



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

**Tesis presentada en opción al Título Académico de
Máster en Biotecnología. Mención Ambiental**

**Ensayo de biorremediación de suelo impactado con
hidrocarburos en la Empresa Puerto Moa.**

Autor: Lic. Asel Guilarte Gainza

Tutora: Dra.C. Rosa María Pérez Silva

SANTIAGO DE CUBA, 2016

“Durante centenares de miles de años, el hombre luchó para abrirse un lugar en la naturaleza. Por primera vez en la historia de nuestra especie, la situación se ha invertido y hoy es indispensable hacerle un lugar a la naturaleza en el mundo del hombre”

Santiago Kovadloff

RESUMEN

Numerosas son las operaciones que se realizan en el área de almacenamiento y mantenimiento en las empresas portuarias que conducen al vertimiento directo de hidrocarburos, y por tanto, afectan los diferentes ecosistemas en los que se encuentran. En este trabajo se realizó la evaluación de impacto ambiental a la Empresa Puerto Moa y la caracterización fisicoquímica de sus suelos, además se aislaron los microorganismos presentes en este último y se realizó un ensayo de biodegradación de hidrocarburos a nivel de laboratorio con las cepas obtenidas. Los factores del medio más afectados en la evaluación de impacto fueron las aguas superficiales y subterráneas, la salud e higiene mientras que las acciones más agresivas resultó ser la emisión de contaminantes y la acumulación de residuos. Los valores para para nitrato y fosfato en los suelos fueron muy bajos, oscilaron en el rango de 3.1–4,2 y 0,3–1,3 mg/L respectivamente, el pH resultó básico en todos los casos y muy baja oxigenación. El grado de contaminación fue mayor en suelo 3, presentó un 81.6 % de materia orgánica extraíble. El tamizaje indicó el elevado porcentaje de arena que presentan los suelos 1 y 3 con óptimos valores de capacidad de campo. En los ensayos en microcosmos, la cepa de mejor crecimiento fue la 4D, y mostraron mejores porcentajes de biodegradación la 4D y la 3C. Se comprobó que aplicando la bioaumentación con las cepas autóctonas aisladas se pueden lograr altos porcentajes de biodegradación.

Numerous are the operations performed in the storage area and maintenance in the port companies leading to direct dumping of hydrocarbons and thus affect different ecosystems in which they find themselves. In this paper the environmental impact assessment to the Company Puerto Moa and physico-chemical characterization of soils was carried out, in addition microorganisms were isolated in the latter and a biodegradation test oil was performed in the laboratory with strains obtained. Environmental factors most affected in the impact assessment were ground and surface water, health and hygiene while more aggressive actions turned out to be the emission of pollutants and waste accumulation. The values for nitrate and phosphate in the soil were very low, ranging in the range of 3.1-4,2 and 0.3-1.3 mg/L respectively, the pH was basic and in all cases very low oxygenation. The degree of pollution was higher in soil 3 presented a 81.6% extractable organic matter. Screening said the high percentage of sand in soils 1 and 3 with optimal values of field capacity. In trials in microcosm, the strain growth was better 4D, and showed better rates of biodegradation 4D and 3C. It was found that using bioaugmentation with native isolates can be achieved high rates of biodegradation.

AGRADECIMIENTOS

Culmina una etapa muy importante en mi vida. Miro hacia atrás y están aún presentes muchas personas a las que quiero agradecer el haber estado acompañándome. Mi Familia, mis amigos y mis compañeros, este trabajo está dedicado a ustedes.

Quiero agradecer en primer lugar a mi colectivo del Centro de Estudios del Medio Ambiente (ISMMM) por ser sustento en esta empresa, especialmente al MSc. Yosvani Cervantes Guerra por su apoyo y consejos.

A los profesores de química de la Facultad de Metalurgia y Electromecánica.

A mis compañeros de maestría en especial al recién estrenado master Ariel Díaz Puig por ser mi compinche en el camino.

A nuestra profesora Catalina, por ser la guía en este programa de formación que es mucho más que una maestría. Gracias por levantarme la autoestima cuando más lo necesitaba.

Agradecer infinitamente a mi tutora Rosita por aceptar y tener la paciencia en la tutoría de este trabajo. Siempre dispuesta y con una sonrisa cada vez que la invadía.

A Miladis (me estas enseñando desde que puse pie en el laboratorio de microbiología). Gracias por haber aceptado asesorarme y por todas las recomendaciones que me hiciste en el trabajo de tesis. Sin tu apoyo y ayuda incondicional no hubiese sido posible.

Al resto de los profesores y trabajadores del CEBI, también va este agradecimiento: Janet, Morris, Norita, Serrat, Teresa, Isabelita, Yaneysis, Abelardo, que aportaron también a nuestra formación.

Mi Familia, Mami, Tía, Guaso, son los pilares de mi vida. Gracias por aguantar mis momentos. Siempre confiando en mí y dándome energías para seguir. Gracias les doy por preguntarme todos los días y por el solo hecho de que les importa lo que hago. Gracias a Dios por tenerlos en mi vida.

Vilma, a ti más que a nadie tengo que agradecer el estar "ahí". Venimos haciendo este camino juntos desde hace muchos años. Vives como propios mis logros y mis frustraciones y siempre me das fuerzas para no aflojar. Gracias por ser mi compañera de vida.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1 Características del Suelo.....	4
II.2 Aspectos Generales de los Hidrocarburos	4
II.2.1. Composición por familias de hidrocarburos	5
II.3. Degradación microbiana de hidrocarburos.....	6
II.4 Contaminación y tecnologías utilizadas en la eliminación de hidrocarburos.	7
II.4.1 Atenuación natural.	7
II.4.2 Técnicas utilizadas para la biorremediación.	8
II.4.3 Tecnologías Físicas	12
II.4.4 Tecnologías químicas.....	13
II.5 Integración de Tecnologías.....	14
II.5.1 Tratamiento físico-químico.....	14
II.5.2 Tratamiento físico-biológico	15
II.5.3 Tratamiento biológico-químico	15
II.6 Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación de suelos contaminados.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
III.1 Origen y toma de las muestras.....	18
III.2 Evaluación de impacto.....	18
III.2.1 Validación de los criterios de expertos.	20
III.3 Caracterización de la matriz suelo.....	21

III.3.1 Análisis Granulométrico	21
III.3.2 Ensayo rápido de aireación de suelos	21
III.3.3 Determinación de la capacidad de campo	22
III.3.4 Determinación de solidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad.	22
III.3.5 Determinación del pH del suelo	23
III.3.8 Determinación del contenido de nitrato	24
III.4 Determinación de la población microbiana y degradadora de hidrocarburos.....	24
III.4.1 Aislamiento de bacterias a partir de suelos contaminados con petróleo.	24
III.4.2 Determinación de crecimiento de población heterótrofa en fuente de hidrocarburo (medio Vela).	25
III.5 Ensayos de degradación de hidrocarburos por las cepas aisladas utilizando microcosmos	25
III.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	26
III.7 Materiales, Reactivos y Equipos.	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
IV. I Evaluación de impacto ambiental en la Empresa Puerto Moa.	29
IV.2 Caracterización químico-física de los suelos.....	32
IV.2.1 Análisis Granulométrico.....	33
IV.2.2 Ensayo rápido de aireación de los suelos	33
IV.2.3 Determinación de la capacidad de campo.....	34
IV.2.4 Determinación del pH del suelo.....	35
IV.2.5 Determinación del contenido de hidrocarburos (MOE), solidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad	36
IV.2.6 Determinación de la conductividad eléctrica	37
IV.2.7 Determinación del contenido de nitrato.....	37
IV.2.8 Determinación del contenido de fosfato	38
IV.3 Aislamiento de microorganismos nativos del área de estudio	39

IV.4 Ensayo de crecimiento microbiano en medio vela.....	40
IV.5 Ensayo de crecimiento microbiano en microcosmos.....	41
IV.6 Degradación de petróleo en microcosmos por las cepas seleccionadas.....	42
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RECOMENDACIONES	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	48

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

A causa del excesivo uso de combustibles y productos derivados del crudo de petróleo, se ha incrementado la contaminación de los suelos por derrames de esta compleja mezcla de compuestos orgánicos, ocasionando un gran desequilibrio en el ecosistema que impacta de manera negativa al entorno ecológico (García., *et al.*, 2013). Por tal motivo se ha considerado la biorremediación como una técnica efectiva en la descontaminación por medio de la degradación microbiana utilizando estrategias como la bioestimulación de microorganismos nativos, y el bioaumento (Windevoxhel., *et al* 2013), basado en la inoculación de cepas o consorcios microbianos de laboratorio.

El uso de microorganismos como herramientas biocorrectoras se llevan empleando, en la descontaminación de suelos y aguas alterados por compuestos orgánicos naturales y sintéticos (xenobióticos), desde hace varios años con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio, si se producen en condiciones aerobias, es decir en presencia de un medio oxidante, o bien de tipo anaerobio, en presencia de un medio reductor.

Las técnicas de degradación biológica de contaminantes se fundamentan en la determinación de tipos de células, moléculas y rutas metabólicas empleadas por los organismos como estrategia para alcanzar el objetivo deseado; así como en las condiciones físicas, químicas y ambientales, ideales para el correcto funcionamiento de estas máquinas biológicas (Cabrera., 2015).

El daño causado en las poblaciones de microorganismos por la presencia de contaminantes y su concentración (degradación biológica por contaminantes), en muchos años de estrés, obliga a que éstos se adapten y evolucionen con novedosas características metabólicas para explotar fuentes de alimento alternativas, cuya consecuencia es el saneamiento de compuestos tóxicos. La rápida evolución se da gracias a la plasticidad del genoma y a la transferencia génica. La ventaja selectiva de cepas, poblaciones y consorcios microbianos a contaminantes las hizo capaces de alimentarse de ellos, logrando la degradación biológica de contaminantes.

Es así que hoy en día se investiga a profundidad a los organismos capaces de transformar los contaminantes, a sus estructuras, a su proteoma, a su genoma así como sus estrategias metabólicas para alcanzar tal fin. Por tanto los resultados obtenidos serán la herramienta fundamental para su uso a nivel industrial, siendo la base de la biotecnología aplicada (Abdulsalam *et al.*, 2011).

En efecto las malas prácticas en el manejo de los hidrocarburos, los accidentes durante el transporte de combustible y otros productos procesados, han traído como consecuencia problemas ambientales en los que se ha hecho evidente la contaminación de grandes extensiones de suelo superficial y la afectación de cuerpos de agua (Nápoles., 2005).

La Empresa Portuaria (“Cdte. Raúl Díaz Argüelles”) ubicada en el Municipio Moa, constituye un eslabón fundamental dentro de la infraestructura del grupo empresarial “Cubaníquel” donde su función fundamental es la recepción y almacenamiento de los productos o insumos de la importación para el consumo industrial de las empresas del níquel del territorio y la exportación de los productos ya terminados de estas industrias productoras.

Es relevante declarar el importante papel natural, sociocultural y socioeconómico que remite esta institución, pues se identifican especies florísticas con un desempeño ecológico vital para el mantenimiento del entorno, la línea costera y las especies faunísticas existentes, significativa generación de empleos permanentes tanto en áreas productivas como administrativas que refleja un notable aumento de la calidad de vida del sector de la población que en la misma labora, además es pilar fundamental para el crecimiento económico del país (García *et al.*, 2013).

De aquí que la actividad marítima portuaria ocasione un impacto negativo al ecosistema costero, lo que está asociado no sólo a la ausencia de sistemas de tratamiento, a la actividad de dragado y la no existencia de un sistema de alcantarillado adecuado; sino también a la sinergia de los impactos ambientales de toda la actividad económica, afectando extensas áreas de suelo por hidrocarburos.

Teniendo esto en cuenta se formulan el problema y la hipótesis siguientes:

Problema científico

La capacidad de biodegradación de hidrocarburos y la cinética de crecimiento microbiano en los suelos de la Empresa Puerto Moa han sido poco estudiados, por lo que se desconoce su eficiencia para el tratamiento de estos suelos contaminados.

Hipótesis

El tratamiento a los suelos contaminados con hidrocarburos en el Puerto Moa con aislados de microorganismos nativos y sus productos, puede minimizar el impacto que este contaminante ocasiona en las zonas afectadas.

El trabajo se propone los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Ensayar el proceso de biodegradación de hidrocarburos a partir de la zona más contaminada de la Empresa Puerto Moa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Valorar el Impacto Ambiental en la Empresa Puerto Moa.
- Caracterizar física y químicamente los suelos de la Empresa Puerto Moa.
- Aislar microorganismos nativos del área de estudio y comprobar su capacidad de crecimiento en suelos contaminados con hidrocarburos.
- Realizar ensayos de biodegradación en microcosmos de suelos contaminados con hidrocarburos empleando las cepas seleccionadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Características del Suelo

El suelo se define como la parte superior de la corteza terrestre, y está compuesto por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. En términos generales, está formado por un 50 % de espacio libre (la mitad del espacio poroso ocupada por gases y la otra mitad por líquidos); un 40-50 % de sólidos minerales (meteorización de las rocas) y un 0,5-5% de materia orgánica (humus y derivados, biomasa viva y muerta) (Romira, 2011).

El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico. Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm de diámetro), limos (2-50 μm de diámetro), arcillas (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa. Los poros pueden contener agua o aire, de manera que existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad (Romira., 2011) (Anexo I). En la Tabla I, se indican algunas propiedades de las distintas fracciones del suelo.

II.2 Aspectos Generales de los Hidrocarburos

El crudo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener múltiples compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Atlas & Bartha, 2002). Los hidrocarburos son una familia predominante de variados compuestos, por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes,

tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales. Pueden contener diferentes compuestos, siendo básicamente una mezcla de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos (estructuras cicloalifáticas saturadas), aromáticos y trazas de metales pesados (Tabla II). A partir de su refinado se obtienen diferentes derivados que potencialmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente. El kerosén y el gasoil/diesel (Tabla III) forman parte de las fracciones obtenidas de la destilación del petróleo en el proceso de refinado en un rango de puntos de ebullición entre 160-275°C para el kerosén y 250-425°C para el diesel, encontrando compuestos de 9 a 27 átomos de carbono, siendo los más abundantes los C₉-C₁₅ para el kerosén y C₁₃-C₂₇ para el diésel (Wang & Stout, 2006).

II.2.1. Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias (Howe-Grant, 1996): parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C₁₀), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C₁₀-C₄₀), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo aparte residirían los componentes de las resinas y los asfaltenos.

Tabla I. Propiedades de las fracciones del suelo (Doménech, 2000).

Fracción	Retención de nutrientes	Infiltración del agua	Retención del Agua	Aireación	Capacidad de ser cultivado
Arcilla	***	*	***	*	*
Limo	**	**	**	**	**
Arena	*	***	*	***	***

*bajo, ** normal, *** bueno

Tabla II. Composición química y contenido de hidrocarburos típicos del crudo. (Tablas modificadas a partir de Hyne 2001).

Elemento	Crudo (%)	Hidrocarburo	Crudo (%)
Carbono	84-87	Parafinas (alifáticos)	15-60
Hidrógeno	11-14	Naftenos (alicíclicos)	30-60
Sulfuro	0.06-2	Aromáticos	3-30
Nitrógeno	0.1-2	Asfálticos	resto
Oxígeno	0.1-2		
Metales Pesados	<0.1		

Tabla III. Composición promedio del kerosen y el diésel. Valores obtenidos a partir de Liang *et al*, 2005.

Hidrocarburo (Diesel)	vol (%)	Hidrocarburo (kerosén)	Vol (%)
Parafinas (alifáticos)	28	Parafinas (alifáticos y ramificados)	+/- 70
Parafinas (ramificadas)	54	Naftenos (alicíclicos)	+/-70
Naftenos (alicíclicos)	8	Aromáticos	11-25
PHA (alquil PHA)	3.7	Olefinas	<5
Aromáticos	0.26		

II.3. Degradación microbiana de hidrocarburos

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo están presentes en la naturaleza y se ha demostrado que la degradación de estos hidrocarburos es llevada a cabo por la acción de grupos microbianos con diferente capacidad degradadora debido a la alta complejidad de los productos derivados del petróleo. Se podría afirmar que en casi todos los ambientes existen, aunque en baja cantidad, microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlos como fuente de carbono y esta es una de las posibles causas del incremento de la biomasa microbiana después de un tiempo de exposición al contaminante (Kaczorek *et al.*, 2011).

El grado en que bacterias, hongos filamentosos y levaduras participan en la biorremediación de hidrocarburos ha sido objeto de numerosos estudios y es una función del ecosistema y las condiciones medioambientales locales. Por otro lado, algas y protozoos son una parte importante de la población microbiana tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres. Sin embargo, el grado de participación en la degradación de hidrocarburos es muy desconocido y no se ha llegado a demostrar que los protozoos utilicen dichos compuestos (Catone, 2013).

Las bacterias son más empleadas que los hongos y levaduras en la degradación de hidrocarburos, diversos estudios permiten establecer una lista de 160 géneros microbianos donde se encuentran las especies más utilizadas en procesos de biorremediación, entre ellos cabe destacar *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida* (Lei *et al.*, 2011).

En los suelos contaminados dominan las comunidades microbianas capaces de sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente utilizando el contaminante para su crecimiento. Las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de los hidrocarburos, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir en las nuevas condiciones a expensas de

otros organismos que serían reprimidos. La diversidad de especies presentes en el suelo puede ser indicador de los efectos de la contaminación y en particular la aparición de microorganismos resistentes a esta. (Di Martino, 2015).

II.4 Contaminación y tecnologías utilizadas en la eliminación de hidrocarburos.

La contaminación con hidrocarburos implica un riesgo humano y ecológico, la exposición a este tipo de contaminación puede generar mutaciones y efectos carcinogénicos. Es la razón por la cual se han investigado e implementado diferentes tecnologías en la remediación de suelos, que pueden ser de tipo *in-situ* o *ex-situ* (Bacosa *et al.*, 2011). Los tratamientos *in-situ* son los que permiten tratar el suelo en el lugar de la contaminación sin excavar ni transportar. Se requieren generalmente periodos largos de tiempo y no hay certeza sobre la uniformidad del tratamiento debido a la variabilidad de las características del suelo, por esto la eficacia del proceso es más difícil de verificar (Cando, 2011).

En el tratamiento *ex-situ*, el suelo es transportado a una planta de procesamiento donde se aplica el tratamiento adecuado, requiere generalmente periodos más cortos que el tratamiento *in-situ*, y hay más certeza sobre la uniformidad del tratamiento debido a la capacidad de homogenizar y de mezclar continuamente el suelo. Sin embargo, este tipo de tratamiento requiere la excavación de suelos, transporte, entre otros procesos y supone costes más elevados (Venegas, 2015).

A continuación, describimos algunas tecnologías en los procesos de remediación.

II.4.1 Atenuación natural.

La atenuación natural también llamada remediación intrínseca está englobada dentro de las técnicas de remediación *in-situ* de muy bajo coste, en la cual su característica principal es la utilización de los procesos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación. Es un proceso natural de limpieza al que se llega cuando los mecanismos de auto-remediación son activados en un suelo contaminado (Cristina, 2012).

Los mecanismos de atenuación natural suponen una serie de elementos físicos, químicos y/o biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin intervención externa para reducir la masa, toxicidad, movilidad, biodisponibilidad, volumen o concentración del contaminante en suelos o aguas subterráneas. Estos mecanismos pueden ser clasificados como destructivos o no destructivos. Los mecanismos destructivos son principalmente químicos y biológicos, e incluyen biodegradación, oxidación abiótica, transformación, hidrólisis, destrucción UV (solo en la superficie), estabilización y mineralización.

Los mecanismos no destructivos son mayoritariamente físicos, e incluyen adsorción, dilución, difusión, dispersión y volatilización (Ros *et al.*, 2010). Los mecanismos no destructivos excepto la volatilización, e incluyendo la biodegradación, también controlan el transporte de contaminantes por el medio subterráneo (Fernández *et al.*, 2006).

II.4.2 Técnicas utilizadas para la biorremediación.

Las herramientas que se utilizan en la biorremediación para optimizar la tasa de degradación son la bioestimulación y la bioaumentación. La primera consiste en modificar los factores limitantes del crecimiento de los micro-organismos y de la degradación del contaminante. Los factores que usualmente limitan la eficacia del proceso son la disponibilidad de nutrientes como nitrógenos y fósforo, el contenido de agua, oxígeno y biodisponibilidad del contaminante. Por otra parte, el bioaumento es la inoculación de micro-organismos degradadores del hábitat contaminado, que generalmente son micro-organismos autóctonos del ecosistema (Cheung *et al.*, 2001).

La llegada a un suelo del hidrocarburo contaminante supone un aporte fundamentalmente de carbono orgánico. Este hecho origina un incremento de la relación carbono/nitrógeno que hace que en la mayoría de los ecosistemas el nitrógeno sea uno de los factores limitantes del crecimiento microbiano y en consecuencia del proceso de biorremediación. Por ello es frecuente la aplicación en los procesos de biorremediación de fertilizantes que mejoren las características

nutricionales del suelo y estimulen la actividad de la microbiota degradadora (Barrios *et al.*, 2015).

II.4.2.1 Biopilas

La técnica de biopilas es un tratamiento de bio-recuperación de tipo ex-situ en condiciones no saturadas, que consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila o bien de forma pasiva mediante tubos perforados de aireación conectados a un soplante (Tirado *et al.*, 2015). En tierras excesivamente puede ser conveniente añadir algún material estructurante (virutas de madera, paja seca, etc) e incluso materia orgánica (compost). Al no requerir laboreo como el land-farming y no estar limitado a las medidas del arado, puede admitir un mayor volumen de tierra en la misma superficie (Vázquez *et al.*, 2011).

II.4.2.2 Compostaje

Es una técnica ex-situ en la que el suelo contaminado se somete a proceso biológico en el cual los contaminantes orgánicos son transformados en sub-productos inocuos por los micro-organismos bajo condiciones aerobias. El proceso de compostaje puede dividirse en cuatro periodos atendiendo a la evolución de la temperatura (Mukherjee *et al.*, 2014)

- Mesófilo: La materia orgánica está a temperatura ambiente y los micro-organismos mesófilos se multiplican rápidamente. Como consecuencia de la actividad metabólica la temperatura aumenta y se producen ácidos orgánicos que conllevan a que el pH disminuya.
- Termófilos: Cuando se alcanza una temperatura de 40°C, los micro-organismos termófilos actúan transformando el nitrógeno en amoníaco y el pH del medio se hace alcalino. A los 60°C estos hongos termófilos desaparecen y aparecen los actinomicetos. Estos microorganismos son los encargados de descomponer ceras, proteínas y hemicelulosas.

- **Enfriamiento:** Cuando la temperatura es menos a 60°C, reaparecen los hongos termófilos que re-invaden el mantillo y descomponen la celulosa. Al bajar de 40°C los mesófilos también reinician su actividad y el pH del medio desciende ligeramente.
- **Maduración:** Es un periodo que requiere meses a temperatura ambiente, durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización del humus.

II.4.2.3 Land-Farming

Es una técnica *ex-situ* que consiste en provocar la oxidación biológica de los contaminantes, por medio de la población microbiana autóctona que se encuentra en el suelo, teniendo lugar por tanto la incorporación controlada de los residuos al suelo (Chagas *et al.*, 2012). Las condiciones controladas normalmente incluyen:

- Contenido de agua (generalmente la irrigación o rociado)
- Aireación (labrando el suelo con una frecuencia predeterminada, el suelo es mezclado y aireado).
- pH (el pH neutro se mantiene agregando piedra caliza, abono cálcico, etc)

El land-farming ha sido la técnica más utilizada para tratar ambientes contaminados con los hidrocarburos del petróleo. Generalmente es utilizada esta técnica para el tratamiento de hidrocarburos más pesados. En general cuanto más alto es el peso molecular y mayor número de anillos aromáticos, más lenta es la tasa de degradación (Cabrera, 2015).

II.4.2.4 Biorreactores

Los biorreactores son equipos que aceleran la descomposición de los contaminantes estimulando la acción biológica de los microorganismos y por consiguiente el proceso natural de degradación. Es la técnica más adecuada para casos en que los peligros potenciales de lixiviados y emisiones de gases sean importantes. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación. Una ventaja de los

biorreactores es la posibilidad de utilizar micro-organismos aerobios, anaerobios y una combinación de ellos dependiendo del contaminante que se quiera degradar (Di Martino *et al.*, 2012).

II.4.2.5 Bioventing. Air sparging

Esta técnica es un tratamiento de bio-recuperación in-situ, consistente en la aireación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno (aire) a través de pozos de inyección. Debido a la aireación del suelo se favorece la degradación de los hidrocarburos por dos vías (Grace *et al.*, 2011).

- por volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes.
- por biodegradación, ya que al aumentar la oxigenación del suelo se estimula la actividad microbiana.

Los sistemas de bioventing no deben de usarse cuando se encuentra producto libre, ya que su volatilización *in-situ* puede originar la migración de estos productos y provocar una contaminación de zonas periféricas. Tampoco deben utilizarse estas tecnologías cuando la contaminación del agua subterránea esté localizada en el acuífero confinado (Domínguez *et al.*, 2011).

En general el sistema bioventing es más efectivo sobre constituyentes de gran volatilidad y baja solubilidad y para suelos con alta permeabilidad. No obstante, las características del suelo determinarán las zonas preferenciales para la extracción de gases en ambientes no saturados. Así, suelos estratificados o con alta heterogeneidad suelen crear grandes barreras para estos sistemas (Mrozik *et al.*, 2010).

II.4.2.6 Fitorremediación

Es una técnica in-situ que utiliza a las plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque aún se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc (Balderas, 2015). Las

ventajas que ofrecen la fitorremediación frente a otros procesos son el bajo coste y la rapidez con la que pueden llevarse a cabo ciertos procesos de degradación. Los mecanismos de la fitorremediación incluyen la rizodegradación que se aplica en el suelo que rodea la raíz, la fitoextracción donde los contaminantes son captados por las raíces y posteriormente son acumulados hacia el tallo y hojas. (Torsvik *et al.*, 1996).

II.4.3 Tecnologías Físicas

II.4.3.1 Extracción con solventes

Esta técnica se basa en utilizar solventes para separar y/o disolver contaminantes orgánicos y así removerlos del suelo. Este tipo de proceso in-situ requiere de un tratamiento posterior para eliminar o destruir los contaminados del líquido de extracción. Los solventes pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo disminuyendo la porosidad y reduciendo la movilidad de los contaminantes. Se requiere tratar previamente los suelos con alto contenido de materia orgánica y también es necesario el tratamiento de los vapores generados (Yagnentkovsky *et al.*, 2011).

II.4.3.2 Incineración

Los procesos de incineración in-situ y/o ex-situ, tiene como finalidad volatilizar y quemar compuestos orgánicos en presencia de oxígeno con temperaturas de operación que van desde los 870°C a los 1200 °C. La eficiencia de la remoción y la destrucción de los incineradores operados adecuadamente son de un 99%, sin embargo, los gases de combustión requieren de un tratamiento adicional. Existen diferentes tipos de incineradores: lecho circulante, lecho fluidizado y tambor rotatorio (Nannipieri & Badaluco., 2003).

II.4.3.3 Desorción Térmica

Los tratamientos térmicos ofrecen tiempos rápidos de limpieza, pero generalmente los costes son elevados. La desorción térmica consiste en calentar el suelo con el fin de vaporizar los contaminantes y los gases producidos se dirigen hasta un sistema de tratamiento. Este es un proceso de separación físico no destructivo,

que puede clasificarse según la temperatura de operación: desorción térmica de alta temperatura donde se utiliza el rango de 320 °C a 560 °C y desorción térmica de baja temperatura con valores de 90 °C y 320 °C (Yuste *et al.*, 2000).

II.4.4 Tecnologías químicas

II.4.4.1 Oxidación química

La oxidación directa de contaminantes orgánicos en suelos involucra un gran número de reacciones donde el principal agente responsable de la oxidación es el radical hidroxilo OH. Este radical libre se forma por la descomposición catalítica de agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno en un medio ácido, el ozono y el permanganato de potasio. El poder de oxidación de este radical es únicamente superado por el fluor (Ron *et al.*, 2002).

El agente oxidante más utilizado es el peróxido de hidrógeno que catalizado por el Fe^{2+} forma los radicales libres OH, esta reacción se conoce como proceso Fenton.



La reacción Fenton, a través de la generación de radicales OH, puede transformar los compuestos orgánicos residuales de difícil degradación por procesos aeróbicos bióticos, en otros más simples y más biodisponibles para los micro-organismos. La reacción de Fenton modificada utiliza como catalizador Fe^{3+} y un compuesto quelante a un pH neutro, además de los minerales de hierro que se encuentran en forma natural en los suelos.

II.4.4.2 Fotocatálisis

La degradación por fotocatálisis *in-situ* se trata de un proceso fotocatalítico promovido por energía con una longitud de onda que sea capaz de excitar a un catalizador (semiconductor), generalmente un óxido metálico en el cual se desarrollan reacciones de óxido-reducción, esta generación de radicales libres muy reactivos promueven el proceso de mineralización de los compuestos orgánicos (Tyagi *et al.*, 2011).

II.4.4.3 Remediación electrocinética

La remediación electrocinética es de tipo in-situ, que aprovecha las propiedades conductivas del suelo, con el uso de un campo eléctrico que permite remover los compuestos orgánicos. Involucra la aplicación de una baja intensidad de corriente eléctrica a través de electrodos colocados en lugar de la contaminación. Los compuestos orgánicos con carga positiva migran hacia el cátodo, mientras que los aniones se mueven hacia el ánodo. Esta tecnología se puede utilizar para contaminantes orgánicos polares y metales pesados (Tyagi *et al.*, 2011).

II.5 Integración de Tecnologías

Cada una de las tecnologías de remediación mencionadas anteriormente tiene sus ventajas y desventajas. Para hacer frente a estas limitaciones y aumentar la eficiencia en la remoción de los hidrocarburos se plantean varias combinaciones entre los tratamientos físicos, químicos y biológicos que pueden ser utilizados como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados (Xu *et al.*, 2013)

II.5.1 Tratamiento físico-químico

Algunos investigadores han indicado que una extracción con solvente (etanol) antes de la oxidación química mejora el proceso de oxidación HAP en suelos contaminados. El pre-tratamiento con etanol ayuda a la desorción de los contaminantes de la matriz del suelo, especialmente los contaminados por antraceno, benceno y pireno. En otro trabajo similar fueron utilizados aceites vegetales como pre-tratamiento de la oxidación aumentando la eficiencia del tratamiento de Fenton, sugiriendo que el aceite vegetal solubiliza los HAP, logrando que sean más susceptibles a los radicales libres (Chia-Hsien *et al.*, 2011)

Otro tratamiento novedoso, combina la tecnología electrocinética y la oxidación química. En este método, los oxidantes químicos se canalizan en el compartimento del ánodo y en los pozos de inyección en la celda electrocinética para inducir al mismo tiempo las reacciones de oxidación directamente en la tierra contaminada (Hector *et al.*, 2011) Se ha demostrado que la electrocinética y la posterior oxidación con pre sulfato, aumenta el porcentaje de reducción en la

eliminación de HAP (35%) con respecto a la electrocinética en un 24 % o la oxidación con persulfato en 12%, aunque la electrocinética no mejora el rendimiento con la oxidación del Fenton.

II.5.2 Tratamiento físico-biológico

En el uso de disolventes (acetona y etanol) para aumentar la biodisponibilidad los suelos se mezclan con el solvente durante 24 horas, este se deja evaporar en condiciones normales de ventilación y luego dicho solvente es transferido a un reactor de biodegradación a una temperatura de 21°C. El pre-tratamiento de los suelos con el disolvente obtuvo como resultado aproximadamente el 90% de los HAP degradados durante 17 días, esto puede ser debido a que el disolvente residual que se mantuvo después de la evaporación puede haber sido utilizado como sustrato de crecimiento que conduce a una mayor población microbiana ayudando a la posterior degradación de HAP de 4-5 anillos, como venzo (a) pireno (Hamzah *et al.*, 2013)

II.5.3 Tratamiento biológico-químico

Los procesos biológicos han sido tradicionalmente considerados incompatibles con la oxidación química a causa de la excesiva muerte y/o inactivación de los micro-organismos nativos por reacciones con el radical hidroxilo. No obstante, estudios recientes sugieren que el uso de ozono como oxidación química después de un tratamiento biológico mejora la eliminación de HAP. Se ha demostrado que después del tratamiento biológico con tres horas de ozonización se ha aumentado en un 90% la eliminación de HAP de bajo peso molecular y los HAP más pesados de 4 a 5 anillos después de 13 horas de ozonización (Madueño *et al.*, 2014).

También se ha estudiado el uso de remediación biológica como segundo paso después de la oxidación química. Por ejemplo, se ha demostrado que el pre-tratamiento con Fenton seguido de biorremediación es eficaz en la eliminación de Hidrocarburos Poli cíclicos Aromáticos, en este sentido se ha demostrado que la oxidación de Fenton ayuda a la biodegradación de PHA de 2 y 3 anillos en un 98% y entre 70% y 85% de los HAP de 4 a 5 anillos (Patel *et al.*, 2013).

Las reacciones con Fenton modificado son más compatibles con las reacciones microbianas que el químico Fenton convencional debido a que su pH es cercano al neutro, de modo que la oxidación química no reduce la cantidad de degradadores de hidrocarburos tal como se esperaría de un tratamiento químico tradicional.

Sintetizando, para desarrollar un proceso de biorremediación eficaz es necesario el establecimiento de un sistema de evaluación y de un protocolo de actuación que debe considerar las siguientes etapas: primeramente, estudios básicos de laboratorio, luego estudios en microcosmos y por último la evaluación del tratamiento en sistemas de mayor escala ya sea planta piloto o instalaciones in-situ (Xu *et al.*, 2013)

II.6 Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación de suelos contaminados.

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo, es importante diferenciar aquellas que suponen una solución temporal o el posible traslado del contaminante a otros compartimentos ambientales de aquellas que potencialmente pueden transformar los contaminantes en productos inocuos. (Festa *et al.*, 2013). La tecnología de la biorremediación, basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (excavación, extracción química e incineración) tanto por su menor coste económico (Ulrici, 2000), como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos (Jimenez *et al.*, 2011).

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las normativas. Durante un proceso de biorremediación se produce una ralentización del proceso de biodegradación ya sea por un enriquecimiento de componentes más recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes (Ying *et al.*, 2010).

Las técnicas fisicoquímicas, aun pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo, modifican las características fisicoquímicas del suelo, y además, no eliminan los contaminantes, sino que los trasladan a otro compartimento ambiental (Kuyukina *et al.*, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Origen y toma de las muestras

Las muestras procedieron de suelos contaminados con hidrocarburos de la Empresa Puerto Moa, Municipio Moa, Provincia Holguín, específicamente de las áreas cercanas a la fuente contaminante (UEB de Recepción y Almacenaje de Combustibles), donde convergen los hidrocarburos residuales del proceso de lavado y mantenimiento sistemático de los tanques de almacenamiento (Anexo II).

Para el manejo y transporte de las muestras se toman las siguientes medidas de seguridad.

- Las muestras se transportaron en frascos de vidrio de boca ancha, con tapa y sello de teflón.
- La etiqueta fue colocada en un lugar visible, con número de identificación, nombre del lugar de muestreo y la hora y fecha en la que se tomó, escrito con tinta indeleble.
- Se elaboró cuidadosamente la ficha de muestreo que recoge la información levantada en el campo, la técnica de muestreo y una descripción de las muestras tomadas.

La toma de la muestra se realizó entre las 9:00 y las 11:00 am, a una profundidad de 5.0 cm aproximadamente, se aplicó la técnica de sondeo manual (Guía para muestreo de suelos: 2014). Las muestras se homogenizaron en un tamiz de 12 mm.

III.2 Evaluación de impacto

La determinación cualitativa de los impactos ambientales se estableció a partir del uso de matrices en tres etapas: 1. Identificación de los impactos y los factores del medio afectados; 2. Valoración de los impactos y 3. Cálculo de la importancia de los impactos (Milán, 2004).

Etapa 1: identificación de impactos

Para el análisis de impactos, se efectuó el desglose de estos en sus diferentes etapas, actividades, hasta la identificación de acciones, entendiendo estas últimas como la unidad capaz de establecer una relación causa-efecto con el entorno o ambiente que lo rodea (Anexo III). La identificación de las acciones susceptibles de generar impactos, se analizó a partir de la caracterización general de las empresas, y poder determinar cuáles son las posibles actividades negativas del trabajo por parte de los individuos que en estas laboran y que puedan trasladar los posibles impactos generados. Esto derivó en identificar los factores del medio impactados (terrestre, acuático y atmosférico) existente en el área de estudio, se seleccionaron los de mayor incidencia mediante la observación directa del grupo de expertos y su anotación en la matriz causa-efecto según (Conesa., 2000).

Etapa 2: valoración de los impactos

La valoración de los impactos se realizó mediante un análisis detallado de las interacciones entre los factores del medio afectado y las acciones impactantes del mismo, utilizando como guía metodológica el cuadro de valores de los atributos de impactos (Anexo IV) para realizar la evaluación cualitativa (Oñate *et al.*, 1998) (Conesa, 2000) (CICA, 2001).

Etapa 3: cálculo de la importancia de impacto

Se elaboró el modelo de matriz de importancia de impactos (Anexo V) donde se recogen cada uno de los resultados calculados a partir de la matriz de la valoración de impactos. Se considera utilizar la importancia de impactos como una función directamente proporcional al grado de alteración producido por un impacto ambiental en el medio ambiente y expresar la importancia como el porcentaje de alteración con respecto a la alteración máxima posible. Se hace uso del sistema establecido según (Conesa, 2000) para realizar el proceso de discriminación, y buscar un mayor grado de precisión al establecer la importancia de los impactos, valorando lo siguiente:

En los impactos negativos determinar: valor medio (V_m) y desviación típica (σ), considerando como valor crítico del impacto (V_{cr}) todos aquellos cuyo valor de importancia (V_i) fuera superior a $V_m + \sigma$. O sea:

$$V_{cr} = V_i > V_m + \sigma \quad (1)$$

Asimismo, se consideró valorar como irrelevantes (V_{ir}) aquellos impactos cuyos valores de importancia (V_i) fueran inferiores del valor medio (V_m) menos la desviación típica (σ). O sea:

$$V_{ir} = V_i < V_m - \sigma \quad (2)$$

De esta forma se obtuvo el rango de discriminación, que no pre-establece valores absolutos de importancia, sino que se concibe como una función de las características de cada proyecto que se evalúe.

III.2.1 Validación de los criterios de expertos.

III.2.1.1 Aplicación del método Delphi

La validación de los criterios de expertos se realizó por el método Delphi o Delfos (el cual data de 1963-1964) presentado por la Rand Corporation y en particular por Olaf Helmer y Dalkey Gordon, siendo el que más se ajusta al juicio intuitivo de expertos en materia ambiental (Linstone & Murray., 2002). El mismo se aplicó seleccionando al grupo de expertos los cuales se sometieron a una autoevaluación de información y argumentación que poseen sobre el tema, utilizando la metodología requerida.

Selección de los expertos

En la selección del grupo de expertos se realizó previa identificación de los individuos (investigadores en temas de medio ambiente) con pertinencia y competencia en el área del conocimiento investigado, sobre la base de su currículo personal. Inicialmente se consideró un valor total de 10 expertos pertenecientes al Puerto Moa y de centros de estudios de biotecnología y medio ambiente de la Universidad de Oriente y el Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa.

Instrumento

Se aplicó a los expertos, como instrumento, un cuestionario elaborado con base en el campo de acción de la investigación, el cual agrupa los ítems entorno a dos temas: 1. Experiencias obtenidas en la investigación de estudios de evaluación de impactos y 2. Pertinencia y objetividad de los trabajos desarrollados a raíz de su investigación individual o colectiva. Para procesar la información recogida en el cuestionario y realizar los pases de rondas establecidos se utilizó una aplicación informática elaborada a partir del método Delphi, versión 1.0 (Oñate *et al.*, 1998).

Procedimiento

Se estableció la metodología a seguir como se muestra en la (Anexo VI). La fase preliminar delimita el tema de estudio, concibiendo inicialmente el problema de investigación, donde se selecciona el grupo de expertos y la supervisión del trabajo. La fase exploratoria, incluye el cuestionario para validar el objetivo de la presente investigación, mientras que la fase final sintetiza los resultados de todo el proceso de selección, validación y evaluación mediante la concordancia y consulta a los expertos, sometiendo a evaluación las variables definidas con anterioridad en la segunda ronda (Oñate *et al.*, 1998; Linstone & Murray., 2002).

III.3 Caracterización de la matriz suelo

III.3.1 Análisis Granulométrico

El suelo fue sometido a un análisis granulométrico realizado en el laboratorio de Mecánica de Suelos del Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa. Dr. Antonio Núñez Jiménez (NC 631: 214)

III.3.2 Ensayo rápido de aireación de suelos

Para realizar el ensayo se dobló un papel de filtro a lo largo de sus diámetros y se colocaron dos muestras de suelo (punta de una espátula) en los extremos opuestos del papel. Se añadieron dos gotas de HCl $c(x/Z^*)=0.1$ N a cada una de las muestras y una gota de la disolución de Tiocianato de potasio (KCNS) y otra de Hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) en las zonas húmedas. La

aparición de coloración roja con KCNS es indicativo de la presencia de hierro férrico. La aparición de color azul con $K_3Fe(CN)_6$, es indicativo de la presencia de hierro ferroso.

III.3.3 Determinación de la capacidad de campo

Se dispuso de una cantidad de tierra conocida, secada previamente a 105 °C, sobre un embudo con papel de filtro para impedir el paso de la tierra (el peso del papel de filtro debe tenerse en cuenta). Se regó el sistema con agua destilada hasta quedar completamente empapado. Cuando cesó el goteo de agua por el embudo se pesó el conjunto del papel con la tierra húmeda. Descontando de este valor el peso de la tierra seca y el peso del papel de filtro (realizando todo el proceso sin tierra) se obtuvo el peso del agua que retiene la muestra de tierra. La capacidad de campo en porcentaje se calculó al dividir el peso de agua retenida entre la cantidad de tierra seca dispuesta por 100 (NC 1042: 2014).

III.3.4 Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad.

Se pesó la cápsula vacía en balanza analítica y se le añadió 1 g de tierra, tomando este valor. Se colocó la muestra en la estufa a 105 °C por 1 hora para eliminar el contenido de agua, hasta peso constante. Se enfrió en desecadora y pesó, anotando el valor. Luego se colocó la muestra en la mufla a 550 °C durante 1 hora hasta peso constante para eliminar la materia orgánica.

Los cálculos se realizarán según las siguientes fórmulas:

Sólidos totales

$$\%ST = \frac{Ps_{105^{\circ}C}}{P_{muestra}} \times 100$$

Sólidos totales fijos

$$\%STF = \frac{Ps_{550^{\circ}C}}{Ps_{105^{\circ}C}} \times 100$$

Sólidos volátiles

$$\%SV = \frac{Ps_{105^{\circ}C} - Ps_{550^{\circ}C}}{Ps_{105^{\circ}C}} \times 100$$

Contenido de humedad

$$\%humedad = 100 - \%ST$$

Donde:

Ps(105°C) es el peso seco de la muestra en la estufa (g)

Ps(550°C) es el residuo de la muestra en la mufla (g)

Pmuestra es el peso inicial de la muestra de tierra (g)

III.3.5 Determinación del pH del suelo

Se pesó 10 g de suelo y se vertió en un matraz de 50 mL. Se añadió 25 mL de agua destilada. Se agitó de 20 a 30 minutos a intervalos regulares. Se midió el pH de la suspensión acuosa en el equipo.

III.3.6 Determinación del contenido de hidrocarburos

El contenido de hidrocarburos se determinó como materia orgánica extraíble (MOE) mediante extracción en Soxhlet con diclorometano., según la ecuación:

$$\% MOE = (P_{b+m} - P_{bv}) \times 100$$

Donde:

P_{b+m} es el peso del balón con materia orgánica luego de la destilación (g)

P_{bv} es el peso del balón vacío (g)

III.3.7 Determinación de la conductividad eléctrica en la muestra de suelo

La conductividad se determinó mediante celdas conductimétricas en un extracto de suelo con una relación suelo/agua 1/5 (m/v). Se pesó 10 g de suelo y se colocó en un erlenmeyer de 100 mL. Se añadió 50 mL de agua destilada y agitó fuertemente cada 10 minutos durante 1 hora. Se dejó reposar 10 minutos para que el suelo sedimentara y posteriormente se filtró sin perturbar la suspensión a través

de un papel. Los primeros mL de filtrado se despreciaron y se determinó la conductividad del extracto con el conductímetro.

III.3.8 Determinación del contenido de nitrato

La determinación de nitrógeno como nitrato por el método espectrofotométrico UV se realizó según técnica descrita en Jackson (1979). Las muestras se leyeron a 220 nm y 275 nm (existencia de materia orgánica). En el análisis se utilizó $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (5:1000) como solución extractora.

III.3.9 Determinación del contenido de fosfato

Se determinó empleando el método espectrofotométrico según APHA (1998). La estabilidad del complejo se alcanzó a partir de los 30 minutos. En el análisis se utilizó H_2SO_4 $c(x/Z^*)=0.002$ N como solución extractora.

III.4 Determinación de la población microbiana y degradadora de hidrocarburos.

III.4.1 Aislamiento de bacterias a partir de suelos contaminados con petróleo.

El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de suelos contaminados con petróleo provenientes de la Empresa Puerto Moa (distantes de las estaciones de muestreo empleadas para los otros análisis). Se tomaron 4 puntos de muestreo, cada uno separados aproximadamente 250 metros de distancia. Las muestras se conservaron en frascos estériles.

A partir de cada una de estas muestras, se tomó 1 g de suelo que fue disuelto, con ayuda de un agitador magnético, en 10 mL de agua destilada estéril durante 15 min. Posteriormente, 1 mL de esta disolución fue añadida a 99 mL de Caldo Triptona Soya (CTS). Se realizaron diluciones seriadas decrecientes (10^{-1} - 10^{-10}) en salina fisiológica estéril al 0,85% y las diluciones escogidas se sembraron mediante diseminación en placas petri que contenían Agar Triptona Soya (ATS), con ayuda de una espátula de Drigalsky. Las placas fueron incubadas a 30 ± 5 °C, en posición invertida, durante 16-24h. Transcurrido este tiempo fueron contadas

las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y el resultado se expresó como UFC/mL.

Las colonias se escogieron según sus diferencias morfológicas macroscópicas, en cuanto al color, elevación, forma, tamaño y bordes de sus colonias. Las mismas fueron purificadas mediante agotamiento en placas que contenían ATS; se describió la morfología de las colonias mediante la observación al microscopio estéreo y, las de las células mediante tinción de Gram y posterior observación al microscopio óptico.

III.4.2 Determinación de crecimiento de población heterótrofa en fuente de hidrocarburo (medio Vela).

Para conocer la capacidad de crecer utilizando el petróleo como única fuente de carbono, las bacterias aisladas fueron cultivadas en placas con medio Vela con petróleo. El medio Vela (Vela & Ralston, 1978) estuvo compuesto por Solución A: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 30 g; KNO_3 , 3,5 g; NaHCO_3 , 62,5 g; NH_4Cl , 35 g; H_2O destilada, 2 litros. Solución B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,5 g; ZNSO_4 , 0,75 g; H_2O destilada, 1 litro. Solución C: KH_2PO_4 , 10 g; H_2O destilada 150 mL.

El medio de trabajo se formuló mezclando en 180 mL de agua destilada, 0,8 mL de la solución A, 0,4 mL de la solución B y 0,2 mL de la solución C. Se le añadió 4 g. de agar bacteriológico.

Se preparó una emulsión de petróleo compuesta por: 18 mL de H_2O destilada; 1 gota pequeña de TWEEN 20; 2 g de petróleo. La emulsión se dejó en agitación por 4 horas. Luego la emulsión se añadió al medio ya formulado. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, el medio se distribuyó de forma aséptica en placas Petri y luego de 24 h se sembraron las bacterias aisladas mediante la realización de una estría en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 30°C, observándose el crecimiento bacteriano diariamente.

III.5 Ensayos de degradación de hidrocarburos por las cepas aisladas utilizando microcosmos

A partir de los resultados de MOE se escogió el suelo más contaminado para el desarrollo de esta técnica. Se colocaron 400 g del suelo contaminado con

hidrocarburos (previamente esterilizado) en bandejas de aluminio de 80 cm x 40 cm y se homogenizaron las muestras (Anexo VII) y, posteriormente, se procedió a realizar los tratamientos con las cepas seleccionadas.

Las bacterias fueron cultivadas en CTS durante toda la noche (overnight) en agitación y a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración del inóculo de cada cepa seleccionada a 10^6 UFC/mL, con ayuda del Patrón 5 de Mc Farland (Anexo VIII), utilizando salina fisiológica estéril al 0,85 %. Los cultivos fueron dispersados de manera homogénea sobre el suelo contenido en las bandejas, con ayuda de un atomizador.

Durante 8 semanas se tomaron muestras del suelo (1g) semanalmente para determinar la concentración bacteriana (UFC) y la MOE (sub-epígrafe III.3.6). La determinación de las UFC/mL se realizó según el procedimiento descrito anteriormente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

III.6 Diseño experimental y análisis estadístico.

Los datos experimentales se sometieron a tratamiento estadístico, empleando el programa STATGRAPHICS CENTURION v 15.2.14. El tratamiento consistió en un diseño estadístico de bloques al azar:

- Cálculo de la media y desviación estándar de los parámetros microbiológicos a partir de los valores obtenidos en cada medición de las muestras (por triplicado), tanto para crecimiento microbiano como para degradación de hidrocarburos.
- Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía multifactorial con integración según la naturaleza del experimento.
- Prueba de Rangos Múltiples para discriminar cuáles de las medias son significativamente diferentes de las otras.
- Método de Duncan para discriminar entre las medias para la comparación múltiple de variables.

- Método de diferencia mínima de Fisher para comparar entre las medias como prueba de rangos múltiples.

III.7 Materiales, Reactivos y Equipos.

Principales materiales, reactivos y equipos utilizados en la investigación.

Materiales y Equipos:

- Placas Petri
- Pesas
- Bandejas
- Pomos de 1 litro
- Matraces aforados de 25, 50, 100 y 250 mL
- Rastrillo de Mano
- Pipetas
- Desecadoras
- Tamiz Mecánico
- Estufa Labergertis(Alemania)
- Mufla (nombre)
- Balanza Analítica (Sartorius BP 121 S)
- Conductímetro Kruss(Alemania)
- Planchas de Calentamiento
- Espectrofotómetro UV (PHARMACIA LKB-ULTROSPEC III)
- Vortex
- Flujo Laminar
- pHmetro

Reactivos:

- Ácido Clorhídrico HCl p.a (Quinsa. Unión Química. Cuba)
- Ácido Fosfórico H₃ PO₄ p.a (Merk. Alemania)
- Diclorometano CH₂Cl₂ p.a (Quinsa. Unión Química. Cuba)
- Hidróxido de Sodio NaOH p.a (Quinsa. Unión Química. Cuba)
- Hidróxido de Calcio Ca (OH)₂ p.a (REACHIM. Rusia)
- Sulfato de cobre pentahidratado CuSO₄*5H₂O p.a (BDH AnalaR. Inglaterra)
- Carbonato de magnesio MgCO₃ p.a (REACHIM. Rusia)
- Ácido sulfúrico H₂ SO₄ p.a (Quinsa. Unión Química. Cuba)
- Tiocianato de potasio KCNS p.a (Merk. Alemania)
- Hexacianoferrato (III) de potasio K₃Fe(CN)₆ p.a (Merk. Alemania)
- Dicromato de potasio K₂ Cr₂ O₇ p.a (BDH AnalaR. Inglaterra)
- Cloruro de bario BaCl₂ p.a (Merk. Alemania)
- Nitrato de sodio NaNO₃ p.a (REACHIM. Rusia)
- Hidrogenofosfato de potasio K₂ HPO₄ p.a (REACHIM. Rusia)
- Fenolftaleína Indicador
- Agar Triptona Soya (ATS) (BIOCEN. Cuba)
- Caldo Triptona Soya (ATS) (BIOCEN. Cuba)
- Caldo Nutriente (CN) (BIOCEN. Cuba)
- Agar Bacteriológico (AB) (BIOCEN. Cuba)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. I Evaluación de impacto ambiental en la Empresa Puerto Moa.

La identificación de los impactos ambientales se obtuvo analizando la interacción entre los componentes provenientes de las empresas asentadas en el Puerto Moa y los factores ambientales de su medio circundante. Se identificaron los factores afectados del medio y las acciones que generan impactos con la ejecución del proyecto.

En la EIA en condiciones actuales de operación, la matriz causa – efecto (Tabla IV) presenta dos entradas con 7 atributos ambientales a impactar y 4 actividades que pueden causar impacto en el ambiente y la salud. Analizando las 28 posibles interacciones obtenidas en la matriz causa – efecto, se encontró que se relacionan 24 atributos con sus respectivas actividades impactantes. Se identificó que la calidad del aire está determinada por las actividades: emisión de contaminantes y la acumulación de residuos. A su vez las aguas superficiales y subterráneas están influenciadas por el vertido de aguas residuales producto de las actividades humanas, vertido de aguas y líquidos industriales, emisión de contaminantes y acumulación de residuos.

Los factores suelo y vegetación están afectados por todas las acciones impactantes excepto por el vertido de aguas residuales producto de las actividades humanas. Tanto la fauna, relaciones ecológicas y salud e higiene se cruzan en la matriz con todas las acciones impactantes (Tabla IV).

En un segundo paso se elaboró la matriz de valoración de impactos, la que permitió obtener una valoración cualitativa de la importancia de los impactos presentes, interceptando las dos informaciones, obtenidas sobre la base de la matriz causa-efecto, con la finalidad de significar cuáles alteraciones ambientales se derivan tanto del estado inicial del medio, durante la ejecución del proyecto, como durante su explotación; permitiendo entonces valorar su importancia.

En la matriz de valoración de impactos (Tabla V) se muestran 24 impactos negativos, resultado del análisis del cruce de datos de la matriz causa-efecto

contra las 11 características correspondiente a la matriz en cuestión, lo cual significa que, además de ser perjudiciales, disminuyen la calidad de los factores analizados. Por tanto, se manifiestan tres resultados irrelevantes por debajo de 25, valor establecido en la metodología según Conesa, (2000) y Milán, (2004); correspondientes a M2I1, M5I1, M6I1 para un 13 % del total. En el caso de los resultados moderados se exhiben 16 valores entre 25 y 50, que corresponden al 67 % del total y los resultados severos entre 50 y 75 muestran un total de 5 atributos impactados correspondientes a M1I4, M2I3, M2I4, M5I3, M6I3 que representan el 21 %.

Según se muestra en la tabla VI, en el factor calidad del aire, el impacto de la emisión de contaminantes resultó ser moderado, determinado fundamentalmente por los atributos intensidad, momento, efecto y probabilidad; sin embargo, para este mismo factor, el impacto acumulación de residuos, resultó ser severo determinado principalmente por todos los atributos excepto reversibilidad y periodicidad que presentaron valores de 2, siendo de 12 el valor más elevado para el atributo intensidad. El factor aguas superficiales y subterráneas resultó ser irrelevante para el efecto vertido de aguas de origen humano y moderado para vertido de aguas y líquidos industriales, originándose efecto severo para los impactos emisión de contaminantes y acumulación de residuos, respectivamente, donde los atributos de mayor influencia fueron la intensidad, extensión y el momento (Tabla VI).

En cambio, los impactos sobre el factor suelo, en todos los casos analizados resultó ser moderado, sin que existan diferencias significativas entre ellos. Los atributos de mayor influencia fueron la intensidad, extensión, momento y efecto. Lo mismo ocurre con los resultados mostrados para el factor vegetación, donde los efectos de los impactos también son moderados (Tabla VI).

Tabla IV: Matriz causa-efecto

Matriz Causa - Efecto					
FACTORES DEL MEDIO	Clave	ETAPA: Actual funcionamiento			
		Vertido de aguas residuales. Actividad Humana	Vertido aguas industriales	Emisión contaminante	Acumulación residuos
		I1	I2	I3	I4
Calidad del aire	M1			x	x
Aguas superficiales y subterráneas	M2	x	x	x	x
Suelo	M3		x	x	x
Vegetación	M4		x	x	x
Fauna	M5	x	x	x	x
Relaciones ecológicas	M6	x	x	x	x
Salud e higiene	M7	x	x	x	x

Tabla V: Matriz de importancia de impacto.

MATRIZ DE IMPORTANCIA IMPACTOS NEGATIVOS								
FACTORES DEL MEDIO		ETAPA: Actual funcionamiento						
Nombre	Clave	IMPACTOS				Valor Alteración	Máx. valor Alteración	Grado de Alteración
		I1	I2	I3	I4			
Calidad del aire	M1			-29	-72	-101	200	-51
Aguas superficiales y subterráneas	M2	-18	-42	-54	-55	-169	400	-42
Suelo	M3		-34	-40	-34	-108	300	-36
Vegetación	M4		-37	-38	-25	-100	300	-33
Fauna	M5	-12	-31	-57	-44	-144	400	-36
Relaciones ecológicas	M6	-22	-27	-56	-44	-149	400	-37
Salud e higiene	M7	-29	-48	-40	-48	-165	400	-41
Valor Medio de importancia		-39						
Dispersión Típica		14						
Rango de Discriminación		-25		-53				
Valor de la Alteración		-81	-219	-314	-322	-936		
Máximo Valor de Alteración		400	600	700	700		2400	
Grado de Alteración		-20	-37	-45	-46			-39

Tabla VI: Matriz para la valoración de impactos

MATRIZ PARA LA VALORACION DE IMPACTOS													
IMPACTOS	ETAPA: Actual funcionamiento												
	Naturaleza	Intensidad	Extensión	Momento	Persistencia	Reversibilidad	Acumulación	Probabilidad	Efecto	Periodicidad	Percepción Social	Importancia	Valor Máximo de Importancia
	Sig.	In	Ex	Mo	Pr	Rv	Ac	Pb	Ef	Pr	PS	I	
M1I3	-	2	2	4	2	1	1	4	4	2	1	-29	100
M1I4	-	12	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-72	100
M2I1	-	2	2	1	1	1	1	2	1	1	0	-18	100
M2I2	-	4	4	4	4	2	4	4	1	2	1	-42	100
M2I3	-	8	4	4	4	2	4	1	4	1	2	-54	100
M2I4	-	8	2	4	4	2	4	4	4	4	1	-55	100
M3I2	-	2	2	4	4	2	4	4	4	2	0	-34	100
M3I3	-	4	4	4	4	2	4	1	4	1	0	-40	100
M3I4	-	4	2	2	4	1	4	1	4	2	0	-34	100
M4I2	-	4	2	4	4	2	4	1	4	2	0	-37	100
M4I3	-	4	4	4	4	2	2	1	4	1	0	-38	100
M4I4	-	2	2	2	2	1	4	1	4	1	0	-25	100
M5I1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-12	100
M5I2	-	4	2	2	2	1	4	1	4	1	0	-31	100
M5I3	-	8	4	4	4	2	4	4	4	2	1	-57	100
M5I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-44	100
M6I1	-	2	1	2	1	1	4	1	4	1	0	-22	100
M6I2	-	4	2	1	1	1	2	1	4	1	0	-27	100
M6I3	-	8	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-56	100
M6I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-44	100
M7I1	-	4	1	1	2	1	4	1	4	1	1	-29	100
M7I2	-	4	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-48	100
M7I3	-	2	4	2	4	2	4	4	4	4	2	-40	100
M7I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-48	100
TOTAL		105	69	74	76	39	83	61	87	48	15	93	2400

En el caso particular de los factores fauna, relaciones ecológicas, salud e higiene, están afectados por cada uno de los impactos identificados, pero mostraron diferencias, algunas de ellas significativas en cuanto al grado de importancia del efecto. Ejemplo de esto resulta el factor fauna con respecto a la emisión de contaminantes, con un efecto severo comparado con los demás impactos que fueron moderados y uno de ellos con valor irrelevante, donde los atributos que más incidieron en el caso del mayor valor (severo) son intensidad, extensión, momento, reversibilidad, acumulación y probabilidad. Igual sucedió con el factor relaciones ecológicas el cual exhibió un impacto de efecto severo y la influencia de atributos tales como extensión, momento, reversibilidad, acumulación e importancia), sus valores de importancia muestran un efecto irrelevante y dos de efecto moderado (Tabla VI).

Para el factor salud e higiene resulta interesante destacar que todos los impactos tuvieron un efecto moderado, pero cercano al límite de un efecto severo, es decir, que este es un factor susceptible a cualquier variación de efectos negativos, donde se muestran atributos con gran frecuencia de aparición como la extensión, momento y reversibilidad.

Del análisis de las matrices causa y efecto y valoración de los impactos (Tablas IV y VI) se derivó que los impactos que afectaron y los factores del medio dañados se recogen por igual en la matriz de importancia de impacto. Esta última reveló que los factores del medio que experimentaron un alto grado de afectación son principalmente dos, primeramente el factor del medio: aguas superficiales y subterráneas con un valor de alteración de 169, donde el máximo valor de alteración fue 400 y grado de alteración de -42, siendo el más afectado. Cabe destacar que el impacto I4 (acumulación de residuos) tuvo mayor influencia sobre este factor con un valor de importancia de -55. El segundo factor del medio que mostró altos índices de afectación fue salud e higiene con un valor de alteración de 165, correspondido con el máximo valor de alteración de 400 y un grado de alteración de -41 donde nuevamente el impacto I4 con I2 (vertido de aguas industriales) ejerció una influencia negativa de -48 de importancia.

A su vez, la matriz de importancia (Tabla V), mostró dos impactos ambientales con altos valores de alteración. El impacto I3 identificado como emisión de contaminante, presentó un valor de alteración de 314, correspondido por el consiguiente máximo valor de alteración de 700 y un grado de alteración de -45. El impacto I4 identificado como la acumulación de residuos, tuvo el valor más elevado de alteración que el mismo puede manifestar hacia los factores del medio, llegando a alcanzar el valor de 322, correspondido por su máximo valor de alteración también de 700 y un grado de alteración de -46.

Al utilizar la metodología de análisis de datos a través del grupo de expertos se encontró una concordancia positiva en relación a los resultados emitidos y la selección del área más contaminada con residuales que se utilizó como material de inicio para la evaluación del crecimiento y degradación microbiana de hidrocarburos. De ahí que el factor suelo es uno de los más vulnerables a la actividad socioeconómica que se realiza en el área de estudio, este evidenció una exposición elevada a los hidrocarburos y otros residuos de origen industrial, atendiendo a que no existe un sistema de tratamiento, la ausencia de políticas, instrumentos de gestión ambiental, labores de buenas prácticas que tracen un camino hacia el correcto manejo y relación con los factores del medio existentes (García *et al.*, 2013). Los resultados arrojados por la matriz de importancia de impactos para el factor suelo en específico exhibió valores significativos de importancia con respecto a los demás factores del medio y de gran vulnerabilidad frente a los impactos identificados.

IV.2 Caracterización químico-física de los suelos.

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la característica química y física del mismo, la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles (Alarcón *et al.*, 2013).

Las zonas muestreadas tuvieron como principal elemento dispersante de la contaminación una corriente de agua superficial prácticamente léntico que alberga y transporta volúmenes significativos del residual.

Los resultados de las muestras de suelo con previa homogenización en tamiz de 12 milímetros, teniendo en cuenta la cercanía a sistemas de manglar, piedras de gran tamaño y fracciones gruesas, mostró que en los tres suelos valorados se confirmó la presencia de lodos petrolizados, mostrando mayor presencia del hidrocarburo (valoración visual) en el suelo 3, con características distintivas como: fuerte olor a hidrocarburo y aspecto lodoso (Anexo IX). La ubicación donde se encuentra el suelo 3 se muestra en la (Anexo II).

IV.2.1 Análisis Granulométrico

El análisis granulométrico del suelo de la Empresa Puerto Moa (Tabla VII) permitió conocer la distribución y tamaño de partícula de los mismos mediante tamizado por vía seca. Al analizar la tabla que muestra los valores de clasificación (Tabla I), se pudo discriminar que en los tres suelos exhibieron valores mínimos de porcentaje de arcilla en comparación con los de grava y arena. El suelo 2 tuvo un porcentaje de grava elevado en comparación con los suelos 1 y 3. Según la posición geográfica en el área, es el suelo más alejado de la zona costera. Los suelos 1 y 3 mostraron mayores valores de arena, el caso particular de este último presentó un valor de 85 %. Los suelos arenosos poseen baja retención de nutrientes y de agua, y la aireación es buena (Nápoles, 2005). Este análisis mostró claramente que los suelos revelan diferentes características, esto se traduce en que los suelos más arenosos son los que se disponen en las cercanías de la zona de manglar y/o costera y el de mayor porcentaje de grava más alejado del litoral y cercano a los tanques de almacenamiento, donde el suelo es modificado sistemáticamente en las labores de mantenimiento y limpieza de los contenedores.

IV.2.2 Ensayo rápido de aireación de los suelos

En el ensayo de aireación a los suelos de la Empresa Puerto Moa, se encontró que los suelos 1 y 2 resultaron positivos a las pruebas para hierro ferroso (Fe^{2+}) y

férrico (Fe^{3+}), lo que denotó una baja oxigenación de los mismos. A su vez, el suelo 3 evidenció una falta de oxígeno severa (Jackson, 1979). En todos los casos fue característica del suelo el color pardo, más intenso en el suelo 3, sumado a la presencia de volúmenes significativos de hidrocarburos.

Si se analiza que en el suelo 3 (Tabla VIII) predominó un mayor contenido de arena se infiere que el mismo debe presentar buena aireación por tener un tamaño de partícula y disposición espacial que permita que circule y se acumule el aire en esta capa, facilitando el proceso de aireación, siendo todo lo contrario en los resultados de este análisis. Es claro que la acumulación de hidrocarburos desempeña un papel determinante pues impidió la circulación del aire y el medio acuoso (Nápoles, 2005).

IV.2.3 Determinación de la capacidad de campo

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante, el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica (Zhao *et al.*, 2011). Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (Zhang *et al.*, 2010). Además algunas bacterias requieren condiciones máximas o mínimas de humedad para su crecimiento; el agua es importante para su desarrollo porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma bacteriano.

Es conveniente mantener una humedad del orden del 25- 75 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la

saturación, que depende de cada tipo de suelo (Martínez *et al.*, 2011), para los procesos de biorremediación se trabaja hasta un 60% de la capacidad de campo pues diferentes estudios reportan que las tasas óptimas de biodegradación se dan cuando la saturación de agua en el suelo se encuentra entre 25-60%. A valores menores, la degradación se ve inhibida (Martínez *et al.*, 2011).

La Tabla VIII, que muestra la capacidad de retención de agua arrojó que el suelo 1 describe mayor porcentaje de capacidad de campo con un 68 %, luego le sigue el suelo 3 con un 61% y el de menor capacidad es el suelo 2 con un 56 %. Si tenemos en cuenta que para los experimentos de biorremediación se toma como valor óptimo un 60% de capacidad de campo, entonces las condiciones físicas de cada uno de estos suelos se acercan al valor antes mencionado, siendo el suelo 3 el más representativo pues el porcentaje de arcilla y arena que presenta es de un 88.6 %. La relación entre arena y arcilla del suelo 2 es de 30.6% (alta capacidad de infiltración) es el más bajo, se sabe que las partículas de arcilla en el suelo se compactan fácilmente y su capacidad de retención es muy alta, efecto contrario en este punto (Nápoles, 2005).

IV.2.4 Determinación del pH del suelo

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones (Sorkoh *et al.*, 1993). Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino (Sharpley, 1991). En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro pH 6-8 (Dibble, 1979). La medida de pH nos da también la medida del contenido de sales que presenta el suelo. El suelo 3 presentó el valor más elevado de pH con 8,6 (Tabla VIII). Un análisis de los suelos 1 y 2 mostró que sus valores de pH son superiores a 7, por lo que se podría decir que en los mismos existen iones que les dan estas características básicas tales como CO_3^{2-} , HCO_3^- y otros (Baker, 1994).

IV.2.5 Determinación del contenido de hidrocarburos (MOE), sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad

Los solventes más usados para la separación de los hidrocarburos suelen ser: hexano, metanol, éter etílico, diclorometano, butanol, acetato de etilo, acetona, ciclohexano, o la combinación entre ellos. Pons *et al.*, (2011) analizan cronosecuencias de las investigaciones, acerca de contaminación en suelos con petróleo, destacando el método de extracción Soxhlet y el diclorometano como extractante.

A simple vista se observó que el suelo 3 presentaba una mayor contaminación con hidrocarburos (Anexo IX). En la Tabla VIII se puede observar que el mayor valor de MOE (81,6%) fue obtenido en el suelo 3, corroborando así lo anteriormente planteado. A su vez, los suelos 1 y 2 presentaron un contenido de MOE de 59.8% y 72.4 % respectivamente que, aunque menor, continúan siendo valores muy elevados, evidenciando un alto nivel de contaminación en el área de estudio.

El contenido de sólidos volátiles en los tres suelos estudiados fue igualmente elevado, obteniéndose valores de 24%, 32% y 42 % respectivamente, siendo en el suelo 3 el de mayor contenido de hidrocarburos (Tabla VIII).

Durante el tratamiento a 105 °C para la determinación de los sólidos totales se volatilizan parafinas, isoparafinas y naftenos de bajo peso molecular con temperatura de ebullición entre 20 y 150 °C, desapareciendo el olor a hidrocarburos (Nápoles, 2005). El contenido de sólidos totales en las tres estaciones no difiere mucho (Tabla VIII), los valores oscilaron entre 62, 73 y 86 % respectivamente. La fracción inorgánica, expresada por los sólidos totales fijos, fue mayor en el suelo 3 con 57% (Tabla VIII). De esta forma se correlaciona el contenido de humedad que presentaron los suelos en el caso de estudio de la Empresa Puerto Moa, pues los mismos mostraron valores de 38, 27 y 14% de humedad muy afín al contenido de sólidos totales (Tabla VIII). El suelo 3, más contaminado presentó el valor más bajo de humedad, pero a su vez fue el que presentó el valor más elevado de sólidos totales. Asumiendo que en dicho suelo

los sólidos totales en su mayoría son hidrocarburos, el cual es un compuesto hidrofóbico, entonces se justifica el bajo porcentaje de humedad que se obtuvo.

IV.2.6 Determinación de la conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es la capacidad de una solución acuosa para transportar una corriente eléctrica. Es una propiedad de las soluciones que se encuentra muy relacionada con el tipo y valencia de los iones presentes, sus concentraciones total y relativa, su movilidad, la temperatura del líquido y su contenido de sólidos disueltos. La determinación de la conductividad eléctrica es por lo tanto una forma indirecta de medir la salinidad del agua o extractos de suelo (Abha *et al.*, 2012). El suelo 3 (Tabla VIII) presentó el mayor valor de conductividad eléctrica con un valor de 201 μS . Teniendo en cuenta que este el suelo más contaminado y con la presencia de mayor cantidad de sólidos, es lógico que presente este valor. Existe una correlación entre la cantidad de sólidos y la capacidad de transmitir la corriente eléctrica a través de los mismos, mientras más contaminantes disueltos presentes en la capa suelo, mayor es la posibilidad de conducir la corriente eléctrica (Arrieta *et al.*, 2012).

IV.2.7 Determinación del contenido de nitrato

El nitrógeno es un elemento indispensable para la vida, forma parte de las principales biomoléculas de todos los seres vivos. Es también uno de los elementos más abundantes de la Tierra, pues en su forma gaseosa (N_2) constituye el 78% en volumen de la atmósfera. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno presente en muchos suelos es escasa, debido a su propia dinámica y a su ciclo biogeoquímico (Bell *et al.*, 2011). El nitrógeno puede llegar al suelo gracias a los aportes de materia orgánica y a la fijación bacteriana a partir del aire. Dentro del suelo, es aprovechado por las plantas, animales y microorganismos que lo incorporan a sus tejidos. Cuando dichos organismos se mueren, el nitrógeno reingresa al suelo completando el ciclo.

En los microorganismos la carencia de nitrógeno puede afectar el crecimiento, por lo que la población microbiana no tendrá un desarrollo óptimo. En contraste, demasiado nitrógeno permite el crecimiento microbiano rápido y acelera la

descomposición; pero puede crear problemas de olor en condiciones anaerobias. Además, el exceso de nitrógeno puede ser liberado como amoníaco; en tanto que el nitrógeno aprovechable escapará en forma de gas. Para la mayoría de los materiales una relación C/N cercana a 10:1 mantendrá estos elementos en equilibrio aproximado. En los suelos normalmente el contenido de nitrógeno varía de 0.05 a 2% en sus diferentes formas (Di Martino, 2015).

El contenido de Nitrato de los suelos 1 y 2 resultaron más elevados en comparación con el suelo 3 con valores de 3.6 mg/L y 4.2 mg/L respectivamente. Los análisis químicos anteriores más el análisis del criterio de expertos, coinciden que es el más contaminado mostrando una concentración más baja de nitrato de 3,1 mg/L (Tabla VIII). Este valor demostró no existe una concentración suficiente de nitrógeno para que los microorganismos puedan degradar los componentes del petróleo.

IV.2.8 Determinación del contenido de fosfato

El fósforo elemental (P) no se encuentra en estado libre en la naturaleza porque se oxida muy fácilmente; sin embargo, son muy comunes los compuestos orgánicos y principalmente minerales que contienen fósforo. La forma orgánica se encuentra en el humus y la materia orgánica, y sus niveles en el suelo pueden variar. El P es un macronutriente esencial para las plantas y los microorganismos, junto con el nitrógeno y el potasio. Puede ser un nutriente limitante, ya que es un componente de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos. Los análisis de P sirven fundamentalmente para el control de la dosificación de productos químicos en tratamientos de agua o suelos, o como un medio para determinar que un sistema presenta contaminación por exceso de este compuesto (Di Martino, 2015).

El contenido de Fosfato igualmente en el suelo 1 y 2 mostró valores de 1.3mg/L y 1.1mg/L respectivamente, en comparación con el suelo 3 que mostró una concentración más baja de fosfato de $0,3 \text{ mg/L} \times 10^{-4}$ (Tabla VIII). Con estos valores se apreció que no existe una concentración suficiente de fosfato en suelo para que los microorganismos puedan degradar los componentes del petróleo.

Tabla VII. Porcentaje granulométrico de los suelos contaminados de la EPM

Suelo	Grava (%)	Arena (%)	Arcilla (%)
1	25	63	12
2	69,4	27,8	2,8
3 *	11,4	85	3,6

Tabla VIII. Resultados de la caracterización físico química de los suelos.

	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3	
Aireación	Hierro Ferroso	+	+	+
	Hierro Férrico	+	+	-
Capacidad de Campo (%)	68	56	61	
pH	7.5	8.1	8.6	
MOE (%)	59.8	72.4	81.6	
Solidos Totales (%)	62	73	86	
Solidos fijos (%)	31	44	57	
Solidos Volátiles (%)	24	32	42	
Contenido de Humedad (%)	38	27	14	
Conductividad eléctrica (μS)	152	174	201	
Contenido de Nitrato (mg/L)	3.6	4.2	3,1	
Contenido de Fosfato (mg/L)	1.3	1.1	0,3	

IV.3 Aislamiento de microorganismos nativos del área de estudio

Durante los últimos 20 años han aumentado, de forma significativa, las metodologías para estudiar la diversidad microbiana presente en la biosfera. Pero la realidad es que todavía queda mucho camino por recorrer. De hecho, existe mucha controversia y el orden de magnitud todavía es desconocido, aunque algunos estudios apuntan que en un único gramo de suelo podrían estar presentes entre 10^2 - 10^7 especies distintas de microorganismos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que solo entre un 0,001 y un 1% de los microorganismos viables son cultivables. Por este motivo, los estudios clásicos de diversidad microbiana, basados únicamente en el aislamiento de microorganismos, representan una parte minoritaria de la diversidad real existente (Madueño *et al.*, 2011).

La caracterización de la microbiota presente en los suelos contaminados con hidrocarburos de la Empresa Puerto Moa estuvo centrada, principalmente en el aislamiento de bacterias. Los hidrocarburos en el medio ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos. Ambos son relativamente abundantes en el suelo (Echeverri *et al.*, 2010).

Se aislaron un total de $25,0 \pm 2,0 \times 10^6$ UFC/mL. A partir de la caracterización de las colonias bajo el microscopio estéreo se seleccionaron 4 cepas bacterianas que difieren en cuanto a su morfología (Tabla IX). El número de comunidades bacterianas en sitios contaminados suele ser menor que en sistemas no contaminados, aproximadamente el 0.1% de la población microbiana total (27), y pueden variar de acuerdo al momento del muestreo o el grado de contaminación por hidrocarburos (32), las condiciones climáticas y el tipo de suelo (Echeverri, 2011)

Samanez, (2008) obtiene 58 cepas de bacterias a partir de 10 muestras de suelos contaminados con petróleo y aunque el mayor porcentaje de aislamiento (70, 70%) fue para las bacterias Gram negativas, el 20,70 % se correspondió con la obtención de bacterias y cocos Gram positivos. De igual manera, a los 7 días de incubación Echeverri *et al.*, (2010) obtienen 28 colonias con morfologías diversas cuando aíslan bacterias potencialmente degradadoras de petróleo.

La no presencia de bacterias Gram negativas en nuestro trabajo puede deberse a errores en cuánto a la selección de las colonias que diferían morfológicamente o a la concentración (baja) de las mismas en la zona muestreada. Razones por la cual no descartamos su presencia en el suelo muestreado.

IV.4 Ensayo de crecimiento microbiano en medio vela.

En este ensayo se determinó la capacidad cualitativa de las cepas aisladas de crecer en el medio vela, que tiene como fuente de carbono el petróleo. Las cepas fueron capaces de asimilar esta fuente de carbono al apreciar su crecimiento en estría, a las 48 h de incubación, en las placas Petri que contenían dicho medio (Anexo X).

Existen bacterias capaces de utilizar petróleo para su crecimiento y mantenimiento, conocidas como bacterias degradadoras de hidrocarburos, entre ellas: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* spp y *Coryneformes*, que por su versatilidad metabólica, son capaces de convertir sustratos habitualmente no degradables, en metabolitos fácilmente asimilables o susceptibles de ser catalizados enzimáticamente.

En este trabajo la utilización del medio vela suplementado con una fuente de hidrocarburo (petróleo) es una de las habilidades empleadas para garantizar la supervivencia y adaptación de las cepas bacterianas aisladas. Este criterio coincide con lo planteado por numerosos investigadores quienes sugieren que: la selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros enriquecidos con petróleo, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo (Echeverri *et al.*, 2010).

Tabla IX. Características morfológicas de las colonias y células de las cepas bacterianas aisladas de los suelos contaminados con petróleo en la Empresa Puerto Moa.

Cepas aisladas	Características de las colonias (Anexo XI)	Características de las células (Anexo XII)
1A	Forma circular y punteada con elevación plana y bordes liso.	Cocos Gram +
2B	Forma filamentosa con elevación convexa y de bordes ondulados.	Bacilos Gram+, algunos unidos formando largos filamentos
3C	Forma filamentosa con elevación convexa y de bordes también filamentosos.	Bacilos Gram+, esporulados (endospora central)
4D	Forma filamentosa con elevación convexa y de bordes ondulados.	Bacilos Gram+, algunos unidos formando largos filamentos

IV.5 Ensayo de crecimiento microbiano en microcosmos

El experimento utilizó la técnica de bioaumentación por las indudables ventajas que la misma aporta. Diversos estudios han demostrado que los factores ambientales bióticos y abióticos influyen la efectividad del bioaumentación (Margesin *et al.*, 2011) por lo tanto, es crítico utilizar microorganismos autóctonos del sitio contaminado para realizar el bioaumentación. Asimismo, Nozari *et al.*, (2014) indicaron que tanto la estrategia de inoculación como el destino de los microorganismos inoculados en el suelo durante la aplicación de estrategias de bioaumentación son factores importantes a tener en cuenta

Luego del análisis de la evaluación de impacto ambiental, los análisis químicos realizados y el consenso del grupo de expertos se determinó viable emplear el suelo 3 para realizar el ensayo de crecimiento microbiano en microcosmos. De forma general, una vez inoculadas las 4 cepas bacterianas en las bandejas que contenían el ensayo de microcosmos, se pudo apreciar la capacidad de degradación de estos microorganismos frente al compuesto contaminante. La bioaumentación asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas. Las bacterias son los microorganismos más comúnmente utilizados para la bioaumentación (Shmaefsky, 1999; Saponaro *et al.*, 2002)

En la Tabla X se muestra el crecimiento de las cepas 1A, 2B, 3C y 4D en las 8 semanas de tratamiento en el microcosmos, expresado en UFC/mL. Se aprecia la tendencia de crecimiento de la población bacteriana referida a las cuatro cepas en estudio. A partir de la semana 6 hasta la última semana se nota un incremento apreciable de los valores de densidad microbiana para cada una de las cepas mostrando valores en el orden de 17×10^{15} , 39×10^{15} , 45×10^{15} , 65×10^{16} UFC/mL para las cepas 2B, 1A, 3C y 4D, respectivamente. En el tratamiento estadístico se reflejan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0000$), para un nivel de confianza del 99%, en el crecimiento microbiano exhibido por las 4 cepas seleccionadas en la octava semana (Tabla XI).

Tabla X. Crecimiento microbiano de las cepas 1A, 2B, 3C y 4D en las 8 semanas de tratamiento en microcosmos

UFC/mL									
Cepas	Sem. 0	Sem.1	Sem.2	Sem.3	Sem.4	Sem.5	Sem.6	Sem.7	Sem.8
1A	20E+07	17E+08	23E+09	34E+10	34E+11	31E+12	20E+13	49E+15	39E+17
2B	24E+07	15E+08	13E+09	38E+10	36E+11	10E+12	11E+13	32E+15	17E+17
3C	26E+06	19E+08	74E+09	84E+10	62E+11	84E+12	88E+13	30E+16	45E+17
4D	24E+06	16E+08	54E+09	47E+10	77E+11	65E+12	33E+14	84E+16	65E+19

Tabla XI. Tabla ANOVA para crecimiento microbiano

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,41396E36	3	4,71319E35	86,22	0,0000
Intra grupos	4,37333E34	8	5,46667E33		
Total (Corr.)	1,45769E36	11			

Tabla XII. Prueba de Rangos Múltiples (Duncan) para crecimiento microbiano

Cepas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2B	3	6,7E17	X
1A	3	7,93333E17	XX
3C	3	9,5E17	X
4D	3	1,56333E18	X

El análisis realizado entre réplicas evidencia que no existen variaciones entre las condiciones experimentales por lo que la variación obtenida en el crecimiento microbiano se debe a las características intrínsecas de cada cepa seleccionada.

La prueba de rangos múltiples de Duncan se utilizó para discriminar la cepa de mejor crecimiento. En la (Tabla XII) se muestran los grupos de similitud identificados. La cepa que mostró una cinética de crecimiento más baja es la 2B, seguida por la cepa 1A. La cepa 4D es la que expresó un mejor crecimiento en el periodo evaluado.

Es significativo señalar que no hubo una fase de latencia apreciable en el crecimiento de estos microorganismos en el ensayo de microcosmos. Esto puede deberse a que estas bacterias fueron aisladas de una zona contaminada con petróleo, por lo que su maquinaria biosintética está adaptada para la biodegradación de estos compuestos para su crecimiento y desarrollo. No obstante, se puede apreciar en la Tabla X que en la primera semana de experimento el incremento de la población microbiana fue más lento con respecto a las semanas posteriores.

El uso de la técnica de bioaumentación como estrategia para el tratamiento de contaminantes a escala laboratorio mostró buenos resultados, indudablemente es necesario escalar estos datos a pruebas de campo donde se puedan controlar e incluir nuevos parámetros de experimentación a partir de las cepas que mostraron los mejores comportamientos. Pruebas bioquímicas específicas podrían brindar más información sobre las mismas y la posibilidad de optimización del proceso/técnica mediante la inclusión de tensoactivos microbianos u otro agregado que pueda optimizar el proceso de degradación.

IV.6 Degradación de petróleo en microcosmos por las cepas seleccionadas

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad y, factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de

electrones disponibles, así como la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles (Di Martino, 2015).

Los resultados del ensayo demostraron la capacidad de degradación del hidrocarburo en el suelo de las cuatro cepas seleccionadas, evidenciado por el crecimiento microbiano anteriormente explicado y la disminución del porcentaje de materia orgánica extraíble (MOE). El experimento con la cepa 4D mostró un 83,9 % de capacidad de degradación de hidrocarburos, similar con respecto a los obtenidos con las cepas 3C (83,1 %). Sin embargo las cepas 2B y la 1A mostraron valores menores con 73,9 % y 38,9 % respectivamente (Figura I). Sin embargo, debe señalarse que en el análisis de la degradación de petróleo en el tiempo se muestra que las cepas 2B y 3C logran una capacidad de degradación mayor en las primeras semanas alcanzando en la semana 6 un valor de 70 % y 54,1%, respectivamente. Esto puede ser debido a que estas cepas requirieron de un menor tiempo para asimilar la fuente de carbono utilizada.

Nozari *et al.*, (2014) utilizaron un consorcio de bacterias (*Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*) y lograron establecer valores favorables de remoción de hidrocarburos de un 45.95%, en un lapso de tres días, en suelos contaminados (mg hexadecano/kg suelo) y modificados con nutrientes esenciales y medios minerales sólidos en microcosmos y con estrategias de bioaumentación.

Prakash *et al.*, (2015) utilizaron un consorcio bacteriano (bioaumentación) del género *Kocuria* (Gram +) para la degradación de HAP en microcosmos en condiciones experimentales muy similares de pH, nitrato, fosfato y capacidad de campo; pero, variando las condiciones de cultivo del inóculo (1. medio de residuos sólidos pretratados + licor de maíz fermentado y 2. medio nutriente estándar), logrando valores de degradación de 68% (tercera semana) y 70% (séptima semana), respectivamente. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en este trabajo. El experimento de estos autores sustenta que para bacterias Gram+ la composición y el manejo del medio de cultivo es vital para los procesos de degradación de HAP.

Un aspecto particularmente interesante son los cambios documentados en los conjuntos de bacterias que degradan hidrocarburos aisladas de un mismo suelo en respuesta a la clase de contaminante que está presente en el suelo como factor determinante. Los resultados de Turner *et al.*, (2014) demuestran que el crecimiento y el porcentaje de materia orgánica extraíble están estrechamente relacionados y, se corresponden con la diversidad microbiana y sobre todo con el dominio de los taxones con capacidades de degradación de hidrocarburos en un mismo suelo. Utilizaron un mismo suelo en tres microcosmos con diferentes hidrocarburos (benceno, etil-benceno y xileno) y un consorcio de bacterias previamente aisladas de los suelos mencionados inicialmente. En efecto, se mostraron resultados diferenciales para crecimiento y degradación frente a los diferentes tipos de hidrocarburos. En general, estas diferencias observadas dentro de un consorcio aislado de un mismo suelo son atribuibles a los efectos directos de las propiedades químicas de cada contaminante sobre la comunidad indígena bacteriana. Por tanto, podríamos presumir que en nuestro caso la cepa 3C y, principalmente, la 4D están mejor adaptadas al contaminante más frecuente (hidrocarburo) con el que opera la Empresa Puerto Moa.

Windevoxhel *et al.*, (2011) también obtuvieron altas tasas de biodegradación de hidrocarburos utilizando cepas autóctonas, alcanzando porcentajes de remoción de 97,2%, 96,0% y 93,1% para tres suelos evaluados a diferentes concentraciones de hidrocarburos y utilizando como técnica la bioaumentación.

El análisis de varianza realizado para esta variable muestra que, al término de las 8 semanas, existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0000$) para un nivel de confianza del 99% en la capacidad de degradación del petróleo presente en el suelo por parte de las 4 cepas seleccionadas (Tabla XIII).

La prueba de rangos múltiples de Duncan indica que la cepa con mejor índice de degradación de petróleo al término de las 8 semanas es la 4D coincidiendo con el resultado obtenido para el crecimiento microbiano (Tabla XIV).

El análisis realizado entre réplicas evidencia que no existen variaciones entre las condiciones experimentales por lo que la variación obtenida en la degradación del petróleo corresponde a las capacidades propias de cada cepa seleccionada.

Teniendo en cuenta que la Empresa Puerto Moa está ubicada en una zona costera es importante tomar en cuenta los trabajos de Paniagua *et al.*, (2015) pues en la biodegradación bacteriana de hidrocarburos policíclicos aromáticos HAP demostraron que las bacterias que degradan HAP se pueden aislar de un entorno costero contaminado y que tienen una buena capacidad para la degradación de los mismos. Sus resultados mostraron que existe una correlación positiva entre los genes de estas bacterias y la capacidad de degradación de contaminantes como pireno y fluoranteno.

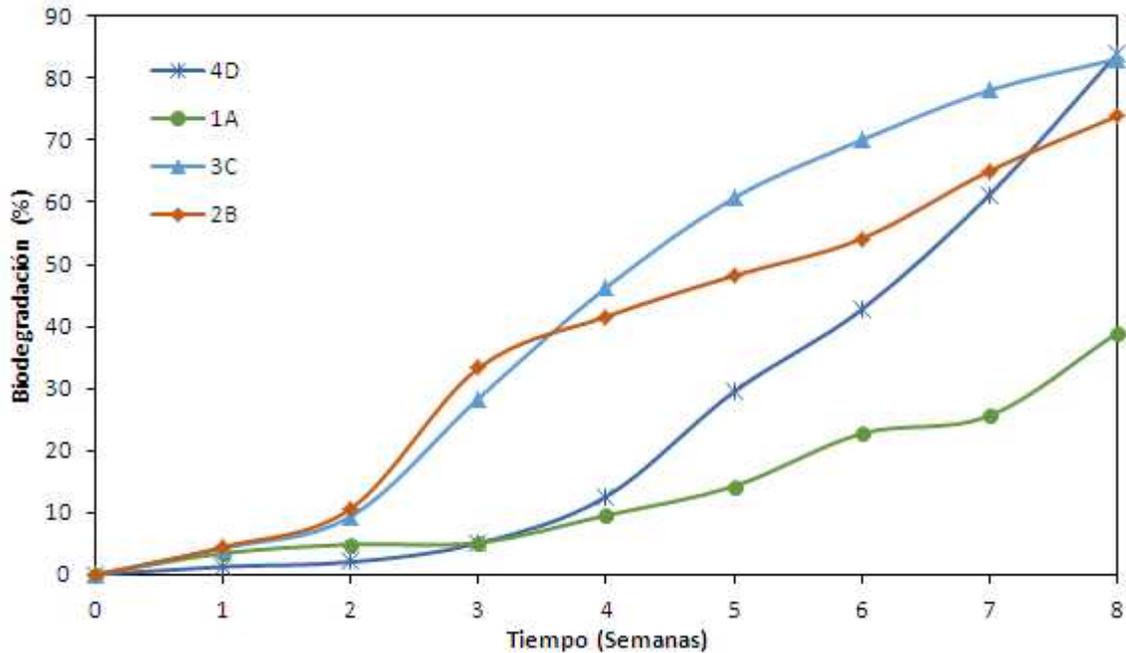


Figura I. Porcentaje de biodegradación de hidrocarburos de las cepas 1A, 2B, 3C y 4D en las 8 semanas de tratamiento.

Tabla XIII. Tabla ANOVA para Materia Orgánica Extraíble

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4036,9	3	1345,63	1102302,18	0,0000
Intra grupos	0,00976599	8	0,00122075		
Total (Corr.)	4036,91	11			

Tabla XIV. Prueba de Rangos Múltiples (Duncan) para Materia orgánica Extraíble

Cepas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1A	3	38,9365	X
2B	3	73,9094	X
3C	3	83,1025	X
4D	3	83,9191	X

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V. CONCLUSIONES

1. El factor suelo y el humano (Salud e higiene) fueron los más vulnerables a la actividad socioeconómica que se realiza en el área de estudio, producto de la exposición elevada a los hidrocarburos y residuos de origen industrial, debido a la no existencia de políticas, sistemas de tratamiento, instrumentos de gestión ambiental y labores de buenas prácticas. Los resultados arrojados por la matriz de importancia de impactos evidenciaron valores significativos de importancia para estos factores.
2. La caracterización químico-física de los suelos de la Empresa Puerto Moa mostraron valores de calidad de suelo muy bajos en contenido de nitrato y fosfato (3.1 y 0.3 mg/L), respectivamente. El alto contenido de materia orgánica extraíble sumado a los porcentajes elevados de sólidos volátiles manifestó el nivel de contaminación por hidrocarburo de los suelos estudiados, siendo el suelo 3 el más contaminado.
3. Se comprobó la capacidad para crecer y biodegradar hidrocarburos de las cepas seleccionadas (1A, 2B, 3C, 4D), en especial las cepas 4D y 3C con un 84 % y 83% de biodegradación respectivamente, lo que demostró la viabilidad del uso de microorganismos autóctonos aislados de los suelos de la Empresa puerto Moa para la degradación del contaminante. La técnica de bioaumentación resultó ser la favorable para todos los casos.

VI. RECOMENDACIONES

- Escalar el proceso de biorremediación con los microorganismos aislados de los suelos contaminados de la Empresa Puerto Moa a sistemas de biopilas siguiendo la estrategia de Bioaumentación.
- Optimizar el proceso de biodegradación utilizando simultáneamente la técnica de bioaumentación y la de bioestimulación.
- Caracterizar a profundidad el contaminante presente en los suelos de la Empresa Puerto Moa.
- Implementación a los futuros trabajos herramientas de sistemas de información geográfica para el monitoreo de las zonas contaminadas.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abdulsalam, S., Bugaje, I., Adefi la, S. e Ibrahim, S. (2011). Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (1), 187-194, Winter 2011 ISSN: 1735-1472.

Abha, S., Singh, C.S. (2012). "Hydrocarbon Pollution: Effects on Living Organisms, Remediation of Contaminated Environments, and Effects of Heavy Metals Co-Contamination on Bioremediation". Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil Contaminated Sites, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.).

Alarcón, A., Cerrato, R. (2013). *Biorremediación de Suelos y Aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos*. Trillas, México, 333 pp. ISBN 978-607-17-1617-0.

APHA. (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition. American Press. Health Association. USA.

Arrieta, A., Rivera, L., Arias, B. A., Rojano, O., Ruiz. (2012). "Bioremediation of soil with diesel," *Revista Gestión y Ambiente.*, vol. 15, no. 1, pp. 27–40.

Atlas, R., Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Education, SA. Madrid. pp 329 – 380, 553 – 593.

Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2011). Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects degradation pattern in aliphatic-aromatic hydrocarbon binary mixtures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 1109-1117.

Baker, K. H. 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. En: *Bioremediation*. Baker, K. H. y D. S. Herson. (Eds). New York. McGraw-Hill. pp. 203-259.

Balderas, I., Sanchez, J.M. (2015). Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/ o *Burkholderiacepacia*. *Journal of the Selva Andina*.

Barrios, L.F., Robayo, J., Prieto, S., Cardona, S.G. (2015). Biorremediación de Suelos Contaminados con Aceites Usados de Motor.

Bell, T. H., Yergeau, E., Martineau, C., Juck, D., Whyte, L. G. (2011). Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum Contaminated Arctic Soils by Using

[15 N] DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. 4163–4171.

Cabrera LM. (2015). Técnicas biológicas para la degradación de contaminantes. Monografía previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR.

Cando, M. (2011). "Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.," Carrera de Ingeniería Ambiental, Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Ambiental.

Catone, M.V. (2013). Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxicarbohidratos en *Pseudomonas extremaustralis*. Dissertation, PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Cerqueira, V., Hollenbach, E., Maboni, F., Peralba, M. y Bento, F. (2012). Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; Mar2012, Vol. 28 Issue 3, p1203.

Chagas-Spinelli, A., Kato, M., de Lima, E., & Gavazza, S. (2012). Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*, 113(1), 510-516.

Cheung, P. Y., B. K. Kinkle, B.K. (2001). Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2222-2229.

Chia-Hsien, Yen., Ku-Fan, Chen., Chih-Ming, Kao., Shu-Hao, Liang., Ting-Yu, Chen. (2011). Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarbon-contaminated soil: Feasibility and comparison with common oxidants. *Journal of Hazardous Materials* 186: 2097–2102.

CICA (Centro de Inspección y Control Ambiental). (2001). Guía para la realización de las solicitudes de licencia ambiental y los estudios de impacto ambiental. La Habana, p 56.

Conesa, V. (2000). Guía metodológica para la evaluación del impacto ambiental. Tercera Edición. Mundi-Prensa. España. 1-30.

Cristina, D. (2012). "Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible," Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira,

Proyecto de Grado presentado como requisito para optar el título de Magister en Ecotecnología.

Di Martino, C. (2015). Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxialcanoatos. Tesis Doctoral.

Di Martino, C., López, N.I., Raiger, L.J. (2012). "Isolation and Characterization of Benzene, Toluene and Xylene Degrading *Pseudomonas* sp. Selected as Candidates for Bioremediation." *International Biodeterioration and Biodegradation* 67:15–20.

Dibble, J.T, Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl Environ Microbiol*;37:729-739.

Domènech, X. (2000). Química del suelo. El impacto de los contaminantes. 3 ra Edición. Miraguano S. A. Madrid. pp 190.

Domínguez, O., Ramos, M., Sánchez, A. (2011) Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca.

Echeverri, GE., Manjarrez, G., Cabrera, M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Revista Nova*, ISSN: 1794-2470, pp,76-86.

Fernandez, LC., Gabriela, N., Guadalupe, T. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Nacional de Ecología. ISBN 968-489-039-7.

Festa, F., Coppotelli, B.M., & Morelli, I.S. (2013). Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1), 42-51.

García, C., Guilarte, A., Fernández, O., Comas, Y. (2013). Impacto sociocultural de la situación medioambiental en la empresa Puerto Moa. Tesis en Opción al Título de Licenciada en estudios socioculturales, Instituto Superior Minero Metalúrgico, Moa-Holguín, p. 42.

Grace-Liu, P.W., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T., & Cheng, S.S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 1119-1127.

Guía para muestreo de suelos: 2014. Ministerio del ambiente. Dirección General de Calidad Ambiental

Hamzah, A., Phan, C.W., Abu-Bakar, N.F., & Wong, K.K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacterial Isolated From Malaysia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 1-10.

Hector, H., Gortares, P., Mondaca, I., Baldera, J.J. (2011). Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburo. *CONCYTEG*, 6(71), pp. 571-584.

Hector, M. (2015). Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Revista QuímicaViva - Número 1*.

Helena, P., Del Carmen, G. (2014). Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia. Programa de Ingeniería Química. Diplomado en procesos químicos. Universidad de San Buenaventura seccional Cartagena. Cartagena de Indias D. T y C.

Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed. Wiley Inerscience Publication. New York. pp. 342-480.

Hyne, N.J. (2001). *Nontechnical Guide to Petroleum Geology, Exploration, Drilling, and Production*. 3° Edición. PennWell, p1-4.

Jackson, M. L. 1979. *Análisis químico de los suelos*. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro. Cuba. pp 70 – 481.

Janbandhu, A., & Fulekar, M.H. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1), 333-340.

Jiménez, A., A. Martínez, F. Ramos, L. Sánchez, A. Martínez, J. Tenorio y M. Cuevas-Díaz (2011) Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. *Multiciencias*, Vol. 11, N o 2, 2011 (136 - 145) ISSN 1317-2255 / Dep. Legal pp. 200002FA828.

Kaczorek E., Moszy ska S. y Olszanowski A. 2011. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*. 22(2): 359–366.

- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B. (2010). Application of Rhodococcus in bioremediation of contaminated environments *Biology of Rhodococcus* 91-108.
- Lei, Z., Lan-ying, Z., Yong-lei, A., Na, L., Song G. (2011). Removing BTEX from contaminated Groundwater by Adsorption of Peat and Degradation of Immobilized microorganism. *Coll of Environ & Resource, Jilin Univ., Changchun, china. Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference.*
- Liang, F., Lu, M., Keener, T.C., Liu, Z., Khang, S.J. (2005). "The Organic Composition of Diesel Particulate Matter, Diesel Fuel and Engine Oil of a Non-Road Diesel Generator." *Journal of environmental monitoring* : JEM 7(10):983-88.
- Liang, X., Zhang, J., Wang, G. (2012). Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China, *J Hazard Mater*, pp. 371–378.
- Linstone, A and Murray, T. (2002). *The Delphy methods techniques and application.* University of Southern California Edition, EUA, p. 615.
- Madueño, L., Alvarez, H.M., Morelli, I.S. (2014) Autochthonous bioaugmentation to enhance phenanthrene degradation in soil microcosms under arid conditions *International journal of environmental science and technology* doi10.1007/s13762-014-0637-5.
- Madueño, L., Coppotelli, B. M., Alvarez, H. M., Morelli, I. S. (2011). Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:345-351.
- Manuel, N. (2015) Biorremediación de suelos y aguas. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 31 (2) 195-196.
- Margesin, R., Zhang, D., Busse H. (2011). *Sphingomonas alpina* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*
- Martinez, A., Perez, E., Pinto, J., Amelia, B. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(3) 241-252.
- Milán, J.A. (2004). *Curso de estudio y evaluación de impacto ambiental.* Editorial Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Nicaragua, p. 375.

Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010). "Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds". *Microbiological Research* 165: 363-375.

Mrozika A. and Piotrowska-Segetb Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*. 165 (5): 363- 375.

Mukherjee, A., Zimmerman, A.R., Hamdan, R., Cooper, W.T. (2014). Physicochemical changes in pyrogenics organic matter (biochar) after 15 months of field aging. *Solid Earth* 5, 693-704.

Nannipieri, P., Badalucco, L. (2003). Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications. *European Journal of Soil Science*. 54: (4): 655–670.

NC 1042:2014 Calidad del Suelo-Determinación de la capacidad de campo.

NC 30:1999 Calidad del suelo. Tierras alteradas. Requisitos generales para la restauración.

NC 31:1999 Calidad del suelo. Requisitos para la protección de la capa fértil del suelo al realizar trabajos de movimientos de tierra.

NC 631: 2014 Minerales-análisis granulométrico por tamizado-requisitos generales.

Nozari, M., Reza, M., Dehghani, M. (2014). Investigation of the Effect of Co-Metabolism on Removal of Dodecane by Microbial Consortium from Soil in a Slurry Sequencing Bioreactor. *Biorremediation & Biodegradation*. Volume 5 • Issue 7 • 1000253.

Oñate, N., Ramos, L. y Díaz, A. (1998). Utilización del Método Delphi en la pronosticación: Una experiencia inicial. *Cuba: Economía Planificada*, 3 (4), 9-48.

Paniagua, Michel., Rosales, A. (2015). Marine Bioremediation - A Sustainable Biotechnology of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Coastal and Marine Environments. *Biorremediation & Biodegradation*. Volume 6 • Issue 2 • 1000273

Patel, V., Patel, J., & Madamwar, D. (2013). Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 199-207.

- Pietramellara, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. and Nannipieri, P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of dna bound on clay minerals. *Soil biology and biochemistry*, 29, 55–61.
- Pons, M., Guerrero, A., Zabala, A., Alarcon, A. (2011). Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleoBiorre en suelos con características físicas y químicas diferentes. 27(1):1-15,2011
- Prakash, V., Saxena, S., Sharma, A., Singh, S. (2015). Treatment of Oil Sludge Contamination by Composting. *Biorremediation & Biodegradation*. Volume 6 • Issue 3 • 1000284.
- Romira L., (2011). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias. Tesis Doctoral.
- Ron E. Z., Rosenberg E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 249-252.
- Ros, M., Rodríguez, I., García, C., Hernández, T. (2010). Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic Amendments. *Bioresource Technology*. 101: 6916–6923.
- Samanez, E. (2008) Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Tesis. Lima-Perú.
- Santos, I. S., Silva, T. H. N., Simões, K., Simioni, V. M., Oliveira, M. J., Grossman. (2012). Correlation of soil microbial community responses to contamination with crude oil with and without chromium and copper, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 70, pp. 104–110.
- Sharpley, A. N. (1991). Efect of soil pH on cation and anion solubility. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 22:1391-1399.
- Silva, G.A. (2011). Biorremediación en hábitats contaminados con hidrocarburos. Estudio de parámetros indicadores de viabilidad de los procesos de biorremediación. Tesis Doctoral.
- Tirado, D., Acevedo, O., Romo, C., Marmolejo. Y. (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. ISSN 2334-2501.
- Torsvik, V.L., Sørheim, R. & Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 170–178.

- Turner, D., Pichtel, J., Rodenas, Y. (2014). Microbial Degradation of Gasoline in Soil: Comparison by Soil Type. *Biorremediation & Biodegradation*. Volume 5 • Issue 2 • 1000216.
- Tyagi, M., Fonseca, M., Carvalho, C., (2011). "Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes." *Biodegradation* 22(2):231–41.
- Ulrici, W. 2000. Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. in: *Environmental processes II. Soil Decontamination Biotechnology*, G. Reed (Ed.), Vol. 11b. Weinheim, pp. 5-42.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Cristie-Oleza, J., Ferrero, M., & Cormack, W. P. (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77(1), 22-30.
- Vela, G and Ralston. (1978): "The effect of temperature on phenol degradation in waste water" *Can. J. Microb.* 24(11): 366-370p.
- Venegas, A. (2015). Evaluación de la adición de materiales de origen orgánico para la remediación de suelos contaminados con metales pesados. Tesis Doctoral.
- Wang, Z., Stout, S.A. (2006). "Oil spill environmental forensics". Elsevier Inc, Oxford, p22.
- Windevoxhel, R., Bastardo, H., Sánchez, N., Pérez, J. (2013). Evaluación de la bioaumentación para la aplicación de un biotratamiento a suelos contaminados con aceites lubricantes. *Ingeniería y Sociedad UC*. Vol. 8, No 2 p. 144-152.
- Windevoxhel, R., Sanchez, N., Bastardo, H., Malaver, N. (2011). Bioaumentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. *Revista Ingeniería UC*, Vol. 18, No. 1.
- Xu, N., Bao, M., Sun, P., & Ly, Y. (2013). Study on Bioadsorption and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Microbial Consortium. *Bioresource Technology*.
- Yagnentkovsky, N. (2011) Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados. Tesis Doctoral.
- Ying T., Yongming L., Mingming S., Zengjun L., Zhengao L. and Peter C. (2010). Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial

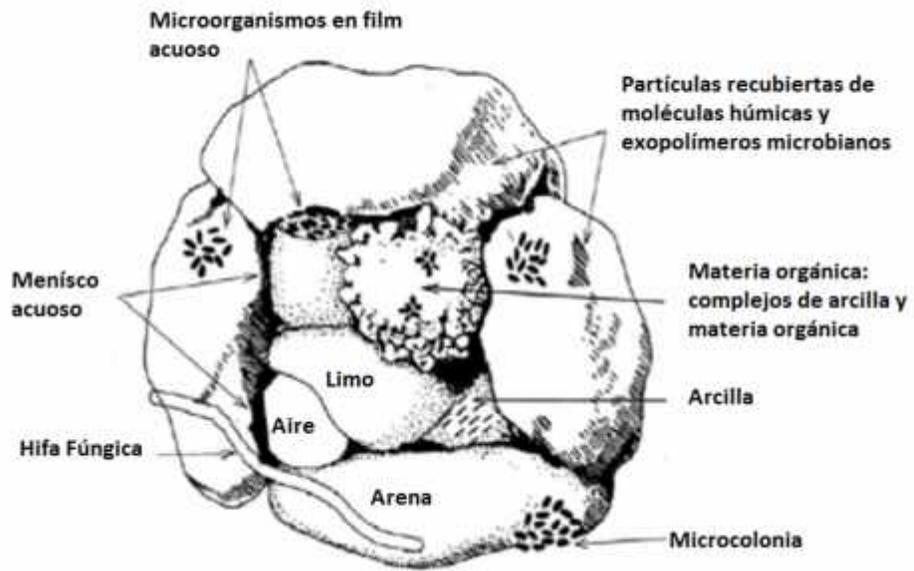
community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*. 101: 3437–3443.

Yuste L.; Corbellá M. E.; Turiégano M. J.; Karlson U.; Puyet A.; Rojo F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS microbiology ecology* 32: 69-75.

Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Wang, Z., & Xu, P. (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology*, 101(1), 8452-8456.

Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., & Wu, W.M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International Biorremediation & Biodegradation*, 65(1), 1244-1248.

ANEXOS



Anexo I. Disposición en el espacio de los agregados constituyentes de un suelo



Anexo II. Imagen aérea de la ubicación del Puerto Moa/ *Suelos contaminados

Factores del medio		Impactos	
Nombre	Clave	I ₁	I _n
	M ₁		
	M _n		

Anexo III. Matriz causa-efecto para la identificación de impactos ambientales

Matriz para la valoración de impactos													
Impactos	Atributos a evaluar											Importancia	Máximo Valor de importancia
	Naturaleza	Intensidad	Extensión	Momento	Persistencia	Reversibilidad	Acumulación	Probabilidad	Efecto	Periodicidad	Perc. Social		
	Signo	I	IX	MO	PI	RV	AC	PB	II	PR	PS		

Anexo IV. Matriz de valoración de impactos y los diferentes atributos a evaluar

Factores del medio		Impactos			Valor alteración	Max valor alteración	Grado alteración
Nombre	Clave	I ₁	I ₂	I _n			
	M ₁						
	M ₂						
	M ₃						
Valor Medio de Importancia:							
Dispersión Típica:							
Rango de discriminación:							
Valor de alteración:							
Valor Max. alteración:							
Grado de alteración:							

Anexo V. Matriz de importancia de impactos para la evaluación.



Anexo VI. Representación de las fases metodológicas para la evaluación de expertos en temas ambientales.



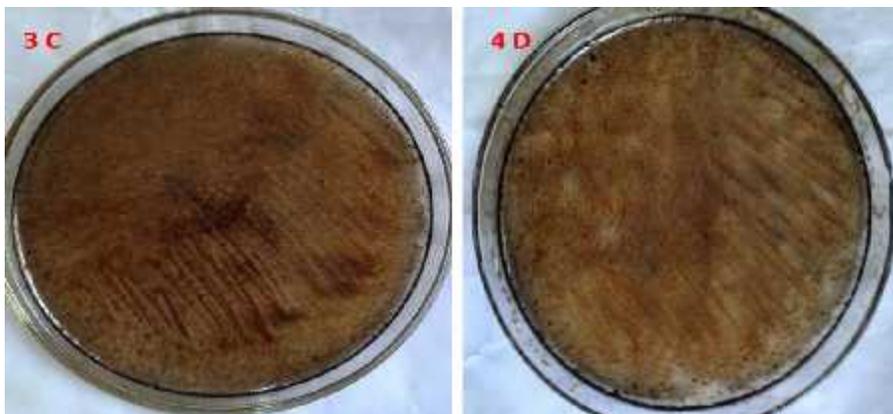
Anexo VII. Microcosmos homogenizado (400 g de suelo+hidrocarburo)

Tubo	BaCl ₂ (1% ml)*2H ₂ O (0.48N)	H ₂ SO ₄ (1% ml) 0.036N	Densidad Bacteriana (Millones/ml)
Patrón 5	0.5	9.5	1500 (1x10 ⁶ UFC/ml)

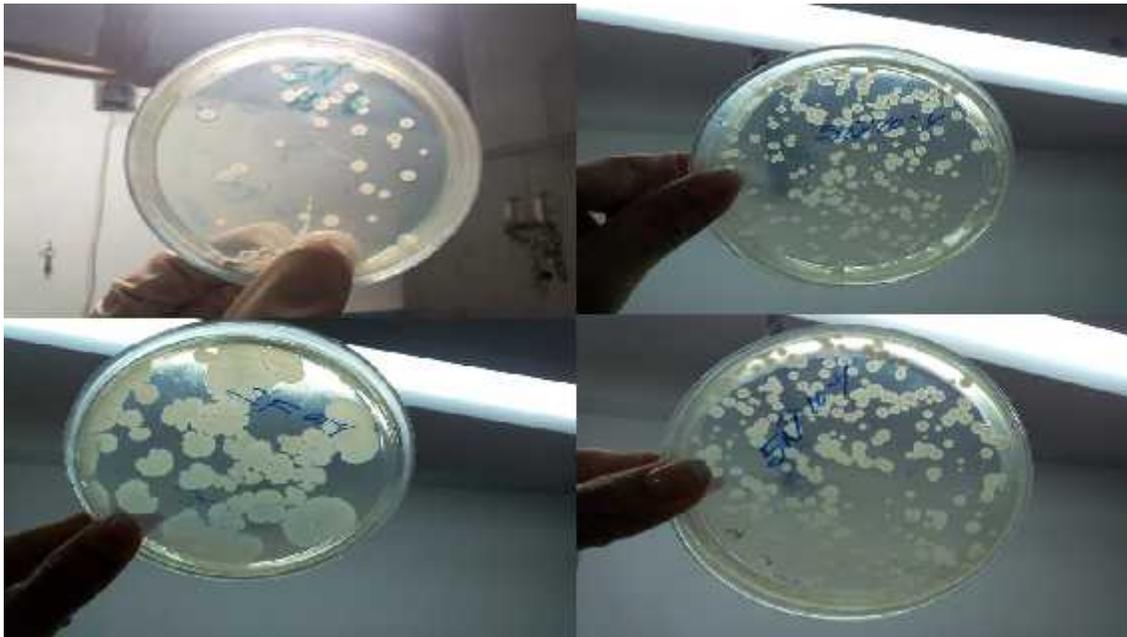
Anexo VIII. Patrón 5 de turbidez del esquema de valoración cualitativa de Mc Farland.



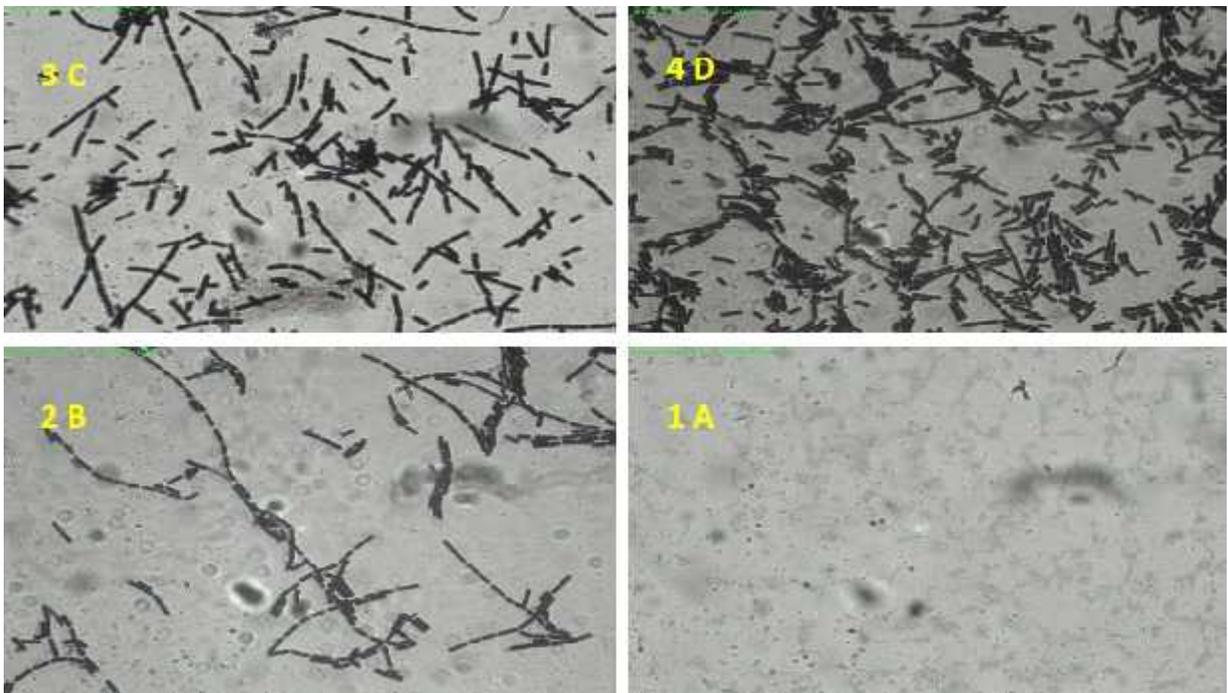
Anexo IX. Suelo 3 contaminado con hidrocarburo



Anexo X. Crecimiento de las colonias en medio. Cepas 4D y 3C



Anexo XI. Representación macroscópica de las cepas bacterianas de los suelos de la EPM



Anexo XII. Morfología de las colonias de bacterias aisladas de los suelos de la Empresa Puerto Moa (1000x).