente, al norte por los campos Cuyabeno y Sanshauari, al sur por el Bloque 15 (Indillana) y Bloque 12 (Eden-Yuturi), al este por la reserva faunística Cuyabeno y al oeste por el Campo Shushufindi. En el Bloque Tarapoa (Tabla 7.1.5), se encuentran varios campos petroleros, uno de los cuales es el Capo Fanny.

**Tabla 7.1.5.** Campos petroleros del Bloque Tarapoa

No	Campos	Situación
1	Aleluya	Cerrado
2	Alice	Productor/inyector
3	Anne	Inyector
4	Chorongo	Productor
5	Dorine	Productor/inyector
6	Fanny	Productor/inyector
7	Isabel	Inyector
8	Joan	Cerrado
9	Mahogany	Cerrado
10	Mariann4A	Productor/inyector
11	Mariann	Productor/inyector
12	Shirley	Productor/inyector
13	Sonia	Productor/inyector
14	Tarapoa	Productor/inyector
15	Tarapoa Sur	Productor/inyector
16	Tucán	Productor/inyector
17	Esperanza	Productor

**Fuente:** Departamento de Ingeniería de Exploración y Desarrollo. Andes Petroleum Ecuador Ltd.

El trabajo de campo se realizó en el Pozo Fanny 18B3. El Campo Fanny se encuentra en el centro del Bloque Tarapoa y al sur del campo Dorine. El Pozo Fanny 18B3, se encuentra a 6,82km de la ciudad de Tarapoa (Figura 7.1.5.). Los trabajos se ejecutaron en una zona parcialmente inundada, previamente adquirida por ENCANA, para la implementación del proyecto. Para el emplazamiento del área de tratamiento se procedió con el secado de la zona inundada, con delimitación del área operativa y adecuación de una plataforma donde se ubicarían el laboratorio y los tanques de reproducción microbiana, así como los contenedores para el almacenamiento de materias primas, herramientas y accesorios.

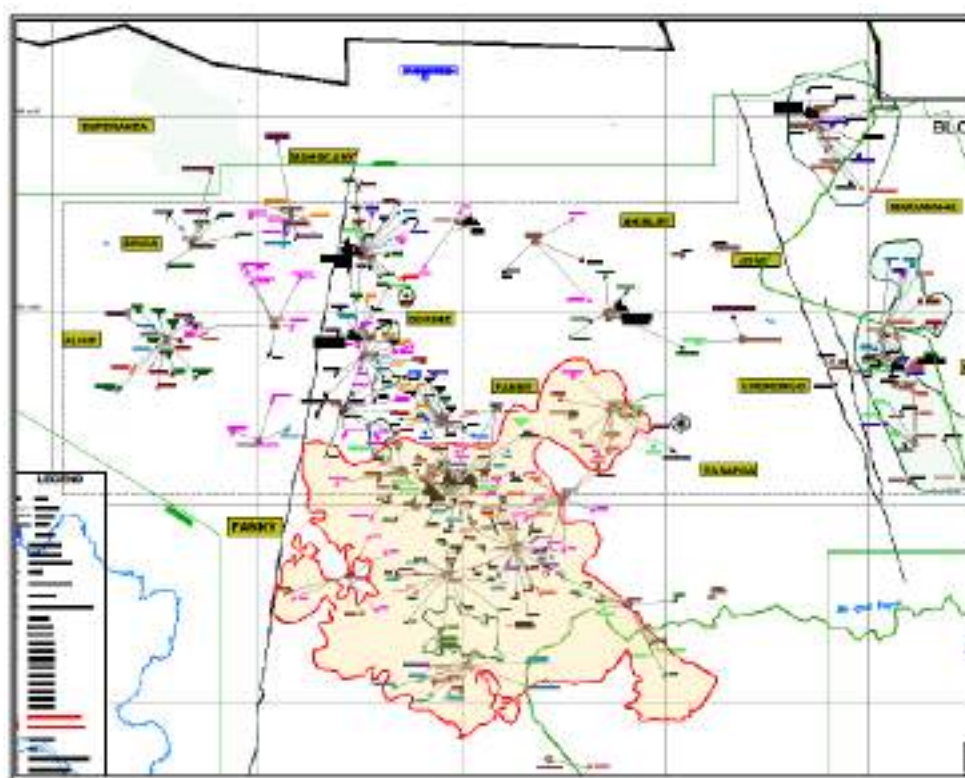


Figura 7.1.5. Ubicación geográfica del campo Fanny

Fuente: Departamento de Ingeniería de Exploración y Desarrollo. Andes Petroleum Ecuador Ltd.

- **Actividades de esta etapa**

Acondicionamiento del área operativa

El acondicionamiento inició, con el levantamiento de línea base ambiental, para el estudio de impacto ambiental y su aprobación por parte de la DINAPA.

Posteriormente se desarrolló el desbroce, limpieza y desecación del área inundada. Una de las principales acciones fue la delimitación del área operativa y la construcción de la vía de acceso adecuada al tipo de vehículos y carga.

### **CONSTRUCCIÓN DE LAS CELDAS**

Las celdas se construyeron con las siguientes dimensiones: 50m de largo, 8 m de ancho y 4m de profundidad. La inclinación de las paredes fue de 75°, cada celda dispuso de una berma perimetral de 50cm de alto y de 50cm de ancho. Las bermas fueron construidas de arcilla compacta y sellada con bentonita. De igual forma las paredes y el fondo de las celdas de tratamiento fueron selladas con bentonita.

Se construyeron un total de cinco piscinas. Las dimensiones de las piscinas corresponden a la longitud del brazo del retroexcavador 320, que realizó la mezcla periódica de los cortes y ripios en tratamiento. En el capítulo IV de metodologías de tratamiento se detallan las características de diseño de las celdas para a metodología de Landfarming en piscina.

### **CONSTRUCCIÓN DEL LABORATORIO Y TANQUES DE REPRODUCCIÓN MICROBIANA**

El laboratorio fue montado en un camper laboratorio adecuado para las actividades de producción del consorcio microbiano y análisis de los parámetros de proceso a ser monitoreados en forma periódica. Se instalaron tres tanques de 700 bbl para la reproducción masiva de microorganismos, los cuales en circuito cerrado se transportaron hasta los tanques desde el tanque Biorreactor de 1m<sup>3</sup>, ubicado dentro de laboratorio.

Para la proliferación del consorcio microbiano se empleó una mezcla de melaza, glicerina, y almidón. Cada celda de tratamiento recibió 15L de fluido microbiano por m<sup>3</sup> de cortes y ripios de perforación. Este volumen de fluido se aplicó tres veces durante el tiempo de tratamiento que duro en promedio 62 días. Considerando la capacidad de almacenamiento de cada celda 1600 m<sup>3</sup>, se requirió la producción de 72.000 L por piscina. Para el total de las cinco celdas se produjeron 360.000 L. Considerando que un barril representa 158,99 l y que la capacidad de os tanques fue de 700 bbl, por

tanque se pudo almacenar y producir 11.1239 L de fluido bacteriano, para un total de 333.879 L por los tres tanques.

### **APLICACIÓN DE FLUIDO MICROBIANO A LAS CELDAS DE TRATAMIENTO**

Con ayuda de un medidor de caudal, y por gravedad se aplicó el fluido microbiano a las celdas de tratamiento en el volumen determinado por m<sup>3</sup>. Para el efecto, cada celda contó con una tubería perimetral de dos pulgadas (ubicada en la base de la berma perimetral, para evitar daños durante el trabajo de la retroexcavadora), cada 12 m., se instalaron acoples rápidos que permitieron conectar mangueras, a través de las cuales se producía la adición del fluido microbiano a las celdas de tratamiento. Con la retroexcavadora 320, se efectuó la mezcla uniforme del fluido con los cortes y ripios de perforación.

### **MEZCLA Y CONTROL DE PARÁMETROS DE PROCESO**

La mezcla se realizó cada 48 horas, a medida que se adicionaban los cortes a las celdas. Los parámetros monitoreados fueron: T, humedad conductividad, UFC y pH.

La humedad se controló con ayuda de una retorta de 50g y se mantuvo dentro del rango de los 60-70%. Este parámetro se midió cada 72 horas al igual que el resto de los parámetros. La temperatura promedio fue de 21°C, conductividad de 1,32 mS/cm y el pH de 7,6.

Debido a la adición periódica de microorganismos (para compensar el aumento de cortes y ripios), el número de UFCs, se mantuvo en valores entre 0,87- 1,2 x10<sup>6</sup> UFC.

El control de la concentración de NO<sub>3</sub>, se monitoreó por cuatro veces durante el tiempo de tratamiento, empleando muestreos por la metodología de cuarteo de cada celda y su análisis correspondiente por Método del ácido crómico (Hach, 1999). En promedio la concentración segura de NO<sub>3</sub>, en las celdas de tratamiento; se lograron en 60-62 días.

### CONTROL DE LIXIVIADOS

Para el control de lixiviados, se construyeron pozos de control, siguiendo la pendiente de la zona y el estudio radio eléctrico de la zona operativa, a una distancia de 12 metros de las celdas. El control se efectuó cada cuatro días. De cada pozo se tomaron muestras periódicas de las aguas en las que se monitorearon, parámetros tales como:

- Parámetros físicos. Aspecto, pH, Potencial redox, Conductividad, color, turbiedad, temperatura, olor.
- Constituyentes orgánicos. Compuestos orgánicos, fenoles, DQO, COT, ácidos volátiles, Taninos, ligninas, N- orgánico, solubles en éter (grasa y aceite), sustancias activas al azul de metileno.
- Constituyentes inorgánicos. Sólidos en suspensión, sólidos totales disueltos, sólidos volátiles solubles, sólidos volátiles disueltos, cloruros, sulfatos, fosfatos, alcalinidad/ acidez, nitratos y nitritos, amoníaco, sodio, potasio, calcio, magnesio, dureza, metales pesados, selenio y arsénico.
- Biológicos. DBO<sub>5</sub>, microorganismos y coliformes.

### EVACUACIÓN DE RIPIOS Y CORTES TRATADOS

Una vez que la concentración de nitratos en los rипios y cortes se reducía hasta límites seguros, se procedió con la evacuación de los cortes y rипios a una zona de disposición final, dentro del área operativa.

Los cortes se compactaron en capas de 60 cm, conformando terrazas, hasta alcanzar una altura de 3,5 m. Las terrazas fueron forestadas con especies como, *Cedrelinga cateniformis* (Chuncho), *Caryodendron orinocensis* (maní de árbol), *Croton lechleri* (sangre de drago), *Clarisia racemosa* (moral boba), *Tabebuia chrysantha* (guayacán) *Brosimum utile* (sande), *Trattinickia glaziovii* (copal), *Jacaranda copaia* (jacaranda), *Schizolobium parahybum* (pachaco), *Parkia nitida* (guarango), *Swietenia macrophylla* (caoba) y *Carapa guianensis* (tangare).

Para proteger la superficie de la erosión se sembró *Arachis pintoii* (maní forrajero), según fuentes bibliográficas el maní forrajero, contribuye a: rápida degradación de hojarasca, estímulo de diversidad biológica del suelo y mejora la materia orgánica del suelo (Jørgensen, 1999).



- **Control de otros aspectos de relevancia para el proceso**

Con el propósito de garantizar la estabilidad en las celdas de tratamiento, se puso a un técnico de la empresa en el taladro, para controlar el proceso de dewatering (control del porcentaje de humedad de los cortes y ripios), pH (separación de los cortes y ripios afectados por las tareas de cementación, que poseen pH cercanos a 13), presencia de hidrocarburos (separación de esos cortes y ripios para ser tratados en una celda exclusiva). Para el efecto se asignó un espacio exclusivo, donde se trataron los materiales bajo condiciones aeróbicas, mediante la técnica de compostaje, en pilas cubiertas.

Los cortes mezclados con cemento se emplearon en el adementamiento de los caminos de la zona operativa, agregando una mezcla de arena y cemento para su tendido y fraguado en los caminos. El porcentaje de este tipo de materiales fue relativamente bajo y no superó el 1,7%.

Otro aspecto para considerar fue la presencia de bloques de material polimérico coagulado (de poliaminas y poliamidas, que son componentes del lodo de perforación), que incrementaron sustancialmente la cantidad de nitrógeno a ser degradado. Estas aglomeraciones generaron incrementos localizados del pH, por la generación de  $\text{NH}_3$ , siendo necesaria la adición periódica de Biosoil, para la captación del amoníaco y su retención en forma de  $\text{NH}_4^+$ .

Las frecuentes lluvias de la zona motivaron el bombeo continuo de las aguas acumuladas en las celdas, para evitar el derrame de estas a los espacios aledaños. Con ayuda de bombas de diésel de 2,5 HP, las aguas se bombearon a una piscina impermeabilizada con geomembrana construida en forma continua a las celdas de tratamiento, para su acumulación, tratamiento y posterior evacuación al estero aledaño a la zona operativa.

- **Normativas de seguridad y Bioseguridad**

En la práctica ambiental de Ecuador, no existían a la fecha experiencias previas de trabajos similares, en consecuencia, ni la autoridad competente de entonces (aún en la actualidad), ni la empresa operadora, contaban con una guía de Bioseguridad para este tipo de trabajos a gran escala.

Toda la información existente de bioseguridad se aplica a laboratorios de microbiología, centros biomédicos y hospitalarios. Tuvimos que adaptar la normativa existente a nuestras necesidades de campo. Parte de esa visión se presenta en el capítulo VI, del presente libro.

A más de las normativas de seguridad industrial y salud ocupacional vigentes en las instalaciones de ENCANA<sup>34</sup>, se tuvo que implementar normativas adicionales de Bioseguridad, aplicables a todo el personal que ingresara al área operativa en Fanny 18B3. Durante la ejecución de los trabajos de remediación, no se presentó ningún caso de contaminación u enfermedad laboral asociada a la Biorremediación. Los trabajos de remediación de cortes y ripios de perforación con lodos base agua y  $\text{KNO}_3$ , como agente inhibidor de arcillas, se prolongaron durante varios años, hasta la compra de la empresa ENCANA por parte de la empresa china Andes Petroleum.

### **7.1.8 Resultados de Bloque Tarapoa:**

La concentración de nitratos se redujo hasta niveles seguros en 60 días como promedio. ENCANA, pudo eliminar la necesidad de compra o arrendamiento de tierras para el confinamiento de cortes y ripios de perforación en piscinas y redujo los costos de inyección de estos en la formación. El tratamiento de cortes y ripios permitió la transformación de estos, en materiales aptos para actividades de reconfiguración del paisaje, cobertura de rellenos sanitarios, base y subbase de carreteras, recuperación de suelos afectados por erosión.

Los cortes tratados se emplearon como sustrato para:

- La siembra de especies forestales, propias de la zona, de interés económico y ambiental.
- Reducción del impacto ambiental de la gestión y disposición final de los cortes y ripios de perforación y control exhaustivo de todos los efluentes del proceso de tratamiento.
- Generación de una alternativa de gestión y disposición final de cortes y ripios de perforación, sustentable económica y ambiental, que mejora de la imagen empresarial, como empresa verde.

---

<sup>34</sup> Manual de seguridad y salud ocupacional de ENCANA

## Bibliografía

1. Bergogne-Berezin, E., y Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 148.
2. Caenn, R., Darley, H. C., y Gray, G. R. (2011). *Composition and properties of drilling and completion fluids*. Gulf professional publishing.
3. Szostak, 1. (1999). *Handbook of molecular sieves*. New York: Library of Congress.
4. Cardoso, R. B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E. R., Gómez, J., y Field, J. A. (2006). Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 95(6), 1148-1157.
4. Dapena, E. R. (s.f.). *Eliminacion contaminacion nitrogenada.pdf*. Obtenido de <http://cidta.usal.es/cursos/EDAR>
5. de Mesa, J. L. B. L., Quintero, G. M., y Ortiz, O. L. O. (2006). Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia. *Nova*, 4(6), 50-54.
6. Jorgensen, P. M. (1999). Asteraceae. Págs. 260-314 en: Jorgensen, PM & S. León-Yanez (eds.) *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 75
7. Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 510-547.
8. Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J., y Maier, R. M. (Eds.). (2011). *Environmental microbiology*. Academic press.
9. Rich, J. J., Heichen, R. S., Bottomley, P. J., Cromack, K., y Myrold, D. D. (2003). Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5974-5982.
10. Rittmann, B. E., y Garralda de Roda, F. (2001). *Biotecnología del medio ambiente principios y aplicaciones* (No. 660.6 R5).
11. Salazar-Sosa, E., Trejo-Escareño, H. I., Vázquez-Vázquez, C., López-Martínez, J. D., Fortis-Hernández, M., Zuñiga-Tarango, R., y Amado-Álvarez, J. P. (2009). Distribución de nitrógeno disponible en

suelo abonado con estiércol bovino en maíz forrajero. *Terra Latinoamericana*, 27(4), 373-382.

12. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., ... & Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 7(4), 204-211.
13. Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(4), 533-616.



## **7.2. Caso de estudio uno: Tratamiento de lodos residuales industriales hidrocarburíferos mediante Landfarming en Plataforma cubierta**

Los servicios de mantenimiento, reparación y limpieza de tubería y herramienta de perforación, asentados en el Distrito amazónico, específicamente en la ciudad de El Coca, generan residuos complejos que representan un peligro potencial para la salud y el ambiente. Componentes de dichos residuos son: los aceites de corte (taladrinas), aceites y grasas lubricantes, diésel, gasolina, pinturas, sustancias anticorrosivas, cortes de perforación, crudo, óxidos metálicos, detergentes.

Por iniciativa de la empresa involucrada, se inició (en noviembre del 2004), un programa de investigación para implementar un sistema Integral de Residuos Industriales generados y acumulados en las operaciones de la empresa, en tal forma que sus emisiones cumplan los parámetros de la legislación ambiental vigente.

La caracterización inicial de los lodos residuales mostró concentraciones de 97.372,54 TPHs, Pb 778,00 mg/kg; Ni 502,32 mg/kg; Cd 7,20 mg/kg, y V 3,10 mg/kg. Para su tratamiento se implementó un sistema de Biorremediación de Landfarming en plataforma cubierta, que permitió en diez meses degradar los contaminantes hasta niveles seguros. Para validar los resultados obtenidos se realizaron análisis en los lixiviados con impermeabilización en la base y sin ella, cuyos resultados confirmaron la efectividad del sistema de tratamiento. En base a estos resultados la empresa gestionó las ISO 14000 para sus servicios, además ganó un premio de calidad ambiental entre todas las filiales a nivel mundial.

Los lodos residuales aceitosos son una mezcla compleja de contaminantes, que se generan en una gran cantidad de procesos como: Tanques de almacenamiento de crudo, combustóleo, gasóleo. Plantas de tratamiento de efluentes, en talleres de mantenimiento de vehículos, lavadoras y vulcanizadoras. En empresas de servicios petroleros: mantenimiento, reparación y limpieza de tubería y herramientas de perforación. Talleres de mantenimiento de maquinaria industrial.

Los lodos aceitosos industriales se caracterizan por ser pastosos y de baja densidad, Insolubles en agua; con alto porcentaje de humedad (figura 7.2.1) y alto contenido de contaminantes ambientales recalcitrantes; fuerte olor desagradable (COVs). Están compuestos por, parafinas, asfaltenos, agua y material inorgánico compuesto por metales pesados y arenas (silicatos) (Gualoto, 2014).

Landfarming en plataforma. Metodología de tratamiento biológico de residuos, que se diferencia del sistema de Landfarming tradicional, en que los residuos no se aplican al suelo, sino que se los tienden en una plataforma de hormigón, estabilizados con tamices moleculares, material estructurante y materia orgánica (de rechazo), en la que se ejecutan las operaciones unitarias características de Landfarming.<sup>35</sup> La estabilización, cambia las propiedades mecánicas de los residuos, le brindan maniobrabilidad y evita la migración de sus componentes al entorno circundante.

### **7.2.1. Introducción caso de estudio dos**

Por más de 30 años las actividades petroleras en el Ecuador han constituido la fuente de financiamiento más importante del presupuesto del estado. Es innegable su importancia en la economía nacional y en los cambios operados en el desarrollo de las fuerzas productivas, sin embargo, también ha generado graves problemas de contaminación ambiental, pérdida irreversible de especies animales y vegetales, deterioro de las fuentes de agua y un agresivo proceso de aculturación de sus comunidades nativas.

En este contexto, las actividades de las empresas de servicios petroleros son muy variadas, así como los residuos que estos generan y los impactos negativos sobre el ambiente. Este es el caso de las empresas dedicadas a la prestación de servicios de lavado, mantenimiento, reparación y venta de tubería y maquinaria de perforación, acantonadas en el distrito amazónico ecuatoriano, específicamente en la ciudad de El Coca. Una caracterización preliminar de sus residuos nos permitió identificar una amplia gama de residuos, entre los cuales podemos mencionar: guaipes, lijadoras, amoladoras, electrodos, lijas, viruta metálica, restos de pinturas, lacas, sustancias anticorrosivas, grasas lubricantes, aceites, diésel,

<sup>35</sup> Definición planteada por el autor

kerosene, petróleo, cortes de perforación, óxidos, aceites de corte (taladrinas), guantes, aguas residuales.<sup>36</sup>

Las taladrinas son emulsiones de aceite y agua. Esta emulsión tiene una concentración variable con valores próximos al 5% de aceite y el 95% de agua, es un producto empleado mayoritariamente en la industria del mecanizado metálico por sus propiedades lubricantes y refrigerantes. Las taladrinas optimizan las condiciones fisicoquímicas de la zona de contacto entre metales reduciendo la fricción y, con ello, facilitando el acabado de la superficie metálica y alargando la vida útil de la herramienta. Además, las taladrinas previenen el sobrecalentamiento de las piezas y la maquinaria, evacúa la viruta resultante y evita el óxido.

Las taladrinas pueden tener efectos muy negativos sobre el ambiente, por ser contaminantes que generan riesgos para la salud del operario. Pueden ocasionar bajo ciertas condiciones efectos negativos sobre la secuencia de producción. Son el motivo de costos considerables gastos de adquisición, almacenamiento, mantenimiento y eliminación de residuos.

Son varios los componentes que generan alto riesgo y son considerados peligrosos, según El Programa Nacional de Toxicología USA, 2016, la dietamina y derivados; Nitrito sódico, alquilfenoles y ácido cresílico. Parafinas cloradas y Biocidas como: Desinfectantes y biocidas en general, conservantes, pesticidas y otros productos biológicos (PROYECTO Fitema Antena de transferencia de tecnología)

La vieja práctica de emplear una mezcla de diésel con gasolina para eliminar los restos de crudo de la tubería y maquinaria de perforación ha sido la principal causa de la contaminación de los suelos y aguas utilizadas en las operaciones de lavado. Tanto las aguas, así como la mezcla compleja de residuos antes mencionados, no recibían tratamiento ni una gestión adecuada, y se evacuaban libremente a los patios, alcantarillas o rellenos municipales. Ante la creciente presión social y la necesidad de proteger la salud ocupacional de los trabajadores, se emprendió con un proyecto de Gestión Integral de Residuos Industriales, cuya parte culminante fue, la implementación de un sistema de tratamiento biológico de

---

<sup>36</sup> Estudio de Impacto Ambiental de las operaciones de Weatherford Ecuador. 2003.



residuos industriales (lodos), mediante Landfarming en plataforma cubierta, construida dentro de las instalaciones de la empresa objeto de estudio.

De esta forma se obviaron una serie de trámites, ante la autoridad ambiental competente, municipalidad y organismos de control, para evacuar los residuos, para su disposición final en un relleno o para tratamiento en otro espacio fuera de las instalaciones de la empresa. La decisión de implementar un sistema de tratamiento dentro de las instalaciones fue a todas luces acertada, por cuanto no solo se logró el control y seguimiento efectivo del tratamiento, sino que, la empresa fue galardonada internacionalmente por su aportación a la conservación de ambiente y por ofertar a sus clientes un servicio de calidad. Los objetivos planteados para la investigación fueron:

### 7.2.2. Objetivo caso de estudio dos

Tratar residuos industriales hidrocarburíferos, mediante la metodología de Landfarming en plataforma cubierta *in situ*.

Los objetivos específicos fueron:

- Identificar los microorganismos capaces de biodegradar una mezcla compleja de residuos industriales.
- Verificar la posibilidad de emplear residuos orgánicos de cocina como fuente de nutrientes (cosustratos) para la biodegradación de residuos industriales.

### 7.2.3. Metodología caso de estudio dos

Los trabajos dieron inicio el 21 de noviembre del 2004 y culminaron el 23 de septiembre del 2005. Los lodos residuales obtenidos de las operaciones de limpieza de canales perimetrales de las naves de trabajo, del tratamiento de aguas residuales, del lavado de tubería y herramienta de perforación, del sistema de anticorrosión (Chem plate), de lubricación y pintura a más de soldadura, se deshidrataron inicialmente en camas metálicas. La metodología empleada en el tratamiento de lodos residuales hidrocarburíferos fue la de Landfarming en plataforma. Esquemáticamente consiste en las siguientes operaciones:

- **Estabilización**

Los lodos residuales de las operaciones de limpieza de cisternas, canales perimetrales de las naves de trabajo, tratamiento de aguas, plataforma de lavado de tubería, tiene una consistencia pastosa, con alto contenido de humedad (figura 7.2.1.).



**Figura 7.2.1.** Lodos residuales

La estabilización se realizó con ayuda de BIOSOIL, producto desarrollado por el autor para estabilización de cortes, ripios y fluidos de perforación. Biosoil se adicionó a razón de 1,5 sacos/ m<sup>3</sup> de lodos (los sacos de Biosoil contienen 32kg). Adicionalmente se emplearon 3 kg/m<sup>3</sup> de cascarilla de arroz para proveer estructura al lodo, también se adicionaron 2 kg/m<sup>3</sup> de viruta, con el mismo propósito de generar porosidad. Todos estos componentes fueron mezclados uniformemente y se dispusieron en recipientes de metal para la siguiente etapa, la deshidratación (Gualoto, 2003).

- **Deshidratación**

Los lodos estabilizados se dejaron a deshidratar durante 5 días, en tanques metálicos, (2,5 metros cúbicos por tanque, (figura 7.2.2.), que disponían de un orificio para la evacuación de la humedad excedente, Los líquidos fueron recolectados y enviados al sistema de tratamiento de agua construido en la planta.



**Figura 7.2.2.** Tanques (camas) de deshidratación

- **Maduración**

A medida que se produce la deshidratación se logra la maduración del lodo, esto es, el desarrollo y aclimatación de la microflora presente en los residuos, como preámbulo para el inicio del proceso natural de biodegradación. Adicionalmente, entre los residuos y el material estructurante y tamices moleculares, ocurren reacciones de: óxido-reducción, adsorción, absorción, quelación, intercambio iónico, neutralización, deshidratación, formación de coloides, etc.

- **Adición de materia orgánica**

Como en todo sistema de biorremediación, fue necesario adicionar periódicamente en calidad de nutrientes, en este trabajo se emplearon residuos de cocina (restos de hortalizas, alimentos y en especial cítricos). La cantidad de residuos finamente fragmentada (3-5 cm) fue adicionada a los residuos a razón de 5kg /m<sup>3</sup>, con una frecuencia semanal. Del total de residuos orgánicos aproximadamente el 60% era restos de cítricos, en proceso de degradación (semifermentados).

- **Adición de tamiz molecular**

Con el propósito de encapsular los metales pesados presentes en los lodos industriales que podrían inhibir la actividad bacteriana, se adicionó a la mezcla estabilizada y tendida en la plataforma de Landfarming, medio saco de zeolita (25kg) por m<sup>3</sup> de residuos. La adición de zeolitas permitió también reducir los malos olores generados por los residuos (Gualoto, 2002).

- **Mezcla y humectación**

Una vez concluida la maduración de los residuos y después de haber adicionado nutrientes, se procedió a humectar y mezclar en forma uniforme todos los residuos. La humectación se realizó inicialmente con agua limpia, hasta lograr una humedad equivalente al 60%, mediada con ayuda de una retorta del tipo empleado para el trabajo con corte de perforación, para el efecto se tomó 50g de la muestra y se sometió a calcinado en la retorta.

- ***Control de parámetros de proceso***

Los parámetros sujetos a control durante el tratamiento de los lodos industriales residuales fueron: pH, T, Conductividad, TPHs, humedad y otros exigidos por la ley 1215. Para control interno, se monitoreo semanalmente la temperatura, pH, conductividad y humedad. El control de los parámetros de proceso se realizó cada tres días, sin embargo, los análisis de TPHs y metales pesados se realizaron cada mes y en algunos casos dos veces por mes (ver tabla 7.2.1.). La temperatura se reguló mediante volteo manual, la temperatura promedio del sistema de tratamiento fue de 35 °C, con máximos de 47°C y mínimos de 28°C. De igual forma el volteo facilitó el aireamiento del sistema para garantizar las condiciones aeróbicas del proceso de biodegradación.

- ***Aislamiento microbiano***

Un gramo de los lodos residuales se diluyó en 9ml de agua destilada y mediante la metodología de diluciones (Paulsen et al., 2014), se ejecutaron siembras en placa, en medio de agar nutritivo DIFCO. Las pruebas de degradación se hicieron en medio de agar nutritivo - petróleo (con 1200 ppm).

- ***Identificación del pool microbiano***

La identificación morfológica y bioquímica, se efectuó con ayuda de un microscopio binocular y la prueba de Gram en tanto que la bioquímica mediante sistemas de identificación de bacterias marca Liofilchem®, y el sistema de identificación STAF SYSTEM 18R.

- ***Construcción de la plataforma de landfarming***

La plataforma de hormigón techada para el tratamiento biológico de los lodos residuales; contó con un canal lateral para la evacuación de los lixiviados del proceso y dos tanques de 1 m<sup>3</sup> de capacidad para la recolección de estos. También fue necesario adecentar toda el área destinada a Landfarming, por cuanto por más de 12 años el espacio había sido utilizado como basurero del campamento y presentaba grandes cantidades de residuos y elevados niveles de contaminación. Así se reemplazó una capa 1,5 metros de espesor de un área de 92 m<sup>2</sup>, con material nuevo y limpio y sobre él se

construyó la plataforma de Landfarming (figura 7.2.3.). Culminada la construcción de la plataforma se tendieron los lodos para realizar el tratamiento biológico, siguiendo la metodología señalada.



**Figura 7.2.3.** Plataforma de Landfarming

Durante el tratamiento se presentaron algunos problemas ligados al control de los parámetros de proceso, por cuanto el personal de apoyo encargado de dichas labores no siempre cumplía los cronogramas de humectación, aireación y adición de nutrientes. Críticos fueron los meses de abril, mayo y junio del 2005, donde las tasas de degradación de TPHs, se redujeron drásticamente; a consecuencia de una sobre hidratación del sistema, baja de temperatura y generación de condiciones anaeróbicas; que posteriormente y gracias a un trabajo continuo se logró estabilizar y reiniciar el proceso bajo condiciones óptimas.

### **7.2.5. Resultados caso de estudio dos**

#### **CARACTERIZACIÓN DE LOS LODOS ACEITOSOS**

La caracterización de los residuos se realizó en los laboratorios acreditados de CORPLAB, de la ciudad de Quito. El informe muestra los siguientes resultados:

- TPHs-97372,54 mg/kg
- Pb- 778,00 mg/kg;

- Ni- 502,32 mg/kg;
- Cd- 7,20 mg/kg, y
- V-3,10 mg/kg

## MICROORGANISMOS AISLADOS Y EMPLEADOS

El empleo de los sistemas de identificación *Liofilchem*®, y el sistema de identificación *STAF SYSTEM 18R*. Permitió identificar con un porcentaje de confiabilidad del 89%, las siguientes cepas:

- *Pseudomona putida*,
- *Pseudomona aeruginosa*,
- *Bacillus* sp, y
- *Mucor* sp.

## REDUCCIÓN DE TPHS Y METALES PESADOS

En 10 meses de tratamiento se logró reducir la concentración de TPHs desde 97.372,54 ppm, hasta 3.765,76 ppm, valor que está dentro de la norma establecida en la ley 1215 para las Operaciones Hidrocarburíferas, para suelos uso industrial de <4000 ppm (figura 7.2.4.). Los resultados globales del trabajo se pueden visualizar en la tabla 7.2.1.

Si bien la Normativa 1215 para remediación de suelos no exige la evaluación de vanadio, a petición del cliente se efectuaron mediciones de este metal pesado.

Los metales pesados como el plomo variaron de 778 ppm hasta un valor de 502,32, que es ligeramente superior a la normativa ambiental, que establece valores de < 500ppm (figura 7.2.5.).

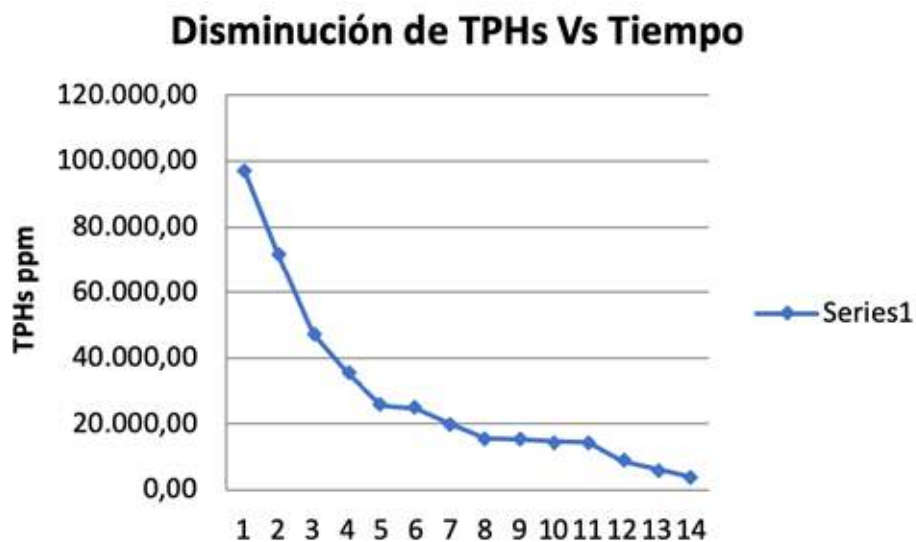
El Ni varió de 389 ppm hasta 98,01 ppm, que es menor al límite permitido equivalente a < 100ppm (figura 7.2.6.).

El Cd a su vez varió de 7,20 a 1,78 ppm, valor que es menor al límite permitido, equivalente a <10ppm (figura 7.2.7.). El vanadio 3,10 ppm, no sufrió cambio alguno durante todo el proceso (según la 1215 del RAHOE, de ser <1ppm).

La tabla 7.2.1. muestra que los valores de TPHs descienden sensiblemente, correspondiendo la mayor tasa de descenso a los cinco primeros meses del proceso de tratamiento. Los resultados obtenidos del Ni y Pb muestran un comportamiento inusual. La curva de descenso de la concentración de TPHs se observa en la figura 7.2.4.

**Tabla 7.2.1.** Resultados de análisis de TPHs en base a 1215 del RAHOE

Fecha	TPHs	Unidad	Pb	Ni	Cd
21/11/2004 97.372,54		ppm	756,00	337	5,09
09/12/2004	71.207,47	ppm	778,00	270,00	7,06
30/01/2005	47.396,59	ppm	759,00	389,00	7,20
15/02/2005	35.282,36	ppm	710,00	350,00	3,43
07/03/2005	25.524,79	ppm	630,05	204,58	4,04
22/03/2005	24.595,67	ppm	712,00	288,90	4,68
06/04/2005	19.887,92	ppm	739,60	307,80	6,36
25/04/2005	15.596,00	ppm	635,00	373,90	3,54
16/05/2005	15.229,38	ppm	636,89	296,61	2,65
02/06/2005	14.562,03	ppm	661,00	160,83	5,76
21/06/2005	14.311,68	ppm	653,00	284,80	4,28
15/07/2005	8.654,12	ppm	610,02	142,02	3,15
08/08/2005	6.231,04	ppm	578,00	103,20	2,12
03/09/2005	3.765,76	ppm	502,32	98,01	1,78



**Figura 7.2.4.** Variación de TPHs vs tiempo (días)



La temperatura promedio del tratamiento osciló entre 35 y 47°C, mientras que la humedad varió entre el 55 y el 60%.

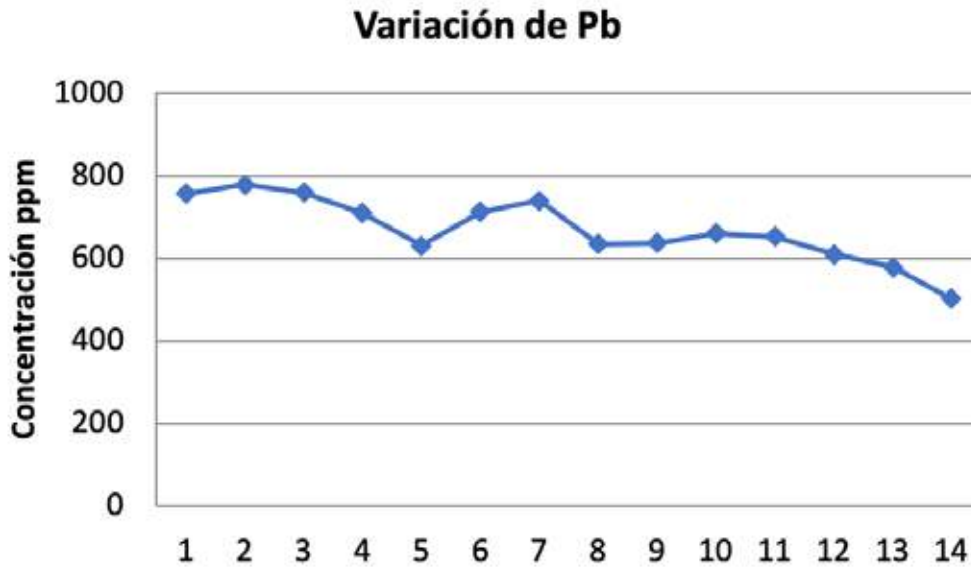


Figura 7.2.5. Variación de Pb vs tiempo (días)



Figura 7.2.6. Variación del Ni vs tiempo (días)



Figura 7.2.8. Variación del Cd vs tiempo (días)

Para normalizar las curvas, empleando valores logarítmicos de las concentraciones obtenidas tenemos los siguientes gráficos (figura 7.2.9.).

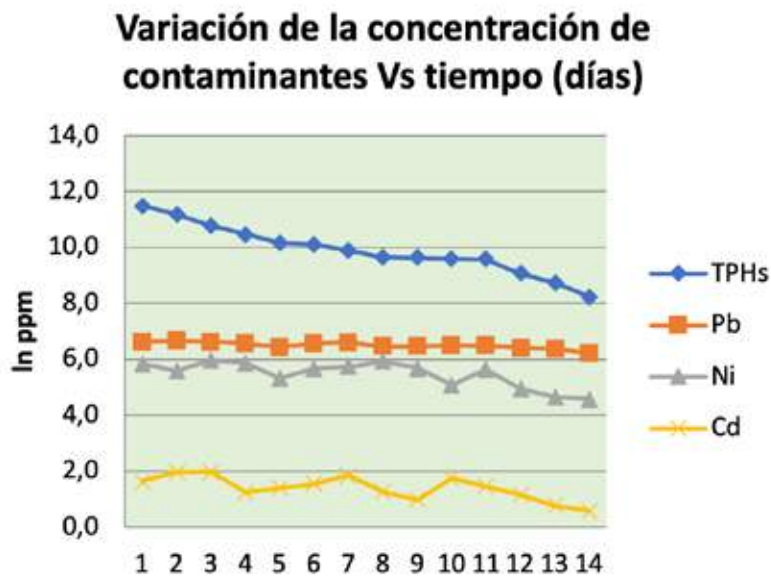


Figura 7.2.9. Variación concentración contaminantes vs tiempo (días)

**TASA DE DEGRADACIÓN DE TPHS (K)**

$$\frac{\ln Co}{C} = \frac{mMax.Bo}{Y * t} = kt$$

Los cálculos de la tasa de degradación se muestran en la tabla 7.2.2.

**Tabla 7.2.2.** Cálculo de lnCo/C

Fecha	1	2	3	4	5	6	7
lnCo/C	0,0	0,313	0,720	1,015	1,339	1,376	1,588
Fecha	8	9	10	11	12	13	14
lnCo/C	1,832	1,855	1,900	1,917	2,421	2,749	3,253

$$K = Y_2 - Y_1 / X_2 - X_1$$

$$K = 0,00983 \text{ ppm/día}$$

El tiempo de vida media calculado de los TPHs

$$t = -\ln(0,5)/k$$

$$T = 70,5 \text{ días}$$

La eficiencia en 10 meses de trataiento.

$$Y = 96,13\%$$

**7.2.6. Análisis y discusión de resultados caso de estudio dos**

Las cepas identificadas se adicionaron al sistema de tratamiento una sola vez, a razón de 1 litro/m<sup>3</sup>. No se estimó necesaria la adición continua de microorganismos (Bioaugmentación), por cuanto estos se hallaban presentes en los residuos en tratamiento y además porque, las cepas de *Penicillium* y *Aspergillum* se adicionaban semanalmente con los restos de cítricos. Otra razón para no reproducir masivamente las bacterias, en especial *Pseudomona aeruginosa*, es su patogenicidad para el hombre. Adicionalmente en el tratamiento, se emplearon sepas de *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillum*, obtenidas espontáneamente a partir de residuos.

Las fuentes bibliográficas consultadas sobre residuos de taladrinas, señalan la presencia natural del género *Pseudomonas* (Velmurugan et al., 2015). La capacidad de *Pseudomona putida* para degradar hidrocarburos es bien conocida así lo certifican varios autores (Vinothini et al., 2015; Tahseen et al., 2019) *Mucor* es una especie ampliamente empleada en la degradación de hidrocarburos, con altos rendimientos (Dirisu et al., 2018; Chukwura et al., 2016; Nrior and Jirigwa, 2017).

Los resultados de la degradación de TPHs, son buenos pese al tiempo prolongado de tratamiento, que se debió a la falta de un seguimiento continuo del proceso, que motivo la incorporación de un tesista de pregrado. Se paso de 97.372,54 ppm a 3.765,76 ppm que es un valor inferior al límite de concentración establecido en la legislación del ramo (1215 RAHOE), que para suelos uso industrial, exige valores menores a 4.000 ppm.

El tiempo de vida media calculado del residuo es equivalente fue de 70,5 días, esto significa que para el décimo mes, se debería contar con una concentración residual de TPHs de 3.042,89 ppm, valor que es cercano al obtenido mediante los cálculos a partir de los análisis de laboratorio (3.765,76 ppm), con la diferencia que el cálculo dice que para llegar a esa concentración, se requiriese 352,5 días, frente a los 300 días prácticos empleados.

En cuanto a los metales pesados, es necesario aclarar que, las metodologías de análisis empleadas en esos años, eran extractivas. En vista que la estrategia empleada de eliminación de metales pesados fue la de adsorción, con el empleo de zeolita y tamices moleculares (Szostak, 1992) resultó que aparentemente no se había cumplido con uno de los objetivos planteados en el trabajo para el cliente. Por esta razón, se realizaron análisis en los lixiviados, para evidenciar que la metodología usada para metales pesados era correcta y eficiente.

A petición de la autoridad competente (Dirección ambiental del Municipio de El Coca- Orellana), se ejecutaron pruebas adicionales de lixiviación con y sin impermeabilización de la base (A y B, respectivamente) con siete muestras de lodos tratados. Los resultados confirmaron nuestras expectativas en relación a la eficiencia de los tamices para retener metales pesados (tabla 7.2.3)

**Tabla 7.2.3.** Valores de pH, conductividad, TPHs y metales pesados en los lixiviados

PARAMETROS	Unidad	I	II	III	IV	V	VI	VIII	LIMITE PERMISIBLE A	LIMITE PERMISIBLE B
Potencial Eléctrico		7,71	7,56	8,08	7,77	8,08	8,53	7,49	6-9	4-12
Conductividad eléctrica	μS/cm	833	1295	977	981	486	1039	359	4000	8000
Bario	Mg/L	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<5	<10
Cadmio	Mg/L	0,038	0,11	0,04	0,031	0,032	0,083	0,01	<0,05	<0,5
Cromo Total	Mg/L	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<1,0	<10
Vanadio	Mg/L	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,2	<2
TPH	Mg/L	1,18	0,24	0,38	0,34	0,24	0,16	0,14	<1	<50

Esta vez el vanadio experimento variación positiva y cumplió las exigencias de la ley 1215. Sin embargo; los lodos residuales tratados, no pudieron ser evacuados a un relleno sanitario como inicialmente se planteó; si no, en jardineras que se construyeron dentro de las instalaciones de la planta (figura 7.2.10.).



**Figura 7.2.10.** Jardinera construida para la evacuación de lodos tratados

Parte de los lodos residuales se depositaron en jardineras frente al casino de la empresa y en ella se obtuvieron cosechas de sandías, tomates y pepinillos (figura 7.2.11.).

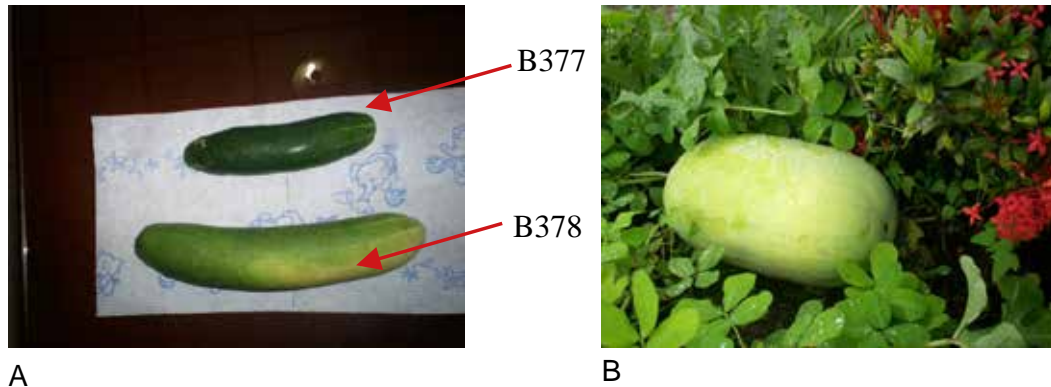


Figura 7.2.11. Producto de jardinera a) Pepinillos del mercado y b) Sandía

Ante la preocupación de que los metales pesados, pudieran haber acumulado en ellos y a petición de las autoridades ambientales municipales; una muestra de pepinillos se envió al laboratorio para su análisis. La tabla 7.2.4., muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 7.2.4.** Resultados del análisis de pepinillos cultivados sobre lodos tratados, (López 2005)

Metales	UNIDAD	B377 (mercado)	B378 (tratamiento)
Cadmio	ppm	<0,05	<0,05
Níquel	ppm	<0,45	<0,45
Plomo	ppm	<7,5	<7,5

### 7.2.7. Conclusiones caso estudio dos

*Pseudomona putida*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus* sp, *Mucor* sp, *Aspergillum* sp. y *Penicillum* sp., son microorganismos idóneos para el tratamiento de residuos industriales hidrocarbúricos.

Los residuos orgánicos derivados de las actividades domésticas de preparación de alimentos son un material idóneo en calidad de cosustrato, para la remediación de lodos residuales industriales aceitosos.

*Mucor Penicillum* y *Aspergillum* capaces de romper moléculas aromáticas y preparar el camino para las bacterias.

La técnica de Landfarming en Plataforma cubierta es idónea para la biorremediación de lodos industriales hidrocarburíferos.

No existen síntomas de toxicidad vegetal ni presencia de metales pesados en las hortalizas en cantidades que puedan considerarse tóxicas.

La cantidad de metales pesados encontrada no es superior a la cantidad de esos metales en pepinillos comercializados en los mercados.

El proceso se puede acelerar mediante el aislamiento, producción e introducción masiva de microorganismos (bioaumentación).

### 7.2.8. Bibliografía

1. Chukwura, E. I., Ojiegbo, N. M., y Nwankwegu, A. S. (2016). Hydrocarbon degradation potentials of fungi associated with oil-contaminated soil from selected mechanic workshops in Awka, Anambra State, Nigeria. *Frontiers in Environmental Microbiology*, 2(6), 38-44.
2. Dirisu C. G., Ogbulie J., Orji J., Eresia-Eke R., Olowu M., Neighbour R. (2018). Crude Oil Degradation by *Penicillium* and *Mucor* Species Isolated From Fresh Water Swamp. *Annals of Ecology and Environmental Science* Volume 2, Issue 2, Page No: 76-81
3. Gualoto M. (2003). Biodegradación de residuos de tanques de combustibles. *El Beaterio*, Petro-comercial.
4. Gualoto M. (2002). Tratamiento de cortes de perforación. “Proyecto Landfarming”, Qmax Ecuador. AEC Tarapoa (Fanny 18B3). Investigación aprobada por la DINAPA.,
5. Nrior, R. R., y Jirigwa, C. C. (2017). Comparative bioremediation potential of *Mucor racemosus* and *Paecilomyces variotii* on crude oil spill site in Gio Tai, Ogoni land. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSRJESTFT)* e-ISSN, 2319-2402.
6. Paulsen, I. T., Holmes, A. J., Wang, Y., Zhang, D., Davison, P., & Huang, W. (2014). *Environmental Microbiology* (pp. 155-168). New York, NY, USA:: Humana Press.
7. Szostak, R. (1992). *Handbook of molecular sieves: structures*. Springer Science & Business Media.

8. Tahseen, R., Arslan, M., Iqbal, S., Khalid, Z. M., & Afzal, M. (2019). Enhanced degradation of hydrocarbons by gamma ray induced mutant strain of *Pseudomonas putida*. *Biotechnology letters*, 41(3), 391-399.
9. Velmurugan, M., Baskaran, A., Kumar, S., Sureka, I., Arockia Raj, E., Emelda, J., & Sathiyamurthy, K. (2015). Screening, stability and antibacterial potential of rhamnolipids from *Pseudomonas* sp., isolated from hydrocarbon contaminated soil. *J. App. Pharm. Sci*, 5(8), 26-33.
10. Vinothini, C., Sudhakar, S., & Ravikumar, R. (2015). Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 318-329.





### **7.3. Estudio de caso 3: Tratamiento de lodos residuales de planta de tratamiento de aguas industriales**

#### **7.3.1. Antecedentes**

Las operaciones de las plantas ensambladora de vehículos en el Ecuador, generan un conjunto complejo de residuos compuesto principalmente por residuos de lacas, pinturas, anticorrosivos, grasas lubricantes, aceites, lodos del tratamiento químico de aguas residuales, herrumbre, detergentes y esquirlas metálicas. La estrategia de gestión de dichos residuos ha sido por muchos años, el confinamiento en vertederos municipales con altos riesgos ambientales y la incineración en cementeras, con altos costos operativos.

Una planta ensambladora de Quito Ecuador, aportó con sus lodos residuales que constituyeron la materia prima del presente trabajo. La investigación se inició en octubre del 2008 y culminó en febrero del 2009, con el propósito de disponer de un procedimiento técnico metodológico eficiente, para resolver el problema de los lodos industriales del sector automotriz. Los lodos residuales investigados tenían una concentración inicial de TPHs 32,88ppm; Ni 37,21 ppm; Pb 53,58 ppm; Zn 77,00 ppm, Cd 4,16 ppm; CN 0,015 ppm, Cr VI 0,081 y Cu 0,162 ppm. Se implementó un sistema de Biorremediación en bandejas de 10 kg (mesocosmos), que permitió en 90 días degradar los contaminantes hasta niveles seguros. Para la eliminación de metales pesados, se emplearon tamices moleculares (Biosoil, puzolana, zeolita), cuya idoneidad se probó mediante distintas combinaciones. Sus resultados se incluyen en los cálculos de cinética de la investigación.

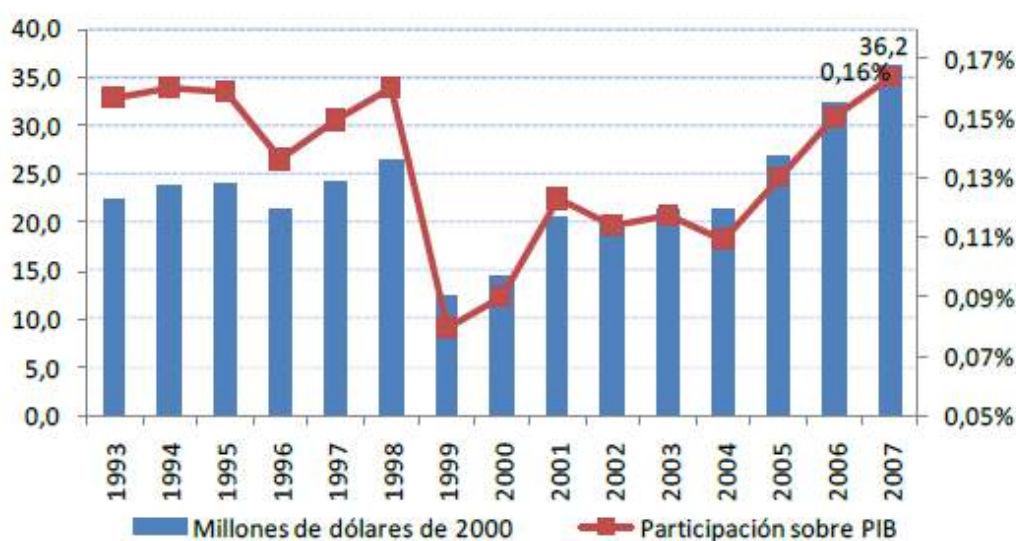
#### **7.3.2. Introducción**

El crecimiento del parque automotor en el Ecuador y en los países de la subregión ha sido vertiginoso, debido principalmente a la variada oferta de vehículos en calidad y precios, la lucha por los mercados ha estimulado la baja en los costos y la ampliación de facilidades para la adquisición de automotores nuevos o usados.

Ecuador no ha sido ajeno a esta tendencia, razón por la que en ensamblaje de autos se ha constituido en una importante fuente de recursos y motor económico a nivel nacional. Sin embargo, su aporte dentro del producto

interno bruto para el año 2007 fue relativamente bajo (0,16%), debido en gran medida al grado de comercialización interna de equipos de transporte importados.

Según el Banco Central del Ecuador, el sector automotriz generó un valor agregado de 36,2 millones de dólares para el 2007 (figura 7.3.1.), lo que representó una tasa de crecimiento de 11,76% con respecto al 2006 (Carrillo, 2009).



Fuente: Banco Central del Ecuador, Cuentas Nacionales Anuales

**Figura 7. 3.1.** Valor Agregado Bruto de la industria de fabricación de equipos de transporte en millones de dólares y como porcentaje del PIB. 1993 – 2007

Por otro lado, este crecimiento del parque automotor también incrementa el volumen de residuos generados en el proceso de ensamblaje vehicular. La problemática se profundiza debido a la falta de metodologías ambientalmente eficientes que permitan la gestión segura de sus residuos. Por un lado, está la contaminación ambiental y riesgos a la salud pública que producen y, por otro lado, los elevados costos de su gestión mediante confinamiento o incineración. En este contexto, la posibilidad de brindar al sector automotriz una alternativa eficiente y de bajo costo para la gestión de sus residuos, constituye una gran oportunidad para estimular la investigación biotecnológica, en busca de soluciones no solo para el sector automotriz,

sino también de otras industrias afines cuyos residuos tienen características similares a las descritas.

La caracterización de los lodos de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ensambladora nos permitió conocer que los TPHs, no constituían un problema ambiental, por cuanto sus valores estaban muy por debajo de los límites establecidos por la legislación ambiental ecuatoriana. Sin embargo, la concentración de metales pesados constituía un problema ambiental de consideración, por cuanto sus valores superaban ampliamente los límites de nuestra legislación para el sector automotriz. Si tomamos en cuenta la cantidad de lodos residuales generados por la empresa mensualmente, el problema se hace mayor ya que la ensambladora produce 320 toneladas mensuales.

El sistema de recolección municipal de residuos se niega a recibir los lodos en el relleno sanitario, porque no existen fosas especializadas para confinar dichos residuos. Incinerar los residuos resulta extremadamente costoso, a razón de 750 USD/ tonelada, esto hace insostenible la incineración y necesaria la búsqueda de alternativas de gestión, eficientes y de menor costo. Para el sector automotriz es fundamental el cumplir con el nuevo marco legal establecido por la Ordenanza Ambiental 213 del DMQ, que obliga a toda industria a tratar sus residuos antes de evacuarlos al ambiente.

### **7.3.3. Objetivos caso estudio tres**

Demostrar que los lodos residuales del sector automotriz pueden ser tratados eficientemente por métodos biológicos.

#### **Objetivos específicos caso estudio tres**

- Identificar los microorganismos capaces de biodegradar una mezcla compleja de residuos industriales.
- Demostrar la eficiencia de tamices moleculares para inmovilizar y encapsular metales pesados.

### 7.3.4. Metodología caso estudio tres

La metodología empleada en el tratamiento de lodos residuales de la industria automotriz fue la de terrarios (bandejas). Esquemáticamente consiste en las siguientes operaciones (Gualoto, 2003).

- Preparación de la muestra
  - Estabilización
  - Hidratación
  - Adición de nutrientes
  - Aislamiento e identificación de microorganismos
  - Adición del pool microbiano
  - Control de parámetros de proceso
- 
- ***Preparación de la muestra***



**Figura 7.3.2.** Celda experimental con lodos estabilizados

Debido a que los lodos que salen de la planta de tratamiento de aguas residuales poseen apenas un 12% humedad y de que los lodos acumulados estaban prácticamente secos, debimos romper los fragmentos con ayuda de un martillo, en tal forma que se obtuvieran partículas finas aptas para iniciar el trabajo de remediación. Parte del material se trituró con ayuda de un mortero de porcelana. Una vez triturados los lodos se sometieron a estabilización.

• **Diseño de las celdas experimentales**

Las celdas empleadas para el tratamiento de suelos contaminados elegidas fueron de plástico de 40 x 25 cm, un total de 12 (figura 7.3.2.), a las cuales se les practicó perforaciones en la base para la evacuación de lixiviados. Las celdas se dispusieron en repisas con una inclinación de dos grados, para garantizar la evacuación de los excedentes de humedad.

• **Composición de las celdas experimentales**

Las bandejas experimentales contenían, lodos industriales homogeneizados y estabilizados con los materiales seleccionados, tales como: Biooil, puzolanas, zeolita, materia orgánica y pool microbiano (tabla 7.3.1.).

**Tabla 7.3.1.** Composición de las celdas experimentales

Celda	Lodos (kg)	Biooil (g)	Agua (ml)	Puzolana (g)	Zeolita (g)	Materia Orgánica (kg)	M/o (ml)
1	10	100	250	100	20	1	35
2	10	150	250	150	20	1	35
3	10	200	250	200	20	1	35
Tres repeticiones por variante							
Control	10	100	250	100	20	1	0

Tres repeticiones y un testigo por variante, sin bacterias. En calidad de materia orgánica, se empleó residuos de cítricos: naranja, limón y mandarina, fragmentados a un tamaño medio de 3-5 cm. Las operaciones unitarias implementadas fueron las siguientes (Gualoto. 2002)

- **Estabilización**

Inicialmente los lodos de la ensambladora fueron estabilizados en relación con el pH, que presentaba valores de 13. Para eso se empleó una solución 1M de  $H_2SO_4$  en un volumen equivalente a 5 cm<sup>3</sup> para los 40 kg de lodos. De esta forma se logró bajar el pH hasta 7,5. Posteriormente se adicionó material esponjante, y tamices moleculares para encapsular metales pesados presentes en la solución del suelo y facilitar el tratamiento biológico. Todos los residuos deben ser previamente estabilizados antes de ser sometidos a degradación, en especial los residuos peligrosos (La Grega et al., 1998; Levin et al., 1997).

- **Hidratación**

Los lodos industriales dispuestos en las bandejas se hidrataron con agua destilada durante 72 horas, tiempo después del cual, los lodos disponían de un nivel de humedad adecuado para el inicio de la biorremediación, equivalente al 56% de humedad (medido con ayuda de una retorta de 50g).

- **Adición de nutrientes**

En cada celda experimental se adicionó 1kg de residuos orgánicos vegetales compuestos de cítricos desmenuzados para incrementar la superficie de contacto y mejorar la asimilación microbiana. La adición de restos de cítricos permite incorporar al sistema de tratamiento ingentes cantidades de *Penicillium* y *Aspergillum*, necesarios para las primeras etapas de biodegradación de compuestos aromáticos presentes en los lodos residuales. La adición de NPK es una etapa importante así lo asevera Eweis et al., (1999)

- **Aislamiento e identificación de microorganismos**

Los residuos viejos, generalmente disponen de microorganismos autóctonos adaptados al medio y con capacidad de emplear los residuos en calidad

de fuente de carbono, por esta razón realizamos siembras de los residuos en busca de microorganismos, mediante la técnica de diluciones (Cappuccino and Welsh, 2018). Con este propósito se utilizó un medio de cultivo compuesto de: Peptona de carne 5g, extracto de carne 3g; agar- agar 12 g y NaCl 5 g (Difco agar). Veinte gramos de dicha mezcla se diluyeron en un litro de agua destilada que posteriormente se esterilizó para en ella realizar la siembra.

Las colonias encontradas se sometieron a identificación morfológica, y pruebas bioquímicas básicas para su identificación presuntiva. Para la identificación bioquímica se enviaron al laboratorio de la Pontificia Universidad Católica CESAC.

- ***Preparación del extracto de adaptación***

Se preparó una mezcla de lodos industriales, Biosoil, puzolana, zeolitas en una proporción similar a la variante 1, en agua destilada. Se dejó reposar durante 24 horas para obtener un extracto que contenga todos los componentes que tendrán las celdas de tratamiento, en cantidades pequeñas, que permita a los microorganismos adaptarse.

Posteriormente se sometió a autoclavado, para dejar reposar por otras 24 horas, con esta operación se eliminó la influencia de cualquier microorganismo que estuviere presente en los componentes de la mezcla. Finalmente se extrajo el sobrenadante y con él se elaboró el caldo de inoculación, adicionando melaza y humato +7plus con microelementos en calidad de activador microbiano.

- ***Elaboración del pool microbiano***

Con las cepas aisladas, se preparó una suspensión de  $2 \times 10^8$  UFCs/ml, tomando como referencia el nefelómetro de Macfarlán. La suspensión se preparó en agua destilada. Todas las suspensiones se adicionan al caldo de inoculación. Seguidamente se procedió a la incubación de la mezcla durante 4 horas, en un termostato a 37°C, para lograr un tiempo de adaptación y determinar el número de UFCs iniciales.



- **Adición del pool microbiano**

En cada celda experimental se adicionaron, dos veces por mes en un volumen de 35 ml de pool microbiano, con ayuda de una pipeta estéril. Una vez adicionado el pool, la bandeja se sometía a mezcla concienzuda, para distribuir los microorganismos en todo el volumen de residuos.

- **Control de parámetros**

Recuento microbiano: Los recuentos de UFCs en placa de agar nutritivo, fueron efectuados desde el 3 de octubre del 2008 hasta 15 de febrero del 2009 por diez ocasiones.

Humedad y otros parámetros: La humedad de las unidades experimentales se midió en promedio dos veces por mes, al igual que la temperatura, pH, conductividad

Nutrientes: Se adicionó nutrientes orgánicos (residuos de cítricos), cada 15 días, 1 kg por cada 10 kg de lodos. La humectación se efectuó con 300 ml de soluciones de humato 7plus al 0,01%, esta solución aportó con microelementos como; Mn, B, Cu, Co, Zn, Mo, Fe, a más de silicio soluble.

Aireación: Las condiciones aeróbicas del sistema de tratamiento se lograron mediante volteo manual de los lodos en tratamiento una vez por semana.

Descenso de metales pesados Este parámetro se monitoreó mediante análisis de adsorción atómica en el laboratorio ambiental certificado Ancy de la ciudad de Quito.

### 7.3.5. Resultados y discusión

#### **Caracterización**

La caracterización inicial de los residuos de la planta de tratamiento de aguas industriales del sector automotriz se puede ver en la tabla 7.3.2.

**Tabla 7.3.2.** Caracterización de los lodos residuales

PARÁMETRO	Ppm
Cd	4,160
Ni	37,210
Pb	53,580
Zn	77,000
Cu	0,162
Cr (VI)	0,081
Fenoles	0,012
TPHs	32,880
CN total	0,015

• **Identificación de microorganismos**

Las colonias encontradas e identificadas fueron: *Pseudomona putida*, *Pseudomona* sp, *Bacillus cereus* y *Rhodococcus* sp.

Adicionalmente en el tratamiento, se emplearon sepas de *Aspergillum* y *Penicillum* y *Mucor*, obtenidas espontáneamente a partir de residuos de cítricos y pan en descomposición, que se adicionaron al sistema de tratamiento en calidad de nutrientes.

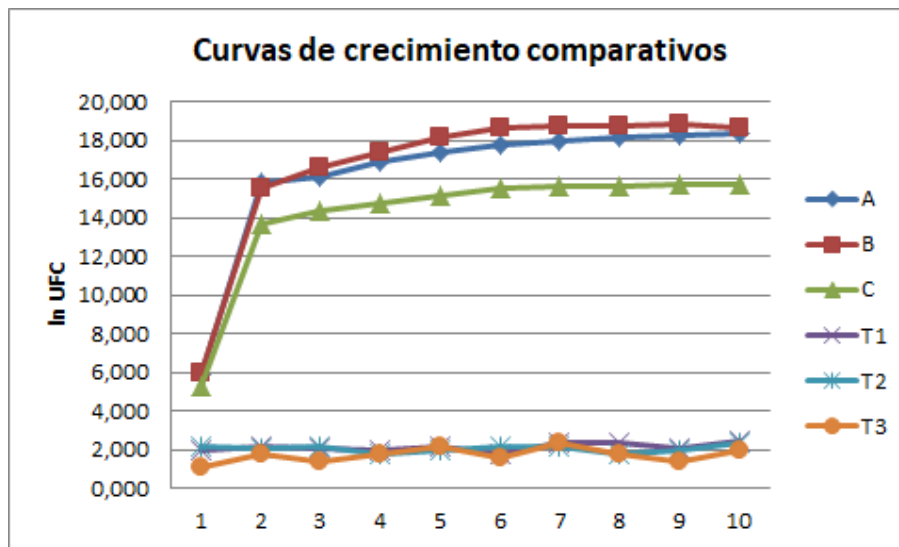
• **Control de parámetros**

Temperatura. La temperatura varió ampliamente ya que las condiciones ambientales de la ciudad de Quito no fueron favorables para el proceso, varió de 8°C a 27°C. Pese a esta variación significativa entre el día y la noche los índices de degradación fueron buenos.

Conteo de UFCs. Los resultados de los conteos de UFCs de las unidades experimentales se observa en la tabla 7.3.3 y en la figura 7.3.3., que muestran las curvas de crecimiento.

**Tabla 7.3.3.** Resultados del conteo de UFCs.

Tiempo (días)	A	In	B	In	C	In
1	357,33	5,879	378,00	5,935	201,33	5,305
10	7406666,67	15,818	5.440.000,00	15,509	853.333,33	13,657
20	10073333,33	16,125	15.733.333,33	16,571	1.673.333,33	14,330
30	22006666,67	16,907	36.733.333,33	17,419	2.553.333,33	14,753
40	34953333,33	17,370	75.833.333,33	18,144	3.693.333,33	15,122
50	49900000,00	17,726	122.566.666,67	18,624	5.306.666,67	15,484
60	65766666,67	18,002	137.400.000,00	18,738	5.883.333,33	15,588
70	75200000,00	18,136	140.733.333,33	18,762	6.266.666,67	15,651
80	84720000,00	18,255	152.333.333,33	18,842	6.674.466,67	15,714
90	91533333,33	18,332	120.433.333,33	18,607	6.946.666,67	15,754



**Figura 7.3.3.** Curva de crecimiento comparativa

Las curvas de crecimiento son cercanas a las ideales en las tres variantes experimentales, siendo la curva de la variante B la mejor.

**TASA DE CRECIMIENTO DEL CONSORCIO.**

Para el cálculo de la tasa de crecimiento del consorcio, se empleó el conteo a las 4h y las 24 horas de cultivo:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

$$\mu = \ln(365) - \ln(14) / 24 - 4$$

$$\mu = 0,019$$

Este valor es bajo en comparación con la mayoría de los datos teóricos que presentan valores cercanos a 0,7- 0,8 (Rittmann y Garralda de Roda, 2001).

### VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS

Los análisis realizados en el laboratorio ambiental certificado presentaron los siguientes resultados (tabla 7.3.4.).

**Tabla 7.3.4.** Variación de la concentración de metales pesados (se presentan los valores promedio)

Tiempo	A (ppm)					
	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn
0	4,16	0,162	0,081	37,21	53,58	77,0
30	1,45	0,154	0,075	28,68	32,64	68,13
60	0,97	0,121	0,078	37,21	18,72	51,16
90	0,83	0,09	0,081	37,21	3,78	49,35
	B (pm)					
0	4,16	0,162	0,81	37,21	53,58	77,0
30	0,1	0,03	0,05	15,51	7,26	53,68
60	0,11	0,05	0,05	10,7	0,4	41,68
90	0,01	0,01	0,05	9,75	0,4	30,33
	C (ppm)					
0	4,16	0,162	0,081	37,21	53,58	77,0
30	3,24	0,142	0,081	37,14	43,67	54,21
60	2,98	0,138	0,081	26,98	39,92	43,28
90	3,16	0,136	0,081	18,24	32,65	55,22

En las figuras 7.3.4; 7.3.5 y 7.3.6; se muestran las curvas de descenso de la concentración de contaminantes.

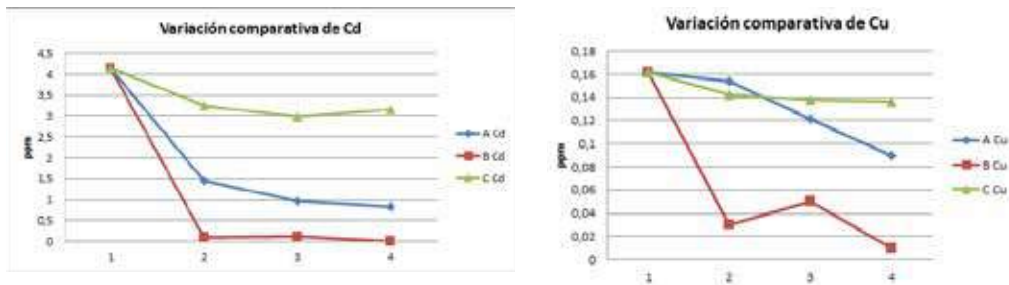


Figura 7.3.4. Curvas de descenso de la concentración de Cd y Cu en las tres unidades experimentales

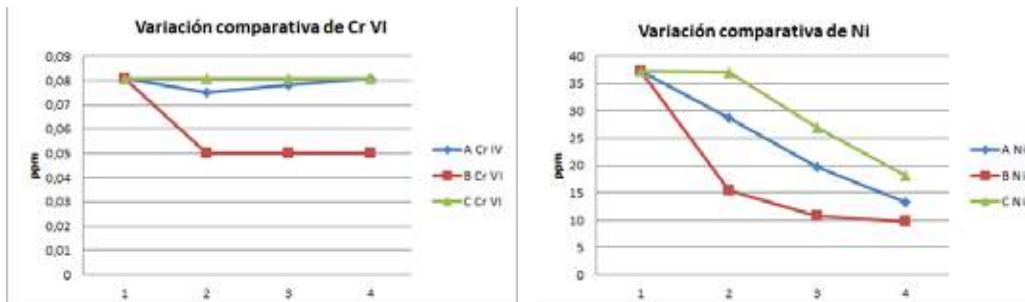


Figura 7.3.5. Curvas de descenso de la concentración de Cr y Ni en las tres unidades experimentales

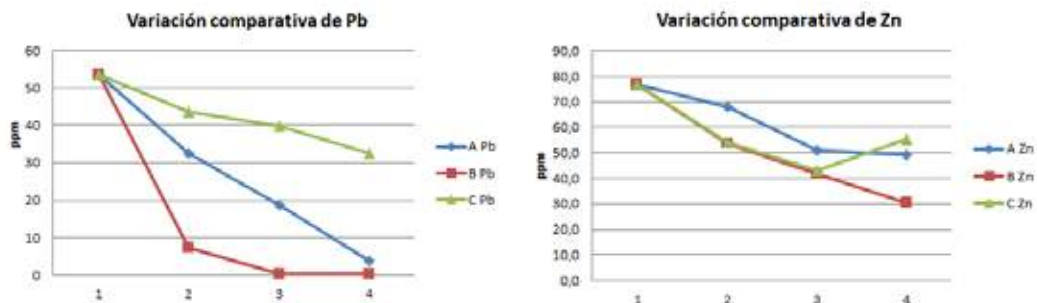


Figura 7.3.6. Curvas de descenso de la concentración de Pb y Zn en las tres unidades experimentales

Con todos los metales pesados, la variante B, muestra los mejores resultados, en tanto que la variante C, muestra los resultados menos efectivos. En relación con el Pb, no existe diferencia significativa entre la celda experimental A y B. En tanto que, con el Ni, no existen diferencias significativas entre las tres celdas experimentales. Con el Cd, Cu, Cr; la celda B muestra mejores resultados que las otras dos celdas.

### TASA DE DEGRADACIÓN

Para el cálculo de la tasa de eliminación se emplea la ecuación modificada de Monod.

$$\frac{\ln C_0}{C} = \frac{m \text{Max. } B_0}{Y * t} = kt$$

$$\frac{\ln C_0}{C} = kt$$

$$K = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

Los valores obtenidos se muestran en la figura 7.3.7.

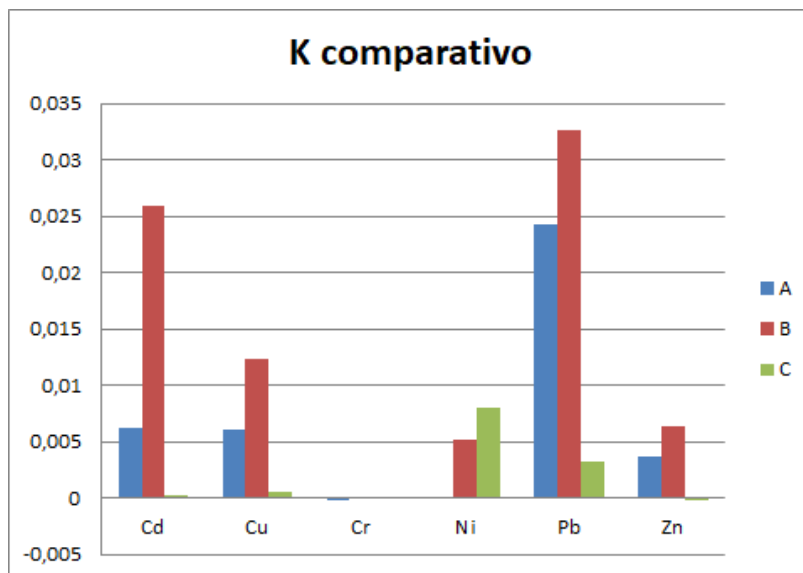
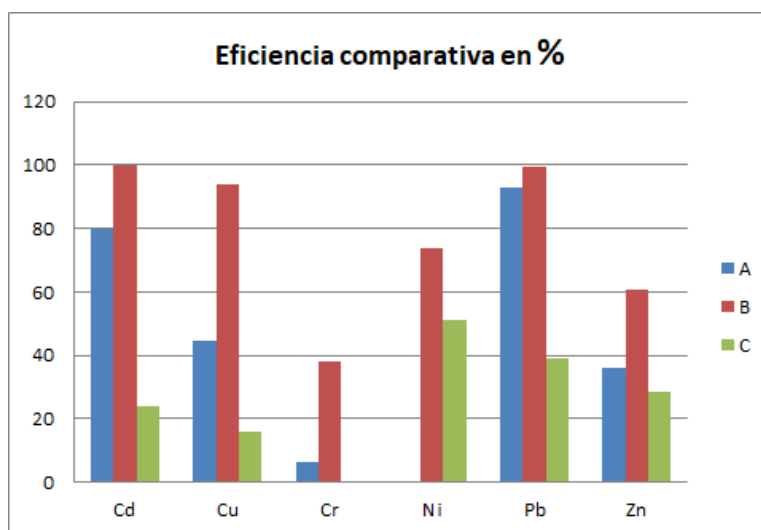


Figura 7.3.7. K comparativo de las unidades experimentales

Las tasas de eliminación muestran que la celda A presenta para el Pb, una tasa 0,024 ppm/día, en tanto que, frente a los otros metales testeados, su tasa K varía entre 0,006 y 0,003 ppm/día.

La variante experimental B, presenta valores de K elevados en Pb y Cd (0,032 y 0,025 respectivamente), en tanto que, con Cu, Ni y Zn (0,012-0,005 y 0,0064 ppm/día respectivamente). Ninguna de las variantes se mostró efectiva con el Cr.

**EFICIENCIA**



**Figura 7.3.8.** Porcentajes de eficiencia comparativos

El cálculo del Porcentaje de eficiencia (figura 7.3.8.), de la variante B, muestra valores superiores al 90% con el Cd, Cu y Pb, con el Ni y Zn entre 70 y 60% respectivamente, con apenas un 38% con el Cr. La variante A muestra un 80% con Cd y 92% con el Pb, con el Cu 44% y 31% con el Zn y apenas un 6% con el Cr, en tanto que con el Ni no muestra eficiencia alguna. La variante experimental C, presenta un valor del 51% con el Ni, 39 con el Pb y 28% con el Zn, en tanto que con Cd 24%, 16% con el Cu y 0% con el Cr.

**EFFECTIVIDAD DEL SISTEMA**

El sistema de tratamiento es altamente efectivo para encapsular plomo (99,2%), cadmio (99,7%), cianuro (93,3%), cobre (93,8%), níquel (73,79%), zinc (60,6%) y cromo VI (38,27%). Los resultados, confirman la capacidad de los tamices moleculares como las Zeolitas, puzolanas y Biosoil, para adsorber metales pesados. (Erdem et al., 2004)

**TPHs y fenoles.**

En cuanto a TPHs y fenoles se obtuvieron los siguientes resultados

Considerando una cinética de primer orden

$$\ln Co/C = kt$$

TPH: 32,880 (0 días) - 20,27 (30 días) - 19,22 (60 días) - 11,73 (90 días)

$$\ln 32,88 / 20,27 = 0,48$$

$$\ln 32,88 / 19,22 = 0,53$$

$$\ln 32,88 / 11,73 = 1,03$$

$$\text{Pendiente} = Y_2 - Y_1 / X_2 - X_1$$

$$K = 1,03 - 0,48 / 1 - 90$$

$$K = 0,55 / 89$$

$$K = 0,0061$$

Este valor señala que cada día desaparece 0,0061 partes de contaminante.

El tiempo de vida media de estos residuos es:

$$t = -\ln(0.5) / 0,0061$$

$$t = 0.693 / 0,0061$$

$$t = 113,6 \text{ /días}$$

Cabe señalar que los lodos industriales de la planta ensambladora no tienen problemas con los TPHs, sin embargo, la metodología se muestra eficiente para degradarlos. El tiempo de vida media sería de 3,7 meses.

La concentración de TPHs varió en promedio de 32,88ppm hasta 11,73ppm. Esto pone en evidencia la acción conjunta de los microorganismos aislados, *Pseudomona putida*, *Pseudomona sp*, *Bacillus cereus* y *Rhodococcus sp.*, que según varios autores son capaces de degradar hidrocarburos (Soto et al, 1997)

Los valores de los fenoles prácticamente no variaron en todas las celdas experimentales y se mantuvo en 0,012 ppm. Los resultados del análisis estadístico, se presenta en la tabla 7.3.5.



**Tabla 7.3.5.** Análisis estadístico

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	0,315	0,07875	8,25E-06		
Columna 2	4	0,231	0,05775	0,00024		
Columna 3	4	0,324	0,081	0		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
en de las variació	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0013155	2	0,00065775	7,941	0,010	4,256494729
Dentro de lo	0,0007455	9	8,28333E-05			
Total	0,002061	11				

De ella se desprende que si existe diferencias significativas entre los tratamientos por cuanto el valor de p es de 0,010, que es menor de 0,05 para un nivel de confianza del 95%.

	A	B	C
A		0,021	-0,00225
B			-0,02325
C			

Hay diferencia entre el grupo A y B  
 Hay diferencia entre el grupo B y C

**HUMEDAD**

Para sistemas de biorremediación los valores de humedad fluctúan entre 50 y 70%, en consecuencia, la humedad del sistema de tratamiento fue ideal.

**CONDUCTIVIDAD.** La conductividad inicial en mS/cm en las unidades de tratamiento varió moderadamente durante el tiempo de tratamiento de 0,67 a 0,32 mS/cm. Los valores de conductividad logrados durante el tratamiento fueron ideales para garantizar una buena tasa de biodegradación de contaminantes.

**pH.** Las variaciones del pH fueron leves. En todas las unidades se logró establecer un pH ligeramente ácido desde 6,5. Este valor está dentro del rango adecuado para garantizar una buena tasa de biodegradación.

### **7.3.6. Conclusiones**

El empleo de tamices moleculares como la puzolana, zeolitas y Biosoil, el proceso de adsorción de los metales presentes en los lodos residuales industriales del sector automotriz, así lo muestran los resultados de las pruebas experimentales.

Pese a que los TPHs, no constituían un problema para los lodos industriales de la ensambladora, el sistema mostró su capacidad para degradar residuos hidrocarburíferos.

La mejor variante experimental fue la B, con % de adsorción de metales superiores al 90% para Cd, Cu y Pb.

Las otras variantes experimentales presentaron eficiencia relativa en comparación de B, así, A muestra un 80% con Cd y 92% con el Pb, pero con el Ni no muestra eficiencia alguna.

La variante experimental C, fue la que presentó porcentajes de eficiencia más bajos en comparación con las dos anteriores.

Los valores de pH, conductividad y humedad logrados en la investigación fueron los ideales.

Los resultados experimentales de laboratorio permiten concluir que se cumplieron a cabalidad los objetivos planteados en la presente investigación.

### **7.3.7. Recomendaciones**

- Ampliar la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes, de bajo costo y libre disponibilidad, tales como residuos de vegetales como: palma, caña, maíz, café, hortalizas y frutas.
- Probar la metodología con lodos residual con mayor concentración de hidrocarburos.
- Realizar pruebas de usos de tamices en forma individual, para determinar cuál de los tamices usados, es el responsable de la eficiencia.

### 7.3.8. Bibliografía

1. Cappuccino J. Welsh C. (2018). *Microbiology a Laboratory Manual*. Eleventh edition. Pearson Education Limited. Malaysia.
2. Carrillo, D. (2009). Diagnóstico del sector automotriz. Instituto Nacional de Estadística y Censos, 1(1).
3. Erdem, E., Karapinar, N., and Donat, R. (2004). The removal of heavy metal cations by natural zeolites. *Journal of colloid and interface science*, 280(2), 309-314.
4. Eweis, J. B., Tejero Monzón, I., & Amieva del Val, J. J. (1999). Principios de biorrecuperación (bioremediation): tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos (No. 628.5 P7).
5. Gualoto M. (2002). Tratamiento de cortes de perforación. “Proyecto Landfarming”, Qmax Ecuador. AEC Tarapoa (Fanny 18B3). Investigación aprobada por la DINAPA., 2002.
6. Gualoto M. (2003) de residuos de tanques de combustibles. El Beaterio, Petrocomercial. Trabajo no publicado.
7. La Grega Michael D. Phillip L. Buckingham y otros. *Gestión de Residuos Tóxicos, Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos* Editorial Mc Graw Hill. México 1998. Páginas 643 -734, capítulo X, tomo II.
8. LaGrega, M. D. B., Phillip, L., & Evans Jeffrey, C. *Gestión de residuos tóxicos: tratamiento, eliminación y recuperación de suelos/por Michael D. Lagrega* (No. 628.54 L3.).8. Morris Levin, Gealt Michael. *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*,
9. Levin, M. A., Gealt, M. A., Tejero Monzon, I., Amieva del Val, J., Armentante, P. M., Atlas, R. M., ... & Zylstra, G. J. (1997). *Biotratamiento de residuos toxicos y peligrosos: seleccion, estimacion, modificacion de microorganismos y aplicaciones*. McGraw-Hill.
10. Rittmann, B. E., & Garralda de Roda, F. (2001). *Biotecnología del medio ambiente principios y aplicaciones* (No. 660.6 R5).
11. Soto A., G.J., A. Gurges F., C. Cárdenas, A. Aranjó y S. Delgado. (1997). *Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburo utilizando bacterias autóctonas*, Maracaibo. IV Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente. RICA/anivo Simón Bolívar; Caracas Venezuela. 11-13 dic.





## 7.4. Caso de estudio cuatro: Biorremediación de hidrocarburos utilizando cepas antárticas

### 7.4.1. Resumen

La ardua tarea de descontaminar zonas andinas afectadas por derrames de hidrocarburos se ha visto afectada por la baja eficiencia de las cepas microbianas empleadas en la biorremediación, así lo han mostrado los trabajos de biorremediación realizados en la laguna de Papallacta, la misma que en la actualidad es un pasivo ambiental. Nuestro trabajo se direccionó a la búsqueda de microorganismos psicrotolerantes, con capacidad para metabolizar hidrocarburos; de cuya existencia se conoce gracias a varios estudios realizados en la Pampa Argentina y chilena (Mc Cormack y Fraile, 1997).

La búsqueda se efectuó en las zonas de carga y descarga de combustibles de las estaciones científicas Pedro Vicente Maldonado y Arturo Prat de la Isla Greenwich y en la zona de almacenamiento de combustibles de la estación científica rusa Bellingshausen de la Isla King George, donde en los años 50 del siglo pasado se produjo un derrame considerable de bunker.

Las muestras de suelos se tomaron a una profundidad de 25-30cm y, a partir de ellas, se prepararon siembras directas en medios de cultivo, mediante diluciones. Las colonias que crecieron fueron transportadas al Ecuador para su identificación y caracterización. Luego de los trabajos de identificación morfológica y bioquímica de los microorganismos encontrados, se realizaron experiencias de degradación de hidrocarburos con cada una de las cepas encontradas. De las 33 cepas<sup>37</sup>, un total de 9 cepas mostraron esta capacidad y con ellas se realizaron pruebas de biodegradación de hidrocarburos en terrarios.

Las celdas de tratamiento fueron mantenidas en un cuarto frío a 4°C, para recrear la temperatura cercana al promedio de verano de la zona de estudio. La temperatura es un factor limitante de estos procesos, por lo que resulta adecuado el uso de bacterias psicrotolerantes (Whyte et al., 2001). Entre las cepas identificadas<sup>38</sup> que se emplearon en la biorremediación,

---

<sup>37</sup> Informe Preliminar de la investigación Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos. FUNDEMAR- UDLA. 2010. Pp: 32 PDF

<sup>38</sup> Es necesario reconfirmar los datos mediante estudios de ARNs16s, en un laboratorio especializado.

se puede mencionar a: *Pseudomonas* sp, *Rhodococcus* sp, *Pseudomona putida*, *Bacillus* sp, *Clostridium perfringens*, ¿*Aspergillum niger?*, *Penicillum Chrysogenum*, ¿*Micrococcus antarticus?*, y *Sphingomonas* sp, las cuales, según varias fuentes de consulta, han mostrado la capacidad de degradar hidrocarburos (Shivaji et al., 1989; Logan et al., 2004; Liu et al., 2000; Arenz et al., 2006). Se reprodujeron las cepas y se adicionaron a las celdas de tratamiento, siguiendo la recomendación de la biomagnificación como la estrategia más efectiva (Coulon y Delille 2003, Cuningham Philp, 2000); aunque otros consideran innecesaria la aplicación de técnicas de biomagnificación (Ruberto y Vazquez, 2004).

Los suelos de las celdas de tratamiento se desinfectaron térmicamente a 80°C durante 60 minutos, para estimular la evaporación de COVs y eliminar la microflora autóctona. Luego a cada celda se adicionó una cantidad de hidrocarburo de 18 grados API (muestra obtenida de Petroecuador en el 2005), hasta lograr una concentración de 5000 ppm de TPHS y 850 ppm de HAPs.

#### 7.4.2. Materiales y métodos

- **Materiales**

Los materiales empleados para las pruebas, a más de medios de cultivo, nutrientes minerales y materiales de microbiología, fueron: suelos andinos, antárticos, bandejas de plástico (terrarios), paletas de madera, atomizadores de plástico

- **Métodos**

##### **Identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos**

Las bacterias aisladas se conservaron en TSB (Tryptona Soya Agar) con glicerol al 20% a -37°C, y los hongos filamentosos en AM (Agar Malta 2%) a 4°C.

Los microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos fueron identificados mediante un medio enriquecido con 150 mg L<sup>-1</sup> de crudo esterilizado y 10g de suelos antárticos. Los Erlenmeyer se incubaron en con-

diciones óptimas a 4°C, pH 8,0, y la salinidad de 30 partes por mil durante 30 días. Frascos que resultaron turbios dentro de dos semanas fueron considerados como positivo. Los microorganismos disponibles en los frascos positivos fueron aislados en medio agar marino (DIFCO, 2216), para ser empleados en las pruebas experimentales de biodegradación de hidrocarburos mediante terrarios.

La composición de diferentes especies bacterianas fue evaluada por el método de recuento en placa (ASM, 1981). La población de cada bacteria específica se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de las colonias y la población total de bacterias en el suelo (Figura 7.4.1.).



**Figura 7.4.1.** Trabajo con microorganismos de suelo antártico. A) toma de muestra de suelo. B) trabajo de laboratorio en Base Maldonado (Antártica)

### **Medio de identificación**

La solución nutritiva utilizada en las pruebas fue un medio sintético que contiene los siguientes componentes en agua doblemente destilada:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (85 mg/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (217,5mg/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (334mg/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25mg/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (22,5 mg/L),  $\text{CaCl}_2$  (27,5 mg/L);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,25 mg/L),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.0399 mg/L),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.0572 mg/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,0428 mg/L),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.0347 mg/L);  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$  (0.1 mg/L) y extracto de levadura (0,15 mg/L) (Henry et al., 2008). El contenido de nutrientes e hidrocarburos en los suelos se determinó cuantitativa y cualitativamente como se describe en el método estándar del PNUMA (1992). Mientras que los nutrientes del suelo (C, N, P) se evaluaron mediante el uso de los métodos propuestos por Cleveland y Liptzin (2007).



### **Preparación de las unidades experimentales**

La metodología de tratamiento empleada fue la de terrario, en bandejas de plástico de 20kg (un total de 10). Los suelos fueron tomados en las inmediaciones del nevado Antisana; y fueron limpiados de restos de materiales orgánicos; se sometieron a tratamiento térmico durante 60 minutos a 80°C, en un horno de mufla. Luego de su enfriamiento se tamizó para eliminar el material pétreo e impurezas presentes con una malla 70 y se dispuso en las bandejas experimentales.

A los suelos se adicionó crudo de 18 grados API disueltos en acetona, en tal forma que los 20 kg de suelos estériles adquieran una concentración de 5000ppm en TPHs y 850 ppm en HAPs, conforme al análisis inicial de la composición del crudo empleado.

**Bioaugmentación.** En cada una de las celdas experimentales, excepto la testigo, los microorganismos se adicionaron con la solución nutritiva antes mencionada a razón de 15ml/kg, por tres ocasiones; al inicio a los 30, y 60 días.

**Bioestimulación.** Se efectuó en forma periódica simultánea a la humectación, al efecto se emplearon sales de ácidos húmicos con siete microelementos: Cu, Fe, Mn, Co, Mo, B y Zn, en solución al 0,01%, cada 15 días en cantidades a razón de 50ml.

**Control de parámetros.** Los parámetros de control del proceso de biorremediación fueron: temperatura, pH, conductividad, humedad, aireación, control de UFCs. Se realizó un control rutinario de parámetros de proceso cada 72 horas.

**Toma de muestras.** Las muestras para análisis de laboratorio y comprobación del avance del proceso de biodegradación de hidrocarburos se realizaron cada 30 días, a razón de 0,5 kg/celda, en sobres de papel aluminio dentro de fundas con cierre hermético y enviadas a un laboratorio certificado con la cadena de custodia correspondiente.

### **Cinética del proceso**

Tasa de degradación. - Basados en experiencias personales decidimos emplear la ecuación modificada de Monod.

$$\frac{\ln Co}{C} = \frac{mMax.Bo}{Y*t} = kt \quad (1)$$

Con la ayuda de esta ecuación se trazó una gráfica de dependencia  $\ln Co/C$  del tiempo, para las unidades experimentales. La constante K (tasa de biodegradación), se determinará por la pendiente de la curva. Se determinaron también los tiempos de vida media de los TPHs y HAPs, la eficiencia del tratamiento en % y la tasa de crecimiento para cada una de las cepas empleadas. Las ecuaciones empleadas fueron:

$$\text{Pendiente} = Y2-Y1 / X2 - X1$$

Tasa de crecimiento específica (2)

$$\mu = \frac{\ln N2 - \ln N1}{t2 - t1} \quad (2)$$

Tiempo de vida media.

$$t = -\ln(0,5)/k \quad (3)$$

### **7.4.3. Resultados caso cuatro**

#### **Tasa de crecimiento específica**

Las tasas de crecimiento específicas fueron bajas, si las comparamos con las que normalmente se obtienen con cepas empleadas en biorremediación bajo condiciones ambientales similares a las del territorio ecuatoriano. Según datos bibliográficos (Ritman y McCarty, 2001), la tasa de crecimiento específico para *Pseudomonas* es de 0,7/día. Los resultados obtenidos se pueden analizar en la Tabla 7.4.1.

**Tabla 7.4.1.** Tasa de crecimiento específica

CEPAS	48 horas	120 horas	Ln N1	Ln N2	$\mu$
<i>Pseudomonas sp</i>	32	160	3,40	5,07	0,023
<i>Rhodococcus sp</i>	21	92	3,04	4,52	0,020
<i>Pseudomonas putida</i>	25	112	3,21	4,71	0,0208
<i>Bacillus sp</i>	15	63	2,70	4,13	0,019
<i>Clostridium perfringens</i>	9	42	2,19	3,73	0,021
<i>Aspergillus niger</i>	41	85	3,71	4,44	0,010
<i>Penicillium chrysogenum</i>	63	154	4,14	5,03	0,012
<i>Micrococcus antarcticus</i>	6	41	1,79	3,71	0,026
<i>Sphingomonas sp</i>	12	43	2,48	3,76	0,017
Testigo	3	3	1,09	1,09	0,00

Es probable, que las condiciones del sitio de experimentación ejerzan influencia sobre dicha tasa, además de las condiciones del medio de cultivo, que difiere en mucho de las condiciones en las cuales normalmente estos microorganismos se reproducen (figura 7.4.2.).

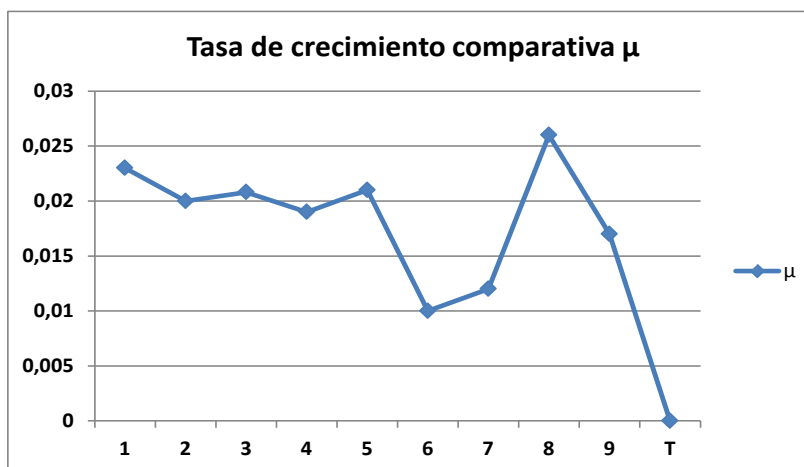


Figura 7.4.2. Tasa de crecimiento microbiano comparativa

La cepa con mayor tasa de crecimiento específica fue *Micrococcus antarcticus* y la de menos *Sphingomonas sp*. Las tasas bajas se explican por su metabolismo lento, propio de microorganismos psicrófilos.

Control UFCs. Uno de los aspectos de importancia en trabajos de biorremediación es el control de UFCs, el mismo que debe mantenerse sobre los  $10^6$  para garantizar una buena tasa de degradación, si pensamos en su potencial aplicación en trabajos a gran escala, donde el tiempo de tratamiento define los costos del proceso. Durante nuestro trabajo su comportamiento fue un poco irregular, logrando en la mayoría de las celdas un crecimiento moderado. Los valores variaron entre  $0,08 \times 10^6$  de *Micrococcus antarcticus* y  $3,7 \times 10^6$  de *Rhodococcus* sp. La figura 7.4.3. ilustra el comportamiento de este parámetro durante las pruebas en cada una de las celdas experimentales.

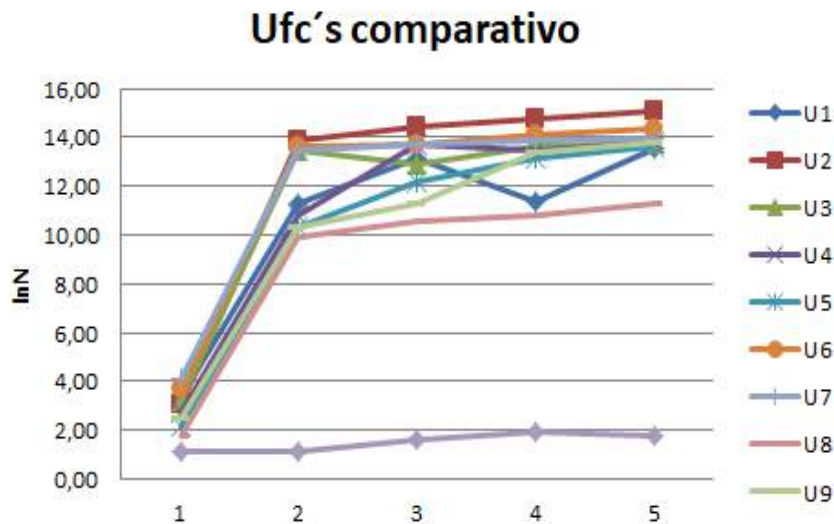


Figura 7.4.3. Curvas de crecimiento de las unidades experimentales

Disminución de la concentración de hidrocarburos

De cada celda experimental se tomaron 0,5 kg de muestra y se enviaron a un laboratorio certificado para el análisis correspondiente de TPHs y HAPs, conforme a metodologías estandarizadas EPA 815D (DG-FID) y EPA 8270D respectivamente.

**Tabla 7.4.2.** Variación de la concentración de TPHs

VARIACIÓN DE TPHS						
Microorganismo	Celda	Muestras (ppm)				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomona</i> sp	U <sub>1</sub>	5000	4629	3731	2978	2120
<i>Rhodococcus</i> sp	U <sub>2</sub>	5000	4896	4662	4132	3700
<i>Pseudomona putida</i>	U <sub>3</sub>	5000	4021	3657	2133	1867
<i>Bacillus</i> sp	U <sub>4</sub>	5000	4729	4119	3027	2630
<i>Clostridium perfringens</i>	U <sub>5</sub>	5000	4502	4194	3645	3112
<i>Aspergillus niger</i>	U <sub>6</sub>	5000	4679	4510	4467	4230
<i>Penicillium chrysogenum</i>	U <sub>7</sub>	5000	4003	3729	2765	2079
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U <sub>8</sub>	5000	4867	4622	4139	4002
<i>Sphingomonas</i> sp	U <sub>9</sub>	5000	4902	4762	4473	4137
Testigo	U <sub>T</sub>	5000	5000	4910	4890	4870

La variación de la concentración de TPHs fue más pronunciada en la unidad experimental de *Pseudomona putida*, con 3133ppm de 5000ppm; la unidad experimental de menor disminución fue la de *Aspergillum niger*, con 770ppm de 5000 ppm; en tanto que la unidad experimental de *Rhodococcus* presentó la mayor disminución de HAPs, con 772ppm de 850 ppm y la celda de menor disminución fue *Bacillus* sp con apenas 49ppm de 850ppm. Mayores detalles se presentan en las tablas 7.4.2 y 7.4.3.

**Tabla 7.4.3.** Variación de la concentración de HAPs

VARIACIÓN DE HAPS						
Microorganismo	Celda	Muestras (ppm)				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomona</i> sp	U <sub>1</sub>	850	837	819	798	720
<i>Rhodococcus</i> sp	U <sub>2</sub>	850	652	387	105	78
<i>Pseudomona putida</i>	U <sub>3</sub>	850	812	779	721	720
<i>Bacillus</i> sp	U <sub>4</sub>	850	845	832	812	801
<i>Clostridium perfringens</i>	U <sub>5</sub>	850	827	814	802	798
<i>Aspergillus niger</i>	U <sub>6</sub>	850	721	413	156	94
<i>Penicillium chrysogenum</i>	U <sub>7</sub>	850	691	396	138	97
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U <sub>8</sub>	850	800	784	726	710
<i>Sphingomonas</i> sp	U <sub>9</sub>	850	770	625	251	112
Testigo	U <sub>T</sub>	850	850	847	844	840

**Tasa de biodegradación de hidrocarburos**

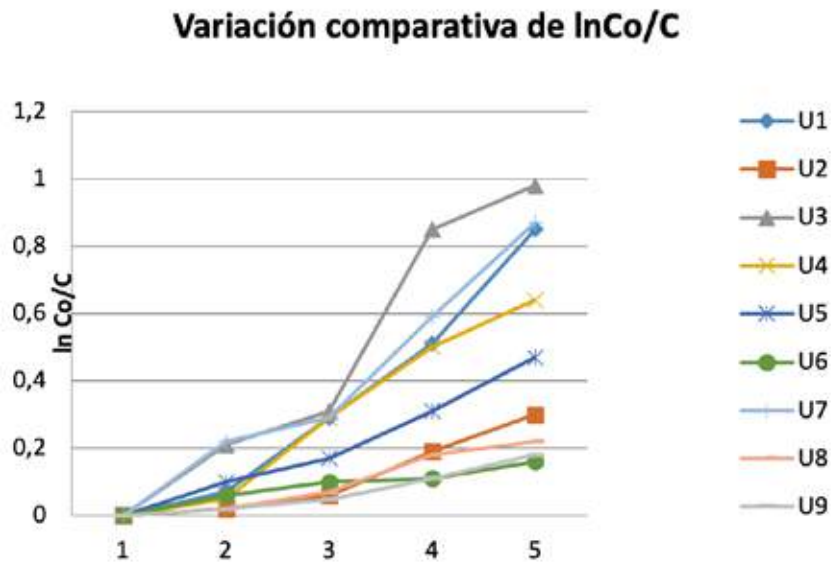
**Tasa de degradación de TPHs**

La tasa se calculó mediante la fórmula (1); la tasa más elevada se obtuvo en la unidad experimental U3 de *Pseudomonas putida*, y la más baja en la unidad U8 de *Micrococcus antarcticus*. La tabla 7.4.4. ilustra los valores obtenidos en cada unidad experimental (figura 7.4.4.).

**Tabla 7.4.4.** Variación de InCo/C TPHs

U1 In-Co/C	U2 In-Co/C	U3 In-Co/C	U4 In-Co/C	U5 In-Co/C	U6 In-Co/C	U7 In-Co/C	U8 In-Co/C	U9 In-Co/C
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,07	0,02	0,21	0,05	0,10	0,06	0,22	0,02	0,019
0,29	0,06	0,31	0,29	0,17	0,10	0,29	0,07	0,048
0,51	0,19	0,85	0,50	0,31	0,11	0,59	0,18	0,11
0,85	0,30	0,98	0,64	0,47	0,16	0,87	0,22	0,18

Los análisis fueron realizados por un laboratorio independiente en el transcurso de 120 días (un total de cinco análisis por muestra).



**Figura 7.4.4.** Variación de InCo/C de TPHs en el tiempo

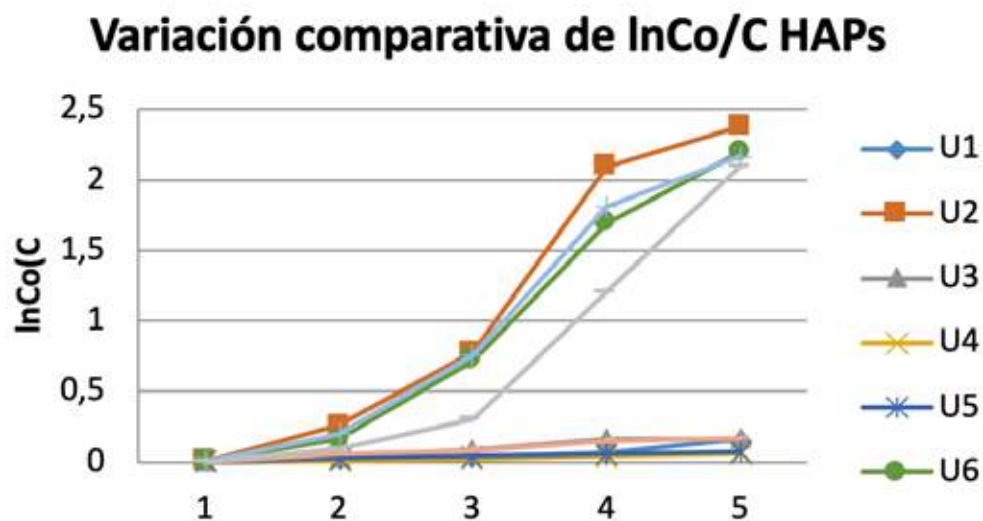
**Tasas de degradación de HAPs**

De igual forma se estableció la relación  $\ln Co/C$ , para HAPs; resultando la de mayor valor la unidad U2 de *Rhodococcus sp*, y la de menor valor la unidad U4 de *Bacillus sp*.

**Tabla 7.4.5.** Variación  $\ln Co/C$  HAPs

U1 In-Co/C	U2 In-Co/C	U3 In-Co/C	U4 In-Co/C	U5 In-Co/C	U6 In-Co/C	U7 In-Co/C	U8 In-Co/C	U9 In-Co/C
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,015	0,26	0,045	0,005	0,027	0,16	0,20	0,06	0,09
0,037	0,78	0,087	0,021	0,043	0,72	0,76	0,08	0,30
0,063	2,09	0,164	0,045	0,058	1,69	1,81	0,15	1,21
0,160	2,38	0,165	0,059	0,073	2,20	2,17	0,17	2,102

Detalles de cada unidad experimental se observan en la tabla 7.4.5 y en la figura 7.4.5. correspondiente



**Figura 7.4.5.** Variación de  $\ln Co/C$  de HAPs en el tiempo

**Tiempo de vida media**

El tiempo de vida media lo calculamos mediante la ecuación (3). Los tiempos de vida media de los hidrocarburos presentes en las muestras experimentales, son largos como era de esperarse, siendo para TPHs el valor

más alto de 821,4 días para la celda U6 de *Aspergillum niger* y el más bajo de la unidad 106,6 días de *Pseudomona sp.*

Los tiempos de vida media para HAPs son más largos, estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos experimentales y de campo, ejecutados en condiciones de campo en el Distrito Amazónico, donde la degradación de compuestos aromáticos requiere mayor tiempo (Pinos, 2010). La celda con mayor tiempo de vida media para HAPs es U<sub>5</sub> de *Clostridium perfringens* con 1916,6 días, en tanto que las de menor son U<sub>2</sub> de *Rhodococcus sp* y U<sub>6</sub> de *Aspergillum niger*, con 40,58 días respectivamente. La figura 7.4.6., ilustra la variación comparativa de los tiempos de vida media para TPHs y HAPs en cada una de las unidades experimentales.

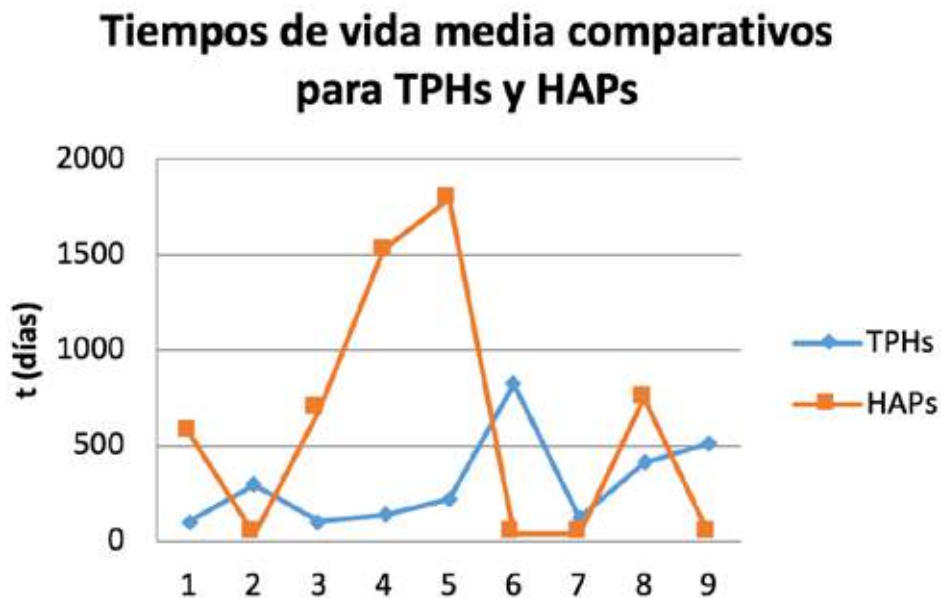


Figura 7.4.6. Tiempos de vida media de las unidades experimentales para TPHs y HAPs

**Eficiencia**

Con los resultados obtenidos en InCo/C, fue factible estimar la eficiencia de las cepas empleadas en el tratamiento de HAPs y TPHs. Para TPHs la cepa de mayor eficiencia resultó *Pseudomona putida* con 62% y la de menor *Aspergillum niger*, con el 15,40%. Para HAPs, la eficiencia cambión de cepa, *Rhodococcus* alcanzó un 90,80% de eficiencia; en tanto que la cepa *Bacillus sp*, obtuvo la menos eficiencia con el 5,76%. Ver detalles en la tabla 7.4.6.



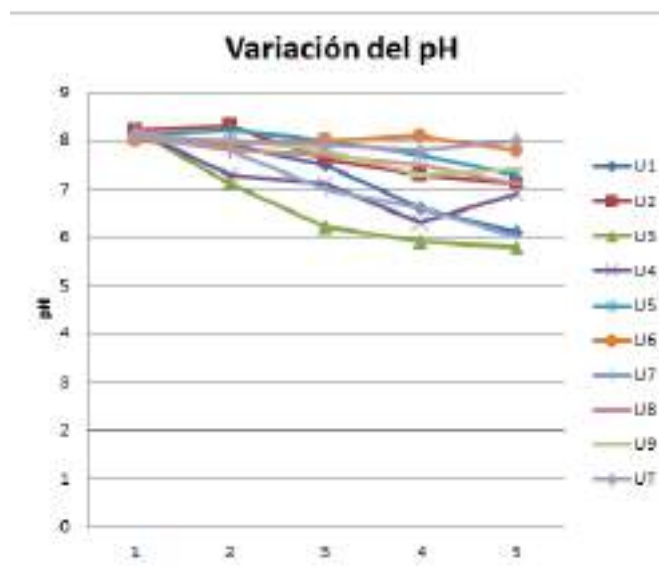
**Tabla 7.4.6.** Eficiencia comparativa en porcentaje para TPHs y HAPs

MICROORGANISMO	TPHs %	HAPs %
<i>Pseudomona</i> sp	57,60	15,29
<i>Rhodococcus</i> sp	26,00	90,80
<i>Pseudomona putida</i>	62,60	15,29
<i>Bacillus</i> sp	47,40	5,76
<i>Clostridium perfringens</i>	37,76	6,11
<i>Aspergillus niger</i>	15,40	88,94
<i>Penicillium chrysogenum</i>	58,42	88,58
<i>Micrococcus antarcticus</i>	19,96	16,47
<i>Sphingomonas</i> sp	2,60	86,82

**Control de otros parámetros de proceso**

**Temperatura**

Para todos es conocida la importancia de la temperatura en la velocidad de las reacciones bioquímicas; en este caso se crearon las condiciones de cuarto frío (4°C), para garantizar la estabilidad de una temperatura adecuada para el trabajo de las cepas antárticas.



**Figura 7.4.7.** Variación de pH comparativo

### pH

En cuanto al pH, fue necesario cada 15 días realizar una medición de este parámetro, para controlar cambios bruscos y consecuentemente problemas en el proceso de biorremediación. Las variaciones de este parámetro se pueden apreciar en la figura 7.4.7. Los datos considerados en la gráfica corresponden a las fechas de muestreo de TPHs y HAPs.

### Conductividad

La resistencia del medio es importante para el flujo de los iones y el transcurso de los procesos de óxido-reducción, que ocurren en el suelo, y para la disponibilidad de ciertos nutrientes para los microorganismos. Las variaciones de sus valores se ilustran en la tabla 7.4.7.

**Tabla 7.4.7.** Variación de la conductividad en las unidades experimentales

MICROORGANISMO	CELDA	CONDUCTIVIDAD MS/CM				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomona sp</i>	U <sub>1</sub>	0,67	0,72	0,83	0,97	1,12
<i>Rhodococcus sp</i>	U <sub>2</sub>	0,52	0,64	0,73	0,81	0,98
<i>Pseudomona putida</i>	U <sub>3</sub>	1,06	1,11	1,23	1,29	1,35
<i>Bacillus sp</i>	U <sub>4</sub>	0,64	0,72	0,87	0,91	0,76
<i>Clostridium perfringens</i>	U <sub>5</sub>	0,52	0,66	0,78	0,82	0,88
<i>Aspergillus niger</i>	U <sub>6</sub>	0,49	0,53	0,62	0,77	0,92
<i>Penicillium chrysogenum</i>	U <sub>7</sub>	0,21	0,44	0,76	0,98	1,13
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U <sub>8</sub>	0,43	0,77	0,54	0,69	0,93
<i>Sphingomonas sp</i>	U <sub>9</sub>	0,32	0,47	0,85	0,91	1,02
Testigo	U <sub>T</sub>	0,56	0,57	0,55	0,56	0,48

### Humedad

Siendo la humedad un factor limitante en condiciones antárticas, se decidió trabajar a una temperatura de 4°C, bajo la cual el agua estuviera disponible para el metabolismo microbiano. Las variaciones de la humedad pueden verse en la tabla 7.4.8. La humectación se efectuó con una solución al 0,01% de humato7plus (sales de ácidos húmicos con siete microelementos; Cu, Mn, Mo, Co, Zn, B, Fe).

**Tabla 7.4.8.** Variación de la humedad en las unidades experimentales

MICROORGANISMO	CELDA	HUMEDAD %				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomona</i> sp	U <sub>1</sub>	60	56	62	48	51
<i>Rhodococcus</i> sp	U <sub>2</sub>	60	61	53	57	54
<i>Pseudomona putida</i>	U <sub>3</sub>	60	54	56	62	57
<i>Bacillus</i> sp	U <sub>4</sub>	60	55	63	57	53
<i>Clostridium perfringens</i>	U <sub>5</sub>	60	63	41	53	44
<i>Aspergillus niger</i>	U <sub>6</sub>	60	42	47	61	47
<i>Penicillium chrysogenum</i>	U <sub>7</sub>	60	61	49	43	45
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U <sub>8</sub>	60	52	53	51	51
<i>Sphingomonas</i> sp	U <sub>9</sub>	60	59	61	63	52
Testigo	U <sub>T</sub>	60	61	62	59	58

#### 7.4.4. Discusión

##### **Tasa de crecimiento específica**

Las tasas de crecimiento específico de las cepas investigadas son bajas. Consideramos que puede ser una consecuencia propia de su metabolismo o quizá están influenciadas por las condiciones del medio y el cambio de las condiciones ambientales. Consideramos ampliar la base investigativa para definir estos aspectos.

##### **Control de UFCs**

El número de microorganismos degradadores de hidrocarburos en suelos vírgenes polares a menudo está bajo los límites de detección, mientras que  $10^5$  degradadores de hidrocarburos  $g^{-1}$  se han detectado en los suelos contaminados en las aguas superficiales y capas subsuperficiales (Aislabie et al., 2001; Rike et al., 2001).

Tomando en consideración dicha fuente, estimamos que nuestros resultados, confirman dicha abundancia, pese que en alguna de las unidades experimentales su valor es igual a  $10^6$ ; seguramente debido a las condiciones especiales que se han creado en las celdas experimentales.

**Tasa de biodegradación de TPHs y HAPs**

Si bien el género *Pseudomonas* tiende a degradar hidrocarburos alifáticos con mayor eficiencia (tal como lo demuestran sus tasas de degradación), también puede degradar una gama reducida de sustratos aromáticos, entre los cuales se incluye PCB, pireno (Erikson et al., 2002).

*Rhodococcus* según Whyte et al., (1999), produce biosurfactantes asociados a la superficie celular con actividad a bajas temperaturas, que se adhieren directamente a los alcanos sólidos a baja temperatura, permitiendo su degradación. Nuestros resultados confirman una baja tasa de degradación de TPHs para *Rhodococcus*, en tanto que los resultados obtenidos para HAPs confirman múltiples referencias de trabajos experimentales y prácticos de biodegradación de aromáticos con *Rhodococcus* en el Ecuador y el mundo (Cabrera y Gualoto, 2008; Gualoto, 2008).

*Sphingomonas* aislado en la Antártida degrada numerosos componentes de la fracción aromática del crudo, jet fuel y diesel (Baraniecki et al., 2002), también utiliza muchos compuestos aromáticos para el crecimiento, incluyendo, m-xileno naftaleno y sus derivados de metilo, fluoreno y fenantreno (Filler y Snape, 2008). En nuestro trabajo este género presenta una baja capacidad de degradación para TPHs (863ppm de 5000ppm) y una considerable capacidad para compuestos aromáticos con 738ppm de 850 ppm. Las referencias bibliográficas existentes en cuanto a las tasas de biodegradación son escasas, en consecuencia, consideramos que nuestros resultados pueden y deben ser confirmados con investigaciones más precisas en cuanto a las metodologías de análisis.

De nuestra experiencia de trabajo en el Ecuador, consideramos que la elevada tasa de degradación de HAPs, de *Aspergillus niger*, no es una novedad, por cuanto la hemos empleado en la biorremediación de sedimentos de tanques de almacenamiento de combustibles, juntamente con el género *Penicillium*; para las primeras etapas del proceso empleando como cosustratos aceites esenciales de cítricos, cuya estructura molecular es similar al de los compuestos aromáticos de los sedimentos. De esto evidencian los resultados obtenidos en nuestra investigación donde *Penicillium chrysogenum*, presenta una elevada tasa de degradación de HAPs (753 de 850ppm), en tanto que *Aspergillus niger* 756 de 850ppm.

### **Tiempos de vida media**

Los tiempos de vida media de los compuestos aromáticos son comúnmente largos debido a que muchos de sus componentes son recalcitrantes, esa ha sido la dinámica observada a lo largo de varios trabajos en Biorremediación en el Ecuador, los resultados obtenidos en la investigación Antártica, confirman esa tendencia. Según Balks Megan et al., (2002) el tiempo necesario para establecer una importante degradación de hidrocarburos en suelos de la comunidad polar después de un derrame es desconocido.

### **Control de parámetros**

La temperatura es un factor de importancia para la biorremediación, la dependencia de la velocidad sigue un valor de  $Q_{10}$ . Este valor es la relación entre la velocidad de primer orden constante a una temperatura específica para la constante de velocidad a una temperatura de 10 ° C más baja (Dellille et al., 2004).

Para nuestro caso, considerando las condiciones especiales de las pruebas, estas transcurrieron a la temperatura de 4°C de un cuarto frío, que permitió al personal operativo e investigadores desarrollar su trabajo en forma segura. Si bien en suelos templados, la degradación bacteriana de hidrocarburos tiene un óptimo alrededor de pH 7,0 a 7,8. Los suelos polares, sin embargo, puede ser altamente alcalino (Aislabie y Fiebert 2008; Aislabie et al., 1998; Whyte et al, 1998) Nuestro trabajo se desarrolló con valores de pH que variaron entre 5,8 y 7,8, aunque el pH inicial del suelo experimental vario entre 8,0 y 8,2. Los resultados obtenidos muestran que los valores de pH fueron adecuados para que se evidencie la capacidad degradadora de hidrocarburos de los microorganismos investigados en mayor o menor intensidad.

Según algunas fuentes (Baraniecki et al., 2002), *Sphingomonas* crecen de manera óptima en un medio bien tamponado con pH entre 6,0 y 7,8, a pesar de estar aislado del suelo Base Scott con pH > 9; para nuestro caso el suelo de aislamiento tubo un pH de 8,3 y su crecimiento se dio bajo pH entre 7,3 y 7,8. En cuanto a la humedad de las unidades experimentales, consideramos que la temperatura elegida para la realización de las pruebas fue adecuada para garantizar el acceso de los microorganismos al agua, algo

que bajo condiciones ambientales de la Antártida no se produce, al menos en la cantidad a la que tuvieron acceso los microorganismos investigados.

Las fuentes consultadas, nada dicen sobre la importancia de la conductividad del medio para el transcurso de la biorremediación. De nuestra experiencia en trabajos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y descontaminación de suelos agrícolas, cogimos que valores de conductividad eléctrica superiores a 1,7 mS/cm, reducen drásticamente la movilidad de iones en la solución del suelo, interrumpiendo y alterando los potenciales de membranas de las bacterias y células vegetales. Consideramos que los valores observados de conductividad fueron adecuados entre 0,58 y 1,35mS/cm.

### **Análisis estadístico**

La prueba de ANOVA. El análisis de varianza para un solo factor determina que existe diferencia significativa en la degradación de HAPs, por cuanto el P valor es menos de 0,05, siendo equivalente a P 0,005. (tabla t.4.9.). La prueba de Tukey señala que existen diferencias entre los grupos U<sub>1</sub>-U<sub>2</sub>, entre el U<sub>2</sub> y U<sub>4</sub>, U<sub>5</sub> y U<sub>8</sub>. Entre el grupo U<sub>4</sub> con U<sub>6</sub> y U<sub>7</sub>, y entre el grupo U<sub>5</sub> y U<sub>7</sub>.

### **7.4.5. Conclusiones caso cuatro**

En nuestro trabajo experimental hemos recurrido a la medición de la concentración de TPHs y HAPs, por medios analíticos estandarizados aprobados para el sector hidrocarburífero en el Ecuador, tal como se estila para trabajos de biorremediación a gran escala, las valoraciones de las pérdidas de hidrocarburos mediadas por esta metodología son confiables y constituyen parte de la documentación de la biorremediación de hidrocarburos obligada para trabajos de este tipo.

**Tabla 7.3.13** Prueba de ANOVA

Análisis de varianza de un factor		HAPs				
<b>RESUMEN</b>						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	4024	804,8	2629,7		
Columna 2	5	2072	414,4	113961		
Columna 3	5	3882	776,4	3235,3		
Columna 4	5	4140	828	443,5		
Columna 5	5	4091	818,2	444,2		
Columna 6	5	2234	446,8	111983		
Columna 7	5	2172	434,4	110433		
Columna 8	5	3870	774	3238		
Columna 9	5	2608	521,6	105309		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1374746,044	8	171843,26	3,424	0,0050	2,21
Dentro de los grupos	1806709,2	36	50186,37			
Total	3181455,244	44				

Sin embargo, consideramos que metodologías adicionales de medición pueden reconfirmar los datos obtenidos, tales como el uso de indicadores como la abundancia de bacterias, la generación de gas, la respiración  $O_2/CO_2$  (Ferguson et al, 2003a; Ferguson et al, 2003b; Walworth et al, 1997a; Walworth et al, 1997b), cambios en la relación ARN / ADN o el aumento de productos intermedios de degradación (Erikson et al., 2001; Whyte et al., 1998).

Se puede ampliar la gama de parámetros, incluyendo la mineralización, con compuestos marcados isotópicamente,  $CO_2$  y TPH, y las vías catabólicas en fase sólida utilizando micro extracción de cromatografía de gases - espectrometría de masas y la reacción en cadena de la polimerasa. Todas estas tecnologías por ahora no son reales para nosotros, pero en un futuro deberán formar parte de nuestro arsenal. Los resultados obtenidos, muestran el potencial de las cepas empleadas para la biodegradación de hidrocarburos y las posibilidades de su empleo en la remediación de zonas andinas contaminadas con hidrocarburos, donde las cepas comúnmente empleadas han mostrado incapacidad.

La eficiencia mostrada de microorganismos como *Rhodococcus*, *Penicillium* y *Aspergillum*, para degrada HAPs, confirman resultados análogos, obtenidos en trabajos en nuestro territorio y en otras partes del mundo, a nivel de laboratorio y a nivel de campo. La prueba confirmatoria de esta capacidad deberá efectuarse *in situ* en las inmediaciones de la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, donde como es natural habrá que hacerse modificaciones sustanciales en cuanto a la disponibilidad de agua y el control de parámetros de proceso.

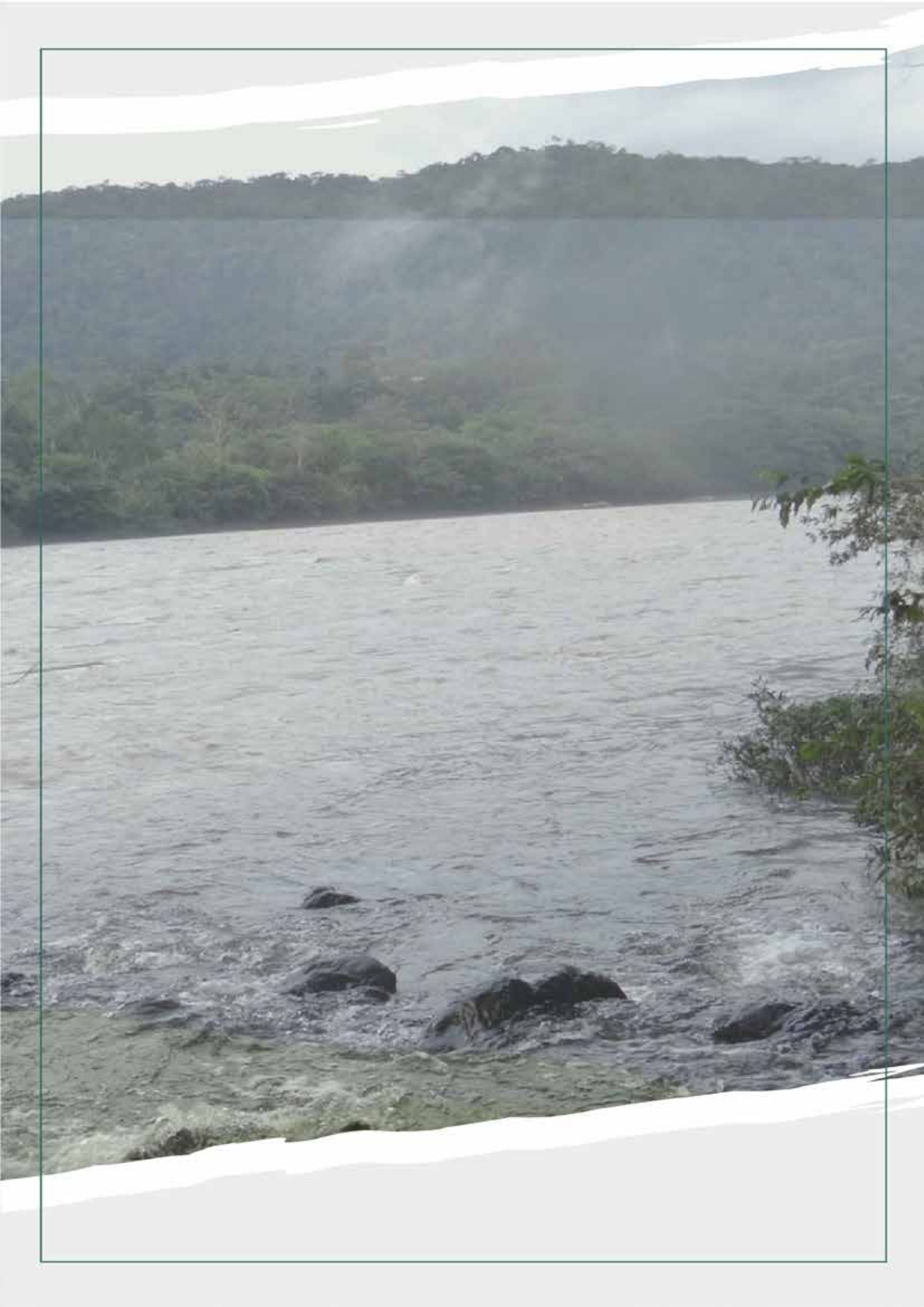
#### **7.4.6. Bibliografía**

1. Aislabie J., and Fight J. (2008). Hydrocarbon-degrading bacteria in contaminated cold soils. In *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions*, ed. Dennis M. Filler, Ian Snape, and David L. Barnes. Published by Cambridge University Press. C Cambridge University Press.
2. Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S., & Farrell, R. L. (2001). Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*, 24(5), 308-313.
3. Aislabie, J., McLeod, M. and Fraser, R. (1998). Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross dependency, Antarctica. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 210-214.
4. Arenz, B. E., Held, B. W., Jurgens, J. A., Farrell, R. L., & Blanchette, R. A. (2006). Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3057-3064.
5. Balks Megan, R., Holmes David, J., & Jackie, A. (2002). Fate and effects of hydrocarbons in antarctic soil: Preliminary results of an experimental fuel spill. In 17. World congress of soil science,, Bangkok (Thailand), 14-21 Aug 2002.
6. Baraniecki, C. A., Aislabie, J., & Foght, J. M. (2002). Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 44-54.
7. Cabrera R., Gualoto M. 2011. Tratamiento de lodos residuales industriales con tamices moleculares y cepas microbianas autóctonas. Ponceña, Congreso AEISA, Cuenca.
8. Cleveland, C. C., & Liptzin, D. (2007). C: N: P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass. *Biogeochemistry*, 85(3), 235-252.
9. Coulon, F., & Delille, D. (2003). Effects of Biostimulation on Growth of



- Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons. *Oil & gas science and technology*, 58(4), 469-479.
10. Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2000). Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation*, 8(4), 261-9.
  11. Delille, D., Coulon, F., y Pelletier, E. (2004). Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology*, 40(1-2), 61-70.
  12. Eriksson, M., Dalhammar, G., & Mohn, W. W. (2002). Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS microbiology ecology*, 40(1), 21-27.
  13. Eriksson, M., Ka, J. O., & Mohn, W. W. (2001). Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5107-5112.
  14. Ferguson, S. H., Franzmann, P. D., Revill, A. T., Snape, I., and Rayner, J. L. (2003a). The effects of nitrogen and water on mineralization of dieselcontaminated terrestrial Antarctic sediments. *Cold Reg. Sci. Technol.* 37: 197– 212.
  15. Ferguson, S. H., Franzmann, P. D., Snape, I., et al. (2003b). Effects of temperature on mineralization of petroleum in contaminated Antarctic terrestrial sediments. *Chemosphere* 52(6): 975–87.
  16. Filler, D. M., Snape, I., & Barnes, D. L. (Eds.). (2008). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons in cold regions*. Cambridge University Press.
  17. Gualoto M. (2008). Tratamiento biológico de lodos residuales aceitosos en plataforma cubierta. Ponencia, Congreso AEISA. Quito-UDLA.
  18. Liu, H., Xu, Y., Ma, Y., & Zhou, P. (2000). Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 715-719.
  19. Logan, N. A., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodríguez-Díaz, M., ... & De Vos, P. (2004). *Bacillus shackletonii* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(2), 373-376.
  20. Mac Cormack, W. P., & Fraile, E. R. (1997). Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarctic Science*, 9(2), 150-155.

21. Pinos Dueñas, A. C. (2010). Biorremediación de suelos sedimentos contaminados por el derrame de la línea del pozo Shushuqui 13 mediante la técnica de Landfarming campo libertador Sucumbíos-Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2010).
22. Rike, A. G., Børresen, M., & Instanes, A. (2001). Response of cold-adapted microbial populations in a permafrost profile to hydrocarbon contaminants. *Polar Record*, 37(202), 239-248.
23. Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: principles and applications*. McGraw-Hill Education.
24. Ruberto, L., Vázquez, S. C., Lobalbo, A., & Mac Cormack, W. P. (2004). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias antárticas sicrotolerantes. In *Actas del V Simposio Argentino y (Vol. 1)*.
25. Shivaji, S. I. S. I. N. T. H. Y., Rao, N. S., Saisree, L., Sheth, V., Reddy, G. S., & Bhargava, P. M. (1989). Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Applied and environmental microbiology*, 55(3), 767-770.
26. Whyte, L. G., Goalen, B., Hawari, J., Labbé, D., Greer, C. W., & Nahir, M. (2001). Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka, Nunavut. *Cold Regions Science and Technology*, 32(2-3), 121-132.
27. Whyte, L. G., Slagman, S. J., Pietrantonio, F., Bourbonniere, L., Koval, S. F., Lawrence, J. R., ... & Greer, C. W. (1999). Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 2961-2968.



## 7.5. Caso de estudio cinco: Tratamiento de suelos contaminados por derrame de la línea de flujo del pozo Shushuqui 13

### 7.5.1. Introducción

El presente trabajo, recoge la experiencia de biorremediación de suelos contaminados por el derrame de la línea de flujo del Pozo Shushuqui 13, en el Campo Libertador, Provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio, Parroquia Pacayacu. Latitud 0.059722 longitud -76.5831. Los trabajos se ejecutaron con la metodología de pilas de compostaje en plataforma cubierta. Se construyeron cuatro unidades experimentales cada una con seis repeticiones. Las unidades Ue1 In situ 14,25 m<sup>3</sup>, Ue2 Guarumo, con 27,08 m<sup>3</sup>, Ue3 Las Gradadas, con 22,60 m<sup>3</sup> y Ue4 Achiotillo, con 28, 18 m<sup>3</sup>.

La caracterización de los suelos a tratar mostró que la concentración de TPHs en las unidades experimentales fue de: In situ- 5.628,20ppm, Guarumo 5.937,70 ppm, Las Gradadas 64.644,80 ppm y Achiotillo con 50.628,60ppm. El tratamiento se prolongó durante 150 días, logrando el descenso de la concentración de TPHs hasta: 170,8 ppm In situ, 1.605,5 ppm Guarumo, 4.296,3 ppm, Las Gradadas y 6.148,8 ppm en Achiotillo. En los tratamientos se emplearon tamices moleculares tales como zeolitas y puzolanas, además de material estructurante como la cascarilla de arroz, que contribuyeron a mejorar las características físicas y mecánicas de los suelos y sedimentos a tratar, además de disminuir la humedad y generar condiciones aeróbicas.

En calidad de cosustrato, estimulante para el proceso de degradación de TPHs, se emplearon residuos de cítricos, materia vegetal triturada, que se adicionó mensualmente en una cantidad de 10 kg/m<sup>3</sup>. Con los residuos de cítricos, se aportó al sistema microorganismos que aportaron a la biorremediación, como *Penicillium* y *Aspergillus*. Se emplearon microorganismos aislados de los suelos y sedimentos contaminados que en pruebas de laboratorio mostraron la capacidad para degradar hidrocarburos, tales como: *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* y *Rhodococcus* sp.

La metodología empleada de compostaje en plataforma cubierta resultó eficiente para la biorremediación de suelos afectados por derrames de hidrocarburos, tomando en consideración los factores ambientales del sitio,

altas temperaturas, elevada humedad ambiental y en especial la elevada pluviosidad (más de 3.700mm/año).

### **7.5.2. Antecedentes**

A fines del 2008, el programa de Remediación ambiental y social del Ministerio del Ambiente realizó un llamamiento abierto a la academia nacional, para que presenten propuestas de remediación ambiental para aguas superficiales, subterráneas, suelos y sedimentos afectados por derrames de hidrocarburos. En respuesta a esta invitación la Universidad Técnica del Norte UTN, presentó una propuesta de biorremediación de suelos para el Campo Libertador, siendo el derrame en la línea de flujo del pozo Shushuqui 13 el asignado para la ejecución de la propuesta.

La propuesta de trabajo incluyó, el levantamiento de línea base ambiental, la caracterización del componente social y la metodología de tratamiento. Para el efecto, se plantearon varias alternativas de remediación, siendo este estudio una de las variantes implementadas.

Los trabajos fueron ejecutados por CETA (Centro de Tecnologías Ambientales), creado por el CTT (Centro de Transferencia de Tecnologías), de la Universidad Técnica del Norte. El área de total tratada fue de 6 Ha, durante 11 meses.

### **7.5.3. Objetivo General**

Tratar biológicamente suelos contaminados con hidrocarburos, mediante el empleo de cepas microbianas autóctonas, tamices moleculares y fuentes de nutrientes alternativas de bajo costo.

### **7.5.4. Objetivos Específicos**

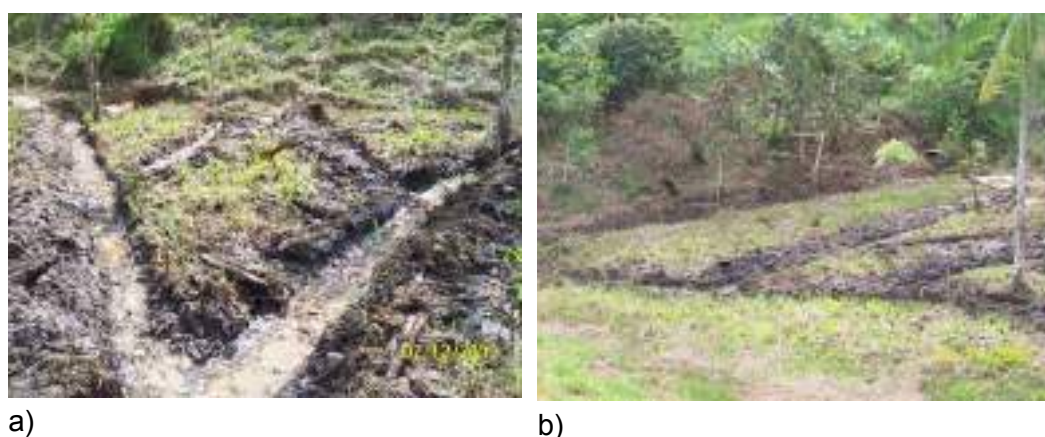
- Evaluar la técnica de Compostaje para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos procedentes del derrame de la Línea de Flujo del Pozo Shushuqui 13.
- Determinar los parámetros cinéticos del sistema de tratamiento.
- Realizar una propuesta de tratamiento global de suelos contaminados con hidrocarburos del campo Shushuqui 13.

### 7.5.5 Metodología

#### **Toma de Muestras**

Las muestras se tomaron en el Campo Shushuqui, ubicado en las coordenadas UTM: 323906 E, 1006445 N. Datum: WGS 84. Zona: 18 Sur, Elipsoide WGS 84. La superficie sujeta a remediación: 2 hectáreas.

Para la caracterización de los suelos y sedimentos tratados en las distintas unidades experimentales, se tomaron muestras compuestas a 15-30 y 60 cm de profundidad. Las muestras de la unidad experimental *In situ*, anegada, se tomaron con ayuda de un muestreador tipo “Core” (muestra no alterada), mediante la construcción de zanjas que permitieron desecar el sitio (figura 7.5.1).



a)

b)

**Figura 7.5.1.** Sistema de zanjas para desecar la zona anegada del derrame. a) zanjas, b) diseño

Las muestras de las restantes unidades experimentales se tomaron de las fosas encontradas (muestras compuestas de las paredes de las fosas a 30-70 y 1.5 m) a lo largo del estero de la zona de derrame (Figura 7.5.2.), a una distancia promedio de 250 metros de la rivera. Para la representatividad de las muestras se empleó el método de cuarteo (Reddy, 2010). La cantidad de suelos y sedimentos tomados de cada punto fue de 2 kg. Una para el laboratorio, otra para conservación como testigo en el laboratorio universitario.



Figura 7.5.2. Fosas encontradas a lo largo del estero

### **Metodología de tratamiento**

La metodología, de tratamiento fue implementada en el tratamiento de lodos residuales industriales aceitosos del sector de servicios petroleros, en el Distrito amazónico (Gualoto, 2008).

### **Estabilización**

Los suelos y sedimentos fueron estabilizados con la adición de tamices moleculares (zeolita y puzolanas), cascarilla de arroz (tabla 7.5.1.), que generaron poro y, en consecuencia, las condiciones aeróbicas necesarias para la biorremediación, además de presentar la superficie necesaria para el anidamiento de los microorganismos.

Tabla 7.5.1. Relación de materiales de estabilización

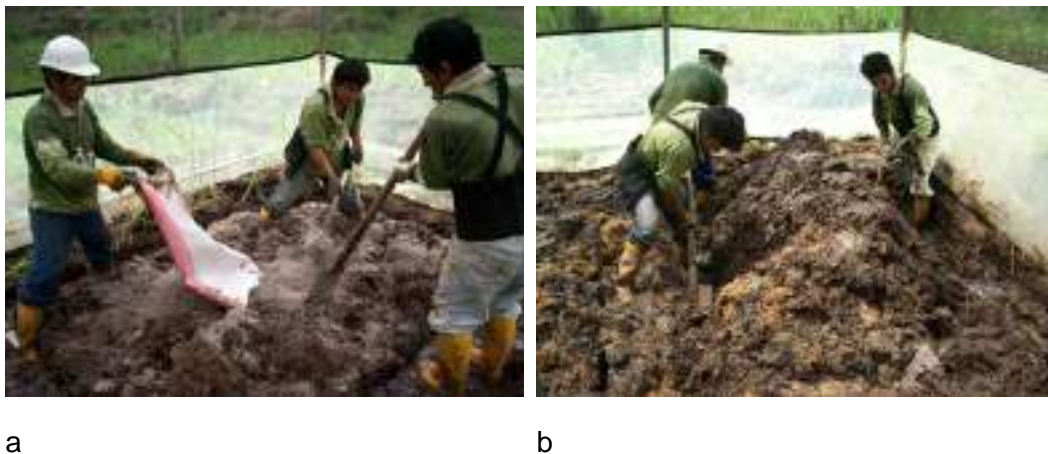
MATERIALES ESTABILIZADORES	Unidad	Unidad	Unidad	Unidad
	saco/m <sup>3</sup>	saco/m <sup>3</sup>	saco/m <sup>3</sup>	saco/m <sup>3</sup>
Zeolita*	1,5	0,5	0,75	1,0
Puzolana**	1,5	1,0	0,75	0,5
Cascarilla de arroz***	15,0 kg	30 kg	20 kg	40 kg

Dónde: \*Un saco de zeolita, 25kg, \*\*Un saco de puzolana 50kg y \*\*\* un saco de cascarilla 15kg.

### **Deshidratación y maduración**

Los suelos y sedimentos estabilizados se transportaron al interior de las unidades experimentales, para su deshidratación durante 3 semanas. Durante este tiempo ocurre un proceso que llamamos maduración, en el cual ocurren una serie de reacciones químicas, de oxidación, reducción, neutralización, adsorción, regulación del pH, quelación y el proceso de adaptación de los microorganismos presentes en los suelos y sedimentos. Indudablemente también se producen procesos de atenuación natural (evaporación), que preparan el entorno para una biodegradación masiva posterior, una vez que se hayan generado las condiciones ideales para el proceso (figura 7.5.3).

La generación de condiciones para el desarrollo microbiano, están sugeridas ampliamente por autores como Eweis y Ergas (1999).



**Figura 7.5.3.** a) Estabilización de suelos y b) sedimentos contaminados.

### **Tendido de suelos, sedimentos y conformación de pilas**

Terminada la deshidratación y maduración, los materiales fueron tendidos en pilas, dentro de las unidades experimentales (figura 7,5.4), que contaron con impermeabilización de la base con geomembrana. Un tanque de recolección de lixiviados y un espacio para la acumulación de materia orgánica en calidad de cosustrato (tabla 7.5.2).





**Figura 7.5.4.** Conformación de pilas. a) Tendido de material deshidratado b) construcción de pilas dentro de las unidades experimentales

**Tabla 7.5.2.** Unidades experimentales dimensiones y volumen de suelos

Unidad experimental	Nombre	Dimensiones	Área m <sup>2</sup>	Volumen m <sup>3</sup>
Ue1	In situ	14 x 4	60	14,25
Ue2	Guarumo	17 x 7	119	27,08
Ue3	Las Gradass	15 x 7	105	22,60
Ue4	Achiotillo	15 x 7	105	28,18
TOTAL				87,11

### **Adición de nutrientes**

En cada unidad experimental y en consecuencia en cada porción (experimento y sus repeticiones) se adicionó 10 kg de materia orgánica por cada metro cúbico de suelos contaminados (figura 7.5.5).



**Figura 7.5.5.** Preparación de materia orgánica para su adicción a las unidades experimentales.

### **Aislamiento e identificación de microorganismos**

El aislamiento de microorganismos fue ejecutado tomando 1g de cada muestra y disolviendo en 2ml de agua salina (figura 7.5.6). A partir de esta suspensión inicial, se procedió a la siembra mediante la técnica de diluciones sucesivas.



**Fotos 7.5.6.** Aislamiento de microorganismos, en laboratorio de campo Pacayacu.

Una vez seleccionada la diversidad morfológica, se procedió a la obtención de cultivos puros, mediante siembras sucesivas en placa mediante la técnica de agotamiento de estría. Seguidamente se sometieron a pruebas de turbiedad (Cappuccino and Welsh 2018), en medio mineral (Bushnell Haas Broth – Himedia) y como fuente única de carbono se empleó crudo recuperado de la zona de derrame. Las muestras que presentaron turbiedad fueron consideradas positivas. La identificación de las cepas se efectuó con ayuda del sistema Identificación de BNNF Biochemical ID systems (Microgen).

### **Adición del Pool Microbiano**

En cada unidad experimental se adicionó el Pool Microbiano obtenido del aislamiento *In Situ* de microorganismos autóctonos presentes en los suelos y sedimentos contaminados del sector.

Cada unidad experimental recibió un tanque de 55 galones de pool por cuatro ocasiones:

- Sábado 16 de enero de 2010
- Lunes 1 de febrero de 2010
- Viernes 26 de febrero de 2010
- Sábado 27 de marzo de 2010

Para las condiciones de campo, es necesario emplear un medio de propagación de bajo costo compuesto de: Un extracto de suelos contaminados esterilizados, una fuente de carbono temporal; melaza, almidón de trigo y maíz, a más de sales de ácidos húmicos y fúlvicos de Na y K (Humatos), que aportan microelementos necesarios para la activación de los sistemas enzimáticos microbianos Cu, Mn, Co, B, Fe, Zn, Mo (Humato 7 plus; producto empleado en actividades florícolas en calidad de abono foliar).

Para la aplicación se empleó un sistema de riego por gravedad, el personal empleó un equipo de seguridad impermeable que lo aisló del medio exterior y garantizó su protección personal, siguiendo las Normas de Bioseguridad personal y ambiental.

### **Control de parámetros**

Humedad de los suelos en tratamiento, se efectuó cada 72 h. Este parámetro se midió con ayuda de una retorta para cortes de perforación de 50g de capacidad, en la cual se evapora de la muestra toda el agua contenida, que se condensa y recoge en un recipiente graduado, que permite medir el volumen del agua presente en porcentaje (Schlumberger), figura 7.5.7.



**Figura 7.5.7.** Retorta para lodos

### **Temperatura**

La temperatura de las celdas en tratamiento se midió con ayuda de termómetros de varilla bimetálico. Estos termómetros bimetálicos, con sonda de penetración de fácil uso y alta resistencia. El vástago de acero inoxidable de Ø6.35mm x 300mm, con un visor acrílico transparente y una tuerca de ajuste de la calibración en la parte trasera del dial. La medición se efectuó cada 72 horas.

### **Conductividad y pH**

Estos dos parámetros fueron monitoreados cada 72h con ayuda de un equipo portátil Metrohm 910 (figura 7.5.8).



**Figura 7.5.8.** Preparación del medio de propagación y aplicación del consorcio microbiano a las unidades experimentales.

**Conteo de microorganismos**

Se monitoreó mediante siembras en medio sólido (Agar nutritivo) en placa, semanalmente (Pepper y Gerba, 2005).

**7.5.6 Resultados y discusión caso cinco**

Los resultados de la caracterización inicial se observan en la tabla 7.5.3.

**Tabla 7.5.3.** Caracterización de suelos inicial

Parámetros	TPH's (mg/kg)	HAP's (mg/kg)	PLOMO (mg/kg)	NIQUEL (mg/kg)	CADMIO (mg/kg)
LIMITES PERMISIBLES	<2500	<2	<100	<50	<2
UE#1 <i>in situ</i>	5268.2	2.9	<8.80	<1.60	<0.30
UE#2 GUA-RUMO	5937.7	2.08	17.83	<1.60	<0.30
UE#3 LAS	64644.8	67.69	18.43	<1.60	<0.30
UE#4 ACHIOTILLO	50628.6	11.81	21.44	<1.60	<0.30

Los análisis se ejecutaron en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Minas y Petróleos de la Universidad Central del Ecuador. La identificación de los microorganismos generó los resultados que se muestran en la tabla 7.5.4.

**Tabla 7.5.4.** Identificación de microorganismos

Taxonomía	A	B	C	D
Dominio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria
Clase	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Bacilli	Actinomycetes
Orden	Pseudomonadales	Pseudomonadales	Bacillales	Corynebacteri- neae
Familia	Pseudomonadaceae	Pseudomonada- ceae	Bacillaceae	Nocardiaceae
Género	Pseudomonas	Pseudomonas	Bacillus	Rhodococcus
Especie	<i>P. sp</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. cereus</i>	<i>R. sp</i>

**Determinación de  $\mu$  de crecimiento microbiano en las unidades experimentales.**

Para calcular este parámetro se realizó el conteo a las 4h de la siembra y a las 24 h. Los conteos se muestran en la tabla 7.5.5. Las tasas de crecimiento se muestran en la tabla 7.5.6.

**Tabla 7.5.5.** Conteo inicial de UFCs en las unidades experimentales

Fecha	U1 - In Situ		U2 - Guarumo		U3 - Las Gradass		U4 - Ashotillo	
	UFC	ln	UFC	ln	UFC	ln	UFC	ln
UFC Inicial	350	5,85	321	5,77	380	5,94	297	5,69
23/12/2009	899864,97	13,7	646934,28	13,3	237993,82	12,1	729416,36	13,5

$$\mu = \frac{\ln N2 - \ln N1}{t2 - t1}$$

**Tabla 7.5.6.** Valores de tasa de crecimiento

UNIDAD	$\mu$
U1	0,39/h
U2	0,38/h
U3	0,32/h
U4	0,30/h

Como era de esperarse, los valores de las tasas de crecimiento microbiano de las cuatro unidades experimentales son cercanos, por cuanto en todas se emplea el mismo consorcio microbiano.

La tabla 7.5.7, recoge los datos del conteo de UFCs, en base a los cuales se trazaron las curvas de crecimiento (figura 7.5.9).

**Tabla 7.5.7.** Conteo de UFCs

Fecha	U <sub>1</sub>		U <sub>2</sub>		U <sub>3</sub>		U <sub>4</sub>	
	UFCs	ln	UFCs	ln	UFCs	ln	UFCs	ln
UFC <sub>i</sub>	350	5,58	321	5,77	380	5,94	297	5,69
23/12/2009	8,9.10 <sup>5</sup>	13,71	6,4.10 <sup>5</sup>	13,38	2,3.10 <sup>5</sup>	12,19	8,9.10 <sup>5</sup>	13,50
03/03/2010	6,1.10 <sup>5</sup>	13,33	5,6.10 <sup>5</sup>	13,24	6,0.10 <sup>5</sup>	13,31	8,9.10 <sup>5</sup>	12,59
07/04/2010	6,4.10 <sup>5</sup>	13,38	3,6.10 <sup>5</sup>	12,80	5,6.10 <sup>5</sup>	13,24	8,9.10 <sup>5</sup>	13,76
04/05/2010	6,9.10 <sup>5</sup>	13,45	2,9.10 <sup>5</sup>	12,58	13,3.10 <sup>5</sup>	14,1	8,9.10 <sup>5</sup>	13,02

Para normalizar las curvas recurrimos a los valores logarítmicos.

En todas las unidades experimentales se logró una curva de crecimiento cercana a la ideal, muestra de eso son los valores de descenso de la concentración de TPHs en cada unidad experimental (figura 7.5.9).

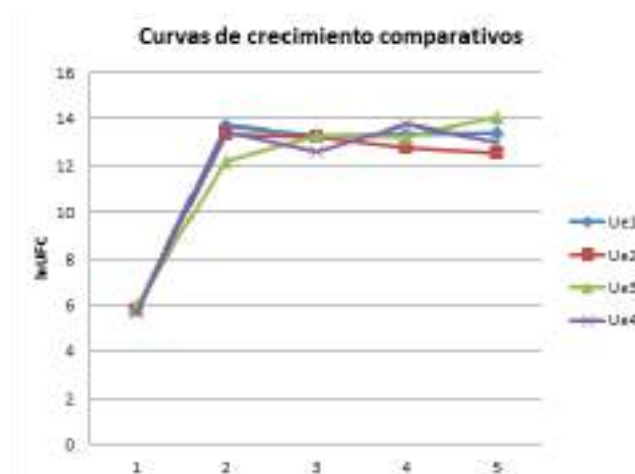


Figura 7.5.9. Curvas de crecimiento

**Disminución de la concentración de TPHs.**

Los resultados recibidos del laboratorio ambiental certificado de la Universidad Central del Ecuador se muestran en las tablas 7.5.8, 7.5.9; 7.5.10 y 7.5.11. Los análisis fueron ejecutados por un laboratorio independiente, por cuanto; al ser los ejecutores de la remediación; somos juez y parte; algo no permitido por el marco jurídico del Ecuador.

**Tabla 7.5.8.** Resultados de análisis de la unidad In situ

Parámetros	IN SITU			
	(ppm)			
	1	2	3	4
TPHs	5268,2	2709,09	1700,8	822,2
HAP's	2,9	0,37	0,01	0,01
Plomo	8,8	8,8	8,8	8,8
Níquel	1,6	3,3	3,51	1,86
Cadmio	0,3	0,3	0,3	0,3



**Tabla 7.5.9.** Resultados de análisis de la unidad Guarumos

Parámetros	GUARUMO			
	(ppm)			
	1	2	3	4
TPHs	5937,7	3464,38	2263,7	1605,5
HAP's	2,08	0,48	0,48	0,01
Plomo	17,83	10,18	8,8	5,3
Níquel	1,6	3,3	2,66	2,04
Cadmio	0,3	0,3	0,3	0,3

**Tabla 7.5.10.** Resultados de análisis de la unidad las Gradass

Parámetros	LAS GRADAS			
	(ppm)			
	1	2	3	4
TPHs	64644,8	4994,1	4571,8	4296,30
HAP's	67,69	4,65	0,27	0,02
Plomo	18,43	11,12	10,13	6,3
Níquel	1,6	1,6	1,6	1,6
Cadmio	0,3	0,3	0,3	0,3

**Tabla 7.5.11.** Resultados de análisis de la unidad Achotillo

Parámetros	ACHOTILLO			
	(ppm)			
	1	2	3	4
TPHs	50628,6	8818,95	8050,3	6148,80
HAP's	11,81	0,41	0,01	0,01
Plomo	21,44	8,8	8,8	8,8
Níquel	1,6	4,3	2,96	1,97
Cadmio	0,3	0,3	0,3	0,3

En todas las unidades se observa un descenso en la concentración de los TPHs, siendo esta más pronunciada en las celdas de Las Gradass y Achiotillos cuyas concentraciones iniciales fueron de 64.644,8 y 50.628,6ppm respectivamente (figura 7.35.). La figura 7.5.10, se muestra las curvas de descenso comparativo de la concentración de TPHs en todas las unidades experimentales.

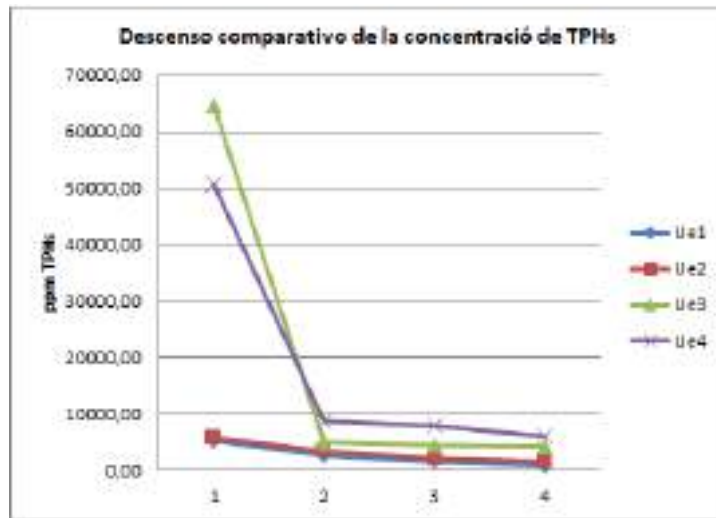


Figura 7.5.10. Descenso de la concentración de TPHs comparativo

Algo similar ocurre con la concentración de HAPs (figura 7.5.11), en todas las unidades experimentales, hasta niveles inferiores a los establecidos en la normativa ambiental del ramo 1215 del RAHOE (>2ppm).

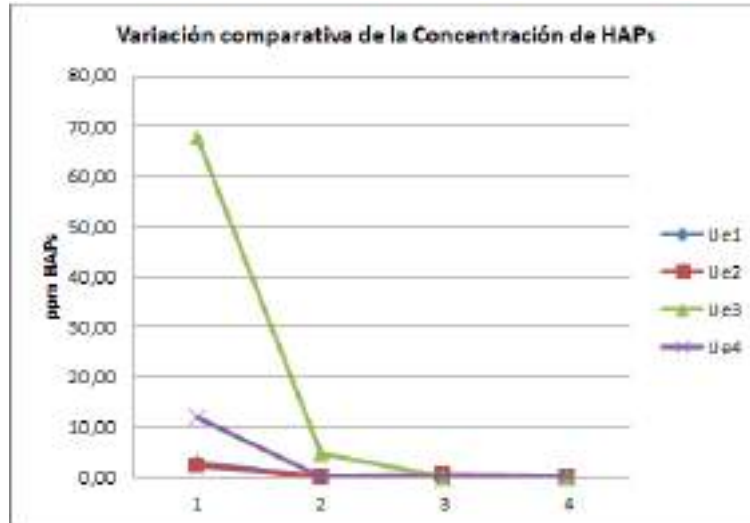


Figura 7.5.11. Descenso de la concentración de HAPs comparativo

Para evidenciar la correspondencia de la curva de crecimiento con la curva de degradación, se construye una gráfica donde ambas curvas mantienen una relación inversamente proporcional. A manera de ejemplo se muestra la gráfica de la Unidad Las Gradadas (figura 7.5.12).

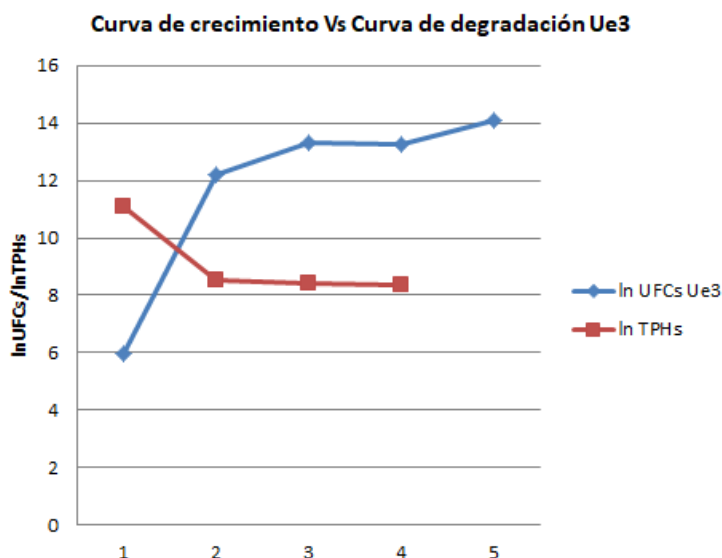


Figura 7.5.12. Curva de crecimiento Vs curva de degradación de TPHs

El género *Pseudomonas* es capaz de degradar hidrocarburos aromáticos y alifáticos en porcentajes de hasta un 37% (Chebbi et al., 2017). En el estudio de Ramadass et al., (2018), se logra degradar hidrocarburos presentes en suelos en concentraciones equivalentes a 39.000–41.000 ppm TPHs, con excelentes resultados. Este y otros trabajos confirman la capacidad de *Pseudomonas* para degradar hidrocarburos y confirman los resultados.

Con relación a *Bacillus cereus*, el estudio de Gao et al., (2018), muestra porcentajes de degradación de hidrocarburos del 12% en el día 40; valores que se incrementan a partir del día 41 al día 80, hasta el 27, en condiciones de laboratorio. De igual forma el estudio de Bibi et al., (2018), muestra un porcentaje de degradación de hidrocarburos por parte de *Bacillus cereus*, en pruebas que emplearon suelos contaminados con 1000ppm de TPHs, hasta 82.29%. De igual forma, Chaudhary et al., (2018), muestra para *Rhodococcus sp*, una eficiencia de degradación de hidrocarburos equivalente a 84% con una concentración inicial de 1500 ppm TPHs, en pruebas de laboratorio.

### Constante de degradación

Los valores encontrados, muestran que las tasas de degradación son pequeñas (tabla 7.5.12), siendo la unidad *in situ* la que presenta la mejor tasa

de degradación. Esto puede explicarse por el hecho de que los suelos de esta unidad fueron evacuados de la zona anegada, donde la concentración de TPHs fue baja (por su baja solubilidad en el agua), en comparación con las unidades Las Gradadas y Achiotillo.

**Tabla 7.5.12.** Valores de la constante de degradación comparativos

Unidad	K ppm/día
<i>In situ</i>	0,0209
Guarumos	0,0058
Las Gradadas	0,0011
Achiotillo	0,0027

**Tiempos de vida media**

$$t = \frac{-1}{k * \ln \left( \frac{C_0}{C} \right)}$$

El tiempo de vida media de la unidad *in situ* es de 13,96 días, en tal virtud para reducir la concentración de TPHs, hasta los límites establecidos en el marco legal; de esta unidad se requieren 2,3 meses (tabla 7.5.13). Para la unidad Guarumos es de 131,22 días, siendo necesarios un total de 8,7 meses. Para la unidad las gradadas, se obtuvo un tiempo de vida media de 323,5 días; para un total de 4,4 años, en tanto que para Achiotillo 173,6 días; para un tiempo total de tratamiento de 2,4 años.

**Tabla 7.5.13.** Valores de vida media comparativos

Unidad	t-días
<i>In situ</i>	13,92
Guarumos	131,22
Las Gradadas	323,50
Achiotillo	173,60

**Eficiencia**

Los cálculos muestran que todas las unidades experimentales, muestran un alto porcentaje de eficiencia para el tratamiento de TPHs (Tabla 7.5.14), mediante la técnica de compostaje, siendo la U<sub>1</sub> la mejor con, el 97,8% y la de menor eficiencia la U<sub>2</sub>, con 72,9%.

**Tabla 7.5.14.** Valores de eficiencia en porcentaje

Unidad	Cf * 100/Ci	%
Ue <sub>1</sub> In situ	3,24	96,76
Ue <sub>2</sub> Guarumo	27,10	72,96
Ue <sub>3</sub> Las Gradadas	6,65	93,35
Ue <sub>4</sub> Achiotillo	12,14	87,86

**Metales pesados**

Los análisis muestran que las muestras no presentan problemas con metales pesados, por cuanto los límites establecidos en la legislación 1215 del RAHOE, para el Pb, Ni y Cd; son 100, 50 y 2 ppm respectivamente (tabla 7.5.15).

**Tabla 7.5.15.** Resultados del análisis de metales pesados

Pb ppm				Norma
I	II	III	IV	100
8,8	17,83	18,43	8,8	
8,8	10,18	11,12	8,8	
8,8	8,8	10,13	8,8	
8,8	5,3	6,3	8,8	
Ni ppm				50
1,6	1,6	1,6	1,6	
3,3	3,3	1,6	4,3	
3,51	2,66	1,6	2,96	
1,86	2,04	1,6	1,97	
Cd ppm				2
0,3	0,3	0,3	0,3	
0,3	0,3	0,3	0,3	
0,3	0,3	0,3	0,3	
0,3	0,3	0,3	0,3	

Sin embargo, para el Pb, las pruebas resultan eficientes, por cuanto disminuyen su concentración en el suelo (figura 7.5.13). Con relación al Ni, el comportamiento es irregular, algo que probablemente se deben a errores de análisis. Con el Cd, no se observaron cambios, su valor 0,3 ppm fue constante durante toda la investigación.

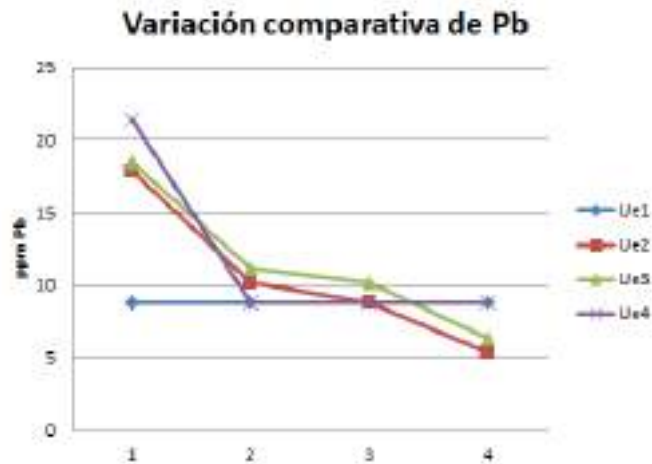


Figura 7.5.13. Variación de la concentración de Pb, comparativo

### 7.5.7. Conclusiones y recomendaciones caso cinco

Los resultados obtenidos en el estudio, nos permite afirmar que la metodología empleada fue adecuada para la biorremediación de los suelos de la línea de flujo del pozo Shushuqui 13.

Los parámetros cinéticos del sistema de tratamiento muestran altas tasa de crecimiento y de degradación de hidrocarburos, en todas las variantes, factor que atestigua en favor de la idoneidad de la metodología y los microorganismos empleados.

Los resultados obtenidos, permitieron generar una propuesta integral de biorremediación de suelos, para el PRAS-MAE, la misma que se ejecutó en 11 meses y permitió remediar cerca de seis Ha.

No existen estudios reales de campo a gran escala, cuyos resultados puedan ser comparados con los nuestros. La mayoría de las referencias son de laboratorio a escala de mesocosmos.

Se recomienda incrementar la cantidad de tamices moleculares, para obtener mejores tasas de estabilización, considerando que esta estabilización es condición fundamental para la biorremediación.

### 7.5.8 Bibliografía

1. Bibi, N., Hamayun, M., Khan, S. A., Iqbal, A., Islam, B., Shah, F., ... & Lee, I. J. (2018). Anthracene biodegradation capacity of newly isolated rhizospheric bacteria *Bacillus cereus* S13. *PloS one*, 13(8), e0201620.
2. Cappuccino J. and Welsh C. (2018). *Microbiology a Laboratory Manual*. Eleventh edition. Pearson Education Limited. Malaysia.
3. Chaudhary, D. K., Jeong, S. W., & Kim, J. (2018). Oil-degrading properties of a psychrotolerant bacterial strain, *Rhodococcus* sp. Y2-2, in liquid and soil media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 1-11.
4. Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., ... & Chamkha, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122, 128-140.
5. Eweis B., Ergas J. y otros. *Principios de Biorrecuperación*. Editorial Mc Graw Hill. Madrid 1999. Páginas 73 – 103.
6. Gao, Y. C., Guo, S. H., Wang, J. N., Zhang, W., Chen, G. H., Wang, H., ... & Naidu, R. (2018). Novel *Bacillus cereus* strain from electrokinetically remediated saline soil towards the remediation of crude oil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(26), 26351-26360.
7. Gualoto M. (2008). Tratamiento biológico de lodos residuales aceitosos en plataforma cubierta. Ponencia, Congreso AEISA., Quito-UDLA.
8. Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2015). *Aeromicrobiology*. In *Environmental Microbiology* (pp. 89-110). Academic Press.
9. Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of the Total Environment*, 636, 968-974.
10. Reddy, R. N. (2010). *Soil Engineering: Testing, Design and Remediation*. Gene-Tech Books.







## 7.6 Estudio de caso seis: Biorremediación de residuos de Hidrocarburos de piscinas de residuos de hidrocarburos de TECP-Ecuador

### 7.6.1. Antecedentes

A petición de la empresa TECP-Ecuador, en el año 2003; el departamento de proyectos ambientales de Oil Energy, realizó una visita técnica a las instalaciones de la empresa en el Campo Bermejo, con el propósito de evaluar la posibilidad de ejecutar un trabajo de biorremediación a los residuos de los procesos de producción de tanques de almacenamiento de combustibles almacenados en las piscinas. La piscina de la cual se tomaron las muestras tenía una capacidad de almacenamiento de 70 m<sup>3</sup>.

En la piscina durante años se dispusieron residuos de combustibles gastados (JP1, diésel y gasolina), restos de derrames de crudo, asfaltos, materia orgánica y suelo contaminado. Con frecuencia se encontraron filtros de combustibles, fragmentos de mangueras, guantes y otros materiales de uso por parte del personal de la empresa.

Las muestras, se tomaron con un muestreador diseñado por nuestro equipo, que permitió tomar muestras de la parte superficial, media y profunda. En concordancia con la cadena de custodia diseñada para el efecto, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Metalurgia extractiva de la Escuela Politécnica Nacional del Ecuador, donde se efectuaron las pruebas de tratabilidad de este tipo de residuos.

El informe final, fue entregado a la empresa TECP-Ecuador para su análisis y sanción. La degradación de hidrocarburos al igual que otros residuos, en especial los poliaromáticos considerados peligrosos, requiere un tratamiento efectivo de alta eficiencia y bajo costo, una de estas metodologías, es la biorremediación (La Grega et al., 1998) y (Henry y Heinke, 1999) en virtud de estas afirmaciones, nos planteamos la necesidad de evaluar la posibilidad de biodegradar los residuos hidrocarbúricos de las piscinas de TECP-Ecuador del campo Bermejo, con ayuda de microorganismos autóctonos.

### 7.6.2. Objetivo general caso seis

Evaluar la posibilidad de biodegradar residuos de piscinas de hidrocarburos, con microorganismos autóctonos.

### 7.6.3. Objetivos específicos caso seis

- Obtener un consorcio microbiano aislado de los residuos, con capacidad para degradarlos.
- Determinar los parámetros cinéticos del proceso

### 7.6.4. Metodología

- A) Toma de muestras y conservación.** Las muestras de residuos de hidrocarburos de las piscinas, se tomó con ayuda de un muestreador de acero inoxidable, con una capacidad de 1,5 litros, de cierre mecánico, diseñado por nuestro equipo. Tomando en cuenta las dimensiones de la piscina (8 x 4 x 2,2), se tomaron 12 muestras, 4 de superficie (30cm), 4 de parte medio (90 cm) y 4 de profundidad (1,8 m.). Las muestras se mezclaron y homogenizaron y de ellas se tomaron dos de cinco kg, Adicionalmente se tomaron muestras de suelo impregnado de crudo de las paredes de la piscina, un total de 10, a partir de las cuales se obtuvieron dos muestras compuestas de cinco. Las muestras fueron transportadas con refrigeración (4-6°C).
- B) Siembra de microorganismos.** Las muestras se homogenizaron y de cada una se tomaron 10 g (suelos); así como también 10 mL (líquidas). Las alícuotas se disolvieron en agua destilada y se procedió con la siembra mediante la técnica de diluciones, en medio sólido de agar nutritivo (Difco), por duplicado. Las muestras se cultivaron durante 48 horas bajo 27°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se efectuó el conteo de UFCs de las placas y con la identificación de la diversidad morfológica de colonias, así como la prueba de gram para las colonias seleccionadas.
- C) Obtención de cultivos puros.** Esta fase se cumplió mediante siembras consecutivas mediante la técnica de agotamiento de es-

tría, una vez obtenida la conformación microscópica de la pureza de la cepa, se procedió a su multiplicación en medio LB (Difco).

**D) Diseño de las pruebas.** Se empleó una muestra líquida homogeneizada con tres repeticiones y una muestra sólida con tres repeticiones, para un total de 8 unidades experimentales (2 testigos). Las pruebas de degradación se efectuaron durante 45 días (Ver diseño experimental tabla 7.6.1).

**Tabla 7.6.1.** Diseño experimental

Muestras líquidas			Muestras sólidas		
UI1	UI.2	UI.3	Us.1	Us.2	Us.3
Testigo			Testigo		

Las unidades experimentales contuvieron: 10L de residuos hidrocarbúrfiro, 150ml de consorcio microbiano con una concentración de  $0,8 \times 10^6$  según McFarland 200 g de BIOSOIL<sup>39</sup> y 100ml de medio Buchnell Haas Broth, en calidad de fuente de microelementos.

Las unidades experimentales en medio sólido: 10Kg de suelos, 300ml de consorcio microbiano, 350g de BIOSOIL, 100 ml de medio Buchnell Haas Broth. Las muestras líquidas se incubaron con agitación y las muestras sólidas se mezclaron periódicamente cada cinco días.

**E) Análisis de hidrocarburos.** El análisis de la concentración residual de hidrocarburos se realizó en un laboratorio certificado ambiental (Gruntec), en conformidad con la metodología de análisis especificada en la normativa ambiental vigente del Ecuador.

**F) Control de parámetros de proceso.** Los parámetros de proceso se monitorearon durante los 45 días del tratamiento, cada cinco días. Los parámetros monitoreados fueron: T, pH, conductividad y humedad.

<sup>39</sup> BIOSOIL, mezcla de tamices moleculares diseñada para el tratamiento de cortes y ripios de perforación.

- G) Determinación de parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos determinados fueron: Tasa de crecimiento microbiano ( $\mu$ ), Tasa de degradación ( $k$ ), Tiempo de vida media ( $t$ ) y eficiencia en porcentaje ( $Y$ ) (Eweis et al., 1999). Las fórmulas empleadas fueron:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (1) \text{ Tasa de crecimiento}$$

$$\frac{\ln C_0}{c} = \frac{m_{Max} \cdot B_0}{Y \cdot t} = kt \quad (2) \text{ Tasa de degradación (Rittmann y Garralda, 2001)}$$

$$K = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} \quad (3) \text{ Pendiente}$$

$$t = \frac{-1}{k \cdot \ln \left( \frac{C_0}{C} \right)} \quad (4) \text{ Tiempo de vida media}$$

$$Y = C_f \cdot 100 / C_0 \quad (5) \text{ Eficiencia}$$

- H) **Determinación de metales pesados.** Para el efecto se enviarán muestras de los residuos en tratamiento al laboratorio GRUNTEC, para su medición, mediante adsorción atómica.

### 7.6.5 Resultados y discusión caso seis

#### A) Cepas identificadas

Las cepas seleccionadas (tabla 7.6.2), fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, de hidrólisis de hipurato, oxidasa, peroxidasa,  $\beta$  galactosidasa, ureasa, Indol, nitratos, fermentación de azúcares, nitritos, hidrólisis de gelatina, descarboxilasas, lipasa, utilización de citrato, utilización de Malonato, rojo de metilo, Voges-Proskauer (Bergey's 1994).

**Tabla 7.6.2.** Identificación taxonómica de los microorganismos empleados

Taxonomía	X1	X7	X8	X11
Dominio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria
Clase	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Bacilli	Streptomycetales
Orden	Pseudomonadales	Pseudomonadales	Bacillales	Streptomyce- neae
Familia	Pseudomonada- ceae	Pseudomonadaceae	Bacillaceae	Streptomyceta- ceae
Género	Pseudomonas	Pseudomonas	Bacillus	Streptomyces
Especie	<i>P. sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. sp</i>

La capacidad de *Streptomyces* spp, para degradar hidrocarburos es mencionada (Baoune et al., 2018; Pérez et al., 2010)

En el estudio de Kim et al., (2000), se confirma la capacidad del género *Bacillus* y en especial de *Bacillus subtilis* degradar hidrocarburos presentes en el agua marina. Por otro lado, Nwaogu et al., (2008) y el estudio de Mukherjee and Bordoloi (2012), muestran el empleo de cepas de *Bacillus* en la degradación de hidrocarburos tanto del agua como del suelo. Una cepa de *Pseudomona aeruginosa*, aislada de la rizosfera de una leguminosa, fue empleada para el tratamiento de un derrame de hidrocarburos en el suelo (Mayz y Manzi. 2017), con una eficiencia de degradación del 66, 70 y 95% en 45 días. De igual forma Gao et al., (2017), muestran la capacidad de *Pseudomona aeruginosa* para degradar asfaltenos en medio mineral.

Avalos y Padilla (2015), observaron la degradación de petróleo Diesel-2 en agua de mar por *P. aeruginosa* en 5 días a condiciones de laboratorio. Palleroni et al., (2010) señalan sobre el uso de un consorcio microbiano integrado por *P. aeruginosa* en la degradación de hidrocarburos. La cepa *Pseudomona* sp. Es una de las cepas más utilizadas en biorremediación de hidrocarburos (Kumar et al., 2008; Prabhu y Phale, 2003), en especial de hidrocarburos alcanos y mono aromáticos (Salleh et al., 2003). El estudio de Bracho et al., (2008), señala la capacidad de *Pseudomonas stutzeri*, para crecer en presencia de dibenzotiofeno y degradarlo con fuentes adicionales de nitrógeno y fósforo.

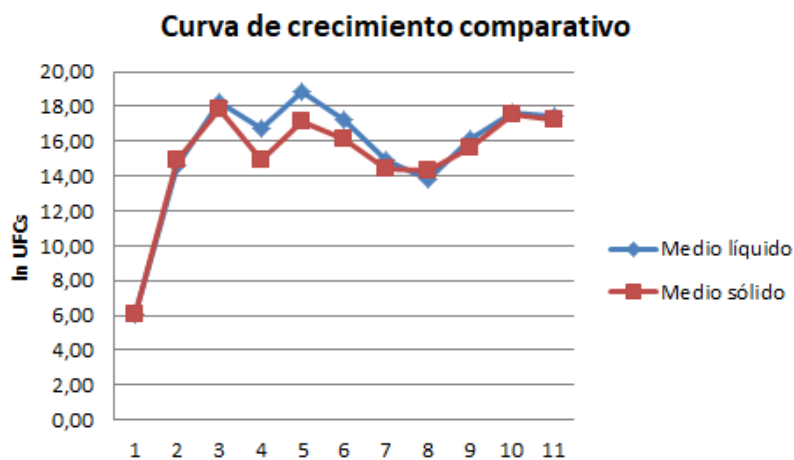
**B) Conteo microbiano**

El conteo de UFCs, en las unidades experimentales (tabla 7.6.3), se realizó por 10 veces desde el 15 de junio del 2003 hasta el 15 de julio del 2003, con los siguientes resultados.

**Tabla 7.6.3.** Ln de UFCs de las unidades experimentales

No	Ln Uel.1	Ln Uel.2	Ln Uel.3	Ln UeS.1	Ln UeS.2	Ln UeS.3	Fecha
0	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	4 h
1	14,5	14,5	14,8	14,9	15,0	14,9	15/06/03
2	19,5	20,2	14,9	14,8	19,5	19,1	20/06/03
3	18,1	16,8	15,2	14,9	15,2	14,6	24/06/03
4	16,0	19,8	20,8	15,9	20,4	15,2	26/06/03
5	14,9	20,4	16,4	15,6	19,8	13,1	28/06/03
6	15,2	13,7	15,9	15,4	14,7	13,1	02/07/03
7	13,8	12,9	14,8	14,8	14,8	13,3	04/07/03
8	13,1	17,2	17,9	15,4	17,7	13,7	09/07/03
9	17,3	17,2	18,4	18,4	17,7	16,6	11/07/03
10	17,9	16,3	18,1	17,7	17,9	16,0	15/07/03

Las curvas de crecimiento trazadas a partir de estos datos, muestran una configuración similar, tal como se observa en la figura 7.6.1.



**Figura 7.6.1.** Curvas de crecimiento promedio, en medio líquido y sólido

La tasa de crecimiento del consorcio empleado en medio líquido fue de:  $\mu=0,19/h$ .

En tanto que la tasa de crecimiento del consorcio en medio sólido:  $\mu=0,20/h$ . Estos valores son sustancialmente inferiores en comparación a los valores sugeridos en fuentes bibliográficas confiables determinan tasa de crecimiento bacteriano máximas de 0.514/h para el género *Pseudomona* en medio sintético (Bracho et al., 2004).

El estudio de Jiménez-Delgadillo et al., (2018), presenta un valor de  $\mu=0,808$  para el género *Bacillus* cultivada a 28°C, este valor es muy superior, con la diferencia que es en cultivo exclusivo en ausencia de otra especie microbiana. Los estudios citados, hacen referencia a las tasas de crecimiento de especies individuales, aspecto que es necesario considera al compararlo con el consorcio empleado en nuestro estudio.

**c) Variación de la concentración de Hidrocarburos**

La medición de la concentración de TPHs, se efectuó por cinco ocasiones, siendo los valores iniciales para la muestra líquida de 2500 ppm y para el suelo de 63.366,3ppm. Transcurridos 45 días de pruebas, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 7.6.4).

**Tabla 7.6.4.** Disminución de la concentración de TPHs comparativa

Fecha	Uel.1ppm	Uel.2ppm	Uel.3ppm	T1ppm
04/06/2003	2500	2500	2500	2500
24/06/2003	2040,3	1860,3	1687,4	2412
01/07/2003	1475,1	956,1	1262,6	2364
08/07/2003	924,8	654,2	915,3	2280
18/07/2003	150,8	246,6	186	2130
Fecha	UeS.1ppm	UeS.2ppm	UeS.3ppm	T2ppm
04/06/2003	63.366,30	63.366,30	63.366,30	63.366,30
24/06/2003	42600,12	37870,24	40298,71	62987,47
01/07/2003	19560,13	13452,69	21392,56	62237,12
08/07/2003	8332,27	7620,54	3271,35	61580,34
18/07/2003	3659,23	2987,13	756,31	61000,22



El descenso de la concentración de TPHs, en medio sólido es marcada en todas las celdas experimentales siendo la mejor en la unidad experimental 3. La figura 7.6.2. muestra las curvas de descenso de TPHs de cada unidad experimental en comparación con la unidad testigo.

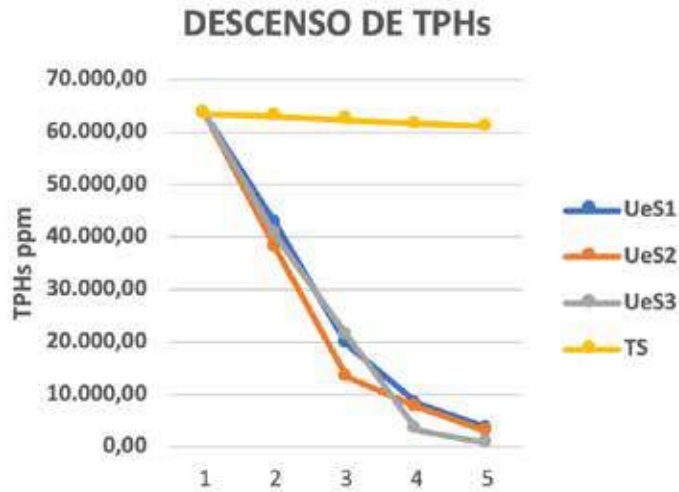


Figura 7.6.2. Curva de degradación de TPHs comparativa entre medio sólido

De igual forma sucede en las celdas experimentales en medio líquido. Como se esperaba los valores de TPHs en los testigos de ambos medios no varió sustancialmente, el ligero cambio, puede explicarse por efectos de evaporación y atenuación natural (figura 7.6.3).

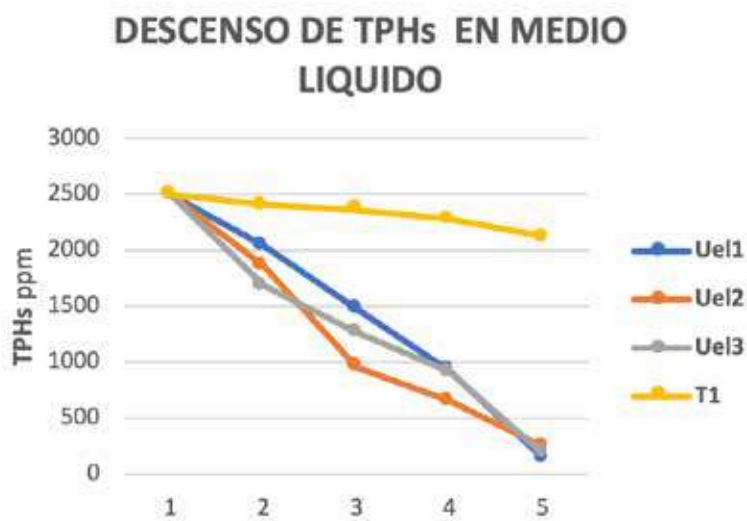


Figura 7.6.3. Curva de degradación de TPHs comparativa entre medio líquido

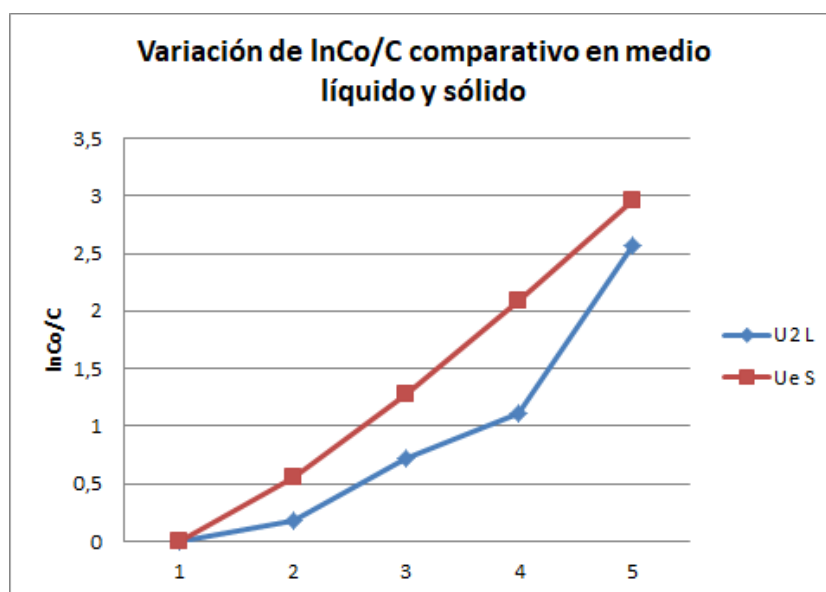
**D) Tasa de degradación**

Los datos calculados a partir de los informes de concentración recibidos de laboratorio muestran los siguientes resultados (tabla 7.6.5). Para el efecto se emplearon las fórmulas 2 y 3.

**Tabla 7.6.5.** Variación de LnCo/C de las celdas experimentales en medio líquido y sólido

Fecha	Medio líquido LnCo/C			Medio sólido LnCo/C		
	Ue <sub>1</sub>	Ue <sub>2</sub>	Ue <sub>3</sub>	Ue <sub>1</sub>	Ue <sub>2</sub>	Ue <sub>3</sub>
4/6/2003	0	0	0	0	0	0
24/6/2003	0,203	0,295	0,035	0,397	0,821	0,452
1/7/2003	0,527	0,961	0,683	1,175	1,549	1,085
8/7/2003	0,994	1.340	1,004	2,028	2,118	2,126
18/7/2003	2,808	2,316	2,598	2,851	3,054	2,963

En la construcción de la curva de LnCo/C, se emplearon los valores promedio de ambas muestras (figura 7.6.4)



**Figura 7.6.4.** LnCo/C comparativa

La tasa K de degradación, calculada del promedio de los valores experimentales, para las pruebas líquidas tienen un valor de  $K = 0,054$  ppm/día, valor que es similar a K de las pruebas en medio sólido. Esto evidencia la capacidad del consorcio para degradar hidrocarburos tanto en medio líquido como en medio sólido.

#### **E) Tiempo de vida media.**

Los cálculos muestran valores de 7,19 días para el medio líquido y de 6,21 para medio sólido. Para las celdas en medio líquido, el tiempo necesario para llegar a los límites de descarga en cuerpos de agua, es de 20 ppm, según el LIBRO VI ANEXO 1, es de 50,33 días. Nuestro tratamiento se prolongó durante 45 días y logró un descenso hasta 195,5 ppm.

Para las unidades experimentales con suelo, el tiempo de vida media calculado es de 6,20 días, en consecuencia, para llegar a los límites de la legislación ambiental, que exigen valores inferiores a <4000 ppm, para suelos de uso industrial, se requieren 24,83 días, y para suelo uso agrícola (<2000ppm), un total de 31 días. Este tiempo necesario es aproximadamente el 50% del tiempo empleado en las pruebas, que fue de 45 días. Estos resultados muestran que los procesos de remediación de hidrocarburos en suelos son más eficientes que en medios líquidos, por cuanto las bacterias encuentran una superficie adecuada en la cual formar la biopelícula. Datos bibliográficos de biorremediación de zonas costeras y esteros contaminados con residuos petroleros hablan de un tiempo de tratamiento aproximado de 800 días, caso Exxon Valdés (McCammon, 2003).

#### **F) Eficiencia**

Ambos tratamientos presentan altos valores de eficiencia, y confirman la capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos, con 92,22 y 94,78% para medio líquido y sólido respectivamente.

#### **G) Metales pesados**

En base a los análisis de laboratorio las concentraciones de metales pesados variaron en conformidad con las tablas 7.6.6. y 7.6.7.

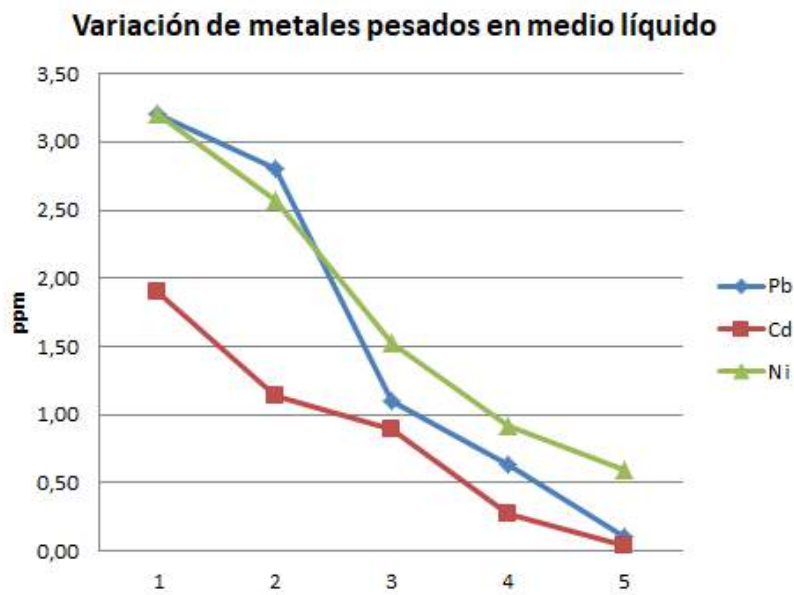
**Tabla 7.6.6.** Variación de Metales pesados en medio líquido

Pb			Cd			Ni		
UeL1	UeL2	UeL3	UeL1	UeL2	UeL3	UeL1	UeL2	UeL3
3,20	3,20	3,20	1,90	1,90	1,90	3,20	3,20	3,20
2,80	2,92	2,34	1,14	1,32	1,05	2,57	2,64	2,81
1,10	1,87	1,02	0,89	0,92	0,62	1,53	1,72	2,09
0,63	0,95	0,15	0,27	0,33	0,15	0,92	1,12	1,32
0,10	0,23	0,07	0,04	0,12	0,09	0,60	0,97	0,78

**Tabla 7.6.7.** Variación de Metales pesados en medio sólido

Pb			Cd			Ni		
UeS1	UeS2	UeS3	UeS1	UeS2	UeS3	UeS1	UeS2	UeS3
87,20	87,20	87,20	37,80	37,80	37,80	123,40	123,40	123,40
52,61	60,03	48,12	24,70	21,33	24,81	85,32	104,6	106,13
23,60	27,39	31,02	18,23	16,28	15,72	57,92	67,92	82,65
1,70	5,68	2,45	2,70	3,45	1,14	35,20	40,35	32,41
0,50	0,38	0,07	0,50	0,64	0,27	27,00	38,42	17,21

La figura 7.6.5., muestra las curvas de descenso de la concentración de metales pesados en las celdas experimentales líquidas en tanto que la figura 7.6.6, en las muestras sólidas.



**Figura 7.6.5.** Variación de metales pesados en muestras líquidas

Según el libro VI Anexo 1 de la Ley unificada Ambiental del Ecuador, para descargas de aguas en un cuerpo receptor de agua dulce; los límites de concentración de metales son de: Pb 0,2 ppm, para el Cd 0,02ppm y para el Ni 2ppm.

Las medias muestran para Pb 0,13ppm, Cd 0,08ppm y Ni 0,78ppm, en consecuencia, no se llegó a cumplir con el límite para el Cd.



Figura 7.6.6. Variación de metales pesados en muestras de suelo

Para los suelos uso agrícola remediados, según el reglamento 1215 para las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador, los límites de Pb, 100ppm, Cd 10ppm y Ni 100ppm.

El tratamiento muestra eficiencia para el Pb con valores finales promedios 0,32ppm, Cd 0,47ppm y Ni 27,54 ppm. Todos los resultados cumplen con los límites de concentración del marco legal.

**H). Control de otros parámetros**

**Conductividad.** La conductividad inicial en  $\mu\text{S}$  en las unidades de tratamiento varió moderadamente durante el tiempo de tratamiento en cada una de las unidades experimentales. En las unidades experimentales en medio líquido vario de 36,4 a 41,49  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . En la unidad con suelo de 23,7 a 28,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

**El pH.** Las variaciones del pH fueron leves. En todas las unidades se logró establecer un pH ligeramente ácido desde 6,2 a 7,6. En todo caso la variación del pH no fue importante como para reducir la tasa de crecimiento bacteriano o la tasa de degradación de residuos.

**Humedad.** La humedad establecida en las unidades de tratamiento con suelo varió entre 56% y 62%.

### I). Análisis estadístico

Por cuanto las pruebas de degradación de hidrocarburos con el consorcio empleado, se realizó en dos medios diferentes, no comparables; no se realiza ningún análisis estadístico.

### 7.6.6 Conclusiones caso seis

Los resultados permiten afirmar con seguridad, que la biorremediación de residuos de hidrocarburos almacenados en piscinas es factible con ayuda de microorganismos autóctonos en conjunto con el empleo de tamices moleculares (BIOSOIL).

Los aislamientos ejecutados, permitieron obtener un consorcio microbiano con capacidad para degradar hidrocarburos, compuesto: *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona sp*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces spp*.

Los parámetros cinéticos calculados para el consorcio microbiano empleado,  $\mu$  0,19 y 0,20/h, para la remediación en medio líquido y suelo respectivamente. La tasa de degradación fue de similar en para ambos casos  $K=0,054$ ppm/día Determinar los parámetros cinéticos del proceso. Los tiempos de vida media: 89,04 y 63,6 días respectivamente. Mientras que la eficiencia en porcentaje alcanzó 92,2 y 94,7% respectivamente.

En relación con los metales pesados, el empleo de tamices moleculares contenido en BIOSOIL, mostró ser efectivo para su eliminación; así lo muestran los resultados de las pruebas en medio líquido y suelo. Solo con el Cd, en medio líquido; no se cumplió con los límites de concentración permitidos por la legislación ambiental, de 0,02ppm, llegando a pezas a 0,04ppm.

Los tiempos de vida media calculados, muestran que es factible tratar este tipo de residuos en tiempos adecuados y con bajo costo.

### 7.6.7 Recomendaciones

- Ejecutar una prueba piloto en condiciones locales, para afinar los parámetros cinéticos y definir los factores ambientales que podrían ejercer influencia sobre el proceso de biorremediación.
- Realizar pruebas complementarias con polímeros y emulsificantes que permitan obtener una emulsión agua/crudo/bacterias/biosoil y asegurar de esta manera el mayor contacto de la masa bacteriana con los residuos.
- Buscar fuentes alternativas de microelementos, de menor costo y buena eficiencia.
- Ejecutar los análisis de metales pesados en los lixiviados, por cuanto el empleo de tamices moleculares permite la adsorción de estos, y en la metodología recomendada en la 1215, es extractiva.
- Planificar una propuesta de trabajo, en condiciones de campo.

### 7.6.8 Bibliografía

1. Avalos, A. M., y Padilla, A. M. G. (2017). BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO DIESEL-2 EN AGUA DE MAR POR *Pseudomonas aeruginosa* EN UN BIORREACTOR AIREADO Y AGITADO. *SCIÉNDO*, 18(1).
2. Baoune, H., El Hadj-Khelil, A. O., Pucci, G., Sineli, P., Loucif, L., & Polti, M. A. (2018). Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 602-609.
3. Garrity, G. (2007). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
4. Bracho, M., Díaz, L., & Soto, L. (2004). Crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de dibenzotiofeno y en función de nitrógeno y fósforo. *Revistas Ciencias*, 12(3), 125-131.
5. Eweis, J. B., Tejero Monzón, I., & Amieva del Val, J. J. (1999). *Principios de biorrecuperación (bioremediation): tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicas y físico-químicos* (No. 628.5 P7)

6. Gao, H., Zhang, J., Lai, H., & Xue, Q. (2017). Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas aeruginosa* strains and their effects on physico-chemical properties of crude oil. *International biodeterioration & biodegradation*, 122, 12-22.
7. Henry, J. G., & Heinke, G. W. (1999). *Ingeniería ambiental*. Pearson Educación.
8. Jiménez-Delgado, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2), 256-275.
9. Kumar, M., León, V., Materano, A. D. S., Ilzins, O. A., y Luis, L. (2008). Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1047-1057.
10. Lagrega, M. (1996). *Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. Vol. 1.
11. Mayz, J., y Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29-37.
12. McCammon, M. (2003). Economic, Social and Environmental Effects of the Prestige Spill. *Consello da Cultura Galega and Association of Natural Resource and Environmental Economics*. Santiago, Spain.
13. Mukherjee, A. K., y Bordoloi, N. K. (2012). Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8), 3380-3388.
14. Nwaogu, L. A., Onyeze, G. O. C., & Nwabueze, R. N. (2008). Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1939-1943.
15. Palleroni, N. J., & Moore, D. P. E. (2010). 12 Microbiology of Hydrocarbon-Degrading *Pseudomonas*.
16. Pérez-Pantoja, D., González, B., & Pieper, D. H. (2010). Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
17. Prabhu, Y., & Phale, P. S. (2003). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of bio-



- surfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(4), 342-351.
18. Rittmann, B. E., y Garralda de Roda, F. (2001). *Biotecnología del medio ambiente principios y aplicaciones* (No. 660.6 R5).
19. Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., & Basri, M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution.

## AUTORES



### TANIA OÑA ROCHA

Ingeniera en Recursos Naturales  
Magister en Ecoturismo en áreas Protegidas  
Docente Investigadora de la Carrera de Ingeniería en Recursos Naturales  
Renovales-UTN  
Participante de XVI, XVII, XXIII expediciones antárticas  
Punto focal de la maestría en red VLIR NETWORK ECUADOR  
E-mail:teonia@utn.edu.ec



### MIGUEL GUALOTO OÑATE

MsC. en Ciencias Biológicas  
Universidad Estatal de Moldova ex URSS  
Participante de XIV, XVI, XIX Y XXII  
expediciones antárticas.  
Coordinador del Comité Asesor  
Científico DIGEIM-FUNDEMAR  
Docente de Biorremediación  
E-mail: miguel.g62@yandex.ru



ISBN: 978-9942-845-16-0



**ISBN**