



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

“Caracterización de las aguas residuales de la
Refinería Hermanos Díaz. Ensayos de
bioestimulación”.

Tesis presentada en opción al título académico de

Master en Biotecnología

Mención Biotecnología Ambiental

Autor: Lic. Norma Pérez Pompa

Tutores: Dra. Alina Mariana Marañón Reyes
Dra. Arelis Abalos Rodríguez

Santiago de Cuba, 2003

RESUMEN

La contaminación marina, por petróleo y sus derivados tiene una significación especial y se considera uno de los factores que más agrede a los ecosistemas acuáticos causando afectaciones al suelo, flora, fauna y la salud humana, al provocar en muchos casos, la ruptura del equilibrio de su restauración natural.

La Bahía de Santiago de Cuba es afectada por diferentes focos contaminantes entre los que se encuentra la Refinería Hermanos Díaz. En este trabajo se realizó un estudio de las aguas residuales de esta industria, para ello se estableció una hipótesis basada en la contaminación que pueden provocar estos residuales que contienen hidrocarburos a la bahía, así como la posibilidad del empleo de microorganismos degradadores de petróleo para su tratamiento. Se consideró el establecimiento de un conjunto de procedimientos para la caracterización fisicoquímica y microbiológica de estos residuales y conocer su influencia al ser vertidos al cuerpo receptor. Se midieron los parámetros: Oxígeno Disuelto, Demandas Química y Bioquímica de Oxígeno, Ciclo del Nitrógeno, pH, Temperatura, Conductividad Eléctrica, Sólidos, iones fosfato y sulfuro, aceites y grasas, Coliformes Totales y Fecales y Población Microbiana. Con el análisis de los resultados se demostró que las aguas residuales de la Refinería Hermanos Díaz no cumplen con la Norma Cubana de vertido y se comprobó que la bioestimulación de las aguas de la laguna de estabilización favorece la remoción del 99% de hidrocarburos y el 59% de la Demanda Química de Oxígeno en las condiciones de estudio.

ABSTRACT

The marine contamination for by oil and their derivates have a special significance, it is considered one of the factors that more attacks to the aquatic ecosystems causing affectations to the soil, flora, fauna and the human health, when causing in many cases the rupture of the balance of their natural restoration.

The Bay of Santiago de Cuba is affected by different polluting focuses among those that is the Refinería Hnos Díaz. In this work it was carried out a study of the wastes waters of this industry, for established a hypothesis based on the contamination that can cause these wastes ones that contain hydrocarbons to the bay, as well as the possibility of the use of oil degrader's microorganisms for its treatment, it was considered the establishment of a group of procedures for the characterization physico - chemistry and microbiological of these waste ones and to know its influence to the being shedded to the receiving body. The parameters were measured: Dissolved Oxygen, Chemistry Oxygen Demand (COD) and Biochemistry Oxygen Demand (BOD), Cycle of the Nitrogen, pH, Temperature, Electric Conductivity, Solids, Ions phosphate and sulphur, Total and Fecal Coliformes and Microbial Population. The results it was demonstrated that the wastes waters of the Refinería Hnos Díaz doesn't go back on the Norma Cubana of shedding residual and it was proven that the bioestimulación of the waters of the stabilization lagoon favors the removal 99% of hydrocarbons and 59% of the Chemistry Oxygen Demand under the study conditions.

1 INTRODUCCION

1.1 Diseño Teórico

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Generalidades sobre contaminación

2.2 Principales contaminantes del agua

2.3 Contaminación de las aguas por petróleo

2.4 Calidad del agua y normas de calidad

2.4.1 Criterios de calidad de los sistemas hídricos

2.5 Tratamientos de aguas residuales

2.5.1 Tratamiento preliminar

2.5.2 Tratamiento primario

2.5.3 Tratamientos secundarios

2.5.4 Tratamiento terciario

2.5.5 Sistemas de tratamiento biológico

2.5.5.1 Tratamiento anaerobio

2.5.5.2 Tratamiento aerobio

2.5.5.2.1 Tratamiento aerobio por Lodos Activados

2.5.5.2.2 Tratamiento aerobio por Filtro Biológico

2.5.5.2.3 Tratamiento aerobio por Laguna de Estabilización

2.5.5.3 Biorremediación

2.5.5.3.1 Estrategias y tecnologías de biorremediación

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Reactivos

3.2 Medios de cultivos

3.3 Equipos

3.4 Localización y denominación de las estaciones de muestreo

3.5 Toma de muestra

3.6 Parámetros analizados y métodos de determinación

3.6.1 pH

3.6.2 Conductividad Eléctrica

3.6.3 Oxígeno Disuelto

3.6.4 Demanda Química de Oxígeno

3.6.5 Demanda Bioquímica de Oxígeno

3.6.6 Determinación de Sulfuro

3.6.7 Ciclo del Nitrógeno

3.6.8 Determinación de Fosfato

3.6.9 Determinación de Metales

3.6.10 Sólidos

3.6.11 Aceites y Grasas

3.6.12 Determinación de Coliformes

3.7 Bioestimulación de la Población Microbiana

3.8 Población Microbiana

3.9 Análisis Estadístico

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estación 1

4.2 Estación 2

4.3 Estación 3

4.4 Metales

4.5 Biestimulación de la población microbiana en la laguna de estabilización para la remoción de la carga contaminante

5 CONCLUSIONES

6 RECOMENDACIONES

7 BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de las aguas tiene una significación especial, se considera uno de los factores que más agreden a los ecosistemas acuáticos; causando además, afectaciones al suelo, la flora, la fauna y la salud humana al provocar en muchos casos la ruptura del equilibrio de restauración natural de los ecosistemas. La contaminación que se produce en las aguas interiores y marinas es el resultado del vertido de residuales sin tratamiento o con tratamiento deficiente debido a dificultades o inexistencia de redes de alcantarillado, al mal funcionamiento de las plantas y sistemas de tratamiento, además del poco aprovechamiento y reuso de residuales líquidos de la actividad agroalimentaria e industrial y la no-ejecución de todos los programas de control y monitoreo de la calidad del agua. /Shastris, 1990/

En el país existen 2 092 focos contaminantes principales de los cuales el 29% carece de sistema de tratamiento y el 53% de las capacidades destinadas a estos fines se encuentran en estado deficiente, determinando la disposición de 341 716 toneladas/año aproximadamente de materia orgánica biodegradable /López, 2001/.

El manejo y control de la calidad de las aguas superficiales es uno de los problemas asociados a la contaminación ambiental que requiere de la utilización de métodos y tecnologías de avanzadas que sean capaces de dar una respuesta rápida y eficaz sobre el estado de esos recursos, su posible uso, su evolución al cabo del tiempo que permita tomar medidas para preservar su calidad y evitar su deterioro /Canas, 1994/.

No se trata de paralizar la actividad humana, pues el hombre ha impactado su entorno desde el mismo momento de su aparición en escena, pero ese impacto debe ser absorbible por el medio, permitiendo que el equilibrio se restablezca. Hay quienes creen que la humanidad es incapaz de controlar el proceso acelerado que amenaza con destruir la biosfera y la civilización, que el colapso del sistema será total y entrañará la extinción de la especie humana. En cambio otros, más optimistas, tienen fe en que el hombre con su gran ingeniosidad e inventiva logrará alcanzar un nuevo equilibrio ecológico antes de que sea demasiado tarde /Jorgensen and Johnsen, 1981/.

El mar posee una gran capacidad autodepuradora y es un medio poco favorable para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos patógenos; sin embargo el vertido incontrolado de las aguas residuales provenientes de zonas urbanas y de los desechos industriales, convierte el ecosistema marino en uno de los más contaminados.

De todos los contaminantes marinos, el petróleo y sus derivados son los que han recibido mayor atención internacional en lo político y lo científico, debido a que son, de las sustancias

presentes en las aguas costeras, las que provocan mayor destrucción en la vida acuática /Fonseca, 2000/. La presencia de hidrocarburos se dispone por su inmiscibilidad, en una capa prácticamente continua, que flota sobre el agua e impide la oxigenación de los océanos debido a los procesos de degradación química y bioquímica de las mismas provocando grandes mortandades en el mundo marino.

Los tratamientos físicos-químicos, también denominados primarios, han sido utilizados ampliamente durante mucho tiempo; a pesar de los elevados costos que generan estas tecnologías. Algunos compuestos presentes en las aguas a tratar no son removidos por estos métodos; es por eso que los tratamientos biológicos o secundarios se han ido consolidando como alternativas factibles para el tratamiento de residuos generados por industrias, agricultura y la actividad humana, aprovechando los procesos metabólicos propios de los microorganismos para su uso en la descontaminación.

1.1 DISEÑO TEORICO

NECESIDAD SOCIAL

El agua es un recurso natural renovable siendo indispensable en toda actividad social, industrial y agrícola. El desarrollo industrial y poblacional trae consigo un aumento de los residuales que han provocado daños considerables en los ecosistemas acuáticos, por lo que no son suficientes los procesos de autodepuración de las aguas; sino que se hace indispensable su tratamiento para su reutilización, contribuyendo así a la protección del medio ambiente y al ahorro del agua.

PROBLEMA

La capacidad de autodepuración de las masas de agua marina es muy grande, en ella se diluyen, dispersan o degradan cantidades de aguas albañales, hidrocarburos, desechos industriales e incluso materiales radiactivos. El vertido indiscriminado de estos residuales, ha convertido las aguas costeras en desiertos de vida o en cloacas malolientes. La contaminación de las aguas por hidrocarburos es uno de los problemas fundamentales que afectan los ecosistemas marinos actualmente.

HIPÓTESIS

Si se conocen las características físico-química y microbiológicas de los residuales contaminados con hidrocarburos, es posible evaluar la contaminación de los vertidos al cuerpo receptor.

Los microorganismos presentes en estos residuales pueden degradar el petróleo y sus derivados durante su crecimiento sobre estos sustratos como fuente de carbono. Esta capacidad degradativa puede ser aprovechada en la remoción de dichos contaminantes.

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la contaminación que provocan las aguas residuales de la Refinería Hermanos Díaz sobre el cuerpo receptor y valorar la remoción de la carga contaminante por bioestimulación de la población microbiana en la laguna de estabilización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar la caracterización físico- química y microbiológica de las aguas residuales de la Refinería Hermanos. Díaz.
- 2) Calcular la carga orgánica y carga contaminante de Hidrocarburos en las aguas residuales de la Refinería Hermanos. Díaz.
- 3) Efectuar el ensayo de bioestimulación de la población microbiana de la laguna de estabilización para la remoción de la materia orgánica en el sistema.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Generalidades sobre contaminación

La contaminación ambiental se define como el cambio no deseado de las características físicas, químicas y/o biológicas del aire, agua o suelos debido a la introducción en estos de agentes extraños, que afectan al hombre y demás especies, los procesos industriales, las condiciones y calidad de vida y los valores socioculturales. Todo proceso que expulse o libere un contaminante al medio constituye una fuente de contaminación ambiental /López y cols., 2001/. Se consideran contaminantes, toda clase de materia o energía, que al incorporarse en cualquiera de los componentes ambientales (aire, agua, suelo) o en los elementos naturales, cambie o modifique su estructura y condición natural original /Enkerlin y cols., 1997/.

Según las características de los diferentes contaminantes vertidos al medio, la contaminación se puede clasificar como:

Contaminación biológica: tiene lugar cuando existen microorganismos (bacterias, hongos, virus, protozoos) que causan un desequilibrio en la naturaleza, alterando las condiciones óptimas del medio y la vida de los organismos presentes. La contaminación biológica es muy frecuente en zonas de gran insalubridad, principalmente en los países subdesarrollados, donde se puede desencadenar una epidemia en un período corto de tiempo. Su control o prevención es relativamente fácil en comparación con la contaminación física o química. Un ejemplo de este tipo de contaminación es la producida por la bacteria patógena al hombre *Vibrio cholerae* /López y cols., 2001/.

Contaminación física: es la contaminación que se produce por el efecto de factores físicos-mecánicos relacionados principalmente con la energía como: altas temperaturas, ruido excesivo y ondas electromagnéticas; además del color, turbidez, espumas y radiactividad. Sus efectos pueden ser duraderos y estimular la aparición de determinadas enfermedades y/o anomalías metabólicas en los sistemas vivientes afectados /López y cols., 2001/.

Contaminación química: es el tipo de contaminación que tiene como causa la acumulación acelerada de materia orgánica o inorgánica. En ocasiones este tipo de contaminación es difícil de atenuar porque las características físicas y químicas de las sustancias varían. Un caso típico de contaminación química es la producida por metales pesados, hidrocarburos, plaguicidas, etc. /Vogel y Rivas, 1997/.

Por su origen la contaminación puede ser:

Natural: es causada por los contaminantes formados y emitidos por procesos naturales: erupciones volcánicas, efectos geoclimáticos, y otros.

Antropogénica: tiene su origen en los contaminantes que son productos o resultados de las actividades humanas; por ejemplo: la basura, el "smog", aguas residuales domésticas e industriales, etc. Suele ser más intensa en áreas cercanas a grandes zonas urbanas o industriales /Enkerlin y cols., 1997/.

La contaminación del medio ambiente, provocada fundamentalmente por el vertido de residuales, abarca todos los ecosistemas que lo constituyen y se manifiesta intensamente en los ecosistemas acuáticos, causando el deterioro de la calidad de las aguas para consumo humano, agrícola e industrial.

Generalmente, cuando se establecen determinadas tecnologías, se producen desechos sólidos, líquidos o gaseosos, que constituyen los **residuales industriales**. De la misma forma el hombre en la vida cotidiana, elimina una serie de sustancias que constituyen los **residuales domésticos**. Si estos se suman en una población, constituyen los **residuales urbanos**. La agricultura genera los **residuos agrícolas**. En la Tabla 1 se presentan las principales características de los diferentes tipos de aguas residuales. Todos estos residuales tienen la característica común de producirse de forma cíclica en el tiempo; por lo que se hace necesario una disposición final adecuada, pues de lo contrario ocurriría grandes acumulaciones con la consecuente contaminación ambiental /Enkerlin,1997/.

El vertido de estos residuales no es espontáneo, pues el hombre lo dirige. Comúnmente los residuales gaseosos van a la atmósfera y los sólidos y líquidos al suelo, mares y ríos; con ello no se logra el equilibrio ambiental necesario, sino por el contrario da lugar a la contaminación /Dickson, 1990/.

Uno de los aspectos más importantes con respecto a los residuales es su caracterización, ya que al realizarla permite conocer los posibles daños que pueden causar en el ambiente y por otra parte tomar decisiones con respecto a su tratamiento y/o aprovechamiento.

En la caracterización de los residuales se incluyen parámetros físico-químicos y microbiológicos, con el objetivo de determinar la carga contaminante, decidir el tratamiento que se utilizará para disminuir su impacto y determinar su disposición final.

2.2 Principales contaminantes del agua

Existen varios tipos de contaminantes de las aguas y por su naturaleza se pueden clasificar como: **químicos** (Sales inorgánicas, Ácidos o álcalis, Materiales orgánicos, radioactivos, Hidrocarburos, Plaguicidas y otros tóxicos), **físicos** (Sólidos y líquidos flotantes, Materiales que producen espumas, Aguas calientes, Materiales suspendidos y sedimentados) y **biológico** (Bacterias patógenas, Virus, Algas, Maleza acuática) /Hill, 1997; García, 1989/

La contaminación de las aguas da lugar a:

- Aumento de la acidez por las lluvias ácidas.
- Aumento de la concentración de Ca y Mg y Si en las aguas superficiales y subterráneas por circulación de las lluvias ácidas.
- Incremento de la concentración de iones fósforo ($>0,1$ mg/L), nitritos y amonio (eutrofización).
- Incremento de la concentración de metales pesados Pb, Cd, Mg, As, Zn etc.
- Reducción catastrófica del oxígeno disuelto.
- Aumento del color y la turbiedad del agua, aparición de olores y sabor desagradable, por la presencia de sustancias y organismos perjudiciales a la salud.
- Desarrollo de una fauna y flora indeseable, que sustituye a los peces y a otras formas valiosas de la vida acuática, anteriormente presenta.

Estos daños pueden ser: de **naturaleza física** (depósitos de materias en suspensión y/o flotante en el lecho o en las márgenes de ríos, mares o represamiento), de **naturaleza química y bioquímica** (disminución del oxígeno normalmente disuelto en el agua a consecuencia de la demanda bioquímica de oxígeno ejercida por los organismos responsables de la descomposición y mineralización de la materia orgánica) y de **naturaleza bacteriológica** (producida como consecuencia de la contaminación del cuerpo de agua por albañales que contienen bacterias patógenas de transmisión hídrica). /Mora y Cano, 1997; Jorgensen, 1981; Hill, 1997/

2.3 Contaminación de las aguas por petróleo

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos que contiene alcanos lineales y ramificados (isoprenoides), compuestos nafténicos, aromáticos, poliaromáticos, resinas y polares.

La contaminación de suelos y acuíferos por hidrocarburos, en general, es uno de los problemas ambientales de mayor impacto en la actualidad, no solo por el deterioro

Anexos

que provoca en los ecosistemas terrestres y marinos, sino también por el prolongado tiempo que perdura la contaminación.

La contaminación del medio marino, producida por derrames de petróleo, constituye uno de los problemas ecológicos de mayor relevancia en la actualidad. Se estima que de la producción mundial de este valioso recurso energético, entre 1.7 y 3.3 millones de toneladas métricas, son derramados anualmente al mar /<http://www.epa.gov/.htm/>.

Derrame de hidrocarburos es cualquier descarga, escape, evacuación o vaciamiento del petróleo en todas sus manifestaciones y pueden representar una amenaza para el medio terrestre, marino o litoral, las personas, instalaciones y otros recursos naturales y económicos. Se conoce como **"Marea negra"** al derrame en el mar de petróleo crudo o sus derivados /Bartha, 1986/. Los derrames de hidrocarburos o mareas negras pueden ocurrir como consecuencia de tres causas fundamentales: transportación marítima, la operación en depósitos próximos al mar y salida espontánea del petróleo y explotación de pozos próximos al mar ó en este. Según Bergueiro y Domínguez (1996), el transporte de crudos de petróleo y productos derivados, se lleva a cabo generalmente en barcos de gran tonelaje, por lo que un accidente puede provocar un derrame en el mar de grandes proporciones. Dentro de la transportación marítima también se incluyen las descargas de sentinas y sedimentos de combustible. Entre los más grandes accidentes se destacan el Amoco Cádiz (1983), Exxon Valdez (1989), Castillo de Bellver (1993), Erika (1999), Jessica (2001), Prestige (2003) /Pritchard y cols., 1990; Bergueiro y Domínguez 1996; <http://www.prestige.com>, Sanjurjo, 2001/

La contaminación provocada por la salida espontánea del petróleo y explotación de pozos próximos al mar ó en este es mucho menor. Estos sucesos contribuyen a un 67% del total de contaminantes por año en los océanos /Fonseca, 2000 /. El comportamiento de un derrame de petróleo es diferente en tierra y en mar. Como es un líquido inmiscible y menos denso que el agua, el petróleo sale a la superficie y cubre grandes áreas. La viscosidad del petróleo, la temperatura del agua, el viento, etc.; influyen en este proceso. Por lo general 1 gramo de hidrocarburo puede cubrir de 1 a 10 m² de superficie. Dependiendo de la cantidad y tipo de derrame, el regreso a la situación normal será rápido o muy lento /Bartha, 1986; UNESCO, 1999/.

Los efectos químicos del petróleo pueden relacionarse con los componentes implicados. Los hidrocarburos saturados de bajo punto de ebullición, como mínimo hasta el octano, pueden producir anestesia y narcosis en muchos animales inferiores. Los hidrocarburos aromáticos de bajo punto de fusión, son incluso más tóxicos y su mayor solubilidad en agua hace que aumente su distribución y absorción

Anexos

en los organismos acuáticos. El benceno, el tolueno, el naftaleno y el fenantreno, son compuestos pertenecientes a este grupo. Todos estos compuestos causan irritación local del sistema respiratorio, excitación y depresión del sistema nervioso central. Muchos pueden ser mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son extremadamente peligrosos a este respecto. Los hidrocarburos aromáticos insaturados, de alto punto de ebullición, no ejercen mucha toxicidad directa; pero interfieren en la respuesta de los organismos acuáticos a los estímulos químicos, por ejemplo, agentes de atracción sexual, con consecuencias extremadamente graves /Duffrus, 1983; Alexander, 1994/.

Cuba, como país consumidor e importador de crudo no es infalible a los accidentes de petróleo. En mayo de 1992 en Cienfuegos, ocurrió un derrame accidental de petróleo combustible, provocado por el supertanquero inglés "AIDA", que contaminó la bahía. Se estima que el volumen derramado fue de más de 100 ton de petróleo. Se afectaron zonas de cultivo de ostiones y camarones, fundamentalmente, además de los grandes daños ecológicos y turísticos /Fonseca y cols., 1994/. La bahía de Matanzas también fue dañada sensiblemente en 1998 por un accidente, se vertieron alrededor de 500 toneladas de crudo nacional. Se requirió un gran esfuerzo de recogida y limpieza en las costas y en el mar y se realizaron muestreos de las aguas y los sedimentos, para conocer las posibles concentraciones de hidrocarburos petrolíferos /Heredero, 2001; Ramos, 1998/.

2.4 Calidad del agua y normas de calidad

La calidad del agua es el conjunto de características que la hacen apropiadas o no a los requerimientos para un determinado uso. A menudo se relaciona con la concentración de las sustancias que la alteran. En algunos casos, la presencia de esta sustancia en concentraciones bajas es condición necesaria para su uso.

Con el desarrollo industrial y el aumento explosivo de asentamientos poblacionales, junto con el uso creciente de la agricultura y la producción de diversos y numerosos desechos industriales, se ha producido un notable deterioro en la calidad de las aguas, por lo que el control analítico de las mismas es cada vez más necesario y los criterios de calidad han aumentado el número de parámetros a determinar, desarrollando métodos sensibles para poder alcanzar los bajos niveles de concentración en que se presentan algunos contaminantes /APHA, 1998/.

Los criterios de calidad del agua nos permiten establecer las normas de calidad, las cuales son los requerimientos que deben cumplirse para un determinado uso. Si algunos de estos requerimientos no se cumple, entonces el agua es inservible y será

Anexos

necesario algún tratamiento especial diseñado para obtener los niveles recomendados.

2.4.1 Criterios de calidad de los sistemas hídricos

Los diversos usos (domésticos, recreativos, industriales, etc) a que se puede destinar los sistemas hídricos están condicionados a la composición físico-química y biológica de sus aguas. Con este fin existen varios criterios de calidad para cada uso específico, que delimitan la aptitud de un agua para el mismo.

Las aguas superficiales, son ecosistemas acuáticos que reciben directa o indirectamente la descarga o efectos contaminante producto del vertimiento de aguas residuales, por lo que son consideradas cuerpos receptores /NC 27: 1999/.

2.5 Tratamiento de aguas residuales

Para la depuración de aguas residuales existen dos tratamientos fundamentales: físico-química y biológico. La utilización de la depuración biológica o la utilización del tratamiento físico-químico o su combinación, estarán en función de los contaminantes presentes en el agua residual /MAPFRE, 1994/.

Con la aplicación de métodos físicos, químicos o biológicos por sí solos, en muchos casos, no es posible obtener un grado de depuración adecuada; lo más conveniente es aplicar los tres métodos de forma consecutiva para alcanzar los resultados deseados. Bajo este concepto la secuencia de tratamiento sería: Tratamiento primario, Tratamiento secundario o biológico y Tratamiento terciario o especiales /Elías, 1992/.

En el tratamiento de aguas residuales, el objetivo fundamental es eliminar los contaminantes, y ajustar la calidad del agua vertida a las especificaciones legales o que en general tengan el menos impacto posible. El tratamiento de aguas residuales depende de factores como: caudal, composición, concentración del contaminante, calidad requerida del efluente, abundancia del agua, posibilidad de reutilización, cuerpo receptor /Rivas, 1967/

2.5.1 Tratamientos preliminares

Tiene como objetivo específico por una parte, proteger las instalaciones de tratamiento y su funcionamiento y por otra, reducir sensiblemente las condiciones indeseables relacionadas mayormente, con la apariencia estética de esas plantas de acondicionamiento /Atlas y Bartha, 2002/.

Anexos

Los elementos extraños, asociados al agua, que constituyen motivo suficiente para establecer tales tratamientos, son: arenas (finas y gruesas), gravas, piedras, trapos y papeles y otros materiales sólidos de desechos de similar procedencia. Varios tipos de aditamentos son frecuentemente utilizados para lograr la separación o transformación de sólidos gruesos: rejas, rejillas, cedazos finos y microfiltro, trituradores o rasgadores.

2.5.2 Tratamiento primario

Los residuales líquidos contienen una serie de partículas en suspensión: arenas, sólidos orgánicos suspendidos y coloidales, sedimentables por sí mismos o mediante su coagulación- floculación; y materia flotante, sólida o líquida, que al no ser removida previamente en los tratamientos preliminares, se requiere separar del agua residual, para obtener cierto grado de tratamiento tendiente a reducir su agresividad, básicamente la DBO_5 que provocan esas materias presentes. Dentro de este tratamiento se encuentran fundamentalmente dos acciones: física (separación de sólidos suspendidos mediante la intervención de áreas limitadas o la sedimentación-flotación de partículas) y la físico-química (la separación de partículas por coagulación-floculación de sólidos presentes en estado coloidal) /Maier, 2000/.

El proceso de sedimentación-flotación permite provocar una separación física al limite que las sustancias extrañas no interfieren en los subsiguientes pasos del tratamiento. Los sólidos más pesados que el agua se separan mediante una sedimentación o desinfección; y aquellos de menor densidad que la misma, a través de operaciones de flotación. Con la ayuda de unidades de sedimentación-flotación no es posible obtener una remoción de la DBO_5 mayor de un 35 a 40%, sin embargo, la sedimentación con coagulación alcanza una remoción entre un 60 y un 85% de los sólidos suspendidos, trayendo como consecuencia reducciones para la DBO del orden de un 40 a 70%. La eficiencia de este tipo de tratamiento está dada en que se logra remover, además de los sólidos suspendidos naturalmente sedimentables, los sólidos presentes en estado coloidal /DSE, 1990; Justiz, 1995; Maier, 2000/.

2.5.3 Tratamientos Secundarios

Cuando los líquidos residuales que han sufrido previamente tratamiento primario, son sometidos a tratamientos en donde la acción metabólica de organismos vivos interviene para

transformar la materia orgánica biodegradable en materia estable inofensiva a los cuerpos receptores, se dice que el proceso de tratamiento es secundario o biológico.

Anexos

El tratamiento secundario puede ser anaerobio, aerobio o una combinación de ambos /Díaz, 1997/ y aplicarse *in situ* o *ex situ*. Todo tratamiento secundario presupone la aplicación previa de otros tratamientos. Durante los tratamientos biológicos son aplicadas diferentes técnicas y estrategias de biorremediación /Solanas, 2002/.

En los procesos de depuración biológica se busca doble acción: la metabólica y la floculación de las partículas en suspensión. El mecanismo consiste en la asimilación de la materia orgánica biológicamente degradable (DBO₅) por los microorganismos en presencia de nutrientes y de oxígeno o en ausencia de este. Las bacterias actúan sobre el contaminante el cual hace de sustrato. El conjunto de las reacciones químicas se catalizan por las enzimas segregadas por las bacterias, las cuales a su vez les sirve de soporte.

Los tratamientos biológicos *in situ* se aplican a aguas subterráneas y se basan en el suministro de O₂ y nutrientes durante un período de tiempo prolongado. De ahí que el O₂ sea considerado el factor limitante más importante para la biorremediación *in-situ*, especialmente en aguas subterráneas y en las capas profundas del suelo contaminadas por hidrocarburos. Menos frecuente es la adición de cultivos microbianos /Atlas y Bartha, 2002/. La infiltración de oxígeno se realiza por ventilación o air sparging (zona saturada o no vadosa) y por bombeo de H₂O₂ (zona no saturada o vadosa). El bombeo de Peróxido de Hidrógeno se conoce como bioventing. Otro método de infiltración de oxígeno y nutrientes es el conocido como pump and treat, es decir bombeo y depuración. En este tratamiento se bombea el agua contaminada hacia la superficie y una vez en ella se trata y posteriormente se reinyecta hacia la zona de origen /<http://www.brownfieldstech.org/cities/index.html/>.

Los tratamientos *ex situ* por su parte, se aplican a aguas superficiales contaminadas y se clasifican en anaerobios (biorreactores anaerobios) y aerobios (lodos activados, lagunas de estabilización y filtros biológicos o biofiltros). En todos estos sistemas se establecen diferentes comunidades microbianas, representadas por bacterias (*Zooglea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Nitrosomonas*, *Alcaligenes*); algas (*Chlorella*, *Euglena*); hongos (*Fusarium*, *Geotrichum*); cianobacterias (*Ulothrix*) y protozoos (*Oicomonastermo*, *Amoeba*, *Colpoda*, *Vorticella*). El predominio de uno u otro microorganismo dependerá de las condiciones de aireación, luz, superficie, tiempo de residencia entre otros que caracterice cada sistema

/Bordons, 1999/. Con los sistemas biológicos se logra entre un 80-95% de remoción de DBO₅ /Grady, 1998; Henze y cols., 1997/.

2.5.4. Tratamiento terciario

Anexos

Son operaciones físicas o químicas para la remoción final del exceso de nutrientes minerales no biodegradables (fósforo y nitrógeno fundamentalmente); así como la materia orgánica que no pudo reducirse hasta niveles aceptables del cuerpo receptor (río, mar, lago, etc.) /Bordons, 1999; Gerba, 2000/. Incluye la desinfección, diseñada para eliminar bacterias y virus enteropatógenos que no han podido ser eliminados con los tratamientos anteriores. La desinfección puede llevarse a cabo al final del tratamiento secundario o después del tratamiento terciario. Usualmente la desinfección se realiza por cloración con cloro gaseoso (Cl_2) o hipoclorito de calcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$] o sodio (NaOCl).

2.5.5. Sistemas de Tratamiento Biológico

2.5.5.1. Tratamiento Anaerobio

La digestión anaerobia es un proceso biológico mediante el cual los contaminantes orgánicos presentes en el agua son degradados en compuestos menos o no tóxicos, principalmente gases (CH_4 , CO_2 , H_2 , H_2S), otros componentes no degradados, nitrógeno y fósforo, y diversos componentes minerales (K, Ca, Mg, etc.). El proceso biodegradativo anaerobio se puede resumir:

Materia orgánica $\xrightarrow{\text{Digestión anaerobia}}$ $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{lodos de digestión}$

Este proceso de digestión se lleva a cabo en el interior de reactores conocidos también como biodigestores (Figura 1). Se conocen distintos tipos de reactores: reactores de primera generación (fosa séptica, tanque IMHOFF, digestores convencionales, digestor completamente mezclado y reactor de contacto anaerobio), reactores de segunda generación (filtro anaerobio, reactor de película fija y reactor de lecho de lodo) y reactores de tercera generación (reactores anaerobios híbridos y reactores de soporte fluidificado) /Rodríguez, 2000/.

Entre las ventajas del tratamiento anaerobio se pueden señalar: generación de una fuente de energía renovable (biogás), bajo requerimiento energético del sistema, menor producción excedente de lodos unido a una buena estabilización del mismo, puede ser aplicado en cualquier lugar y a cualquier escala, gran capacidad de tolerar altas velocidades de carga orgánica en los sistemas modernos, el efluente enriquecido en nutrientes puede ser utilizado como fertilizante y los sistemas de tratamiento son relativamente baratos y sencillos de construir.

2.5.5.2 Tratamiento Aerobio

La digestión aerobia requiere una vasta población de microorganismos con metabolismo activo, capaces de degradar productos orgánicos tanto solubles como en estado coloidal y con una elevada tasa de conversión a CO₂ y H₂O al utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones.

2.5.5.2.1 Tratamiento Aerobio por Lodos Activados

El sistema de depuración de aguas residuales mediante la tecnología de lodos activados es reconocido como el más común en los procesos de oxidación biológica de residuos orgánicos a biomasa microbiana, CO₂ y H₂O /Lee y Wang, 1999/ (Figura 2).

Este proceso consiste en la aireación de las aguas residuales procedentes de la sedimentación primaria en un estanque de aireación mezclada previamente con una parte del lodo activado sedimentado, que es devuelto desde el tanque de sedimentación secundaria, manteniendo a altos niveles la actividad microbiana. En estos sistemas se reduce la DBO₅ del agua residual hasta valores de 85-95%, además de reducirse considerablemente la concentración de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo que pueden causar eutrofización de las aguas receptoras, mediante sistemas avanzados de depuración de lodos activados, que incluyen fases anaerobias y aerobias / Atlas y Bartha, 2002; Maier, 2000/.

Durante el proceso de depuración se desarrolla una diversidad notable de poblaciones bacterianas heterótrofas, predominando Gram negativas (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Zooglea*), bacterias filamentosas (*Beggiatoa*, *Shaerotilus* y *Bacillus*) y hongos filamentosos (*Geotrichum*, *Cephalosporium* y *Penicillium*) que normalmente están en bajo número y su papel no es decisivo en la depuración; sin embargo, una proliferación de estos microorganismos tiene relación con el "esponjamiento" del lodo de aguas residuales haciendo escasa la sedimentación de los flóculos de lodo, lo que limita su eliminación por sedimentación. También existen protozoos, principalmente ciliados (*Vorticella*) que junto a los rotíferos, son importantes depredadores de bacterias.

[/http://www.geocites.com/capecanaverallab/7839;](http://www.geocites.com/capecanaverallab/7839)

[http://www.wsd.dst.il.us/vtour/eff/filt.html/.](http://www.wsd.dst.il.us/vtour/eff/filt.html/)

Anexos

La principal desventaja que presenta el sistema de tratamiento de lodos activados es el requerimiento energético necesario para airear los tanques, por lo que se convierte en una tecnología incosteable e insostenible para países subdesarrollados.

2.5.5.2.2. Tratamiento Aerobio por Filtro Biológico

El filtro biológico es un sistema de tratamiento aerobio de aguas residuales, sencillo y relativamente barato que consiste en tanques circulares, entre 3 y 15 m de profundidad. El interior del tanque se rellena con un material de gran superficie (piedras o material plástico), que sirve de soporte o matriz a una comunidad estable de microorganismos que forman la película biológica llamada biofilm /Percival y Knapp, 1999/. Las aguas residuales se distribuyen con un aspersor de brazo giratorio sobre la superficie del material poroso, por donde filtra lentamente, acumulándose en el fondo el vertido que contiene los nutrientes minerales y el humus orgánico producidos en este proceso (Figura 3).

La aireación del biofiltro es asegurada por la naturaleza porosa de la capa, de modo que una sobrecarga de nutrientes produce un exceso de lodo microbiano, reduciendo las tasas de aireación y filtración, lo que constituye un inconveniente del sistema. Esta desventaja hace necesaria la renovación de la capa del filtro. Otra desventaja es que las bajas temperaturas reducen la eficacia de estas instalaciones de depuración al aire libre /Atlas y Bartha, 2002/.

La diferencia con el tratamiento por lodos activados está en que la biomasa al estar suspendida en el líquido bajo proceso de aireación, está adherida al material de contacto que constituye el reactor o unidad filtrante, la materia orgánica disuelta entra en contacto con la masa microbiana, a través de la fina película de agua que existe en la interfase del material de contacto, y que, constantemente, se remueve por el pase del líquido bajo tratamiento /Maier, 2000; Bordons, 1999/.

2.5.5.2.3. Tratamiento Aerobio por Lagunas de Estabilización

Las lagunas de estabilización son una forma de tratamiento biológico de las aguas residuales, sobre todo aplicado en comunidades de carácter rural, debido a la gran cantidad

de terreno que se requiere. Estas lagunas como su nombre lo indica, son estanques o reservorios excavados en el suelo con mayor o menor protección, según el caso, para las paredes y fondo. / MAPFRE, 1994; Rivas, 1967; <http://www.fao.org/docrep/003/>

Anexos

v9922e.htm#contrnts/

En las lagunas se establece un complejo ecosistema con gran diversidad de microorganismos. En la parte superficial proliferan las microalgas que realizan la fotosíntesis en presencia de luz solar, produciendo el oxígeno molecular que necesitan las bacterias aerobias o facultativas para la oxidación bioquímica de la materia orgánica, liberándose CO₂ y compuestos inorgánicos que sirven de nutrientes a las algas; las cuales a su vez producen

más oxígeno que facilita la actividad biodegradativa que realizan las bacterias. Existe por tanto una simbiosis entre bacterias y algas que favorece la estabilización aerobia de la materia orgánica. Entre las diversas microalgas que predominan están las flageladas (*Euglena*, *Chlamydomonas*), algas verdes (*Chlorella*, *Scenedesmus*), y también cianobacterias (*Oscillatoria*, *Ulothrix*)

[/http://www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/lagunas.html/](http://www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/lagunas.html/)

En el fondo de las lagunas van sedimentando sólidos en suspensión y microorganismos muertos, donde llegan a crecer bacterias anaerobias fermentadoras y metanogénicas, que también biodegradan la materia orgánica. Las lagunas de estabilización pueden además reducir considerablemente las poblaciones de microorganismos patógenos entéricos, en dependencia de la temperatura, radiación solar y tiempo de retención /Mills y cols., 1992/. El rendimiento del sistema se ve afectado además, por las fluctuaciones estacionales de temperatura, y su utilidad, por tanto, está restringida en gran medida a climas cálidos. A mayor luz y temperatura, mayor eliminación de microorganismos patógenos. Por ejemplo, según Grimason y cols. (1993), para asegurar al menos un 99.9% de reducción de *Giardia* y *Cryptosporidium* en una laguna de estabilización en África fue necesario un tiempo de retención de 37.3 días.

Los diferentes tipos de lagunas que existen son: lagunas anaerobias, lagunas facultativas y lagunas aerobias; con eficiencia y tiempos de retención diferentes, pero también con cargas de contaminación asimilables diferentes /Bordons, 1999/.

Lagunas anaerobias: Consiste en estanques profundos de hasta 10 metros donde las condiciones anaerobias prevalecen, con excepción de una pequeña zona en la superficie. Estos sistemas poseen el inconveniente de los malos olores asociados. Por lo general los tiempos de retención son de 20-40 días. Se utilizan en aguas de desechos industriales evacuadas a temperatura superior a la del ambiente y con cierto contenido de sólidos suspendidos sedimentables.

Lagunas facultativas: Tienen una profundidad entre 1-2.5 m subdivididas en tres estratos: una zona aireada superficial, una zona media facultativa, y una zona anaerobia más baja, en las cuales el tratamiento del residual ocurre por procesos

Anexos

aerobios y anaerobios (Figura 5). El tiempo de retención varía entre 5 y 30 días. Son las más comunes para el tratamiento de residuos domésticos y su uso se recomienda para cargas orgánicas inferiores de 300 Kg DBO₅/ha/día /<http://www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/lagunas.html>; Rivas 1967/.

Lagunas aerobias, de maduración o de alto rendimiento: Las lagunas aerobias o de maduración deben ser poco profundas (1-1.5 m) porque dependen de la penetración de la luz solar para estimular el crecimiento de algas que promueve la generación de oxígeno. El tiempo de retención varía entre 3-5 días y su función primaria es la remoción de microorganismos patógenos de aguas residuales /Gerba, 2000/.

En Cuba, la mayoría de las industrias que poseen sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales utilizan el sistema de depuración por lagunas de oxidación. La ciudad de Santiago de Cuba, específicamente la zona industrial, concentra el mayor número de fábricas que vierten directamente las aguas residuales de su proceso productivo hacia la bahía (cuerpo receptor). Entre las fábricas que generan los mayores volúmenes de aguas residuales se pueden citar la Termoeléctrica A. Maceo, Refinería Hnos. Díaz, Planta de Soja, Planta Refinadora de Aceites Comestibles ERASOL, Destilería Santiago, Fábrica de Productos Químicos A. Miller. De estas fábricas solo el 16% tiene diseñado un sistema de tratamiento aerobio por lagunas de estabilización para la depuración de las aguas residuales.

2.5.5.3 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza la capacidad metabólica de los microorganismos (hongos, levaduras, bacterias y algas) y/o sistemas biológicos (enzimas) para producir una transformación parcial o total de contaminantes orgánicos. La transformación parcial conduce a la formación de compuestos más sencillos y menos agresivos que el parental, mientras que la transformación total o mineralización conduce a la formación de CO₂ + H₂O + CH₄ (este último solamente en condiciones anaeróbicas). El objetivo principal de la biorremediación es estimular los procesos biodegradativos que de forma natural tienen lugar en los ecosistemas acuáticos y terrestres contaminados /Maier, 2000/.

La biorremediación depende de factores bióticos (población microbiana, aclimatación, adaptación, cometabolismo y metabolismo fortuito) y abióticos (solubilidad en agua y biodisponibilidad, estructura molecular, disponibilidad de oxígeno, pH, temperatura salinidad y nutrientes) /Bossert y Bartha, 1984; Venosa y cols., 1996; Leahy y

Anexos

Colwell, 1990; Stapleton y cols., 1998; Davison y cols., 1994; Lant y cols., 1997/. Es un proceso lento que no genera residuos y se aplica tanto a suelos como a aguas.

2.5.5.3.1 Estrategias y tecnologías de biorremediación

La biorremediación puede llevarse a cabo utilizando dos estrategias: bioestimulación y bioaumentación /Viñas, 1999/.

La **bioestimulación** consiste en suministrar oxígeno y/o nutrientes (fundamentalmente nitrato y fosfato), para estimular el crecimiento microbiano de la población indígena (Eckenfelder y Norrís, 1993). Cabe destacar que mientras más diversidad biológica exista en un ecosistema con mayor eficiencia podrá autodepurarse.

Las condiciones que se necesitan para aplicar la bioestimulación son: población microbiana viable en el sitio contaminado y población microbiana viable con capacidad metabólica para degradar el contaminante /Solanas, 2002/.

Durante los tratamientos de biorremediación del derrame provocado por el Exxon Valdés, se aplicó la estimulación de los microorganismos hidrocarbonoclastas indígenas aplicando los fertilizantes nitrogenados **INIPOL EAP-22** (7,4% Nitrógeno; 0,7% Fósforo) y **Customblem** (28% Nitrógeno; 3,5% Fósforo) alcanzándose entre un 38-67% de biodegradación /Bragg, 1994; Fonseca, 1998/. Lacottes y colaboradores utilizaron fertilizantes nitrogenados y fosfatados para la biodegradación del crudo del petróleo Arabían Light 250, por un cultivo mixto marino. El porcentaje de biodegradación en los primeros cuatro días se incremento 4,5 veces /Lacottes y cols., 1995/.

La **bioaumentación** se refiere a la inoculación de microorganismos exógenos con actividad biodegradativas, ya sea por adaptación /Kerr y Capone, 1988; Bossert y Bartha, 1984/ o manipulación genética /Hada y Sizemore, 1981; Leahy y cols., 1990; Ford y cols., 1999/.

Los microorganismos son introducidos en formulaciones liofilizadas o deshidratadas mezcladas con nutrientes minerales, como es el caso del **BIOTEMPOSCREEM**, formulación

de 14 cepas bacterianas hidrocarbonoclastas, nutrientes y un catalizador biodegradable /Kaushansky, 1994/ y **PUTIDOIL**, cultivo puro liofilizado de ***Pseudomonas Putida*** más nutrientes.

La estrategia de bioaumentación se aplica cuando la población microbiana indígena es muy baja o no posee actividad degradativa eficiente /Viñas y cols., 2001/. La bioaumentación ha sido utilizada comúnmente en la biorremediación de aguas

Anexos

contaminadas ya que la población de bacterias (principales microorganismos responsables de la biodegradación) en aguas es más baja que en suelos. Tiene el inconveniente de que introduce población microbiana exógena, lo cual en zonas vírgenes puede considerarse una fuente de contaminación /Cabrerizo y cols., 1999/.

Independientemente de la estrategia de biorremediación que se aplique, los tratamientos se agrupan en dos categorías: *in situ*, cuando el tratamiento es realizado en el sitio de la contaminación sin excavación ni modificación de la estructura física del material a tratar, y *ex situ*, cuando el tratamiento es realizado fuera del sitio de la contaminación; es decir requiere excavación del material contaminado. La biorremediación *in situ* es menos costosa que la *ex situ*, pero más difícil de controlar; por el contrario la biorremediación *ex situ* a pesar de ser más costosa debido a la excavación y traslado del material contaminado puede controlarse con mayor facilidad.

La tendencia actual es el uso de tratamiento *in situ* que ofrece beneficios significativos para el ecosistema y proporciona a los asesores ecológicos un nuevo instrumento para solucionar y administrar limpiezas de sitios, alterándolos de forma mínima. En algunos casos, este enfoque es menos costoso que las tecnologías convencionales de tratamientos *ex situ* las cuales poseen alto costo de operaciones y mantenimiento.

Para aplicar las técnicas de biorremediación hay que tener en cuenta lo siguiente:

- Han de existir los microorganismos con la capacidad degradativa correspondiente.
- Los microorganismos han de transformar los contaminantes a una velocidad razonable y eliminar o disminuir su concentración hasta los niveles estándar requeridos.
- Los microorganismos no han de formar productos que puedan presentar toxicidad a la concentración que se forman en el proceso.
- Las condiciones en la zona o en el biorreactor han de estar orientadas a permitir el crecimiento y la actividad de los microorganismos (suplementados de nutrientes, suficiente oxígeno, u otro aceptor de electrones, temperatura adecuada, humedad adecuada y una fuente de carbono y energía para el crecimiento si el contaminante es cometabolizado) /Alexander, 1994; Solanas, 2002/

3. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo experimental se utilizaron los materiales y equipamientos disponibles en el Laboratorio Analítico del Centro de Estudio de Biotecnología Industrial perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente.

La preparación de las soluciones para los ensayos químicos está descrita en el Manual de Preparación de Soluciones e Indicadores del Grupo Analítico del Centro de Estudio de Biotecnología Industrial y el Departamento de Química (CEBI – DQ).

3.1 Reactivos

Acetato de Zinc, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Ácido Clorhídrico, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Ácido Sulfanílico, p.a, E.MERCK, Alemania
Ácido Sulfúrico, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Almidón, p.a, FLUKA, Hungría
Cloruro de Sodio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Cloruro de Amonio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Cloruro de Calcio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Dicromato de Potasio, p.a, E.MERCK, Alemania
Dihidrógenofosfato de Sodio, p.a, PANREAC, España
Ferroina, p.a, REACHIM, URSS
Hidrógenofosfato de Sodio, p.a, REACHIM, URSS
Hidróxido de Sodio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Hidróxido de Sodio, p.a, REACHIM, URSS
Hipoclorito de Sodio, p.a, REACHIM, URSS
Molibdato de Amonio, p.a, PANREAC, España
Molibdato de Amonio, p.a, PANREAC, España
n-hexano, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Nitrato de Potasio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Nitrito de Sodio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Nitruro de Sodio, p.a, REACHIM, URSS
N-Naftilamina, p.a, FLUKA, Hungría
Sulfato de Amonio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Sulfato de Brucina, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Sulfato de Magnesio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Sulfato de Manganeso, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Sulfato de Plata, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Sulfato doble de Hierro II y Amonio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Tiosulfato de Sodio, p.a, BDH Analar, Inglaterra
Yodo, p.a, REACHIM, URSS
Yoduro de Potasio, p.a, BDH Analar, Inglaterra

3.2 Medios de cultivos

Agar Czapek
Agar Saboureaud
Agar Triptona Soja (TSA)
Caldo Lactosado
Caldo verde bilis brillante

Extracto de levadura
Peptona bacteriológica

3.3 Equipos

Autoclave vertical, DK-75, Rusia
Balanza analítica, LB1050 MIM, Hungría
Conductímetro, DDS-11^a, China
Espectrofotómetro, Aguaris "Cecil Inst. Limited, Inglaterra
Espectrómetro de emisión, Spectro Analytical Instruments, Alemania
Estufa, Labergertis, Alemania
Mufla, Carbolite, Inglaterra
pH-metro, Pocitronic, Alemania
Plancha de calentamiento, LP 300, Alemania
Zaranda rotacional, Mizard 2001, Cuba

3.4 Localización y denominación de las estaciones de muestreo.

La localización de las estaciones de muestreo se realizó según metodología establecida en Normas ISO 5667-1, ISO 5667-3, ISO 5667-9, ISO 5667-10.

ESTACION 1: Salida del separador API (Figura 5).

ESTACION 2: Segunda laguna de estabilización (Figura 5).

ESTACION 3: Cuerpo receptor, Bahía, (Figura 5).

3.5 Toma de muestra

En este trabajo se utilizaron para la recolección de las muestras envases de cristal de 1 litro de capacidad. Se tomaron dos tipos de muestras: muestras residuales (en el separador API y en el sistema de Lagunas de Estabilización) y en el cuerpo receptor (Bahía).

La toma de muestra y preservación de las mismas, se realizó mediante la metodología establecida en la Normas ISO 5667-1, ISO 5667-3, ISO 5667-9, ISO 5667-10.

Se efectuaron cuatro muestreos comprendidos entre Marzo y Noviembre del 2002; dos en época de seca y dos en época de lluvia, en el horario de 9 – 11 de la mañana. Las muestras fueron tomadas por triplicado y a una profundidad entre 1 – 1.5 metros.

Existen algunos parámetros (pH, λ , S^2 , O_2) que se recomiendan realizar su análisis en el terreno, pues pueden modificarse durante el almacenamiento o la transportación. En el caso del sulfuro y el oxígeno disuelto, fue necesario fijarlos en el campo utilizando el procedimiento establecido para ello /APHA, 1998 /.

3.6 Parámetros analizados y métodos de determinación.

Para la caracterización de un cuerpo de agua o un residual, es importante determinarle diferentes parámetros fisicoquímicos, ya que son factores que describen tanto su calidad estacionaria como su posible evolución /Barceló, 2000/.

Para realizar el estudio químico – físico y microbiológico de los residuales líquidos de la Refinería Hermanos Díaz y de las aguas del cuerpo receptor (Bahía), se utilizan las técnicas descritas en el Standard Methods /APHA, 1998/.

Se determinaron los parámetros siguientes: pH, Temperatura (T), Conductividad Eléctrica (λ), Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales disueltos (STD), Sólidos Totales Fijos (STF), Sólidos Totales Volátiles (STV), Sólidos Suspendidos (SS), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5), Oxígeno Disuelto (OD), Aceites y Grasas (AG), Sulfuros (S^{2-}), Nitrato / Nitrito / Amonio ($\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$), Fosfato (PO_4^{3-}), Metales pesados, Coliformes (NMP/100 ML) y Población microbiana (UFC/ML).

3.6.1 pH

La determinación se realiza por el método Potenciométrico empleando electrodo de vidrio combinado.

3.6.2 Conductividad eléctrica (λ)

Es la habilidad de una sustancia de transmitir la corriente eléctrica. Se realiza empleando el método Conductimétrico.

3.6.3 Oxígeno Disuelto (OD)

En esta determinación se fija el oxígeno de forma inmediata después de la toma de la muestra, empleando soluciones de sulfato de manganeso y álcalis yoduro azida.

La determinación se basa en que el oxígeno oxida al manganeso (II) pasándolo a un estado de oxidación superior, bajo condiciones ácidas, así el oxígeno disuelto es equivalente a la cantidad de yodo liberado, el cual es valorado con tiosulfato de sodio utilizando el almidón como indicador observándose un cambio de azul a incoloro.

3.6.4 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Su determinación se basa en el hecho de que todos los compuestos orgánicos, con pocas excepciones, pueden ser oxidados a CO_2 y H_2O por la acción de agentes oxidantes fuertes, a pH ácido. Se utiliza el dicromato de potasio como agente oxidante y el mismo se valora por retroceso con solución de sulfato doble de hierro (II) y amonio, una vez concluida la digestión de la muestra.

3.6.5 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5)

Determina el oxígeno que requieren las aguas residuales, los efluentes y aguas contaminadas durante un periodo de tiempo de incubación (5 días) para la degradación bioquímica del material orgánico y la oxidación de materiales inorgánicos como sulfuros e iones ferrosos. El oxígeno consumido se determina mediante una valoración con tiosulfato de sodio, utilizando almidón como indicador.

3.6.6 Determinación de Sulfuro (S^{2-})

El método volumétrico es preciso, pero no puede ser llevado a cabo directamente en los residuales debido a las sustancias interferentes. Es necesario tratar el sulfuro con una solución de acetato de zinc en medio básico antes de valorarla. El sulfuro de zinc formado se filtra, se disuelve, y se hace reaccionar con un exceso de yodo cuyo remanente se valora con una solución de tiosulfato, empleando almidón como indicador.

3.6.7 Ciclo del Nitrógeno ($NO_3^-/NO_2^-/NH_4^+$)

La determinación de nitrógeno como nitrato por el método espectrofotométrico UV es rápida, se emplea una longitud de onda para la medición de 220 nm; en caso de que exista materia orgánica en las muestras se lee a 220 nm y 275 nm, lo que permite que se realice una corrección de las lecturas.

En la determinación de amonio se emplea el método colorimétrico con Indofenol, que se basa en la oxidación del amonio a nitrógeno, utilizando como agente oxidante una solución de hipoclorito de sodio con la formación de un complejo de color azul, cuya absorbancia se mide a 640 nm.

La determinación de nitrito se basa en la diazotación del ácido sulfanílico por el ácido nitroso y su copulación con la α -Naftilamina para formar un azocolorante de color púrpura-rojizo, que se produce a pH de 2.0 a 2.5. Este color es medido colorimétricamente a 520 nm.

3.6.8 Determinación de fosfato (PO_4^{3-})

Se determinó empleando el método espectrofotométrico por formación de un complejo coloreado heteropoliácido molibdofosfórico conocido como azul de molibdeno el cual presenta un máximo de absorción a 590 nm. La estabilidad del complejo se alcanza a partir de los 30 minutos con el reactivo molibdato de amonio en medio neutro.

3.6.9 Metales

La determinación de los metales pesados se realiza mediante el método de Espectrometría de Emisión de Plasma, y se basa en el estudio de los espectros de emisión de los átomos o iones contenidos en el seno de un plasma.

3.6.10 Sólidos

Toda la materia contenida en materiales líquidos, excepto el agua, se considera sólida. La definición usual de sólido, se refiere a la materia que permanece como residuo después de la evaporación y secado a 102 – 105 °C.

Uno de los principales objetivos por lo que se efectúa la determinación de sólidos es la de obtener una medida de la cantidad de materia orgánica presente. El procedimiento estándar es llevar a ignición a 155 – 600 °C. Es esta la temperatura más baja a la cual, la materia orgánica, particularmente residuos de carbón que resultan de la pirolisis de carbohidratos y otras materias orgánicas, pueden ser oxidadas a velocidad razonable.

Cualquier compuesto de amonio no desprendido durante el secado es volatizado, pero la mayoría de las otras sales son relativamente estables.

3.6.11 Aceites y grasas (AG)

Los aceites y grasas se definen como cualquier material recuperado soluble en un solvente específico, por ejemplo hexano. Se extraen de la muestra, acidificada a pH 5, y se determinan gravimétricamente después de la evaporación del disolvente. Este método es adecuado para líquidos biológicos e hidrocarburos minerales, para las aguas industriales residuales o efluentes tratados que contengan estos materiales, aunque la complejidad de la muestra podría provocar resultados bajos o altos debido a la pérdida de especificidad analítica.

3.6.12 Determinación de coliformes (NMP/100 mL)

La determinación de coliformes se basa en el empleo de los tubos múltiples para el cálculo del número más probable (NMP) de coliformes por 100 mL de muestra. El método de los tubos múltiple se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos de fermentar la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas de incubación a 37°C.

Anexos

Este método se divide en dos etapas: Prueba presuntiva (determina coliformes totales), Prueba confirmativa (determina coliformes fecales). Se incuban a 37 y 44°C por 48 horas para diferenciar los coliformes totales de los fecales /Mair, 2000/.

3.7 Bioestimulación de la población microbiana.

La toma de muestra para estos ensayos se realizó según lo descrito en el acápite 3.5.

El inóculo se prepara a partir del cultivo de 1 mL de muestra de la estación 2 (laguna) en 9 mL de caldo nutriente durante 24 horas a 30°C.

En balones de 250 mL de capacidad se esterilizan 100 mL de agua residual de la laguna de estabilización (15 minutos, 121°C) y posteriormente se añade 1 mL de inóculo y 20 mL de medio nitrogenado cuya composición en g/L es: (NH₄)₂SO₄, 0,5; KNO₃, 0,5; CaCl₂, 0,2; MgSO₄, 0,2; KH₂PO₄, 1; Na₂HPO₄.12H₂O, 1 /Fletcher, 1997/. Las muestras y controles (duplicadas) se incuban durante 5 días a 150 rpm en zaranda orbital. Transcurrido el período de incubación se determinaron tanto a controles como a las muestras los siguientes parámetros: pH, (λ) (ST), (STD), (NO₃⁻/NO₂⁻/NH₄⁺), DOQ, (AG), (SS), y Población microbiana (UFC/ML).

La remoción de la carga orgánica y contaminante, medida en porcentaje, se calculó en base a la DQO, AG, y SS, parámetros considerados determinantes en este tipo de residuales.

$$\% \text{ Remoción} = \frac{X_c - X_m}{X_c} \cdot 100$$

Donde: X_c = Valor medio del control

X_m = Valor medio de la muestra

La carga contaminante respecto a un parámetro específico se determina por la siguiente fórmula:

$$\text{Carga Contaminante en Kg/días} = \text{Concentración (Kg/L)} \cdot \text{Caudal (L/día)}$$

Si se toma como parámetro la concentración de DQO se denomina carga orgánica.

3.8 Población microbiana.

Se utilizó el método directo de siembra en superficie, en placa agar Tripton Soja (TSA), según describe Ingraham /Ingraham, 1998/.

3.9 Análisis estadístico.

El procesamiento de los datos se realizó con el programa Statgraphics plus, versión 3.1. Todos los gráficos fueron realizados utilizando el Microsoft Excel versión 2000. Para detectar diferencias significativas se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA), tomando como factor la variable estación y como variables dependientes los parámetros analizados. Además se realizó una prueba Post Hoc para determinar en que variables y entre que estaciones existía la diferencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cumplir los objetivos del trabajo se situaron tres estaciones de muestreos (Figura 5) y se analizaron 19 parámetros para un total de 684 determinaciones. En todos los casos las muestras son incoloras, sin presencia de material flotante; y un fuerte olor a sulfhídrico en las estaciones 1 y 2.

Una vez identificadas las estaciones de muestreo (Materiales y Métodos 3.4) se presentan a continuación los resultados obtenidos en cada una de ellas.

4.1 ESTACIÓN 1 (Salida del Separador API).

Este punto permite valorar las características con que las aguas salen del separador hacia el sistema de lagunas de estabilización.

pH

El valor del pH del agua tiene influencia en muchas reacciones que tienen lugar en el seno de la misma.

El pH obtenido para estas muestras oscila entre 7.20 – 8.20 unidades con un valor medio de 7.68, (Tabla 2) por lo que estas aguas pueden considerarse ligeramente alcalinas. En aguas neutras o alcalinas predomina la eliminación de oxígeno por oxidación, mientras que en aguas ácidas domina la evolución de burbujas de hidrógeno /Skoog y cols., 1998/.

El total de las muestras se encuentran en el intervalo de pH deseable (6–10 unidades) según NC 27; 1999.

Temperatura

Oscila entre 33 – 37 °C (Tabla 2) con un valor medio de 35 °C. La variabilidad corresponde con el período de muestreo. Los valores obtenidos en este parámetro indican que la temperatura no constituye una fuente de contaminación, pues esta se considera contaminante si su valor es superior a 50 °C /NC 27: 1999; Bordons, 1999/

Conductividad Eléctrica

Cuando se trata de un agua natural los electrolitos disueltos hacen que esta sea más conductora, tanto más, cuanto mayor sea la concentración de electrolitos disueltos, hasta alcanzar un valor límite, ya que entran en juego las interacciones iónicas; por

Anexos

tanto en principio, debe existir una relación directa entre la conductividad del agua y los electrolitos disueltos STD.

La conductividad en estas muestras varía entre 2.51 y 3.99 mS/cm, encontrándose todos los valores por debajo del valor máximo deseable (4 mS/cm) según NC 27; 1999; no obstante en el tercer muestreo casi se alcanza este valor (Tabla 2). Los valores obtenidos se relacionan adecuadamente con la concentración de STD, y evidencian que se trata de aguas con una mineralización importante. El mayor aporte a los STD está dado por la presencia de sales inorgánicas; lo que se aprecia en los valores de STF, cuyo promedio es 1 424 mg/L (Tabla 2). Los ST tienen valores altos, que oscilan entre 1 462 - 2 433 mg/L.

Demandas Química y Bioquímica de Oxígeno/ Oxígeno Disuelto.

Entre los parámetros químicos más importantes para detectar contaminación de las aguas, está el OD. Los niveles de este parámetro en aguas naturales y residuales dependen de la actividad física, química y bioquímica en un cuerpo de agua. La determinación del mismo es importante para el análisis de la contaminación de las aguas y como proceso de control para el tratamiento de las aguas residuales (industriales y albañales). El impacto principal de la sobrecarga de aguas residuales es la reducción o el agotamiento del OD, lo que conlleva a que los procesos de autopurificación se hagan drásticamente más lentos, porque el agua se convierte en anóxica o séptica /Atlas y Bartha, 2002/.

La concentración de OD en esta estación fue cero; lo que se atribuye, además de lo planteado anteriormente, a la capa de hidrocarburos presente en la superficie de las aguas en esta estación, que favorece el establecimiento de condiciones anóxicas en el ecosistema.

La DQO se usa para medir el contenido de materia orgánica en aguas naturales y residuales, y es una medida de control de la calidad del agua. Corresponde a la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la fracción orgánica de una muestra de agua susceptible de oxidación por un agente oxidante fuerte en medio ácido /Maskerw y cols., 1992; Ramalho, 1991/.

El valor medio obtenido para la DQO en estas muestras fue de 441 mg/L. Este parámetro aumenta notablemente en el tercer muestreo (985 mg/L) (Tabla2); encontrándose todos los valores, excepto en el segundo muestreo por encima de la norma 250 mg/L /NC 27: 1999/.

Anexos

La DBO_5 se usa como una medida de la cantidad de oxígeno requerida para la oxidación de la materia orgánica biodegradable presente en la muestra de agua y como resultado de la acción de oxidación bioquímica aerobia /Romero, 1995; Ramalho, 1991/.

El valor medio obtenido para la DBO_5 fue de 208 mg/L, encontrándose todas las muestras (Tabla 2) por encima del valor máximo permisible (100 mg/L) según NC 27; 1999.

La relación DBO_5 / DQO se utiliza frecuentemente para caracterizar la contaminación. Si esta relación es superior a 0.5, se considera el efluente de carácter orgánico biodegradable, lo que hace que sea susceptible a un tratamiento biológico; si la relación es inferior a 0.1, se trata de un efluente en el que predominan las sustancias químicas, en este caso los tratamientos son específicos, siendo los fisicoquímicos los más adecuados /Barceló, 2000; Maier y cols. 2000/.

El valor del coeficiente de degradación biológica DBO_5 / DQO calculado en estas muestras fue 0.51 y se puede plantear que en estas aguas predomina la materia orgánica biodegradable.

Sulfuros

El sulfuro total incluye al H_2S disuelto y el HS^- , pero no a los sulfuros metálicos solubles en ácidos que están presentes en la materia suspendida. El ión S^{2-} no está presente en cantidades significativas por debajo de pH 13 /Jorgensen and Johnsen, 1981/.

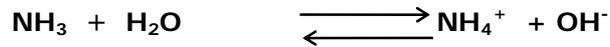
La concentración promedio de iones sulfuros presente en la muestra es de 1.74 mg/L, los valores oscilan entre 0.19 - 3.80 mg/L (Tabla 2), intervalo amplio que puede estar condicionado por eventos ocurridos entre un muestreo y otro.

Nitratos/ Nitrito/ Amonio.

El nitrógeno presente en aguas residuales recién vertidas aparece, fundamentalmente como materia proteica y urea. La descomposición bacteriana transforma fácilmente estas moléculas a amoníaco, pudiendo inferirse el tiempo de vertido por la cantidad presente del mismo. En un ambiente aerobio las bacterias pueden oxidar el N-amoniaco a nitrito y nitrato. El predominio de N-nitrato en las aguas residuales indican que el mismo ha sido estabilizado con respecto a las demandas de oxígeno. El N-amoniaco existe en solución acuosa, ya sea como ion

Anexos

amonio o amoníaco dependiendo del pH de la solución, de acuerdo al siguiente equilibrio:



A $\text{pH} > 7$, el equilibrio se modifica hacia el amoníaco; a $\text{pH} < 7$, el amonio es el predominante /Skoog y cols., 2000/.

La concentración de iones amonio detectada en los tres primeros muestreos es alta (Tabla 2) respecto a la concentración de iones nitrato indicando contaminación reciente de tipo albañal, lo que se relaciona con la presencia de coliformes fecales $> 2 \cdot 10^3$ NMP/100 mL en estas muestras, y confirma este tipo de contaminación. Antiguamente en esto se basaba la interpretación de la calidad sanitaria del agua. Es decir, si un agua presenta gran cantidad de N-orgánico y amoniacal se considera que ha sido contaminada recientemente. Si contiene el nitrógeno en forma de nitrato se considera que posee contaminación no reciente. Posteriormente surgió la prueba bacteriológica para coliformes que es más exacta para determinar contaminación de las aguas /Maier y cols., 2000/.

En el cuarto muestreo hay una inversión de la relación $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$; observándose que la concentración de iones NO_3^- es de 28.9 mg/L y la de iones NH_4^+ de 7.19 mg/L; esto puede deberse al tiempo que media entre la descarga del contaminante y la toma de muestra.

No se detectan iones nitrito en estas muestras esto puede deberse, a que al ser una especie intermedia en el ciclo del nitrógeno, no es estable /Barceló, 2000/.

Fosfato

El Fósforo es otro de los elementos que juega un papel importante en el desarrollo de la vida en el seno del agua, por una parte es imprescindible para el desarrollo de la misma y por otra, cuando su concentración aumenta, actúa de inhibidor del desarrollo de ciertas especies. Actualmente existe una fuente de Fósforo artificial: los detergentes polifosfatados, considerándose, en general, que el 50% del Fósforo presente en las aguas, en las zonas urbanas, proviene de los detergentes /Bodek, 1998; Joryenson and Johnsen, 1981/.

En todas las muestras analizadas la concentración de fosfato obtenida fue muy bajo, menor que 0.03 mg/L.

Aceites y Grasas

Anexos

La concentración de A G influye en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Si están en cantidades excesivas interfieren en los procesos aerobios, disminuyendo la eficiencia del tratamiento al formarse películas superficiales y depósitos costeros que dañan el medio ambiente /López y cols, 2001; Viñas, 1999/.

Los valores de aceites y grasas oscilan entre 11.2 – 19.3 mg/L (Tabla 2) con un valor medio de 14.26 mg/L. Todas las muestras se encuentran por debajo del valor máximo deseable (30 mg/L) para este parámetro según NC 27; 1999; considerando que se elimina mecánicamente la capa de Hidrocarburos que cubre la superficie del agua en esta estación antes de la toma de muestra.

Coliformes

El peligro mayor que puede presentarse en el agua de consumo está en la posibilidad de que se contaminen por aguas albañales por excretas e incluso por materia de origen animal. Los métodos bacteriológicos permiten detectar las bacterias patógenas (coliformes) en las aguas. Los gérmenes bacterianos más comunes son: *Streptococo faecalis* 10^3 - 10^4 NMP/100 mL, *Enterococo sp* 10^2 - 10^3 NMP/100 mL, *Sigella* presente (significa que tan solo 1 colonia presente es señal de contaminación), *Salmonella* 1 - 10^2 NMP/100 mL, *Clostridium perfringens* 10 - 10^3 NMP/100 mL /Gerba, 2000/

Se determinó la presencia de coliformes totales y fecales $> 2 \cdot 10^3$ NMP/100 mL en estas muestras, indicando una mezcla reciente con aguas albañales, este valor se encuentra por debajo de lo que usualmente se reporta en la literatura, 10^5 NMP/100 mL /Gerba, 2000/.

Población Microbiana

Se detectan en los residuales de esta estación bacterias en 10^3 UFC/mL, no hay presencia de hongos ni de levaduras.

En medio acuático la población microbiana es más baja que en suelos. La población microbiana degradadora de hidrocarburos en ambientes terrestres es de 6-82% para hongos y 0.13-50% para bacterias, en medio acuático (marino) 0.003 - 100% para bacterias. Los géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos más comunes tanto en suelos como en aguas son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas spp* /Leahy, 1990/.

4.2 ESTACIÓN 2 (Segunda laguna de estabilización)

Anexos

Se ubica este punto (Figura 5) para la evaluación de estas aguas residuales antes de su vertido al cuerpo receptor. Se trabajó en esta laguna partiendo del criterio que las aguas tienen una menor carga contaminante que las de la primera laguna y además vierten directamente hacia el cuerpo receptor. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en esta estación.

pH

El pH varía en el intervalo de 6.80 – 8.20 unidades con un valor medio de 7.49 (Tabla 3). El total de las muestras se encuentran en el intervalo deseable según NC 27; 1999. Al ser comparados estos valores con los de la estación 1, no se detectaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

Temperatura

Los valores obtenidos están por debajo del límite máximo permisible, 50 °C, según NC 27; 1999. De forma general los valores obtenidos en la estación 1 son más altos que en la estación 2 (Tabla 2 y 3), lo que puede deberse a la sistemática del muestreo; siempre se comenzó por el cuerpo receptor y finalizó en el separador API (siendo la temperatura ambiente más elevada, en el momento de la toma de muestra).

Conductividad Eléctrica

Los valores de conductividad oscilan entre 4.25 - 4.98 mS/cm con un valor promedio de 4.61 mS/cm (Tabla 3). Los resultados obtenidos en esta estación son más altos que en la estación 1, existiendo diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los resultados de ambas estaciones. Hay correspondencia con el incremento de los STD (valor medio 2 438 mg/L y 1 608 mg/L para la estación 2 y 1 respectivamente) (Tablas 2 y 3). Esta diferencia significa que la mineralización en la laguna es mayor que en el separador API (estación 1), por la presencia de mayor cantidad de electrolitos. Los valores de conductividad de todas las muestras analizadas se encuentran por encima de la NC 27; 1999.

Demandas Química y Bioquímica de Oxígeno/ Oxígeno Disuelto

Anexos

Los valores medios correspondientes a la DBO₅, 201 mg/L y a la DQO, 451mg/L son similares a los valores alcanzados en la estación 1 (Figura 6). Ambos valores se encuentran por encima del valor máximo deseable según NC 27; 1999. No se detectaron diferencias significativas

($\alpha = 0.05$) en los resultados obtenidos en ambas estaciones para los dos parámetros; es decir que con un 95% de probabilidad la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica en las estaciones 1 y 2 es similar. Este comportamiento sugiere un funcionamiento ineficiente del tratamiento secundario en la estación 2. Los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales están diseñados para alcanzar una reducción de DBO₅ del 80-90% /Atlas y Bartha, 2002/. El coeficiente de degradación biológica DBO₅/DQO 0.50, predominando la materia orgánica biodegradable al igual que en la estación 1.

En el estudio de caracterización de las aguas del río Los Guaos de la provincia de Santiago de Cuba, la relación DBO₅/DQO en la zona en que se vierten residuales porcinos es de 0.5, lo que confirma que es un efluente con alto contenido de carga orgánica biodegradable; en las cercanías de su estuario la relación es inferior a 0.1, los efluentes en esta zona provienen de industrias químicas y de la construcción donde predominan sustancias de tipo inorgánicas /Pérez y Marañón 1999 /.

En un estudio realizado en la Presa José Antonio Alzate del Estado de México, la relación DBO₅/DQO en todas las muestras analizadas fue de 0.2 lo cual confirma el carácter industrial inorgánico de los contaminantes que poseen las aguas del río Lerma, principal afluente de la presa, /Barceló, 2000/.

La carga orgánica contaminante que poseen las aguas en esta estación, es de 1 624 Kg/día.

La concentración de OD es cero atribuible a la carga contaminante y la capa de hidrocarburos de 5-7 cm de espesor que poseen estas aguas y que fue necesario retirar físicamente, para la toma de muestras en las estaciones 1 y 2; dando lugar a condiciones anaerobias. Una vez establecidas estas condiciones pueden mantenerse mediante la formación de H₂S, compuestos orgánicos residuales, sales inorgánicas reducidas, etc /Grant y Long, 1989/.

La laguna por su diseño es facultativa (predominio de la fermentación anaerobia, oxidación aerobia y reducción fotosintética) /Bordons, 1999/; sin embargo la capa de hidrocarburos que posee impide la penetración de la luz solar y la oxigenación del sistema; esto significa que los procesos de oxidación aerobia no se llevarán a cabo /Atlas y Bartha, 2002/.

Aceites y Grasas

No se observó, variación de la concentración de A G en esta estación (10.20 - 20.50 mg/L), con respecto a los valores obtenidos en la estación 1 (11.20 - 19.30 mg/L) (Tabla 2 y 3) y están por debajo del valor normalizado, 30 mg/L según NC 27; 1999. Esto sugiere además de un nulo funcionamiento del sistema de tratamiento primario (tipo Skimmer, el cual tiene la función de recoger la mayor cantidad de hidrocarburos en el separador y reincorporarlo al proceso de refinado), la no biodegradación de hidrocarburos por la población microbiana de la laguna en las condiciones actuales. Tal situación es atribuible a las condiciones anóxicas y afóxicas que posee la laguna estudiada. La penetración de la radiación solar es un factor determinante en la eliminación de la materia orgánica (Figura 4). La carga contaminante de hidrocarburos es de 52.92 Kg/día.

Sulfuros

La concentración media de este ión en estas muestras es de 26.96 mg/L. Todos los valores son mayores que los encontrados en la estación 1, (Tabla 3 Figura 7); encontrándose diferencias significativas para ($\alpha = 0.05$) entre ambas estaciones.

El incremento notable en la concentración de este ión, en la estación 2 puede deberse entre otras causas a las siguientes:

1) La especie química de sulfuro predominante. La forma en que el sulfuro está presente en un medio depende del diagrama de distribución de sus especies /Bodek, 1998/, según la variación de pH, de acuerdo al siguiente equilibrio:



Las aguas de la laguna poseen un pH neutro valor por lo que la especie predominante es el ión hidrogeno sulfuro (HS^-) que es muy hidrosoluble; acumulándose en las aguas ya que las condiciones anóxicas impiden la oxidación del HS^- a SO_4^{2-} /Madigan et al 1999/.

2) El contenido de H_2S libre en el petróleo. El petróleo crudo contiene H_2S libre y disuelto el cual se deposita en los lodos sedimentados de los tanques de almacenamiento y cuando se procede a su limpieza, son arrastrados hacia el sistema de evacuación de residuales. En la estación 1 no se observaron concentraciones tan altas de este ión debido al rápido tránsito

Anexos

(1-2 horas) del residual por el separador, lo que no ocurre así en la laguna donde el tiempo de estadía del residual es de ≈ 5 días y dadas sus condiciones actuales este ión puede irse acumulando.

3) El contenido de azufre en el petróleo cubano. Durante la época de muestreo se ha refinado una mezcla 80:20 m/m de petróleo venezolano Mesa 30 con crudo nacional Puerto Escondido. El crudo cubano contiene $\approx 7\%$ de azufre que no es eliminado en el proceso de craqueo del petróleo.

4) Reducción desasimilatoria de SO_4^{2-} . La reducción desasimilatoria del sulfato (SO_4^{2-}) es la principal fuente del ión hidrógenosulfuro (HS^-) y esta reducción es llevada a cabo por las bacterias sulfato-reductoras (anaerobias estrictas). La reducción de SO_4^{2-} tiene lugar únicamente en presencia de una cantidad significativa de materia orgánica /Poulton cols., 2002/.

Nitratos/ Nitritos/ Amonio

Se observa el mismo comportamiento que en la estación 1 (Tablas 2 y 3). En los tres primeros muestreos la concentración de iones NO_3^- , es menor que la concentración de iones amonio (Figura 8). Esto pudiera deberse a que en condiciones anóxicas el amonio es estable y es en esta forma que predomina el nitrógeno en la mayoría de los sedimentos anóxicos. El amonio se produce durante la descomposición de compuestos orgánicos de nitrógeno (amonificación) y a pH neutro. La reducción desasimilatoria del nitrato ocurre en condiciones estrictamente anóxicas por bacterias desnitrificantes (*Pseudomonas* y otras bacterias facultativas). Esta reducción se lleva a cabo por las enzimas nitratorreductasa desasimilatoria, proteínas cuya síntesis solo se reprime por el oxígeno. /Madigan et al, 1999/.

En el último muestreo aumenta la concentración de iones nitrato, 13.30 mg/L, y la concentración de amonio disminuye a 3.78 mg/L invirtiéndose la relación antes mencionada (Figura 8). Esta situación es similar a la que se presenta en la estación 1 (Tabla 2) y puede deberse al momento en que se tomó la muestra con relación a la descarga del contaminante. Al comparar los resultados de las concentraciones de iones nitratos y amonio en las estaciones 1 y 2 se detectaron diferencias significativas.

Tampoco se detectaron iones nitritos en estas muestras.

Coliformes Totales y Fecales

Se detectó la presencia de coliformes totales ($2 \cdot 10^3$ NMP/100 mL) y fecales ($9 \cdot 10^2$ NMP/100 mL) siendo estos más bajos que en la estación 1. La población de

Anexos

coliformes totales se encuentra por debajo de los valores reportado 10^5 NMP/100 mL como criterio de contaminación en aguas residuales /Gerba, 2000/.

Población Microbiana

La población microbiana es del orden 3×10^4 UFC/mL para bacterias y del orden de 10^3 UFC/mL para hongos. No se detectaron levaduras. En esta estación la población microbiana es mayor que en las estaciones 1 y 3 aunque no alcanza valores que permitan afirmar que es una población rica ($10^6 - 10^7$) /Leahy, 1990/. Tal situación puede explicarse por el bajo contenido de nutrientes (nitrato, amonio y fosfatos) que posee esta estación.

La situación que presenta la laguna de estabilización es compleja debido a la falta de limpieza de la capa de hidrocarburos durante un largo período de tiempo; lo cual ha traído como consecuencia una ineficiencia del tratamiento secundario que debe llevarse a cabo en ella.

Si se comparan los resultados mostrados en la Tabla 3 con los que se presentan en la (Tabla 4) y que corresponden a las características de las aguas de la laguna en 1960 (tomados como línea base en este trabajo) se observa claramente, que excepto el pH, todos los valores han aumentado en sentido de impacto negativo; ocurriendo un drástico descenso del OD y un marcado incremento en los valores de DQO, AG, e iones S^{2-} . La concentración de hidrocarburos se ha incrementado en 86 veces.

El estado de la laguna de estabilización es la causa de que las aguas que se vierten al cuerpo receptor no cumplan con los límites máximos permisibles promedios para la descarga de aguas residuales según la NC 27; 1999 y que quedó evidenciado en el análisis.

4.3 ESTACIÓN 3 (Cuerpo receptor, Bahía).

Las muestras se toman aproximadamente a 1 m de la barrera móvil de contención (Figura 5) para conocer como se afectan las aguas más próximas al vertido. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

pH

El pH oscila en el intervalo 7.16 – 7.9 unidades con un valor medio de 7.65 (Tabla 5). Este intervalo es más estrecho con respecto a las estaciones 1 y 2 (Tablas 2 y 3) debido a la capacidad tampón del agua de mar. No se detectaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre estos valores y los obtenidos en las estaciones 1 y 2,

Anexos

lo cual denota que el comportamiento de este parámetro es similar en las diferentes estaciones.

Los valores de pH obtenidos le confieren una calidad dudosa a esta agua según NC 93 - 01 - 105.

Temperatura

Oscila entre 30 - 35 °C según las condiciones ambientales existentes en el momento de toma de la muestra con un valor medio de 32 °C (Tabla 5).

Conductividad eléctrica

Los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 35.85 - 37.20 mS/cm (Tabla 5), con valor medio de 36.56 mS/cm. Los valores aumentan con respecto a las estaciones 1 y 2 como era de esperar en agua de mar. Los STS tienen un valor medio alto, 4489 mg/L, influyendo en la transparencia del cuerpo de agua siendo sinónimo de contaminación (Tabla 5).

Demandas Química y Bioquímica de Oxígeno/ Oxígeno Disuelto

La concentración de OD es variable en esta estación, existiendo una correspondencia inversa con las demandas químicas de oxígeno (Tabla 5). En los muestreos 3 y 4 la concentración de OD está por encima del valor mínimo recomendable para la vida en este medio (5 mg/L) confiriéndole una buena calidad al agua según NC 93-01-105, antes del tercer muestreo hubo fuertes lluvias y es posible que esto diera lugar a la oxigenación del agua, de ahí dicho ascenso. Esto corresponde con la disminución de los valores de DQO y DBO₅ en este muestreo.

Hay que señalar que en todos los casos la concentración de DBO₅ está muy por encima del valor recomendado (1mg/L), afectando la vida de las especies marinas y confiriéndole una mala calidad al agua según NC 93 - 01 - 105.

Si se analizan los valores obtenidos en cada uno de los muestreos, se aprecia que los resultados de DQO, DBO₅ y OD en la estación 3 son más altos Tabla 2, en la mayoría de los casos, que los obtenidos para la estación 2 (Tabla 2). Esto sugiere que la zona de muestreo en la estación 3 puede estar afectada por el vertido de residuales de otras fuentes, además de la laguna. Sin embargo al realizar el análisis estadístico (MANOVA) no se detectaron diferencias significativas entre los valores de las variables estación y la variable dependiente DQO.

Anexos

A partir del MANOA realizado (Tabla 6) puede plantearse que la contribución de las fuentes externas a la DQO del cuerpo receptor es pequeña, 17.05% y por tanto el mayor aporte a la DQO en esta estación proviene de la estación 2 (laguna de estabilización); aporte que alcanza un 82.95%.

Al comparar los valores promedios obtenidos en este trabajo para la DQO y DBO₅ (621 y 433 mg/L respectivamente) DBO₅ con los del monitoreo realizado en la Bahía de Santiago de Cuba en 1996 en la estación de Boca del Morrillo (200 y 5.8 mg/L respectivamente); zona más limpia de la Bahía y que se toma como referencia precisamente por ser una zona poco perturbada por la contaminación, se observa que son muy superiores; lo cual confirma la mala calidad del agua en la zona de vertido.

Aceites y Grasas

La concentración de este parámetro está por debajo de los valores de concentración obtenidos para las estaciones 1 y 2 (Tabla 2 y 3) lo que está de acuerdo con las características de esta

estación (Tabla 5). La concentración media de aceites y grasas en el cuerpo receptor es cinco veces más alta que la de Boca de Morrillo (1.04 mg/L), lo que confirma la afectación de la zona de vertido.

Sulfuros

El valor promedio de iones sulfuro es de 2.84 mg/L. Como se observa en la Tabla 5, la concentración de iones sulfuro en los diferentes muestreos no tuvo un comportamiento uniforme; lo cual puede atribuirse a eventos especiales no determinados y que afectan este parámetro. Los valores obtenidos se diferencian significativamente ($\alpha = 0.05$) con los de la estación 2 (Tabla 3).

Nitratos/ Nitritos/ Amonio

La concentración de iones nitrato está por encima de la concentración de iones amonio (Tabla 5) y le confieren calidad dudosa al agua (0.01 – 0.6 mg/L), según NC 93 – 01 – 105. La relación de las concentraciones de iones nitrato y amonio indica contaminación no reciente ya que ha sido posible la oxidación de los iones amonio a nitrato (existe un mayor nivel de oxígeno que en las estaciones anteriores, situación que favorece la oxidación) (Tabla 5) En esta agua no se detecta la presencia de

Anexos

nitrito; se conoce que cuando los valores de nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-}) no son muy altos, la concentración de dicho ión puede ser muy bajo e incluso no detectable. En este caso la concentración de fosfato está por debajo de 0.03 mg/L.

Coliformes Totales y Fecales

Los valores obtenidos son muy bajos, 2 NMP/100mL, por efecto de dilución del cuerpo receptor siendo las aguas de buena calidad según NC 93 – 01 – 105.

Población Microbiana

No se detecta presencia de hongos y levaduras, encontrándose una población $\approx 2 \cdot 10^3$ UFC/mL de bacterias; esto confirma que la población microbiana en agua de mar es más baja que en otros medios. En las tres estaciones evaluadas no se detectó presencia de levaduras. Este grupo de microorganismos no es característico de aguas contaminadas por hidrocarburos /Leahy, 1990/.

Analizando de forma integral los resultados obtenidos para las muestras de la estación 3 (Bahía) se observa que la mayoría de los parámetros estudiados (pH, DBO_5 , NO_3^- , NH_4^+ , SS, OD y PO_4^{3-}) y que se relacionan en la NC 93 – 01 – 105 le confieren al agua calidad entre mala y dudosa.

4.4 Metales

Además de los macro constituyentes, existen en las aguas naturales micro constituyentes o elementos trazas ($< 1\text{mg/L}$), en esta denominación se enmarcan los metales pesados

En general, los metales que consideremos son especies iónicas y compuestos neutros, estables en presencia del oxígeno disuelto en las aguas naturales y que se encuentran en las mismas en cantidades variables. En las aguas contaminadas, sobre todo con sustancias orgánicas, pueden existir en otros estados debido al carácter reductor de las mismas.

Muchos metales pesados presentes en el agua pueden inhibir la actividad bacteriana, debido a lo cual, tienen gran influencia en la depuración biológica de la materia orgánica. El plomo, por ejemplo, presenta inhibición de la actividad enzimática en un 20% a concentraciones de 182 y 1 280 ppm para la glucosidasa y deshidrogenasa bacteriana respectivamente; mientras que el cadmio provocó pérdidas de la actividad

Anexos

desidrogenasa a 60 ppm, no detectándose actividad glucosidasa a niveles menores que 1 470 ppm /Montuelle y cols., 1994/.

En la Tabla 7 se muestran los valores medios de la concentración total de las especies metálicas consideradas como las más importantes y representativas en este tipo de residual.

De forma general se puede plantear que existe una tendencia a disminuir la concentración de los mismos en la estación 3 (cuerpo receptor), excepto para la Ag que muestra un ligero incremento y el Co que posee valores similares a la estación 2 (segunda laguna de estabilización). El As, Cr, Pb, Sb, Se y Hg se detectaron a nivel traza en todas las estaciones. y la NC 93-01-105 solo considera los metales pesados, As, Pb, Hg, Cu y Cd que en nuestro caso están por debajo del límite máximo permisible (Tabla 7)

Actualmente se planifican métodos de biolixiviación y preconcentración de metales utilizando microorganismos que favorecen la remoción de metales pesados de hábitats terrestres /Viera y cols.,2003; Sand y cols., 2001/

4.5 Bioestimulación de la población microbiana en la laguna de estabilización para la remoción de la carga contaminante.

Los procesos industriales o de servicios en los cuales se utilizan los sistemas biológicos (microorganismos y/o sistemas enzimáticos) como agentes activos del proceso son definidos como Biotecnología. Si estos sistemas biológicos tienen aplicación ambiental, entonces se define como Biotecnología Ambiental.

La Biotecnología Ambiental considera tres aspectos fundamentales:

1. Aprovechamiento biotecnológico de residuos. El objetivo es obtener un producto con valor añadido, independientemente de que el residuo a su vez es modificado, en el sentido de disminución de su impacto.
2. Biodegradación de xenobióticos. Se centra en la transformación de polifenoles, polihalogenados y compuestos nitrogenados principalmente, en moléculas menos agresivas que la parental.
3. Tratamiento biológico de residuos. Se refiere a la remoción de carga orgánica (DQO) mediante la acción microbiana, y puede o no obtenerse un producto con valor añadido. El resultado final, si el sistema de tratamiento biológico es eficiente, es un residual con una carga orgánica mucho menor. En el Tratamiento biológico de residuos es donde se aplican las diferentes técnicas de biorremediación, ya sea por bioestimulación o bioaumentación /Bordons, 1999/.

La **bioestimulación** es una estrategia de Biorremediación y consiste en suministrar oxígeno y nutrientes (fundamentalmente fuentes de nitrógeno y fosfato) para estimular el crecimiento microbiano de la población endógena, la cual debe tener capacidad metabólica para degradar y/o transformar el contaminante /Eckenfelder y Norrís, 1993/. En el territorio nacional, la mayoría de los trabajos de biorremediación de ecosistemas impactados por hidrocarburos; se llevan a cabo aplicando estrategias de bioaumentación. Estos ecosistemas son fundamentalmente aguas costeras y bahías /Fonseca, 1997/.

Previo a los ensayos de bioestimulación fue necesario comprobar la existencia de población microbiana en la laguna de estabilización; así como la capacidad de degradación de petróleo por esta población.

Se seleccionó la estación 2 (laguna de estabilización) para realizar los ensayos de bioestimulación considerando dos aspectos: a) es en esta estación donde tiene lugar el tratamiento biológico de las aguas residuales del proceso y b) en las costas (estación 3) no resulta útil la bioestimulación con nutrientes ya que los procesos físicos (mareas, oleaje y corriente) son los que controlan el flujo de materia y organismos /Fonseca, 1998/.

La existencia de población microbiana se comprobó a partir de la siembra de 1 mL de muestra de agua de la laguna de estabilización, tomada en el punto 2 (Figura 5), en 9 mL de caldo nutriente (Materiales y Métodos Sección 3.7) durante 24 horas a 28-30 °C. El recuento directo en placa detectó una población de $3 \cdot 10^4$ UFC/mL. Este valor de población microbiana; si bien es bajo para un sistema biológico, donde generalmente se detecta una población entre 10^5 y 10^6 UFC/mL /Viñas, 2001/, es más alto que la población detectada en las estaciones 1 y 3 (API y Bahía, respectivamente).

Para comprobar la capacidad metabólica de la población sobre petróleo, contaminante de mayor interés en las aguas de la laguna, se cultivó 1 mL de muestra en 9 mL de medio nitrogenado (Materiales y Métodos Sección 3.7) durante 48 horas a 28-30 °C y como única fuente de carbono se añadió 1 mL de petróleo crudo (que equivale a 0.75 g). La aparición de turbidez frente a un control cultivado en las mismas condiciones, se tomó como prueba positiva; es decir que la microbiota de la laguna de estabilización tiene la capacidad de degradar petróleo al asimilar esta fuente de carbono en su metabolismo. La prueba positiva indica que la población microbiana de la laguna está adaptada a este contaminante, debido a que la contaminación de este ecosistema es no reciente.

Considerando que existe microbiota con capacidad metabólica para degradar hidrocarburos, así como el contenido de nutrientes en esta estación (NO_3^- , PO_4^{3-} y OD) y el coeficiente de degradación biológica > 0.5 se realizó el ensayo de biestimulación de la población de la laguna de estabilización según se describe en (Materiales y Métodos Sección 3.7). Antes y después del ensayo se analizaron los parámetros de impacto Hidrocarburos (como Aceites y Grasas); pH, λ , ST, STD, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$, DQO, SS, y Población microbiana (UFC/mL).

Se seleccionaron las condiciones de trabajo en base a lo reportado por Viñas y colaboradores en el 2001 y Jonson y Scow en 1999. Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron: aireación, nutrientes, temperatura y tiempo. Los ensayos se realizaron a 25°C. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los

Anexos

microorganismos, (específicamente bacterias), que existen en aguas contaminadas con petróleo; está entre 25 y 30°C /Fletcher 1997; Viñas, 1999/. El tiempo de incubación aplicado, 5 días, se seleccionó considerando que el mayor consumo de petróleo por poblaciones microbianas ocurre en los primeros 20 días (Viñas, 2001, Solanas 2002). De experiencias anteriores en nuestro grupo, se conoce que cepas obtenidas en la zona de trabajo degradan en los primeros 5 días la mayor cantidad del crudo y a partir de este tiempo, el consumo del sustrato es menor (Marañón, comunicación personal).

La degradación de hidrocarburos (sustratos altamente reducidos) requiere del oxígeno como aceptor final de electrones. En agua, no suele ser un factor limitante; como sucede en sedimentos y suelos. Las muestras fueron sometidas a agitación constante (150 rpm) para suministrar oxígeno al sistema.

Los nutrientes inorgánicos son esenciales para mantener las proporciones de los elementos en las estructuras biológicas de los microorganismos. Los elementos limitantes son habitualmente el nitrógeno y el fósforo en relación al carbono orgánico que contiene el medio /Viñas, 1999/.

Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Como se aprecia en la Tabla, la estrategia de estimulación de nutrientes aplicada permite reducir la concentración de los diferentes parámetros de impacto analizados. La remoción de DQO es del 59%, disminuyendo la carga orgánica hasta 441 kg/día (2.4 veces menos).

Los hidrocarburos, una vez finalizado el tratamiento, son removidos en un 99% (Tabla 8), lo cual significa una reducción de la carga contaminante de hidrocarburos de 49.84 a 0.70 kg/día.

La biodegradación aerobia de hidrocarburos puede representarse:

$$1\text{kg HC} + 2.6\text{kg O}_2 + 0.07\text{ kg N}_2 + 0.007\text{ kg P} = 1.6\text{kg CO}_2 + 1\text{kg H}_2\text{O} + 1\text{kg biomasa}$$

donde HC representa hidrocarburo

De acuerdo con esta expresión, la biodegradación del crudo requiere de oxígeno (2.6 veces la cantidad de hidrocarburos a degradar), nitrógeno (nitrógeno/hidrocarburo = 0.07) y fósforo (fósforo/hidrocarburo = 0.007). La relación nitrógeno/hidrocarburo utilizada fue de 0.05 y la de fósforo/hidrocarburo de 0.008 y aunque la relación nitrógeno/hidrocarburo es menor que la recomendada (Solanas, 2002); los

Anexos

resultados alcanzados evidencian que la proporción utilizada en el trabajo no fueron limitante en la biodegradación del crudo.

La estrategia de bioestimulación que se aplicó en el trabajo, favoreció la reducción de las concentraciones de DQO e hidrocarburos a valores por debajo del límite máximo permisible para estos parámetros (250 y 30 mg/L respectivamente) según NC-27:1999. En base a estos parámetros, el residual adquiere la calidad requerida para ser vertido al cuerpo receptor.

La biestimulación con nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-}) en microcosmos redujo la contaminación por hidrocarburos en suelos de 12 000 ppm a 5 000 ppm en 50 días de tratamiento para un 50% de remoción /Viñas, 2001/. La adición de nitrógeno y fósforo en formulación proteica para estimular el crecimiento de una comunidad bacteriana marina obtenida de sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Marinobacter hydrocarbono clasticus*) favoreció el 30% de biodegradación de Hidrocarburos en 25 días /Lacotte, 1995/.

La adición de nitrógeno en forma de NH_4^+ y NO_3^- y PO_4^{3-} ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4= 0.8$) al suelo Yolo, favoreció la mineralización del fenantreno en 30-35% a los 25 días por la población microbiana indígena del suelo /Johnson, 1999/.

La carga contaminante de SS disminuyó significativamente (5.8 veces), para un 83% de remoción (Tabla 8). Según NC 27:1999, no se recomiendan sólidos suspendidos; a pesar de ello el residual adquiere una notable mejoría. Por su parte la remoción de nitrato y amonio son del 72 y 88 %; significando una reducción de la carga de 3.6 y 8.5 veces respectivamente.

Los porcentajes de remoción alcanzados en los diferentes parámetros analizados evidenciaron la capacidad degradadora de la población de la laguna de estabilización; la cual se incrementa hasta 10^7 UFC /mL (Tabla 8).

En sentido general el tratamiento realizado mejora las características del residual para su vertido al cuerpo receptor; lo cual sugiere que el tratamiento de biestimulación de la población microbiana para la remoción de la carga contaminante es adecuado. No obstante, en estudios sucesivos será necesario valorar las proporciones de estos nutrientes al aplicar la bioestimulación; con el objetivo de estimular una remoción más alta de la DQO, la cual aún es baja en comparación con los porcentajes descritos al utilizar sistemas biológicos (80-90%) /Gerba, 2000/.

5. CONCLUSIONES

1. Las aguas residuales de la Refinería Hermanos Díaz no cumplen con la Norma de vertido **NC 93 – 01 – 105**.
2. Los tratamientos primario (Separador API) y secundario (Sistema de laguna de estabilización), en las condiciones del estudio realizado, son ineficientes.
3. Durante el período de estudio la carga orgánica y contaminante de hidrocarburos de las aguas de la Refinería Hermanos Díaz fue de 1 624 Kg/día y 52.92 Kg/día respectivamente.
4. La bioestimulación de la población de la laguna de estabilización favorece la remoción del 99% de hidrocarburos y del 59% de la DQO, en las condiciones estudiadas.

6. RECOMENDACIONES

1. Optimizar los parámetros a tener en cuenta en los ensayos de bioestimulación para alcanzar una mayor remoción de materia orgánica.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ **Alexander, M. 1994.** "Biodegradation and Bioremediation". Ed. Academic Press. Usa. pp. 302
- ✓ **APHA. 1998.** "Standard Methods for the examination of water and wastewater". 20th edition. American Public Health Association. USA.
- ✓ **Atlas R.; Bartha, R. 2002.** "Ecología microbiana y microbiología ambiental". Pearson Educación. Madrid. España. pp 696.
- ✓ **Barceló, I. 2000.** "Estudio de la movilización de Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb Y Zn en sedimentos de la presa José Antonio Alzate en el Estado de México". Tesis Doctor en Ingeniera-Ciencias del Agua. Universidad Autónoma del Estado de México.
- ✓ **Bartha, R. 1986.** "Biotechnology petroleum Pollutant Biodegradation". Microb. Ecol. 12: pp 155-172.
- ✓ **Bergueiro, J. R. y Domínguez, F. 1996.** "Evaporación y mezclas de hidrocarburos". Editorial Bilbilis. p p.348.
- ✓ **Bodek, I. 1998.** "Environmental Inorganic Chemistry". Tomo I y II. Pergamon Press.
- ✓ **Bordons, A.; Constantín, M. 1999.** "Introducción a la Biotecnología Ambiental". Ed. Universitat Rovira Virgill. Tarragona. España. pp 111.
- ✓ **Bossert, I.; Bartha, R. 1984.** " The fate of petroleum in soils ecosystems". pp 434-476. Citado en Atlas, R. M. (ed), Petroleum microbiology. MacMillan Publishing Co., New York.
- ✓ **Bragg, J. R. 1994.** " Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdes oil spill. Nature. 368. pp 413.
- ✓ **Cabrerizo, P.; Expósito, H.; Fabra, A. 1999.** "Biorremediación de Vertidos petrolíferos". pp. 6.
- ✓ **Canas, B. 1994.** "Técnicas de Laboratorio". No. 189. Marzo.
- ✓ **Davison, A. D.; Csellner, H.; Karuso, P.; Veal, D. A. 1994.** "Synergistic Growth of two members from a mixed microbial consortium growing on byphenyl". FEMS. Microbial. Ecol. 14. pp. 133-146.
- ✓ **Díaz B. 1999** "Principales parámetros de la Contaminación Ambiental", Programa Maestría en Biotecnología, ESPOCH, Ecuador.
- ✓ **Dickson, T. R. 1990.** "Química un enfoque ecológico". Ed. Limusa.
- ✓ **DSE. 1990.** Manual de Tratamiento de aguas negras. Departamento de Sanidad del Estado de New York. Edit. Limusa.

Anexos

- ✓ **Duffrus, J., H. 1983.** "Toxicología Ambiental". Edición Omega, Barcelona.
- ✓ **Eckenfelder, W. W.; Norris, R. D. 1993.** "Aplicability of biological proceses for treatment of soils". En: Tedder, D. E; Pohland, P. (eds). Emerging technologies in hazandous waste management III. PP. 38-158.
- ✓ **Elías, A. 1992.** "Separación de etapas en el tratamiento anaerobio de efluentes con reactores UASB". Tesis Doc. Bilbao. pp.1-61.
- ✓ **Enkerlin, H.; Cano, G.; Garza, A. 1997.** "Ciencia ambiental y desarrollo sostenible". Pp. 373-379.
- ✓ **Fonseca, E. L. 1998.** "Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar". Tesis de maestría. Universidad de la Habana.
- ✓ **Fonseca, E. L.; Bellota, M.; Villaverde, M.; Martínez, J.; Núñez, R. R.; Riverón, L. A.; Joseph, N. y Fuentes, M. 1994.** "Tratamiento de un derrame de petróleo combustible en la Bahía de Cienfuegos, Cuba". Archivo Científico. OCIM. Instituto de Oceanología.
- ✓ **Fonseca, J. A. 2000.** "Posible trayectoria y consecuencias de un derrame de petróleo". Proyecto Geocuba.
- ✓ **Ford, C. Z.; Sayler, G. S.; Burlage, R. S. 1999.** "Containment of a genetically engineered micoorganism during a field bioremedation application". Appl. Microbiol. Biotechnol. 151. pp 397- 400.
- ✓ **García, J. M. 1989.** "Estudio de la Contaminación de corrientes". Tesis Dr. Ciencias Técnicas. CINC. Cuba.
- ✓ **Gerba, C. 2000.** "Domestic waster and waste treatment". En, Environmental Microbiology. Cap. 21Academic. Press ed. (Canada) pps. 505-543, 508-512.
- ✓ **Grady, C. 1998.** "Biological Wastewater Treatment". M. Dekker, NY.
- ✓ **Grant, W. D.; Long, P. E. 1989.** "Microbiología Ambiental". Ed. Acrebia S. A.
- ✓ **Grimasson, A.; Smith, H.; Thitai, W. 1993.** "Ocurrence and removal of *Cryptosporidium spp. Oocysts* and *Giardia Cysts* in Kenya waste stabilization pons". Wat. Sci. Technol. 27. pp. 97-104.
- ✓ **Hada, H. S.; Sizemore, R. K. 1981.** "Incidence of plasmids in marine Vibrio spp. Isolated from an oil field in the northwestern Gulf of Mexico". Appl. Environ. Biotechnol. 41. pp 199-202.
- ✓ **Henze, M.; Harremoes, P.; Cour, J. 1997.** " Wastewaster treatment: Biological an Chemical Proceses".
- ✓ **Herebero, L.; Quijada, A. 2001.** "Derrames de Petróleos en Cuba", Periódico Juventud Rebelde, Cuba, Junio 3.
- ✓ **Hill, M. K. 1997.** "Understanding Environmental Pollution". Cambridge Universidad. Press

Anexos

- ✓ **Ingraham, J. L. And Ingraham, M. 1998.** "El crecimiento de los microorganismos". En Introducción a la Microbiología. Cap. 8. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. PP. 205-208.
- ✓ **Johnson, C. R.; Scow, K. M. 1999.** " Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils". Biodegradation 10.pp. 43-50.
- ✓ **Jorgensen, S. E.; Johnsen, I. 1981.** "Principles of Environmental Science and Technology". Elsevier Scientific Publishing Company.
- ✓ **Jústiz, N., 1995.** "Intensificación de los Procesos de Depuración de las aguas residuales de la refinería "Hermanos Días"", Tesis de Doctorado.
- ✓ **Kaushansky, T. 1994.** "Comunicación personal".
- ✓ **Kerr, R. P; Capone, D. G. 1998.** "The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments". Mar. Environ. Res. 26. pp 181-198.
- ✓ **Lacotte, D. J.; Miller, G.; Acquaviva, M.; Bertrand, J. 1995.** "In vitro biodegradation of Arabian Light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as nitrogen and phosphorous sources". Chemosphere. 31. pp 4351-4358.
- ✓ **Lantz, S. K.; Monlgomery, M. T.; Schaltx, W. W.; Prichand, P. H.; Spargo, S. I.; Mueller, J. G. 1997.** "Constituents of an organic wood-preserved that inhibit the fluoranthene-degrading activity of *Sphingomonas paucemobilis*". EPA SOS. Environ. Sci. Technol. 31. pp. 3573-3580.
- ✓ **Leahy, J. G.; Colwell, R. R. 1990.** "Microbial degradation of Hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54. pp 305-315.
- ✓ **Lee, T.; Wang,I, Y. 1999.** "Dynamic modelling and simulation of activated sludge process using orthogonal collocation approach". En, Wat. Res. Vol. 33, No. 1, pp. 73-86.
- ✓ **López, C. M.; Ilubalde, M. A.; Claro, R. y cols., 2001.** "Introducción al conocimiento del Medio Ambiente. Universidad para Todos Tabloide.
- ✓ **Madigan, N. V.; Martenko, J.; Parker, J. 1999.** "Brock Biología de los microorganismos". Ed. Prentice Holl. Octava Edición.
- ✓ **Maier R.; Piper, I.; Gerba Ch. 2000.** "Environmental Microbiology". Ed. Academic Press. NY USA. Pp. 585.
- ✓ **MAPFRE. 1994.** "Manual de Contaminación Ambiental" MAPFRE SA. Edit., ITEMAT., Madrid, España.
- ✓ **Maskew, G.; Geyer, J. Y.; Okun, D.1992.** " Ingeniería Sanitaria y Aguas Residuales. Edit. Limusa, Grupo Noriega, Vol. 3.

Anexos

- ✓ **Mill, S.; Alabaster, G.; Mara, D. 1992.** "Efficiency of fecal bacterial removal in waste stabilization ponds in Kenya". Was. Sci. Technol. 26, 1739-1748.
- ✓ **Montuelle, B.; Latour, X.; Volat, B.; Gounot, A. M. 1994.** "Toxicity of Hecry metals to Bacteria in sediments. Biell. Environ. Contam. Toxicol. 53 pp. 753-758.
- ✓ **Mora, D.; Cano, F. (Editores). 1997.** "XI Congreso Centroamericano y V Nacional de Microbiología y III Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala". Memorias de Labores. Ciudad de Guatemala.
- ✓ **Norma Cubana 27:1999.** "Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y de alcantarillado". Especificaciones
- ✓ **Norma Cubana 93-01-105-1987.** "Especificaciones y procedimientos para la evaluación de los objetos hídricos de uso pesquero".
- ✓ **Norma ISO 5667-1.** "Calidad del agua muestreo". Parte 1.
- ✓ **Norma ISO 5667-10.** "Calidad del agua muestreo". Parte 10.
- ✓ **Norma ISO 5667-3.** "Calidad del agua muestreo". Parte 3.
- ✓ **Norma ISO 5667-9.** "Calidad del agua muestreo". Parte 9.
- ✓ **Percival, J.; Knapp, S. 1999.** "Biofilm Development on stainless steel in main water". En Wat. Res. No. 1, pp. 243-253.
- ✓ **Pérez, N.; Marañón, A. 1999.** "Evaluación de la calidad de las aguas del río Los Guaos de la provincia de Santiago de Cuba. Vol. XI No. 1.
- ✓ **Poulton, S. W.; Krom, M. D.; Van Rijn, J.; Raiswell, R. 2002.** "The use of hydrous iron (III) oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems". Water Research 36.pp. 825-834.
- ✓ **Pritchard, P.H.; Araujo, R.; Clark, J.R.; Claxton, L.D.; Coffin, R.B.; Costa, C.F.; Glaser, J.A.; Haines, J.R.; Heggem, D.T.; Kremer, F.V.; Mc Cutcheon, S.C.; Rogers, J.E. and Venosa, A. D. 1990.** "Interim Report oil spill Bioremediation Project". Prepared by U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development. pp 224.
- ✓ **Ramalho, R. S. 1991.** "Aquatic Chemistry Concepts". Lewis Publ.
- ✓ **Ramos, I.; Ibarra, E.; Ruiz, D. 1998.** "Impacto ambiental por petróleos en la Bahía de Matanzas", Memorias V Congreso Internacional Iberoamericano Sobre Medio Ambiente, La Habana.
- ✓ **Rivas, G. 1967.** "Tratamiento de aguas residuales". Vol. III. Ed. Vargas. Venezuela, pp. 475.
- ✓ **Rodríguez, S. 2000.** "Influencia de la vinaza de destilería en la biodegradación de tiocianato". Tesis Master.

Anexos

- ✓ **Romero, J. A. 1995.** "Acuitratamiento por laguna de estabilización". Escuela Colombiana de Ingeniería. Ed. Cap. 1, 3 y 5.
- ✓ **Sand, W.; Gehrke, T.; Jozsa, P. G.; Schippers, A. 2001.** "(Bio) Chemistry of bacterial leaching-direct vs-indirect bioleaching". Hydrometallurgy 59. pp. 159-175.
- ✓ **Sanjurjo, F., S. 2001.** "La contaminación de los mares", Diplomado Economía y Medio Ambiente, Univ. de Oriente.
- ✓ **Shartris, S. 1990.** "Pollution and the Environmental Low Printwill Publishers. Jaipur.
- ✓ **Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. 1998.** "Principles of Instrumental Analysis". Quinta edición: saunders College Publishing.
- ✓ **Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. 2000.** Química Analítica. Ed. Mc Graw Hill Sexta Edición.
- ✓ **Solanas, A. M. 2002.** "Biodegradación y Biorremediación": "Aspectos Básicos y aplicación de la transformación microbiana de contaminantes orgánicos". Curso de Doctorado.
- ✓ **Stapleton, R. D.; Savage, D.; Saylor, G. S.; Stacey, G. 1998.** "Biodegradation of aromatic hydrocarbons, in extremely acidic environment". Appl. Env. Microb. 64. pp. 4180-4184.
- ✓ **UNESCO. 1999.** "Memoria del Programa de Extensión Educativa del Subcomité para la COI".
- ✓ **Venosa, A.; Suidan, M. 1996.** "Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay". Environ. Sci Technol. 30, 1764-1775.
- ✓ **Viera, M.; Curutchet, G.; Donati, E. 2003.** "A combined bacterial process for the reduction and immobilization of chromium". International Biodeterioration and Biodegradation 52. pp. 31-34.
- ✓ **Viñas M. 1999.** "Biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos". Memorias Maestrías en Biotecnología experimental Universidad de Barcelona.
- ✓ **Viñas, M.; Sabatí, J.; Grifoll, M.; Solanas, A. M. 2001.** "Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. Residuales. Año XI. pp 78-82.
- ✓ **Vogel, E.; Rivas, E. 1997.** "Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible". pp. 401-410.

Tabla 1. Características fundamentales de las aguas residuales.

Tipo de aguas residuales	Características
Urbanas	Alto contenido de materia orgánica y patógenos, Poca variación en su composición Variación horaria Grandes volúmenes
Industriales	Grandes volúmenes Gran variación en la composición Descargas continuas o periódicas
Agrícolas	Volúmenes en dependencia de las precipitaciones y permeabilidad del suelo

Tabla 2 Resultados de los análisis realizados en la Estación 1 (Separador API)

Muestreo	pH (U)	T (°C)	λ (mS/cm)	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	AG (mg/L)	S ²⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	ST (mg/L)	STF (mg/L)	STD (mg/L)	STS (mg/L)
1	7.80	35	3.88	285	142	13.90	1.41	2.40	8.12	1902	755	1725	177
2	7.51	33	2.51	234	153	12.30	0.19	0.99	7.87	1462	1107	1373	110
3	7.20	37	3.99	985	408	11.20	1.57	0.65	8.70	2125	1127	1883	287
4	8.20	33	3.00	261	130	19.30	3.80	28.90	7.19	2433	1717	1450	335

Tabla 3 Resultados de los análisis realizados en la Estación 2 (Laguna)

Muestreo	pH (U)	T (°C)	λ (mS/cm)	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	AG (mg/L)	S ²⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	ST (mg/L)	STF (mg/L)	STD (mg/L)	STS (mg/L)
1	8.21	34	3.88	214	106	14.90	11.00	6.36	14.40	2499	1868	2150	349
2	7.20	38	4.45	239	118	13.20	27.50	1.02	13.00	2606	2064	2361	226
3	6.87	35	4.98	1004	408	10.20	42.50	0.83	14.70	2999	1892	2767	581
4	7.10	33	4.75	347	173	20.50	33.70	13.30	3.78	3227	2077	2473	753

Tabla 4. Características de las aguas del sistema de lagunas de estabilización en 1960.

pH	DQO (mg/L)	AG (mg/L)	O _D (mg/L)	S ²⁻ (mg/L)
7.50	57	0.17	9	0.16

Tabla 5. Resultados de los análisis realizados en la Estación 3 (Bahía)

Muestreo	pH (U)	T (°C)	λ (mS/cm)	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	AG (mg/L)	S ²⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	ST (mg/L)	STF (mg/L)	STD (mg/L)	STS (mg/L)
1	7.69	30	35.85	323	658	5.20	1.41	nd	nd	38074	32835	34510	5036
2	7.89	31	37.20	1340	669	5.50	5.60	0.24	nd	40911	34214	36096	842
3	7.16	35	35.85	39.90	19	6.00	1.65	0.11	nd	38590	28286	35734	4192
4	7.89	33	36.20	781	388	4.10	2.72	3.50	1.98	39059	32694	35144	3915

nd: no detectable

Tabla 7 Concentración promedio de las especies metálicas en las diferentes estaciones de muestreo.

Estación	Cd (mg/L)	Co (mg/L)	Ni (mg/L)	Fe (mg/L)	Zn (mg/L)	Ag (mg/L)	Cu (mg/L)
1	0,013	0,001	0,018	0,268	0,108	0,050	0,015
2	0,023	0,004	0,017	0,168	0,260	0,026	0,042
3	0,007	0,005	0,009	nd	0,125	0,036	0,024

Tabla 8. Resultado de la bioestimulación de la población microbiana de la laguna de estabilización a los 5 días de tratamiento.

Parámetros	Control	Muestra	% Remoción	Carga Kg/día	
				Antes	Después
DQO (mg/L)	298	123	59	1072	441
A G (mg/L)	13.84	0.19	99	49.84	0.70
NO ₃ ⁻ (mg/L)	63.8*	17.7	72	230	64
NH ₄ ⁺ (mg/L)	28.3*	3.41	88	102	12
SS (mg/L)	157	27.0	83	565	97
λ (ms)	2.19	2.22	nd	nd	nd
ST (mg/L)	1565	1588	nd	nd	nd
STD (mg/L)	1408	1561	nd	nd	nd
pH (U)	7.4	8.8	nd	nd	nd
Población microbiana (UFC/mL)	3.10 ⁴	3.10 ⁷	nd	nd	nd

Leyenda: n= 3, nd = no determinado,

*Valor real de la muestra + aporte del medio nitrogenado al contenido de iones nitrato y amonio

Tabla 6.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de las medias	F	Valor de la probabilidad (P)
Entre grupos	74158.2	2	37079.1	0.19	0.8295
Fuera de grupos	1.74861E6	9	194290.0		

95% de confianza

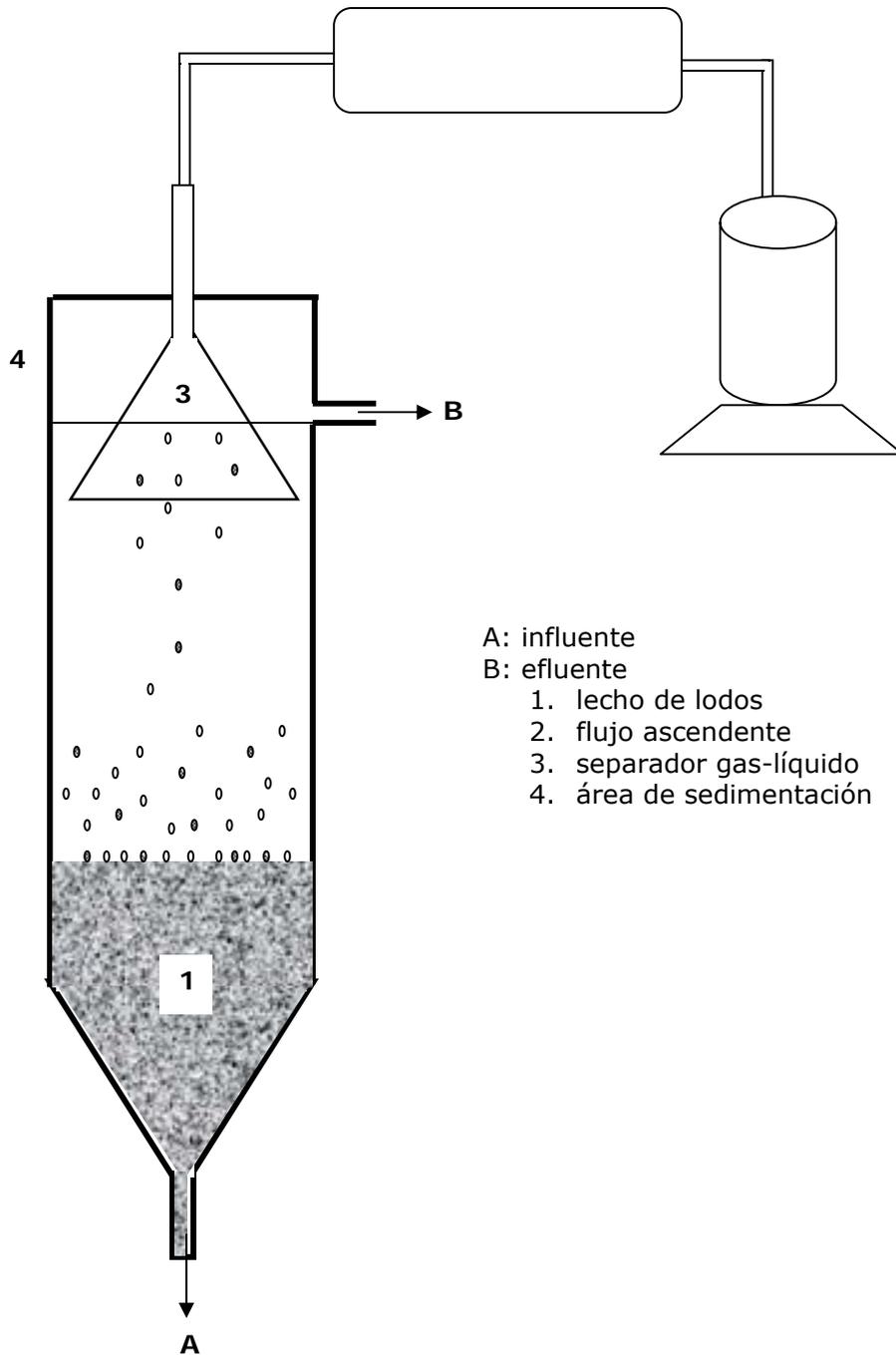


Figura 1 Representación esquemática del reactor UASB

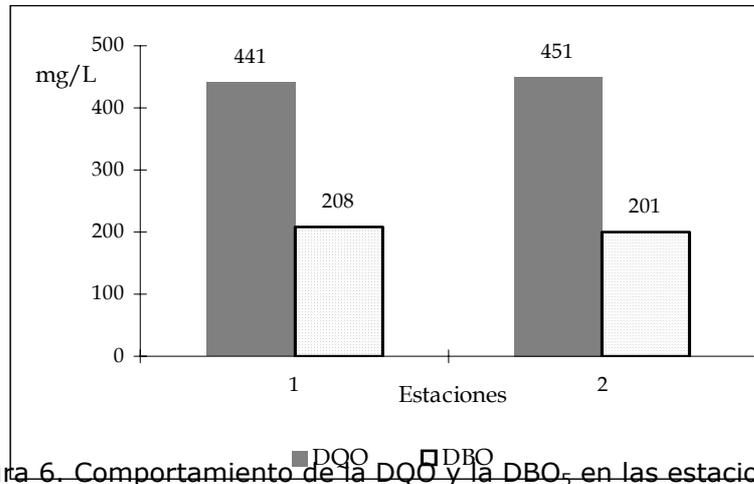


Figura 6. Comportamiento de la DQO y la DBO₅ en las estaciones 1 y 2

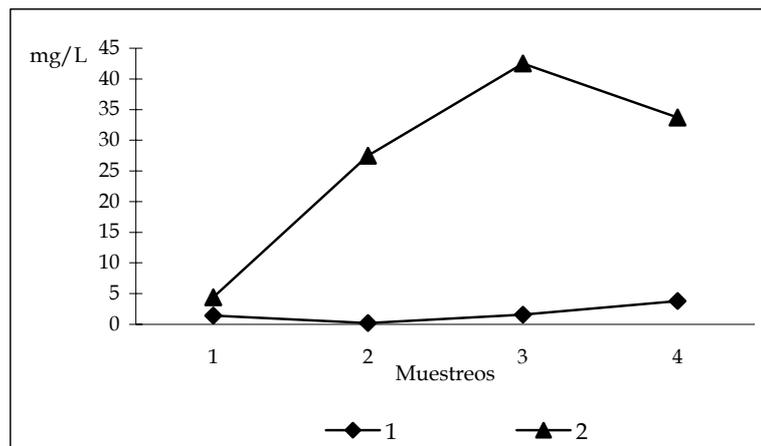


Figura 7. Comportamiento de los sulfuros en las estaciones 1 y 2.

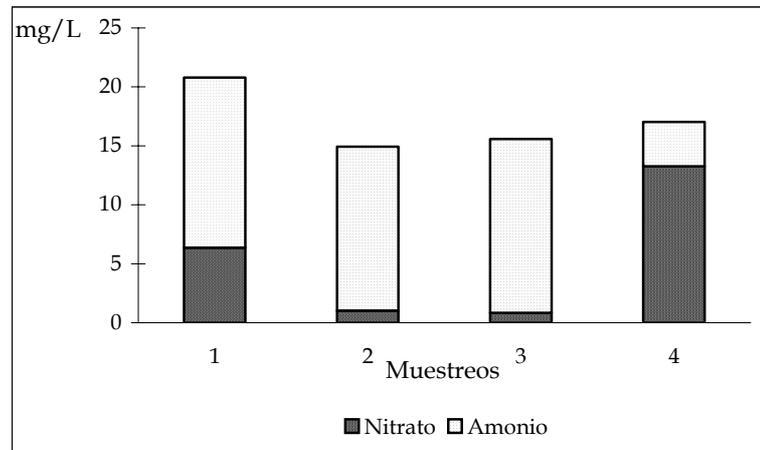


Figura 8. Comportamiento de los iones nitrato y amonio en la estación 2.

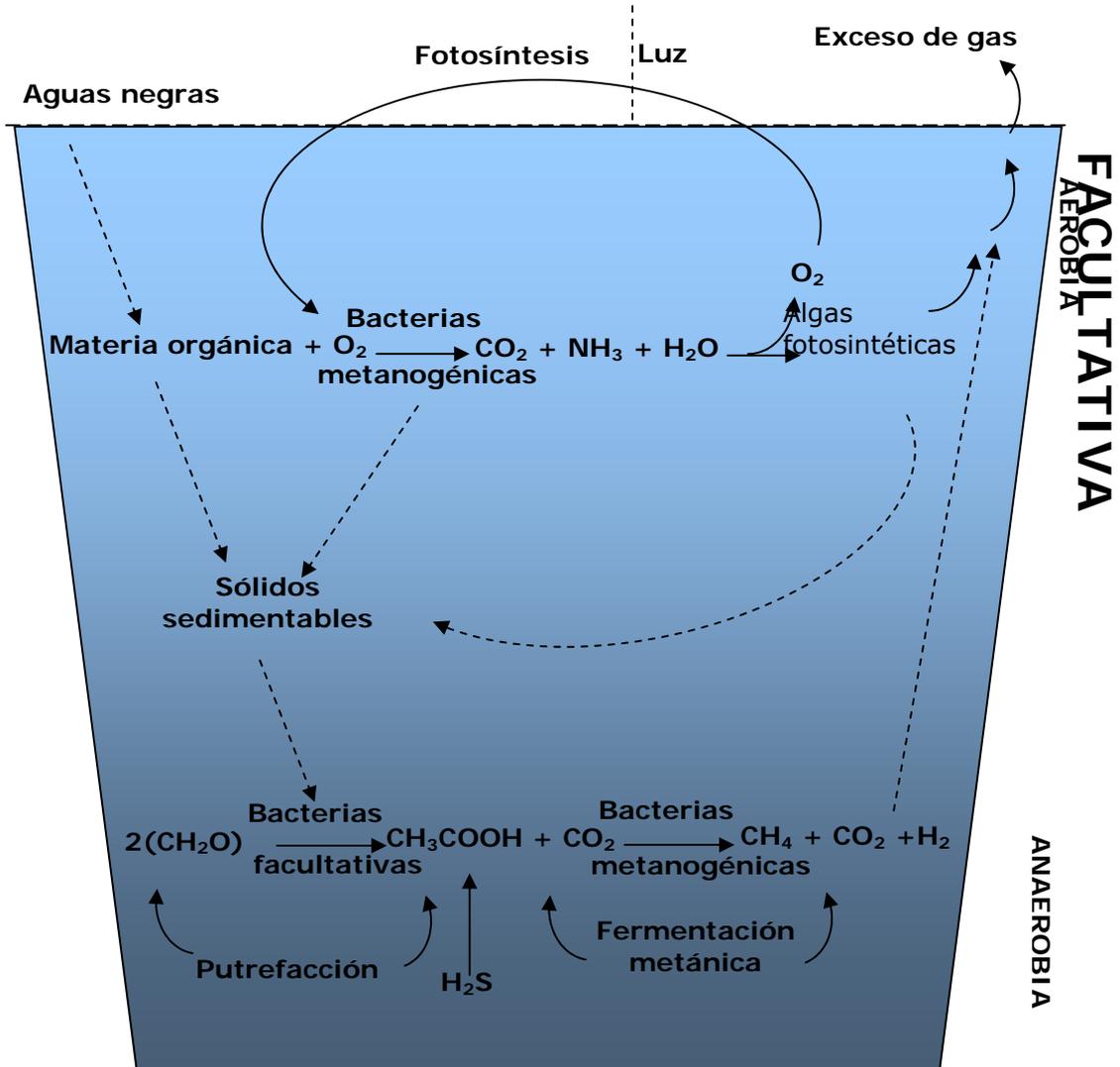


Figura 4 Laguna de estabilización facultativa

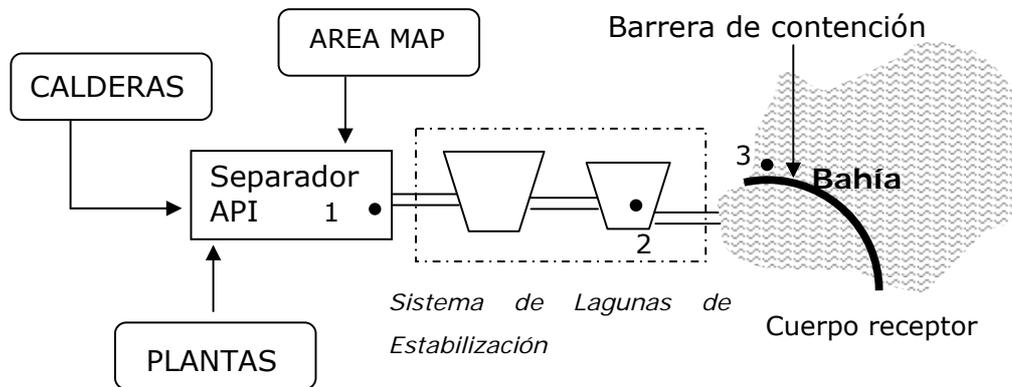


Figura 5. Sistema de depuración de aguas residuales en la Refinería "Hermanos Díaz". Señaladas las tres estaciones de muestreo (•)

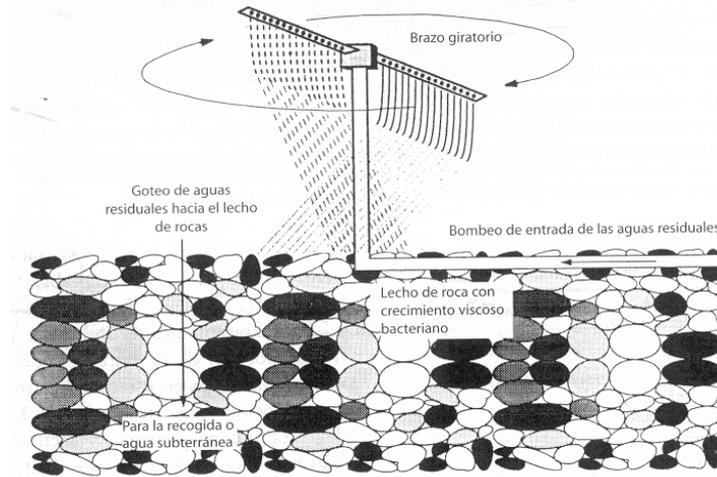


Figura 3. Representación esquemática de un filtro biológico

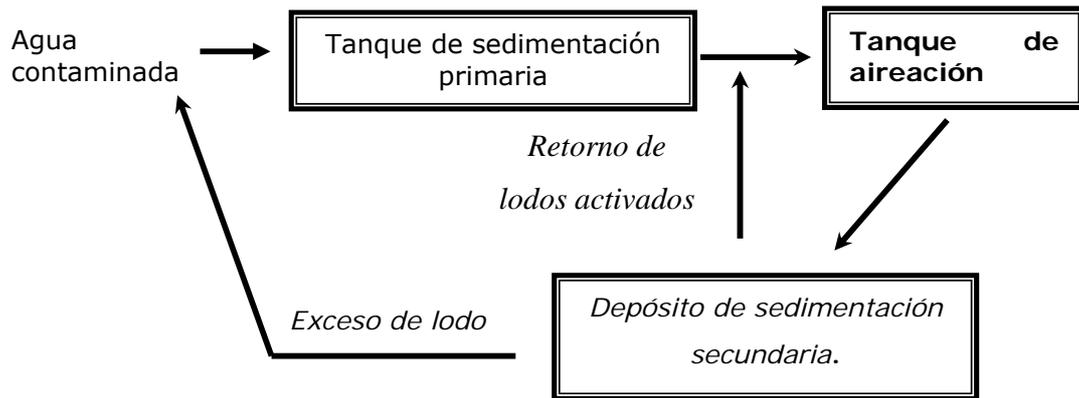


Figura 2. Esquema de tratamiento por lodos activados