

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



**“Evaluación comparativa de la remoción del diésel contenido en suelo contaminado empleando biodegradación natural, bioestimulación con lactosuero y activador enzimático comercial.”**

**Trabajo de diploma presentado por:**

Br. Bianka Rosa Reyes Altamirano  
Br. Jesbelly Yislenn Sánchez Aldana

Para Optar al Título de:  
**Ingeniero Químico.**

**Tutor:** Javier Enrique Ramírez Meza

**Asesores:**

PhD. Katia Montenegro  
M.Sc. María Elena López

Managua, Nicaragua 2019

## **Agradecimiento**

A Nuestro Buen Padre Dios, por darnos la fuerza para trabajar el doble y así poder culminar este trabajo.

A nuestras familias, en especial a nuestros padres, por el apoyo incondicional que nos brindaron para el cumplimiento de esta gran meta.

A la Empresa EPC por permitirnos realizar el trabajo en sus instalaciones, por brindarnos las herramientas y asesoría necesaria, por confiar en nosotras y brindarnos el apoyo requerido para efectuarlo.

A nuestro tutor Javier Ramírez Meza por el apoyo, colaboración y perseverancia con nosotras en la realización de este trabajo.

A nuestras asesoras PhD. Katia Montenegro y M.Sc. María Elena López por el impulso inicial que dio luz a este estudio.

Al personal de EPC y el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua quienes estuvieron dispuestos a colaborar y brindarnos toda la información necesaria.

Y a todos los que de alguna manera aportaron en la realización de este trabajo, a los que nos ayudaron en la revisión y nos regalaron su tiempo para que lográramos tener un trabajo de mejor calidad.

## **Dedicatoria**

A Dios y nuestra madre Santísima por permitirme llegar donde estoy, por iluminar mi camino, por llenarme de fortaleza, paciencia y sabiduría para guiarme hacia esta gran meta.

A mi madre y a mi padre por su apoyo incondicional, por creer en mí y siempre tener una voz de aliento en los momentos difíciles, por inculcarme valores que hacen de mí la persona que soy. A mi hermano menor Emanuel Reyes.

A todos mis allegados, por sus consejos, el apoyo que me han brindado, las infinitas palabras de aliento, que me han ayudado y por los bellos momentos compartidos. A los profesores desde los que confiaron en mí hasta los que no pensaron que culminaría esta meta porque de no ser por ustedes no habríamos llegado tan lejos.

*Bianka Rosa Reyes Altamirano*

En primer lugar dedico este trabajo a Dios quien me ha bendecido, protegido y ayudado desde que inicie mis estudios hasta la culminación de esta carrera profesional.

A mi mamá Alma Lucía Aldana, a mi padre José Luis Sánchez quienes con mucho esfuerzo y sacrificio me han apoyado en cada etapa de mi vida, quienes han luchado junto a mí para poder llegar a esta meta y por haberme educado de la manera que lo hicieron.

A Judy y Randy Watkins por haberme ayudado a lograr esta meta y su apoyo incondicional durante todo este camino.

A cada persona que cuando pedí su ayuda no me la negaron y por el contrario estuvieron siempre animándome y dándome aliento cuando pensaba que jamás podría llegar a realizar este sueño hoy hecho realidad.

*Jesbelly Yislenn Sánchez Aldana*

## Resumen

En la presente evaluación comparativa de tres distintas tecnologías de biorremediación de suelos contaminados con diésel con el propósito de determinar la eficiencia de dichas tecnologías en función de la remoción del contaminante y calidad de suelo tratado.

Para efectos del estudio, se emplearon las técnicas de bioestimulación por agregación de lacto suero (BLS), bioestimulación por agregación de un activador enzimático comercial (BDAE) y biodegradación natural (BDN).

El suelo contaminado presentaba una concentración inicial de 2400 mg/kg de HTP-ROD, valor que excede el límite máximo permisible para suelo de uso agrícola y domiciliar según la normativa NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Así mismo se dio un seguimiento a distintos parámetros físicos (textura, humedad, temperatura) químicos (HTP-ROD, Materia Orgánica, pH en extracto acuoso, pH de campo) y biológicos (actividad enzimática deshidrogenasa, conteo de organismos en placa) durante un periodo de diez semanas.

Los parámetros químicos analizados en el suelo contaminado (pH alcalino, concentración de TPH-ROD, pH en extracto acuoso alcalino) exhibieron características de suelo afectado por hidrocarburos. Así mismo, las características físicas (densidad media-baja, temperatura y humedad) y las biológicas (conteo de microorganismos y actividad enzimática deshidrogenasa) presentaron un medio apto para la implementación de tratamientos biológicos.

Los resultados obtenidos indican que en un periodo de cinco semanas se obtiene una remoción de diésel en el suelo superior al 80% empleando las tres técnicas, mientras en un periodo de diez semanas se obtuvo una remoción superior al 95%, por lo cual la eficiencia de remoción obtenida con las tres técnicas es eficiente. Obteniéndose en el suelo tratado con BDAE y BLS un suelo apto para usos de cultivo, mientras que el suelo tratado con BDN presentó características de un suelo apto para uso como material de relleno en construcción.

## Tabla de Contenido

Agradecimiento.....	i
Dedicatoria .....	ii
Resumen .....	iii
Tabla de Contenido .....	iv
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
2.1 -Objetivo general.....	3
2.2-Objetivo específico .....	3
III. Marco Teórico.....	4
3.1 El suelo .....	4
3.1.1 Composición del suelo. ....	4
3.1.2 Calidad del suelo .....	5
3.1.3 Tipos de suelos .....	6
3.1.4 Propiedades físicas del suelo.....	7
3.1.5 Propiedades químicas del suelo.....	10
3.1.6 Propiedades biológicas del suelo .....	11
3.2 Diésel como contaminante.....	12
3.2.1 Propiedades medias del diésel comercial .....	13
3.2.2. Fuentes de contaminación por hidrocarburos .....	13
3.2.3. Consumo de diésel en Nicaragua.....	13
3.2.4 Movilización del diésel como contaminante en una matriz de suelo ..	14
3.2.5 Ecotoxicidad .....	16
3.2.6. Normativa Nacional sobre protección de suelos en casos de derrames de hidrocarburos .....	17
3.2.7 Remediación de suelos contaminado con diésel.....	18
3.3 Biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos .....	20
3.3.1 Tipos de biorremediación .....	21
3.3.2 Fundamento bioquímico de la biodegradación .....	25
3.3.3 Etapas de tratamiento biológico. ....	27
3.3.4 Interferencias en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en suelo.....	29
3.3.5 Eficiencia del proceso de remediación del suelo contaminado por hidrocarburos. ....	30

IV. Metodología .....	31
4.1 Descripción de la evaluación .....	31
4.2 Alcances y limitaciones del estudio.....	31
4.3 Caracterización de propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado .....	32
4.3.1 Selección del suelo contaminado .....	32
4.3.2 Montaje del experimento .....	33
4.3.2 Muestreo del suelo contaminado.....	35
4.4 Determinación del comportamiento de los parámetros físicos, químicos y biológicos durante el tratamiento del suelo .....	37
4.4.1 Determinación de dosificaciones de lactosuero y activador enzimático .....	37
4.4.2 Dosificación y volúmenes acuosos aplicados .....	39
4.4.3 Obtención del lactosuero como sustrato .....	40
4.4.4 Activación de la enzima comercial.....	41
4.4.5 Evaluación de parámetros de interés durante el experimento.....	41
4.5 Determinación de la eficiencia de remoción del diésel en matriz suelo ....	45
4.6 Evaluación de resultados respecto a la normativa de uso. ....	45
V. Análisis y discusión de resultados.....	47
5.1. Características físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado...	47
5.1.1 Parámetros físicos iniciales .....	47
5.1.2 Parámetros químicos iniciales .....	48
5.1.3 Parámetros biológicos iniciales .....	48
5.2 Comportamiento de los parámetros físicos en el suelo durante el tratamiento .....	49
5.2.1 Temperatura del suelo durante el tratamiento.....	49
5.2.2 Humedad del suelo durante el tratamiento.....	50
5.3 Comportamiento de los parámetros químicos en el suelo durante los tratamientos .....	51
5.3.1 Comportamiento de materia orgánica .....	51
5.3.2 Comportamiento del pH en extracto acuoso y en suelo .....	55
5.5 Resultados parámetros biológicos durante el tratamiento.....	59
5.2.6 Conteo de Organismos heterotróficos .....	59
5.2.7 Actividad enzimática deshidrogenasa .....	60

5.6	Remoción del diésel en matriz suelo .....	61
5.6.1	Remoción de diésel .....	61
5.6.2	Porcentaje de remoción de diésel en el suelo tratado. ....	62
VI.	Conclusiones .....	65
VII.	Recomendaciones .....	66
	Nomenclatura .....	67
	Bibliografía.....	69
	Apéndices.....	74
	Anexos .....	81

## **Apéndice A: Graficas**

Figura A.1: Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BDAE

Figura A.2: Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BLS

Figura A.3: Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BDN

Figura A.4 Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BDAE

Figura A.5: Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BLS

Figura A.6: Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BDN

## **Apéndice B: Tablas**

Tabla B.1: Valores de temperatura durante el tratamiento en las seis celdas.

Tabla B.2: Prueba post-Hoc de análisis de varianza entre tratamientos para la temperatura

Tabla B.3: Valores de humedad durante el tratamiento en las seis celdas.

Tabla B.4: Prueba post-Hoc de análisis de varianza entre tratamientos para la humedad

Tabla B.5: Valores de Materia orgánica durante el tratamiento

## **Apéndice C**

C.1 Cálculos Límites

C.2 Calculo dosis y volúmenes para BDAE y BLS

## **Anexo A: Tablas**

Tabla A.1: Valores banco central consumo nacional de Diésel

Tabla A.2: Concentraciones máximo permisible normativa SEMARNAT

Tabla A.3: Clasificación de suelo en función del pH según normativa RECNAT

Tabla A.4: Clasificación del suelo en función de la materia orgánica según normativa RECNAT

## **Anexo B: Resultados de Laboratorio**

-B.1: Hidrocarburos totales de petróleo (HTP-ROD)

-B.2: Materia Orgánica

-B.3: pH en extracto acuoso

-B.4: Conteo de organismos heterotróficos en placa y actividad enzimática.

## Lista de tablas

Tabla 3.1	Indicadores físicos, químicos y biológicos de calidad del suelo	06
Tabla 3.2	Propiedades químicas del diésel comercial en américa latina.	13
Tabla 3.3	Procesos de transporte de compuestos orgánicos en suelos	15
Tabla 3.4	Cambios en algunas propiedades del suelo contaminado con diésel	16
Tabla 3.5	Límites máximos permisibles establecidos por la NOM-138-SEMARNAT	18
Tabla 3.6	Procesos que afectan la degradación del diésel en el suelo	19
Tabla 3.7	Factores que afectan el proceso de biorremediación	27
Tabla 4.1	Métodos de análisis realizados en la caracterización del suelo	34
Tabla 4.2	Características de los equipos para medición de parámetros de control	34
Tabla 4.3	Rangos permisibles para proceso de biorremediación	36
Tabla 4.4	Muestras tomadas para cada parámetro	39
Tabla 5.1	Parámetros físicos químicos y biológicos del suelo contaminado	44
Tabla 5.2	Dosis acuosos máximos y mínimos permisibles en el suelo a tratar	46
Tabla 5.3	Dosis y volumen aplicados por celda en los tratamientos BDAE y BLS	46
Tabla 5.4	Resumen valores estadísticos de la temperatura en los tres tratamientos.	48
Tabla 5.5	Resumen valores estadísticos en la humedad de los tratamientos	49

Tabla 5.6	Concentraciones de diésel (HTP-ROD) durante los muestreos inicial, seguimiento y final para los tres tratamientos de suelo	50
Tabla 5.7	Variación de materia orgánica en el suelo antes y después del tratamiento.	55
Tabla 5.8	Resultados de pH en extracto acuoso del suelo contaminado	56
Tabla 5.9	Resultados del conteo de organismo heterotróficos en suelo tratado	60
Tabla 5.10	Resultados de la actividad enzimática en el suelo.	60
Tabla 5.11	Evaluación cualitativa del porcentaje de remoción en la 5ta semana de tratamiento.	61
Tabla 5.12	Evaluación cualitativa del porcentaje de remoción al finalizar el tratamiento.	62

## Lista de figuras

Figura 3.1	Triángulo de las clases texturales del suelo	08
Figura 3.2	Consumo nacional anual de diésel en miles de barriles durante el periodo 2010-2016	14
Figura 3.3	Equilibrio multi fase en el suelo	15
Figura 3.4	Esquema básico de las etapas de tratamiento de suelos	20
Figura 3.5	Tipos de biorremediación de suelos afectados con hidrocarburo.	22
Figura 3.6	Principales tecnologías de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Rose, 2000)	23
Figura 3.7	Etapas del tratamiento biológico de suelos contaminados.	28
Figura 4.1	Selección de lote de suelo y homogenización mecánica del lote de suelo	32
Figura 4.2	Isométrico de celda piloto utilizada durante el experimento	33
Figura 4.3	Llenado de celdas con suelo contaminado	33
Figura 4.4	Representación de muestreo por cuarteo en las celdas piloto	35
Figura 4.5	Distribución de grupos de tratamiento en celdas para experimento	40
Figura 5.1	Gráfico de control de la temperatura durante el tratamiento	47
Figura 5.2	Gráfico de control de la temperatura durante el tratamiento	48
Figura 5.3	Variación del contenido de materia orgánica de celdas tratadas con BDAE	51
Figura 5.4	Variación del contenido de materia orgánica de celdas tratadas con BLS	52
Figura 5.5	Variación del contenido de materia orgánica respecto al tiempo en celdas tratadas con BDN	54
Figura 5.6	Variación del pH durante el tratamiento BDAE	57
Figura 5.7	Variación del pH durante el tratamiento BLS	58

Figura 5.8 Comportamiento del pH durante las diez semanas de tratamiento BDN

59

## I. Introducción

Entre los hidrocarburos de mayor demanda en Nicaragua se encuentra el diésel, el cual es una mezcla compleja de alcanos y compuestos aromáticos (Alcolea, 1952), los cuales en contacto directo con el suelo causan diferentes repercusiones ambientales tales como la degradación de la vegetación superficial, inhibición de las funciones de los organismos heterotróficos autóctonos, interrupción de los procesos de biodegradación; por mencionar algunos (Manahan, 2007). Dada su ecotoxicidad y alta demanda, hace necesaria la implementación de distintos tipos de regulaciones y tecnologías especializadas en la protección de este recurso.

Nicaragua como un país petro-dependiente es propicio a accidentes durante el transporte, manejo y uso de hidrocarburos, tal como derrames en vuelcos de cisterna siendo algunos ejemplos de estos el derrame de 8 mil litros de combustible en carretera norte el área de la garita norte el 10 de agosto del 2015; vuelco de cisterna y derrame de 2400 galones en el kilómetro 147 de la carretera entre Matagalpa y El Tuma-La Dalia (Martínez, 2017), por mencionar algunos incidentes ocurridos recientemente.

A nivel nacional los dos tratamientos más empleados para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos son la oxidación química y la biorremediación, de los cuales esta última consiste en la implementación de organismos degradadores del contaminante en el medio (Arellano, 2009), ya sea empleando la bioaumentación, bioestimulación o creación de un medio apto para la degradación del contaminante. La implementación de estas técnicas de remediación requiere sustratos importados del extranjero lo cual resulta en un aumento en los costos de tratamiento.

El lacto suero ha sido evaluado como posible técnica bioestimulante en distintas pruebas y ensayos teóricos, así mismo como agente bioestimulador de bacterias degradadoras de hidrocarburo (Haller, 2015). Por lo cual el lacto suero presenta a escala de laboratorio atributos para sustituir los cócteles y medios bacterianos importados para procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el rango orgánico del diésel (HTP-ROD).

A nivel internacional se ha realizado distintos estudios sobre el uso de diferentes sustratos para la degradación hidrocarburos en la matriz suelo, así como de las rutas metabólicas de degradación de distintos hidrocarburos. Entre los cuales resalta el estudio realizado por Osteberg T., 2007, sobre la degradación mejorada del n-hexadecano en suelo contaminado con combustible diésel, el cual determinó que la actividad microbiana se ve estimulada por la presencia de lacto suero obteniendo que en suelo areno arcilloso la cinética de la biodegradación es de orden cero y estableciendo que la adición de 60 a 6000  $\mu$ l de lacto suero por kg de suelo brindaron el mayor grado de biodegradación.

En Nicaragua la planta de tratamiento ex-situ de suelos contaminados San Benito de la empresa Environmental Protection & Control (EPC), emplea para la remediación de suelos con hidrocarburos la técnica de bioestimulación y bioaumentación mediante el uso de un activador enzimático importado (BDAE), de manera que le ha permitido el tratamiento efectivo de más de quince mil metros cúbicos de suelo contaminado por hidrocarburos derivados del petróleo en el rango orgánico de la gasolina y diésel (GRO y DRO) durante el periodo comprendido entre 2006 y 2009 (Arellano F., 2009)

De acuerdo a (Haller, 2015); la implementación de técnicas de bajo costo en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, usando recursos nacionales y accesibles permitiría disminuir los costos de tratamiento, así como el reaprovechamiento de un subproducto de la industria láctea. La disminución de los costos de tratamiento permitiría un aumento en la accesibilidad al tratamiento de suelos contaminados proveyendo una solución alternativa al pasivo ambiental generado por la presencia de hidrocarburos en el suelo.

En el presente trabajo realizó una evaluación comparativa del porcentaje de remoción del diésel en suelo contaminado proveniente de un caso real de derrame, en el cual se emplearon tres métodos diferentes: la bioestimulación empleando lactosuero (BLS), bioestimulación con activador enzimático comercial (BDAE) y la biorremediación natural (BDN). Así mismo evaluó las variaciones en los parámetros físicos (temperatura, humedad) químicos (HTP-ROD, materia orgánica, pH ) y biológicos (conteo heterotróficos en placa, actividad enzimática deshidrogenasas) en el suelo tratado.

La prueba se realizó a escala piloto en celdas de tratamiento ubicadas en la Planta de tratamiento de suelos contaminados San Benito , con muestreos semanales sobre distintos parámetros de control (pH, temperatura , humedad); y un seguimiento periódico a distintos parámetros de interés (HTP-ROD, materia orgánica, conteo de organismo heterotróficos, actividad enzimática deshidrogenasa) con el fin de tener un monitoreo sobre el comportamiento que describen los distintos tratamiento a nivel piloto.

El seguimiento a los parámetros físicos , químicos y biológicos realizados durante el experimento , permitieron identificar los cambios que se presentan en el suelo durante el proceso de bioremediación. Estas variaciones así mismo son de gran importancia para futuras referencias en el tratamiento biológico de suelo contaminado con hidrocarburos, y evaluar posibles alternativas para la optimización de este y otros tratamientos de suelo

## **II. Objetivos**

### **2.1 -Objetivo general**

Evaluar la remoción de diésel contenido en una matriz de suelo contaminado empleando las tecnologías de: biodegradación natural (BDN), bioestimulación con lacto suero (BLS), y bioestimulación con un activador enzimático comercial (BDAE) a escala piloto.

### **2.2-Objetivo específico**

Caracterizar las propiedades físicas (textura, temperatura, humedad), químicas (pH, HTP-ROD, Materia Orgánica) y biológicas (actividad enzimática, conteo de organismos heterotróficos) del suelo contaminado.

Determinar el comportamiento de los parámetros físicos (temperatura, humedad), químicos (pH, HTP-ROD, Materia Orgánica) y biológicos (actividad enzimática deshidrogenasa, conteo de organismos heterotróficos) durante el proceso de degradación del diésel en la matriz suelo.

Determinar la eficiencia de degradación del diésel (HTP-ROD) en la matriz suelo, tratados con; degradación natural (BDN), degradación por bioestimulación con lacto suero (BLS), y degradación por bioestimulación con un activador enzimático comercial (BDAE).

Comparar las concentración de diésel (HTP-ROD) en el suelo tratado con: degradación natural (BDN), degradación por bioestimulación con lacto suero (BLS), y degradación por bioestimulación con un activador enzimático comercial (BDAE) ; con el límite máximo establecido por la normativa adoptada NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

### **III. Marco Teórico**

En el presente acápite se abordan los conceptos, ecuaciones, estudios, publicaciones previas realizados con el fin de mejorar la comprensión de los medios y factores que se pueden llegar a presentar en el estudio.

#### **3.1 El suelo**

El suelo es la cubierta superficial de la mayoría de la superficie continental de la Tierra. Es un agregado de minerales no consolidados y de partículas orgánicas producidas por la acción combinada del viento, el agua y los procesos de desintegración orgánica. Debido a esto los suelos y sus características varían respecto al lugar. (Boul & Cracken, 1973).

##### **3.1.1 Composición del suelo.**

La composición química y la estructura física del suelo están determinados por el material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, por la cantidad de tiempo en que ha actuado la meteorización, por la topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades antropogénicas del área. Según (Fulgencio R, 2012) las variaciones del suelo en la naturaleza son graduales, excepto las que son derivadas de desastres naturales.

La naturaleza física del suelo está determinada por la proporción de partículas de varios tamaños. Las grandes partículas del suelo como la arena y la grava son en su mayor parte químicamente inactivas; pero las pequeñas partículas inorgánicas, componentes principales de las arcillas finas, sirven también como depósitos en las raíces de las plantas que extraen nutrientes (Ganem, 2010).

El tamaño y la naturaleza de estas partículas inorgánicas diminutas determinan en gran medida la capacidad de un suelo para almacenar agua, compuesto vital para todos los procesos biológicos. Los componentes primarios del suelo según (Ganem A, 2010) son:

- Compuestos inorgánicos, no disueltos, producidos por la materialización y la descomposición de las rocas superficiales.
- Los nutrientes solubles utilizados por las plantas.
- Distintos tipos de materia orgánica viva o muerta.
- Gases y agua requeridos por las plantas y por los organismos subterráneos.

Los principales gases contenidos en el suelo son oxígeno, el nitrógeno y el dióxido de carbono, El primero de estos gases es de vital importancia para el metabolismo de las plantas dado que su presencia es necesaria para el crecimiento de varias

bacterias y de otros organismos responsables de la descomposición de la materia orgánica.

### **3.1.2 Calidad del suelo**

(Ochoa V., 2007) Afirma que la calidad y la salud del suelo son conceptos equivalentes, no siempre considerados sinónimos. La calidad debe interpretarse como la utilidad del suelo para un propósito específico en una escala amplia de tiempo. El estado de las propiedades dinámicas del suelo como contenido de materia orgánica, diversidad de organismo o productos microbianos en un tiempo particular constituye la salud del suelo

La calidad del suelo ha sido percibida de muchas formas (Bautista A., 2014), este concepto ha sido relacionado con la capacidad del suelo para funcionar. Incluye atributos como fertilidad, productividad potencial, sustentabilidad y calidad ambiental. Simultáneamente, calidad del suelo es un instrumento que sirve para comprender la utilidad y salud de este recurso.

Según (Ochoa V., 2007) el término calidad de suelo se empezó a acotar al reconocer las funciones del suelo:

- Promover la productividad del ecosistema sin perder propiedades físicas, químicas y biológicas.
- Atenuar la salud de plantas, animales y humanos.
- Favorecer la salud de plantas, animales y humanos.

Para hacer operativo este concepto, es preciso contar con variables que puedan servir para evaluar la condición del suelo. Estas variables se conocen como indicadores, pues representan una condición y con llevan información acerca de los cambios o tendencias de esa condición. Según (Bautista A., 2004) los indicadores son instrumentos de análisis que permiten simplificar, cuantificar y comunicar fenómenos complejos. Tales indicadores se aplican en muchos campos del conocimiento (economía, salud, recursos naturales, etc.)

Los indicadores de calidad del suelo pueden ser propiedades físicas, químicas y biológicas, o procesos que ocurren en él. Para que las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo sean consideradas indicadores de calidad deben cubrir las siguientes condiciones (Doran J.W., 1994): a) describir los procesos del ecosistema; b) integrar propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; c) reflejar los atributos de sostenibilidad que se quieren medir; d) ser sensitivas a variaciones de clima y manejo; e) ser accesibles a muchos usuarios y aplicables a condiciones de campo; f) ser reproducibles; g) ser fáciles de entender; h) ser sensitivas a los cambios en el suelo que ocurren como resultado de la degradación antropogénica; i) y, cuando sea posible, ser componentes de una base de datos del suelo ya existente.

Existen muchos parámetros normalizados empleados para determinar la calidad del suelo, algunos de estos se encuentran en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Indicadores físicos, químicos y biológicos de calidad del suelo

<b>Propiedad</b>	<b>Parámetro</b>
Física	-Textura del suelo -Densidad aparente -Humedad -Temperatura
Química	-pH -Conductividad eléctrica -Carbono Orgánico Total
Biológica	-Carbono de biomasa microbiana -Actividades enzimáticas

### 3.1.3 Tipos de suelos

Los suelos se dividen en clases según sus características generales. La clasificación se suele basar en la morfología, el clima, el uso y la composición del suelo. La mayoría de los suelos tienen capas características, llamadas horizontes; la naturaleza, el número, el grosor y la disposición de estas también es importante en la identificación y clasificación de los suelos (Garay S., 2017).

Los suelos muestran gran variedad de aspectos, fertilidad y características químicas en función de los materiales minerales y orgánicos que lo forman. El color es uno de los criterios más simples para identificar la variedad de suelo. La regla general, aunque con excepciones, es que suelos oscuros son más fértiles que los claros, esto como resultado de la presencia de grandes cantidades de humus en los suelos oscuros (Leth E., 2017). Los suelos rojos o castaño-rojizos suelen contener una gran proporción de óxidos de hierro (derivado de las rocas primigenias) que no han sido sometidos a humedad excesiva. Los suelos grisáceos por otra parte pueden tener deficiencias de hierro u oxígeno, o un acceso de sales alcalinas como el carbonato de calcio.

Otra de las formas de clasificar el suelo es por su textura la cual viene a ser dada en su mayoría por el tamaño de las partículas. Las partículas de arena tienen un diámetro entre 2 y 0.05mm, las de limo entre 0.05 y 0.002 mm y las de arcilla son menores de 0.002 mm. En general las partículas de arena pueden verse con facilidad y son rugosas al tacto (Jaramillo D., 2002). En función de las proporciones de arena, limo y arcilla, la textura de los suelos se clasifica en varios grupos, algunos de estos son: la arcilla arenosa, arcilla limosa, el limo arcilloso, limo arcilloso arenoso, el fango arcilloso, el fango, el limo arenoso y la arena limosa.

Los suelos zonales son otra forma de clasificación del suelo (Ortega L., 2010), en este caso representada por el tipo de clima presente en el área de origen de este. Basado en el clima se presenta los siguientes tipos de suelos: Podzoles (característico de la taiga), pardos (característico de zonas semi húmedas y mediterráneas), suelos áridos, suelos tropicales. También se presentan los suelos azonales que se ven muy influenciados por el sustrato sobre el que se asientan en esta clasificación se encuentran: ranker (suelo silíceo), rendzina (suelo sobre sustrato calizo) y suelos gley (suelo con descomposición anaerobia de humus). La clasificación más conocida y empleada según (Ortega, 2010), es la cual emplea el uso del suelo como parámetro distintivo entre estos. Los tipos de suelos según sus usos son: soporte vegetal (agrícola, ganadero, forestal, recreativo), urbano (edificación, infraestructura), recursos minerales (bauxita, materiales de construcción).

### **3.1.4 Propiedades físicas del suelo**

El suelo es una mezcla de materiales sólidos, líquidos (agua) y gaseosos (aire). La adecuada relación entre estos componentes determina la capacidad de hacer crecer las plantas y la disponibilidad de suficientes nutrientes para ellas (Bautista A., 2004). La proporción de los componentes determina una serie de propiedades que se conocen como propiedades físicas o mecánicas del suelo: textura, estructura, color, permeabilidad, porosidad, drenaje, consistencia, profundidad efectiva etc.

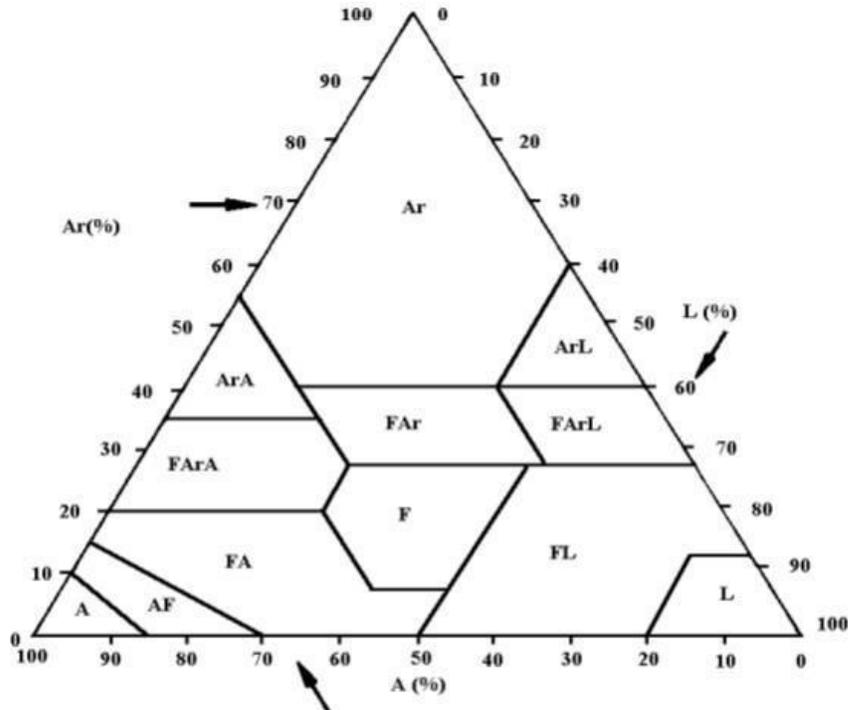
Las propiedades físicas que pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo son aquellas que reflejan la manera en que este recurso acepta, retiene y transmite agua y demás componentes a las plantas, así como las limitaciones que se pueden encontrar en el crecimiento de las raíces, la emergencia de las plántulas, la infiltración o el movimiento del agua dentro del perfil y que además estén relacionadas con el arreglo de las partículas y los poros (Bautista A., 2004).

#### **Textura**

La textura de un suelo es la proporción de los tamaños de los grupos de partículas que lo constituyen y está relacionada con el tamaño de las partículas de los minerales que lo forman y se refiere a la proporción relativa de los tamaños de varios grupos de partículas de un suelo. Esta propiedad ayuda a determinar la facilidad de abastecimiento de los nutrientes, agua y aire que son fundamentales para la vida de las plantas. Así mismo la textura permite evaluar la retención y transporte del agua y compuestos químicos en el suelo.

(Jaramillo D., 2002) Explica que la diferencia entre los suelos arcillosos y los suelos arenosos residen en los diversos tamaños de partículas individuales del suelo. En los suelos arcillosos predominan las partículas muy pequeñas, mientras en los suelos arenosos están compuestas casi en su totalidad de partículas más

grandes. Las texturas del suelo se basan en la división arbitraria del suelo en tres fracciones según su tamaño: arena, limo y arcilla. Si una de estas fracciones domina las propiedades de un suelo, su nombre se incorpora al de la textura del suelo. Los rangos de variación de las clases texturales están representados en el triángulo textural (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Triángulo de las clases texturales del suelo (Fuente: USDS, 1993).

La nomenclatura utilizada para nombrar las clases texturales ha sido establecida por (USDA, 1993). Para determinar la clase que le corresponde a un suelo dado, se ubican los porcentajes de arena, limo y arcilla en el respectivo eje del triángulo, se proyecta en él dicho valor, siguiendo la dirección indicada por la flecha, hasta que las tres líneas se interceptan determinando un punto; la clase en la cual queda comprendida dicha intersección es la clase textural del suelo analizado; así por ejemplo, a un suelo que presente 40% de arena, 30% de limo y 30% de arcilla, le corresponde la clase textural Franco arcillosa.

El término utilizado para definir una clase textural implica el separado dominante en la textura; así, en un suelo Arcillo limoso, el separado dominante es la arcilla, ya que es el separado que encabeza el nombre de la clase textural; el suelo Franco es aquel cuyos separados están en una proporción tal que ninguno de ellos domina las propiedades del suelo; desde el punto de vista de la planta, esta clase textural es la que presenta un mejor equilibrio entre sus separados.

## Densidad

La densidad de un material se define como el peso que tiene dicho material por unidad de volumen. Según (Jaramillo, 2002) en el suelo, por ser este un cuerpo poroso, se presentan dos situaciones diferentes con respecto a la densidad; si se considera la masa de las partículas sólidas únicamente se tiene la densidad real, pero si, aparte de la masa de las partículas se tiene en cuenta su organización, entonces se tiene la densidad aparente. Basado en la diferencia básica de estos dos contextos se puede calcular tanto la densidad real por medio de la ecuación 3.1 y la densidad aparente con la ecuación 3.2

$$\rho_r = \frac{P_{SS}}{V_s} \quad (\text{ec. 3.1})$$

Dónde:  $\rho_r$  es la Densidad real en gr/mL,  $P_{SS}$  es el Peso del suelo secado en el horno en gr,  $V_s$  es el Volumen de Suelo en  $\text{cm}^3$ .

$$\rho_a = \frac{P_{SS}}{V_c} \quad (\text{ec. 3.2})$$

Dónde:  $\rho_a$  es la Densidad Aparente en  $\text{gr/cm}^3$ , y  $V_c$  es el Volumen del cilindro en  $\text{cm}^3$ .

## Contenido de humedad del suelo

De acuerdo a (Williams R.J., 1998) la cantidad de agua que posea el suelo es una de sus características más específicas e importante la cual está determinada, fundamentalmente, por su textura, su contenido de materia orgánica la composición de sus fracciones minera y orgánicas y el arreglo que presente el medio físico edáfico, por el aporte que se haga natural (lluvia) o artificialmente (riego) de ella, así como por el consumo causado por la evapotranspiración.

El contenido de agua del suelo está sometida a varias fuerzas, entre las que destacan la atracción vertical, que ejerce el campo gravitacional de la tierra, el propio peso del agua y el peso de las partículas sólidas suspendidas en ella; el campo de fuerzas que generan, en todas las direcciones, las superficies de los sólidos del suelo; las fuerzas de atracción entre moléculas de agua y el desbalance entre estas y la interface agua –aire. (WilliamsR.J, 1998).

El contenido de agua ( $\theta_m$ ) en el suelo puede ser medido al determinar la masa de agua perdida una vez la muestra de suelo es calentada en un horno a  $105^\circ\text{C}$  con una masa de suelo constante, siendo este definido por la siguiente ecuación (Marshall, Holmes, & Rose, 1996).

$$\theta_m = \frac{m_w}{m_s} \quad (\text{ec.3.3})$$

Dónde:  $\theta_m$  es el contenido de agua,  $m_w$  es la masa de agua perdida al calentarse el suelo a  $105^\circ\text{C}$  y  $m_s$  es la masa de suelo definido previo al calentamiento. El contenido de agua como fracción del volumen es obtenido a través de la ecuación 3.4.

$$\theta = \theta_m * \frac{\rho_r}{\rho_w} \quad (\text{ec.3.4})$$

Dónde:  $\rho_w$  es la densidad del agua a temperatura ambiente.

Así mismo el contenido de humedad en el suelo controla y rige los medios de transporte de distintos nutrientes a través de la capas de suelo (Williams R.J., 1998).

### **Temperatura del suelo**

La temperatura del suelo dependerá de la cantidad de radiación neta que llegue a la superficie terrestre resultado de considerar el balance energético de onda corta y de onda larga. (Van Wambeke A., 1982) establece que la cantidad de radiación neta que llega a la superficie del suelo depende de factores externos al mismo, entre ellos la radiación global disponible, el albedo, y del balance resultante de radiación infrarroja que dependerá de la temperatura y de las emisividades de la atmósfera y la Tierra.

Los gradientes de temperaturas de los diferentes suelos en latitudes medias, son muy similares; solo varía la diferencia de temperatura entre invierno y verano que es mayor a medida que la latitud disminuye. Las fluctuaciones de temperatura de suelo suelen ser debidas a cambios en las condiciones meteorológicas, como la radiación solar, precipitación y evaporación diaria. (Van Wambeke A., 1982)

### **3.1.5 Propiedades químicas del suelo**

Las propiedades químicas del suelo se refieren a condiciones de este tipo que afectan las relaciones suelo-planta, la calidad del agua, la capacidad amortiguadora del suelo, la disponibilidad de agua y nutrimentos para las plantas y microorganismos. Algunos indicadores son la disponibilidad de nutrientes, carbono orgánico total, pH, capacidad de adsorción de fosfatos, capacidad de intercambio de cationes, cambios en la materia orgánica, nitrógeno total y nitrógeno mineralizable entre otros.

#### **pH del suelo**

En términos generales los líquidos o fluidos tienen en consideración la cantidad de hidrógenos libres existentes en una solución dependiendo de una determinada situación química, teniendo esto en cuenta existente acidez, neutralidad o alcalinidad. Según (Velásquez S., 2014) los suelos en general (suelos medios) oscilan entre 4.5 (ácidos) y 7.5 (Neutros o ligeramente alcalinos).

Se da prominentemente en climas áridos pH alcalinos o neutros y en climas húmedos pH ácidos o ligeramente ácidos. En la naturaleza se distribuyen respondiendo a condiciones naturales diversas, los suelos según las materias con que se han formado van a tener mayor o menor pH.

### **Materia orgánica del suelo**

Las sustancias orgánicas del suelo provienen de la descomposición de seres animales y vegetales. Los organismos vivos están constituidos por proteínas, que son sustancias cuaternarias dado que poseen cuatro componentes: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Ganem A., 2010). Las plantas al descomponerse liberan el nitrógeno que contienen formando sales de nitratos los cuales el vegetal puede absorber.

De acuerdo a (Ganem A., 2010) las bacterias y microorganismos que viven en la materia orgánica juegan un papel importante en la vida de las plantas, determinando síntomas vegetales. El humus es el último estado de la materia orgánica, rico en ácidos orgánicos suaves (ácidos húmicos) y actúa en las propiedades de agregación de las partículas también íntimamente ligado a la materia mineral.

La materia orgánica húmica se puede separar de las otras fracciones: la materia orgánica fresca y la materia orgánica no húmica. La materia orgánica fresca es un componente importante para suministrarle alimentación y energía a la meso y macrofauna del suelo. La materia orgánica no húmica es la principal fuente de energía y de carbono para los microorganismos del suelo. (Jaramillo D., 2002)

Sin embargo, desde el punto de vista fisicoquímico, es la materia orgánica húmica o humus la fracción orgánica más importante del suelo pues, al adquirir ésta propiedades coloidales le transmite al suelo propiedades relacionadas al uso agrícola del suelo. (Jaramillo D., 2002)

#### **3.5.1.6 Propiedades biológicas del suelo**

Los suelos son sistemas complejos donde ocurren una vasta gama de procesos físicos, químicos y biológicos que se ven reflejados en la gran variedad de suelos existentes en la tierra. El suelo posee una gran biodiversidad puesto que representa una de las principales fuentes de nutrientes para macro y microorganismos. (Porto, 2017).

#### **Organismos heterotróficos.**

Un organismo, a nivel biológico, es el conjunto de órganos que interactúan de acuerdo con las leyes de la naturaleza. De manera extensiva a este significado, organismo puede usarse como sinónimo de vivo. Heterótrofo, por su parte, es un adjetivo que se aplica al ser vivo que no puede tomar una sustancia inorgánica y crear materia orgánica para sí mismo, lo que lo obliga a alimentarse de otros seres vivos (Porto, 2017). La mayoría de los organismos heterótrofos son quimiorganotrofos y usan la energía que extraen de manera directa de las sustancias orgánicas.

En el organismo heterótrofo se ven atraídos a las sustancias nutritivas tales como son materias orgánicas ricas en energía (carbohidrato, lípido, proteína), dado que los seres heterótrofos son incapaces de transformar materia inorgánica en orgánica. Estos organismos, por tanto, dependen de la materia orgánica viva o muerta sintetizada por los organismos autótrofos, o de otros seres heterótrofos.

### **Actividad enzimática deshidrogenasa**

Las deshidrogenasas son enzimas capaces de catalizar la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación), empleando un par de coenzimas que actúan como aceptores o como donadores de electrones y protones. Esta cualidad ha sido ampliamente estudiada en el uso de la actividad enzimática deshidrogenasa (Margesin R, 2001) como bioindicador de contaminación con metales pesados, pesticidas e hidrocarburos, un gran número de estudios han demostrado que las enzimas del suelo poseen un potencial para categorizar el impacto de hidrocarburos y de la fertilización de los microorganismos del suelo para monitorear las etapas tempranas de remediación de suelos contaminados.

El uso de múltiples parámetros enzimáticos depende de la composición y concentración de los hidrocarburos, a la vez que depende de otros factores tales como los periodos de contaminación y características físico-químicas del suelo según afirma (Rose M., 2000). Mientras que algunas otras actividades enzimáticas son apropiadas para monitorear la fase más activa de la biodegradación, otras sin embargo son más convenientes para indicar bajas concentraciones de hidrocarburos.

La actividad de la deshidrogenasa ha sido usada como un indicador de la actividad microbiana. Encontrándose una correlación positiva entre esta actividad y el contenido de hidrocarburos en el suelo, teniendo un aumento sustancial en la actividad deshidrogenasa tras un aumento en la carga de hidrocarburos. Así mismo, un decaimiento en la actividad enzimática deshidrogenasa en la disminución de hidrocarburos siendo útil para monitorear la reducción del contenido de hidrocarburos como consecuencia de la biodegradación (Margesin R., 2001).

### **3.2 Diésel como contaminante**

El diésel, es un hidrocarburo compuesto fundamentalmente por parafinas y utilizado principalmente como combustible en calefacción y en motores diésel. El gasóleo es un compuesto derivado de la destilación de crudo, por lo cual presenta una densidad promedio de 0,832kg/l, siendo un 12% más denso que la gasolina. Posee una composición aproximada de 86,1% de hidrocarburos saturados, 23% de hidrocarburos aromáticos. Basado en esto, se generaliza que la fracción diésel (ROD) está comprendida entre el C10–C28 (Commission, 2017).

### 3.2.1 Propiedades medias del diésel comercial

El carácter de contaminante del gasóleo o diésel está ligado a sus propiedades fisicoquímicas dentro de las cuales se incluye la densidad, la solubilidad, la tensión de vapor, además de las reacciones que sean propensas a sufrir y de la concentración. Conjuntamente habrá que considerar las características del medio que los rodea como el tipo de suelo, la adsorción, permeabilidad, tamaño de las partículas, contenido de humedad, materia orgánica, profundidad del nivel de agua entre otros factores (Comisión, 2017). En la Tabla 3.2 se encuentra un resumen de las principales propiedades del diésel.

**Tabla 3.2** Propiedades física y químicas del diésel comercial en américa latina.

Propiedad	Valor	Unidad de Medida
Densidad	840	Kg/m <sup>3</sup>
Presión de Vapor	132,000	BTU/Gal
Polaridad	No polar	-
Solubilidad en el agua	0,0005	g/mL de agua a 20°C
Coefficiente de reparto	>3,3	Octano/agua
Punto de ebullición	282 – 338	°C

### 3.2.2. Fuentes de contaminación por hidrocarburos

La contaminación por hidrocarburo se produce de forma frecuente en áreas con alta densidad poblacional o fuerte actividad industrial. Los principales orígenes de aparición de hidrocarburos en el subsuelo son: centros petroquímicos y de refinación, fugas de depósitos, transporte terrestre, confinamiento inadecuado de residuos con hidrocarburos. (Riesco, 2012)

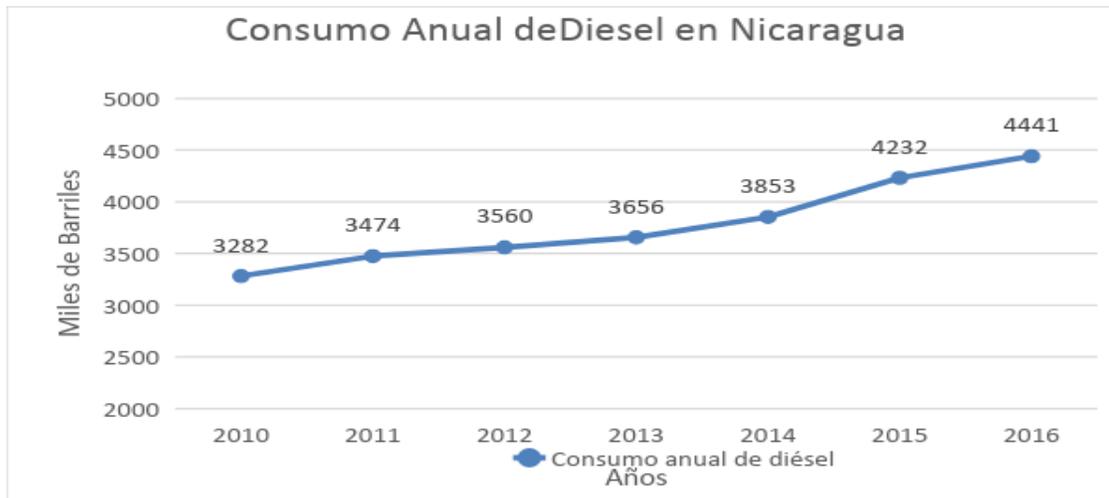
La guía sobre suelos contaminados (Pastor, 2004) actividades consideradas así mismo como fuentes de contaminación son: Saneamiento in situ (genera trazas de hidrocarburos), gasolineras y talleres automotrices (bencenos, fenoles, hidrocarburos halogenados y aromáticos), industrias metalúrgicas, pintura y esmalte, madera y pesticidas, derrames por volcamientos o siniestros naturales.

### 3.2.3. Consumo de diésel en Nicaragua

Los valores de consumo y producción nacional de diésel según las estadísticas anuales del Banco Central de Nicaragua (BCN, 2017), muestra un consumo constante, con una ligera tendencia al aumento, la cual es observable en los últimos cinco años al determinar el ligero aumento entre el periodo 2010 y 2016.

Siendo los valores del año 2017 y 2018 omitidos debido a que el informe anual del BCN durante estos años no contempló la suma total de barriles consumidos durante estos dos años.

Así mismo en la Figura 3.2 se presenta los valores anuales del consumo de diésel a nivel nacional en el periodo 2010-2016, los valores fueron obtenidos de las estadísticas del banco central de Nicaragua para el consumo de hidrocarburos (Véase Anexo A.1).



**Figura 3.2** Consumo nacional anual de diésel en miles de barriles durante el periodo 2010-2016 (BCN, 2017)

### 3.2.4 Movilización del diésel como contaminante en una matriz de suelo

La movilización del diésel a través de un suelo está dada por un equilibrio multi-fase, en el cual la zona no saturada no contaminada presenta cuatro fases diferentes, aire, suelo, agua y fase líquida no acuosa (hidrocarburo), como se muestra en la figura 3.3. La distribución de fluidos depende de la dimensión de los poros, el ángulo de contacto, la tensión superficial y de las saturaciones.



**Figura 3.3** Equilibrio multi fase en el suelo

Fuente: Eweis J.B., 1999

La movilización de un contaminante en un medio viene a estar dada por distintas características intrínsecas y extrínsecas del compuesto y el medio en que se moviliza. En la tabla 3.3 se enumeran alguno de los procesos de transporte de los compuestos orgánicos, sus posibles consecuencias y factores que afectan.

**Tabla 3.3** Procesos de transporte de compuestos orgánicos en suelos.

<b>Proceso</b>	<b>Consecuencia</b>	<b>Factores</b>
Movilización física	Movimiento de compuestos orgánicos debido a la acción del viento o gravedad	Velocidad del viento, distancia al objeto físico, tamaño de la gota o caudal
Adsorción	Eliminación de los compuestos orgánicos debido a su interacción con plantas, suelos y sedimentos	Contenido de arcilla y materia orgánica tipo de arcilla, humedad
Volatilización	Pérdida de compuestos orgánicos debido a la evaporación del líquidos en al suelo.	Presión de vapor, velocidad del viento, temperatura
Lixiviación	Movilización de los compuestos orgánicos a través de los suelos superficialmente o en profundidad	Contenido de agua, Macro poros, textura del suelo, arcilla, contenido de materia orgánica.
Erosión	Movimiento de compuestos orgánicos ocasionada por el agua o viento	Escorrentías, velocidad del viento, tamaño de partículas del medio y del compuesto orgánico.

Así mismo la vida media de un compuesto es otro parámetro de importancia, dado que este se refiere al tiempo necesario para que la mitad de reactante se convierta en producto o cuando la concentración de reactantes es la mitad de su nivel inicial (Riesco, 2012). Para compuestos orgánicos, las vidas medias pueden calcularse para distintos tipos de reacciones como volatilización, fotólisis, lixiviación potencial y degradación (química o microbiana).

De acuerdo con (Riesco, 2012), los compuestos con bajas vidas medias presentan una propagación y persistencia mucho menor en el medio por ejemplo un contaminante vertido en un medio semi-impermeable y este contaminante presenta una velocidad de fotólisis muy pronunciada las consecuencias ambientales pueden ser mínimas si los productos de fotólisis no poseen propiedades tóxicas.

La volatilización de los compuestos orgánicos o sintéticos determina su transferencia de las aguas y suelos a la atmósfera. La Información sobre la velocidad de volatilización de los compuestos orgánicos es importante para comprender su persistencia en el medio. Los factores que afectan la volatilización de los compuestos orgánicos de los suelos son las propiedades fisicoquímicas intrínsecas (presión de vapor, solubilidad, estructura, características de adsorción-desorción) la concentración, las propiedades del suelo (humedad, porosidad,

densidad y contenido de materia orgánica y arcilla) y los factores medioambientales (temperatura, humedad, velocidad del viento (Riesco, R. 2012).

### 3.2.5 Ecotoxicidad

Según (Ganem,2010) los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependen de la cantidad y composición de petróleo; la frecuencia y tiempo de exposición; el estado físico del derrame; las características del sitio donde sucedió el derrame; variables ambientales como la temperatura, humedad y oxígeno, la sensibilidad de la biota específica del ecosistema afectado , entre otras.

Los hidrocarburos se pueden encontrar de la siguiente forma en el suelo: líquida, soluble en agua del suelo, absorbida por el suelo y en la atmósfera edáfica. Ante un derrame de diésel las propiedades físicas del suelo que pueden resultar afectadas son su estructura, aumento de la retención del agua en la capa superficial y potencial hídrico (Ganem A., 2010)

**Tabla 3.4** Cambios en algunas propiedades del suelo contaminado con diésel

<b>Parámetro</b>	<b>Cambios</b>
Humedad	La presencia de hidrocarburos pesados en una capa superficial del suelo inhibe el proceso de filtración del agua a capas inferiores, así mismo causa un aumento de esta en las capas inferiores al evitar pérdidas de humedad al ambiente, aumentando el porcentaje de retención de esta y creando un medio anaerobio en estratos inferiores (Williams R.,1998)
Temperatura	La temperatura de los suelos contaminados con hidrocarburos de las cadenas medias y ligeras en el suelo presentan un comportamiento análogo a la humedad, es decir absorben el calor incidente usándolo para la descomposición de cadenas carbonadas largas en compuestos más sencillos (dióxido de carbono) o compuestos intermedios (benceno, toluenos, etilbencenos). (Van Wambeke, 1982)
pH	El pH de un suelo está altamente relacionado a la cantidad de ácidos orgánicos y composición de estos. Sin embargo los suelos al absorber el diésel el pH de estos suele elevarse volviéndose más alcalino en función del aumento de la concentración de hidrocarburo presente. (Velásquez S., 2014)
Materia Orgánica	Los hidrocarburos son compuestos a base de cadenas carbonadas y micronutrientes en esta, por lo cual el contenido de carbono orgánico disponible en el suelo aumenta al presentarse la adición de hidrocarburos en este. (Ganem A.,2010)
Organismos Heterotróficos	La mayor consecuencia notable de la presencia de hidrocarburos en el suelo es la notable disminución de la diversidad microbiana en este. La presencia del hidrocarburo en el suelo crea un ambiente hostil para la mayoría de las bacterias, causando una disminución considerable de las unidades formadoras de colonias, prevaleciendo únicamente aquellas adaptables a las nuevas condiciones del medio las cuales tras largos periodos empiezan a proliferar en este. (Porto J.,2017)

Actividad Enzimática deshidrogenasa	La actividad enzimática deshidrogenasa es ampliamente relacionada a los procesos de oxidación reducción y presenta una relación directamente proporcional a la concentración de carbono orgánico disponible. Aumentando la actividad enzimática de este al aumentar la concentración de hidrocarburos degradables en el suelo. (Margesin R, 2001)
-------------------------------------	---

Por todo lo anterior, la presencia de un hidrocarburo, en este caso el diésel resulta en una serie de cambios físicos químicos y biológicos en el suelo, los cuales pueden ser mayores o menores en función de la concentración de hidrocarburo en el suelo, el área de la pluma de contaminación, el tipo de suelo, el clima en que este se encuentre. La tabla 3.4 detalla algunos de los cambios realizados por el diésel en el suelo.

### **3.2.6. Normativa Nacional sobre protección de suelos en casos de derrames de hidrocarburos**

El Instituto Nicaragüense de Energía (INE) como ente regulador del sector energía y el Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales (MARENA) en el decreto No. 39-2011 estableció el Reglamento de la Ley de Suministros de Hidrocarburos. El capítulo VIII abarca la protección del medio ambiente en la cadena de suministro de hidrocarburos.

El artículo 54 establece que el MARENA y el MEM deberán coordinarse para la elaboración de normas sobre la protección ambiental en el subsector de hidrocarburos. Esta normativa no ha sido oficialmente anunciada o aprobada por lo cual estas instituciones se rigen por la normativa NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (véase Anexo A.2), aprobada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México.

La NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos por hidrocarburos, caracterización del sitio y procedimientos para la remediación. Esta normativa entró en vigencia en México el 20 de agosto de 2003. Los límites máximos permisibles de concentración de hidrocarburos en suelo se presentan en la tabla 3.5.

La NOM-138-SEMARNAT/ss-2003 establece los límites en función de los rangos orgánicos de las fracciones de hidrocarburos que componen las mezclas comercializadas, siendo la cadena ligera la correspondiente al rango orgánico de la gasolina (ROG), la fracción media corresponde al rango orgánico del diésel (ROD) y la fracción pesada la cual corresponde al rango orgánico del aceite (ORO), así mismo la normativa incluye también límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos como el benceno , tolueno , etilbenceno , xilenos (llamados BTEX) así como algunos hidrocarburos aromáticos polinucleares (por sus siglas en inglés PAHs).

**Tabla 3.5** Límites máximos permisibles establecidos por la NOM-138-SEMARNAT

Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola	Residencial	Industrial	
Ligera	200	200	500	EPA 8015B rango gasolina
Media	1200	1200	5000	EPA 8015B rango orgánico diésel
Pesada	3000	3000	600	EPA 9071B/EPA 1664

En el capítulo correspondiente a la protección del medio ambiente en la cadena de suministro de hidrocarburos se establece en su artículo 56 y 57 que el INE en coordinación con el MARENA formarán un comité técnico de emergencia multisectorial e interinstitucional el cual indicará los procedimientos de referencia para efectuar las actividades de caracterización ambiental, plan de remediación, determinación de daños o afectación, valoración socioeconómica, ambiental y análisis de riesgo a la salud según el caso.

### 3.2.7 Remediación de suelos contaminado con diésel

La remediación de suelos contaminados con hidrocarburos comprende un conjunto de procedimientos que, mediante la contención, remoción o destrucción del contaminante, permite la recuperación total o parcial de las funciones del suelo (Riesco R., 2012).

Existen muchas estrategias encaminadas a la limpieza de suelos tales como la adición de fertilizantes, tensos activos, agentes de volumen, compuestos de liberación de oxígeno, inóculos especializados y otros productos comercialmente disponibles (Cerrato & Rojas, 2006). De igual forma, el uso de acondicionadores y mejoradores orgánicos del suelo tiene como objetivo principal el adicionar nutrientes y material de fácil degradación en el suelo (compost) con el fin de reducir la densidad aparente de los suelos y facilitar su remediación.

El uso de reactores de suelos activados (RSA, o “slurry bioreactors”, por su denominación en inglés) constituye otra alternativa para la limpieza de suelos y sedimentos contaminados (Cerrato & Rojas, 2006) de manera exsitu. Los tratamientos in situ presentan una gran cantidad de variables que podrían afectar el proceso de degradación de un hidrocarburo siendo los más importantes citados en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6** Procesos que afectan la degradación del diésel en el suelo

<b>Proceso</b>	<b>Definición</b>	<b>Factores</b>
Fotoquímica	Rotura de enlaces presentes en los compuestos orgánicos debido a la incidencia y adsorción de radiación solar directa e indirecta.	Estructura de los compuestos orgánicos, intensidad y duración de la exposición solar, Factores medioambientales (pH, Humedad del suelo, temperatura), presencia de nutrientes, contenido de materia orgánica.
Microbiana	Degradación de los compuestos orgánicos ocasionada por microorganismos.	Factores medioambientales (pH, humedad, porosidad, temperatura), presencia de nutrientes, contenido de materia orgánica.
Química	Alteración de los compuestos orgánicos por procesos químicos como hidrólisis y reacciones redox.	PH alto o bajo, tipo de compuesto orgánico, capacidad de adsorción y desorción, velocidad de reacción.
Metabólico	Transformaciones químicas de los compuestos orgánicos tras ser adsorbidos por organismos de orden mayor.	Capacidad de adsorción del organismo, metabolismo de este, e interacciones con el medio.

Existe un gran número de técnicas que pueden agruparse en función de sus características de operación o finalidad. Así, según el objetivo del tratamiento, un grupo está formado por las tecnologías de inmovilización o contención de los contaminantes, mientras que otro comprende los diferentes tratamientos para eliminarlos, mediante su retirada (lavado, extracción de vapores, arrastre con vapor, etc.) o su transformación (incineración, vitrificación, biodegradación, etc.).

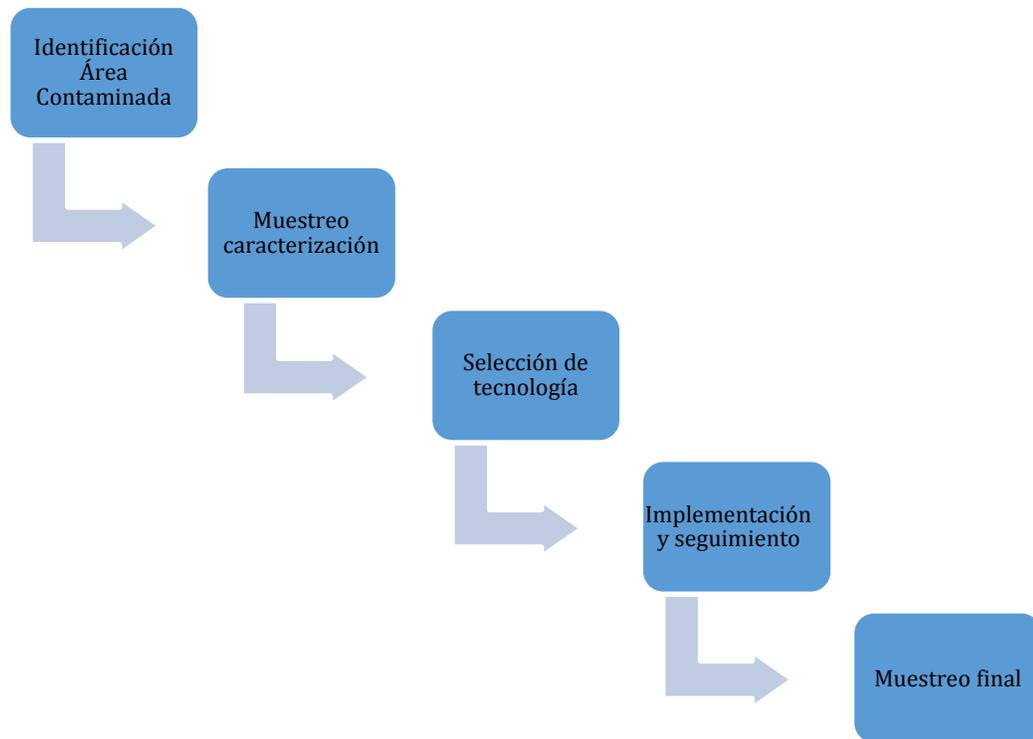
#### **Tren de tratamiento para la remediación del suelo**

Para la remediación de suelo contaminado, se evalúan muchas variables con el fin de determinar el tren de tratamiento idóneo para cada tipo de contaminante, algunos de estas variables son el tipo de contaminante, el área contaminada, la concentración de contaminante, la ejecución, el presupuesto entre otros (Hellmunth, 2003). De manera general la figura 3.4 presenta las etapas, en la remediación del suelo.

La caracterización del área contaminada permite la determinación de las condiciones del área, así como determinar factores tal como la factibilidad de técnicas in situ, exsitu. En esta etapa se delimita el área afectada, se define la implementación de técnicas de contención, identificación de factores (accesibilidad, clima, acceso) que podrían interferir en la logística del tratamiento.

Se realizan muestreos iniciales, de seguimiento y final durante el proceso de remediación, con el fin de determinar el grado de afectación, el monitorear las condiciones del medio durante el tratamiento y una vez terminado el tratamiento (Hellmunth, 2003). Para el muestreo se emplean distintas técnicas tales como el muestreo por aproximación de áreas, muestreo por cuarteo, muestreo puntual de áreas de interés. La técnica de muestreo se selecciona en función de la información disponible y la información que se requiere obtener de este

La selección de la tecnología se realiza una vez se tiene los resultados de la identificación en campo del área afectada y los resultados obtenidos del muestreo inicial (Hellmunth, 2003). Algunos de los factores más influyentes en la selección del tratamiento son: presupuesto, coste operacional, logístico de transporte de materiales, materias primas para la remediación, etapas del tren de tratamiento implementado, efectividad de la técnica seleccionada, tiempo de tratamiento, entre otros.



**Figura 3. 4** Esquema básico de las etapas de tratamiento de suelos

### **3.3 Biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos**

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándose en moléculas más pequeñas y no tóxicas (Riesco R.,2012). Sin embargo, este proceso es muy lento y puede acelerarse introduciendo determinadas bacterias o plantas en los ambientes contaminados. Esta intervención se denomina “biorremediación” y se define como el empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua.

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos. Actualmente se están desarrollando microorganismos,

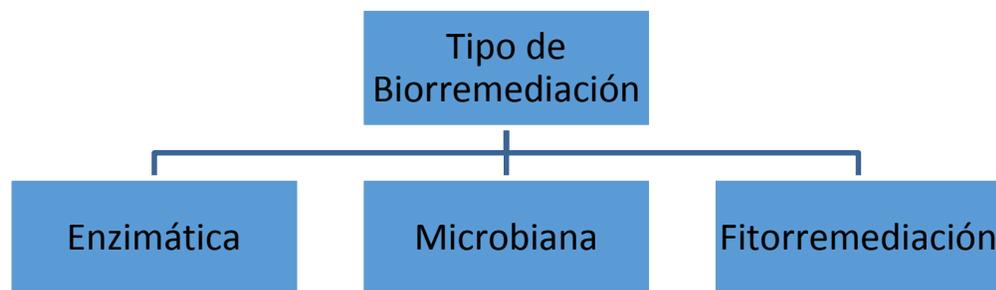
algas (especialmente cianobacterias o algas azules) y plantas genéticamente modificadas para ser empleadas en biorremediación (Riesco R., 2012).

El principio más importante de la biorremediación consiste en usar los microorganismos (principalmente las bacterias) para degradar a los contaminantes o transformarlos en formas menos peligrosas (Riesco R., 2012). En general, los compuestos más fácilmente degradados en la superficie son los hidrocarburos del petróleo, pero las tecnologías para la estimulación del crecimiento de los organismos para degradar una amplia gama de otros contaminantes están surgiendo y han sido probados en el campo y laboratorio exitosamente.

La biorremediación in situ, el uso de microorganismos para la remoción de los contaminantes en determinados sitios es potencialmente más económico, rápido y seguro que otros métodos de descontaminación (Riesco R., 2012). Así mismo representa el tratamiento ex situ más eficiente en el tratamiento de hidrocarburos derivados del petróleo presentes en el rango orgánico de diésel (HTP-ROD), rango orgánico de la gasolina (HTP-ROG) y algunos compuestos tales como el benceno, tolueno, xileno y etilbenceno (BTEX).

### 3.3.1 Tipos de biorremediación

La biorremediación consiste en la remediación o destrucción de un contaminante por organismos vivos o por enzimas producidas por estos (Sepulveda J, 2002). Algunos de los organismos de mayor uso son las bacterias, protozoos, hongos y algas; debido a la alta adaptabilidad a medios hostiles. Basado en lo anterior se puede clasificar la biorremediación en función de los organismos biorremediantes, tal como se muestra en la figura 3.5.



**Figura 3.5** Tipos de biorremediación de suelos afectados con hidrocarburo.

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos de petróleo (TPH's) solventes (benceno, tolueno) explosivos (TNT) clorofenoles (pentaclorofenol), pesticidas

(ácido 2,4- diclorofenoxiacético), hidrocarburos aromáticos (PAH's) (Van Deuren, 1997)

La meta final de la biorremediación es la mineralización del contaminante, esta última ocurre con la biodegradación completa de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO<sub>2</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y formas inorgánicas (N, P y S) componentes celulares y productos de las rutas metabólicas (Morgenstern A. 1961).

En la Figura 3.6 se muestran las tecnologías de biorremediación más implementadas en casos de derrames de combustibles



**Figura 3.6** Principales tecnologías de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Rose M., 2000)

En los sitios donde ocurren derrames de hidrocarburos que no son atendidos inmediatamente, la flora microbiana presente en el suelo se somete a un proceso de selección natural, en el que los microorganismos sobrevivientes son aquellos que desarrollan capacidad degradativa. En esos casos la mejor opción es utilizar la flora autóctona del sitio, en lugar de agregar microorganismos exógenos. Para

tratar derrames recientes es necesario recurrir a preparados microbianos frescos. (Saval S., 2007).

Las técnicas de biorremediación de suelos se dividen a su vez en técnicas in-situ y ex-situ, siendo estas últimas menos efectivas en ambientes de clima templados y polares. La técnica ex-situ presenta grandes ventajas sobre la remediación in.situ ya que permite un mayor control sobre las variables que afectan la matriz, pero la técnica de extracción y transporte repercute en aumento en coste de logística.

Dependiendo del tipo de contaminante la técnica seleccionada varía, dado que algunas presentan mayores rendimientos en medio aerobio o anaerobio, así mismo por las facilidades operacionales se evalúan si esta se realiza in-situ o ex-situ. Su aceptación como estrategia de limpieza viable, en muchos casos depende de sus costos, por lo cual muchas estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y del impacto sobre la matriz contaminada (Reid S., 2001).

### **Biorremediación Natural (BDN)**

Se refiere al uso de microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Estos microorganismos pueden ya existir en ese sitio o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado (proceso de inoculación).

Existen bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros (Hellmunth S., 2003). También pueden degradar parcialmente, otros compuestos químicos como el PCB, y elementos químicos como; arsénico, selenio, cromo. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden sintetizarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente o si no bien inmovilizarlos del medio.

En el caso de que la contaminación esté en lugares inaccesibles se puede realizar la biorremediación sin necesidad de excavar. Por ejemplo, en el caso de derrames de petróleo que hayan penetrado en el suelo y amenacen contaminar al manto freático, la biorremediación resulta mucho menos costosa que los procesos de excavación e incineración (Hellmunth, 2003).

El empleo de desechos orgánicos de fácil degradación como aditivos o correctores de densidad, resulta una alternativa técnicamente factible, viable y sencilla que favorece la degradación de contaminantes orgánicos en suelos a través de procesos de Composteo, ya que estos mejoran las propiedades del sistema y aportan nutrientes para mantener activas las poblaciones microbianas.

### **Biorremediación con Activadores enzimáticos (BDAE)**

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que se destacan por catalizar reacciones bioquímicas. Estas sustancias actúan sobre distintos sustratos (proteínas, grasas, hidratos de carbono, etc.) convirtiéndolos en diferentes moléculas inocuas. Una de las ventajas de las enzimas es que las reacciones mediadas por éstas poseen tasas de velocidad significativamente mayores que las reacciones en las cuales no se encuentran estos catalizadores (Prezi, 2014).

La degradación enzimática consiste en agregar enzimas al sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad. Dichas enzimas son previamente producidas en bacterias transformadas genéticamente (Prezi, 2014). Esta aplicación de la biotecnología lleva décadas en el mercado y hoy las compañías biotecnológicas ofrecen las enzimas y los microorganismos genéticamente modificados para tal fin.

### **Biorremediación con lactosuero (BLS)**

El lacto suero o suero lácteo es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación del coágulo o fase micelar (Morgado R., 2017). Sus características corresponden a un líquido de color amarillo verdoso, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido que contiene un 94% de agua, proteínas y grasas.

Considerado por largo tiempo como un desecho difícil de tratar y eliminar debido a las grandes cantidades producidas en la industria del queso, es actualmente una de las materias primas más usadas en el ámbito alimentario. Nuevas tecnologías permiten recuperar los principales nutrientes y elaborar a base de ellos nuevos productos como los concentrados de proteínas de suero, emulsificantes, estabilizantes y otros aditivos que confieren propiedades reológica y sensorial en la industria alimentaria (Haller H., 2015).

Se han realizado relativamente pocos estudios sobre el efecto del suero sobre la biodegradación de contaminantes orgánicos. Entre los cuales se ha demostrado que la degradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos se puede mejorar significativamente mediante la adición de suero de leche y suero fermentado (Haller H., 2015).

Los resultados de aplicación del suero de leche no han sido tan prometedores en experimentos in-situ como en el laboratorio, debido a la baja temperatura del suelo y la baja disponibilidad del suero de leche debido a la restricción de la percolación en el suelo arcilloso (Osteberg T., 2007) sin embargo en clima tropical, se espera

que la tasa de mineralización sea significativamente más alta y el método podría resultar más apropiado en dicho clima.

(Osteberg T., 2007) determinó que la actividad microbiana se ve estimulada por la presencia de lacto suero obteniendo que en suelo areno arcilloso la biodegradación alcanzó un estado lineal, mejor descrito por cinética de orden cero y estableciendo que la adición de 6000 o 60000  $\mu$ l de lacto suero por kg de suelo daban el mayor grado de biodegradación

Basado en los resultados de (OstebergT., 2007) se realizó un estudio comparativo en condiciones tropicales en que empleando como estimulante 6 ml de suero de leche por kg de suelo contaminado presentó una disminución del 20% en el porcentaje de materia orgánica en el suelo contaminado con hidrocarburo.

El ácido láctico obtenido a partir de residuos de lacto suero estimulan la actividad microbiana, sobre todo aquellas que pueden usar lactato como fuente de carbono tal es el caso de las Pseudomonas, Bacilos, azoto bacterias y rizo bacterias (Morgado R., 2017). De estas últimas, el uso de los bacilos y Pseudomonas son ampliamente conocidas por su capacidad degradadora de hidrocarburos, motivo por el cual estas son empleadas como componentes fundamentales en distintos cocteles bacterianos empleados en la biodegradación de hidrocarburos y compuestos aromáticos (Alexander R, 1987).

### **3.3.2 Fundamento bioquímico de la biodegradación**

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que, en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células en la cual se produce una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía (Cerrato & Rojas, 2006). La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

En algunos casos, los productos de la biodegradación, son más reactivos para transformaciones subsecuentes y pueden ser mineralizados, mientras que otros son susceptibles a unirse con la materia orgánica del suelo, quedando inaccesibles. Para ciertos químicos es posible también una transformación muy diferente a la mineralización, el metabolismo. Durante este proceso, los microorganismos utilizan como fuente carbono y energía un compuesto, produciendo enzimas capaces de transformar bioquímicamente otro compuesto sobre el cual no pueden crecer (Alexander R., 1987).

Un contaminante puede ser degradado a productos intermedios o finales que pueden ser menos, igual o más tóxicos que el contaminante original (Semple,

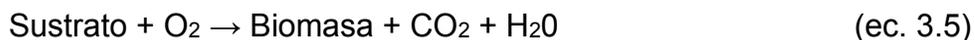
2001). Sin embargo, el papel más importante de los microorganismos en la transformación de un contaminante es su habilidad para producir su detoxificación. La detoxificación de un compuesto se refiere a un cambio estructural que lo haga menos peligroso hacia una o más especies susceptibles (humanos, animales, plantas u otros microorganismos).

Los aceptores comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Semple, 2001).

Para que los microorganismos puedan degradar alcanos primero deben de oxidar con oxígeno el último carbono de la molécula gracias al complejo multi enzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno. Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida más hasta grupo aldehído y finalmente carboxílico. (Torres, 2012) afirma que así se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetil-CoA por  $\beta$ -oxidación. Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por  $\beta$ -oxidación.

Por lo tanto, para colonizar las interfaces petróleo-agua los microorganismos tienen que variar sustentablemente la membrana para introducir los hidrocarburos en la célula lo hacen vía vesícula. Por lo tanto, el requerimiento genético de los microorganismos no solo es necesario el sistema monooxigenasa, sino otros genes que permitan variar la envoltura y formación de esas vesículas. Por esta razón son pocas las especies que puedan realizar esta biodegradación.

Sin duda la especie con más posibilidades y la más estudiada en el campo es *Pseudomonas* (Torres, 2012). Por lo anterior, la reacción para la degradación aerobia de un hidrocarburo se puede representar de manera general por la ec 3.5.



El hecho que en todos los ambientes donde los hidrocarburos naturales se forman el oxígeno no está presente, ha hecho pensar a la comunidad científica que los hidrocarburos no podrían ser degradados anaeróbicamente. Pero a finales de 1980 se descubrieron algunos microorganismos que sí tenían cierta actividad degradadora bajo condiciones totalmente estrictas (Hellmunth, 2003).

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores, los cuales se presentan en la tabla 3.7

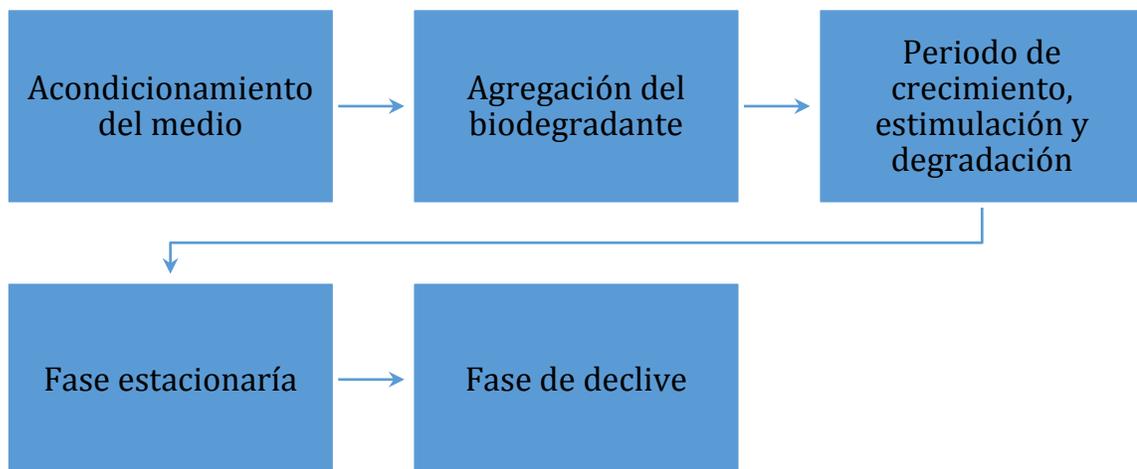
**Tabla 3.7:** Factores que afectan el proceso de biorremediación

Factor	Influencia en la biorremediación
Necesidad de Nutrientes	El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos (nitrógeno, fósforo, oxígeno etc.) se encuentren disponibles para su asimilación y sintonización.
pH	Afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8
Temperatura	Generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófitas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.
Humedad:	Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células.

### 3.3.3 Etapas de tratamiento biológico.

A diferencia de los tratamientos físicos o químicos, los tratamientos biológicos deben de presentar las condiciones ideales para que los organismos biológicos lleven a cabo las funciones degradadoras requeridas. (Hellmunth S., 2003). Debido a ello para el tratamiento de suelos in situ se debe realizar una serie de estudios de caracterización con el fin de determinar si la matriz presenta características aptas para el tratamiento biológico o si este debe ser acondicionado. Estas etapas son mostradas en la figura 3.7.

Para el tratamiento de suelos ex situ se realiza una homogenización y extracción de sólidos alóctonos no característicos del área (desechos plásticos, restos de construcción, sólidos metálicos etc.) con el fin de que estos no afecten el proceso de biorremediación. Para los tratamientos in situ, si el suelo no presenta las condiciones necesarias para la biorremediación se realiza una etapa de bioestimulación en la cual se crea un medio apto para la proliferación de los organismos degradadores.



**Figura 3. 7** Etapas del tratamiento biológico de suelos contaminados.

Las tecnologías biológicas necesitan un tiempo de desarrollo, estimulación durante el cual el agente biodegradador se desarrolla en el medio conforme consume (degrada) en contaminante en el medio. Esta etapa del tratamiento también es llamada etapa exponencial, dado que es en esta en la que la proliferación de los microorganismos y crecimiento de estos aumenta exponencialmente.

El tiempo de desarrollo y estimulación varía de técnica en técnica, siendo la fitorremediación una de las técnicas que más tiempo requiere dado que la adsorción y degradación del contaminante requiere periodos largos, los cuales dependen del tipo de planta que se emplee (Hellmunth S., 2003). La degradación microbiana y enzimática es directamente proporcional a la tasa de desarrollo y proliferación de las unidades formadoras de colonias en el medio.

La etapa de meseta se presenta una vez se llega al punto de equilibrio en el que el agente biodegradador no puede desarrollarse más dado a las limitantes que presenta el medio. En esta etapa se presenta unos valores constantes en la degradación del hidrocarburo (Hellmunth S., 2003).

Posterior a la etapa de meseta, la etapa de declive es aquella en la que el agente degradante disminuye su coeficiente de remoción y su tasa de crecimiento decae, esto puede deberse a que ha culminado el periodo de vida del agente degradante, porque el medio ya no presenta condiciones aptas para la sustentación del organismo o bien que el contaminante ha sido completamente degradado.

### **3.3.4 Interferencias en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en suelo.**

El destino de un contaminante en el suelo está determinado por una variedad de factores que interactúan de manera compleja (Riese-Roberts, 1998) siendo estos procesos simultáneos o con el predominio de uno sobre otros. Estos incluyen: procesos químicos (reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción, fotólisis), procesos físicos o de transporte (sorción, dispersión y difusión, volatilización, solubilización), biológicos (bioacumulación, biotransformación, biodegradación, toxicidad), procesos abióticos, factores ambientales combinados.

Esta serie de factores inciden en la efectividad de la biorremediación y son un parámetro básico para decidir la aplicación de una tecnología de tratamiento para remediar un tipo de contaminación particular. En general, pueden clasificarse los factores en tres grupos: Físicoquímicos, Biológicos y Ambientales (Riese-Robert, 1998)

Los factores fisicoquímicos según (Riese-Robert, 1998) están determinados por las propiedades del contaminante siendo los de mayor relevancia:

-viscosidad: la cual determina ampliamente la capacidad del contaminante a migrar en la matriz, dándose el caso de desplazamiento del contaminante al agregarse un coctel bacteriano

-la densidad del contaminante permite determinar la formación de fases y prever el tipo de mezcla que se dará entre el agente biorremediante, el contaminante y el suelo.

-volatilidad: permite evaluar la presencia del contaminante en la matriz, así como la posible formación de compuestos secundarios (bencenos, toluenos, etilbencenos) previo a la biorremediación.

Los factores biológicos están intrínsecamente relacionados a la cantidad de microorganismos, la capacidad de estos para biodegradar determinados compuestos y sobre todo un medio para que los microorganismos degradadores proliferen (pH, humedad, temperatura, etc.)

El factor medio ambiental es de vital importancia puesto que los microorganismos presentan un rango de temperatura, pH y humedad en los cuales se desarrollan mayoritariamente, así mismo la disponibilidad de nutrientes y oxígeno determina la capacidad de estos para degradar hidrocarburos.

La mayoría de los microorganismos degradadores usados comercialmente son consorcios bacterianos basados en pseudomonas y bacilos, los cuales se desarrollan mayormente en condiciones aerobias, con temperaturas medias y suelos ligeramente alcalinos (Hellmunth S., 2003).

### 3.3.5 Eficiencia del proceso de remediación del suelo contaminado por hidrocarburos.

La eficiencia de un método de remediación suele medirse en función de distintos parámetros los cuales van desde el tiempo de remediación, la viabilidad tecnológica, el coste operacional, y la más remarcable es la eficiencia de remoción del contaminante. Según (Aguilar, 2009) la eficiencia o porcentaje de remoción es calculado empleando una correlación lineal entre el valor inicial de la carga de contaminante y el valor final obtenido tal como se muestra en la ecuación 3.7.

$$E = \frac{(C_{Do} - C_{Df})}{C_{Do}} * 100 \quad (\text{ec. 3.7})$$

Dónde:  $E$  es la eficiencia de remoción en valores porcentuales (%),  $C_{Df}$  es la concentración final de hidrocarburo en mg/kg,  $C_{Do}$  es la concentración inicial de hidrocarburo en mg/kg.

Otro de los parámetros empleados con el fin de evaluar la calidad del suelo tratado, consiste en comparar distintos parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo tratado (Ochoa V. ,2007). La calidad del suelo está directamente relacionada a la función que se le dará al suelo tratado, siendo los suelos tratados con hidrocarburos usados con fin industrial (relleno en carreteras, suelo selecto para construcción etc.) o con fines agrícolas (siembra, suelo enriquecido, agricultura, pastaje).

## **IV. Metodología**

En el presente acápite se especifica la metodología empleada, detallando el montaje del experimento, el proceso de muestreo, los análisis realizados, y los medios necesarios para la obtención de los datos y su respectivo procesamiento implicados en el desarrollo del estudio.

### **4.1 Descripción de la evaluación**

La evaluación tecnológica se realizó en la Planta de Tratamiento de suelo contaminado San Benito perteneciente a la empresa Environmental Protection & Control, ubicada en el km 33.5 de la carretera panamericana norte. En esta planta de tratamiento se emplea un activador enzimático comercial con el fin de remediar suelo contaminado con hidrocarburos.

La investigación realizada se basó en la evaluación a escala piloto del proceso de remoción del diésel en el suelo contaminado empleando tres tipos de tecnologías de biorremediación (BDAE, BLS, BDN). Se midieron las variaciones de determinados parámetros físicos, químicos y biológicos en suelo contaminado, durante el tratamiento empleando las tres técnicas antes mencionadas, las cuales han sido evaluadas a escala laboratorio en estudios realizados por: (Hellmuth ,2003), (Prezi, 2014) (Haller, 2015) (Osteberg 2007).

Para la etapa final del estudio correspondiente al análisis e interpretación de los resultados obtenidos durante el experimento se emplearon la herramienta estadística SPSS, Microsoft Excel, Sketchbook Pro.

### **4.2 Alcances y limitaciones del estudio**

A continuación se presentan los alcances y limitaciones presentadas durante el estudio de evaluación comparativa de las tres técnicas (BDAE,BLS,BDN) de remediación para la remoción del diésel en suelo contaminado.

#### **4.2.1 Alcances**

El presente estudio evaluó las variaciones en los parámetros físicos (temperatura, humedad) químicos (HTP-ROD, materia orgánica, pH ) y biológicos (conteo heterotróficos en placa, actividad enzimática deshidrogenasas) en el suelo tratado a escala piloto con tres técnicas de remediación (BDAE,BLS,BDN).

La investigación abarca las variaciones en los parámetros de interés seleccionados, presentadas en un sub-lote de suelo contaminado perteneciente a un caso de derrame real atendido por la empresa Environmental Protection & Control (EPC).

## **Hipótesis**

Basado en los alcances del estudio, así como la bibliografía recopilada sobre experimentos previos realizados a escala laboratorio se elaboró la siguiente hipótesis nula:

-Las biorremediación natural monitoreada, bioestimulación con activador enzimático comercial y bioestimulación con lactosuero son técnicas eficientes para la remoción de diésel en suelo contaminado, empleando el tratamiento ex situ a escala piloto durante un periodo de diez semanas de tratamiento.

Según (Hellmunth, 2011) se considera eficiente a todo aquel tratamiento en el cual se presente un porcentaje de remoción de contaminante igual o superior al 85% en periodos de prevalencia relativamente cortos. Planteándose de esta misma manera como hipótesis alternativa la siguiente:

-Al menos uno de los tres tratamientos evaluados a escala piloto presentará un porcentaje de remoción inferior al 85% en un periodo de tratamiento de diez semanas.

### **4.2.2 Limitaciones**

A continuación se enuncian las limitaciones presentadas durante el presente estudio:

- Falta de recursos logísticos para la realización de múltiples réplicas del presente estudio.
- Laboratorios nacionales no certificados para la realización de los análisis químicos por la metodología requerida por la normativa adoptada (HTP-ROD) y biológicos específicos (identificación de especies microbianas en suelo y lactosuero).
- Normativa nacional que determine las concentraciones límites permisibles de hidrocarburo en suelo.
- La normativa adoptada RECNAT para la determinación de fertilidad en suelos no abarca parámetros biológicos dentro de los límites establecidos.

## **4.3 Caracterización de propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado**

Para llevar a cabo la caracterización del suelo se realizó actividades tales como la selección del suelo contaminado, montaje del experimento, muestreo y determinación de los parámetros seleccionados, a continuación, se describen cada una de las actividades antes mencionadas.

### **4.3.1 Selección del suelo contaminado**

El suelo tratado provino de un caso de derrame de diésel atendido por la empresa Environmental Protection & Control (EPC) el cual estaba ubicado en una celda de

almacenamiento en la planta San Benito y cubierto con una membrana plástica. Se seleccionó el lote de suelo sin tratar presente en la planta, con la mayor concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el rango orgánico del diésel o por sus siglas en inglés TPH-ROD. En la figura 4.1a se muestra el proceso de selección del lote de suelo contaminado.

Para la homogenización del lote de suelo contaminado se empleó una retroexcavadora, como se muestra en la figura 4.1b, una vez homogenizado el lote se tomó un sub-lote el cual fue sujeto del presente estudio.



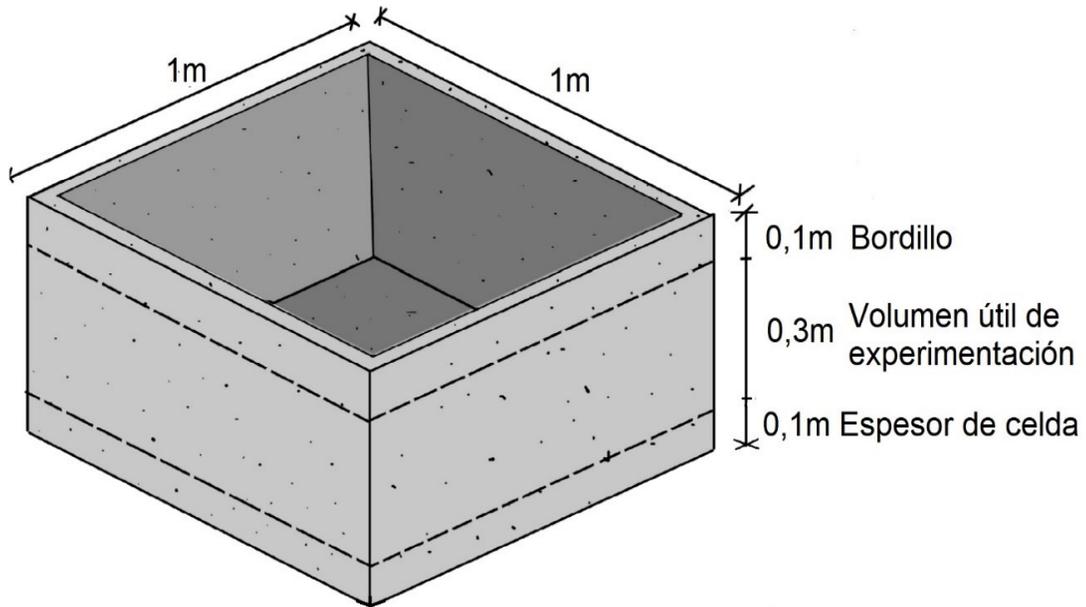
**Figura 4.1** a) Selección de lote de suelo b) Homogenización mecánica del lote de suelo

### 4.3.2 Montaje del experimento

Dado que el suelo contaminado es un medio trifásico, fue necesario la implementación y diseño de una celda que permitió trabajarlo de manera aislada, impidiendo cualquier interferencia externa. Estas celdas fueron diseñadas con el fin de simular las celdas de Landfarming, empleadas en el tratamiento ex-situ de suelos afectados con hidrocarburo en planta San Benito.

La celda está construida con una mezcla de cemento y varillas de hierro con grosor de media pulgada. Se seleccionó este material ya que es inerte con el suelo y el diésel. Las dimensiones de cada celda se muestran en la figura 4.2, esta consiste en: 0,5 m de alto, y una base de 1 m de largo y ancho respectivamente. Teniendo un volumen interno de la celda de  $0,4 \text{ m}^3$ , del cual  $0,3 \text{ m}^3$  corresponde al volumen útil de experimentación (volumen del suelo contaminado) y  $0,1 \text{ m}^3$  para la manipulación y homogeneización del suelo en tratamiento (0,1 m de bordillo), la figura 4.2 muestra el isométrico de la celda.

Las celdas fueron ubicadas al aire libre, por lo cual con el fin de evitar el contacto con el agua de lluvia y la saturación de la celda estas fueron cubiertas con una capa plástica independiente para cada celda.



**Figura 4.2** Isométrico de celda piloto utilizada durante el experimento.

El sub-lote seleccionado fue homogenizado mecánicamente por segunda vez y colocado en las seis celdas piloto usadas para el experimento. En la figura 4.3 se presenta las seis celdas piloto y el proceso de llenado de estas con asistencia de la máquina retroexcavadora.



**Figura 4.3** Llenado de celdas con suelo contaminado.

### 4.3.2 Muestreo del suelo contaminado

Para la determinación de las características del suelo contaminado se llevó a cabo un muestreo de caracterización. En este muestreo se determinaron las características del suelo afectado en el cual se incluyeron parámetros de campo, tales como; pH, temperatura y humedad con equipos de monitoreo y control empleado en las instalaciones de Planta San Benito (véase tabla 4.2).

La determinación de parámetros físicos (textura y densidad) químicos (HTP-DRO Materia orgánica, pH en extracto acuoso) y biológicos (conteo de organismos en placa y actividad enzimática deshidrogenasa) fueron determinados en distintos laboratorios (CIRA-UNAN, Biotecnología UNAN-Managua e IAG Pensacola USA).

El método de análisis implementado para su determinación respectiva y los laboratorios donde se realizaron las mediciones se detallan en la tabla 4.1. Estos métodos de análisis se seleccionaron basados en las normativas NOM-138-SEMARNAT y la NOM-021-RECNAT, siendo ambas normativas adoptadas por las autoridades nacionales para la determinación de suelos contaminados por hidrocarburos y determinación de especificaciones de fertilidad, salinidad de suelos y clasificación de suelos; respectivamente.

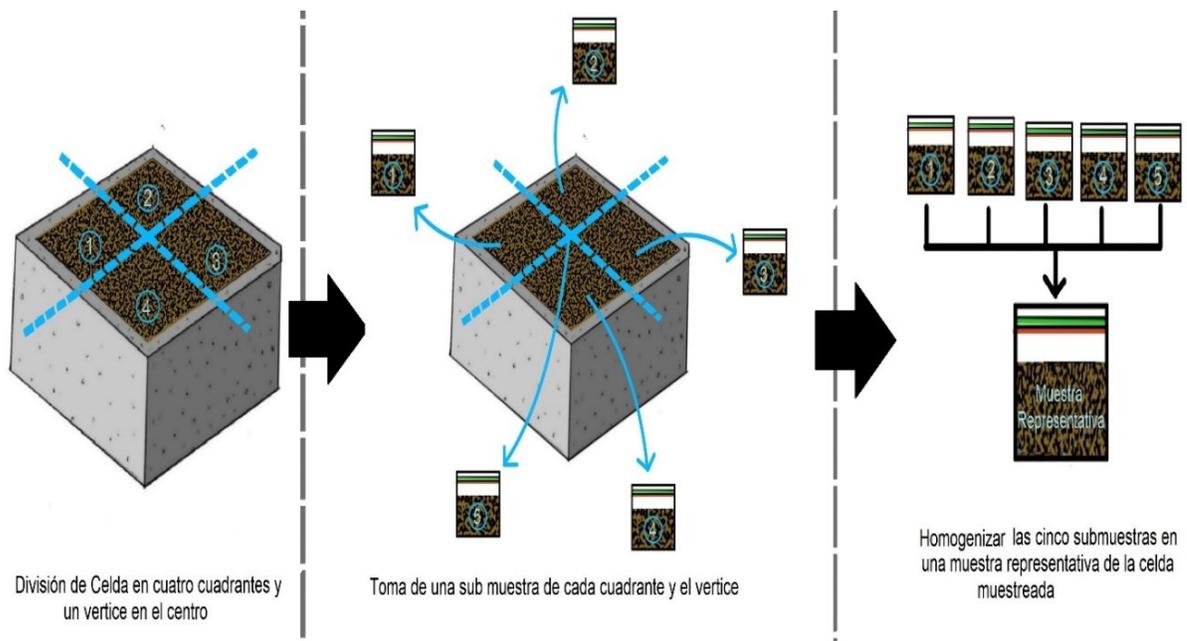
**Tabla 4.1** Métodos de análisis realizados en la caracterización del suelo

Parámetro	Método	Laboratorio
pH	Soil and waste pH (USEPA 90450)	Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua; Managua, Nicaragua
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP-ROD)	HTP por cromatografía de gases (EPA 8015B)	Test América, Pensacola; Florida, USA.
Actividad Enzimática deshidrogenasa	Enzymatic Activity dehydrogenase in Contaminated Soil (Margesin&Schinner)	Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua; Managua, Nicaragua
Conteo Heterotrófico en Placa	Heterotrophic Plate Count (IMP-SEMARNAT-INE/SMWW 9215 C)	Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua; Managua, Nicaragua
Carbono Orgánicos	Materia Orgánica Oxidable mediante el Ácido crómico con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y valor de dilución (Walkley-Black).	CIRA-UNAN; Managua, Nicaragua.

**Tabla 4.2** Características de los equipos para medición de parámetros de control

Parámetro	Equipo	Características
Humedad	Hidrómetro para suelo, Medidor con sonda de 8"	Rango de Humedad: 0-50% ± 2%
Temperatura	Termómetro para Suelo Marca Taylor	Rango de Lectura 20-180°F Sonda de 5"
pH	pH-metro de lectura directa HI99121	Rango de pH: 2 -14 ± 0,02 Calibración: Automática

La toma de muestras para la caracterización de suelo contaminado fue mediante la elaboración de una muestra mixta del suelo contenido en las seis celdas piloto. El método de muestreo en cada una de las celdas fue el método de cuarteo por montón detallado en la figura 4.4.



**Figura 4.4** Representación de muestreo por cuarteo en las celdas piloto

Las muestras recolectadas fueron manipuladas empleando guantes y palas esterilizadas. Estas se etiquetaron y rotularon con el nombre de M0 para la

realización de las mediciones de los parámetros físicos, químicos y biológicos seleccionados.

El transporte de las muestras enviadas a laboratorios nacionales fueron preservadas bajo refrigeración (empleando recipientes térmicos con hielo), con los recipientes necesarios para cada tipo de muestra. Para los análisis biológicos se emplearon recipientes esterilizados brindados por el Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua y fueron manejados según indicaciones del laboratorio (empleando equipo y frascos cubiertos con papel aluminio). Para los análisis físicos (textura, densidad aparente) y químicos (pH en extracto acuoso, materia orgánica) se emplearon bolsas ziploc para su transporte y homogenización.

Para el análisis de HTP-ROD la muestra fue colocada en envases de vidrio de 1 onza, la cual fue etiquetada, cubierta con papel burbuja y recubierta con cinta adhesiva después se almaceno en un termo con hielo. El cual fue enviado mediante FEDEX en dirección al laboratorio Test América, Pensacola, Florida USA.

#### **4.4 Determinación del comportamiento de los parámetros físicos, químicos y biológicos durante el tratamiento del suelo**

La determinación del comportamiento de los parámetros durante el experimento abarca, la aplicación de los bioestimulantes, el monitoreo de los parámetros de control y los muestreos de seguimiento y final.

##### **4.4.1 Determinación de dosificaciones de lactosuero y activador enzimático**

Previo al proceso de aplicación se determinaron las dosis y volúmenes necesarios del activador enzimático comercial y el lacto suero a aplicar al suelo contaminado. Así mismo la definición de límites máximos y mínimos del volumen de agua aplicable al suelo, con el fin de no exceder los rangos de humedad recomendados por Haller (2015) y por el fabricante del activador enzimático

##### **Determinación de volumen acuoso máximo y mínimo aplicable.**

Basado en la bibliografía se determinaron los valores máximos y mínimos en los parámetros de control del suelo con tratamientos biológicos. Estos rangos son presentados en la tabla 4.3 y serán empleados con el fin de determinar el volumen máximo y mínimo de agua, lactosuero y activador enzimático que se puede aplicar a la matriz.

-Se calculó la masa de suelo en la celda con la ecuación 4.1

$$ms = \rho_{asc} * V_s \quad (\text{ec.4.1})$$

Donde  $\rho_{asc}$  es la densidad aparente del suelo contaminado en g/cm<sup>3</sup> y  $ms$  es la masa del suelo contaminado en g y  $V_s$  es el volumen del suelo contaminado en cm<sup>3</sup>.

**Tabla 4.3** Rangos permisibles para proceso de biorremediación

Parámetro	Rango
Temperatura	15 - 35°C ± 2
Humedad	15 - 25% ± 2
pH	6.5 - 8.5 ± 0.5

- Para determinar el contenido de agua en el suelo contaminado se colocaron en un horno tres muestras de un gramo de suelo a 105°C por dos horas, posteriormente se sacaron del horno y se pesaron, la humedad se obtuvo por medio de la ecuación 4.2.

$$\theta_{mc} = \frac{m_{wc}}{m_{sc}} \quad (\text{ec.4.2})$$

Dónde:  $\theta_{mc}$  es el contenido de agua en el suelo contaminado,  $m_{wc}$  es la masa de agua perdida al calentarse el suelo a 105°C en g y  $m_{sc}$  es la masa de suelo contaminado húmedo.

Basado en la ley de conservación de la masa la humedad del suelo durante la aplicación es directamente proporcional al contenido de agua inicial y al volumen acuoso agregados. Esto es expresado en la ecuación 4.3 y reescrito en la ecuación 4.4 en función de la humedad agregada.

$$\theta_{sist} = \theta_0 + \theta_{ag} \quad (\text{ec. 4.3})$$

$$\theta_{ag} = \theta_{sist} - \theta_0 \quad (\text{ec 4.4})$$

Basado en la ecuación 4.3 y 4.4, así como los valores máximos y mínimos recomendados por la bibliografía para la humedad se determina el volumen acuoso máximo y mínimo aplicable al suelo a través de las ecuaciones 4.5 y 4.6 respectivamente.

$$D_{mx} = D_{smx} - D_0 \quad (\text{ec.4.5})$$

$$D_{mn} = D_{smn} - D_0 \quad (\text{ec.4.6})$$

Dónde:  $D_{mx}$  es la dosificación acuosa máxima permitida en L/m<sup>3</sup>,  $D_{smx}$  es la dosificación máxima acuosa establecida por las condiciones de control en L/m<sup>3</sup>,  $D_0$  es la dosis acuosa inicial en L/m<sup>3</sup>,  $D_{mn}$  es la dosificación mínima permitida en L/m<sup>3</sup> y  $D_{smn}$  es la dosificación mínima acuosa establecida por las condiciones de control en L/m<sup>3</sup>.

### **Determinación de la dosificación y volumen del activador enzimático**

La dosificación aplicada del activador enzimático comercial fue la recomendada por el fabricante, la cual es de 20 litros de activador por m<sup>3</sup> de suelo contaminado. Dado que el volumen de suelo contenido en cada celda equivale a 0.3 m<sup>3</sup>, el volumen aplicado se determinó mediante la ecuación 4.7.

$$V_{AE} = D_{RAE} * V_S \quad (\text{ec. 4.7})$$

Dónde  $V_{AE}$  es el volumen aplicado de activador enzimático (L),  $D_{RAE}$  es la dosificación recomendada del activador enzimático (L/m<sup>3</sup>), y  $V_S$  es el volumen de suelo contaminado (m<sup>3</sup>).

### **Determinación de la dosificación del lactosuero**

Para la dosificación de lacto suero se realizó un ajuste a las dosificaciones empleadas por (Haller, 2015) de 0,6 ml de suero por kg de suelo contaminado, debido a que la concentración de diésel fue de 5 mg diésel/kg de suelo, la cual es inferior respecto a los valores que se encuentran en casos de derrames.

Por lo que se empleó la ecuación 4.8 para calcular la dosificación de lactosuero a emplear basándose en los resultados de la concentración de hidrocarburo y densidad aparente obtenidos en los análisis de línea base.

$$D_{TLS} = \frac{D_H * C_{de}}{C_{dh}} \quad (\text{ec. 4.8})$$

Dónde:  $D_{TLS}$  es la dosis aplicada de lactosuero (L/m<sup>3</sup>),  $D_H$  es la dosificación sugerida de lactosuero por Haller (L/m<sup>3</sup>),  $C_{de}$  es la concentración de diésel en el suelo contaminado del experimento (mg/kg) y  $C_{dh}$  es la concentración de diésel en el suelo contaminado del experimento realizado por Haller (mg/kg).

Una vez definido la dosis teórica de lactosuero a emplear, se determinó el volumen a aplicar mediante la ecuación 4.9

$$V_{LS} = D_{TLS} * V_S \quad (\text{ec. 4.9})$$

Dónde  $V_{LS}$  es el volumen aplicado de lactosuero (L),  $D_{TLS}$  es la dosificación teoría de lactosuero (L/m<sup>3</sup>), y  $V_S$  es el volumen de suelo contaminado (m<sup>3</sup>).

El valor del volumen de lactosuero es comparado con el volumen acuoso máximo y mínimo aplicable, siendo aceptada la dosificación teórica de lactosuero si el volumen calculado se encuentra entre el volumen máximo y mínimo aplicable.

#### **4.4.2 Dosificación y volúmenes acuosos aplicados**

En la tabla 4.4 se presenta los resultados obtenidos de la determinación de las dosis acuosas permisibles, estos fueron determinados para obtener volumen máximo y mínimo acuoso que se podía aplicar al medio sin saturarlo, manteniéndolo dentro del rango de humedad recomendado por la bibliografía.

**Tabla 4.4** Dosis acuosa máximos y mínimos permisibles en el suelo a tratar.

<b>Dosis acuosa permisibles (L/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Máximo</b>	22,86
<b>Mínimo</b>	1,94

La dosis de lactosuero aplicada en el tratamiento BLS fue de 3,94 L/m<sup>3</sup> por lo cual el volumen aplicado a cada celda de tratamiento semanalmente fue de 1,18 L, correspondiente a un volumen de 11,82 L durante las diez semanas de tratamiento.

La dosis de activador enzimático aplicada en el tratamiento BDAE fue de 20 L/m<sup>3</sup>, aplicando un volumen semanal por celda de 6 L y un volumen total de activador enzimático durante las diez semanas de tratamiento de 60 L. El volumen total de activador enzimático es cinco veces mayor que el volumen de lactosuero empleado para la remediación de suelo. En la tabla 4.5 se presenta una tabla resumen con las dosis y volúmenes aplicados por celda de tratamiento.

**Tabla 4.5:** Dosis y volumen aplicados por celda en los tratamientos BDAE y BLS

<b>Sustrato agregado</b>	<b>Dosis aplicada (L/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Volumen semanal aplicado (L)</b>	<b>Volumen total aplicado (L)</b>
<b>Activador enzimático</b>	20	6	60
<b>Lacto suero</b>	3,94	1,18	11,82

#### **4.4.3 Obtención del lactosuero como sustrato**

El lactosuero es un subproducto del proceso de elaboración de queso, por lo cual se emplearon prácticas artesanales con el fin de emular las características propias del suero producido artesanalmente en áreas rurales del pacífico de Nicaragua.

Para la elaboración del queso y el lactosuero, se empleó leche fresca la cual no fue sometida a ningún pre-tratamiento. La leche fue obtenida de la finca Santa Rita ubicada en la comunidad de La Fuente, León municipio de Malpaisillo. La leche previa a la adición de la pastilla de coagulante fue depositada en un recipiente plástico esterilizado.

El método de elaboración del lactosuero artesanal empleado consiste en la dilución completa de media pastilla de cóctel bacteriano (pastilla coagulante) marca Súper Cuajo Luna M. (basado en enzimas extraídas del hongo *Rhizomucor miehei*) en un volumen equivalente a 3,5 galones de leche fresca. Se dejó reposar la mezcla por un periodo de 25 a 30 minutos durante los cuales se formarán coágulos de queso en la superficie de estos. Posteriormente estos fueron separados mecánicamente empleando una malla de tela esterilizada, obteniendo la separación del lactosuero y el queso.

El lacto suero fue almacenado en un recipiente plástico hermético esterilizado, el cual fue refrigerado en un termo con hielo durante su transporte desde la finca Santa Rita hasta la Planta de tratamiento de suelo San Benito, con el fin de mantener la integridad del suero y evitar la fermentación de este durante el transporte.

#### **4.4.4 Activación de la enzima comercial**

Para la activación de la enzima comercial, se usó la mezcla empleada en la Planta San Benito para el proceso de biorremediación de suelos, activador enzimático comercial, el cual se caracteriza por ser una mezcla de nutrientes (azúcares) y *pseudomonas fluorescens* degradadoras de hidrocarburos.

El proceso de activación de las enzimas se realizó 24 horas previas a su aplicación según indicaciones del fabricante, dicho proceso de activación se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

-Dilución: Se colocaron 0,5 gr de activador enzimático en una malla de nylon dentro de un recipiente el cual contiene 6 L de agua no clorada.

-Reposo: Se dejó reposando por un periodo de 12 horas.

-Enriquecimiento: Al culminar la etapa de reposo se agregó 0,1 lb de azúcar refinada a la mezcla y se dejó reposar por otras 12 horas más.

Una vez transcurridas las 24 horas del proceso de activación de las enzimas están listas para su aplicación.

#### **4.4.5 Evaluación de parámetros de interés durante el experimento**

El procedimiento de monitoreo y seguimiento realizado a cada una de las celdas piloto se detalla a continuación, así mismo en la tabla 4.6 se presentan la cantidad de muestras tomadas para cada parámetro durante el experimento.

**Tabla 4.6** Numero de muestras de suelo tomadas para cada parámetro

Parámetros	Numero de muestras por etapa (unidad)			
	Caracterización (semana 0)	Quinta semana	Decima semana	Monitoreo (1-10 semana)
pH en extracto acuoso	1	6	6	-
pH de campo	1	-	-	60
Humedad	1	-	-	60
Temperatura	1	-	-	60
HTP-ROD	1	6	6	-
Materia Orgánica	1	-	-	60
Actividad Enzimática deshidrogenasa	1	6	6	-
Conteo Heterotrófico en Placa	1	-	6	-

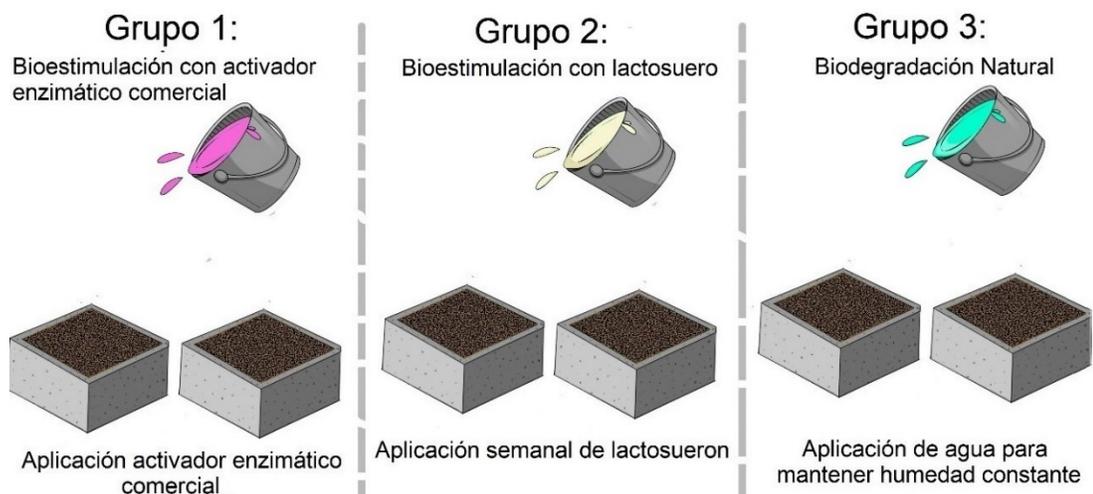
### **Monitoreo de Parámetros físicos, químicos y biológicos en el suelo contaminado.**

Previo a las aplicaciones semanales del activador enzimático comercial y el lactosuero se realizaron mediciones de los parámetros de control (temperatura y humedad) los cuales fueron medidos in-situ empleando los equipos de medición, citados en la tabla 4.2.

Posterior a la lectura de parámetros in-situ se recolectaron dos muestras de cada una de las celdas, empleando el método de cuarteo mostrado en la figura 4.4, durante las 10 semanas que duró el experimento. Las muestras tomadas se emplearon una para el análisis de pH en el laboratorio de planta San Benito y la segunda muestra fue rotulada, empacada y preservada en un termo con hielo para enviarse al laboratorio (CIRA-UNAN) para la determinación del porcentaje de materia orgánica presente en la muestra.

### **Aplicación de activador enzimático comercial y lactosuero en celda piloto**

Para la evaluación de los procesos de biorremediación empleando; lactosuero, activador enzimático comercial y la atenuación natural, se diseñaron 6 celdas piloto, las cuales fueron divididas en tres grupos como se muestra en la figura 4.5.



**Figura 4.5:** Distribución de grupos de tratamiento en celdas para experimento

Al primer grupo se le realizaron aplicaciones semanales de activador enzimático comercial, al segundo grupo se le realizaron aplicaciones semanales de lactosuero y el tercer grupo al cual se le adicionó agua tratada para mantener la humedad. La aplicación del lactosuero y activador enzimático se llevó a cabo por irrigación y homogenización empleando una pala metálica para cada una de las celdas, las aplicaciones se realizaron una vez por semana, con el fin de no sobresaturar el medio.

El periodo de aplicación para todos los tratamientos fue de diez semanas, este periodo se precisó tomando en cuenta la experiencia obtenida de los casos de biorremediación ex situ realizados en la planta de tratamiento de suelos San Benito, en la cual los lotes de suelo contaminado con HTP-ROD logran concentraciones por debajo de los límites permisibles establecidos por la normativa NOM-138-SEMARNAT//SS-2003 en periodos de cuatro a diez semanas.

### **Periodo de Degradación**

El proceso de biorremediación se caracteriza por ser un proceso lento en comparación otras técnicas como la reducción química. Basado en esto es necesario crear las condiciones y medios aptos a los microorganismos para la degradación del hidrocarburo, esto requirió tiempo para consumir el hidrocarburo como sustrato, por esto es necesario la implementación de un periodo de reposo en el cual la matriz suelo no fue alterada ni manipulada.

Es durante este periodo de reposo (6 días) entre aplicaciones en el cual se dio la bioaumentación de bacterias, desarrollo de actividades enzimáticas y biodegradación del hidrocarburo en el suelo afectado. Por lo cual de las diez semanas que se proyectó el experimento, se obtuvieron 10 días de aplicación y sesenta días de reposo.

## **Determinación de parámetros químicos y biológicos del suelo en tratamiento**

Posterior al muestreo de caracterización se realizaron dos muestreos los cuales fueron el muestreo de seguimiento (realizado durante la quinta semana de tratamiento) y el muestreo final (realizado durante la décima semana de tratamiento), para estos muestreos se emplearon los mismos métodos y materiales utilizados durante la caracterización.

El muestreo de seguimiento se realizó entre la cuarta y la sexta semana, momento donde se esperaba la mayor actividad microbiana. En este muestreo se determinaron las variaciones que presentaron los parámetros químicos (HTP-ROD, pH en extracto acuoso, materia orgánica) y biológicos (actividad enzimática deshidrogenasa).

Una vez finalizado el periodo de experimentación (diez semanas), se realizó el muestreo final, con el fin de determinar las concentraciones de hidrocarburo y demás parámetros químicos y biológicos en el suelo tratado empleando las tres tecnologías evaluadas (BDAE, BLS y BDN).

Las muestras tomadas se rotularon de la siguiente manera: la letra M seguida del número correspondiente a la semana de tratamiento (por ejemplo, toda muestra tomada en la quinta semana lleva el prefijo M5) seguido de la identificación de la celda muestreada (M5C1 por ejemplo correspondería a la identificación de una muestra tomada durante la quinta semana de tratamiento, en la celda uno).

### **Análisis e interpretación de resultados**

Los resultados obtenidos de los parámetros físicos, químicos y biológicos fueron tabulados y graficados empleando Microsoft Excel, con el fin de representar y procesar los datos durante los tres muestreos y el monitoreo.

Los parámetros químicos (pH, materia orgánica) fueron analizados e interpretados de acuerdo con los criterios establecidos por la normativa NOM-021-RECNAT-2000 (véase tabla 4.5), la cual establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Así mismo, se realizaron un análisis de varianza el cual se hizo uso del software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), con el fin de determinar si los tratamientos (BDAE, BLS, BDN) muestran diferencias significativas.

### **Análisis estadístico de parámetros de interés.**

Dada la cantidad de celdas de tratamiento empleadas en el estudio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Este análisis compara las medias de la variable dependiente entre los grupos o categorías de la variable independiente.

Al aplicar ANOVA de un factor se calcula un estadístico o test denominado F y su significación. El estadístico F o F-test (se llama F en honor al estadístico Ronald Fisher) se obtiene al estimar la variación de las medias entre los grupos de la variable independiente y dividirla por la estimación de la variación de las medias dentro de los grupos (Cárdenas, 2015).

Al realizar varios análisis de ANOVA de un factor, aquel con F más alto indicará que hay más diferencias y por tanto una relación más fuerte entre las variables. La significación de F se interpretará como la probabilidad de que este valor de F se deba al azar. Siguiendo un nivel de confianza del 95%, el más utilizado en ciencias sociales, cuando la significación de F sea menor de 0,05 es que las dos variables están relacionadas.

Si la significancia es menor de 0,05 es que las dos variables están relacionadas y por tanto que hay diferencias significativas entre los grupos

#### **4.5 Determinación de la eficiencia de remoción del diésel en matriz suelo**

La determinación de la eficiencia de remoción del diésel en el suelo contaminado fue realizada durante el muestreo de seguimiento (Quinta semana de tratamiento) y una vez finalizado el tratamiento (Décima semanas de tratamiento).

Para la determinación del porcentaje de remoción del diésel se empleó la ecuación 4.10. Procesándolo mediante el uso de tablas en Excel.

$$E = \frac{(C_{Do} - C_{Df})}{C_{Do}} * 100 \quad (\text{ec. 4.10})$$

Dónde:  $E$  es la eficiencia de remoción en valores porcentuales (%),  $C_{Df}$  es la concentración final de hidrocarburo en mg/kg,  $C_{Do}$  es la concentración inicial de hidrocarburo en mg/kg.

Así mismo se realizó una comparación cualitativa de las características del suelo tratado por cada una de las tres técnicas de biorremediación. Los resultados de las medias de los parámetros de control fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación múltiple de medias de Turkey, a 0,05 de significancia. En todos los casos, los análisis estadísticos fueron realizados con el auxilio del programa computacional SPSS.

#### **4.6 Evaluación de resultados respecto a la normativa de uso.**

La concentración del diésel en el suelo tratado se evaluó comparativamente con los límites establecidos por la normativa adoptada NOM-138-SEMARNAT//SS-2003 (véase anexo D), con el fin de determinar si los niveles de diésel contenido en el suelo tratado logran cumplir con esta normativa.

La determinación del cumplimiento o no cumplimiento de la normativa permitió determinar la factibilidad de las técnicas implementadas según la normativa y los porcentajes de remoción obtenidos en cada tratamiento.

## V. Análisis y discusión de resultados

En el presente acápite se presentan los resultados obtenidos de la prueba piloto realizada en las celdas ubicadas en la Planta de Tratamiento de Suelos Contaminados. Todos los reportes de laboratorios se encuentran copilados en el anexo B.

### 5.1. Características físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado

Los resultados de los parámetros físicos, químicos y biológicos determinados durante el muestreo de caracterización son presentados en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1:** Parámetros físicos químicos y biológicos del suelo contaminado

Parámetro de Control	Resultado	Unidad de Medida
Temperatura	26	°C
Humedad	18	%
Densidad	1,9	g/cm <sup>3</sup>
Textura	franco arcilloso	-
HTP-ROD	2400	mg/kg
pH	8,9	-
pH en extracto acuoso	8,665	-
Materia Orgánica	1,86	%
Actividad enzimática deshidrogenasa	1,78	µg de INTF (g de suelo seco *2h)
Conteo heterotrófico en placa	26240	UFC/g

#### 5.1.1 Parámetros físicos iniciales

El suelo contaminado presentó una textura o granulometría inicial de 25% arena, 30% limo y 45% arcilla, por lo cual se categorizó como un suelo franco arcilloso. La densidad aparente obtenida fue de 1,9 g/cm<sup>3</sup>, que se considera un suelo de baja densidad en concordancia con la clasificación de densidad del suelo según Gutiérrez (2010).

Una densidad media es propicia para la implementación de técnicas de biorremediación que involucren la adsorción de complejos en fase acuosa dado a su gran espacio entre poros que facilita la conductividad hidraulica en el medio. Rose (1996) afirma que un suelo de densidad baja-media permite que la dispersión, movilización y homogenización del suelo sea mas fácil, así mismo se señala que a mayor presencia de materia organica, mayor retención de humedad en el medio.

La humedad y la temperatura son parametros susceptibles al medio ambiente y condiciones en el cual se ubican . La temperatura media inicial 26°C estuvo dentro

del rango de temperatura óptima de crecimiento para organismos mesófilos (15°C -35°C) lo cual para fines del estudio implica que la temperatura del suelo es apta para el desarrollo de microorganismos empleados en la biorremediación. Así mismo la humedad media inicial medida fue del 18 %, que se encuentra dentro del rango recomendado(15-25%) para la implementación de técnicas de remediación de suelo por adición de sustratos (Cerrato & Rojas, 2006).

### **5.1.2 Parámetros químicos iniciales**

La concentración inicial de HTP-DRO determinada durante el muestreo de caracterización fue de 2400 mg/kg, valor el cual al ser comparado con la normativa de referencia NOM-138-SEMARNAR/SS-2003 supera al límite establecido para suelos de uso domiciliar y agrícola (1200mg/kg). Sin embargo, el suelo presenta una concentración inferior a la establecida por la normativa de referencia para suelos de uso industrial (5000 mg/Kg).

El contenido de materia orgánica en el suelo contaminado es de 1,86% por lo cual según la NOM-021-RECNAT-2000 todo suelo de origen volcánico con un porcentaje de materia orgánica igual o inferior al 4% es clasificado como un suelo muy bajo en materia orgánica. Jaramillo (2002) afirma que un suelo pobre en materia orgánica es poco apto para usos agrícolas. Sin embargo, es un suelo con posibles usos en construcción como suelo selecto para relleno o compactación.

El valor del pH tanto en extracto acuoso (8,66) como el pH en campo (8,9) son considerados fuertemente alcalinos según la NOM-021-RECNAT-2000. Los suelos alcalinos según Sepúlveda (2011) son característico de suelos afectados por hidrocarburos derivados del petróleo.

### **5.1.3 Parámetros biológicos iniciales**

El conteo de organismos heterotrofos presenta una cantidad de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) mayor de 1000 UFC recomendadas por (Ferreira, 2013) por lo cual es un suelo apto para el tratamiento biológico del suelo. Así mismo presenta una moderada actividad enzimática deshidrogenasa la cual es atribuida a la presencia de los microorganismos presentes en la matriz contaminada.

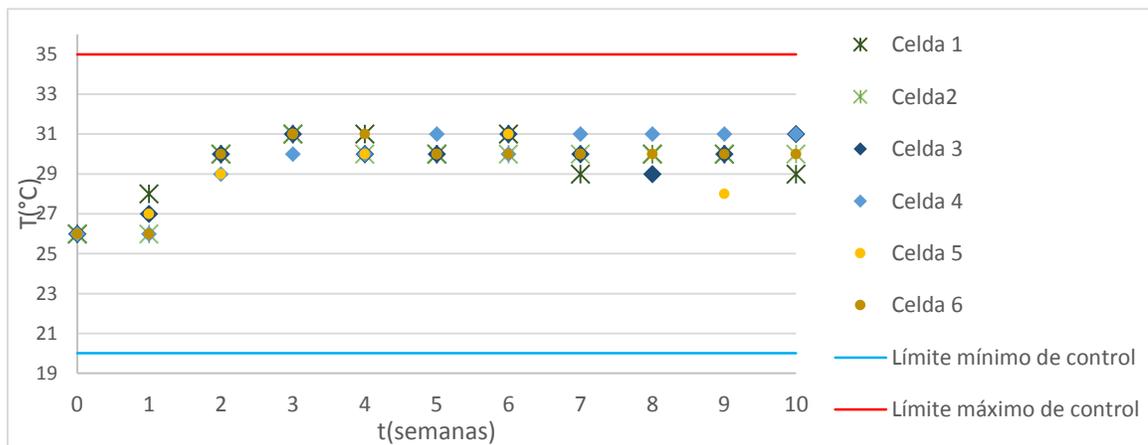
La presencia de la actividad enzimática deshidrogenasa en el suelo contaminado es un indicador de la presencia de microorganismos especializados en la degradación de hidrocarburos, recalando que la diversidad microbiana disminuye en un suelo contaminado prevaleciendo mayormente los organismos especializados para sobrevivir en el medio (Margesin R., 2001).

## 5.2 Comportamiento de los parámetros físicos en el suelo durante el tratamiento

A continuación, se presentan los resultados de los parámetros físicos (temperatura y humedad) realizados durante el tratamiento del suelo. De esta misma manera las tablas con los resultados obtenidos se presentan en los anexos B.

### 5.2.1 Temperatura del suelo durante el tratamiento

En la figura 5.1 se muestra el grafico de control para la temperatura monitoreada en las seis celdas durante los tratamientos. En el Apéndice B.1 se presentan los valores obtenidos durante el experimento y en los Apéndice A1 al A3 se presenta la varianza por tratamiento de este parámetro. En la tabla 5.4 se presentan los valores mínimos, máximos, media y varianza para los tres tratamientos.



**Figura 5.1** Grafico de control de la temperatura durante el tratamiento

Los valores de temperatura del suelo durante el experimento estuvieron en un rango entre 26 (inicio de los experimentos) y 31 °C en las seis celdas, estando dentro del rango recomendado para la biorremediación empleando organismos mesófilos (20 a 35°C) según Hellmunth (2003).

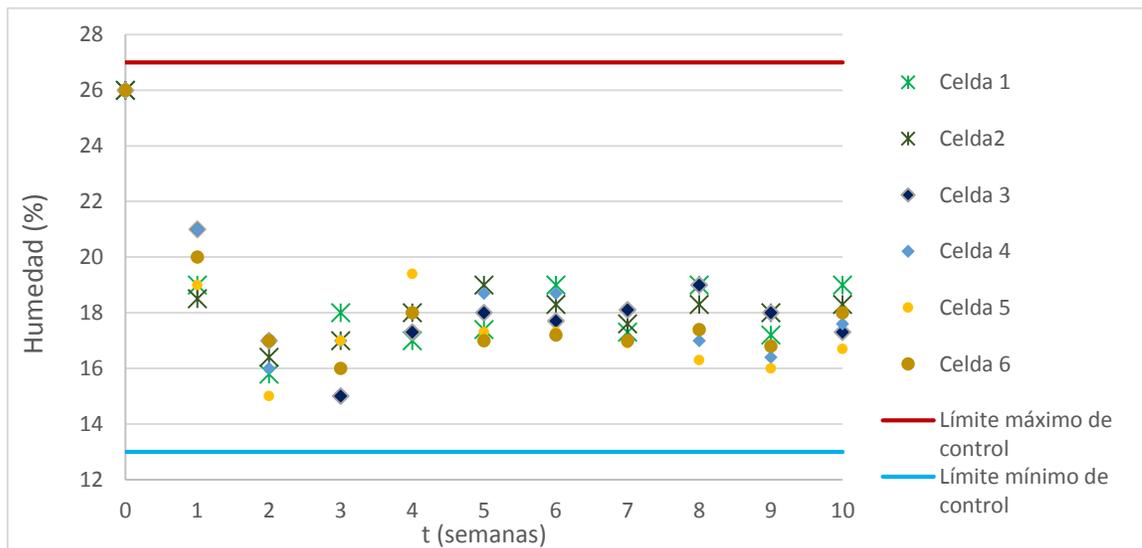
El tratamiento BDAE (Celdas 1 y 2) fue el que presentó menos variación en temperatura y el de BLS (Celdas 3 y 4) fue el que presentó la mayor variación. Sin embargo, la prueba estadística ANOVA no detectó diferencias significativas de este parámetro por tratamiento. En la tabla 5.2 se presenta un resumen de la estadística descriptiva de la temperatura en los tres tratamientos de interés.

**Tabla 5.2:** Resumen de estadística descriptiva de la temperatura en los tres tratamientos de interés.

Tratamiento	Mínimo	Máximo	Media	Varianza	Desviación Estándar
<b>BDAE</b>	26	31	29,8	1,32	1,15
<b>BLS</b>	26	31	29,95	1,83	1,36
<b>BDN</b>	26	31	29,7	1,69	1,30

### 5.2.2 Humedad del suelo durante el tratamiento

En la figura 5.2 se muestra el grafico de control de los valores presentados por las seis celdas durante el tratamiento. En la Tabla B.3 del Anexo se presenta los valores obtenidos durante el experimento para las seis celdas. Así mismo en las Figuras A5, A6, A7 y A8 del apéndice A se muestra el comportamiento de la humedad por tratamiento.



**Figura 5.2** Grafico de control de la humedad durante el tratamiento

Los valores del porcentaje de humedad en el suelo durante el experimento oscilaron en un rango entre 15 y 21% en las seis celdas. Por lo cual, la humedad se encuentra dentro del rango recomendado para la biorremediación empleando organismos mesófilos.

En la tabla 5.3 se presentan los valores máximos, mínimos, media, varianza y desviación estándar obtenidos de la humedad por tratamiento

**Tabla 5.3:** Resumen de estadística descriptiva de la humedad en los tres tratamientos

<b>Tratamiento</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>Varianza</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>BDAE</b>	15,8	19	17,47	0,789	0,89
<b>BLS</b>	15	21	17,43	2,24	1,49
<b>DBN</b>	15	20	16,85	1,68	1,29

La humedad media presentó valores cercanos al 17% de humedad, para las celdas tratadas con BDAE el valor medio de esta fue de 17,47, mientras que para las celdas tratadas con BLS y BDN los valores medios fueron 17,43 y 16,85 respectivamente.

### **5.3 Comportamiento de los parámetros químicos en el suelo durante los tratamientos**

A continuación, se reportan los resultados de los análisis químicos realizados durante el tratamiento del suelo.

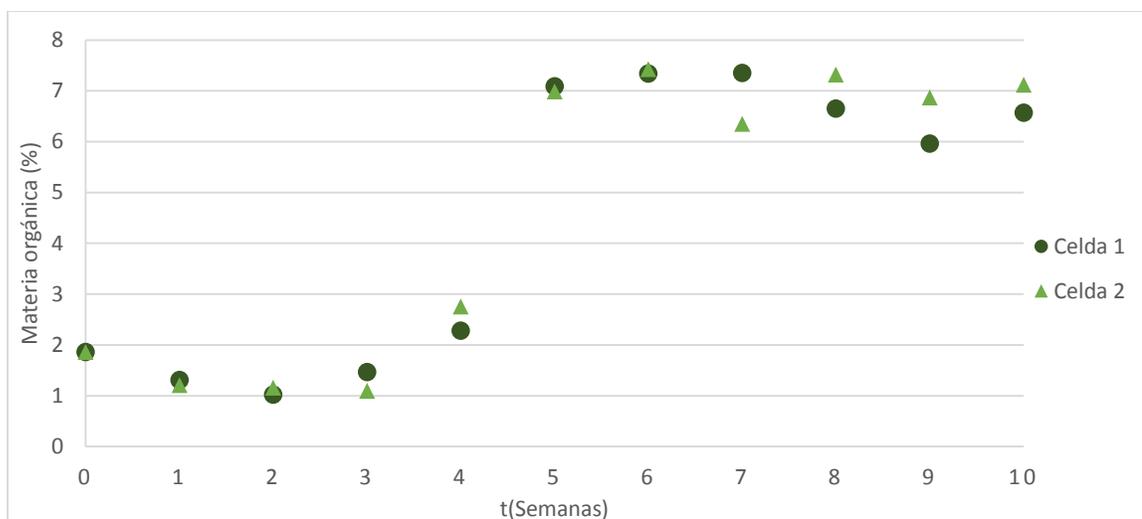
#### **5.3.1 Comportamiento de materia orgánica**

El contenido de materia orgánica fue monitoreado semanalmente, determinándose el comportamiento de este parámetro durante el tratamiento. Los valores obtenidos de materia orgánica a lo largo de las diez semanas de tratamiento en las seis celdas de tratamiento se presentan en la tabla B.5 del Apéndice B.

#### **Comportamiento de materia orgánica durante el tratamiento BDAE**

En la figura 5.3 se muestra el comportamiento de la materia orgánica en las celdas 1 y 2 durante el tratamiento con activador enzimático comercial. Ambas celdas presentaron comportamientos similares, sin diferencias significativas entre ellos.

En ambas celdas la MO contenida en el suelo presentó una disminución en las primeras dos semanas de tratamiento. Mientras que desde la tercera hasta la sexta semana se tuvo un incremento, y a partir de la séptima semana la MO presentó variaciones entre ambas celdas, siendo estas las siguientes: El contenido de MO en la celda uno disminuyó desde la séptima hasta la novena, incrementándose en la última semana. Por otro lado, la celda dos presentó un comportamiento variable donde la MO presenta ligeros aumentos y disminuciones entre cada semana.



**Figura 5.3** Variación del contenido de materia orgánica de celdas tratadas con BDAE

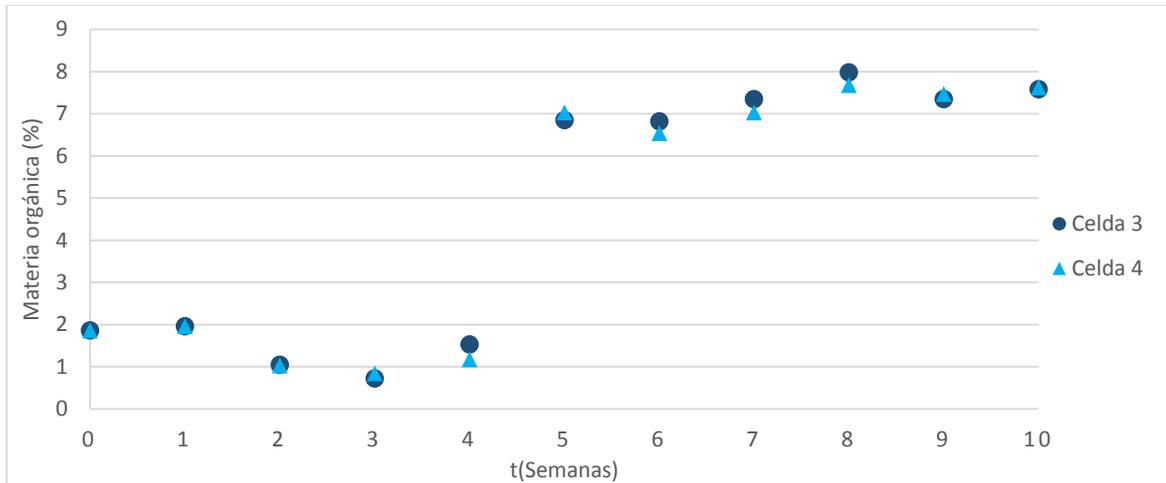
La disminución de la materia orgánica en las primeras dos semanas de la celda 1 y en las primeras tres semanas de la segunda celda de tratamiento posiblemente se ve atribuido a la disminución de la concentración del hidrocarburo en el suelo. Ferreira (2001) explica que la materia orgánica presenta una relación directamente proporcional a la cantidad de hidrocarburo en el suelo.

El posterior aumento de la materia orgánica puede deberse al aumento de la biomasa disponible debido a la adición del activador enzimático en el suelo. Este aumento súbito de la MO dado entre la cuarta y quinta semana es posiblemente atribuido a que la cantidad de microorganismos especializados no es capaz de sintetizar la biomasa adicionada a la misma velocidad en que este es agregado.

El periodo comprendido entre la séptima y décima semana se caracterizó por presentar un comportamiento variable entre ambas celdas, esto posiblemente es atribuido a la recirculación de nutrientes. El proceso de recirculación de nutrientes es regulado por los caminos de la red trófica que descomponen la materia en nutrientes minerales (Elser, 1999).

### **Comportamiento de materia orgánica durante el tratamiento BLS**

En la figura 5.4 se muestra el comportamiento de la materia orgánica respecto al tiempo en las celdas tratadas con BLS.



**Figura 5.4** Variación del contenido de materia orgánica en celdas tratadas con BLS

De manera similar el suelo tratado con BDAE, el suelo tratado con BLS presentaron las mismas etapas con diferencias en el periodo de duración de estas.

El suelo muestreado la primera semana de tratamiento presentó un leve aumento en el contenido de MO, respecto al valor muestreado durante la caracterización del suelo. En ambas celdas la MO contenida en el suelo presentó una disminución en las primeras tres semanas de tratamiento respecto al contenido de MO en la primera semana de tratamiento. La disminución en la materia orgánica presentada durante las primeras tres semanas de tratamiento al igual que en el tratamiento BDAE es atribuida a la disminución de la concentración del hidrocarburo y crecimiento de la fauna microbiana en la matriz.

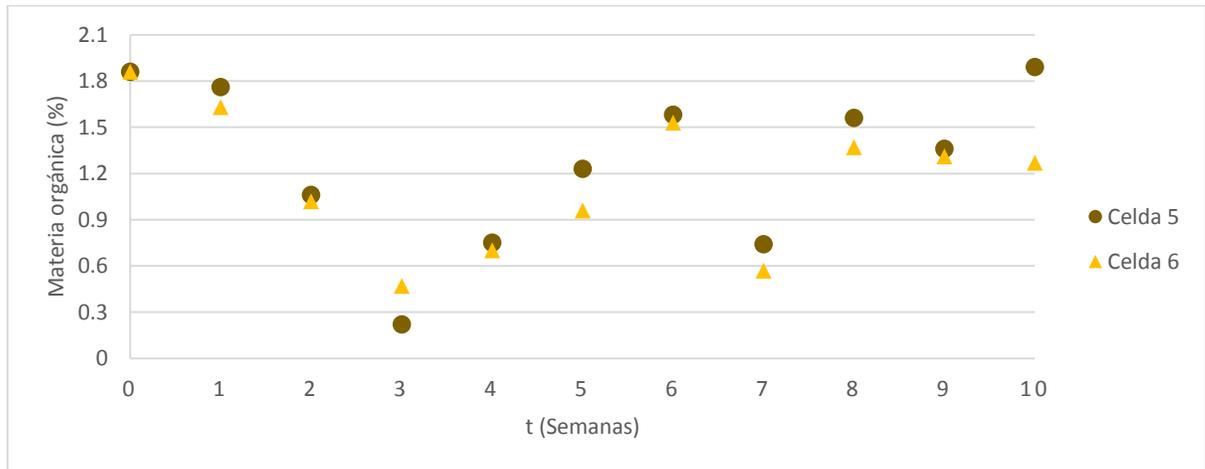
El periodo comprendido entre la cuarta y la quinta semana presentó un incremento, y a partir de la sexta semana la MO presentó en ambas celdas un comportamiento variable entre semana y semana teniendo ligeros aumentos y disminuciones que oscilaron entre un 6,5 y 8% de MO.

Durante la cuarta y la quinta semana se presenta en ambas celdas un aumento en la materia orgánica respecto los valores obtenidos en las semanas previas de tratamiento, esto probablemente debido a la adición del lactosuero rico en materia orgánica en forma lactosa, proteínas, calcio, fósforo, lactato entre otros compuestos.

Así mismo el comportamiento variable presentado a partir de la sexta semana de tratamiento es debido a la recirculación de nutrientes. Este comportamiento presentó una mayor duración y homogeneidad en las celdas tratadas con BLS que las celdas tratadas con BDAE

## Comportamiento de materia orgánica durante el tratamiento BDN

En la figura 5.5 se muestra el comportamiento de la materia orgánica respecto al tiempo en las celdas tratadas con BDN. El suelo tratado con BDN se caracterizó principalmente por no presentar aumentos considerables en la materia orgánica respecto al porcentaje de MO inicial.



**Figura 5.5** Variación del contenido de materia orgánica respecto al tiempo en celdas tratadas con BDN.

El porcentaje de MO en las primeras tres semanas de tratamiento disminuyó en el periodo de las primeras tres semanas de tratamiento. La disminución del porcentaje de MO en las primeras tres semanas podría atribuirse a la síntesis y degradación del hidrocarburo en el suelo. En el cual el sustrato (el diésel) del cual se alimentan los microorganismos disminuye conforme aumenta la cantidad de organismos en el suelo.

En el periodo comprendido entre la cuarta y sexta semana se presentó un aumento de la materia orgánica, seguido de un comportamiento variable a partir de la séptima semana. El aumento en la materia orgánica se podría atribuir a la recirculación del hidrocarburo en el suelo tras la síntesis de los microorganismos autótrofos y heterótrofos en el suelo.

El comportamiento variable presentado por ambas celdas a partir de la séptima semana puede ser debido a los ciclos bioquímicos que se presentan en la matriz y que están regidos por la red trófica presente en el medio.

### Clasificación del suelo tratado según el contenido de materia orgánica

Al realizar el análisis de varianza entre los tres tratamientos empleados, se determinó que no existe diferencia significativa en los valores obtenidos en el

tratamiento de BDAE y BLS. Sin embargo, para el tratamiento BDN varía significativamente respecto a los dos tratamientos anteriores.

En la tabla 5.4 se presenta los contenidos iniciales y finales del suelo tratado con los tres tratamientos. En esta se observa que el suelo tratado con BDAE triplicó su contenido de MO, y el suelo tratado con BLS aumento cuatro veces su contenido de MO, por último, el suelo tratado con BDN se mantiene igual o menor que el suelo contaminado original.

**Tabla 5.4** Variación de materia orgánica en el suelo antes y después del tratamiento.

Tratamiento	Celda	Muestreo		Contenido de Materia orgánica según NOM-RECNAT
		Inicial	Final	
BDAE	Celda 1	1,86	6,57	Medio
	Celda 2		7,12	Medio
BLS	Celda 3		7,58	Medio
	Celda 4		7,63	Medio
BDN	Celda 5		1,89	Muy bajo
	Celda 6		1,27	Muy bajo

Basado en la clasificación de los suelos de la norma NOM-RECNAT, se determina que el suelo obtenido con el tratamiento BDN es un suelo muy bajo en materia orgánica, debido a que esta es menor al 4%. Por otro lado, el suelo tratado con BDAE y BLS son suelos con un contenido medio de materia orgánica, debido a que el contenido de materia orgánica está entre 6,1 y 10,9 %.

Según (Jaramillo, 2002) porcentajes de materia orgánica entre el 3 y 20% representan suelos aptos para cultivo, mientras que suelos con materia orgánica menor a 3% son recomendados para uso de relleno o construcción. Basado en esto se determina que el contenido de materia orgánica en el suelo tratado con BDAE y BLS son suelos aptos para cultivo, mientras que el suelo tratado con BDN es apto para relleno y construcción.

### 5.3.2 Comportamiento del pH en extracto acuoso y en suelo

Los valores obtenidos de pH tanto en extracto acuoso como en el monitoreo de campo presentan valores similares a lo largo del tratamiento. A continuación, se presentan los resultados para ambos métodos de medición de pH.

## pH en extracto acuoso

En la tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos del pH en extracto acuoso, el cual durante el análisis de caracterización presentó un valor fuertemente alcalino. Este valor de pH según Sepúlveda (2011) es característico de suelos afectados por hidrocarburos derivados del petróleo previo a la formación de ácidos carboxílicos por la descomposición de estos.

Durante el muestreo de seguimiento se presentó una disminución en el valor de pH para todos los tratamientos, lo cual puede deberse a que los microorganismos generan ácidos carboxílicos durante la descomposición del hidrocarburo, así mismo generan un ambiente cercano al pH neutral para su mayor desarrollo.

**Tabla 5.5** Resultados de pH en extracto acuoso del suelo contaminado.

Tratamiento	Celda	Muestreo de Caracterización	Muestreo de Seguimiento	Muestreo Final
BDAE	Celda 1	8,66	7,56	7,43
	Celda 2		7,75	7,97
BLS	Celda 3		7,95	7,88
	Celda 4		7,74	7,95
BDN	Celda 5		8,19	8,68
	Celda 6		8,37	8,78

La disminución en el pH fue mayor en las celdas tratadas con BDAE y BLS las cuales presentaron pH en el rango de 7,56 y 7,95, siendo estos valores ligeramente alcalinos. Mientras que el suelo tratado con BDN presentó una ligera disminución durante el muestreo de seguimiento. Sin embargo, con valores entre 8,1 y 8,4 este suelo se considera fuertemente alcalino.

El muestreo final presentó un pH inferior al obtenido durante el muestreo de caracterización. Los suelos tratados con BDAE y BLS presentaron un comportamiento variable entre las celdas, presentándose aumentos y disminuciones respecto a los valores obtenidos durante el muestreo de seguimiento. El suelo tratado con BDN presentó un aumento en el pH del suelo tanto respecto al muestreo inicial como al muestreo de seguimiento.

Según (Ramirez, 2012) la biorremediación en suelo bajo las mismas condiciones puede presentar comportamientos variables, debido a la heterogeneidad del suelo y la variabilidad de comportamientos que puedan presentar los organismos autóctonos y alocónos del suelo. Por lo que resulta comprensible que ambos tratamientos en los que se empleó la bioestimulación presentaran comportamientos distintos.

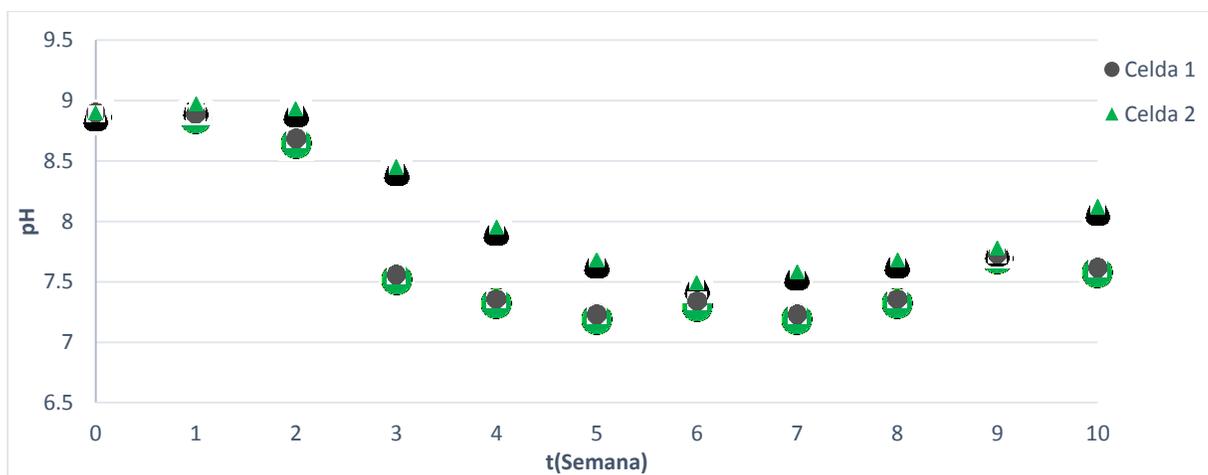
El incremento del pH en el suelo tratado con BDN, podría deberse a la falta de sustratos que contribuyan a la formación de los ácidos carboxílicos una vez finalizase el proceso de degradación.

### pH de campo en suelo

Los valores de pH de campo presentaron un comportamiento análogo al presentado por el pH en extracto acuoso, con un pH alcalino al iniciar el experimento y tras cuatro semanas de aplicación se mostró variaciones significativas en el pH del suelo tratado con BDAE y BLS. Obteniéndose al terminar el experimento suelo con pH ligeramente alcalino, mientras que el suelo tratado con BDN este no varió y se mantuvo con un pH fuertemente alcalino a lo largo del experimento.

### Comportamiento del pH en suelo para BDAE

En la figura 5.6 se muestra el comportamiento del pH en ambas celdas de tratamiento. Los valores de pH durante este tratamiento están en el rango de 7,2 y 9 por lo que se considera presentó pH entre moderadamente alcalino y neutro.

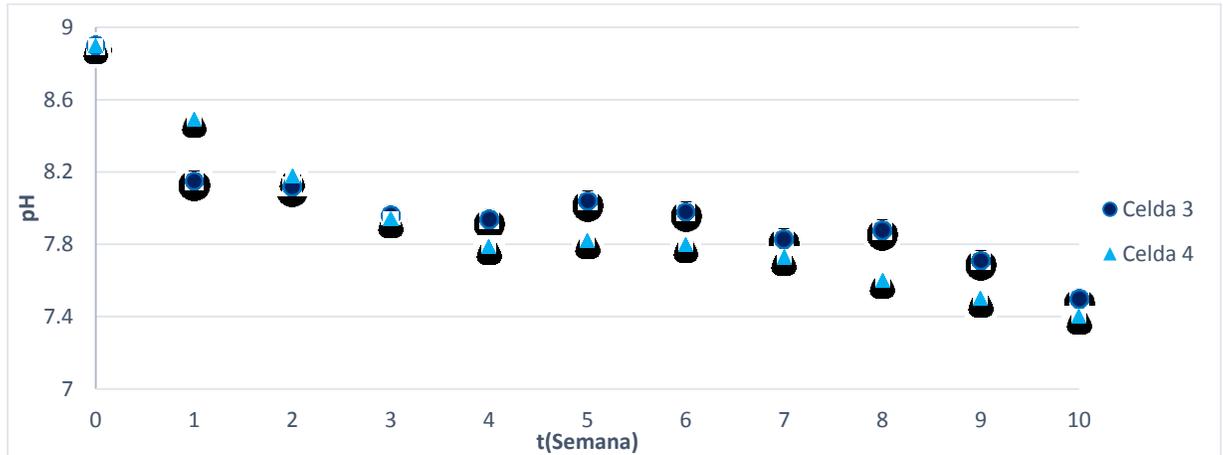


**Figura 5.6** Variación del pH durante el tratamiento BDAE

La disminución inicial del pH es atribuida en su mayoría a la formación de ácidos carboxílicos debido a la degradación del hidrocarburo en la matriz. El aumento de pH en el periodo comprendido entre la séptima y novena semana es atribuible a la disminución en la actividad microbiana en el suelo así como a la disminución de la formación de ácidos carboxílicos y compuestos derivados de la degradación del hidrocarburo

### Comportamiento del pH en suelo para el tratamiento BLS

La figura 5.7 presenta el comportamiento del pH durante las 10 semanas de tratamiento en las celdas tratadas con lactosuero. El pH varió en un rango entre 8,5 y 7,4 lo cual es considerado entre fuertemente alcalino y medianamente alcalino.



**Figura 5.7** Variación del pH durante el tratamiento BLS

El pH del suelo tratado con BLS presentó una tendencia a la acidificación durante todo el proceso, esta tendencia puede ser atribuida a la degradación del hidrocarburo y a la formación de ácido láctico al degradarse el lacto suero en el suelo. (Haller, 2015) detalla que la formación de ácidos carboxílicos y ácidos lácticos presentes en la matriz tratada es evidencia de la actividad enzimática que se da en esta durante la degradación del hidrocarburo. El comportamiento de amortiguación que se da durante la tercera y octava semana es consistente con el periodo de reposo o meseta, en el cual el crecimiento microbiano disminuye, así como el proceso de degradación de sustratos.

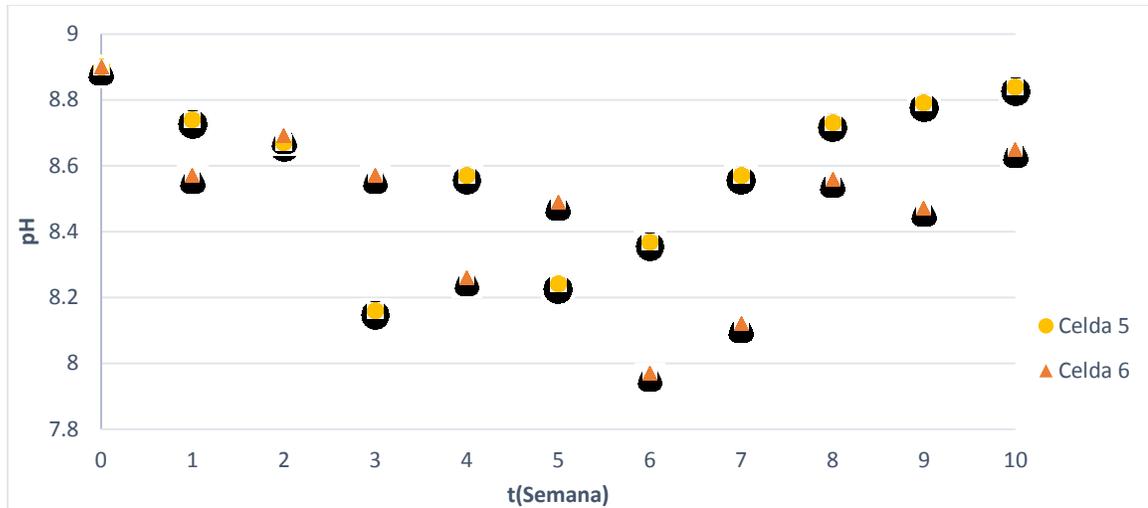
### Comportamiento del pH en suelo para el tratamiento BDN

En la figura 5.8 se presenta el comportamiento del pH durante las diez semanas de tratamiento. El comportamiento presentado por el pH se mantuvo durante las diez semanas de tratamiento en el rango entre 8,0 y 8,8 por lo cual se desarrolló en un medio entre fuertemente alcalino y medianamente alcalino.

El comportamiento presentado por ambas celdas se caracterizó por ser discrepante entre las dos celdas durante las diez semanas de tratamiento, esto probablemente se deba a que, dado a la no adición de sustratos externos que estimulasen el crecimiento microbiano, los organismos autóctonos se comportaran a distinto en cierta medida.

Lo que se observa en la figura es una tendencia a la disminución desde la semana 1 hasta la semana 6, y luego se presentó un incremento hasta alcanzar el valor de la primera semana.

Al realizar el análisis de varianza en los valores obtenidos de pH de campo se determinó que de los tres tratamientos el suelo tratado con BDAE presentó la mayor variación de pH durante el tratamiento, seguido del tratamiento con BLS y el que presentó menos variaciones fue el tratamiento de BDN.



**Figura 5.8** Variación del pH durante el tratamiento BDN

### 5.5 Resultados parámetros biológicos durante el tratamiento

A continuación, se presentan los resultados de los análisis biológicos realizados durante el muestreo de seguimiento y final.

#### 5.2.6 Conteo de Organismos heterotróficos

Los valores obtenidos de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/gr) se presentan en la tabla 5.6. Los suelos tratados con bioestimulación (BDAE y BLS) presentaron aumentos importantes en la cantidad de colonias respecto a los valores iniciales ( $10^3$  a  $10^4$ ), mientras que los suelos tratados con BDN presentaron una disminución importante (82 %).

El aumento de la abundancia de UFC en el tratamiento BLS se basa en la producción del sustrato preferido (ácido láctico) por diversos grupos microbianos, como son las *Pseudomonas*, Bacilos, azoto bacterias y rizo bacterias (Morgado, 2017). El aumento de las UFC en el tratamiento de BDAE podría justificarse debido al paso de enriquecimiento con azúcar durante la activación del AEC, lo que daría a los grupos microbianos presentes la suficiente energía para poder

reproducirse de acuerdo a Gámez (2015). Por el contrario, es normal que haya una disminución de las densidades en el tratamiento BDN debido a la falta de sustrato suficiente para mantener las poblaciones existentes.

**Tabla 5.6** Resultados del conteo de organismo heterotróficos en suelo tratado

Tratamiento	Celda	Muestreo inicial	Muestreo final
		UFC / gramo de suelo	
BDAE	Celda 1	26 x 10 <sup>3</sup>	35x10 <sup>4</sup>
	Celda 2		39x10 <sup>4</sup>
BLS	Celda 3		83x10 <sup>4</sup>
	Celda 4		16x10 <sup>4</sup>
BDN	Celda 5		3 x 10 <sup>3</sup>
	Celda 6		6 x 10 <sup>3</sup>

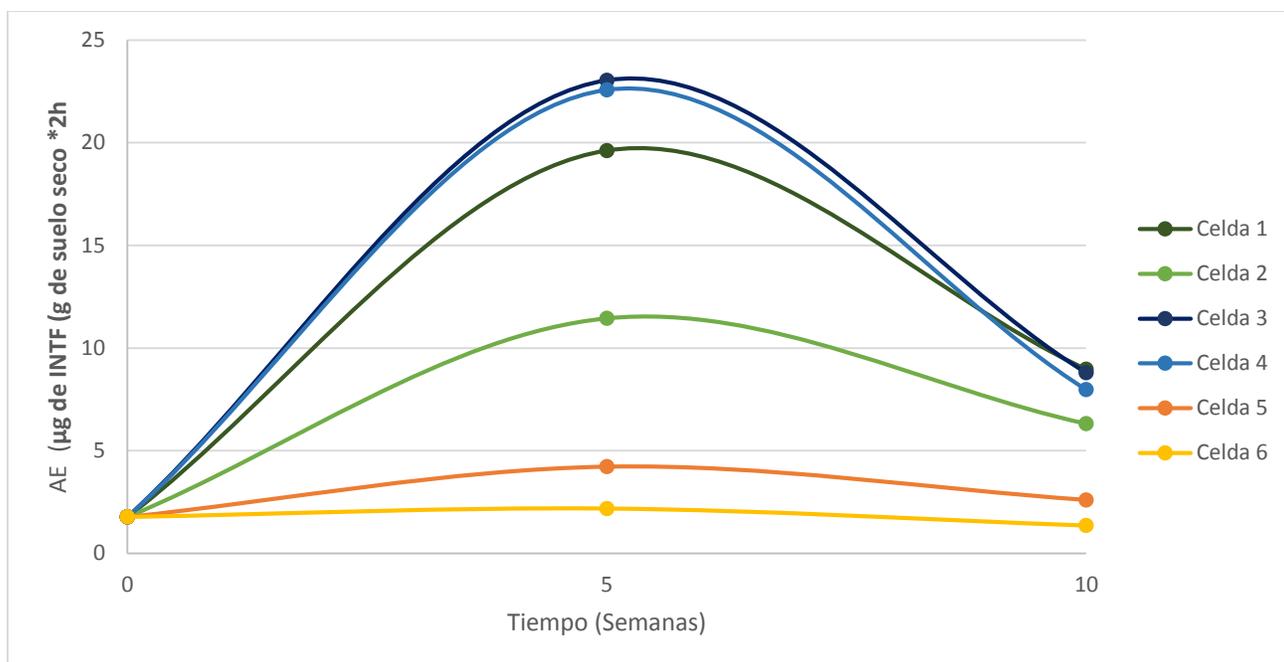
La disminución de UFC/gr se debe a que, dada la falta de adición de sustratos, los organismos predominantes en el medio son aquellos especializados para un medio contaminado (pH alcalino, baja materia orgánica, alta concentración de diésel). Según (Hellmunth, 2003) en un medio contaminado los organismos no especializados en la síntesis del contaminante decrecen, predominando únicamente los organismos especializados en las condiciones creadas por el suelo contaminado

### 5.2.7 Actividad enzimática deshidrogenasa

La actividad enzimática de deshidrogenasas presentó en general un comportamiento bifásico al detectarse un aumento importante en el muestreo de seguimiento (semana 5) seguido de una disminución (semana 10) (tabla 5.10).

Los tratamientos con BLS y BDAE se distinguieron por presentar un aumento de 6 a 13 veces la concentración inicial en las primeras 5 semanas. La actividad enzimática de deshidrogenasas es directamente proporcional a la degradación de hidrocarburos en suelo (Margesin, 2001) y a la actividad microbiana (), por lo que se podría establecer que el período comprendido entre la primera y quinta semana de tratamiento es cuando se presentó la mayor actividad biológica así como la mayor remoción del hidrocarburo. El diésel ha sido reportado como un inductor del incremento en la actividad enzimática de deshidrogenasas, normalmente a bajas concentraciones de contaminante (Wu *et al.*, 2014).

En el caso del tratamiento BDN ,otra posible causa del alcance de estos valores tan inferiores a los iniciales podría ser el agotamiento de los nutrientes en el entorno necesarios para la actividad de la comunidad microbiana (Baran *et al.*, 2004).



**Figura 5. 9** Variación temporal de la AE durante el tratamiento

## 5.6 Remoción del diésel en matriz suelo

A continuación se presenta las variaciones en las concentraciones del diésel (HTP-ROD) durante los tratamientos, así como el porcentaje de remoción de este y su comparación respecto a la normativa adoptada.

### 5.6.1 Concentración de diésel en el suelo

En la tabla 5.7 se muestran los valores obtenidos para la concentración del diésel durante el proceso de degradación. El análisis de hidrocarburos totales de petróleo en el rango orgánico de diésel (HTP-ROD) presentó una concentración inicial de 2400 mg/kg.

Durante las primeras cinco semanas de tratamiento la concentración del diésel en el suelo contaminado disminuyó considerablemente de la siguiente forma; en las dos celdas tratadas con BDAE este vario entre 260 y 340, mientras que las celdas tratadas con BLS las concentraciones en cada celda fueron 260 y 300 mg/kg respectivamente. Por otro lado, las celdas tratadas con BDN presentaron valores entre 350 y 490 mg/kg. Estos valores reflejan que los tres tratamientos implementados (BDAE, BLS, BDN) al suelo contaminado reducen considerablemente la concentración de HTP-ROD en el suelo tratado.

Según (Hellmuth S., 2003) la etapa de estimulación y desarrollo en la biorremediación se caracteriza por un incremento de la población microbiana y disminución de la biomasa que funciona como nutriente para los microorganismos especializados. Por lo cual, se puede inferir esta etapa se presentó durante el periodo comprendido entre el muestreo de caracterización y el muestreo de seguimiento (en las primeras cinco semanas de tratamiento).

**Tabla 5.7** Concentraciones de diésel (HTP-ROD) durante los muestreos inicial, seguimiento y final para los tres tratamientos de suelo.

Tratamiento	Celda de Tratamiento	Concentración de HTP-ROD (mg/kg)		
		Muestreo de Caracterización (Semana 0)	Muestreo de seguimiento (Semana 5)	Muestreo final (Semana 10)
BDAE	Celda 1	2400	260	74
	Celda 2		340	18
BLS	Celda 3		260	55
	Celda 4		300	69
BDN	Celda 5		350	62
	Celda 6		490	63

En el muestreo final el suelo tratado con BLS y BDN presentó concentraciones finales en el rango de 55 mg/kg y 69 mg/kg, y suelo tratado con el BDAE presento valores entre 18 y 74 mg/kg. Obteniéndose una disminución en la concentración de HTP-ROD a la presentada en el muestreo de seguimiento.

Se puede definir que durante periodos de diez o cinco semanas se presenta una reducción en la concentración de hidrocarburo en los tres tratamientos. Presentándose mayor reducción en la concentración de hidrocarburo en el periodo comprendido en las primeras cinco semanas de tratamiento.

El suelo tratado con BDAE y BLS son los que presentaron a lo largo del tratamiento concentraciones de hidrocarburo más cercanas y menos variables, que el suelo tratado con BDN. (Ramírez, 2012) Determinó que la biorremediación en suelo bajo las mismas condiciones puede presentar comportamientos variables, esto debido a que el suelo es una matriz heterogénea la cual al ser sometida a bioaumentación puede presentar distintos tipos de interacción entre los microorganismos autóctonos y alóctonos.

### 5.6.2 Porcentaje de remoción de diésel en el suelo tratado.

El porcentaje de remoción determinado durante el muestreo de seguimiento realizado en la quinta semana de tratamiento se presenta en la tabla 5.8 mientras que en la tabla 5.9 se muestra durante la décima semana de tratamiento.

**Tabla 5.8** Evaluación cualitativa del porcentaje de remoción en la 5ta semana de tratamiento.

Tratamiento	Celda de Tratamiento	Porcentaje de remoción en el muestreo de seguimiento (%)	Evaluación cualitativa de la remoción (Hellmunth, 2001)	Evaluación cualitativa de la remoción (Hamann, 1990)
BDAE	Celda 1	89,17	Eficiente	Bueno
	Celda 2	85,83	Eficiente	Bueno
BLS	Celda 3	89,17	Eficiente	Bueno
	Celda 4	87,50	Eficiente	Bueno
BDN	Celda 5	85,42	Eficiente	Bueno
	Celda 6	79,58	Buena	Bueno

El suelo tratado con BDAE presentó un porcentaje de remoción de HTP-ROD entre 85 y 89% durante las primeras cinco semanas de tratamiento, por lo cual según (Hellmunth S., 2001) es un tratamiento eficiente para la remoción de diésel, mientras que según (Hamann, 1990) es un buen tratamiento.

Del mismo modo que el tratamiento con BDAE, el tratamiento con BLS presentó en las primeras cinco semanas de tratamiento porcentajes de remoción de HTP-ROD entre el 87 y 89% de diésel, siendo considerado también una alternativa eficiente para la remoción del diésel según (Hellmunth 2001) y bueno según (Hamann,1990).

El suelo en el que se empleó la BDN presento durante la quinta semana de tratamiento un porcentaje de remoción de diésel comprendido entre el 79 y 85% lo cual según (Hamann, 1990) y (Hellmunth, 2001) representa un tratamiento bueno-eficiente.

**Tabla 5.9** Evaluación cualitativa del porcentaje de remoción al finalizar el tratamiento.

Tratamiento	Celda de Tratamiento	Porcentaje de remoción en el muestreo final (%)	Evaluación cualitativa de la remoción (Hellmunth, 2001)	Evaluación cualitativa de la remoción (Hamann, 1990)
BDAE	Celda 1	96,92	Muy eficiente	Excelente
	Celda 2	99,25	Muy eficiente	Excelente
BLS	Celda 3	97,71	Muy eficiente	Excelente
	Celda 4	97,13	Muy eficiente	Excelente
BDN	Celda 5	97,42	Muy eficiente	Excelente
	Celda 6	97,38	Muy eficiente	Excelente

Al finalizar el tratamiento del suelo con BDAE, BLS y BDN se logró una remoción del diésel contenido inicialmente superior al 95%, por lo que se puede considerar un tratamiento muy eficiente en la remoción del contaminante según (Hellmunth, 2001), y un tratamiento excelente según (Hamann, 1990).

Los resultados obtenidos presentan que el suelo tratado con BDAR, BLS y BDN confirman la hipótesis planteada al inicio del experimento, determinándose que los tres tratamientos ex situ son eficientes para suelos contaminados con diésel que presenten características similares a las del suelo tratado en el presente estudio.

## **VI. Conclusiones**

El suelo contaminado con diésel presentó características de un suelo afectado recientemente por hidrocarburo (pH alcalino, humedad y temperatura características de la zona, bajo contenido de materia orgánica, con una gran actividad biológica), por lo cual era un suelo viable para someter a tratamiento biológicos.

Basada en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo tratado se determinó que el suelo tratado con BDAE y BLS presenta un mayor grado de recuperación de la matriz, siendo esta después del tratamiento apta para uso agrícola. Así mismo el suelo tratado con BDN, presenta características similares al inicio del tratamiento, por lo que es un suelo apto para uso como material de relleno en construcción.

Se determinó que los tratamientos ex situ empleando BDAE, BLS y BDN al suelo contaminado con diésel, son técnicas muy eficientes para diez semanas de tratamiento, obteniéndose porcentajes de remoción superiores al 95%, mientras que para cinco semanas de tratamiento se obtuvieron porcentajes de remoción entre el 75 y el 90%, por lo que se consideran técnicas eficientes.

El suelo tratado empleando las tres técnicas de remediación presentaron concentraciones entre 78 y 490 mg/kg de HTP-ROD para el periodo comprendido entre la primera y quinta semana de tratamiento, siendo estas concentraciones inferiores al límite máximo permisible establecida por la NOM-138-SEMARNAT, cumpliendo con concentraciones admisibles para suelos de uso agrícola o domiciliar.

## **VII. Recomendaciones**

Para futuros estudios en técnicas de biorremediación se aconseja delimitar el periodo experimental a las primeras cinco semanas de tratamiento puesto que en estas se desarrolla la mayor degradación de hidrocarburo.

Se recomienda el uso de la técnica BDN para el tratamiento industrial de suelo contaminados con diésel que presente características físicas, químicas y biológicas similares a las del presente estudio.

## Nomenclatura

BDAE	Bioestimulación con activador enzimático.
BLS	Bioestimulación con lactosuero.
BDN	Biodegradación natural.
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo.
EPC	Environmental Protection & Control.
ROG	Rango orgánico de la gasolina en mg/kg.
ROD	Rango orgánico del diésel en mg/kg.
ORO	Rango orgánico del óleo en mg/kg.
pH	Potencial de hidrogeniones, grado de acidez o alcalinidad.
MO	Porcentaje de materia orgánica en el suelo.
$\rho_r$	Densidad real del suelo en g/cm <sup>3</sup> .
$V_c$	Volumen del cilindro en cm <sup>3</sup> .
$V_s$	Volumen del suelo.
$P_{ss}$	Peso del suelo seco.
$\theta_m$	Contenido de agua.
$m_w$	Masa perdida de agua al calentarse en g.
$m_s$	Masa del suelo húmedo en g.
$\theta$	Contenido de agua como fracción de volumen.
$\rho_w$	Densidad del agua a la temperatura ambiente.
BCN	Banco Central de Nicaragua
INE	Instituto Nicaragüense de Energía
MARENA	Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales.
MEM	Ministerio de Energía y Minas
BTEX	Compuestos de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.
PAHs	Hidrocarburos aromáticos poli cíclicos.
TNT	Trinitrotolueno
$E$	Eficiencia de remoción en valores porcentuales (%)
$C_{Df}$	Concentración final de diésel en mg/kg.
$C_{Do}$	Concentración inicial de diésel en mg/kg.
SPSS	Siglas en inglés para Paquete estadístico para ciencias sociales (Statistical Package for the Social Sciences)
CIRA	Centro de investigación de recursos hídricos
UNAN	Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
USEPA	Por sus siglas en inglés Agencia de Protección del Medio Ambiente (United States Environmental Protection Agency)
$\rho_{asc}$	Densidad aparente del suelo contaminado
$\theta_{mc}$	Contenido de agua en el suelo contaminado.
$m_{wc}$	masa de agua perdida en el suelo húmedo
$m_{sc}$	masa de suelo contaminado húmedo
$\theta_{sist}$	Contenido de humedad en el sistema
$\theta_0$	Contenido de humedad inicial
$\Theta_{ag}$	Contenido de humedad agregado

$D_{mx}$	Dosificación acuosa máxima permitida en $L/m^3$
$D_{mn}$	Dosificación acuosa mínima permitida en $L/m^3$
$D_0$	Dosis acuosa inicial en $L/m^3$
$D_{smx}$	Dosificación máxima acuosa establecida por las condiciones de control en $L/m^3$
$D_{smn}$	Dosificación mínima acuosa establecida por las condiciones de control en $L/m^3$
$V_{AE}$	Volumen aplicado de activador enzimático
$D_{RAE}$	Dosificación recomendada del activador enzimático en $L/m^3$
$D_{TLS}$	Dosis aplicada de lactosuero en $L/m^3$
$D_H$	Dosificación sugerida de lactosuero por Haller en $L/m^3$
$C_{de}$	Concentración de diésel en el suelo contaminado del experimento en mg/kg.
$C_{dh}$	Concentración de diésel en el suelo contaminado del experimento realizado por Haller (mg/kg)
$V_{LS}$	el volumen aplicado de lactosuero en L
INTF	2-p-io dinitrofenil formazano

## Bibliografía

- Aguilar, M. R. (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.
- Alcolea, E. G. (1952). *Química Orgánica: Estructura y Nomenclatura*. Universidad de Murcia.
- Alexander R.Wilm Roelofsen(1987). Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns.
- Ana Pastor, E. d. (2004). *Guía sobre suelos contaminados*. Zaragoza: Gobierno de España Departamento de Economía, Hacienda y Empleo.
- Arellano, F. (17 de 12 de 2009). Nicaragua lidera remediación de los suelos con bacterias. *La Prensa*, pág. 5 A.
- Auge, D. M. (2008). *Hidrogeología Ambiental*. Buenos Aires: Facultad de Ciencias exactas y Naturales.
- Bautisa, A. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Asociación Española de Ecología Terrestre. Revista Científica y Tecnológica de Ecología y Medio Ambiente*
- BCN. (11 de 11 de 2017). Banco Central de Nicaragua. Obtenido de Base de Datos Estadísticos:  
<http://www.bcn.gob.ni/estadisticas/siec/demoFrameset.html>
- Boul, S. W., & Cracken, H. y. (1973). *Soil Genesis and Classification*. Iowa: Iowa State University.
- Cerrato, R. F., & Rojas, N. G. (2006). Proceso de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM*, 179-187.
- Chamorro, A. (31 de 01 de 2018). *blogspot.com*. Obtenido de <http://agronomiaandrea.blogspot.com/p/naturaleza-del-suelo.html>
- CE. (16 de 12 de 2017). Archivos Comisión Europea. Obtenido de [http://web.archive.org/web/20110720162258/http://ies.jrc.ec.europa.eu/uploads/media/TTW\\_Report\\_010307.pdf](http://web.archive.org/web/20110720162258/http://ies.jrc.ec.europa.eu/uploads/media/TTW_Report_010307.pdf)

- Doran, J.W. y Parkin, B.T. 1994. Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication. Number 35. Madison, Wisconsin, USA.
- Efstathia Tsakali, K. P. (2003). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. Departamento de Progettazione e Gestione dei Sistemi Agrozotecnici e Forestali.
- Elser J.J.(1999) The stoichiometry of consumer –driven nutrient recycling :Theory , Observation and consequences.
- Fulgencio, R. (2012). Estudios de la Naturaleza 7°. Satillana.
- Ganem, A. Y. (2010). Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados Mediante El Proceso de Electroquímica. México D.F.: Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura.
- Garay, S. (22 de 12 de 2017). Obtenido de: <https://elxsuelo.es.tl/Clasificaci%F3n-de-los-suelos.htm>
- Gutierrez M. , Ortiz C. (2010) , Claves para la taxonomía de suelos. Departamento de agricultura de los Estados Unidos. Servicio de conservación de Recursos Naturales.
- Haller, H. (2015). Appropriate Technologies for soil remediation in low prioritized regions-developing countries and sparsely populated regions. Ostersund, Sweden: Departmente of Ecotechnology and sustainable building engineering.
- Hernández, A. (1999). Determinación simultánea de seis hidrocarburos policíclicos aromáticos en medio micelar por regresión de mínimos cuadrados parciales utilizando espectros de fluorescencia de angulo variable lineal.
- Jaramillo, D. F. (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Keller, T. H. (2010). Estimation of Reference Bulk Density from soil particle size distribution and soil organic matter content. Geoderma.
- Ramírez, L.R (2004). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. México: Instituto de Ingeniería, UNAM.
- Leth, E. (14 de Noviembre de 2017). Blogspot.com. Obtenido de <http://elsueloequipo4.blogspot.com/2009/02/clases-de-suelo-los-suelos-muestran.html>

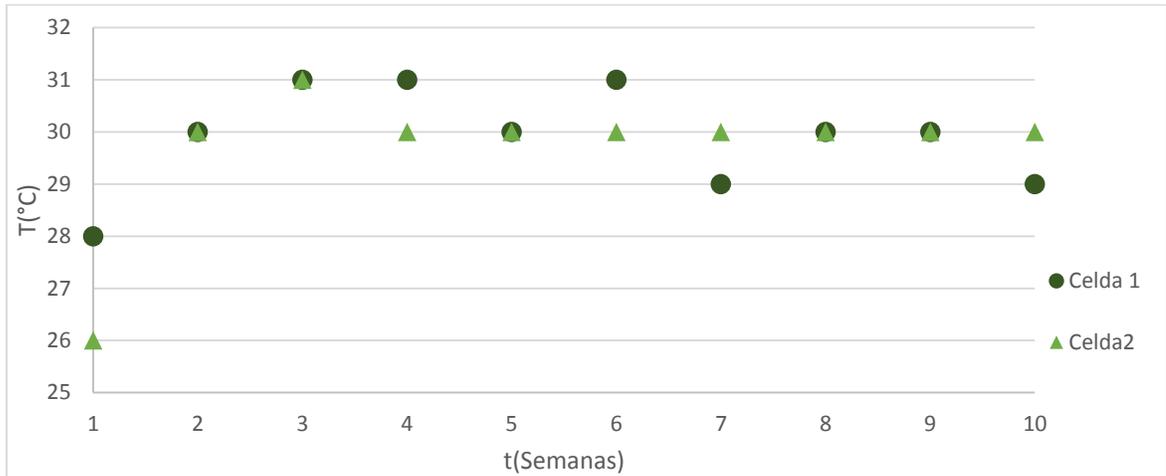
- Lopez, E. (18 de Agosto de 2016). Explota segundo tanque de almacenamiento de Puma Energy en Puerto Sandino. La Prensa.
- Morgenstern.A. (1961). Introduction to soil microbiology. Tokyo: Toppan Company.
- Manahan, S. E. (2007). Introducción a la Química Ambiental. Editorial Reverté.
- Margesin R, S. F. (2001). Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures.
- Marshall, T., Holmes, J., & Rose, C. (1996). Soil physics. New York: Cambridge University.
- Martinez, L. E. (18 de Junio de 2017). Conductor Lesionado en Vuelco de Cisterna. HOY.
- Morgado R., Bruno et al. "Effect of l-lactic acid from whey wastes on enzyme activities and bacterial diversity of soil." *Biology and Fertility of Soils* 53 (2017): 389-396.
- Ortega, L. P. (2010). Introducción estudio del suelo. En L. P. Ortega, Introducción estudio del suelo (págs. 10-25). Valencia, España: IES Santiago Grisolia
- Ortinez Brito, I. I. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica Mexico*, 83-92.
- Osteberg TL, J. A. (2007). The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 334-341.
- Pastor A, Gonzales M. (2004) Guía sobre suelos contaminados. Gobierno de Aragón. Departamento de Economía, Hacienda y Empleo de la España.
- Porto, J. P. (10 de Diciembre de 2017). Definición De. Obtenido de <https://definicion.de/organismo-heterotrofo/>
- Prezi. (12 de mayo de 2014). Ficha de Enzimas para tratamiento de aguas servidas y riles. Ficha técnica.
- Quirine Ketterings, K. C. (2017). Guidelines for Land Application of Acid Whey. Ithaca, Nueva York: Department of Animal Science, College of Agriculture & Life Sciences, Cornell University.

- Williams, R. J. (1998). Estimation of Infiltration Rate in the Vadose Zone: Application of Selected Models.
- Reid, S. K. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* (págs. 269-283).
- Riese-Roberts E., 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. *Physical , Chemical and Biological Processes*.
- Riesco, R. A. (2012). Proyecto de Recuperación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos. Cedanyola del Vallés: Universidad Nacional de Barcelona.
- Rodríguez Morgado, B. J. (2017). Effects of L-lactic acid from whey wastes on enzyme activities and bacterial diversity of soil. *Biology and Fertility of soils*, 389-396.
- Rose, M. (2000). The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. En W. G. Margesin Rose, *Acta Biotechnologies* (págs. 313-333).
- Saval, S. (2007). La Biorremediación como alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos. México D.F.: Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, UNAM.
- Schinner F, O. R. (1996). *Methods in Soil Biology*. New York.
- Schmidt, W. (2002). Suelos contaminados con hidrocarburos: La biorremediación como una solución ecológicamente compatible.
- Schnurer J, R. T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl Environmental Microbiology*, 1256-1261.
- Serrano, M.F., Torrado, L.M. & Pérez, D.D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Ciencia y Tecnología*. 11, 233-244.
- Sepulveda, J. A. Tania Volke (2002). *Tecnologías de Remediación de Suelos Contaminados*. México: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).
- USDA, U. S. (1993). Soil Survey Division Staff: *Soil Survey manual Handbook No. 18*. Washington: (USDA).
- Soreen Hellmunth, C. R. (2003). Tecnologías de remediación de suelo. En *Remediación de suelos* (págs. 45-59). Leipzig: ITK Universitat.

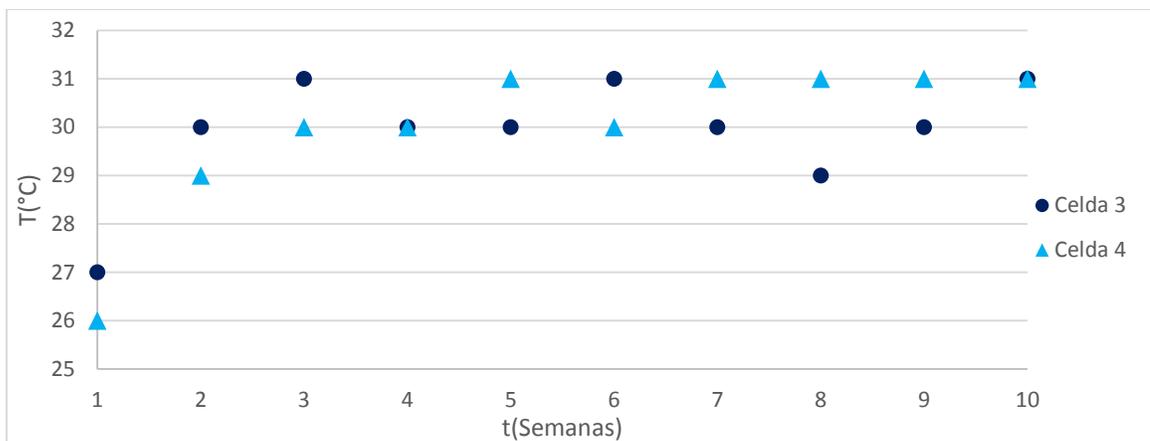
- Torres, V., & J., V. (2003). Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental INE–SEMARNAT. México.
- Van Deuren, Z. W. (1997). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide 3a Ed. EPA: Technology Innovation Office, EPA.
- Van Wambeke, A. y. (1982). Determinación de los regímenes de humedad y temperatura para los suelos de Chile. En A. y. Van Wambeke, Agricultura Técnica (Chile) (págs. 149-159).
- Velasquez, S. A. (2014). Programa de Zootecnia: Modulo de Pastos y Forrajes. Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Ochoa, B. H.-M.-R. (2007). Actividad Enzimática como indicadores de calidad del suelo en agro ecosistemas ecológicos. Revista Universidad de JAÉN, 35-45.
- W.J. Sharrat, A. P. (1962). Effect of whey on soil and plant Growth. American Society of Agronomy, 359.
- Zuñiga, F. B. (1999). Introducción al estudio de la contaminación de suelo por metales pesados. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

## **Apéndices**

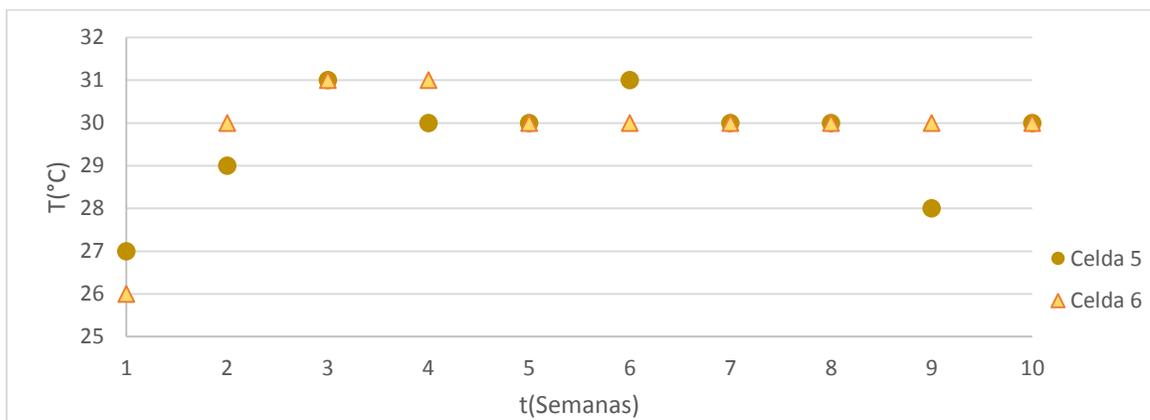
## Apéndice A: Graficas



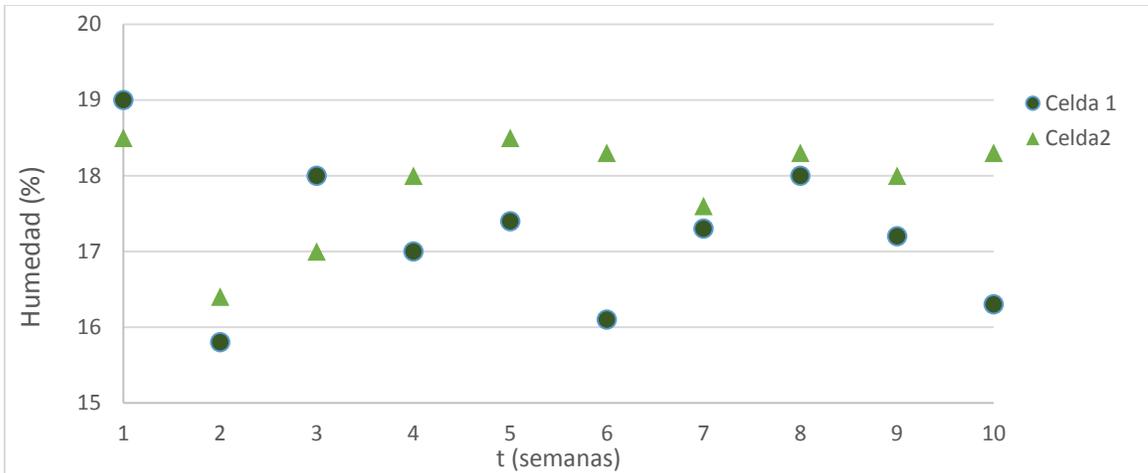
**Figura A.1:** Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BDAE



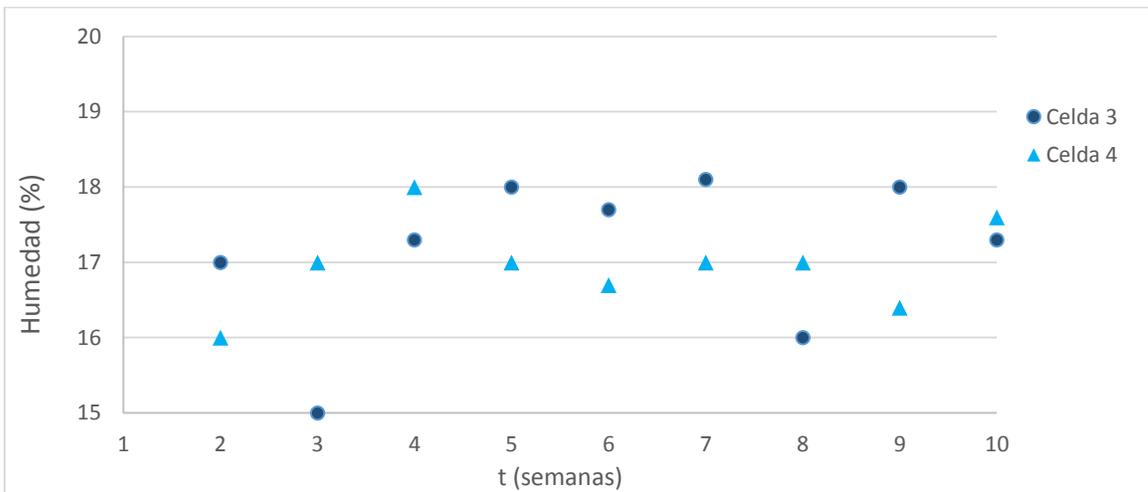
**Figura A.2:** Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BLS



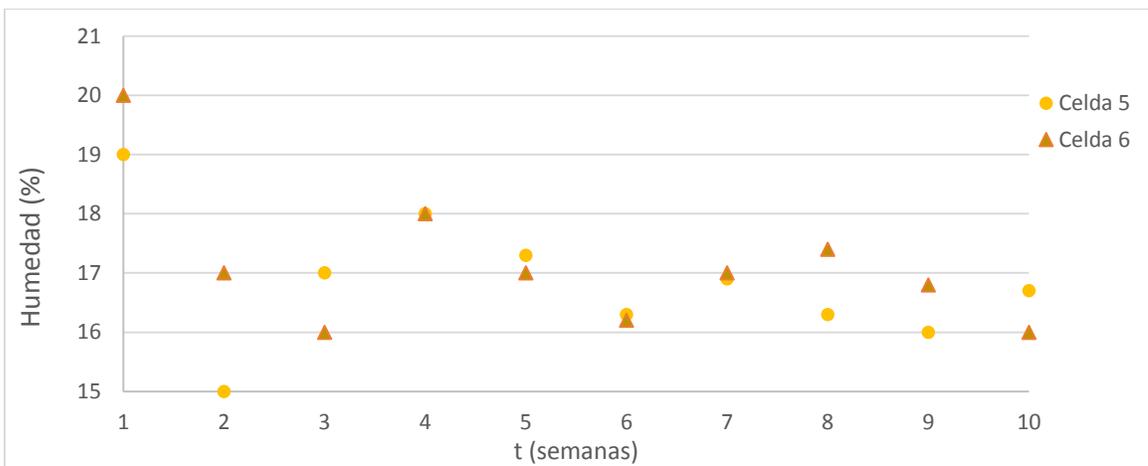
**Figura A.3:** Comportamiento de la temperatura en las celdas tratadas con BDN



**Figura A.4:** Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BDAE



**Figura A.5:** Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BLS



**Figura A.6:** Comportamiento de la humedad en las celdas tratadas con BDN

## Apéndice B: Tablas

**Tabla B.1:** Valores de Temperatura en °C durante el tratamiento

Tiempo (semanas)	Tratamientos					
	DBAE		DBLS		DBN	
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6
1	28	26	27	26	27	26
2	30	30	30	29	29	30
3	31	31	31	30	31	31
4	31	30	30	30	30	31
5	30	30	30	31	30	30
6	31	30	31	30	31	30
7	29	30	30	31	30	30
8	30	30	29	31	30	30
9	30	30	30	31	28	30
10	29	30	31	31	30	30

**Tabla B.2:** Prueba post-Hoc de análisis de varianza entre tratamientos para la T °C

		(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	DBAE	DBLS		-,15000	,40251	,926
		DBN		,10000	,40251	,967
	DBLS	DBAE		,15000	,40251	,926
		DBN		,25000	,40251	,809
	DBN	DBAE		-,10000	,40251	,967
		DBLS		-,25000	,40251	,809

**Tabla B.3:** Valores de humedad en % durante el tratamiento en las seis celdas.

Tiempo (semanas)	DBAE		DBLS		DBN	
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6
1	19	18.5	21	21	19	20
2	15.8	16.4	17	16	15	17
3	18	17	15	17	17	16
4	17	18	17.3	18	18	18
5	17.4	18.5	18	17	17.3	17
6	16.1	18.3	17.7	16.7	16.3	16.2
7	17.3	17.6	18.1	17	16.9	17
8	18	18.3	16	17	16.3	17.4
9	17.2	18	18	16.4	16	16.8
10	16.3	18.3	17.3	17.6	16.7	16

**Tabla B.4:** Prueba post-Hoc de análisis de varianza entre tratamientos para la humedad en %

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	tratamiento DBAE	tratamiento DBLS	,0350	,3967	,996
		tratamiento DNM	,6200	,3967	,270
	tratamiento DBLS	tratamiento DBAE	-,0350	,3967	,996
		tratamiento DNM	,5850	,3967	,311
	tratamiento DNM	tratamiento DBAE	-,6200	,3967	,270
		tratamiento DBLS	-,5850	,3967	,311

**Tabla B.5:** Valores de Materia orgánica en % durante el tratamiento

<b>Tiempo (semanas)</b>	<b>DBAE</b>		<b>DBLS</b>		<b>DBN</b>	
	<b>Celda 1</b>	<b>Celda2</b>	<b>Celda 3</b>	<b>Celda 4</b>	<b>Celda 5</b>	<b>Celda 6</b>
<b>1</b>	1.31	1.21	1.96	1.96	1.76	1.63
<b>2</b>	1.02	1.16	1.05	1.03	1.06	1.02
<b>3</b>	1.47	1.10	0.72	0.84	0.22	0.47
<b>4</b>	2.28	2.75	1.53	1.18	0.75	0.70
<b>5</b>	7.09	6.99	6.85	7.03	1.23	0.96
<b>6</b>	7.34	7.43	6.82	6.54	1.58	1.53
<b>7</b>	7.35	6.35	7.35	7.03	0.74	0.57
<b>8</b>	6.65	7.32	7.98	7.68	1.56	1.37
<b>9</b>	5.96	6.87	7.35	7.47	1.36	1.31
<b>10</b>	6.57	7.12	7.58	7.63	1.89	1.27

## Apéndice C. Cálculos realizados

### C.1 Cálculos Límites

Determinación de peso masa seca del suelo, tras calentarlo a 105°C por dos horas. Los resultados se muestran en la tabla C.1.1

	Peso ms (g)			
Humedad	Replica 1	Replica 2	Replica 2	Promedio
0.1	0.955	0.975	0.969	0.966
0.13	0.799	0.592	0.879	0.757
0.27	0.683	0.645	0.708	0.679

Peso masa húmeda (mw) en g por gramo de suelo húmedo

Humedad	mw (g)
0.1	0.0969
0.13	0.0984
0.27	0.1834

Empleando la densidad del agua a 25°C se determinó la proporción de agua por gramo de suelo húmedo (L/kg)

Humedad	Proporción de agua por gramo
0.1	0.0967
0.13	0.0982
0.27	0.1830

Con las mediciones realizadas de densidad aparente y el volumen de agua por gramo de suelo húmedo se determina el volumen de agua por metro cubico de suelo húmedo.

Humedad	Densidad aparente(kg/m <sup>3</sup> )	Volumen de agua por metro cubico (L/m <sup>3</sup> )
0.1	1900	183.722
0.13	1890	185.672
0.27	1920	351.341

Empleando las ecuaciones 4.5 y 4.6 con la humedad es de 0.10, 0.13 y 0.27 se determinaron las dosis máximas y mínimas aplicables

Dosis mínima permisible	1.949 L/m <sup>3</sup>
Dosis máxima permisible	22.927 L/m <sup>3</sup>

## **Anexos**

**Tabla A.2:** Concentraciones máximo permisible normativa SEMARNATT

Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola	Residencial	Industrial	
Ligera	200	200	500	EPA 8015B rango gasolina
Media	1,200	1,200	5,000	EPA 8015B rango diésel
Pesada	3,000	3,000	6,000	EPA 9071B/EPA 1664

**Tabla A.3:** Clasificación de suelo en función del pH según normativa RECNAT

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	<5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

**Tabla A.4:** Clasificación del suelo en función de la materia orgánica según normativa RECNAT

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	<4	<0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11.0-16.0	3.6-6.0
Muy alto	>16.1	>6.0