



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**“*ASPERGILLUS Y ACINETOBACTER Sp Para la
BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS*”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Ingeniero Ambiental

AUTOR:

Olivera Campos Antony Juan Manuel (ORCID: 0000-0002-4255-9692)

ASESORES:

Dr. Monteza Arbulu Cesar Augusto (ORCID: 0000-0003-2052-6707)

Dr. Ponce Ayala Jose Elias (ORCID: 0000-0002-0190-3143)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Calidad y gestión de los recursos naturales

CHICLAYO – PERÚ

2020

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación, está dedicado a todo aquel que se encuentre interesado en tener conocimientos acerca de insumos que se usa a diario en nuestro país como lo es el petróleo. Contaminante que acaba poco a poco con uno de los recursos más importantes; el suelo. Esta investigación fue hecha con todo mi esfuerzo para que lo hecho se plasme en las memorias de los siguientes investigadores que les fascine este mundo, el mundo que tenemos que ir recuperando.

Antony Juan Manuel

Agradecimiento

Mi agradecimiento es primero para Dios y La virgen que me llenaron de sabiduría y perseverancia por mi trabajo de investigación, de la misma forma agradecer a mis padres por su constancia, sus consejos brindados, pero sobre todo por su amor y la confianza puesta en mí, para culminar el presente trabajo de investigación.

Agradecer a mi asesor, por estar a mi lado y mostrar interés hacia mi trabajo de investigación y mis ideales desde el inicio de esta etapa.

Muchas Gracias.

Antony Juan Manuel

Índice de contenidos

Carátula	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. METODOLOGÍA	15
3.1. Tipo y diseño de investigación	15
3.2. Variables y operacionalización	15
3.3. Población, muestra y muestreo	15
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	16
3.5. Procedimientos	17
3.6. Método de análisis de datos	17
3.7. Aspectos éticos	17
IV. RESULTADOS	18
V. DISCUSIÓN	22
VI. CONCLUSIONES	24
VII. RECOMENDACIONES	25
REFERENCIAS	26
ANEXOS	29

Índice de tablas

Tabla 1: <i>Análisis de pH</i>	18
Tabla 2: <i>Análisis de conductividad eléctrica</i>	19
Tabla 3: <i>Resultados de parámetro de materia orgánica</i>	20
Tabla 4: <i>Método gravimétrico HTPs</i>	21

Índice de figuras

<i>Figura 1:</i> Medición de pH	18
<i>Figura 2:</i> Análisis de conductividad eléctrica.....	19
<i>Figura 3:</i> Materia orgánica.....	20
<i>Figura 4:</i> Método gravimétrico HTPs.....	21

Resumen

El trabajo de investigación “*ASPERGILLUS Y ACINETOBACTER Sp Para la BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS*”, se realizó de forma experimental, con una muestra de 15 kg de suelo contaminado por petróleo, se toma la primera muestra, en esta se analizó los parámetros pH, Conductividad Eléctrica, Materia orgánica y extracción de HTPs (Hidrocarburos totales de Petróleo). Luego se dividió en dos partes iguales. En la muestra 1 se inocula el *ASPERGILLUS*, levadura y en la muestra 2 el *ACINETOBACTER Sp* bacteria, en cada muestra se monitoreo en la 1° semana, 3° semana y 6° semana los parámetros antes mencionados.

Los resultados fueron que el *Aspergillus levadura*, su pH aumento más que con el *Acinetobacter Sp bacteria*, en la especie *Acinetobacter Sp*. la conductividad eléctrica tiende a aumentar a comparación con la especie *Aspergillus*, el recipiente con la bacteria *Acinetobacter Sp*, la materia orgánica tiende a disminuir más que el recipiente con la especie *Aspergillus*, porque el *Acinetobacter Sp* está, más en contacto con el suelo. Se observa además que la especie *Aspergillus* ha disminuido en comparación con la muestra inicial, por otro lado, con la muestra *Acinetobacter Sp bacteria* se logró disminuir, pero no a comparación con la especie *Aspergillus levadura*.

Palabras clave: *Acinetobacter Sp*, *Aspergillus* y biorremediación de suelos.

Abstract

The research work "ASPERGILLUS AND ACINETOBACTER Sp for the BIORREMIEDIATION OF SOILS CONTAMINATED BY HYDROCARBONS", was carried out experimentally, with a sample of 15 kg of soil contaminated by oil, the first one was taken, in this the pH parameters were analyzed, Electrical conductivity, organic matter and extraction of HTPs (Total Petroleum Hydrocarbons). Then it was divided into two equal parts. In sample 1 the ASPERGILLUS, Yeast is inoculated and in sample 2 the ACINETOBACTER Sp bacteria, in each sample the parameters mentioned above are monitored in the 1st week, 3rd week and 6th week.

The results were that the Aspergillus yeast, its pH increased more than with the Acinetobacter Sp bacteria, in the Acinetobacter Sp species the electrical conductivity tends to increase a comparison with the Aspergillus species, the container with the Acinetobacter Sp bacteria, the organic matter tends to decrease more than the container with the Aspergillus species, because the Acinetobacter Sp is, more in contact with the ground. It is also observed that the Aspergillus species has decreased compared to the initial sample, on the other hand, with the Acinetobacter Sp bacteria sample it was possible to decrease, but not a comparison with the yeast Aspergillus species.

Keywords: Acinetobacter Sp, Aspergillus and soil bioremediation.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación que se da en la superficie del suelo por causa de los hidrocarburos afecta directamente la flora, fauna y microorganismos del suelo (Madigan et al., 1999).

En el distrito de José Leonardo Ortiz se encuentra ubicado la mecánica Roman Diesel, donde se encuentra una porción de suelo contaminado por petróleo. La contaminación por este hidrocarburo afecta de manera directa al suelo, esto debido a que cubre el suelo cuyo efecto impide el paso de la luz además de generar otro tipo de sustratos haciendo que el suelo se degrade de manera permanente. Se usará la técnica de biorremediación a través de organismos microbiológicos, como lo son el *Aspergillus* y *Acinetobacter Sp* para el tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos, de esta manera se logrará saber que organismos metabolizará más el hidrocarburo en mención. Las técnicas de biorremediación que se usaran son de biolabranza debido a que se le proporcionara aire al suelo para que las bacterias actúen de manera eficiente, beneficiando así al suelo.

Si bien es cierto, se sabe que la tecnología actualmente va de aumento; por ende, el uso de hidrocarburos en países emergentes es más representativo.

En el Perú existen grandes hectarias de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a la antigüedad de sus oleoductos y al no dar mantenimiento y provocando la corrosión de dichos oleoductos y vida útil de los oleoductos. En estos suelos se modifican sus características fisicoquímicas y biológicas, con lo que afecta la flora fauna y los microorganismos, los oleoductos atraviesan la selva deteriorando el ambiente y las especies oriundas del lugar.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo explorar y biorremediar suelos contaminados por derrames de hidrocarburos y sus derivados.

Así mismo refiero a los métodos usados para la obtención de los cálculos en determinados parámetros ya sea pH, Conductividad eléctrica, Materia orgánica y sobre todo el método gravimétrico de Hidrocarburos totales de petróleo.

Formulación del problema

¿En la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos el *Aspergillus* es más eficiente que el *Acinetobacter sp*?

El manejo inadecuado del petróleo actúan como agentes pasivo ambientales, que de una forma u otra afectan haciendo que el suelo pierda lentamente su fertilidad, el uso de estos microorganismos como el *Aspergillus* y el *Acinetobacter sp* en la biorremediación actúan como degradadores de este tipo de hidrocarburo, haciendo de este más factible de minimizar, así de esta manera ayudándonos de biopilas se notara el cambio físico, químico y microbiológico de un suelo contaminado por petróleo, (tipo de hidrocarburo).

Para de esta manera hacer del suelo uno fértil y rico no solo para futuras plantaciones de uso agrícola si no, también plantas ornamentales, debido a que el lugar donde se ubica el problema del derrame está en un sitio estratégico para la buena visión, así no solo se beneficiará el propietario sino también a la población, haciendo de este impacto un lugar de aprovechamiento visual.

Hipótesis

El *Aspergillus*, logra la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y es más eficiente que el *Acinetobacter sp*.

Objetivos:

Objetivo general

- Determinar la eficiencia de *Aspergillus* y *Acinetobacter Sp* para la aplicación en la biorremediación de suelos por hidrocarburos.

Objetivos específicos

- Determinar el nivel de contaminación inicial por hidrocarburos en el suelo agrícola.
- Determinar el nivel de contaminación remanente luego de aplicar *Acinetobacter Sp* en el suelo contaminados por hidrocarburos.
- Determinar el nivel de contaminación remanente luego de aplicar *Aspergillus* en el suelo contaminados por hidrocarburos.

II. MARCO TEÓRICO

Pérez, Iturbe, Flores. (2006), evalúa el cambio de algunas propiedades físicas del suelo en San Agustín Tlaxco, Puebla, el cual se vio afectado por estar contaminado por derrame de gasolina "Nova". Este suelo es de uso agrícola y se encuentra ubicado al lado del derecho de la vía por donde atraviesan los poliductos de Petróleos Mexicanos (PEMEX) que transportan diésel y gasolina.

Para la biorremediación de este suelo se usó la técnica del venteo, se debe tener en cuenta que el suelo puede tener algún tipo de cambio en sus propiedades físicas. Para la evaluación se consideraron dos sitios; el suelo afectado por el derrame y un predio el cual se consideró como sitio testigo, que se ubica en una zona aguas arriba del sitio afectado por el derrame. En ambos lugares se obtuvieron muestras a tres profundidades. A las muestras recolectadas se les determinó densidad real, densidad aparente, textura y porosidad.

Pardo, Perdomo Y Benavides (2004), las consecuencias que más influyen en el ambiente por derrames de hidrocarburos tienen una importancia más relevante dentro de los ecosistemas terrestres, principalmente de los derivados del petróleo como de este mismo, causas que son generadas por las diferentes actividades como son el transporte y la explotación de este insumo.

En el país de Colombia; Para buscar una solución a este tipo de problemas ambientales, utilizan métodos de tratamiento en el suelo contaminados para recuperarlos, como es la técnica de biolabranza (landfarming) sumando nutrientes inorgánicos. En este estudio se analizó dicha técnica, in vitro, realizando un diseño de 6 unidades experimentales (UE) que contenían el suelo que había sido contaminado con petróleo crudo; 3 UE fueron fertilizadas con compuestos inorgánicos Triple 15, y las otras tres muestras fueron utilizadas como control biótico.

Bracho, Díaz, Soto (2004), analiza la capacidad de 14 cepas de *Pseudomonas* para metabolizar hidrocarburos.

Con la finalidad, que los hidrocarburos que han sido disueltos por solventes orgánicos fueron colocados en placas de agar, de tal manera que formaron una capa de color opaco por el sustrato, sobre el cual se inocularon las colonias. Las bacterias capaces de metabolizar los hidrocarburos muestras que han degradado el petróleo al detectarse un crecimiento visible, este fenómeno evidencia la solubilización y utilización del sustrato.

En este estudio se encontraron los siguientes resultados que el total de las cepas estudiadas (100%) fueron capaces de degradar los hidrocarburos disminuyendo el naftaleno y antraceno, el 78,57% degradó fenantreno, el 71,42% dibenzotiofeno y la mitad de estos (50%) metabolizó los 4 hidrocarburos. De acuerdo a los resultados concluimos que las cepas que fueron aisladas poseen más capacidad enzimática que lo diferencia en la degradación estos compuestos. Por tal motivo, se permitieron seleccionar cepas capaces de degradar solo algunas de las fracciones aromáticas que constituyentes el petróleo, haciendo que los rasgos que las hacen ideales para que se dé la utilización de estos en los ensayos en la técnica de biorremediación en suelos impactados con petróleo sea óptima

Rivera, Ferrera, Volke, Rodríguez, Fernández Linares (2002), en este estudio se presentan resultados donde hacen referencia a la versatilidad de adaptación y de tolerancia de 46 hongos y 34 cepas de bacterias autóctonas de la rizósfera de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) y cabezón (*Paspalum virgatum*) establecidos en *Gleysols*, capaces de metabolizar posibles derrames recientes y que pueden llegar a ser crónicos debido al petróleo crudo y las aguas aceitosas esta problemática se encuentra ubicada en el estado de Tabasco.

Zhongyun Ma, B. (1998), esta investigación consistió en estudiar el potencial de biodegradación de Total *Petroleum HydrocarbOm* (WH) en un suelo contaminado con diésel usando culturas indígenas. El sitio de investigación realizado es un sitio contaminado en Argentina (Newfou11dland, Canadá), los perfiles y contaminantes típicos fueron decisivos para ayudar a establecer una instalación de prueba ambiental el potencial para la biorremediación del suelo en esa área se estudió en el laboratorio.

Se aislaron cuatro tipos de cultivos del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo (diésel), se enriquecieron en el laboratorio y se inyectaron en el suelo como una semilla para aumentar la población de cultivos. Los suelos contaminados se incubaron en reactores cerrados a temperaturas que oscilaban entre 25 y 5 ° C y valores de pH de 6 a 8. También se incluyó la adición de sales minerales como nutrientes. Los surfactantes se utilizaron como productos químicos adicionales para mejorar la tasa de biorremediación, La degradación de TPH se evaluó mediante monitoreo de concentración (cromatografía de gases) y conteo de bacterias

El estudio de los efectos de la temperatura mostró que la biotratibilidad disminuyó notablemente con la disminución de la temperatura. La tasa óptima de bioactividad se obtuvo en un estado ácido neutro o leve, y el tensoactivo Triton X-100 mostró una mejora de la degradación de hidrocarburo de petróleo, mientras que el tensoactivo Twen 60 no mejoró la degradación.

El requerimiento de nutrientes también se identificó claramente. En condiciones óptimas, la eficiencia de eliminación de TPH alcanzó el 50% del valor inicial. También se observó que la siembra de bacterias es posible e iguala la tasa de remediación.

Surfactantes se usaron para lavar el diesel fuera de los suelos contaminados en pruebas en columna, agua destilada, solución acuosa al 0,5% (p / p) de surfactante Tween 60 y 0.5% (p / p) Se usaron soluciones acuosas de tensoactivo Triton X-100 como soluciones de lixiviación. Las remociones correspondientes de TPH se obtuvieron en 5.3%, 21.7% y 67.8% respectivamente, la eficiencia potencial de combinar métodos físicos y biológicos de remediación.

(Torres y Zuluaga), la biorremediación es una tecnología que utiliza potencialmente el metabolismo de microorganismos (principalmente las bacterias, además de hongos y levaduras) para de esta manera transformar en compuestos más simples de degradar a los contaminantes que se encuentren alterando los terrenos o aguas.

Su aplicación es muy amplia, de esta manera se puede considerar, cada uno de los estados de la materia Sólido. Aquí los medios contaminados pueden ser sedimentos o suelos, además de lodos y/o residuos, etc.

Líquido: Se pueden considerar aguas superficiales y subterráneas, e incluye a las aguas residuales.

Gases: Las emisiones que provienen de las industrias, esto debido a que derivan de algún tipo de tratamiento de suelos o aguas.

Los contaminantes con los que se puede trabajar, tienen la siguiente clasificación:

- Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, BTEX, PAHs,).
- Hidrocarburos clorados (PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas,).
- Compuestos nitroaromáticos (TNT y otros).

Los metales pesados no se pueden metabolizar utilizando microorganismos debido a que estos pueden inmovilizar o precipitarlo, haciendo que esta técnica no funcione fácilmente.

La manera en que los microorganismos metabolizan y transforman los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos es de forma aeróbica incluyendo el agua, y CO₂ fuentes de alimento para que se realice su reproducción y el crecimiento de este, precisando que su desarrollo se dé naturalmente la biodegradación. Los microorganismos nativos tienen el aporte de adaptarse y muchas veces de degradar diferentes tipos de estructuras orgánicas naturales sin que se realice la intervención del hombre; sin embargo, esta adaptación necesita que ocurra en condiciones ambientales apropiadas.

Factores que condicionan la biorremediación de un suelo:

Un suelo contaminado depende de factores muy diversos, tal es que para que se desarrolle la biodegradación de una mezcla de hidrocarburos, se pueden clasificar en cuatro grupos y estos son:

- Químicos.
- Microbiológicos.
- Medio ambientales.
- Físicos.

Los factores medio ambientales

Son esenciales para suministrar condiciones óptimas para que pueda darse el crecimiento de microorganismos que desarrollan eficazmente la degradación de contaminantes. De estos microorganismos se puede precisar que son sensibles a los cambios de temperatura, pH, a la disponibilidad de nutrientes, el oxígeno y la humedad.

El pH. Definitivamente afecta la actividad microbiana. Por lo tanto, mientras mayor sea la variedad de microorganismos existentes, potencialmente el rango de tolerancia será mayor. No se puede afirmar que existan condiciones preestablecidas que sean óptimas para el desarrollo de la tecnología en todos los casos, sin embargo en términos generales para darse el aumento en el crecimiento de los microorganismos es máximo un intervalo de pH situado entre 6 y 8. En general, el pH óptimo es neutro (pH 6 - 8), para las bacterias heterótrofas; mientras que para los hongos es más ácido (pH 4 - 5). El pH óptimo es neutro (pH 7,4 - 7,8) establecido para procesos de biodegradación

El pH afecta directamente que el fósforo se diluya fácilmente y que los metales pesados se transporten a través del suelo.

Temperatura. Es un factor ambiental muy importante debido a que afecta la actividad metabólica de microorganismos y la creciente de biodegradación. La mayoría de las especies bacterianas crecen entre 20 y 30 °C.

Humedad. Para el crecimiento de microorganismos se necesita ambientes con un mínimo porcentaje de humedad para que se desarrolle la adaptación de estos. El agua es un recurso que se incluye en el protoplasma bacteriano y se utiliza como medio de conducción por ende los compuestos orgánicos y los nutrientes orgánicos de las células son transportados hasta el interior de la misma.

El oxígeno: Este recibe finalmente los electrones más principales, usando los procesos biológicos y es importante en diferentes reacciones de oxidación – reducción en donde es catalizada por enzimas. Estos microorganismos, tienen compuestos orgánicos o inorgánicos que se oxidan, para que el crecimiento se obtenga la energía debe ser necesaria. Este ciclo de oxidación muestra a los electrones que se desarrollan en el interior de la célula una cadena de reacciones y que finalmente, deben ser eliminados al ambiente.

Los hidrocarburos en su mayoría se hallan presentes en la obtención de derivados petrolíferos, son degradados con mayor rapidez y extensión de forma aeróbica.

Necesidad de nutrientes inorgánicos. La reproducción está orientada en el metabolismo de los organismos microbianos y requieren que los compuestos químicos se hallen aptos para su asimilación y sintonización.

La adición de fuentes de fósforo y Nitrógeno inorgánicos, mayormente tiene un efecto positivo aumentando los niveles de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados por compuestos orgánicos y las colonias microbianas. Las proporciones en la molaridad de C: N: P, escritas en la bibliografía, con respecto al contenido de degradar al carbono son muy diferentes; el margen de Carbono, Nitrógeno, fósforo normalmente depende de un sistema de tratamiento utilizado.

Por lo general la adición de fuentes inorgánicas de P y N al suelo debería ayudar a los procedimientos de biodegradación, por tal motivo, el uso máximo de fuentes de nutrientes inorgánicos en los procesos de biodegradación también puede inhibirse. Para que no se manifieste interferencia de nutrientes, así mismo como la minimización de estos por lixiviación, donde se utilizan fertilizantes inorgánicos oleofílicos dándose la liberación lenta dentro de la biorremediación de suelos que son contaminados por hidrocarburos.

La importancia de precisar que los nutrientes inorgánicos se accionan por la interacción química ya que puede estar limitada por los minerales del suelo. (El amonio se puede enlazar con arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones hierro, calcio y aluminio).

Factores físicos

Los factores físicos con más valor en la biorremediación, la provisión de un aceptor de electrones óptimo, como el O_2 la biodisponibilidad y que el agua se encuentre presente.

La Biodisponibilidad, el suelo es uno de los factores que limita la biodegradación en donde se transfieren masas, así mismo los microorganismos que se encuentran en los suelos contaminados, manifiestan niveles de biodegradación al estar expuestas a los compuestos orgánicos y con mayor variedad. Obteniendo que la absorción la adsorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, que propiamente se da en la transferencia de masas, que hacen que se limiten en la contaminación y estén biodisponibles.

Un fenómeno que altera la biodisponibilidad de forma negativa de contaminantes es el ageing o envejecimiento cuya definición es la disminución de la biodegradabilidad en los compuestos por tiempos prolongados en el suelo (por tanto, la población microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), por lo tanto, su importancia se da en suelos con alto nivel de materia orgánica. Este efecto se realiza por una serie de fenómenos como, por ejemplo: que la materia particulada del suelo sea adsorbida, y que la materia orgánica del suelo se absorba, la mínima dispersión de los compuestos, prima desde los microporos; hasta la disolución de fases líquidas no acuosas (FLNAs), o de enlaces covalentes con la materia del suelo ya sea orgánica e inorgánica de este.

Además, para mantener contacto con los contaminantes debe incluirse el agua en proporciones que faciliten el desarrollo de comunidades microbianas. Aunque este recurso puede llegar a obstruir el flujo de aire y disminuir el suministro de oxígeno debido para la respiración microbiana. Hay valores para la humedad en suelos no saturados que optimiza la biorremediación, en donde habitualmente se encuentran entre 150 y 250 grados de agua esto por cada kg de suelo seco.

Factores químicos

Estos factores influyen en la técnica de biorremediación para el tipo de contaminante dentro de su estructura molecular, de tal manera que afecta a sus propiedades químicas y físicas.

Esta capacidad está basada en:

Factores como el grado de solubilidad, de ramificación, el nivel de saturación, la naturaleza y el grado de efecto en los sustituyentes incluyendo la estructura química.

La inherencia de un hidrocarburo en su biodegradación depende, de su estructura molecular en mayor medida. Existiendo parámetros que van a ser afectados por la existencia de ramificaciones, la halogenación, la baja solubilidad en el agua y las diferentes cargas atómicas.

Factores microbiológicos

Los factores microbiológicos tienen mayor importancia para con la técnica de biorremediación ya que es la transformación biológica de compuestos orgánicos, su canalización es por acción de las enzimas. Estos compuestos se biodegradan frecuentemente dentro de un proceso en específico en donde debe realizarse paso a paso para esto se involucran muchas enzimas y muchos organismos. Para ser vivida una sustancia orgánica se utiliza normalmente más de una enzima. Frecuentemente, los organismos que se hallan en el suelo son degradativos.

Biorremediación de suelos:

Lladó (2012), La biorremediación es una tecnología en donde se utilizan el potencial metabólico de los microorganismos para degradador, eliminar o transformar los tipos de contaminantes del medio en estudio o en productos inocuos. Estos tienen algunas ventajas refiriéndose a los métodos físico-químicos (excavación, incineración, química y extracción), en donde se manifiesta su bajo costo, como sin afectar la optimización de los recursos y otras divisiones ambientales.

La capacidad de metabolizar a las poblaciones microbianas, ante los contaminantes presentes en el suelo, es la definición sobre el cual se sustenta la tecnología de la biorremediación. Por eso, deben emplazarse muestras previamente contaminadas, la bioestimulación en la población microbiana indígena, hongos, bacterias, pueden ser agentes que aceleren el proceso de biodegradación en los contaminantes.

En algunos casos de contaminación específico o de diferentes compuestos de mayor recalcitrancia, puede ser importante la inoculación de poblaciones alóctonas, con similitud en la capacidad degradativa especializadas, posibilitando la degradación de los contaminantes que se encuentran en este, una de las técnicas que además se utiliza es la conocida como bioaumento. De tal manera que la supervivencia de poblaciones aloctonas se puede poner en riesgo mientras exista la falta de adaptación.

Tecnologías de Biorremediación:

Anza, Orantes, González, Ruíz, Espinoza, e. Martínez, García, Vera, (2016), Bioestimulación: es la suma de nutrientes, así como también de oxígeno para estimular la actividad de microorganismos autóctonos y biodegradación de contaminantes.

Bioaugmentación: aumentar el número de microorganismos para degradar el contaminante.

Biolabranza: se dice de la mezcla con volúmenes de agentes y de nutrientes, para ayudar en la aireación, uniendo el suelo limpio con contaminado.

Bioventeo: ayudar a estimular el suministro de aire dentro de la técnica de biodegradación. De tal manera que favorece la aireación en la degradación por: volatilización, migración de la fase volátil de contaminantes y biodegradación, donde se estimula la actividad bacteriana.

Fitorremediación: aquí son utilizadas las plantas para transferir, remover, concentrar, estabilizar, y/o eliminar del suelo los contaminantes.

Las biopilas: Son biorremediación ex situ es decir en el lugar en donde las condiciones no saturadas, consiste en reducir de concentración de los contaminantes del petróleo u sus derivados que afectan los suelos. Estas tienen un diseño con sistemas cerrados para que la temperatura se mantengan, evitando la saturación de agua.

Biorremediación de suelos

De Almeida Andrade, J. Sales Fontes Jardim F. & Isabel Cristina. Brasil (2010), En esta técnica implica que se utilicen microorganismos, ya sean naturales (nativos) o que se hayan cultivado, para inmovilizar o degradar contaminantes cuya procedencia sean de aguas subterráneas y en suelos. Generalmente, los microorganismos que se utilizan son bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Por tal motivo, las bacterias son las más usadas y, son consideradas como el principal elemento que involucren en trabajos de biodegradación de los contaminantes.

Por definición los microorganismos unicelulares, son agregados generalmente en colonias, su habitat se da en diversos compartimentos ambientales. Su mayor importancia, está en función de sus efectos bioquímicos y transformar o por destruir los contaminantes que son potencialmente peligrosos en compuestos que sean menos dañinos al medio ambiente y al ser humano

Los microorganismos llegan a metabolizar sustancias orgánicas, ya que de estas se obtienen energía y nutrientes. De tal manera que, para que esto llegue a realizarse, estos microorganismos deben estar activos para desempeñar la tarea impuesta que es la de biodegradar.

Contaminación de suelos afectados por hidrocarburos.

Cando, Rodríguez, M. (2011), En efecto, los hidrocarburos saturados que contienen el aceite usado no son degradables biológicamente, recubren las tierras de una película cuya finalidad es impermeabilizar de tal manera que destruya el humus vegetal definiendo la fertilidad del suelo.

Suelo:

El 29% constituye el recurso suelo dentro de la superficie del planeta cuya definición es el medio poroso que forma la superficie de la tierra, durante el ciclo de meteorización, ayudado por los fenómenos geológicos, biológicos e hidrológicos.

En este recurso hay mayor cantidad de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas) estos mismos pueden ser beneficiosos como para recuperarlo cuando se haya originado por algún tipo de contaminación. Por tal motivo es importante conocer las propiedades del suelo desde el punto de vista biológico, haciendo de su composición química, porosidad, estructural, y permeabilidad

Minerales:

Uno de los componentes estructurales del suelo con mayor importancia son los minerales ya que representan de volumen total el 45%, el mineral que más se encuentra es dióxido del silicio (SiO₂), también están presentes con menor cantidad el aluminio (Al), calcio (Ca), hierro (Fe), magnesio (Mg), titanio (Ti), potasio (K), nitrógeno (N), manganeso (Mn), sodio (Na), fósforo (P), azufre (S),

Agua – Aire:

Para el volumen de poros los componentes constituyen, ocupando en el agua el 25% y en aire el 25%, otorgando el volumen total del suelo. La proporción del agua – aire varían considerablemente con respecto a la humedad del suelo.

Materia orgánica:

El volumen del suelo es representa el 5% por la materia orgánica, que proviene de los residuos de animales y vegetales, células microbianas y productos del metabolismo microbiano (humus) este último la fracción que tiene más estabilidad es gracias a la materia orgánica.

Existen microorganismos que ayudan a la transformación de compuestos que ayudan a metabolizar los suelos contaminados.

Humedad del suelo:

El volumen de la cantidad de agua que hay en la tierra se encuentra por medición exacta realizándose gravimétricamente cuyo procedimiento se da pesando una muestra de suelo antes y después del secado.

El pH del suelo:

El valor del pH mayormente oscila entre 4 y 8, casi todos lo pH superior a 8 poseen sales en exceso o un aumento en el porcentaje de sodio (NA) en sus sitios de intercambio iónico.

Su pH del suelo puede ser afectar significativamente los procesos de biorremediación y la actividad microbiana además del crecimiento de la mayoría de microorganismos que se encuentran dentro de un rango de pH de 6 a 8, cuyas condiciones son altamente alcalinas o básicas que generalmente que minimicen la actividad microbiana.

Salinidad del suelo:

El suelo salino contiene el aumento de sales solubles, éste puede darse de manera natural (suelos planos y suelos bajos) y antropogénica. Al darse este proceso cuyo origen antropogénico, se ve asociado a sistemas de riego, en la contaminación de suelos por hidrocarburos.

Microbiología del suelo:

Dentro del suelo se desarrollan microorganismos eucariotas (algas hongos y protozoos) y así como procariotas (arqueas y bacterias). La actividad biológica depende muchas veces de algunas características del suelo.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Diseño cuasi – experimental.

El método cuasi experimental se presenta para estudiar problemas en los que no se puede tener total control de las situaciones, pero se trata de tener el mayor control posible.

3.2. Variables y operacionalización

Variables 1:

Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

Operacionalización:

En la presente se muestra la definición de las variables y la metodología de cómo se realizará y los rangos de los indicadores que mostraran en el desarrollo del proyecto de tesis

3.3. Población, muestra y muestreo

Población:

La población está determinada por un área de 15.92 m. de donde se tomará la muestra.

Muestra:

En la muestra se utilizará 1k de suelo contaminado.

Muestreo:

Para la siguiente investigación el muestreo es por conveniencia, debido a que es un terreno de proporción menor.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnicas:

Se evaluarán datos recolectados de la observación de parámetros establecidos en el procedimiento de la muestra, estos datos se anotarán en tablas que se irán desarrollando a través de la experimentación dentro del laboratorio.

Análisis de varianza (ANOVA). Se utilizará solo para la fiabilidad de los datos y la significancia de los mismos.

Técnicas de campo (toma de muestras)

Se prepara la muestra extrayendo 1 kilogramo del total de la parcela el cual servirá para el análisis de los parámetros para la fertilidad del suelo. La muestra será de forma homogénea.

La guía para la toma de muestras de suelo dada por el ministerio del ambiente dice que se debe tener un plan de muestreo de los cuales tiene las siguientes generalidades:

Tener información básica del suelo en investigación, tales como mapas de ubicación, accesibilidad, infraestructuras realizadas además de saber qué tipo de contaminante posee.

Realizar análisis de estudios previos del suelo que este potencialmente contaminado.

Tener en cuenta a las poblaciones vulnerables además de aspectos ambientales.

Determinar el procedimiento de toma muestras y método de muestreo demás de los posibles parámetros que se analicen

Técnicas de muestreo:

Para muestras superficiales:

Guía para el muestreo de suelo-MINAM

Técnicas de análisis físicos y químicos para suelo

Validez:

La validez de los resultados será dada por INIA (Instituto Nacional De Innovación Agraria) "Vista La Florida", el cual certificara que los análisis de mis muestras son veraces, así de esta manera se corroboran los datos por el laboratorio.

Además, realizaré análisis químicos dentro del laboratorio de la universidad cesar vallejo, los cuales serán certificados por el encargado de dicho establecimiento.

3.5. Procedimientos

Se preparará una muestra de la capa orgánica del suelo (entre 10 y 30 cm de profundidad) recolectada del taller mecánico de automotriz Román diésel, para la toma de muestras compuestas de suelos. El área escogida para la recolección de la capa orgánica, cumplió con la siguiente característica: No haber estado expuesto anteriormente a contaminación con ninguna clase de hidrocarburo. La muestra fue secada y posteriormente tamizada hasta alcanzar tamaños de partícula entre 2 y 2.36 mm (tamices Pinzuar), para garantizar una distribución más homogénea del hidrocarburo en el suelo.

3.6. Método de análisis de datos

Se tuvo en cuenta las tablas y figuras estadísticas para presentar los datos que se obtuvieron al aplicar los instrumentos de recolección

3.7. Aspectos éticos

El desarrollo del proyecto de tesis se caracterizará por ser veraz y objetiva, ya que se tendrá los cuidados necesarios desde la recolección de muestras, hasta el proceso de ellas; ya sea en análisis físicos, químicos y microbiológicos guardando un protocolo de protección en caso las muestras sean llevadas a otros laboratorios, además de seguir las normas de bioseguridad, establecidos dentro de la literatura brindada y obtenida.

IV. RESULTADOS

Parámetros de análisis para las muestras.

Análisis de pH.

En la tabla 1 se observan los resultados para los ensayos para el parámetro de pH. De la muestra de suelo contaminado por hidrocarburos.

Tabla 1: *Análisis de pH*

Semana	<i>Aspergillus</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>sp</i>
Prom 1	6.85	6.84
Porm 2	6.98	6.87
Prom 3	7.02	6.90

Fuente: Elaboración propia

En la figura 1, se observa que el *Aspergillus* levadura, el pH tiende a aumentar más que con el *Acinetobacter Sp*, esto se debe a que la acción de los microorganismos están en aumento, notándose más con el *Aspergillus*, ya que este microorganismo se encarga de metabolizar los hidrocarburos, por el contrario la especie *Acinetobacter Sp* se concentra más en la disminución del olor, por eso la diferencia en el pH. Con cada microorganismo.

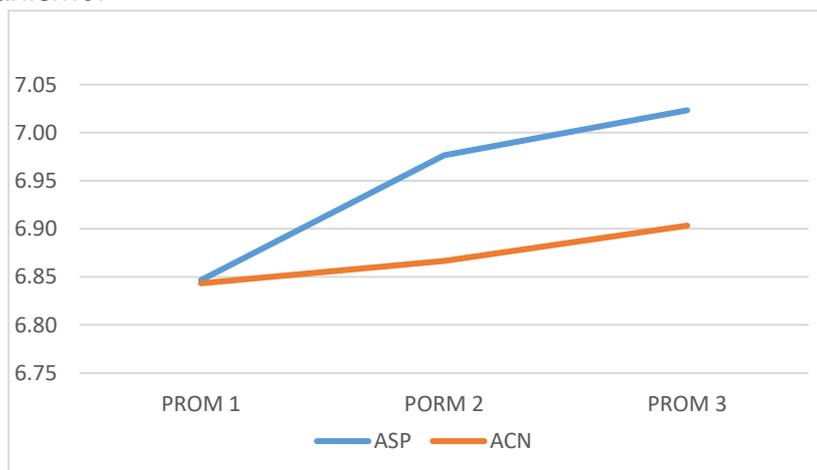


Figura 1: Medición de pH

Fuente: Elaboración propia

Análisis de conductividad eléctrica.

En la tabla 2 notamos los resultados para los ensayos del parámetro para el análisis de conductividad eléctrica. De la muestra de suelo contaminado por hidrocarburos.

Tabla 2: Análisis de conductividad eléctrica

Semana	<i>Aspergillus</i>	<i>Acinetobacter sp</i>
Prom 1	6.57	6.72
Porm 2	6.42	6.98
Prom 3	6.50	7.36

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 2, se percibe que la especie *Acinetobacter Sp.* La conductividad eléctrica tiende a aumentar a comparación con la especie *Aspergillus*. Que se mantiene dentro de los valores, esto se debe a que la especie *Aspergillus*. Crece en la zona superficial, a comparación con la especie *Acinetobacter Sp.* Que se concentra más en el sub suelo y se mezcla con las sales que hay en el entorno.

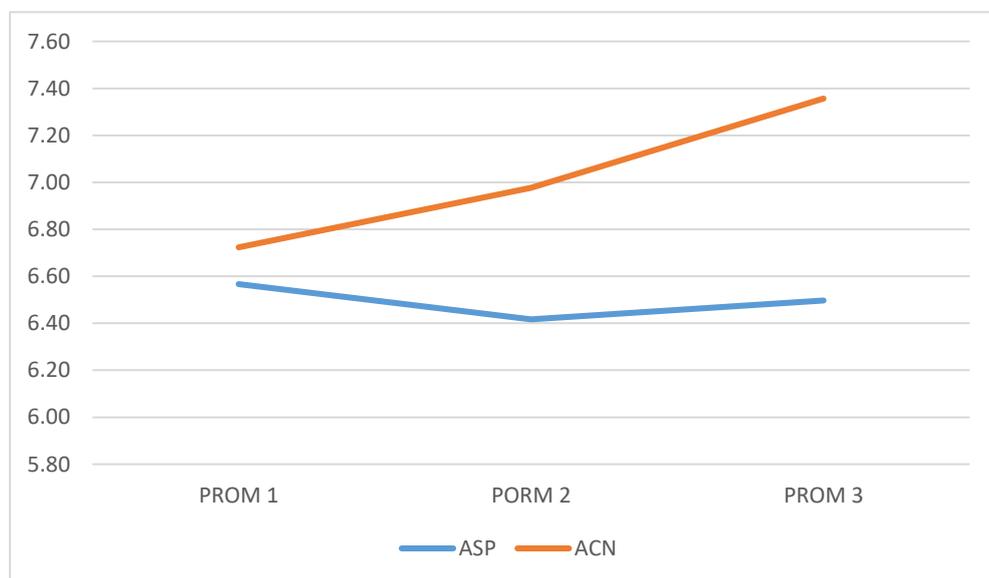


Figura 2: Análisis de conductividad eléctrica

Fuente: Elaboración propia

Análisis de materia orgánica

En la tabla 3 se observan los resultados para los ensayos para el parámetro de materia orgánica. De la muestra de suelo contaminado por hidrocarburos.

Tabla 3: Resultados de parámetro de materia orgánica

Semana	<i>Aspergillus</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>sp</i>
Prom 1	3.29	2.96
Porm 2	2.63	1.06
Prom 3	2.30	0.82

Fuente: Elaboración propia

En la figura 3, se percibe que en el recipiente con la bacteria *Acinetobacter Sp*, la materia orgánica tiende a disminuir más que el recipiente con la especie *Aspergillus*. Esto se debe el *Acinetobacter Sp* bacteria su metabolismo aumenta haciendo crecer colonias y la materia orgánica no se abastezca al estar en contacto con el sub suelo.

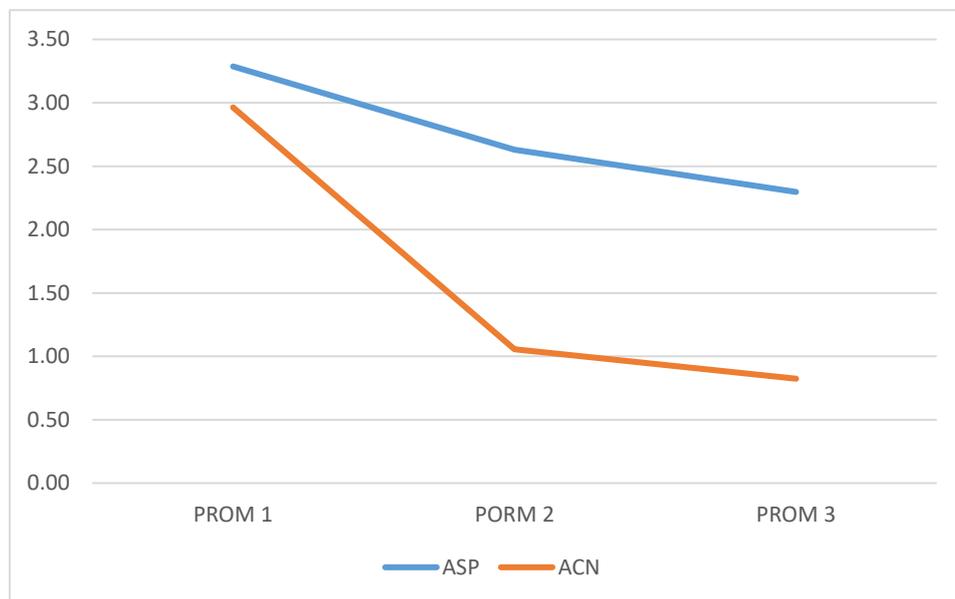


Figura 3: Materia orgánica

Fuente: Elaboración propia.

Método gravimétrico HTPS

En la tabla 4 se observan los resultados para los ensayos para el método gravimétrico HTPs. De la muestra de suelo contaminado por hidrocarburos.

Tabla 4: Método gravimétrico HTPs

Muestra Inicial	<i>Acinetobacter Sp</i>	<u>Aspergillus</u>
123.08	92.31	76.92

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 4, se percibe que con la especie *Aspergillus*, ha disminuido notoriamente en comparación con la muestra inicial (M.I.), por otro lado, con la muestra *Acinetobacter Sp.*, logró disminuir a comparación con la levadura *Aspergillus*. Esto se debe a la función de cada uno, mientras que una se encarga de metabolizar el hidrocarburo, la otra se encarga de disminuir los olores.

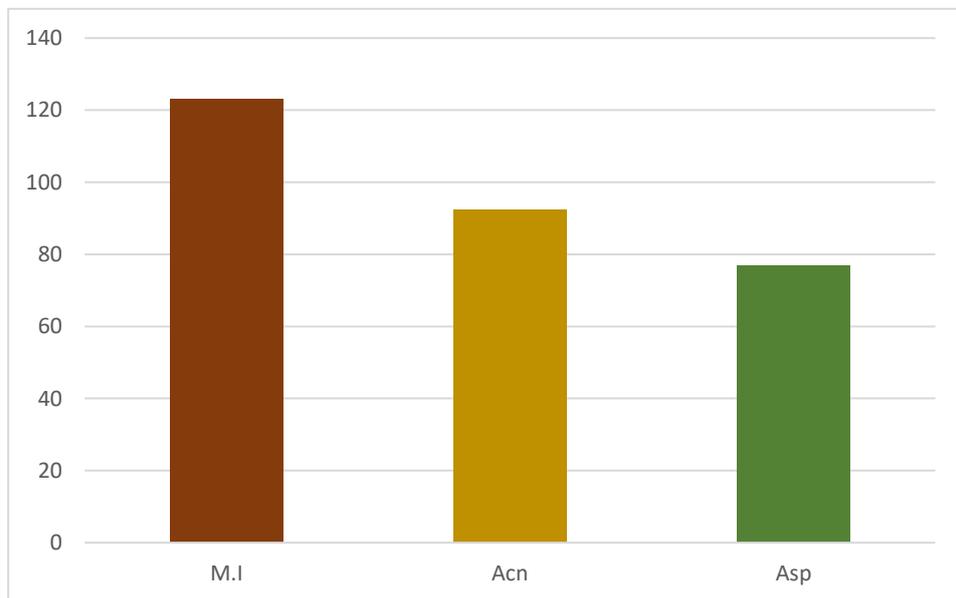


Figura 4: Método gravimétrico HTPs.

Fuente: Elaboración propia.

V. DISCUSIÓN

Los parámetros analizados en los suelos con hidrocarburos son el pH, materia orgánica y conductividad eléctrica, en muestras diferentes de la especie *Aspergillus* y *Acinetobacter Sp*, y se comparó la eficiencia de cada una de la especie.

Para la muestra en la que se aplicó la especie *Aspergillus* , resultado con pH 7.02, la conductividad eléctrica resulto en 6.50 mmhos y de materia orgánica 2.30%, estos valores están en un rango bajo, puesto que esta especie está en la superficie del suelo donde comienza a metabolizar los hidrocarburos, por otro lado en la muestra en la que se aplicó la especie *Acinetobacter sp*, se obtuvo resultados de pH 6.90 , la conductividad eléctrica se obtuvo , 7.36 mmhos y la materia orgánica 0.82 % , esto se debe a que esta especie *Acinetobacter Sp* , cumple la función de disminuir los olores.

Con los resultados antes descritos podemos afirmar la tesis del autor: RIVERA Cruz, M. FERRERA Cerrato, R. VOLKE Haller, V. RODRÍGUEZ Vázquez, R. Y FERNÁNDEZ Linares, L. , En este estudio se presentan resultados donde hacen referencia a la versatilidad de adaptación y de tolerancia de 46 hongos y 34 cepas de bacterias autóctonas de la rizósfera de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) y cabezón (*Paspalum virgatum*) establecidos en *Gleysoles*, capaces de metabolizar posibles derrames recientes y que pueden llegar a ser crónicos debido al petróleo crudo y las aguas aceitosas esta problemática se encuentra ubicada en el estado de Tabasco.

En el análisis de HTPs, en la muestra con la especie *Aspergillus* , resultado 76.92 mientras que para la especie *Acinetobacter Sp*, los resultados se obtuvieron fue de 92.31 , podemos decir entonces que la especie *Aspergillus* metaboliza más eficientemente los hidrocarburos , esto lo podemos encontrar también en la tesis del autor Pardo Castro, j. Perdomo Rojas m. y Benavides López de Mesa J. que se obtuvieron porcentajes de remoción altos de TPH's, llegando a un 91%, alcanzando concentraciones finales de TPH's de 2028 ppm, en comparación con el control biótico en el cual se obtuvieron porcentajes de remoción hasta del 65% y concentraciones finales de 8049 ppm de TPH's; de tal manera que se logra

demostrar que al sumar nutrientes en el suelo contaminado por hidrocarburos optimiza el proceso de degradación de estos.

Este mismo autor utiliza a la *Pseudomonas* como fuentes de obtención de hidrocarburos el cual obtuvo un 100% de remoción de hidrocarburos aromáticos, sin embargo, mi investigación arroja que *Pseudomonas putida* (especie estudiada para la metabolización de hidrocarburos) degrada un 21% de hidrocarburos.

Martínez et al, (2011) hace mención que en su investigación utiliza lodos residuales como sabemos este tipo de lodos tiene una carga orgánica con variedad de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos y sus derivados. Así como *Pseudomonas putida* y *Penicillium* en este caso el *Penicillium chrysogenum*, especies que fueron estudiadas y evaluadas en la presente investigación.

BENAVIDES et al, (2006). Analizó la biorremediación como una alternativa de solución para este tipo de contaminación de suelos por hidrocarburos, realizó experimentos inoculando consorcios microbianos las cuales también fueron aisladas del suelo en cuestión encontrando *Pseudomonas sp.* durante su proceso de aislamiento; sin embargo a pesar de haber sido aislada directamente de mi suelo contaminado en los tratamientos realizados la *Pseudomonas* no llega a degradar tanto como el *Penicillium*, también se hizo una comparación con el tratamiento de consorcio microbiano el cual tuvo un 26% de remoción, dando como resultado final que los microorganismos obtenidos del propio suelo no siempre actúan con total eficacia como se querría, esto también depende del tiempo de viaje y el tipo de compuesto que degraden.

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinaron que para el parámetro de pH, el valor más alto es de 7 utilizando el microorganismo *Aspergillus* que es una levadura, mientras que para el análisis de conductividad eléctrica con 7,36 mmhos utilizando la bacteria *Acinetobacter Sp*, por último en el análisis para el parámetro de Materia Orgánica el valor más alto es de 2,3 % utilizando el microorganismo *Aspergillus* levadura.
2. Se comparó la eficiencia de las dos especies una bacteria y una levadura utilizando el Método Gravimétrico HTPs, cuyos resultados demostraron que con el microorganismo *Aspergillus levadura* se logra remediar de forma más eficiente el suelo.
3. Para la utilización de muestras pequeñas en este caso al ser secado el peso de la muestra disminuye por lo tanto se tiene que lavar el suelo mezclado con el sulfato de sódico y el diclorometano obteniendo una muestra mayor para ser llevado al rotavaporador.
4. Par el monitoreo de muestras se concluye que estas tenían un olor característico a pastel o dulce después de haber inoculado los microorganismos.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Se debe tener los equipos nivelados y calibrados para tener resultados exactos a la hora de tener una muestra.
- 2.** Fomentar la participación ciudadana, en temas de restauración en lugares contaminados.
- 3.** Fomentar el uso de agentes biológicos para la remediación de suelos.
- 4.** Seguir los protocolos de bioseguridad dentro de un laboratorio para garantizar nuestra salud y vida.
- 5.** Fomentar buenas prácticas para el reciclaje de reactivos utilizados en el laboratorio.

REFERENCIAS

ANZA Cruz, Héctor Guillermo ORANTES Calleja, Paula Deyanira GONZÁLEZ Herrera, Raúl RUÍZ Marín, Alejandro ESPINOZA Medinilla, Eduardo MARTÍNEZ Salinas, Rebeca Isabel GARCÍA Lara, Carlos Manuel VERA Toledo, Pedro. “Biorremediación De Suelos Contaminados Con Aceite Automotriz Usados Mediante Sistema De Biopilas” Mexico – Campache. 2016.

ARAUJO, José. YEGRES, Francisco. Barreto, Guillermo. ANTEQUERA, Angel. Depool, Belkys. Rojas Yarubit. “Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del género *Aspergillus* para la descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs)”. Venezuela. 2015.

BRACHO Mariangela; DÍAZ Laugeny; SOTO Luz Marina “Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp”. 2004.

BRAIBANT Wayens, Caroline. “Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados”. Cartago. 2004.

Calderón Saenz, Felipe. Y Pavlova, Margarita. “Metodologías para análisis químico de suelos”. 1999.

CANDO, Rodríguez, Miguel Angel "Determinación Y Análisis De Un Proceso De Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos". Cuenca. 2011.

CANO, García Adán. “Manuel de Practicas de la Materia de Edafología” (S/F).

CERON, Rincón Laura Emilia. “indicadores de salud y calidad de suelos en cuencas hídricas de Bogotá D.C.” 2012.

DE ALMEIDA Andrade, Juliano, Fabio Augusto & Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. “Biorremediação De Solos Contaminados Por Petróleo E Seus Derivados” Brasil. 2010.

FERNÁNDEZ, Linares Luis Carlos. ROJAS, Avelizapa Norma Gabriela “Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados”. México. 2006.

GUÍA PARA EL MUESTREO DE SUELOS / Ministerio Del Ambiente. Dirección General De Calidad Ambiental. -- Lima: MINAM. 2014.

GUTIERREZ Escarcena, Laura Isabel. “Biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburos usando lodos residuales estabilizados y fertilización”. 2010.

J. OLGUÍN, Eugenia; HERNÁNDEZ María Elizabeth y SÁNCHEZ Galván Gloria. “Contaminación De Manglares Por Hidrocarburos Y Estrategias De Biorremediación, Biorremediación Y Restauración”. México. 2007.

Judith Cavazos-Arroyo, Beatriz Pérez-Armendáriz*, Amparo Mauricio-Gutiérrez “AFECTACIONES Y CONSECUENCIAS DE LOS DERRAMES DE HIDROCARBUROS EN SUELOS AGRÍCOLAS DE ACATZINGO, PUEBLA, MÉXICO”

LLADÓ Fernández, Salvador “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas”. Barcelona. 2012

PARDO Castro, Jenny Liliana; PERDOMO Rojas, Maria Carolina y BENAVIDES López de Mesa, Joaquín L. “Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo”. 2004.

PÉREZ Casimiro, Guillermina. ITURBE Argüelles, Rosario. FLORES Serrano Rosa María “Cambio En Las Propiedades Físicas De Un Suelo Contaminado Con Hidrocarburos Debido A La Aplicación De Una Tecnología De Remediación”. México D.F. 2006.

RIVERA Cruz, María del Carmen. FERRERA Cerrato, Ronald. VOLKE Haller, Víctor. RODRÍGUEZ Vázquez, Refugio. Y FERNÁNDEZ Linares, Luis. “Adaptacion Y Selecccion De Microorganismos Autoctonos En Medios De Cultivos Enriquecidos Con Petroleo Crudo”. México. 2002.

TORRES Delgado Katerine y ZULUAGA Montoya Tatiana. "Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos". Medellín. 2009

VALLEJO, Victoria; SALGADO, Laura; ROLDAN, Fabio. "Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo". Colombia. 2005.

ZAMORA, Alejandra. RAMOS, Jesús. y ARIAS, Marianela. "Efecto De La Contaminación Por Hidrocarburos Sobre Algunas Propiedades Químicas Y Microbiológicas De Un Suelo De Sabana". Venezuela. 2011.

ZHONGYUN Ma, B. "Bioremediation Of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil Using Indigenous Culcultures". Canadá. 1998.

ANEXOS

Anexo 1: Operacionalización de Variables: "BIORREMEDIACION CON ASPERGILLUS Y ACINETOBACTER SP "

Eficiencia	La biorremediación está basada en una tecnología en la cual se utilizan el potencial metabólico degradador de los microorganismos para eliminar o transformar los diferentes contaminantes del medio en productos que no afecten fuertemente, teniendo ciertas ventajas en los métodos físico-químicos.	Aislar cepas bacterianas del suelo contaminado por hidrocarburos, después inocular las cepas, realizar el método de landfarming o venteo, con todo y sus aspectos, mantener el sistema aireado y húmedo	Materia orgánica	%
Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, que están frente a los contaminantes que se hallan en un suelo, es la definición sobre la tecnología de la biorremediación.	Esto para el crecimiento bacteriano y/o fúngico.	pH	6 y 8
			Conductividad eléctrica	mmhos
			Extracción de https	HTPs/kg.

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2:

Estado de la normatividad ambiental sectorial

- Hidrocarburos:

La Ley Orgánica de Hidrocarburos - Ley No. 26221 (en adelante la Ley 26221), en concordancia con el DECRETO SUPREMO N° 042-2005-EM – Texto Único Ordenado de la Ley 26221, Ley Orgánica de Hidrocarburos, es la norma base que regula las actividades de hidrocarburos en el territorio nacional. Esta Ley establece que los titulares de actividades de hidrocarburos están obligados a salvaguardar el interés nacional; y atender la seguridad y salud de sus trabajadores; y cumplir con las disposiciones sobre protección al medio ambiente.



COMPENDIO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL PERUANA

VOLUMEN VI LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECTORIAL

El Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos - DECRETO SUPREMO No. 015-2006-EM establece las especificaciones que se deberán tomar en cuenta para desarrollar dichas actividades, buscando la protección del ambiente en el que se desarrolle la actividad; y los organismos competentes para la aplicación de dicho reglamento. También, señala los requisitos para la presentación de los EIA, EIAP y PAMA. Finalmente, aprueba los niveles máximos aceptables de contaminantes en el aire y los formatos para el Programa de Monitoreo de Efluentes Líquidos, el Programa de Monitoreo de Emisión de Gases y la Declaración Jurada sobre generación de emisiones y/o vertimientos de residuos de la industria de hidrocarburos. Dentro del Sector de Hidrocarburos debemos hacer referencia a las normas relacionadas con otros combustibles:

Anexo 3:

Determinación de pH: método electrométrico

Guía para el muestreo de suelo-MINAM

Antes de medir el pH se recomienda que se recolecte 200 gramos de suelo aproximadamente, se esparce la muestra sobre un papel periódico y se deja secar por 48 hasta que esté totalmente seca, después se pasa a tamizar para eliminar las partículas grandes para así evitar que se altere la muestra, luego se pasa a medir el pH del suelo.

Reactivos:

1. Agua destilada.
2. Soluciones reguladoras de referencia, pH 4.00, 7.00 y 10.00, las cuales se adquieren preparadas o concentradas para diluirse de acuerdo a la instrucción. Estas soluciones deben estar a temperatura ambiente al momento de calibrar el medidor de pH.

Materiales y equipos:

1. Potenciómetro o medidor de pH equipado con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia.
2. Balanza con 0.1 g de sensibilidad.
3. Frascos de vidrio o plástico transparente de boca ancha con capacidad de 50 a 100 ml.
4. Pipeta volumétrica de 20 ml.
5. Varilla de vidrio que sirva como agitador manual.
6. Piceta.

Procedimiento:

1. Pesar 10 g de suelo en un frasco de vidrio o plástico de boca ancha.
2. Adicionar 20 ml. de agua destilada al frasco conteniendo el suelo.
3. Con una varilla de vidrio, agitar manualmente la mezcla de suelo: agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.
4. Dejar reposar durante 15 minutos.
5. Calibrar el medidor de pH con las soluciones reguladores pH 4.00 y 7.00 o 7.00 y 10.00 según el suelo, enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras.
6. Agite nuevamente la suspensión e introduzca el electrodo en la suspensión.
7. Por último, registre el pH al momento en que la lectura se haya estabilizado.

Determinación de conductividad eléctrica: método de extracto de saturación.

Calderón Saenz, F. Y Pavlova, M. "Metodologías para análisis químico de suelos" (1999). La medida de la Conductividad Eléctrica de los extractos obtenidos de un suelo permite establecer una estimación aproximadamente cuantitativa de la cantidad de sales que contiene. La relación suelo-agua tiene influencia sobre la cantidad y composición de las sales extraídas, siendo necesario especificar la relación.

Reactivos:

- Agua destilada
- Alcohol Etílico (para lavar los electrodos de pipeta)

Materiales y equipos:

- Conductímetro
- Filtro a Presión
- Vasitos de 50 mls
- Papel de filtro (whatman 42)
- Vasijas plásticas
- Varillas

Procedimiento:

Para obtener la Conductividad Eléctrica del suelo en el extracto de Saturación inicialmente se prepara la pasta saturada; se extrae luego el extracto en un filtro a presión. En el extracto obtenido se lee la conductividad Eléctrica.

Se toma una alícuota de pasta saturada de suelo de aproximadamente 750 ml. Se extrae a continuación el extracto por medio de un equipo de filtración a presión. Deben salir al menos 25 ml. Luego se lee la Conductividad Eléctrica por medio de un conductímetro.

Cálculos:

El extracto obtenido se lee directamente en el conductímetro, ajustando la temperatura, la constante de Celda y la escala de lectura. El resultado se puede expresar en mmhos/cm, en ms/cm o en ds/mt.

Determinación de materia orgánica: método walkey black.

Gutierrez Escarcena, L. "Biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburos usando lodos residuales estabilizados y fertilización" (2010).

Reactivos:

1. Dicromato de potasio 0.166 M o 1N.- Disolver 48.82 g de $K_2Cr_2O_7$ en agua destilada aforar a 1000 ml en un matraz volumétrico.
2. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
3. Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4).
4. Indicador de difenilamina. Disolver 0.5 g de difenilamina en 20 ml de agua y añadir 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.
5. Sulfato ferroso 1.0 M (aproximadamente). Disolver 278 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua a la que previamente se le añadieron 80 ml de H_2SO_4 concentrado, enfriar y diluir a un litro. Esta solución debe ser valorada con $K_2Cr_2O_7$ 1 N antes de realizar la determinación.

Materiales y equipos:

1. Matraces Erlenmeyer de 500 ml.
2. Bureta para $K_2Cr_2O_7$ (50 ml).
3. Bureta para $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (50 ml).
4. Pipeta volumétrica (10 ml).
5. Probeta de vidrio (25 ml).

Procedimiento:

1. Pesar 0.5 g de suelo seco y pasado por un tamiz de 0.5 mm y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Procesar un blanco con reactivos por triplicado.
2. Adicionar exactamente 10 ml de Dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el suelo.
3. Agregar cuidadosamente con una bureta 20 ml de H_2SO_4 concentrado a la suspensión, girar nuevamente el matraz y agitar de esa forma durante un minuto.
4. Dejar reposar durante 30 minutos sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera, evitando las mesas de acero o cemento.
5. Añadir 200 ml de agua destilada.
6. Añadir 5 ml de H_3PO_4 concentrado.
7. Adicionar de 5 a 10 gotas del indicador de difenilamina.
8. Titular con la disolución de sulfato ferroso gota a gota hasta un punto final verde claro.

Cálculos

Donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml).

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml).

N = Normalidad exacta del sulfato ferroso (valorar por separado al momento de analizar las muestras).

g = Peso de la muestra empleada (g).

Mcf = factor de corrección de humedad.

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ C Orgánico} \times 1.724.$$

Determinación de fósforo disponible: método olsen

CERON, Rincón Laura Emilia. "indicadores de salud y calidad de suelos en cuencas hídricas de Bogotá D.C." (2012).

Reactivos:

Solución extractora de Olsen (NaHCO_3 0,5 M, pH 8,5): Disolver 420 g de bicarbonato de sodio en agua destilada y completar a un volumen final de 10 L. Ajustar el pH de la solución a un valor de 8,5 añadiendo hidróxido de sodio al 50%.

Materiales y equipos:

1. Muestras de suelo tamizado a 2 mm.
2. Pipeta de 25 ml.
3. Matraz Erlenmeyer de 50 ml.
4. Soporte universal.
5. Papel de filtro Whatman N° 42.
6. Embudos.
7. Agitador con capacidad de 200 (o más) r.p.m.
8. Balanza analítica o granataria.
9. Fotocolorímetro.

Procedimiento:

1. Pese 1 g de suelo y transfíralo a un matraz Erlenmeyer de 50 ml.
2. Añada 20 ml de solución extractora de Olsen a cada matraz y agite a 200 o más r.p.m. durante 30 minutos a una temperatura ambiente menor a 24° - 27° C.
3. Si es necesario, para obtener un filtrado incoloro, agregue 1 cm³ (aprox. 200 mg) de carbón vegetal a cada matraz.
4. Pasar los extractos por un papel de filtro Whatman N° 42. Filtrar de nuevo, si los extractos no son claros.
5. Analizar el P disponible en el blanco y los patrones realizados con la solución Olsen por colorimetría.

Cálculos

P extractable (mg/kg)

$$= [\text{concentracion de P en extracto olsen (mg/L)}] \times \left[\frac{0,020 \text{ L extracto}}{0,001 \text{ kg de suelo}} \right]$$

Determinación de textura: método hidrómetro.

CANO García, "Manuel de Practicas de la Materia de Edafología" (S/F).

Reactivos:

- Solución Buffer 7.0 y 10.0
- Nitrato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Cloruro de Bario
- Agua destilada
- Nitrito de sodio
- Ácido Clorhídrico

Materiales y equipos:

- 1Potenciómetro
- Probetas de 500 ml
- 1 termómetro
- 1 balanza granataria
- 1 platillo de aluminio
- Vaso de precipitado 500 ml
- 1 agitador de vidrio
- 1 mortero
- 1 tamiz
- 1 parilla Eléctrica
- 1 probeta de 10 ml
- 1 pipeta de 5 ml

Procedimiento:

1.- Pretratamiento de la Muestra.

a.) Mezclar 150 gramos de suelo más 100 ml de agua destilada más 30 ml de H₂O₂

2.- Destrucción de Carbonatos

a.) Identificar carbonatos colocando 5 gramos de suelo en un vidrio de reloj agregando tres gotas de BaCl₂

3.- Si la Observación es más agregar 25 ml de Ácido Clorhídrico (HCl) a 1 N.

4.- Calentar la muestra durante 15 minutos y enfriar.

5.- Verificar el PH que está en un rango de 6 a 7.5. Si es > a 7.5 Agregar gotas de HCl

Si es < a 6 Agregar gotas de NaOH. Dejar en el rango de 6 a 7.5

6.- Dejar Reposar el suelo durante 2.9 horas y eliminar toda el agua

7.- Secar hasta detectar las partículas de suelo.

8.- Una vez identificando los agregados separar las partículas gruesas de las finas.

9.- Pesar 50 gramos de textura fina más 10 ml de Nitrato de Sodio y verter en una probeta de 1000 ml y completar con agua el volumen. Agitar la muestra por 5 minutos y sumergir el hidrómetro, si presenta espuma y si no se puede leer agregar 5 gotas de alcohol amileo

- Leer el hidrómetro a 40" 120" 30' 60' 120' 180' 240' 300'.
- Por cada lectura tomar la temperatura

10.- Pesar 50 gramos de textura gruesa y repetir el paso 9

- Sumergir y leer 40" 120" 30' 60' 120' 180' 240' 300'.
- Por cada lectura tomar la temperatura.

Instrumentos y materiales

- Palana
- Pico
- Bolsas herméticas
- Guantes de protección
- Mascarilla
- Guardapolvo
- Lapiceros
- Libretas de apuntes
- Guincha

Extracción de hidrocarburos:

FERNÁNDEZ, Linares L. ROJAS, Avelizapa N. México. 2006.

Extracción agitación-centrifugación:

Aunque la extracción con Soxhlet es una de las técnicas más utilizadas para la extracción de hidrocarburos por su eficiencia de extracción (mayor a 80%), el tiempo y número de muestras que se logran procesar son limitadas a la cantidad de equipos disponibles. Por esta razón, se han desarrollado otras técnicas que tienen como finalidad optimizar los tiempos de extracción y cantidad de solvente por utilizar, haciéndolas más económicas y rápidas, con la ventaja de poder procesar más muestras en menor tiempo; tal es el caso de la extracción agitación-centrifugación.

Material y equipo:

- Tubos de centrifuga de plástico Corning o Falcon de 15 ml.
- Espátulas.
- Vórtex.
- Balanza analítica.
- Rotoevaporador.
- Pipetas de vidrio.
- Centrífuga.
- **Reactivos:**
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
- Diclorometano (CH_2Cl_2).

Procedimiento:

- 1) Pesar una muestra de 0.5 a 2 g de suelo seco, previamente triturado en mortero, en un tubo para centrifuga de 15 ml y adicionar 3 g de Na_2SO_4 anhidro, mezclar con agitación en el vórtex hasta homogeneizar.
 - Nota: el sulfato de sodio anhidro debe secarse previamente en el horno por 4 horas a 120°C .
- 2) Adicionar 5 ml de diclorometano y volver a agitar en el vórtex durante 45 segundos, de tal manera que se incorpore bien el solvente con el suelo.
- 3) Centrifugar la muestra a 6 000 rpm durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un vial, matraz bola o tubo de vidrio.
- 4) Lavar el suelo dos ocasiones más sobre el residuo sólido extraído, hasta obtener aproximadamente 15 ml de sobrenadante (extracto orgánico).
- 5) Evaporar el disolvente (diclorometano) del extracto orgánico en un rotoevaporador hasta concentrar a sequedad. El residuo obtenido contiene todos los hidrocarburos solubles en diclorometano.
- 6) Recuperar el concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación por alguno de los métodos reportados más adelante.

Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs)

El método gravimétrico es recomendado para la medición de HTPs provenientes de muestras muy aceitosas, por ejemplo, que contienen hidrocarburos pesados o para muestras acuosas cuando el hexano es preferido como solvente (US EPA 821-B94-004, 1995).

Material y equipo

- Matraces de bola de 250 ml.
- Rotoevaporador.
- Viales o tubos de vidrio de 25 ml.
- Balanza analítica.
- Pinzas.

Procedimiento

- 1) Poner a peso constante el recipiente donde se colocará el extracto orgánico obtenido (matraz de bola para la extracción, vial o tubo de vidrio) (ver sección 5.2). Colocar el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas. Sacar este material y colocarlo en un desecador para que se enfríe. Pesar el recipiente, después colocarlo otra vez dentro de la estufa y volver a realizar el procedimiento hasta que el peso no cambie. Anotar el peso del recipiente (RA).

- 2) Una vez que el extracto orgánico obtenido (ver sección 5.2) esté en un matraz de bola, tubo o vial de vidrio a peso constante, se procede a la evaporación total del solvente (diclorometano) en un rotoevaporador 740 ± 50 mbar y 45°C hasta sequedad.

- 2) Pesar nuevamente el matraz, vial o tubo con el extracto libre de solvente. Anotar el peso (RB).

Cálculos:

La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTPs. Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de la muestra, se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado debe expresarse en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kg De suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

Anexo 4:

Fotografías para el método gravimétrico: hidrocarburos totales de petróleo.



Pesado de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).



- Las muestras se colocan en la centrifuga a 6 000 rpm a 10 minutos
- Las muestras son una mezcla de: Suelo seco + Sulfato De Sodio Anhidro (Na_2SO_4). + Diclorometano.



Extracto orgánico de la muestra inicial.



Agitación de la mezcla sólida en el vortex



Absorción de diclorometano para agregarlo en el tubo que contiene la mezcla solido suelo seco +sulfato de sodio.

*Tener en cuenta el riesgo de inhalación del reactivo (diclorometano) hoja de seguridad.



El extracto orgánico es colocado en el matraz de bola en el rotavaporador y esperar. Para su posterior pesado del envase que contiene el sobrenadante.



El matraz de bola contiene el sobrenadante listo para ser pesado