



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETRÓLEOS**

**TEMA:**

**“ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE  
BACTERIAS PSEUDOMONAS”**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**AUTOR:**

**KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**

**TUTOR:**

**ING. GERARDO ANTONIO HERRERA BRUNETT, MSc**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2021**

**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETRÓLEOS**

**TEMA:**

**“ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE  
BACTERIAS PSEUDOMONAS”**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**AUTOR:**

**KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**

**TUTOR:**

**ING. GERARDO ANTONIO HERRERA BRUNETT, MSc**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2021**

**UPSE**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico a mis padres José Soto y Doris Lavayen, que siempre me han apoyado en mis estudios, motivándome y ayudándome en todo lo posible.

También a mis hermanos que han sido mi motivación para no rendirme en los estudios y poder ser un ejemplo para ellos.

## CERTIFICADO DE ANTIPLAGIO

En calidad de tutor del trabajo de investigación para titulación del tema “**ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PSEUDOMONAS**” elaborado por el estudiante **KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**, egresado de la carrera de Ingeniería en Petróleos, de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería, me permito declarar que una vez analizado en el sistema antiplagio URKUND, luego de haber cumplido con los requerimientos exigidos de valoración, la presente tesis, se encuentra con un 2 % de la valoración permitida.



### Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** TESIS FINAL KEVIN SOTO.docx (D111405745)  
**Submitted:** 8/18/2021 4:33:00 AM  
**Submitted By:** gherrera@upse.edu.ec  
**Significance:** 2 %

Sources included in the report:

<https://www.slideshare.net/leonardoignacio/tecnologas-de-remediacion>  
<https://repository.usc.edu.co/bitstream/20.500.12421/2299/1/USC0100104545.pdf>

Instances where selected sources appear:

8

FIRMA DEL TUTOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gerardo B", is written over a horizontal line. The signature is contained within a light blue rectangular box.

Ing. Gerardo Antonio Herrera Brunett, MSc.

C.I.: cedula de identidad del tutor

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**, declaro bajo juramento que el presente trabajo de titulación denominado **“ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PSEUDOMONAS”**, no tiene antecedentes de haber sido elaborado en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Carrera de Ingeniería en Petróleo lo cual es un trabajo exclusivamente inédito y perteneciente de mi autoría.

Por medio de la presente declaración cedo los derechos de autoría y propiedad intelectual, correspondientes a este trabajo, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

Atentamente,



**KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**

**Autor de Tesis**

**C.I. 0923172126**

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ing. Gerardo Antonio Herrera Brunett, MSc.

**TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Universidad Estatal Península de Santa Elena

En mi calidad de Tutor del presente trabajo **“ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PSEUDOMONAS”** previo a la obtención del Título de Ingeniero en Petróleo elaborado por el Sr. **KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**, egresado de la Escuela de Petróleo, Facultad Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Estatal, me permito declarar que luego de haber orientado, estudiado y revisado, la apruebo en todas sus partes.



GERARDO ANTONIO HERRERA BRUNETT

TUTOR

# CERTIFICADO DE GRAMATOLOGÍA

---

## CERTIFICADO DE REVISIÓN DE LA REDACCIÓN Y ORTOGRAFÍA.

Yo, Lola González, certifico que he revisado la redacción y ortografía del contenido del trabajo de integración curricular: **"ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PSEUDOMONAS"**, elaborado por el sr. **KEVIN JOSUE SOTO LAVAYEN**, previo a la obtención del título de **INGENIERO EN PETRÓLEO**.

Para el efecto he procedido a leer y analizar de manera profunda el estilo y la forma de contenido del texto.

- Se denota pulcritud en la escritura en todas sus partes.
- La acentuación es precisa.
- Se utiliza los signos de puntuación de manera acertada.
- En todos los ejes temáticos se evita los vicios de dicción.
- Hay concreción y exactitud de las ideas.
- No incurre en errores en la utilización de letras.
- La aplicación de sinonimia es correcta.
- El lenguaje es pedagógico, académico, sencillo, directo y de fácil comprensión.

Por lo expuesto, en calidad de gramatóloga, se procede a emitir el presente informe.

Atentamente,



---

Lic. Lola González Quimí, Mg  
CC: 0914393483  
Reg. Senescyt: 1050-15-86072949

## TRIBUNAL DE GRADO

---

Qf. Rolando Calero Mendoza, PhD. MSc

DIRECTOR DE LA CARRERA DE  
PETRÓLEOS



Firmado  
digitalmente  
por ERICA  
LORENZO  
GARCIA

---

Lcda. Erica Lorenzo García, PhD.

PROFESOR DE ARÉA



---

Ing. Gerardo Antonio Herrera, MSc

TUTOR



Firmado  
digitalmente  
por ERICA  
LORENZO  
GARCIA

---

Lcda. Erica Lorenzo García, PhD.

DOCENTE Y SECRETARÍA DE LA UIC

## AGRADECIMENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a mi familia por estar siempre presentes.

A mi universidad “Península de Santa Elena”, por haberme permitido formarme en sus aulas, con constancia, dedicación y esfuerzo.

Al Ing. Gerardo Herrera, por su apoyo como tutor y docente a lo largo de mi carrera.

A la Dra. Erica Lorenzo, por brindarme sus conocimientos durante estos cuatro años.

A mis amigos Ricky Guzmán, Bryan Galarza e Ing. Eddie Medina, por brindarme su confianza y apoyo.

A Noha Rivilla, por compartirme sus conocimientos en biología.

A la Superintendencia del Terminal Petrolero La Libertad (SUINLI) donde pude realizar las pruebas de laboratorio y tener acceso a la información de la empresa.

Al Sr. Raúl Panchana e Ing. Johnny Del Pezo, radio-operadores de SUINLI, quienes confiaron en mi desempeño como pasante y motivaron a realizar mi proyecto.

A la Sra. Yolanda Villavicencio, Lcdo. Santiago Boponti e Ing. José Días, trabajadores de la Intendencia de Operaciones, por ayudarme en el proceso de gestión de los permisos en SUINLI.

Al Blgo. Fredy Espinoza, Insp. Jimmy Chaux, Insp. Arturo Torres y Ec. Fausto Fajardo, trabajadores de la Intendencia de Control y Contaminación

A mi novia Paola Proaño, por acompañarme este año brindándome su apoyo para cumplir esta meta.

# CONTENIDO

	<b>pág.</b>
Dedicatoria _____	iii
Certificado de antiplagio _____	iv
Declaración de autoría _____	v
Certificación del tutor _____	vi
Certificado de gramatología _____	vii
Agradecimientos _____	ix
Contenido _____	ix
Lista de figuras _____	xii
Lista de tablas _____	xiii
Resumen _____	xiv
Abstract _____	xv
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN _____	1
1.1 JUSTIFICACIÓN _____	1
1.2 ANTECEDENTES _____	2
1.3 OBJETIVOS _____	3
1.3.1 General. _____	3
1.3.2 Específicos. _____	3
1.4 HIPÓTESIS _____	3
CAPITULO II: MARCO TEORICO _____	4

2.1	PETRÓLEO _____	4
2.2	PROPIEDADES FÍSICAS DEL PETRÓLEO _____	4
2.2.1	Densidad. _____	4
2.2.2	Olor. _____	5
2.2.3	Solubilidad. _____	5
2.2.4	Color. _____	5
2.2.5	Viscosidad. _____	5
2.2.6	Volatilidad. _____	5
2.3	PROPIEDADES QUÍMICAS DEL PETRÓLEO _____	6
2.4	PETRÓLEO EN EL ECUADOR _____	6
2.5	IMPACTO DE LA ACTIVIDAD PETROLERA _____	7
2.6	DERRAMES DE PETRÓLEO _____	8
2.7.1	Derrames en ambientes marinos. _____	8
2.7.2	Derrames en ambientes terrestres. _____	12
2.7.3	Derrames en ambientes fluviales. _____	13
2.7	TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN _____	14
2.8.1	Clasificación de tecnologías de remediación _____	15
2.8.2	Tecnologías de remediación biológicas (biorremediación) _____	17
2.8	MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN PETROLEO _____	28
2.9	BACTERIAS PSEUDOMONAS _____	29
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA _____		32
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN _____	32
3.2	POBLACIÓN _____	32
3.3	MUESTRA _____	32
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL _____	33
3.4.1	Variable independiente _____	33
3.4.3	Variable dependiente _____	33
3.5	MATERIAL BIOLÓGICO _____	34

3.5.1 Medios de cultivo	35
3.5.2 Preparación de cultivos	36
3.6 PRUEBAS EN MEDIO LÍQUIDO	36
3.6.1 Lectura de la Densidad Óptica indirectamente	37
3.6.2 Evolución microbiana (Análisis)	37
3.7 CUANTIFICACIÓN DE PETRÓLEO BIORREMEDIADO	37
3.8 EQUIPOS	37
3.9 REACTIVOS	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	39
4.1 CULTIVO SOBRE UN MEDIO ACUOSO CON GLUCOSA	39
4.2 RESULTADOS DE BIORREMEDIACIÓN DE PETRÓLEO	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
5.1 CONCLUSIONES	44
5.2 RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS	46

# LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1: Esquema del diseño experimental en 100 mililitro de medio acuoso.....	34
Figura 2: Curva de crecimiento de bacterias Pseudomonas, D.O. a 660 nm en función del tiempo .....	39
Figura 3: Resultados de Biorremediación, representados en porcentaje (%).....	40
Figura 4: Porcentaje de biorremediación en función del tiempo y dosificación de Pseudomonas .....	41
Figura 5: Evolución de crecimiento de bacterias Pseudomonas en medio acuoso con petróleo .....	42
Figura 6: Evolución de crecimiento de bacterias Pseudomonas en dos medios acuosos.....	43

# LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1: Relación color mancha / espesor aproximado, (Adaptado de SILOS, 2008) .....	10
Tabla 2: Valores de los niveles y variables .....	33
Tabla 3: Característica de crecimiento de las bacterias Pseudomonas en un medio acuoso enriquecido ...	40

# **ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PSEUDOMONAS”**

## **RESUMEN**

En el presente proyecto se recolectaron y reprodujeron las bacterias *Pseudomonas* hasta tener un cultivo para la aplicación en muestras contaminadas con petróleo. Se calculó el volumen biorremediado en las muestras contaminadas en función del tiempo y la dosificación de *Pseudomonas*.

Se preparó 100 mililitro de medio acuoso, un mililitro de cultivo y 0,5 mililitro de glucosa en los erlenmeyers de 250 mililitro. Posteriormente se añadió 5, 10 y 20 mililitro de petróleo respectivamente. Los erlenmeyers fueron agitados a 300 revoluciones por minuto e incubaron a 37 °C. Se determinó el porcentaje de petróleo biorremediado por las bacterias, para ello, se obtiene muestras del medio líquido de los erlenmeyers y se introducen en un vortex para homogenizar la solución y posteriormente se extrae cinco mililitros y son colocados sobre la ranura de cristal del TOG / TPH Analyzer (InfraCal) para su debido análisis.

La aplicación de las bacterias *Pseudomonas* directamente en medios acuosos contaminados por petróleo no es viable, ya que se da la lisis celular de las bacterias debido a la toxicidad del petróleo, matando la población bacteriana presente en el medio.

**PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas* / Biorremediación / Bacterias**

# **STUDY ON THE BIOREMEDIATION CAPACITY OF PSEUDOMONAL BACTERIA**

## **ABSTRACT**

In this project, the Pseudomonas bacteria were collected and reproduced until they had a culture for application in oil-contaminated samples. The bioremediated volume in the contaminated samples was calculated as a function of time and Pseudomonas dosage.

100 milliliter of aqueous medium, one milliliter of culture and 0.5 milliliter of glucose were prepared in 250 milliliter erlenmeyers. Later, 5, 10 and 20 milliliter of oil were added respectively. The Erlenmeyers were shaken at 300 rpm and incubated at 37°C. The percentage of oil bioremediated by the bacteria was determined, for this, samples of the liquid medium of the Erlenmeyers are obtained and they are introduced into a vortex to homogenize the solution and then five milliliters are extracted and they are placed on the glass slot of the TOG / TPH Analyzer (InfraCal) for proper analysis.

The application of Pseudomonas bacteria directly in aqueous media contaminated by oil is not feasible, since the cell lysis of the bacteria occurs due to the toxicity of the oil, killing the bacterial population present in the medium.

**KEY WORDS: Pseudomonas / Biorremediation / Bacteria**

# **CAPITULO I: INTRODUCCIÓN**

Las técnicas de biorremediación son utilizadas desde hace varias décadas para mitigar el impacto ambiental en zonas afectadas por contaminantes.

El objeto de estudio es proporcionar información sobre la capacidad de las bacterias pseudomonas, la utilización de estas bacterias en recuperación de suelos contaminados y mitigar el impacto ambiental, mediante técnicas de biorremediación de áreas afectadas por derrames de petróleo. Para el desarrollo de este estudio se inocula la superficie del agar con una torunda o mediante aplicación de una membrana de filtración para la incubación de las bacterias pseudomonas de 24 a 48 horas a una temperatura de 37 °C. Finalizado el periodo de incubación, observaremos una colonia de bacterias, se retiran cepas para la aplicación en las muestras contaminadas y elaborando análisis y obtención de resultados.

Las muestras contaminadas se obtendrán en el laboratorio mediante la aplicación de petróleo a muestras libre de contaminación, esto nos permitirá tener un porcentaje de concentración de contaminante (petróleo) en cada muestra.

## **1.1 JUSTIFICACIÓN**

Las necesidades de una sociedad cada vez más consumista, han llevado a un crecimiento de la industria petrolera con un fuerte impacto sobre la calidad del ambiente, por los procesos de perforación, producción y transporte de petróleo.

La contaminación por petróleo suele tener repercusiones sociológicas y ambientales cuando es de carácter masivo, se ven afectados lugares apartados que se contaminan en una zona menor, no solo en lugares aledaños a las torres de perforación, sino que también se presentan derrames durante el proceso de transporte, contaminando el suelo.

La biorremediación es una técnica innovadora que se ha desarrollado en la década de los 80 y 90, la cual ha sido aplicada exitosamente en el tratamiento de suelos y aguas contaminadas con petróleo. Se caracterizan por ser una técnica de bajos costos de operación. La aplicación de este tipo de técnica ha encontrado cierta resistencia de aplicación por el tiempo que demanda completar un proceso hasta obtener las metas de limpieza deseadas (Rodríguez & Sánchez, 2003).

La biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos y aguas contaminadas en contraste a alternativas más costosa y de menor aceptación pública como la incineración. Los tratamientos biológicos de degradación en suelos pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas. Se define como biorremediación al proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de petróleo (Rodríguez & Sánchez, 2003).

## **1.2 ANTECEDENTES**

En el año 2004 en Cartago, Caroline Braibant Wayens, realizó un estudio sobre la degradación de hidrocarburos con un consorcio de bacterias *Acinetobacter* y *Pseudomonas putida*, dando como resultado que En el año 2017 en Venezuela, Lic. Juliana Mayz Ph. D, realizó una investigación que incluye el aislamiento, caracterización e identificación de las especies de *Pseudomonas* existentes en la rizosfera de una leguminosa presente (colonizadora o sobreviviente) en un suelo de sabana contaminado por un derrame de petróleo con el fin de explicar el apoyo al crecimiento de esta leguminosa a través de la reducción de la toxicidad del crudo derramado.

En el año 2019 en Brasil, Daniel Luján, realizó una revisión de la participación de bacterias *Pseudomonas* en los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con moléculas orgánicas de difícil degradación y metales tóxicos; dando como resultado que las bacterias *pseudomonas* presentan un rol a destacar en la biorremediación debido a su gran capacidad catabólica, requerimientos abióticos no muy exigentes y fácil adaptación a condiciones adversas, lo cual le permite participar activamente en la degradación de contaminantes tales como hidrocarburos y metales pesados.

En el año 2018 en Quito, Marco Pérez Pozo, realizó una evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*, concluyendo que *Pseudomonas fluorescens* degrada de mejor forma cuatro HAPs (Acenaftaleno, benzo a antraceno, fenantreno, naftaleno) de los 16 que se detectaron en los análisis iniciales y finales, demostrándose la importancia de biotransformación de la bacteria en estos compuestos tóxicos para el ambiente y el hombre.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 General.**

Proponer el uso de bacterias de la familia *Pseudomonas* para la biorremediación en zonas acuáticas con presencia de derrames de petróleo.

#### **1.3.2 Específicos.**

- Recolectar y reproducir las bacterias *pseudomonas* hasta tener un cultivo para la aplicación de cepas bacterianas en muestras contaminadas con petróleo.
- Calcular el porcentaje de volumen biorremediado de las muestras contaminadas en función del tiempo de aplicación de las bacterias *Pseudomonas*.
- Analizar los resultados obtenidos en función al porcentaje de biorremediación de las muestras contaminadas.

### **1.4 HIPÓTESIS**

El uso de las bacterias *Pseudomonas*, para la remediación de zonas contaminadas con petróleo, presentan un 80% de eficacia.

## **CAPITULO II: MARCO TEORICO**

### **2.1 PETRÓLEO**

La palabra petróleo, gramáticamente puede dividirse en petro=roca y óleum=aceite, que etimológicamente significa aceite de roca. La construcción química del petróleo se caracteriza por contener átomos de carbono (C) y de hidrógeno (H) mayoritariamente, formando una variedad de compuestos denominados hidrocarburos (Lorenzo García & Morato Medina , 2018)(Lorenzo y Morato,2018).

El petróleo también está formado por pequeñas proporciones de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales. se presenta de forma natural en depósitos de roca sedimentaria y sólo en lugares en los que hubo mar. Su color es variable, entre el ámbar y el negro y el significado etimológico de la palabra petróleo es aceite de piedra, por tener la textura de un aceite y encontrarse en yacimientos de roca sedimentaria (AOP, 2002).

Una propiedad característica del petróleo es la miscibilidad de todas sus fracciones, por lo cual forma una fase orgánica continua. En cambio, los hidrocarburos son poco miscibles en agua, y como son más ligeros, forman siempre una capa sobre su superficie

### **2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL PETRÓLEO**

#### **2.2.1 Densidad.**

La densidad del petróleo es menor al de agua (0,998 g/cm<sup>3</sup>), esta propiedad varía del origen del petróleo.

### **2.2.2 Olor.**

s característico y depende de la naturaleza y composición del aceite crudo. Los hidrocarburos no saturados dan olor desagradable, debido al ácido sulfhídrico y otros compuestos de azufre. Los petróleos crudos tienen olor aromático. En otros aceites el olor varía, dependiendo de la cantidad de hidrocarburos livianos y de las impurezas (Servicio Geológico Mexicano, 2017).

### **2.2.3 Solubilidad.**

Los petróleos son insolubles en agua y sus diversos elementos se disuelven recíprocamente. El disolvente más interesante y más importante es el ácido sulfúrico, que tiene poca acción sobre los hidrocarburos forménicos que los nafténicos .

### **2.2.4 Color.**

El petróleo es un líquido de color oscuro y origen natural compuesto por diferentes sustancias orgánicas (Es una mezcla de hidrocarburos, aunque también suelen contener azufre y oxígeno). Por diferencias en su composición química, viscosidad y densidad puede adquirir una amplia gama de tonalidades, que va desde incoloro hasta negro, pasando por el amarillo o el rojo (Ramos et al., 2017).

### **2.2.5 Viscosidad.**

La viscosidad del petróleo se mide por el tiempo que necesita una cantidad dada para fluir a través de una abertura (poro).

### **2.2.6 Volatilidad.**

2.2.7 Esta propiedad depende de los diversos puntos de ebullición que tienen los componentes del petróleo crudo.

## **2.3 PROPIEDADES QUÍMICAS DEL PETRÓLEO**

El petróleo, se compone principalmente de carbono e hidrógeno en la porción 83-87% de C y de 11-14% de H. Contiene abundantes impurezas de compuestos orgánicos en los que intervienen componentes como el azufre, oxígeno, nitrógeno, mercaptanos, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, alcoholes mezclados también con agua salada, ya sea libre o emulsionada, en cantidad variable. Como impurezas, se encuentran también diversas sales minerales como cloruros y sulfatos de Ca, Mg y Fe, su color varía entre ámbar y negro (Servicio Geológico Mexicano, 2017).

Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan, determinando su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (Servicio Geológico Mexicano, 2017).

Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos.

Hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas, y un contenido menor de otros elementos. Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen verdaderamente complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión. Un ejemplo, son los asfáltenos que forman parte del residuo de la destilación al vacío; estos compuestos además están presentes como coloides en una suspensión estable que se genera por el agrupamiento envolvente de las moléculas grandes por otras cada vez menores para constituir un todo semicontinuo .

## **2.4 PETRÓLEO EN EL ECUADOR**

El Ecuador cuenta con la capacidad de procesamiento de 175 mil barriles diarios en sus 3 refinerías (Esmeraldas, Shushufindi y La Libertad) que operan al 100% de su

capacidad, produciendo combustibles entre sus más importantes la gasolina, diésel, jet fuel y GLP, dichos derivados representan el 71% del consumo nacional energético del país.

## IMPACTO DE LA ACTIVIDAD PETROLERA

Ecuador debido a la dependencia del petróleo, para generar ingresos estatales, se ha visto limitado en la capacidad de sus gobiernos y analistas a no establecer una buena relación que cambien algunas realidades marcadas por la desigualdad o marginación económica, también se ha sometido a financiar la burocracia para invisibilizar efectos colaterales, que se han dado en las fases de explotación petrolera, al ser humano con la migración de los pueblos, la represión militar, la contaminación al suelo y agua, y su consecuente afectación a la salud.

La actividad extractiva del petróleo tiene gran impacto en los elementos abióticos. Las fases como la prospección sísmica, desforestación, perforación y transporte generan graves impactos sobre el suelo, el movimiento de tierra ocasiona procesos erosivos, la disposición de líquidos y materiales de manera incorrecta tales como los lodos de perforación y los residuos sólidos contaminan el suelo.

El agua se ve afectada por el cambio de calidad de la misma, debido a la disposición incorrecta de desechos sólidos y líquidos como el agua de formación, que se produce por miles de barriles, estos elementos se conservan por mucho tiempo en el agua provocando grandes fuentes de contaminación.

El aire es afectado por la quema de gas natural, donde los subproductos de la combustión son liberados a la atmosfera mediante mecheros, esto produce la contaminación de poblados cercanos y en algunos casos aun no estando cerca, se ven afectadas por las corrientes de aire. El aire también se contamina por el ruido emitido de las turbinas en las plataformas y taladros de perforación.

En la biodiversidad, las actividades petroleras tienen un impacto elevado, la flora se somete a su deterioro y remoción que se ejecuta para ensamblar el taladro de

perforación y sus instalaciones (1 hectárea). La producción natural vegetal se ve reducida por la acumulación de basura industrial, lodos de perforación, materiales sólidos y químicos, es decir, impide la secuencia evolutiva.

La fauna es comprometida debido al desplazamiento de las especies (aéreas y terrestres) por trabajos de deforestación para la construcción de plataformas, apertura de trochas y caminos. Algunas especies se ven afectadas debido a la mala deposición de residuos sólidos y líquidos resultante de las perforaciones en la zona.

Efectos sobre el suelo: las zonas ocupadas por pozos, baterías, playas de maniobra, piletas de purga, ductos y red caminera comprometen una gran superficie del terreno que resulta degradada. Esto se debe al desmalezado y alisado del terreno y al desplazamiento y operación de equipos pesados. Por otro lado, los derrames de petróleo y los desechos producen una alteración del sustrato original en que se implantan las especies vegetales dejando suelos inutilizables durante años (Greco, s.f.).

## **2.5 DERRAMES DE PETRÓLEO**

Los derrames de petróleo a menudo ocurren debido a accidentes, cuando las personas cometen errores o equipos se descomponen. Otras causas incluyen desastres naturales o actos deliberados. Los derrames de petróleo tienen importantes efectos ambientales y económicos.

Los derrames de petróleo también pueden afectar a la salud humana. Estos efectos pueden depender de qué tipo de petróleo se derramó y dónde (en tierra, en un río o en el mar). Otros factores incluyen qué tipo de exposición y la cantidad de exposición que hubo. Las personas que limpian derrames están en mayor riesgo. Los problemas pueden incluir irritación cutánea y ocular, problemas neurológicos y respiratorios, y estrés (MEDLINEPLUS, 2021).

### **2.6.1 Derrames en ambientes marinos.**

El hidrocarburo vertido sobre la superficie del mar se extenderá inmediatamente. A causa de sus propiedades físicas y químicas, así como las condiciones

externas. Se extenderá de manera impredecible resultando un vertido no homogéneo consistente en manchas espesas y grumos entremezclados con finas capas oleosas (Manduca, 2000).

Al derramarse petróleo, el mar se ve afectado por varios cambios físico-químicos. Estos cambios hacen que los hidrocarburos presentes en el petróleo se volatilicen de la superficie del mar, mientras que otros cambios hacen que perduren (Borrás, 2010).

El tiempo para que suceda los cambios físico-químicos del petróleo, dependen, de los procesos de meteorización que se pueden dar y de las características del crudo. Los procesos de meteorización pueden alterar las características y comportamiento del petróleo en el ambiente marino, para la remediación es importante conocer estos procesos y cómo interactúan con el crudo (Manduca, 2000).

Los procesos de meteorización son los siguientes:

- ***Propagaciónl.***

Al principio, tras el derrame, los hidrocarburos comienzan a extenderse, formando una mancha uniforme de color oscuro que se reduce gradualmente a brillos finos iridiscentes o plateados en sus bordes. En este momento el factor más importante a la hora de considerar el tamaño de la mancha es el volumen de hidrocarburo derramado.

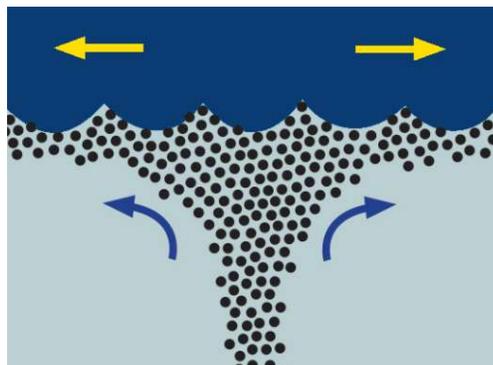


Figura 1: Propagación del petróleo, (

La viscosidad y la temperatura del agua del mar (teniendo en cuenta que si esta es inferior al punto de fluencia difícilmente se propagaran) son los factores que junto a la cantidad determinaran la viscosidad de propagación (Silos, 2008).

Tabla 1: Relación color mancha / espesor aproximado, (Adaptado de SILOS, 2008)

<b>Apariencia</b>	<b>Espesor aprox. (mm)</b>	<b>Volumen aprox. (m<sup>3</sup>/km<sup>2</sup>)</b>
Bandas de colores mates oscuros	0,00200	2,00
Bandas de colores crema claro	0,00500	5,00
Bandas de colores marrón oscuro	0,01000	10,00
Parches marrones claros y oscuros, zonas color negro	0,02500	25,00
Nódulos negros sobre fondo marrón	0,05000	50,00
Franjas marrones oscuro	0,10000	100,0
Franjas colores oscuros y negros	0,25000	250,0
Mancha compacta, colores café oscuros	0,50000	500,0
Mancha continua y totalmente negro	1,00000	1000,0
Fuertemente negro con ondulaciones amortiguadas	2,00000	2000,0
Fuertemente negro sin ondulaciones	3,00000	3000,0

- ***Evaporización*** *Evaporación del petróleo.*

La evaporación del petróleo desde la superficie del mar puede exponer a los primeros equipos de respuesta e industriales a compuestos tóxicos. Además, el petróleo evaporado se puede foto-oxidar en aerosoles orgánicos secundarios y ozono (Middlebrook et al, 2012)

Una vez el petróleo está en la superficie, el sol calienta la mancha y los hidrocarburos más ligeros empiezan a evaporizarse, y el petróleo residual, más pesado, continua en el mar.

Se ha demostrado que el 50% del petróleo crudo, puede perderse por evaporación entre las 24 y 48 horas posteriores al derrame. Los márgenes van

desde el 10 % para el fuel-oil pesado, hasta el 75% para el fuel-oil liviano, gasolina o queroseno (Silos, 2008).

- ***Dispersión del petróleo.***

El crudo que aún sigue en el agua, después de la evaporización, se somete a la acción del sol, las corrientes marinas y vientos, lo que provoca la división del crudo en miles de partículas, un porcentaje precipitan y otras se mantienen en la superficie formando una capa. La velocidad de la dispersión, junto con la evaporación, determinan en gran parte la persistencia de los hidrocarburos sobre la superficie del mar (Otero, y otros, 2014)

- ***Disolución del petróleo.***

La disolución es el proceso por el cual las fracciones de menor peso molecular del petróleo se diluyen en el volumen de la columna de agua y en los alrededores del derrame (Silos, 2008).

- ***Emulsión del petróleo.***

De acuerdo con María Martínez en el año 2013, detalla que el oleaje hace que se mezcle el petróleo con en agua formando una emulsión compacta en la superficie. En el caso del petróleo pueden formarse dos tipos de emulsiones:

- Petróleo en agua
- Agua en petróleo

En ambos casos va a ser el oleaje el responsable del fenómeno, pero sus propiedades son muy distintas.

- ***Oxidación del petróleo.***

La oxidación se define como la pérdida de electrones por un átomo. A veces la oxidación se define como un aumento del estado de oxidación de un elemento. Mientras que la reducción se define como la ganancia de electrones en un átomo,

a veces la reducción se define como una disminución del estado de oxidación. Las partículas de crudo reaccionan con el oxígeno, formando alquitrán mientras otras se disuelven por la acción de oxidación (Nicasio, 2012).

- ***Sedimentación del petróleo.***

Consiste en el desplazamiento vertical hacia abajo de las partículas de hidrocarburo. Depende de su densidad (respecto del agua), del tamaño de las partículas y del estado de agitación del mar (Arenas Camps, 2015).

### **2.6.2 Derrames en ambientes terrestres.**

El tipo de suelo -arena, limo y arcilla- y la cantidad de materia orgánica existente determinan el destino de los hidrocarburos del petróleo y la extensión del daño a las plantas (Yu, Liu y Wu, 2013)

La contaminación por hidrocarburos de petróleo ejerce efectos adversos sobre las plantas indirectamente, generando minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, además, conduce a un deterioro de la estructura del suelo; pérdida del contenido de materia orgánica; y pérdida de nutrientes minerales del suelo, tales como potasio, sodio, sulfato, fosfato, y nitrato (Serrano, Torrado y Pérez, 2013).

Ante la presencia de aceite, por ejemplo, un suelo arenoso saturado por este tipo de derrame tiende a perder parámetros como la permeabilidad o la compactación, puede llegar a sufrir variaciones cuyos comportamientos están asociados a la saturación del aceite en el medio (Serrano, Torrado y Pérez, 2013).

Además, los suelos arenosos con concentraciones de aceites superiores hasta del 6% pueden reducir drásticamente la capacidad de carga de los suelos (Shin y Das, 2001).

Los derivados de hidrocarburos -gasolina, queroseno, aceites, combustibles, parafinas, y el asfalto, entre muchos otros- no solo impactan la capa superficial

del suelo, también corren el riesgo de ser movilizados hasta aguas subterráneas generando así su contaminación, o incluso pueden ser transportados por escorrentía incrementado aún más el daño ambiental. Dicha contaminación afecta las condiciones fisicoquímicas de agua al presentarse una disminución de oxígeno disuelto debido a la reducción de la transferencia de oxígeno entre la fase atmósfera – agua, al igual que la entrada de luz al medio, lo que inhibe el crecimiento de ciertas especies y disminuye la fijación de nutrientes (Jiménez, 2006).

### **2.6.3 Derrames en ambientes fluviales.**

El transporte y destino del petróleo y sus derivados en cuerpos de agua, está gobernado por distintos procesos físico-químicos y biológicos interrelacionados, los cuales dependen de las condiciones hidrodinámicas, de los sedimentos suspendidos, de los agentes ambientales y de las propiedades del petróleo. Una vez que el petróleo ingresa al cuerpo de agua, se esparce generando una película sobre la superficie del agua (Hung Tao y Poojitha, 1988).

El petróleo forma una región fuente, que varía en el tiempo, es independiente de la hidrodinámica del escurrimiento y depende de efectos gravitatorios, inerciales y viscosos, este proceso es llamado dispersión mecánica (Fay, 1971).

El área ocupada por el derrame se moviliza también de acuerdo a las condiciones advectivas del escurrimiento y del viento. Una parte de la masa de petróleo se pierde por evaporación hacia la atmósfera, otra parte interactúa con el agua por disolución. Si el escurrimiento presenta determinadas condiciones de turbulencia una porción del petróleo forma, por emulsión, pequeñas gotas las que pueden depositarse sobre el lecho. Cuando el petróleo alcanza los bordes del cuerpo de agua, una parte del mismo queda sorbida a los sedimentos que la conforman. Al mismo tiempo que ocurren los procesos descritos, la cantidad de petróleo puede aún reducirse por efecto de reacciones fotoquímicas y por degradación biológica (Hung Tao y Poojitha, 1988).

De acuerdo con FAY en el año de 1971, detalla que la dispersión mecánica es más relevante que la difusión horizontal debido a la turbulencia. Se establece un balance dinámico de fuerzas en el proceso de dispersión, según el cual la fuerza gravitatoria y la de tensión superficial, que tienden a aumentar el tamaño de la mancha, son balanceadas por las fuerzas de inercia y de tensión viscosa. Se consideran tres fases en la dispersión mecánica:

- ***Fase 1***

El fluido ingresa al cuerpo de agua la diferencia de densidad entre el petróleo y el agua genera un gradiente de presión actuando en la dirección horizontal de la mancha. La fuerza gravitacional es contrabalanceada inicialmente por la fuerza de inercia que se opone al movimiento, efecto conocido como dispersión inercial.

- ***Fase 2***

Debido a la naturaleza dinámica del proceso, en la interfase agua-óleo se genera una fuerza contraria al movimiento debido al arrastre viscoso dando lugar a otra fase llamada dispersión viscosa.

- ***Fase 3***

A medida que decrece la importancia de los efectos gravitatorios, la viscosidad es balanceada por la tensión superficial dando lugar al proceso de dispersión por tensión superficial.

## **2.6 TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN**

Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición en tierra de desechos peligrosos que no han sido tratados, y sus capacidades o posibilidades de éxito, bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar ampliamente (EPA, 2001).

El uso de una tecnología de remediación en particular depende, además de los factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada o proyectada, de su estado de desarrollo (laboratorio, escala piloto o gran escala) y de su costo (Sellers, 1999).

### **2.7.1 Clasificación de tecnologías de remediación**

Es importante mencionar que cada una de estas clasificaciones proporciona diferente información acerca de las tecnologías de remediación. A continuación, se describen con más detalle las clasificaciones:

- ***Estrategia de remediación.***

Según (Van Deuren *et al*, 1997), las tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados son:

- *Destrucción o modificación de los contaminantes.*

Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.

- *Extracción o separación.*

Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).

- *Aislamiento o inmovilización del contaminante.*

Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

- ***Lugar de realización del proceso de remediación.***

Sellers en 1999 determina dos tipos de tecnología explicadas a continuación:

- *In situ.*

Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.

- *Ex situ.*

La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio o fuera de él.

- ***Tipo de tratamiento***

Tipo de tratamiento. Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento

- *Tratamientos biológicos (biorremediación).*

Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (Sellers, 1999).

- *Tratamientos fisicoquímicos.*

Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación (Sellers, 1999).

- *Tratamientos térmicos.*

Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo (Sellers, 1999).

Según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU en el año 2001, detalla que las tecnologías de remediación pueden clasificarse con base en el tiempo

que llevan en el mercado y al grado de desarrollo en el que se encuentran, en tecnologías tradicionales y en tecnologías innovadoras:

- ***Tecnologías tradicionales.***

Son tecnologías utilizadas comúnmente a gran escala, cuya efectividad ha sido probada. La información disponible acerca de costos y eficiencia es de fácil acceso. Entre las tres tecnologías tradicionales usadas con mayor frecuencia, se encuentran: la incineración in situ y ex situ, la solidificación/estabilización, la extracción de vapores y la desorción térmica.

- ***Tecnologías innovadoras.***

Son tecnologías propuestas más recientemente, que pueden encontrarse en diferentes etapas de desarrollo (investigación, escala piloto o gran escala). Su limitado número de aplicaciones genera la falta de datos acerca de sus costos y eficiencias. En general, una tecnología de tratamiento se considera novedosa si su aplicación a gran escala ha sido limitada.

## **2.7.2 Tecnologías de remediación biológicas (Biorremediación)**

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al*, 1997).

Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de oxidoreducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Eweis *et al*, 1998).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse in situ o ex situ, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Eweis *et al*, 1998).

- ***Tecnologías in situ.***

Las técnicas in situ buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (EPA, 2001).

- *Bioventeo.*

El bioventeo es una tecnología relativamente nueva, cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores (Van Deuren *et al*, 1997).

Se utiliza para tratar compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles o no volátiles. Además de favorecer la degradación de contaminantes adsorbidos, por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo (Eweis *et al*, 1998).

De acuerdo a (Eweis *et al*, 1998), los factores que pueden limitar la efectividad del bioventeo son:

- El tipo y la concentración del contaminante.
- Falta de nutrientes;
- Bajo contenido de humedad

- Dificultad para alcanzar el flujo de aire necesario

Es una tecnología en la que los tiempos de limpieza pueden variar desde algunos meses hasta varios años, y sus costos de operación varían entre 10 y 70 USD/m<sup>3</sup>. Esta tecnología no requiere de equipo caro, pero los costos pueden variar en función de la permeabilidad del suelo, espacio disponible, número de pozos y velocidad de bombeo (Van Deuren *et al*, 1997).

- *Bioestimulación.*

La bioestimulación implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ* (Van Deuren *et al*, 1997).

Se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, COV, COS y pesticidas. Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O<sub>2</sub> (Alexander, 1994).

De acuerdo a Alexander en el año 1994, detalla los factores que pueden limitar su aplicación, incluyen:

- que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano
- incremento en la movilidad de los contaminantes
- obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.

La limpieza de una pluma de contaminación, puede tomar varios años. Su costo oscila entre 30 y 100 USD/m<sup>3</sup>. La naturaleza y profundidad de los contaminantes y el uso de bioaumentación puede aumentar sus costos (Van Deuren *et al*, 1997).

○ *Bioaumentación.*

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser-Roberts, 1998).

Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994).

○ *Biolabranza.*

Durante el proceso de biolabranza, la superficie del suelo contaminado es tratado en el mismo sitio por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, aireación) se controlan para optimizar la velocidad de degradación y generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviado (Riser-Roberts, 1998).

Los contaminantes tratados con éxito por biolabranza, incluyen diésel, gasolinas, lodos aceitosos, creosota y coque, además de algunos pesticidas (Alexander, 1994).

La biolabranza debe manejarse con cuidado para prevenir la contaminación de acuíferos, superficies de agua, aire o en la cadena alimenticia. El mayor problema es la posibilidad de lixiviados de los contaminantes hacia el suelo y el agua. Otra limitante para su utilización, es que, por la incorporación de suelo contaminado en suelo limpio, se genera un gran volumen de material contaminado. No es recomendable su uso para contaminantes diluidos, ni

tampoco cuando no todos los contaminantes son biodegradables (Van Deuren *et al*, 1997).

- *Fitorremediación.*

La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación y la fitoestabilización (Hutchinson, Banks, y Schwab, 2001).

La rizodegradación se lleva a cabo en el suelo que rodea a las raíces. Las sustancias excretadas naturalmente por éstas, suministran nutrientes para los microorganismos, mejorando así su actividad biológica. Durante la fitoextracción, los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación), y posteriormente éstos son traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción). En la fitoestabilización, las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción en las raíces de compuestos químicos que pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interfase raíces-suelo (Sellers, 1999).

- *Tecnologías ex situ.*

Los procesos de biorremediación *ex situ*, incluyen, procesos de biodegradación en fase de lodos, en donde el suelo se mezcla con agua (para formar un lodo), microorganismos y nutrientes; y de biodegradación en fase sólida, en donde los suelos colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes (EPA, 2001).

- *Biorremediación en fase sólida (composteo)*

Las pilas estáticas (biopilas) son una forma de composteo en el cual, además de agentes de volumen, el sistema se adiciona con agua y nutrientes, y se coloca en áreas de tratamiento (que incluyen alguna forma de aireación y sistemas para coleccionar lixiviados). Las pilas de suelo generalmente se cubren con plástico para

controlar los lixiviados, la evaporación y la volatilización de contaminantes, además de favorecer su calentamiento (Eweis, 1998).

Según (Van Deuren *et al*, 1997), Algunas limitaciones del proceso son:

- necesidad de espacio
- necesidad de excavar el suelo contaminado, lo que puede provocar la liberación de COV
- incremento volumétrico del material a tratar
- no pueden tratarse metales pesados

De acuerdo a (Riser-Roberts, 1998), es una tecnología que puede llevar desde algunas semanas hasta varios meses. Los costos típicos se encuentran entre 130 y 260 USD/m<sup>3</sup>, el costo del composteo está en función de:

- la cantidad y fracción de suelo a tratar
  - disponibilidad de agentes de volumen
  - tipo de contaminantes y proceso
  - necesidad de tratamientos previos y/o posteriores
  - necesidad de equipos para el control de COV
- *Biorremediación en fase de lodos (biorreactores)*

Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, ya que es posible combinar controlada y eficientemente, procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Riser-Roberts, 1998).

Uno de los reactores más utilizados para biorremediar suelos es el biorreactor de lodos, en el cual el suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en

suspensión o inmovilizados en la fase sólida. El tratamiento puede realizarse también en lagunas construidas para este fin o bien en reactores sofisticados con control automático de mezclado (Alexander, 1994).

Los biorreactores de lodos aerobios, se utilizan principalmente para tratar HTP, COS no halogenados y COV. Se utilizan también reactores secuenciales de lodos aerobios/anaerobios para tratar BPC, COS halogenados, pesticidas y desechos de artillería (Van Deuren *et al*, 1997).

De acuerdo con (Riser-Roberts, 1998) y (Van Deuren *et al*, 1997), algunos factores que pueden limitar el uso y efectividad de los biorreactores son:

- El suelo debe tamizarse
  - Suelos heterogéneos y arcillosos pueden generar problemas de manipulación
  - Los productos intermediarios pueden ser más tóxicos que el contaminante original (en caso de explosivos o solventes clorados)
  - Los residuos pueden requerir de tratamiento o disposición final
- ***Tecnologías de remediación fisicoquímicas.***

Como ya se mencionó, los tratamientos fisicoquímicos aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. Este tipo de tecnologías generalmente son efectivas en cuanto a costos y pueden concluirse en periodos cortos, en comparación con las tecnologías de biorremediación. Sin embargo, los costos pueden incrementarse cuando se utilizan técnicas de separación en las que los contaminantes pueden requerir de tratamiento o disposición (Van Deuren *et al*, 1997).

- *Remediación electrocinética (RE).*

La remediación electrocinética es una tecnología en desarrollo que aprovecha las propiedades conductivas del suelo, cuyo objetivo es separar y extraer

contaminantes orgánicos e inorgánicos (metales) de suelos, lodos y sedimentos, con el uso de un campo eléctrico que permite remover las especies cargadas (iones). Implica la aplicación de una corriente directa de baja intensidad entre un electrodo positivo y uno negativo (Van Cauwenberghe, 1997) & (Paillat T. *et al*, 2000).

Los iones metálicos, iones amonio y compuestos orgánicos con carga positiva, migran hacia el cátodo; mientras que los aniones como el cloruro, cianuro, fluoruro, nitratos y compuestos orgánicos cargados negativamente se mueven hacia el ánodo (EPA, 2001).

○ *Solidificación/estabilización (S/E).*

La S/E es un proceso en el que el suelo contaminado se mezcla con aditivos para inmovilizar los contaminantes, disminuyendo o eliminando la lixiviación. La solidificación se refiere a las técnicas que encapsulan (atrapan físicamente) al contaminante formando un material sólido, y no necesariamente involucra una interacción química entre el contaminante y los aditivos solidificantes. La estabilización limita la solubilidad o movilidad del contaminante, generalmente por la adición de materiales, como cemento Portland, cal o polímeros, que aseguren que los constituyentes peligrosos se mantengan en su forma menos móvil o tóxica (Sellers, 1999).

La S/E puede realizarse tanto in situ como ex situ. Para la S/E ex situ, el material a tratar debe excavar para tratarse, de manera que el material resultante sea dispuesto. En la S/E in situ pueden utilizarse sistemas para cubrir los suelos contaminados sin necesidad de excavar, de manera que el material se deja en el mismo sitio (EPA, 2001).

Los COV tienden a volatilizarse durante el mezclado del suelo con los agentes de solidificación/estabilización, y generalmente éstos no son inmovilizados; la profundidad a la que se encuentre el contaminante limita algunos procesos; el material solidificado puede impedir el futuro uso del sitio; los metales volátiles (Pb, Cd, As, Hg) pueden volatilizarse durante el tratamiento y no es recomendable para sitios con más de 25% de metales (Riser-Roberts, 1998).

○ *Tratamiento químico.*

El tratamiento químico, típicamente involucra reacciones de oxidación-reducción (redox) que convierten químicamente compuestos tóxicos o peligrosos a compuestos menos tóxicos o no peligrosos, que son más estables, menos móviles o inertes. Los agentes oxidantes más usados para tratar contaminantes peligrosos en el suelo, son el ozono, peróxido de hidrógeno, hipocloritos, cloro, dióxido de cloro y el reactivo de Fenton (peróxido de hidrógeno y fierro). Este método puede aplicarse in situ o ex situ en suelos, lodos, sedimentos y otros sólidos (Van Deuren *et al*, 1997).

Por este método pueden atacarse principalmente compuestos inorgánicos. Sin embargo, puede usarse con menor eficiencia para COV no halogenados y COS, gasolinas y pesticidas. Puede ocurrir una oxidación incompleta o formación de compuestos intermediarios, dependiendo del contaminante y el agente oxidante usado; la presencia de aceites y grasas disminuye la eficiencia y los costos se incrementan para altas concentraciones de contaminantes (Van Deuren *et al*, 1997).

○ *Separación física.*

Las técnicas de separación buscan concentrar los contaminantes sólidos por medios físicos y químicos. La mayoría de los contaminantes orgánicos e inorgánicos tienden a unirse, química o físicamente, a la fracción más fina del suelo. Las partículas finas de arcillas y sedimentos pueden separarse de arenas y gravas gruesas para concentrar los contaminantes en volúmenes menores de suelo. De esta manera, el volumen de suelo obtenido puede tratarse o disponerse (EPA, 2001).

La separación ex situ puede realizarse por varios procesos. La separación por gravedad (por diferencia de densidad entre fases) y la separación por tamaño de partícula (concentración de contaminantes en volúmenes menores) son dos procesos bien desarrollados. En cambio, la separación magnética (extracción de partículas magnéticas) es un proceso mucho más novedoso que aún se encuentra en desarrollo (EPA, 2001).

- ***Tecnologías de remediación térmicas.***

Las tecnologías térmicas de separación producen vapores que requieren de tratamiento; las destructivas producen residuos sólidos (cenizas) y, en ocasiones, residuos líquidos que requieren de tratamiento o disposición. Es importante hacer notar que, para ambos tipos de tratamiento, el volumen de residuos generados que requieren de tratamiento o disposición, es mucho menor que el volumen inicial (Van Deuren *et al*, 1997).

- *Desorción térmica (DT).*

Los procesos de DT consisten en calentar (90 a 540 °C) el suelo contaminado con contaminantes orgánicos, con el fin de vaporizarlos y por consiguiente separarlos del suelo. El calor acelera la liberación y el transporte de contaminantes a través del suelo, para posteriormente ser dirigidos hasta un sistema de tratamiento de gases con el uso de un gas acarreador o un sistema de vacío. Es un proceso de separación física no destructivo (EPA, 2001).

Según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU en el año 2001, detalla que con base en la temperatura de operación, la DT puede clasificarse en dos grupos:

- Desorción térmica de alta temperatura (DTAT). Es una tecnología a gran escala en la cual los desechos son calentados a temperaturas que varían entre los 320 y los 560 °C. Frecuentemente se utiliza en combinación con la incineración o S/E, dependiendo de las condiciones específicas.
- Desorción térmica de baja temperatura (DTBT). Los desechos se calientan a temperaturas entre 90 y 320 °C. Es una tecnología a gran escala que se ha probado con éxito en el tratamiento de varios tipos de suelos contaminados con HTP.

El proceso de DT puede aplicarse en general, para la separación de compuestos orgánicos de desechos, así como para suelos contaminados con creosota e hidrocarburos. Los sistemas de DTBT pueden usarse para tratar COV no

halogenados y gasolinas y, con menor eficiencia, para COS. Los procesos de DTAT se utilizan principalmente para tratar COS, HAP, BPC y pesticidas, pero pueden aplicarse también para COV y gasolinas (Van Deuren *et al*, 1997).

○ *Incineración.*

En los procesos de incineración tanto in situ como ex situ, se utilizan altas temperaturas de operación que van desde los 870 a los 1,200 °C, con la finalidad de volatilizar y quemar compuestos orgánicos y halogenados en presencia de oxígeno. Generalmente se utilizan combustibles para iniciar el proceso de combustión. Las eficiencias de remoción y destrucción de los incineradores operados adecuadamente exceden el 99.99%. Sin embargo, los gases de combustión generalmente requieren de tratamiento. Existen diferentes tipos de incineradores (Van Deuren *et al*, 1997).

○ *Vitrificación.*

El proceso de vitrificación puede llevarse a cabo in situ o ex situ, y utiliza una corriente eléctrica para fundir los suelos contaminados con temperaturas que van de 1,600 a 2,000 °C. Es un proceso de S/E que estabiliza la mayoría de los contaminantes inorgánicos y destruye los orgánicos. El producto de la vitrificación es un material cristalino químicamente estable que no produce lixiviados, en el cual quedan incorporados los compuestos inorgánicos. Durante el proceso, las altas temperaturas, provocan la destrucción o remoción de los materiales orgánicos (EPA, 2001).

○ *Pirólisis.*

La pirólisis es la descomposición química de materiales orgánicos inducida por calor en ausencia de oxígeno. El proceso normalmente se realiza a presión y temperaturas de operación mayores a 430 °C. Los hornos y equipos utilizados para la pirólisis pueden ser físicamente similares a los utilizados para la incineración, pero se deben operar a temperaturas menores en ausencia de aire (Riser-Roberts, 1998).

De acuerdo a Kreiner en el año 2002, describe que los productos primarios formados de la pirólisis de materiales orgánicos, en diferentes proporciones de acuerdo con las condiciones del proceso, son:

- Gases residuales (metano, etano y pequeñas cantidades de hidrocarburos ligeros)
  - Condensados acuosos y aceitosos
  - Residuos sólidos carbonosos (coque) que pueden usarse como combustible
- *Trenes de tratamientos.*

En algunos casos, dos o más tecnologías innovadoras o tradicionales pueden usarse juntas en lo que se conoce como «trenes de tratamiento». Estos trenes de tratamiento son procesos integrados o bien, una serie de tratamientos que se combinan en una secuencia para proporcionar el tratamiento necesario. En general, los trenes de tratamiento se emplean cuando no todos los contaminantes en un medio particular, pueden tratarse con una sola tecnología (EPA, 2001).

Según (EPA, 2001), un suelo contaminado con compuestos orgánicos y metales puede tratarse primero por biorremediación para eliminar los compuestos orgánicos y después por S/E para reducir la lixiviación de los metales. En otros casos, un tren de tratamientos puede usarse para:

- hacer un medio más fácilmente tratable por una tecnología subsecuente
- para reducir la cantidad de desechos que necesitan un tratamiento posterior con una tecnología subsecuente y más costosa
- para disminuir el costo total del tratamiento

## **2.7 MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN PETROLEO**

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos

químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir. En el caso de los hidrocarburos, las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono (Venosa *et al*, 1999).

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado (Hanson *et al*, 1997). Las poblaciones nativas pueden ser sensibles a la presencia y la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, visto las diferencias metabólicas, producen en algunos casos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa. Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Thomassin – Lacroix *et al*, 2002).

## **2.8 BACTERIAS PSEUDOMONAS**

Según (Golovleva *et al*, 1990), las Pseudomonas son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica.

Las Pseudomonas es un bacilo gram negativo aeróbico que existe en el suelo, pero también en el agua dulce y salada. Este género consume todo tipo de sustratos orgánicos como los azúcares y aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, ácidos húmicos e inclusive algunos plaguicidas sintéticos (Davids, Flemming, y Wilderer, 1998).

Los microorganismos pertenecientes al género Pseudomonas son un grupo muy diverso de bacterias Gram negativas en forma de varillas, con frecuencia móviles. Las Pseudomonas se encuentran típicamente en las plantas y en el suelo, donde actúan como actores clave en eventos cruciales para el medio ambiente, como el ciclo del carbono, el ciclo del nitrógeno, la biodegradación y la descomposición. Se caracterizan por una gran diversidad metabólica y contienen información genética necesaria para la producción de

vías enzimáticas responsables de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, incluidos los compuestos que pocos otros organismos son capaces de degradar (Reuter, 2019).

Para que un hidrocarburo sea reconocido por un microorganismo como sustrato utilizable por este mismo, los receptores localizados sobre la membrana celular deben reconocer algunos grupos químicos con el fin de adsorber las moléculas. Cuando un hidrocarburo es demasiado soluble, penetra la membrana, la vuelve inestable y provoca una lisis celular. Por esta razón es que muchos compuestos solubles son considerados tóxicos para las bacterias (Pieper y Reineke, 2000).

Además de su capacidad única para degradar una miríada de compuestos orgánicos, las *Pseudomonas* también son bien conocidas por su mayor tolerancia a condiciones ambientales desfavorables al crecimiento de muchas otras bacterias. Estos incluyen ambientes de salinidad moderada tales como agua marina, ambientes que contienen sustancias tóxicas tales como Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC) entre otros, e incluso condiciones de privación de nutrientes que son inadecuadas para la viabilidad de muchos microorganismos. La superioridad microbiana en el papel de la Biorremediación se atribuye a su tolerancia a los productos químicos y ambientes desfavorables (Reuter, 2019).

Por otro lado, los compuestos no tóxicos son transportados selectivamente (reconocimiento bioquímico) hacia el citoplasma de la bacteria y toman diferentes rutas de metabolización. Pasando por varias etapas, el compuesto puede ser parcial o completamente degradado o mineralizado. La mineralización implica la transformación total del reactivo en agua y dióxido de carbono (Harris, 1997).

Los hidrocarburos presentan la particularidad de adsorberse rápida y fuertemente a las partículas del suelo. Esta peculiaridad junto con la gran variedad de hidrocarburos hace necesario concebir consorcios bacterianos que logran trabajar juntos para la descomposición natural de los contaminantes. La degradación de la gasolina alcanza un nivel óptimo al combinar apropiadamente los microorganismos, nutrientes inorgánicos y orgánicos y surfactantes, el todo asociado con buenas condiciones de oxigenación (Rahman *et al*, 2001).

Existe una diferencia entre las tasas de degradación de los contaminantes en estado puro y aquellos que forman parte de una mezcla de hidrocarburos, como en el caso del diésel y la gasolina. Para una degradación más rápida y completa es preferible degradarlos a partir de su forma pura antes que en presencia de otros hidrocarburos (Greene *et al*, 2000).

La baja solubilidad de los hidrocarburos en medio acuoso necesita la acción de surfactantes para incrementar su biodisponibilidad y su metabolización por los microorganismos (Harris, 1997). Como el efecto de los emulsificantes químicos sobre las bacterias y la dispersión de los hidrocarburos no está muy claro, es preferible trabajar con cepas que producen un bioemulsificante a la vez que degradan los hidrocarburos. Ha sido comprobado por varios autores que los surfactantes de origen químico pueden provocar una inhibición del crecimiento de los microorganismos y una disminución del rendimiento de la biodegradación. Su fuerte actividad tensoactiva disminuye la estabilidad de las membranas celulares y produce una lisis celular. Sin embargo, los biosurfactantes producidos por los microorganismos degradadores no son tóxicos para estos (Lepo *et al*, 2001).

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo corresponde a una investigación experimental, que se presenta mediante la manipulación de una variable no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con este fin se descubrirá de qué modo se produce la biorremediación en ambientes contaminados con petróleo.

El investigador introduce determinadas variables de estudio manipuladas por él, así puede controlar la concentración y su efecto en las condiciones planteadas.

### **3.2 POBLACIÓN**

La población utilizada para esta investigación estaba constituida por 10 000 mililitros de medio acuoso con glucosa y 5000 mililitros de medio acuoso con petróleo, elaborada en el laboratorio a condiciones controladas.

Las bacterias *Pseudomonas* se obtuvieron de fosas sépticas y posteriormente se realizaron cultivos de cepas bacterianas en cajas Petri.

### **3.3 MUESTRA**

Las muestras utilizadas fueron 100 mililitro de medios acuosos para cada prueba realizada.

Las muestras de *Pseudomonas* se aislaron en tubos de 20 mililitros con 10 mililitros de medio bacteriano

### 3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñó como un experimento factorial constando de tres factores, con diferentes niveles. Este diseño permite el estudio de cada factor sobre la variable establecida y el efecto de las interacciones.

#### 3.4.1 Variable independiente

Las variables independientes utilizadas son:

- Tiempo, (horas)
- Dosificación de Pseudomonas, (mililitros)
- Dosificación de Petróleo, (mililitros)

Valores de los niveles para cada variable se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2: Valores de los niveles y variables

Variable	Niveles
Tiempo, (horas)	1, 24 y 48
Dosificación de pseudomonas, (mililitros)	1, 5 y 10
Dosificación de hidrocarburos, (mililitros)	5, 10 y 20

#### 3.4.3 Variable dependiente

- Porcentaje de biorremediación de Petróleo, en (%)

Se realizó 27 pruebas, combinando las variables y cada prueba se repitió 3 veces para eliminar el porcentaje de incertidumbre, véase en la Figura 1.

Figura 2: Esquema del diseño experimental en 100 mililitro de medio acuoso

Cantidad de Pseudomonas (mililitro)		1			5			10		
		5	10	20	5	10	20	5	10	20
Tiempo de Biorremediación (horas)	1	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
	24	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
		R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
		R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
	48	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27
		R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27
		R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27

### 3.5 MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa bacteriana utilizada se obtuvo de fosas sépticas y se cultivó inicialmente en Bacto Agar. A las 24 horas, la pureza del cultivo fue verificada por medio de un microscopio y repartido en tubos de ensayos cerrados que contenían 10 mililitro de

medio acuoso (MA) al 20% de glicerol y conservado a -17 °C en un congelador tradicional.

La cepa fue inoculada en un medio acuoso (MA) con el fin de realizar pruebas de la densidad óptica a 660 nm sobre un espectrofotómetro, esto permitió llevar a cabo una curva de crecimiento de la cepa dentro de las 48 horas posterior a su inoculación desde el medio sólido (Bacto Agar) hasta el medio acuoso (MA).

### **3.5.1 Medios de cultivo**

El cultivo en placas se realizó sobre un medio sólido compuesto por:

- 15 gr / l de Bacto Agar (TCBS)
- 10 gr / l de triptona
- 5 gr / l de extracto de levadura
- 10 gr / l de NaCl
- Agua destilada

El cultivo se llevó a cabo en un medio acuoso (MA) compuesto por:

- 10 gr / l de triptona
- 5 gr / l de extracto de levadura
- 10 gr / l de NaCl
- Agua destilada

Las pruebas con petróleo se realizaron en un medio acuoso estándar (MAE) compuesto por:

- Agua destilada

Todos los medios fueron autoclavados a 100 °C y el medio acuoso (MA) presentó un pH neutro a partir de su preparación.

### **3.5.2 Preparación de cultivos**

Veinticuatro horas antes de la inoculación en el medio acuoso, se inoculó la cepa en el medio sólido en cajas petri para posteriormente ser incubadas en un horno a 37 °C cerrado herméticamente. Luego de este lapso, los cultivos se observaron en el microscopio para asegurar su pureza.

Se inoculó la cepa desde las cajas petri hasta los 10 tubos de ensayos, que contenían ocho mililitros de medio acuoso y dos mililitros de glicerol cada uno, el nuevo cultivo se conservó a -17 °C y así se obtuvo 100 mililitro para las pruebas.

Para inocular los medios en presencia de petróleos se preparó un medio con 100 mililitros de medio acuoso y todo se incubó a 37 °C previamente agitado. Pasadas 24 horas se obtiene una muestra para asegurarse de su pureza y medir la densidad óptica (D.O.). Los cultivos se centrifugan a 10000 revoluciones por minuto en una centrífuga Triac BC Clay Adams, con la finalidad de lavar las células y descartar todo residuo en nuestro cultivo.

### **3.6 PRUEBAS EN MEDIO LÍQUIDO**

Se preparó 100 mililitros de medio acuoso, un mililitro de cultivo y 0,5 mililitros de glucosa en los erlenmeyers de 250 mililitros. Posteriormente se añadió 5, 10 y 20 mililitros de petróleo respectivamente, los erlenmeyers fueron agitados a 300 revoluciones por minuto e incubaron a 37 °C.

Se tomaron muestras de los erlenmeyers cada hora para examinarlas en el microscopio y leer la medida de la densidad óptica indirectamente según la presencia de petróleo en el medio acuoso del cultivo.

### **3.6.1 Lectura de la Densidad Óptica indirectamente**

Se utiliza este método para los cultivos con presencia de petróleo, esto debido a que la emulsión formada interfiere con la medida de turbidez de las bacterias en solución. Para ello se toma una muestra de 10 mililitros de cada erlenmeyer y se centrifugan cinco minutos a 10000 revoluciones por minuto.

El precipitado se diluyó en cinco mililitros de agua destilada e introducidos en un vortex para obtener una solución homogénea y hacer la prueba de densidad óptica a 660 nanómetros en un espectrofotómetro, siguiendo el mismo procedimiento de la lectura de D.O. directa hecha al cultivo.

### **3.6.2 Evolución microbiana (Análisis)**

Se preparó en erlenmeyers de 220 mililitros de capacidad 100 mililitros de medio acuoso, 1 mililitros de cultivo y 0,5 mililitros de glucosa sin añadir petróleo, con el objetivo de tomar muestras cada hora. Se realiza un análisis de pureza a las muestras en el microscopio y se determina la densidad óptica para tener una idea de la evolución bacteriana con el transcurso del tiempo que dura la investigación.

## **3.7 CUANTIFICACIÓN DE PETRÓLEO BIORREMEDiado**

Para determinar el porcentaje de petróleo se procedió a obtener muestras del medio líquido de los erlenmeyers. Estas muestras se introducen en un agitador vortex para homogenizar la solución y posteriormente se tomó cinco mililitros y se procedió a poner sobre el cristal del TOG / TPH Analyzer (InfraCal) para su análisis con un mililitro de hexano. El resultado se obtiene en ppm.

## **3.8 EQUIPOS**

- ❖ Balanza BLC-500. Apreciación (0,1 – 500) gramos
- ❖ Espectrofotómetro, HACH DR 2800
- ❖ TOG / TPH Analyzer, Infracal

- ❖ Azul de metileno
- ❖ Macropipeteador, BOECO Germany
- ❖ Pipetas, 0,5 – 1 – 10 mililitros
- ❖ Termómetros, 50 °C – 100°C – 200 °C
- ❖ Horno de laboratorio, T° max. 50 °C
- ❖ Centrifugadora Clay Adams, rango hasta 12000 revoluciones por minutos
- ❖ Autoclave, 40 litros
- ❖ Erlenmeyers, 100 – 250 – 1000 – 2000 mililitros
- ❖ Mechero
- ❖ Probetas, 100 – 200 – 500 – 1000 mililitros
- ❖ Vaso de precipitación, 100 ml – 250 ml
- ❖ Embudo de Laboratorio
- ❖ Tubos de ensayos, 20 mililitros
- ❖ Cajas petri de vidrio, 20 mililitros

### **3.9 REACTIVOS**

- ❖ Bacterias Pseudomonas, procedente de fosas sépticas
- ❖ Triptona
- ❖ Extracto de levadura
- ❖ NaCl
- ❖ Bacto Agar
- ❖ Glucosa
- ❖ Agua destilada
- ❖ Petróleo crudo liviano, 36° API procedente de Ancón de la provincia de Santa Elena, Ecuador
- ❖ Hexano
- ❖ Glicerol

# CAPÍTULO IV: RESULTADOS

## 4.1 CULTIVO SOBRE UN MEDIO ACUOSO CON GLUCOSA

El seguimiento del crecimiento de las bacterias *Pseudomonas* permite hacer una relación con el tiempo que le toma a la cepa adaptarse en un nuevo cultivo, el lapso necesario para dividirse y el periodo que se mantiene antes de la mortalidad.

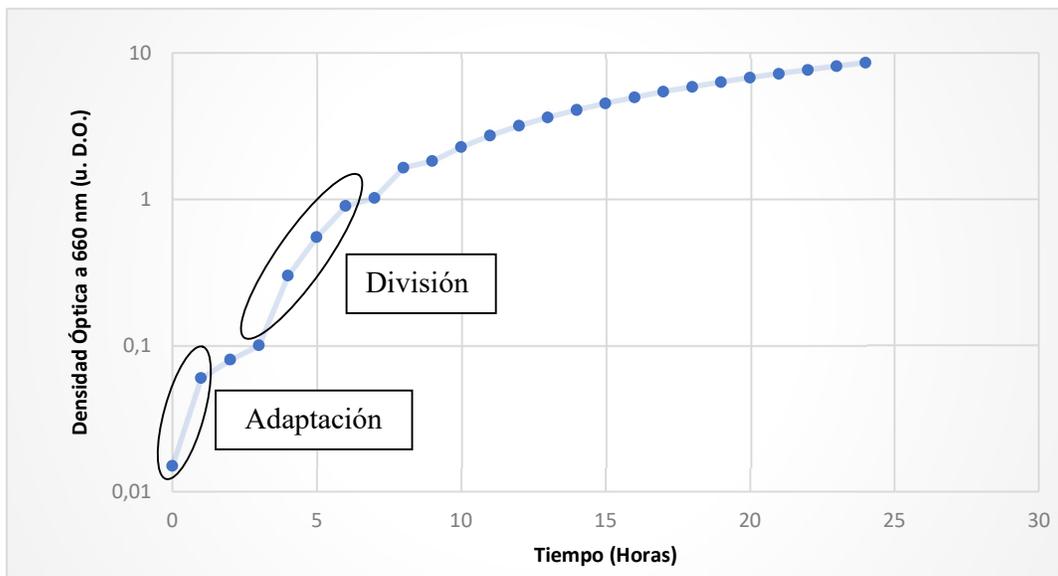


Figura 3: Curva de crecimiento de bacterias *Pseudomonas*, D.O. a 660 nm en función del tiempo

La Figura 2 muestra el crecimiento de las cepas de bacterias *Pseudomonas* en un medio acuoso enriquecido desde un tiempo 0, obteniendo que desde la primera hora las bacterias entran en las fases de adaptación y división. Luego de nueve horas el crecimiento de las bacterias es constante hasta las 24 horas de duración de la prueba.

La Tabla 3 muestra el parámetro de la densidad óptica (D.O.) inicial y final durante la prueba de crecimiento de las bacterias en un medio acuoso, enriquecido con glucosa al 0,5%.

Tabla 3: Característica de crecimiento de las bacterias Pseudomonas en un medio acuoso enriquecido

<b>CEPA</b>	<b>D.O. Inicial (t = 0 h)</b>	<b>D.O. final (t = 24 h)</b>
Pseudomonas	0,028	8,57

## 4.2 RESULTADOS DE BIORREMEDIACIÓN DE PETRÓLEO

A continuación, la Figura 3, muestra los porcentajes de biorremediación que se obtuvieron en diferentes tiempos y dosificaciones de Pseudomonas y petróleo.

Figura 4: Resultados de Biorremediación, representados en porcentaje (%)

<b>Cantidad de Pseudomonas (mililitros)</b>		<b>1</b>			<b>5</b>			<b>10</b>		
		<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>Tiempo de biorremediación (horas)</b>	<b>1</b>	0,23	0,09	0,03	1,13	0,95	0,41	1,92	1,63	1,25
		0,21	0,09	0,03	1,19	0,92	0,42	1,92	1,61	1,30
		0,21	0,09	0,03	1,14	0,95	0,41	1,93	1,63	1,27
	<b>24</b>	4,45	3,76	2,85	6,23	5,85	5,02	9,67	9,34	8,47
		4,44	3,72	2,87	6,30	5,90	5,04	9,67	9,38	8,48
		4,50	3,75	2,79	6,27	5,91	4,93	9,69	9,29	8,45
	<b>48</b>	4,46	3,72	2,82	6,26	5,86	5,07	9,70	9,31	8,46
		4,45	3,74	2,84	6,31	5,89	5,04	9,69	9,32	8,50
		4,51	3,73	2,73	6,29	5,85	5,08	9,72	9,29	8,48

En la Figura 3, se observa que el mayor porcentaje de biorremediación es de 9,72%, con una dosificación de 10 mililitros de Pseudomonas y 5 mililitros de petróleo, tomando en cuenta que, al tener el doble del volumen de bacterias sobre el volumen de petróleo, esto no influye en la biorremediación.

El análisis de los resultados muestra que la biorremediación se da en las primeras horas de la prueba, después de ese tiempo las bacterias no metabolizan adecuadamente la fuente de carbono (petróleo), debido a que la bacteria es aerobia necesita una fuente de oxígeno, teniendo en cuenta que el petróleo no contiene oxígeno.

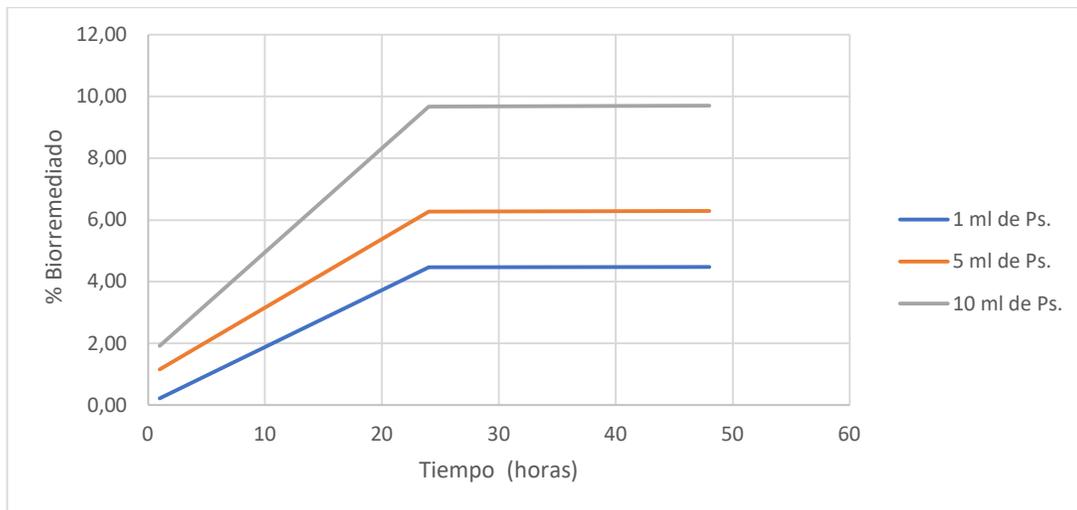


Figura 5: Porcentaje de biorremediación en función del tiempo y dosificación de Pseudomonas

En la Figura 4 se determinan los porcentajes de petróleo metabolizado por las bacterias, al analizar los tres casos determinamos que al aumentar las dosificaciones de Pseudomonas no es proporcional al porcentaje biorremediado, es decir, al tener 10 veces la dosificación de Pseudomonas el porcentaje de biorremediación debería ser 42% con respecto a la dosificación de un mililitro de bacterias que remedian el 4.2%, pero lo que nuestros resultados de las pruebas arrojaron es que, con el aumento de 10 veces la dosificación se remedió el 9,72 %.

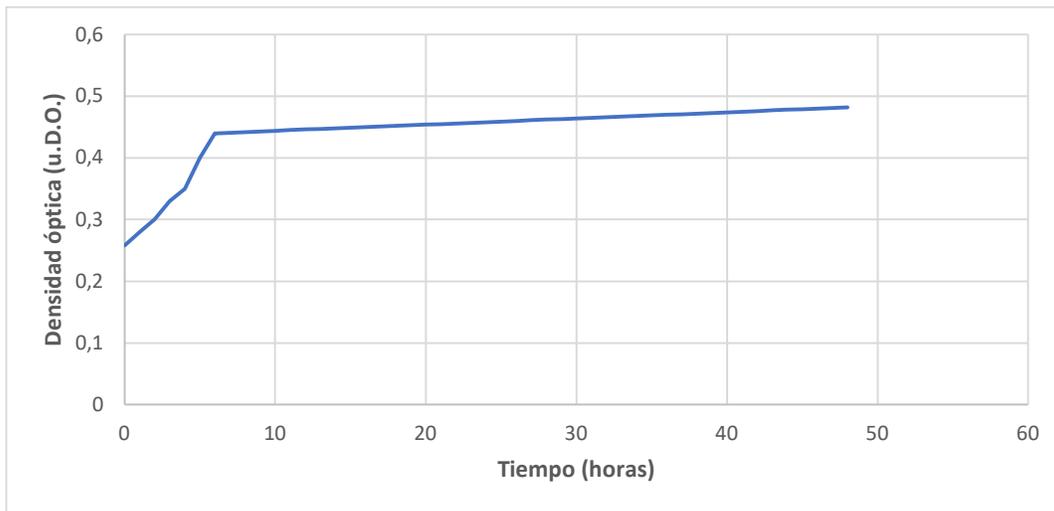


Figura 6: Evolución de crecimiento de bacterias Pseudomonas en medio acuoso con petróleo

En la Figura 5 se muestra el ritmo de crecimiento de las cepas de bacterias inoculadas en un medio acuoso con petróleo, se obtuvo que durante las primeras siete horas las fases de adaptación y división se dieron de manera normal, es decir que la división celular es viable para el crecimiento de la cepa bacteriana, dando como resultado una mitosis acelerada debido al consumo de carbono presentes en el petróleo. En estas siete horas se mantiene el número de bacterias vivas considerables para su división celular.

Transcurridas las ocho horas se obtiene que la lectura de la densidad óptica ha cambiado ligeramente, y empieza un crecimiento constante hasta las 48 horas de duración de la prueba. El crecimiento de manera constante indica que, el petróleo presente en las pruebas, es tóxico para la población bacteriana debido a que el número de bacterias vivas va disminuyendo a causa de la lisis celular

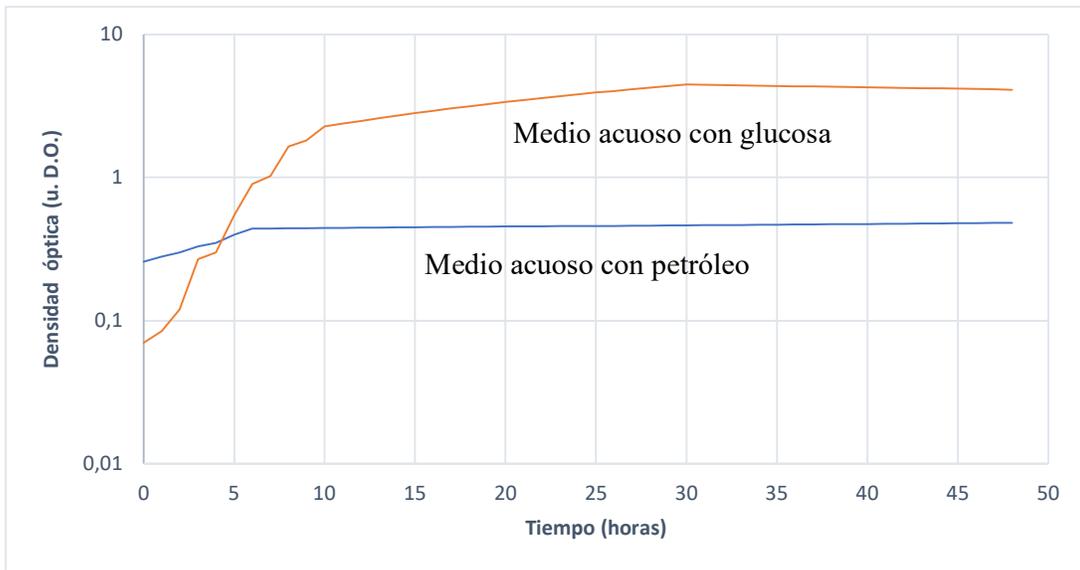


Figura 7: Evolución de crecimiento de bacterias Pseudomonas en dos medios acuosos

En la Figura 6 se hace una comparación de la evolución del crecimiento de las bacterias Pseudomonas en dos medios acuosos, con glucosa y petróleo, resultando una gran diferencia en las densidades ópticas. En el escenario con medio acuosos con glucosa las bacterias Pseudomonas metabolizan de manera acelerada el carbono presente en la muestra, debido a que la glucosa contiene oxígeno y las bacterias son aerobias, y en el medio acuosos con petróleo la metabolización del petróleo es deficiente.

En el microscopio se observó muestras de los medios acuosos, se visualizó que al transcurrir el tiempo las bacterias perdían movilidad hasta llegar a una etapa de lisis celular.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 CONCLUSIONES**

Las *Pseudomonas* presentaron un metabolismo acelerado en los medios acuosos enriquecidos con glucosa debido a una cantidad extra de oxígeno presente en la glucosa.

El porcentaje biorremediado NO es el esperado, debido a que luego de siete horas la falta de oxígeno en las muestras hace que la cepa bacteriana no se divida y esto evita que continúe con su proceso de mitosis.

Por la lisis celular de las bacterias *Pseudomonas* **NO** es viable aplicar cultivos en medios acuosos contaminados por petróleo debido a su toxicidad, matando la población bacteriana a partir de la séptima hora de incubación.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Realizar cultivos sucesivos de *Pseudomonas* en presencia de hidrocarburos para tener una mejor selección de cepas bacterianas con respecto a su capacidad metabólica

Constituir consorcios bacterianos capaces de biorremediar petróleo en medios acuosos.

Utilizar protección de bioseguridad nivel 2, para las pruebas con *Pseudomonas* en el proceso.

## REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press.
- Almeida, A. (2006). Fases e impactos de la actividad petrolera. *Manuales de Monitoreo Ambiental Comunitario*.
- Arenas Camps, M. (2015). Efecto de los derrames de petróleo en el medio marino. *All you need is Biology*.
- Asociación Española de Operadores de Productos Petrolíferos (AOP). (2002). Obtenido de Asociación Española de Operadores de Productos Petrolíferos: [https://www.enerclub.es/extfrontenerclub/img/File/nonIndexed/petroleo/secciones/pdf/caps\\_todos/AOP%20FICHAS%20DIDACTICAS.pdf](https://www.enerclub.es/extfrontenerclub/img/File/nonIndexed/petroleo/secciones/pdf/caps_todos/AOP%20FICHAS%20DIDACTICAS.pdf)
- Borrás, G. (2010). *Evolución y comportamiento de las manchas de petróleo*. Obtenido de <https://www.cetmar.org/documentacion/comportamiento.htm>
- CNE. (2009). *Refino, Logística y Comercialización de productos derivados del petróleo*. Obtenido de <https://www.ariae.org/file/532/download>
- Cortés, A. (2014). *PROCESO DE REFINO DEL PETRÓLEO PARA LA OBTENCIÓN DE COMBUSTIBLES MARINOS*. Barcelona .
- Davids, L., Flemming, H., & Wilderer, P. (1998). Microorganisms and their role in soil. (S. e. Sikdar, Ed.) *Bioremediation : Principles and Practice, Volumen I : Fundamentals and Applications*, 283-332. .

- Di Toro, D., McGrath, J., & Stubblefield, W. (2007). Predicting the Toxicity of Neat and Weathered Crude Oil: Toxic Potencial and the Toxicity of Saturated. *Environmenatl Toxicology and Chemistry*, 24 - 36.
- Domingo. (2011). *Apuntes de Mecánica de Fluidos*. Madrid.
- EPA, U. (2001). Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. *Office of Solid Waste and Emergency Response, 10th Edition*. Obtenido de Office of Solid Waste and Emergency Response: <http://www.epa.gov/TIO>.
- Eweis, J. E. (1998). Bioremediation Principles. *McGraw-Hill International Editions*.
- Fay, J. A. (1971). Physical Processes in the Spread of Oil on a Water Surface. Washington D.C., Estados Unidos de América.
- Golovleva, L. A. (1990). The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. *Pure and Applied Chemistry*. doi:Chem 62: 351-364.
- Greco, S. (s.f.). *CONICET MENDOZA*. Obtenido de <https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal/enciclopedia/terminos/ContamPetr.htm>
- Greene , A., Kay, J., Jaber, K., Stehmeier, L., & Voordouw, G. (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:66(12):5282-5289.
- Halden, R. T. (1999). Degradation of 3 phenoxybenzoic acid in soil by Pesudomonas pseudoalcaligenes POB310 (pPOB) and two Modified Pseudomonas Strains. *Applied and enviromental microbiology*. doi:65: 3354-3359.
- Hanson, K., Anauranjini, N., Madhavi, K., & Anjana, D. (1997). Bioremediation of crude oil contamination with Acinetobacter sp. A3. *Current Microbiology*. doi:35:191-193.

- Harris, S. (1997). Hydrocarbon bioremediation. *No se encontró más información.*
- Hernández, J. (2020). La volatilidad en la vida. *Ciencia y Luz*, 1.
- Hung Tao, S., & Poojitha, Y. (1988). Oil slick transport in rivers. *Journal of Hydraulic Engineering*. doi:114 (5): 529-543
- Hutchinson, S., Banks, M., & Schwab, A. (2001). Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ.*
- Jiménez, D. L. (2006). *Estudio de impacto ambiental generado por un derrame de hidrocarburos sobre una zona estuarina, aledaña al terminal de ecopetrol en Tumaco*. Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle.
- Kreiner, I. (2002). Tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos. *En: Cortinas, C. y C. Mosler (eds.). Gestión de residuos peligrosos.*
- Leahy, J., Tracy, K., & Eley, M. (2003). Degradation of volatile hydrocarbons from steam-classified solid waste by a mixture of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Biotechnology Letters*. doi:25:479-483
- Lepo, J., Hancock, P., Zuleger, C., & Roupp-Edwards, K. (2001). Effectiveness and safety of biosurfactants as agents of oil spill response. *Center for Environmental Diagnostics and Bioremediation, University of West Florida.*
- Lorenzo García, E., & Morato Medina, A. (2018). *Geología del Petróleo*. La Libertad, Ecuador: UPSE, Matriz.
- Manduca, M. (2000). Derrames de hidrocarburos en el mar.
- Martínez, M. (2013). *Remediación de agua contaminada con petróleo utilizando pennisetum clandestinum como bioadsorbente*. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.

- MedLinePlus. (03 de Febrero de 2021). *MedLinePlus*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/oilspills.html>
- Middlebrook, A., Murphy, D., Ahmadov, R., & Atlas, E. (2012). Air quality implications of the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Mitjá, A. (2002). El petróleo - El recorrido de la energía. *REPSOL YPF*. Obtenido de <https://www.fenercom.com/wp-content/uploads/2019/05/recorrido-de-la-energia-el-petroleo.pdf>
- Nicasio, E. (2012). Petróleo. *QUÍMICA*.
- Núñez, J. (2015). *Caracterización de nafta súper comercial por espectroscopia infrarroja. Análisis de los componentes especiales*. Argentina.
- Otero, L., Pierini, J., Chambel, P., Malhadas, M., Ribeiro, J., Chambel, J., & Restrepo, J. (2014). Transporte y dispersión tridimensional de un derrame de petróleo en el mar debido a un evento "blowout". *DYNA, Volumen 81* (Número 186).
- Paillat T., M. T. (2000). Electrokinetic phenomena in porous media applied to soil decontamination. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 7, 693 - 704.
- Pérez, G. (2019). *Componentes y estructuras del petróleo*. National Polytechnic Institute.
- Perry, R., & Green, D. (1997). *Chemical Engineers* (Vol. 7<sup>a</sup> Edición edición).
- Petroecuador, E. (2018). *Refinerías operadas por EP Petroecuador trabajan al 100% de su capacidad*. Obtenido de <https://www.eppetroecuador.ec/?p=3647>

- Pieper, D., & Reineke, W. (2000). Engineered bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:11:262-270.
- Rahman, K., Banat, I., Thahira, J., Thayumanavan, T., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2001). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*. doi:81:25-32
- RAMOS, C., GAROÑA, M., CAMELO, M., & CARRETERO, T. (15 de noviembre de 2017). *PREZI*. Obtenido de [https://prezi.com/xbuvoohhho\\_/el-color-del-petroleo/](https://prezi.com/xbuvoohhho_/el-color-del-petroleo/)
- Reuter, C. (2019). Biorremediación de los suelos, un llamado de atención en la industria de los hidrocarburos. *Amerex - Munox Biorremediación con Pseudomonas*. Obtenido de <http://www.labamerex.com/novedad027.htm>
- Reyes, F., & Ajamil, C. (2005). Descripción de los impactos de la actividad petrolera. *Petróleo, Amazonía y Capital Natural*.
- Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. *Lewis Publishers*.
- Rodríguez , G., & Sánchez, M. (2003). Biorremediación - Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Dialnet*, 12 - 16.
- Rosanía, G. (1993). Memorias del Taller sobre Monitoreo Ambiental a la industria petrolera.
- Sellers, K. (1999). Fundamentals of hazardous waste site remediation. . *Lewis Publishers*.

- Serrano, M. F., Torrado, L. M., & Pérez, D. D. (julio - diciembre de 2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Revista Científica General José María Córdova*. doi:11, 233-244.
- Servicio Geológico Mexicano. (22 de marzo de 2017). *GOBIERNO DE MEXICO (SGM)*. Obtenido de [https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones\\_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html](https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html)
- Shin , E. C., & Das, B. M. (september de 2001). Bearing Capacity of Unsaturated Oil-Contaminated Sand. *International Journal Offshore Polar Engineering*.
- Silos, J. (2008). *Manual de Lucha contra la Contaminación por Hidrocarburos*. UCA Universidad de Cádiz.
- Sinche, M. (2016). Análisis de riesgos en seguridad y salud ocupacional en la producción de petróleo en el sector Shiviayacu lote 1AB-Loreto. 16. Lima, Perú. Obtenido de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2264/T10-S555-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Thomassin - Lacroix, E., Eriksson, M., Reimer , K., & Mohn, W. (2002). Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology Biotechnology*. doi:59:551-556.
- Vallés , J., & Mariscal, D. (2005). Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*.
- Van Cauwenberghe, L. (1997). Electrokinetics. Technology Evaluation Reports TO-97-03. *GWRTAC E Series. USA*. Obtenido de <http://www.gwrtac.org>

- Van Deuren, J. W. (1997). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. *Technology Innovation*, 3<sup>a</sup> Ed. Obtenido de <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Venosa, A., Stephen, J., MacNaughton, S., Chang, Y., & White, D. (1999). Microbial populations changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. doi:65 (8). 3566-3574, 1999.
- Yu, Y., Liu, Y., & Wu, L. (2013). Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PP-cPs) in soils. *Environmental Science Pollution Restoration*. doi:20, 4261-4267