

UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

Facultad de Ingenierías y Arquitectura

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental



TESIS

**“Tratamiento de suelo contaminado por vertido
de crudo de petróleo mediante la inmovilización
de *Aspergillus niger*”**

Presentado por:

VALLADARES ROBLES, Lourdes Cynthia

Asesor:

ADALIDES ARENAS, Santiago

LIMA – PERÚ

2016

Dedicatoria:

A DIOS, a mi madre, a mi abuelito y abuelita, y a Luis Cubas por estar siempre apoyándome durante el transcurso de mi vida.

Agradecimiento:

A DIOS, a mis madre, a mi abuelito, abuelita, Luis Cubas, al Ing. Adalides Arenas como mi Asesor, amigos y compañeros por el constante apoyo y comprensión durante el desarrollo de mi proyecto de investigación, y por ayudarme a ser cada día un mejor profesional.

**Tratamiento de suelo contaminado por vertido de crudo de petróleo
mediante la inmovilización de células de *Aspergillus niger***

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO.....	3
INDICE DE ABREVIATURAS.....	7
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS.....	10
INDICE DE GRÁFICOS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.1. Caracterización de la realidad problemática.....	16
1.2. Formulación del problema.....	19
1.2.1. Problema General.....	19
1.2.2. Problemas Específicos.....	20
1.3. Objetivos.....	20
1.3.1. Objetivo General.....	20
1.3.2. Objetivos Específicos.....	20
1.4. Justificación.....	21
1.5. Importancia.....	22
1.6. Limitaciones.....	22
1.7. Delimitación de la Investigación.....	23
1.7.1. Delimitación espacial.....	23
1.7.2. Delimitación Temporal.....	24

CAPÍTULO II	25
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	25
2.1. Marco Referencial.....	25
2.1.1. Antecedentes de la investigación.....	25
2.1.2. Referencias Históricas.....	31
2.2. Marco legal.....	34
2.2.1. Leyes.....	34
2.2.2. Normas Técnicas.....	35
2.2.3. Decretos Supremos.....	36
2.3. Marco conceptual.....	39
2.4. Marco teórico.....	42
2.4.1. El suelo.....	42
2.4.2. El Petróleo.....	63
2.4.3. Biorremediación.....	87
2.4.4. Microrremediación.....	111
2.4.5. Organismos Hidrocarburoclásticos.....	112
2.4.6. Cepa <i>Aspergillus niger</i>	113
2.4.7. Inmovilización de la biomasa microbiana.....	115
2.4.8. Inmovilización en Hidrogeles.....	122
CAPÍTULO III	126
PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	126
3.1. Metodología.....	126
3.1.1. Método de la investigación.....	125
3.1.2. Tipo de la Investigación.....	139
3.1.3. Nivel de la Investigación.....	139
3.2. Diseño de la Investigación.....	139
3.3. Hipótesis de la Investigación.....	142
3.3.1. Hipótesis General.....	142
3.3.2. Hipótesis Específicas.....	142
3.4. Variables.....	142
3.4.1. Variable Independiente.....	142
3.4.2. Variable Dependiente.....	143

3.5. Cobertura del Estudio.....	143
3.5.1. Población.....	143
3.5.2. Muestra.....	143
3.5.3. Muestreo.....	144
3.6. Técnicas e Instrumentos.....	146
3.6.1. Técnicas de la Investigación.....	146
3.6.2. Instrumentos de la Investigación.....	150
CAPITULO IV.....	151
ORGANIZACIÓN, PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	151
4.1. Análisis e Interpretación de los Resultados.....	151
4.1.1. Caracterización del Suelo.....	151
4.1.2. Caracterización de los microorganismos durante el proceso de remediación sobre el suelo contaminado con petróleo.....	155
4.1.3. Variación de los Parámetros pH, Porcentaje de Humedad y Temperatura del suelo contaminado.....	156
4.1.4. Variación de los Parámetros: pH, Porcentaje de Humedad, Temperatura y HTP (Hidrocarburos Totales de Petróleo) durante el proceso de remediación sobre el suelo contaminado con petróleo.....	158
4.1.5. Análisis Estadístico.....	162
CONCLUSIONES.....	164
RECOMENDACIONES.....	166
BIBLIOGRAFÍA.....	168
ANEXOS	

INDICE DE ABREVIATURAS

HTP	Hidrocarburos Totales de Petróleo
DNALPs	Hidrocarburos pesados
LNAPLs	Hidrocarburos ligeros
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
OSINERGMIN	Organismos Supervisor de la Inversión en Energía y Minería
PNAA	Plan Nacional de Acción Ambiental
OEFA	Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental
C.D.	Capacidad Degradativa
A.E.	Actividad Emulsificante
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
GLP	Gas Licuado de Petróleo
DBO	Demando Bioquímica de Oxígeno
BTEX	Benceno, Tolueno, Naftaleno y Xileno
OPEP	Organización de Países Exportadores de Petróleo
API	American Petroleum Institute
Log Kow	Coeficiente octanol/agua
MNA	Atenuación Natural Monitorizada
UV	Ultravioleta

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Movimiento de los Hidrocarburos en el subsuelo.....	17
Figura N° 2: Horizontes del Suelo.....	44
Figura N° 3: Partes del Suelo a nivel hidrológico.....	44
Figura N° 4: Triángulo de textura a partir del cual se obtienen los nombres de las clases de textura.....	46
Figura N° 5: Movimiento de hidrocarburos pesados (DNALPs) en el subsuelo.....	62
Figura N° 6: Movimiento de Hidrocarburos ligeros (LNAPLs) en el subsuelo.....	63
Figura N° 7: Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo.....	70
Figura N° 8: Ejemplos de estructuras de (a) un hidrocarburo alifático, (b) un carbono aromático y (c) una molécula de asfaltenos.....	74
Figura N° 9: Ejemplos de hidrocarburos saturados que forman parte de la mezcla de hidrocarburos del petróleo (hidrocarburos lineales y ramificados).....	75
Figura N° 10: Ejemplos de hidrocarburos presentes en la fracción aromática del petróleo.....	76
Figura N° 11: Ejemplos de Asfaltenos (izquierda) y resinas (derecha).....	78
Figura N° 12: Lista de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos por la EPA, OMS y UE como contaminantes primarios.....	81
Figura N° 13: Pirosíntesis de HAP a partir de etano.....	82
Figura N° 14: Proceso que pueden sufrir un contaminante en el ambiente.....	92
Figura N° 15: Representación esquemática de los principales tipos de inmovilización de biomasa.....	119
Figura N° 16: Bloques G (ácido L-gulurónico); bloques M (ácido D-monofónico) y regiones MG.....	123
Figura N° 17: Representación gráfica del modelo "Egg-box".....	124
Figura N° 18: Redes de Alginato.....	125
Figura N° 19: Preparación del suelo contaminado.....	127
Figura N° 20: Suelo contaminado con crudo de petróleo.....	128
Figura N° 21: Preparación de la Cámara de Flujo Laminar.....	129
Figura N° 22: Material de vidrio a esterilizar.....	129
Figura N° 23: Cepa <i>Aspergillus niger</i> , ACTT 16888.....	130
Figura N° 24: Tubos de Ensayo con la Cepa A. Niger y el medio Agar S.....	130
Figura N° 25: Sabouraud Dextrose Agar.....	131
Figura N° 26: Sabouraud Agar dispuesto en Placas Petris.....	131
Figura N° 27: Realizando el Medio Líquido en el Extractor.....	132

Figura N° 28: Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en Placa Petri y Tubo de Ensayo.....	133
Figura N° 29: Semilla, <i>Aspergillus niger</i> en el medio de crecimiento.....	134
Figura N° 30: Macroalga <i>Macrocystis peryfera sp.</i>	135
Figura N° 31: Preparación de Alginato en base a la macroalga <i>Macrocystis peryfera sp.</i>	136
Figura N° 32: Semilla Final de <i>Aspergillus niger</i>	136
Figura N° 33: Mezcla Final (Cepa/Alginato).....	137
Figura N° 34: Células Inmovilizadas en base a <i>Aspergillus niger</i>	138
Figura N° 35: Aplicación de Cédulas Inmovilizadas en los terrarios de suelo contaminado.....	138

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Flujograma en caso de derrame de sustancias químicas y/o hidrocarburos.....	18
Tabla 2. Clasificación de las partículas de un suelo, utilizada a partir de 1936 en Alemania, está basada en una proposición original de Kopecky.....	48
Tabla N° 3: Constantes de difusión de los principales.....	53
Tabla N° 4: Presión de succión necesaria para eliminar agua en el suelo.....	55
Tabla N° 5: Clasificación de Suelos y su Porcentaje en el Mundo.....	56
Tabla N° 6: Composición elemental típica de un crudo de petróleo.....	68
Tabla N° 7: Tipo de crudo según el pozo de origen.....	72
Tabla N° 8: Esquema de biodegradabilidad de los diversos hidrocarburos.....	92
Tabla N° 9: Factores que influyen en los proceso de Bioaumentación.....	102
Tabla N° 10: Aplicaciones en las que se emplean células enteras inmovilizadas.....	116
Tabla N° 11: Ventajas de la inmovilización de células viables frente a la inmovilización de enzimas o a las células libres.....	117
Tabla N° 12: Resultados de la Conductividad Eléctrica del Suelo.....	152
Tabla N° 13: Resultados del Análisis Mecánico del Suelo.....	152
Tabla N° 14: Resultados de contenido de sales minerales.....	152
Tabla N° 15: Resultados de la Humedad del Suelo.....	153
Tabla N° 16: Resultados de la Materia Orgánica del Suelo.....	154
Tabla N° 17: Resultados de contenido de fósforo, potasio y calcáreo total del suelo	154
Tabla N° 18: Determinación del pH del Suelo.....	155
Tabla N° 19: Resultados de pH, %H y T° del suelo contaminado.....	156
Tabla N° 20: Resultados de pH, %H, T° y HTP durante el proceso de Biorremediación sobre suelo contaminado con petróleo.....	158
Tabla N° 21: Medición de los HTP (Hidrocarburos Totales de Petróleo) antes y después del proceso de biorremediación.....	161

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Variación del pH en suelo no contaminado.....	156
Gráfico N° 2: Variación del porcentaje de humedad en suelo no contaminado.....	157
Gráfico N° 3: Variación de la Temperatura en suelo no contaminado.....	157
Gráfico N° 4: Variación del pH sobre el suelo contaminado con petróleo...	158
Gráfico N° 5: Variación del Porcentaje de Humedad en suelo contaminado..	159
Gráfico N° 6: Variación de la Temperatura en suelo contaminado.....	160
Gráfico N° 7: Variación de HTP antes y después del proceso de biorremediación.....	161

RESUMEN

En la industria petrolera se desarrollan diversas actividades de exploración, explotación, funcionamiento de equipos de perforación para lograr llegar a grandes profundidades de aproximadamente 10,000 metros, tratamiento del material químico contaminado, en las cuales se pueden generar impactos negativos sobre el medio donde se desarrolla, por tal razón es importante enfatizar la búsqueda de un método que logre disminuir los efectos de los derrames de crudo de petróleo en el medio ambiente. El presente trabajo tiene por objetivo estudiar la degradación de los compuestos de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante la aplicación de un método de remediación, denominado inmovilización de microorganismos en un medio determinado, alginato, utilizando la cepa *Aspergillus niger* en placas Petri y tubos de ensayo, en un suelo contaminado. Después de un proceso de degradación de 28 días, se obtuvo un valor de remoción cercano al 70% de hidrocarburos totales de petróleo.

Palabras claves: Petróleo, biodegradación, Inmovilización de microorganismos, contaminación del suelo.

ABSTRACT

The oil industry in various activities of exploration, development, performance rig to make it to great depths of approximately 10,000 meters, chemical treatment of contaminated material, which can have negative impacts on the environment where the activities develops, for that reason is important to emphasized the research of a method that reduce the effects of crude oil spills on the environment. This paper aims to study the degradation of the compounds of total petroleum hydrocarbons (TPH) through the application of a remediation method, called immobilization of microorganisms in a particular environment, alginate, using the strain *Aspergillus niger* in petri dishes and tubes trial, in a contaminated soil. After a degradation process of 28 days, a value close to 70% removal of total petroleum hydrocarbons was obtained.

Key words: oil, biodegradation, immobilization of microorganisms, soil contamination.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sector hidrocarburífero en el Perú viene logrando una creciente importancia exploratoria y extractiva, lo cual se traduce en mayores ingresos para el Estado Peruano y un encadenamiento de actividades productivas alrededor del sector. Al mismo tiempo significa que el recurso natural será extraído y agotado eventualmente, por lo tanto es importante realizar un uso óptimo del mismo y desarrollar una gestión apropiada para no peligrar las necesidades de las próximas generaciones.

El Perú, a pesar de no ser un país petrolero, posee regiones donde existen problemas de contaminación ambiental por vertidos de crudo de petróleo, como en Tumbes, Loreto (Reserva Nacional de Pacaya Samaria), etc. Asimismo se debe analizar la razón por la cual los derrames de petróleo han ido incrementándose, pudiendo ser una de las mayores causas el transporte del recurso natural a través de ductos.

La actividad petrolera es una de las principales fuentes de energía, dado que aporta un porcentaje significativo del total de energía que se consume en el mundo. Los hidrocarburos de petróleo son uno de los grupos que contienen elementos químicos contaminantes, y debido a lo complejo de la composición del crudo de petróleo, la biodegradación por parte de los microorganismos

seleccionados dependerá de la concentración de los componentes del petróleo vertidos en los suelos.

La problemática plasmada en el presente estudio de investigación desde el punto de vista normativo, tiene como base legal la legislación ambiental peruana, la que tiene como objetivo asegurar que cualquier actividad de aprovechamiento de los recursos hidrocarburíferos se realicen en condiciones que no originen impactos negativos de acuerdo a lo establecido en la Ley Orgánica de Hidrocarburos, Ley N° 26221; además el Ministerio de Medio Ambiente, la autoridad a nivel nacional, dictará las medidas de prevención, mitigación, control, remediación para disminuir los actos o hechos que ocasionan la contaminación en el medio ambiente.

Esta tesis está organizada de la siguiente manera:

1. PAGINAS PRELIMINARES. Entre las que se tiene lo siguiente: Caratula, Dedicatoria, Agradecimiento, Resumen, Introducción, e Índice.
2. CONTENIDO TEMATICO.
 - a. Capítulo I: Planteamiento del Problema.
 - b. Capítulo II: Fundamentos Teórico.
 - c. Capítulo III: Planteamiento Metodológico.
 - d. Capítulo IV: Resultados Obtenidos.
3. PAGINAS COMPLEMENTARIAS, como son: Conclusiones, Recomendaciones, Bibliografía y Anexo.

En vuestra ilustrada mano podrá este trabajo, luego de su lectura, ser enriquecido a fin de que nos brinde un trabajo más acabado y de mejores condiciones.

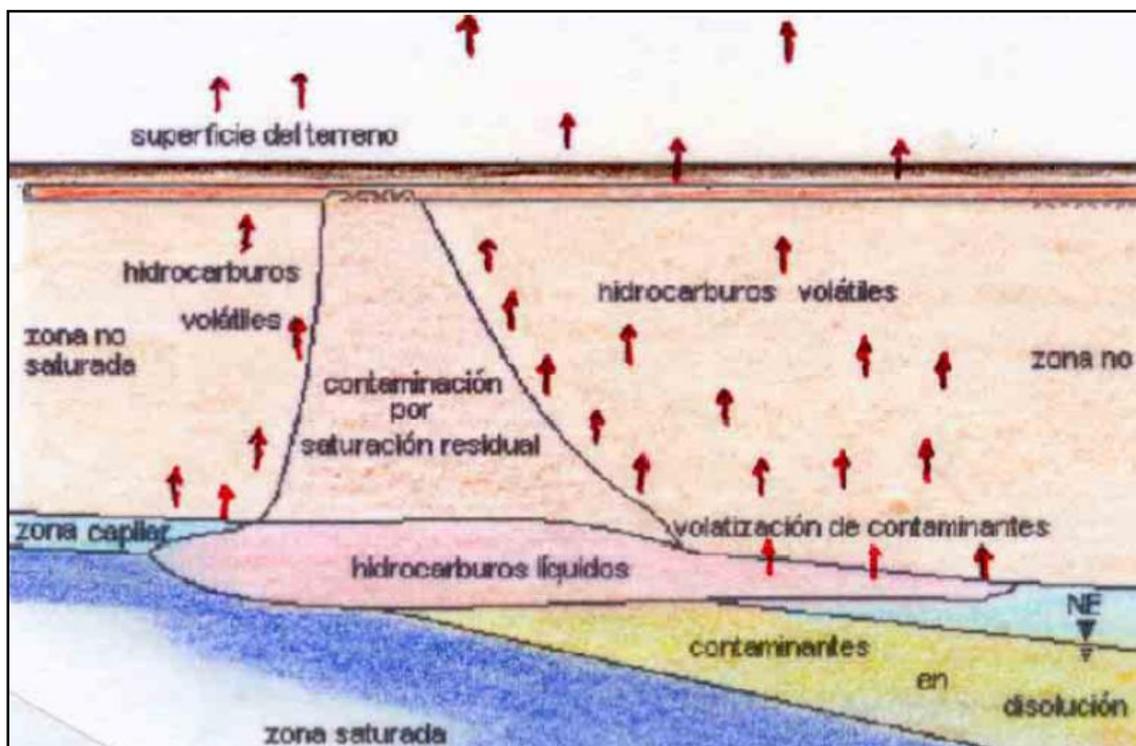
CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Caracterización de la realidad problemática

El derrame de los hidrocarburos de petróleo tiene un impacto negativo sobre el medio en el que se localiza, la magnitud del impacto dependerá del nivel de medidas de prevención tomadas. La contaminación del suelo se puede producir en las etapas de exploración, explotación, transporte y almacenamiento (ver Figura N°1), inclusive se presenta en la etapa sísmica que forma parte del proceso productivo.

Figura N° 1: Movimiento de los Hidrocarburos en el subsuelo

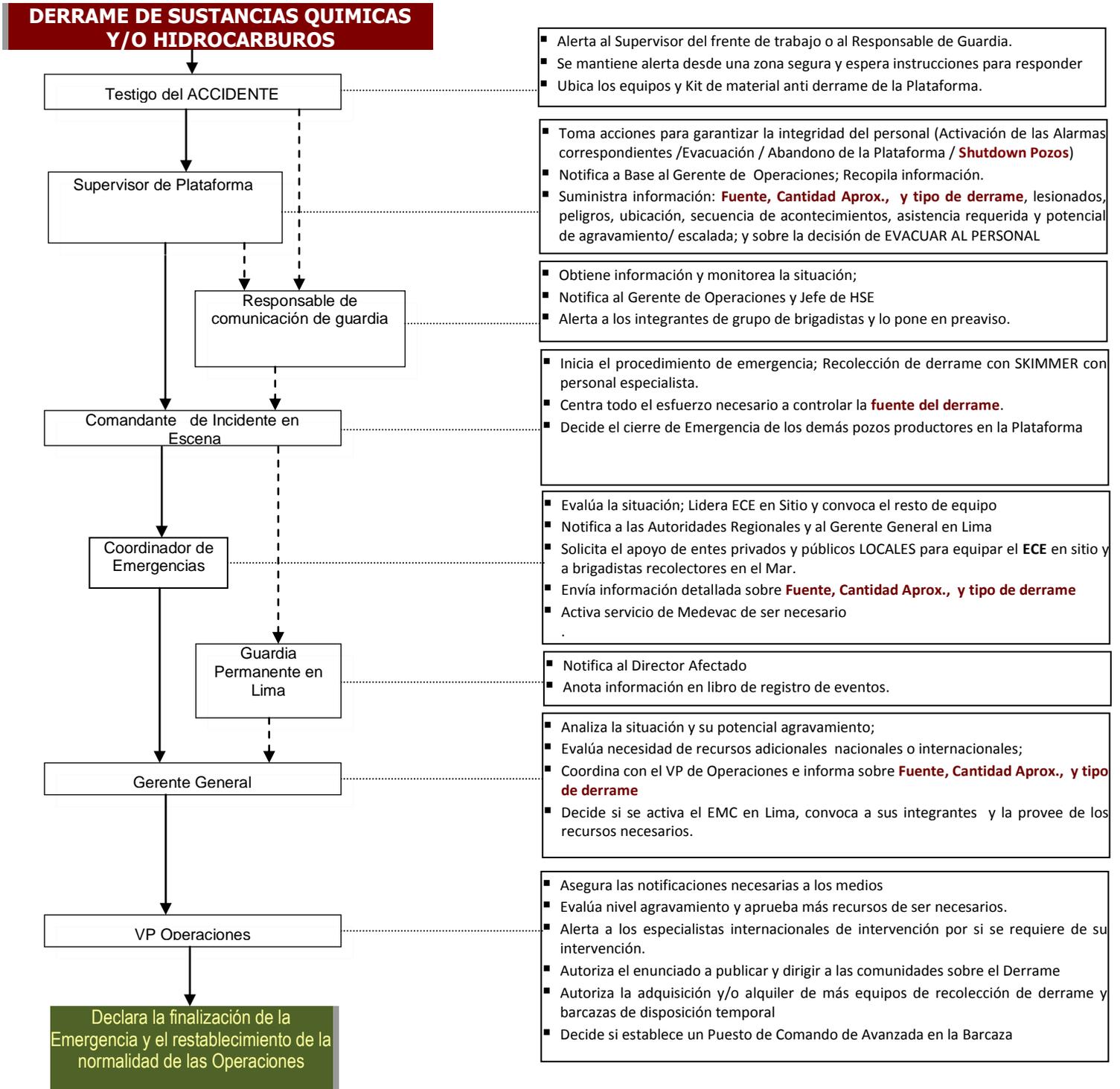


Fuente: Gestión Calidad Consulting, 2012.

Los impactos más importantes del derrame se producen en la actividad de los microorganismos y en la función que cumplen dentro del ecosistema. En un derrame la baja densidad del petróleo le permite formar una capa sobre el suelo, lo que impide el flujo de oxígeno desde el aire hacia la superficie terrestre, deteriorando así, la calidad de los ecosistemas de los sistemas bióticos. En el Perú, el procedimiento a seguir por las entidades del sector encargadas de la operación petrolera ante un derrame de petróleo, consiste en la activación de un Plan de Contingencia, previamente aprobado por la entidad reguladora, OSINERGMIN¹, con el objetivo de mitigar el impacto negativo del derrame. En dicho Plan se indican las responsabilidades en caso de derrame de sustancias químicas y/o hidrocarburos, en el Tabla N°1 se puede observar como ejemplo el Plan de Contingencia desarrollado por una empresa petrolera en el Perú.

¹ OSINERGMIN: Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería

Tabla N°1: Flujograma en caso de derrame de sustancias químicas y/o hidrocarburos



Extraído: Plan de Contingencia para la ampliación de actividades de perforación en la Plataforma Z1-8A, Albacora, Lote Z-1
Fuente: BPZ Exploración & Producción

Una de las técnicas utilizadas para mitigar el impacto de los derrames de petróleo es la biorremediación, que se define como el proceso en el que se utilizan organismos biológicos para remover sustancias peligrosas del ambiente.

A diferencia del uso de dispersantes químicos, la técnica de biorremediación no tiene efectos negativos secundarios, en cambio estos pueden causar un mayor daño que el derrame mismo, por su toxicidad. Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar de acuerdo al lugar donde se aplican, en técnicas in-situ y ex-situ. Entre las técnicas in-situ se encuentran la bioaumentación, la bioestimulación, la adición de enzimas y de nutrientes y la inmovilización de la biomasa microbiana, entre las técnicas ex-situ se tiene el tratamiento de biopilas, que consiste en apilar gran cantidad de material contaminado en grandes pilas de hasta cuatro metros de altura, proporcionando aire y nutrientes a la biomasa autóctona.

En el Perú, a pesar de la poca información que se puede obtener de los incidentes ambientales, los que se producen sin que se hayan realizado las mediciones oficiales de los efectos negativos que estos pueden causar, es por esta razón que la presente investigación busca ahondar en posibles soluciones a los problemas generados por los derrames de crudo de petróleo.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema General

¿En qué medida la inmovilización de *Aspergillus niger*, como método de biorremediación, reduce los efectos negativos ocasionados por el derrame de hidrocarburos de petróleo en los suelos?

1.2.2. Problemas Específicos

¿Cuáles son los niveles de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo?

¿Cuáles son los tipos de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo?

¿Cómo influyen las variables del método de biorremediación en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo petróleo?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Comprobar la viabilidad de la inmovilización de *Aspergillus niger*, como método de biorremediación, en la reducción de los efectos negativos ocasionados por derrames de hidrocarburos de petróleo en los suelos.

1.3.2. Objetivos Específicos

Determinar los niveles de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo.

Caracterizar la contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo.

Determinar cómo influyen las variables en el método de biorremediación en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo de petróleo.

1.4. Justificación

Las empresas dedicadas a las actividades de exploración y explotación de hidrocarburos cuentan con tecnologías cada vez más avanzadas para mitigar los efectos de la actividad petrolera en el medio ambiente, algunas empresas nacionales ya cuentan con sistemas anti derrames, pero a pesar de esto no se ha registrado ningún descenso en la cantidad de derrames de hidrocarburos en el territorio peruano, teniendo en cuenta además que la producción de petróleo continúa mostrando una tendencia decreciente, retrocediendo a 62,9 mil barriles diarios en el 2013² (6 % menos que en el 2012).

En el Plan Nacional de Acción Ambiental 2011 – 2012 se observa que la matriz energética actual es diversa y proviene mayormente del uso de energías renovables el 59% del mercado eléctrico se genera con hidroelectricidad, el 31% con gas, el 5% con residual, el 3 % con carbón y sólo el 2% con diesel. Una meta prioritaria del PNAA en acciones ambientales es hacer uso de un instrumento de gestión ambiental en el sector energético que permita mejorar los niveles de desempeño ambiental y social de las empresas energéticas, teniendo como meta al 2017 que el 40% de las grandes y medianas empresas tengan un sistema de gestión ambiental implementado y en el 2021 llegar a un 100 %.

La Política Nacional del Ambiente, en su primer eje de política relacionado a la conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y de la diversidad biológica establece que se debe fortalecer los conocimientos y tecnologías tradicionales compatibles con el manejo sostenible del suelo e impulsar acciones para prevenir los procesos de degradación y pérdida de suelos mitigando sus efectos y/o recuperándolos.

En el segundo eje, relacionado a la gestión integrada de la calidad ambiental, establece que cada industria debe contar con parámetros e indicadores de contaminación para el control y mantenimiento de la calidad del suelo,

² Memoria Anual de la Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y Energía, 2013.

tomando en cuenta sus fuentes fijas y móviles, para así poder evaluar la eficacia de la aplicación de los instrumentos de control de la calidad ambiental.

1.5. Importancia

El desarrollo de métodos más amigables con el medio ambiente tiene como función primordial remediar el daño de los derrames de crudo de petróleo sin generar efectos secundarios. Entre ellos se encuentra la biorremediación que tiene como ventaja ser más económica, útil y no impactar el medio afectado, ya que no utiliza instrumentos químicos como salchichas, dispersantes químicos, skimmers, paños oleofílicos, etc.

La biorremediación tiene como fundamento principal las reacciones que se generan en la biodegradación, en las que se hace uso de bacterias, hongos, levaduras y algas, las que se encargan de este proceso tomando como fuente de alimento al nitrógeno, fósforo, oxígeno, hidrocarburos y elementos que generalmente están presentes en medios marinos y/o terrestres.

El uso de este método necesita de la participación de diferentes disciplinas, principalmente en la etapa de la selección del tratamiento óptimo en la remoción de crudo de petróleo en ambientes marinos y terrestres contaminados.

1.6. Limitaciones

El desarrollo y actualización de las normas ambientales que tienen como finalidad salvaguardar los recursos renovables y no renovables del territorio peruano, están siendo aplicadas por la entidad fiscalizadora a aquellas empresas que contaminan en el medio ambiente a través de la actividad exploratorio y productora de hidrocarburo. A pesar de contar con leyes ambientales tan rigurosas, la contaminación de suelos por derrame de crudo de petróleo ha ido aumentando con el transcurso de los años. Es por esto la necesidad de desarrollar tecnologías limpias que no impacten en el medio afectado.

La implementación de este tipo de tecnologías, requiere de recursos financieros, uso de instrumentos de laboratorio, equipos multidisciplinarios que tienen como finalidad buscar una solución o una medida mitigadora a la problemática. Es por esto que las empresas responsables no realizan estudios de remediación del área que ha sido afectada, además las mismas instituciones del Estado no le dan la debida importancia, y se puede visualizar en el proyecto aprobado el 12 Julio del 2014, mediante Ley N° 30230, Ley que establece medidas tributarias, simplificación de procedimientos y permisos para la promoción y dinamización de la inversión en el país, en dicho proyecto se modifica el plazo de aprobación de los Estudios de Impacto ambiental a una menor cantidad de días, se reduce las funciones del Ministerio del Ambiente, disminuyen los niveles de estándares de calidad ambiental y se establecen límites máximos permisibles de contaminación, además se reducen las multas impuestas por el OEFA³ con la finalidad de reactivar la economía del País a causa de la gran demanda del recurso hidrocarburo y de la matriz energética con la que se cuenta actualmente.

1.7. Delimitación de la Investigación

1.7.1. Delimitación espacial

El estudio a cerca de tratamiento de suelo contaminado puede ser aplicado en diferentes situaciones y lugares donde se generé contaminación por vertimientos de crudo de petróleo. El desarrollo de la etapa experimental se realizó en el laboratorio central de la Universidad Alas Peruanas, sede Pachacamac, ciudad de Lima, haciendo uso de las muestras de crudo de petróleo del Lote ubicado en la Región Tumbes.

³ OEFA: Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental

1.7.2. Delimitación Temporal

El desarrollo del experimento se realiza durante los meses de primavera para obtener un mejor resultado de la aplicación del método, dado que los resultados se encuentran en función a los parámetros ambientales.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Marco referencial

2.1.1. Antecedentes de la investigación

Escalante (2002) realiza un estudio en Perú en el que hace la comparación de aislar bacterias oleofilicas a partir de muestras de suelos de Trompeteros (Iquitos) con la finalidad de seleccionar un consorcio bacteriano de elevada capacidad degradativa (C.D.) en laboratorio, la C.D. se determinó mediante la prueba de actividad emulsificante (A.E.)⁴ y por la prueba de actividad degradativa (A.D.)⁵, y compararla con la biodegradación de crudo de la refinería “La Pampilla” en suelos de cultivo de una zona aledaña a la huaca

⁴ Planteada por Goldman y col. en 1982.

⁵ Según Mills y col. en 1988

San Marcos contenidos en terrarios, con la finalidad de determinar la importancia de consorcios bacterianos y factores ambientales en la degradación de hidrocarburos. Se prepararon tres terrarios cada uno con 30 kg de suelo contaminado con petróleo, en el primero de control abiótico se determinó la degradación por factores ambientales, en el segundo se evaluó la degradación por bacterias nativas y en el último se inoculó el consorcio bacteriano exógeno seleccionado en laboratorio. Se evaluaron los parámetros de hidrocarburos totales, humedad, pH, número de microorganismos aerobios mesófilos, número de microorganismos oleofílicos, temperatura y tiempo. En los resultados las cepas bacterianas de mayor A.E. fueron la *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 y *Serratia rubidaea* 6B9, en función a la técnica de biorremediación se tuvo una degradación de crudo de petróleo del 92.5% en el terrario del consorcio bacteriano exógeno.

Díaz (2011), en la Antártida, desarrolla la técnica de biodegradación in-situ, bajo las estrictas condiciones climáticas antárticas, en la época de verano, en suelos contaminados en forma aguda de gasoil. Realiza estudios a pequeña escala usando dos sistemas experimentales que son mayormente utilizados en la biorremediación a mayor escala en terrenos ubicados en áreas templadas: las parcelas y las biopilas, se aplica una fuente inorgánica de nutrientes, una fuente orgánica compleja, harina de pescado, un producto comercial OSEII, sugerido por la EPA para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, y el surfactante comercial Brij700. Se plantearon los siguientes microcosmos: CC (control no tratado), SI (bioestimulado con sales inorgánicas), SIB (bioestimulado con sales inorgánicas y con Brij700), HP (bioestimulado con harina de pescado), HPB (bioestimulado con harina de pescado y con Brij700) y OSE (bioestimulado con el fertilizante OSEII). En los resultados del ensayo se observó una eliminación del 42% en el microcosmo control, el nutriente OSEII fue el que mostró mejores niveles de eliminación de hidrocarburo en un 49,4% respecto al microcosmo control.

Largo Pereda (2010), en la Universidad del País Vasco, realiza un estudio de biodegradación de alcanos mediante la inmovilización de bacterias en

hidrogeles adhesivos y biodegradables. Se aplican las siguientes bacterias; *M. hidrocarbonoclásticas*, *Pseudomonas sp. CHAPS-2* y dos cepas de *A. venustensis*. Se seleccionó la cepa de *A. venustensis* como candidata para el estudio en base a la degradación de alcanos de cadena variable, tanto en células libres como inmovilizada, el segundo criterio es la posibilidad de obtener gran cantidad de biomasa para los ensayos de inmovilización y degradación de aceite mineral con biomasa inmovilizada. Se observa que las bacterias hidrocarbonoclastas son capaces de degradar alcanos de hidrocarburos cuando sus células se encuentran tanto en forma libre como inmovilizada a soporte.

Martínez Altamirano (2013), en Quito estudia la capacidad de adsorción en función de la cantidad de petróleo de agua, el peso de biosorbente utilizado y el tiempo de adsorción de la bacteria *Pennisetum clandestinum* como biosorbente vegetal. Al utilizarlo se obtiene como resultado 1,5% de biosorbente y 1,5% de petróleo, dio como resultado una remoción del 97% de hidrocarburo de petróleo, observando que el agua quedaba libre de hidrocarburos luego del tratamiento.

Mohamad Ghazali (2004) en Malasia, aísla 6 bacterias de las cuales las siguientes bacterias, 2 de *Pseudomonas sp.*, 3 de *Bacillus sp.* y 1 de *Micrococcus sp.* toleraron grandes concentraciones de crudo de petróleo y son capaces de utilizar los compuestos alifáticos y monoaromáticos del hidrocarburo así como también los alcoholes y sus sustratos. Se aplico muestras de arena de playa contaminada por crudo de petróleo de un vertido de diesel sobre los consorcios de las bacterias mencionadas, y se obtuvo la remediación de 80,19% de remoción luego de 30 días de incubación del consorcio de bacterias.

García Orbe (2012) en Perú, realiza el estudio de biorremediación de suelos aledaños al Lote 31D de los pozos 05 y 09 del departamento de Loreto, concesionados por Petroperú a la empresa privada Maple Gas, contaminados por petróleo y remediados mediante compostaje con estiércol de porcino y equino. Realiza dos tipos de ensayo para determinar la biodegradación de

petróleo, armando bandejas de plástico transparentes de 60x40x40cm, donde se colocan tierra de suelo no contaminado, con una regadera se vertió petróleo, observando que el petróleo se había dispersado hasta unos 23,2 cm, luego se mezcló todo el contenido con estiércol de porcino – equino. Teniendo como resultado que después de un proceso de compostaje de 16 semanas utilizando microorganismos nativos del suelo, estiércol de equinos y porcinos se ha detectado una reducción del 80% de hidrocarburos.

Samanez Gibaja (2008) en Perú, aplica la técnica de biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. En el estudio se comparan 5 terrarios conformados de la siguiente manera: el primero por bacterias bioaumentadas reintroducidas con fertilizantes inorgánicos (B+F), el segundo por bacterias bioaumentadas reintroducidas sin fertilizantes (B-F), el tercero por bacterias nativas con fertilizantes inorgánicos (N+F), el cuarto por bacterias nativas sin fertilizantes inorgánicos (N-F) y el quinto el control abiótico (CA). Se seleccionó las siguientes bacterias *Pseudomonas aeruginosa* TK-5, *Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1, *Bacillus* sp. TX-4, y para el proceso de bioestimulación se seleccionó una mezcla de componentes inorgánicos. Los resultados en los terrarios determinaron que el de mayor porcentaje de biodegradación fue el de B+F con un 71.4%.

Izquierdo (2013) en Barcelona, implementa la estrategia de biorremediación de suelo basada en biopilas estáticas. El suelo se encontró contaminado por una mezcla heterogénea de gasoil y aceites minerales pesados (aceite hidráulico). En cada fase del tratamiento se construyó tres biopilas con una estructura piramidal de 37 m de largo por 20 m de ancho y 2 de altura, conteniendo unos 1800 m³ de suelo. Se escogió la biopila que contenía mayor concentración de HAP's. Se cuantificó el contenido de TPHs durante la biodegradación de hidrocarburos en el suelo, teniendo como resultado la degradación del 90% en 30 días, sin embargo a tiempos posteriores el resultado oscila entre el 65% y 88%. La técnica ha dado como resultado que la fracción alifática se ha degradado casi por completo a los 30 días, las clases de microcosmos incubados (*Alfaproteobacteria*) aumenta de forma significativa a los 3 días

(59%), de 7 a 15 días (100%), y decrece significativamente a los 30 (66%). La concentración se redujo de los 19799 mg/kg iniciales a 6373 mg/kg a los 120 días (67.8%) durante el tratamiento de biorremediación. La concentración de los 16 HAP's que se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA se redujo en un 93%, siendo los compuestos de dos y tres anillos los que se degradaron más rápida y extensamente (93-96%) en comparación a los compuestos de mayor peso molecular, como los de cuatro (86-91%) o cinco (73-96%) anillos.

Cabal (2009) en la Universidad de Oviedo, evaluó la eficacia de los métodos de adsorción sobre carbones activados para la eliminación de HAP presentes en agua. Desarrolla un análisis de las características, tanto químicas como texturales, de los carbones activados antes y después de la adsorción de estos compuestos. Asimismo, se han realizado diversos tratamientos de oxidación con diferentes agentes oxidantes. La aplicación de la técnica dio como resultado para el caso del acenafteno y del fluoreno un descenso del volumen de aproximadamente 80%, mientras que cuando se satura el carbón activado con naftaleno es de un 57%.

Claire Booyzen (2007) en Johannesburgo, desarrolla la técnica de bioaumentación, asilando bacterias locales de África de suelos contaminados de una mina de oro, esta técnica existe actualmente pero no ha sido desarrollada y probada en el hemisferio norte, asimismo no ha sido formulada ni probada en África. Se seleccionaron seis tipos de bacterias de muestras de agua y del subsuelo, teniendo como resultado un incremento homogéneo de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, y degradando un 98% el crudo de petróleo.

Hernández (2008) en Madrid, realiza la investigación sobre actividades de exploración y producción de hidrocarburos, evaluación de impacto ambiental, auditoría ambiental. Propone investigar el impacto de la actividad petrolera sobre la problemática del sistema ambiental agua de las instalaciones de producción. Las alternativas planteadas son la remoción de compuestos orgánicos aromáticos y de bajo peso molecular, con baja degradabilidad, lo

cual crea un problema en las aguas industriales que lo contienen, por tal motivo las alternativas se establecieron en un proceso de oxidación avanzada con peróxido de hidrogeno y se realizó un comparativa de un sistema de flotación natural (FN) y flotación con aire inducido como pre tratamiento Los datos obtenidos dieron como resultado que la oxidación avanzada con peróxido de hidrogeno con un desengrasado previo, brinda rendimientos altos en cuanto a la remoción de fenoles y DQO, 83% y 90% respectivamente, alcanzando niveles más altos al pasarlos por un filtro de arena.

Xu Ran (2004) en Singapur, realiza el estudio de optimización de biorremediación in-situ para la costa de Singapur. Este experimento se realiza en diversas partes. La primera parte analizó los factores claves que estimulan la biorremediación del petróleo en sedimentos de playa, con esto se logró comprobar que la adición de nutrientes es clave en la biodegradación de petróleo comparado con enmiendas de aceite crudo de palma, como un co-sustrato sencillo de carbono y un inóculo de biomasa microbiana mejorada. En la segunda y tercera parte se identificó una fuente de nutrientes para la biorremediación de petróleo de sedimentos de playa. En la cuarta parte se utilizó el fertilizante Osmocote y se demostró que su presencia acelera significativamente la biodegradación de compuestos alifáticos y HAP's, sin embargo la biodegradación de los HAP's todavía requiere una mejora adicional. En la quinta parte se analizó el efecto de dos biopolímeros, quitina y quitosano, dando como resultado que la quitina y el quitosano se biodegradan durante la duración del experimento, liberando gradualmente nitrógeno y estimulando la biodegradación de alcanos (n-C12 a n-C32, pristano y fitano).

Medina (2014) en la Bahía de Amuay en Venezuela, realiza el estudio de biorremediación mediante el empleo de microorganismos autóctonos en suelos contaminados. La metodología se realiza mediante la toma de muestra de un área contaminada por derrame de crudo de petróleo, sobre el cual se colocan biorreactores con la adición de nutrientes para el desarrollo de los microorganismos. Sobre la muestra tomada del suelo contaminado se aíslan e identifican tres especies autóctonas de hongos del género *Aspergillus*, como lo

son: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus terreus*. Durante 30 días de tratamiento ex situ se remueve el crudo de petróleo con un valor del 85%.

2.1.2. Referencias históricas.

Las investigaciones llevadas a cabo durante la primera mitad del siglo XX han brindado la sólida base de conocimiento actual acerca de la degradación de hidrocarburos, especialmente de alcanos, y se han identificado una gran cantidad de microorganismos capaces de utilizar estos compuestos orgánicos altamente reducidos. Así, Zobell (1946) realizó una revisión acerca de la capacidad de ciertos microorganismos que utilizan hidrocarburos como única fuente de energía en su metabolismo

La contaminación ambiental por petróleo y productos petroquímicos han sido reconocidos como un problema serio y significativo (Bozo et al., 2013). De la misma forma la generación de impactos adversos en los diferentes compartimientos ambientales constitutivos de un entorno a causa de aportes intencionales y no intencionales (incidentes y accidentes) de fugas y derrames de hidrocarburos, así como afloramientos naturales, se constituye en uno de los problemas ambientales más importantes para el recurso suelo (Arrieta, 2012).

Las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos en la actualidad son las actividades de explotación y transporte del petróleo. En los ecosistemas terrestres, el suelo representa el medio físico que sustenta la vida de diversas especies, tanto animales como vegetales. La materia orgánica e inorgánica del suelo da cabida a la coexistencia de una gran cantidad de microorganismos que se adaptan a sus características físicas y químicas aun cuando estas sean variables. Los microorganismos tienen una gran importancia ecológica en los ecosistemas terrestres, pues cumplen la función de descomponer sustancias orgánicas de desecho en sus componentes básicos, los cuales se metabolizan junto con los nutrientes obtenidos del suelo, para generar nueva biomasa y llevar a cabo sus funciones vitales. (Castro, 2004).

Los compuestos de petróleo son tóxicos para los humanos y para la vida en general, porque se pueden incorporar en cualquier nivel de la cadena alimenticia, asimismo este hecho ha generado que la comunidad científica tome un mayor interés en la investigación de su distribución, comportamiento y además los derivados del mismo en el medioambiente. Por otra parte, no todos los hidrocarburos se degradan con la misma facilidad, en general las tasas de biodegradación disminuyen con el aumento del peso molecular y complejidad de los hidrocarburos, en ese sentido, las tasas de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos son inversamente proporcionales al número de anillos y de sustituciones (Leahy y otros 1990). De igual manera los derrames de petróleo pueden causar daños a largo plazo en los ecosistemas acuáticos, terrestres, en la salud humana y en los recursos naturales, Por lo tanto es importante la caracterización de los derrames de petróleo y sus derivados, ya que se puede predecir su comportamiento y efecto a largo plazo en el medioambiente, pudiendo así seleccionar el método de limpieza más apropiado (Bozo et al., 2013)

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, entre ellas destacan las siguientes: (i) son efectivas y ambientalmente seguras; (ii) los contaminantes se destruyen o transforman; (iii) se pueden aplicar in situ; (iv) generalmente no se requieren tratamientos adicionales; y (v) suelen presentar ventajas económicas. En contrapartida suele tratarse de procesos lentos, que involucran muchas etapas y que se realizan bajo condiciones ambientales complejas y no modificables.

Dentro de la biorremediación, la bioaumentación ofrece una manera de proporcionar microbios específicos en número suficiente para completar la biodegradación e involucra la inoculación de una cepa, o consorcio microbiano mixto enriquecido, en la tierra o en el agua, siendo los microorganismos indígenas más eficaces para degradar petróleo crudo local o sus derivados locales, que para degradar hidrocarburos provenientes de otras regiones. Los microorganismos indígenas están presentes en cantidades muy pequeñas o

pueden encontrarse en formas metabólicas inactivas en sus hábitats y por ello no tienen la capacidad para degradar un contaminante en particular.

La biorremediación de compuestos tóxicos usando la tecnología de inmovilización de microorganismos ha sido estudiada empleando diferentes transportadores que incluyen poliacrilamida (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; White y Thomas, 1990), alginato (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Weir et al., 1995), o k-carragenina (Cassidy et al., 1997; Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar et al., 2001; Gardin y Paus, 2001). En los últimos años se ha descubierto y reconocido un nuevo grupo, ecofisiológicamente inusual, de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos. Este nuevo grupo, denominado bacterias hidrocarbonoclastas obligadas (OHCB), de acuerdo a las investigaciones, tendrá un papel muy importante en la eliminación de hidrocarburos procedentes del petróleo en aguas marinas contaminadas (Yakimov et al., 2007).

Entre los organismos eucariotas existen varios capaces de degradar hidrocarburos, entre ellos hongos, levaduras, algas y cianobacterias (Van Beilen et al., 2003). En ambientes acuáticos los principales géneros de bacterias y hongos con esta capacidad son, *Pseudomonas*, *Acromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Atlas, 1981).

Desde los estudios pioneros de Zobell (1946) en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos. La inmovilización de las bacterias aumenta significativamente la biodegradación de crudo en comparación con células libres en un amplio rango de salinidad (Díaz et al., 2002).

Las principales ventajas de la inmovilización son las siguientes: (i) estabilidad, (ii) elevada densidad celular, (iii) elevadas tasas de conversión, (iv) limitación de la inhibición por sustrato y toxicidad debido a límites difusionales (Abou

Seoud y Maachi, 2003) y (v) uso en reactores continuos (Manohar y Karegoudar, 2001).

2.2. Marco legal

2.2.1. Leyes

a. Ley General del Ambiente, Ley N° 28611

La Ley General del Ambiente, a través del artículo 2° inciso 2.1., la disposiciones contenidas en la presente Ley, así como en las normas complementarias y reglamentarias, son de obligatorio cumplimiento para toda persona natural o jurídica, pública o privada, dentro del territorio nacional, el cual comprende el suelo, subsuelo, el dominio marítimo, lacustre, hidrológico e hidrogeológico y el espacio aéreo.

En el artículo 91°, el estado es responsable de promover y regular el uso sostenible del recurso suelo, buscando prevenir o reducir su pérdida o deterioro por erosión o contaminación. Cualquier actividad económica o de servicios debe evitar el uso de suelos con aptitud agrícola, según lo establezcan las normas correspondientes.

b. Ley Orgánica de Hidrocarburos, Ley N° 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.

2.2.2. Normas Técnicas

a. Norma Técnica Peruana – NTP 321.002.2001 PETROLEO Y DERIVADOS. Petróleos industriales. Especificaciones

Esta Norma Técnica Peruana establece las propiedades requeridas de los Petróleos Industriales, como normatividad oficial de calidad de estos combustibles, en el lugar y tiempo donde se efectúe la actividad de su comercialización.

b. Norma Técnica Peruana – NTP 360.009-1-2013. Recipientes Portátiles para Gases Licuados de Petróleo. Válvulas. Parte 1: Válvulas de cierre automático. Requisitos y ensayos

Esta Norma Técnica Peruana establece los requisitos generales para los materiales de construcción, el diseño, la fabricación y los ensayos de tipo de la válvula de cierre automático para los recipientes portátiles destinados a utilizarse específicamente con gases licuados de petróleo (GLP).

c. ISO 3016:1994 PRODUCTOS DE PETRÓLEO. Determinación del punto de fluidez

Esta Norma Técnica Peruana, da un método para determinar el punto de fluidez de los productos del petróleo, también describe el un procedimiento separado adecuado para la determinación del punto de del aceite del combustible pesado, los productos que contienen componentes de combustibles residuales de gota más bajo.

d. ISO 3104:1994 PRODUCTOS DE PETRÓLEO. Determinación para la viscosidad cinemática y cálculo de la viscosidad dinámica de líquidos transparentes y opacos

La presente Norma Técnica especifica un procedimiento para la determinación de la viscosidad cinemática y muestra cómo se puede conseguir la viscosidad dinámica.

e. ISO 3170:2004 LÍQUIDOS DE PETRÓLEO. Muestreo Manual

Esta Norma Internacional define los métodos a utilizar para obtener, de forma manual, muestras de hidrocarburos líquidos o semi-líquidos, residuos y sedimentos contenidos en tanques fijos, vagones cisterna, cisternas de carretera, barcasas y buques petroleros, bidones y latas, o bien, de los productos líquidos que se bombean por los oleoductos.

f. ISO 3171:1988 LÍQUIDOS DE PETRÓLEO. Muestreo automático en línea

Esta Norma Internacional recomienda procedimientos para el petróleo crudo y los productos petrolíferos líquidos que se transportan por oleoducto. No se aplica a los gases licuados del petróleo y gases naturales licuados. El propósito principal de dar directrices para la especificación, pruebas, operación, mantenimiento y supervisión de las muestras de aceite crudo.

2.2.3. Decretos Supremos

a. DECRETO SUPREMO N° 002-2013-MINAM

Los estándares de calidad ambiental para suelo, son aplicables a todo proyecto y actividad, cuyo desarrollo dentro del territorio nacional genere o puede generar riesgos de contaminación del suelo en su emplazamiento y áreas de

influencia. Estos estándares son obligatorios en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental.

b. DECRETO SUPREMO 039-2014-EM Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos

El Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos – DECRETO SUPREMO No. 039-2014-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.

c. DECRETO SUPREMO 052-93-EM Reglamento de Seguridad para el Almacenamiento de Hidrocarburos 18 / 11 /1993

Las indicaciones del Reglamento son guías para el desarrollo de proyectos en sitios de configuración o topografía normal. De no tener estas condiciones, se deberá tomar precauciones especiales para satisfacer las condiciones básicas de seguridad y eficiencia. Las situaciones de control ambiental no contempladas en este Reglamento, se regirán por lo dispuesto en el artículo 87°, de la Ley Orgánica de Hidrocarburos N° 26221 y su reglamento correspondiente. Las instalaciones para almacenamiento de hidrocarburos, deberán cumplir con las reglamentaciones de control emitidas por el Organismo Competente del Ministerio de Energía y Minas.

d. DECRETO SUPREMO 026-94-EM Reglamento de seguridad para el Transporte de Hidrocarburos 10 / 05 / 1994

Las normas, regulaciones, condiciones o definiciones contenidas en este Reglamento no eximirán en modo alguno a los capitanes, propietarios, operadores y agentes de naves, diques, espigones, muelles u otras instalaciones portuarias de su principal responsabilidad que es la de velar por la seguridad de dichas naves, diques, espigones, muelles o instalaciones y sobre todo del personal.

e. DECRETO SUPREMO 043-2007-EM Reglamento de Seguridad para las Actividades de Hidrocarburos. 22 / 08 / 2007

El presente reglamento tiene por objeto, preservar la integridad y la salud del personal que interviene en las actividades de hidrocarburos, así como prevenir accidentes y enfermedades, proteger a terceras personas de los eventuales riesgos provenientes a las actividades de hidrocarburos, proteger las instalaciones, equipos y otro bienes con el fin de garantizar la normalidad y continuidad de las operaciones, las fuentes de trabajo y mejorara la productividad y preservar el medio ambiente.

f. DECRETO SUPREMO 032-2004-EM Reglamento de las actividades de exploración y explotación de actividades de hidrocarburos 21 / 08 /2004

Este reglamento tiene por objeto normas las actividades de Exploración y Explotación de Hidrocarburos en el ámbito nacional, con el fin de obtener la Recuperación Máxima Eficiente de los Hidrocarburos de los Reservorios, dentro de condiciones que permitan operar con seguridad y protección del ambiente. El presente Reglamento es de aplicación para los Contratistas, quienes a su vez, son responsables del cumplimiento del mismo por parte de sus Subcontratistas.

g. DECRETO SUPREMO 012-2008-EM Reglamento de Participación Ciudadana para la realización de actividades de Hidrocarburos 20 / 02 / 2008

La consulta es una forma de Participación Ciudadana que tiene por objeto determinar si los intereses de las poblaciones que habitan en el área de influencia directa de un proyecto de Hidrocarburos podrían verse afectados, a efectos de que antes de emprender o autorizar cualquier programa de actividades, se conozca y analice las principales preocupaciones manifestadas respecto a los posibles impactos sociales, económicos, ambientales y culturales que podrían generarse a partir de su elaboración y/o ejecución.

Este proceso está orientado a informar y recoger las medidas que objetiva y técnicamente permitan evitar o mitigar posibles impactos ambientales y sociales negativos, así como identificar y recoger las iniciativas, sugerencias y aportes para potenciar o maximizar los impactos sociales y ambientales positivos del proyecto.

2.3. Marco conceptual.

2.3.1. Petróleo: es un combustible fósil que proviene de la descomposición de seres vivos enterrados hace millones de años, que se transformaron bajo condiciones adecuadas de presión y temperatura. Los combustibles fósiles representan el 75% de las energías no renovables.

2.3.2. Hidrocarburos: están compuestos por alcanos de cadena lineal (n – alcanos o n – parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), ciclo alcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. Estos se dividen en dos grupos de compuestos, en hidrocarburos mono aromáticos y poli aromáticos

- 2.3.3.** Petróleo crudo: es una mezcla de hidrocarburos con pequeñas cantidades de compuestos de azufre, oxígeno, nitrógeno y ciertos metales como: vanadio, níquel, sodio y otros, que son considerados como impurezas del petróleo, las que afectan su calidad. Esta mezcla compleja de hidrocarburos (parafinas, naftenos, asfálticos y aromáticos) debe procesarse para desarrollar productos de mayor valor agregado como el gas licuado de petróleo (GLP), la gasolina, el diesel, disolventes, el queroseno, el aceite residual y el asfalto..
- 2.3.4.** Aromáticos: es un compuesto presente en el crudo de petróleo, está fracción está compuesta por uno o varios anillos bencénicos presentes en su estructura. De acuerdo a los anillos bencénicos, pueden haber monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromático (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAP's con más de dos anillos bencénicos)
- 2.3.5.** Parafinas volátiles: están presentes en un 30% del crudo de petróleo, son n – alcanos e isoprenoides que son alcanos ramificados, son la fracción más volátil del crudo de petróleo y la más susceptibles a que genere pérdidas abióticas por su volatilización.
- 2.3.6.** Parafinas no volátiles: son n - alcanos e isoprenoides, los n – alcanos tiene de cadenas de 11 a 40 carbonos, aunque se han encontrado algunos con cadenas más largar, y constituyen el 15 y 20 % del crudo que no se puede degradar, mientras que los isoprenoides tienen cadenas de 12 a 22 carbonos y son el 1 a 2 % del crudo, y pueden llegar hasta el 15 % de crudo degradado, además los que tienen de 11 a 15 carbonos en su cadena son de volatilidad intermedia.

- 2.3.7.** DBO: demanda bioquímica de oxígeno, es la cantidad de oxígeno disuelto (mg/l), necesaria para descomponer la materia orgánica presente por la acción de los microorganismos aeróbicos presentes en el agua. Normalmente se emplea la DBO5, que mide el oxígeno consumido por los microorganismos en cinco días. Resulta el parámetro de contaminación orgánica más ampliamente empleado.
- 2.3.8.** Fracción saturada: n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas, las ciclo parafinas o ciclo alcanos y los hopanos.
- 2.3.9.** Fracción aromática: Hidrocarburos mono aromáticos diaromáticos y aromáticos policíclicos (HAP)
- 2.3.10.** Fracción de resinas: Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
- 2.3.11.** Fracción de asfaltenos: Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metalporfirinas, fenoles polihidratados. Son menos abundante y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular.
- 2.3.12.** Naftenos: Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31 % del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden entre el 50 y 55 % de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos.

2.3.13. Oleofinas: Son alquenos, los cuales están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones trazas. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de cracking, existiendo hasta un 30 % en gasolinas y un 1 & en fueles.

2.4. Marco teórico.

2.4.1. El Suelo

2.4.1.1. Definición

El suelo es el resultado de la descomposición de la roca madre por factores climáticos y la acción de los seres vivos, estando constituido por partículas minerales de meteorización (arena, arcilla, etc.) materia orgánica, agua, aire y organismos vivos, que interactúan entre ellos en un equilibrio dinámico que puede ser modificado por las características intrínsecas de cada uno de ellos (Bardgett, 2005).

Adicionalmente, también se le denomina al suelo como un sistema estructurado, biológicamente activo, que tiende a desarrollarse en la superficie de las tierras emergidas por la influencia de la intemperie de los seres vivos. Se trata de un sistema formado por componentes minerales, componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénicos.

Los suelos proporcionan soporte físico y nutriente para el crecimiento de las plantas y los microorganismos. Existe una gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos) que casi siempre están

presentes en ellos, aunque las densidades de población de las mismas varían ampliamente. La superficie de los suelos constituye el lugar donde se producen la mayoría de las reacciones bioquímicas pertenecientes al ciclo de la materia orgánica, el nitrógeno y otros minerales, a la meteorización de las rocas y a la toma de nutrientes por parte de las plantas (Alexander, 1991).

Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en gran manera sobre la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua y, por lo tanto, en la actividad biológica. Las propiedades más importantes de las que engloban estos grupos son el tamaño de partículas, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y fracción orgánica. El tamaño de partícula afecta a la química de la superficie de los suelos y al tamaño de los poros. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica del suelo.

El suelo se ha formado lentamente como consecuencia de la acción combinada del clima, materia orgánica, paisaje, factores bióticos (vegetación, fauna y acciones antrópicas) y el tiempo.

En un corte vertical del terreno, se puede distinguir diversas capas que se llaman horizontes. Cada uno de ellos tiene características y propiedades diferentes en cuanto a color, estructura, textura, composición química, biológica o mineralógica. De forma descendente se distinguen (Griem W. & Griem-Klee S.)

- Horizonte O: horizonte orgánico de un suelo mineral que hace referencia al suelo de bosque.
- Horizonte A: horizonte mineral oscurecido por aportes de materia orgánica.
- Horizonte B: horizonte mineral formado en el interior del suelo
- Horizonte C: horizonte mineral, comparativamente poco afectado por procesos edafogénicos, excepto meteorización o hidroformismo.

- Horizonte D: roca consolidada subyacente, que es demasiado dura para romperla con la mano. Impide el paso de las raíces.

A nivel hidrológico, el suelo se define de manera descendente por lo siguiente:

- Zona edáfica: es la parte superficial del terreno que contiene las raíces de las plantas
- Zona vadosa o no saturada: es el espacio comprendido entre el nivel freático y la superficie, donde no todos los poros están llenos de agua
- Nivel freático: es el lugar en el que se encuentra el agua subterránea y separa la zona saturada de la no saturada. Éste varía según las circunstancias: descendiendo en épocas secas cuando el acuífero no se recarga o lo hace a un ritmo más lento que su descarga y ascendiente en épocas húmedas.
- Zona saturada: está situada por debajo del nivel freático donde el agua rellena completamente los poros de las rocas
- Acuífero: terreno rocoso permeable bajo la superficie, en donde se acumula y por donde circula el agua subterránea.

Figura N° 2: Horizontes del suelo

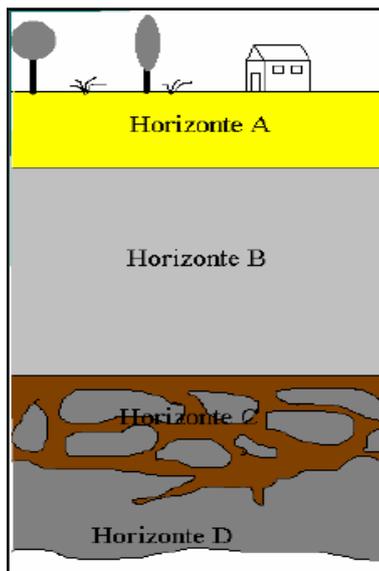
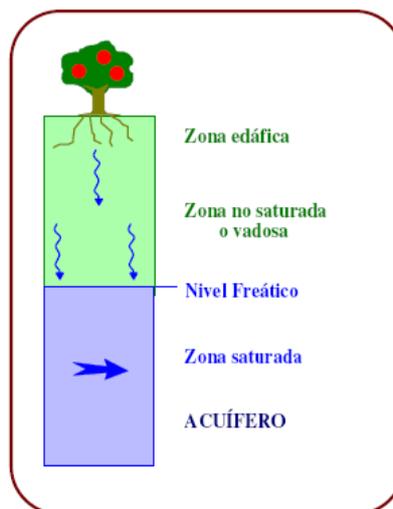


Figura N° 3: Partes del suelo a nivel hidrológico



Fuente: Raquel Alonso Riesco, 2012

2.4.1.2. Composición del suelo

La composición de los suelos depende del tipo de roca que les da origen, del tipo de organismos que se desarrollan en ellos y de sus condiciones climáticas y topográficas. Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm de diámetro), limos (50-2 μ m de diámetro), arcillas (inferior a 2 μ m de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos de diferentes suelos.

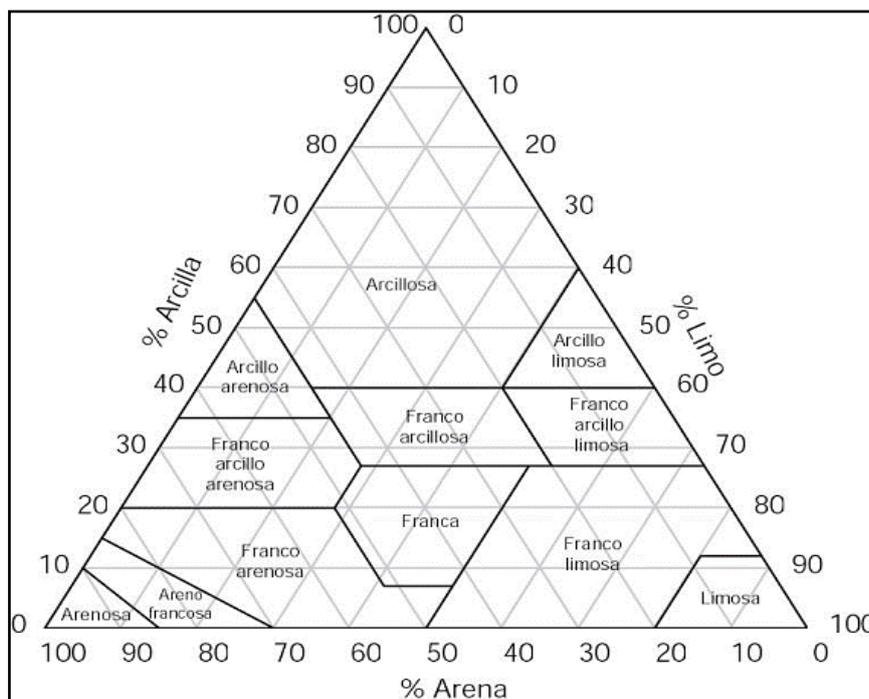
La matriz de un suelo está compuesta por cinco componentes principales:

- **Minerales:** los materiales minerales constituyen los principales componentes estructurales de los suelos y suponen más del 50% del volumen total.
- **Aire-agua:** conjuntamente constituyen el volumen de poros, que, por lo general, ocupa entre el 25% y 50% del volumen total. La proporción aire – agua varía considerablemente con la humedad del suelo.
- **Organismos vivos:** ocupan menos del 1% del volumen
- **Materia orgánica:** oscilan entre 3 y 6% del volumen, con valor medio.

Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa. Estos poros pueden contener agua o aire, de manera que en el suelo existen tres fases sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en estos poros contiene sales minerales y nutrientes, constituyendo el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. Las oscilaciones en el contenido de agua, habituales en el suelo, pueden por lo tanto afectar dicha actividad. La materia orgánica procede, fundamentalmente, de la vegetación y por lo tanto podemos encontrar concentraciones muy diferentes variando entre suelos muy ricos (bosques) y pobres (desiertos) en materia orgánica. Su descomposición forma el humus bruto que aporta al suelo diferentes minerales y gases: amoníaco, nitratos, fosfatos, etc; en su mayoría con un pH ácido.

En cuanto a la textura el suelo está constituido por partículas de diferentes tamaños. El término textura se usa para representar la composición granulométrica del suelo. Conocer esta granulometría es esencial para cualquier estudio. Para clasificar la textura del suelo básicamente todas aceptan los términos de grava, arena, limo y arcilla, hay diferencia en los valores de los límites establecidos para definir cada clase. Cada término textural se corresponde con una determinada composición cuantitativa de arena, limo y arcilla (ver Figura N° 4). En los términos de textura se prescinde de los contenidos de grava; se refieren a la fracción del suelo que se estudia en el laboratorio de análisis de suelos y que se conoce como tierra fina.

Figura N° 4: Triángulo de textura a partir del cual se obtienen los nombres de las clases de textura.



Fuente: Alexander, 1991.

a. Fracción Mineral

El mineral predominante en un suelo es dióxido de silicio (SiO_2). Igualmente se encuentran en abundancia el aluminio y el hierro, mientras que el calcio, magnesio, potasio, titanio, manganeso, nitrógeno, azufre, sodio y fósforo están presentes en menor cuantía (Alexander, 1991). La composición química varía

de un suelo a otro y, en un mismo suelo, a diferentes profundidades. Los microorganismos obtienen parte de los nutrientes que necesitan de la fracción mineral del suelo, siendo dichos nutrientes nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, hierro, calcio, manganeso, zinc, cobre y molibdeno. Sin embargo los microorganismos pueden disponer con facilidad únicamente de una pequeña parte de esos minerales, convirtiéndolos más en una provisión de lento empleo, que en una fuente de rápido uso.

Los suelos se clasifican según el tamaño de sus partículas⁶, teniendo en cuenta tres componentes principales:

- Arcilla. Pasa por un tamiz de 0,002 mm (2 μ m)
- Limo. Queda retenido en el tamiz de 0,002 mm pero pasa a través del tamiz de 0,05 mm
- Arena. Queda retenida en el tamiz de 0,05mm aunque pasa a través del de 2mm⁷.

El área específica (área/volumen) de los diferentes tipos de partículas afecta directamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (ver Tabla N° 2). La arcilla constituye el tipo de partícula que mayor efecto produce sobre las propiedades de un suelo, principalmente debido a la alta actividad superficial que la caracteriza. La mayor parte de sus partículas son de naturaleza coloidal, tienen una carga superficial negativa y de forma plan; además, son buenos absorbentes de agua, iones y gases. Las partículas de mayor tamaño, como la arena, no tienen el mismo nivel de actividad superficial. Los principales efectos asociados a las partículas de arena están relacionados con el tamaño del poro del suelo y, por tanto, con el movimiento del aire y el agua a través del mismo (las arenas no afectan en gran medida a las propiedades químicas y biológicas del suelo).

⁶ En general, la clasificación según tamaños está basada en el análisis granulométrico que proporciona el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)

⁷ Aquellas partículas que quedan retenidas en el tamiz de 2mm de paso se clasifican como grava o piedra

La presencia en un suelo de superficies que absorban con gran intensidad determinadas clases de compuestos puede reducir la disponibilidad de compuestos orgánicos para la biodegradabilidad. También afecta la disponibilidad de nutrientes la capacidad de intercambio de cationes en el suelo de los minerales arcillosos y los compuestos orgánicos que constan de zonas con carga eléctrica superficial negativa⁸. El amonio, por ejemplo, que tiene carga positiva, pasa a estar disponible en menor grado para su uso directo por plantas y microorganismos y queda retenido en el suelo más tiempo que los nitratos, oxidándose y pasando a tener carga negativa.

Tabla 2. Clasificación de las partículas de un suelo, utilizada a partir de 1936 en Alemania, está basada en una proposición original de Kopecky

Material	Característica	Tamaño mm
Piedra	---	Mayor de 70 mm
Grava	Gruesa	30 a 70
	Media	5 a 30
	Fina	2 a 5
Arena	Gruesa	1 a 2
	Media	0.2 a 1
	Fina	0.1 a 0.2
Polvo	Grueso	0,05 a 0.1
	Fino	0,02 a 0,05
Limo	Grueso	0.006 a 0.02
	Fino	0.002 a 0.006
Arcilla	Grueso	0.0006 a 0.002
	Fino	0.0002 a 0.0006
Ultra-Arcilla	---	0.00002 a 0.0002

Fuente: Mecánica de Suelos, Tomo 1, Von Terzaghi, 1998.

b. Materia Orgánica de un suelo

La fracción del suelo está compuesta por:

- Residuos de plantas y animales
- Células Microbianas

⁸ Atraen iones de carga positiva, tales como NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}

- Productos resultantes del metabolismo microbiano, el Humus. Es la materia orgánica que ha sufrido varias degradaciones y transformaciones. Está compuesto en su mayor parte por sustancias polimerizadas: compuestos aromáticos, polisacáridos, aminoácidos, polímeros del ácido urónico y compuestos que contienen fósforo (Alexander, 1991).

Mucha de la materia orgánica de un suelo, en particular el humus, es ligeramente soluble únicamente en agua y de alguna forma, resistente a la biodegradación. El material húmico tiene propiedades coloidales y una carga neta negativa; por lo tanto, la importancia que tiene en el proceso de formación de complejos organometálicos es considerable.

2.4.1.3. Tipos de suelos según sus características biológicas

La arcilla y el humus son el asiento de la actividad del suelo; estos dos constituyentes existen en el llamado estado coloidal. Las propiedades químicas y físicas de los suelos son controladas, en gran parte, por dichos compuestos, que actúan como centros de actividad donde ocurren reacciones químicas y cambios nutritivos.

Por sus características biológicas los suelos pueden ser:

- **Suelos mull o de humus elaborado:** se caracterizan por tener una actividad biológica intensa, sobre todo de la fauna y microorganismos que se alojan en el suelo y descomponen rápidamente la materia orgánica del mismo. Aparecen en regiones de temperatura elevada y humedad mediana. El suelo está bien aireado. La roca madre suele ser calcítica y la vegetación rica en nitrógeno.
- **Suelos mor o de humus bruto:** son suelos biológicamente poco activos. La vegetación tiende a ser acidificante, pobre en nitrógeno, y la roca madre silícica. La lentitud de los procesos de descomposición favorece que se forme un mantillo de materia orgánica mal descompuesta.

- **Suelos moder:** poseen un tipo de humus intermedio entre el mull y el mor. En realidad se trata de la degradación desde el bosque caducifolio a la pradera alpina.
- **Suelos de turba:** son suelos formados en condiciones anaeróbicas permanentemente cubiertos de agua. La fauna y la flora se reduce a especies microscópicas y pequeños hongos. La transformación de la materia orgánica es muy lenta, y se acumula en grandes cantidades. Las turbas pueden ser tanto ácidas como básicas. Según las condiciones climáticas y topográficas los suelos pueden variar de un tipo a otro.
- **Suelo permafrost o pergelisol:** por falta de calor está permanentemente helado, lo que impide el desarrollo de la vegetación. En un suelo permafrost podemos diferenciar la zona helada de la capa de molisol, que se deshíela en verano y se hielá en invierno

2.4.1.4. Estructura y Agregación de un suelo

- Estructura de un suelo: la estructura de un suelo puede definir como la disposición y organización de las diferentes partículas del mismo. Dicha estructura y organización de las diferentes partículas del mismo. Dicha estructura constituye una propiedad cualitativa y depende de la porosidad total de un volumen de suelo, de la forma de cada poro y de la distribución global de los tamaños de los poros. Como consecuencia, la estructura de un suelo afecta en gran medida a las propiedades mecánicas de éste, principalmente al movimiento de fluidos, incluidas la infiltración, la retención de agua y la aireación.

Aquellos suelos en los que las partículas están sueltas y no adheridas entre sí (como los depósitos no consolidados de polvo del desierto), se definen como carentes de estructura o como poseedores de una estructura de grano simple. En contraposición, los suelos con partículas estrechamente unidas (como en una arcilla seca), se definen como poseedores de una estructura en masa. Los

suelos que poseen una estructura intermedia entre las dos anteriormente descritas, se denominan como agregados (Hillel, 1982).

- Agregación de un suelo: la agregación de un suelo consiste en la estabilización de la arena, limo y arcilla, mediante la formación de complejos de materia arcillosa – orgánica en agregados. En comparación con las partículas minerales, los agregados constituyen unidades estructurales temporales, en los cuales, su estabilidad se ve afectada en gran parte por la actividad microbiana, los cambios climáticos y por las prácticas agrícolas (tales como la preparación del terreno para su sembrado).

La formación de agregados es el resultado de los enlaces iónicos originados entre arcillas, que poseen una gran superficie neta negativa, y materia orgánica, que también está cargada negativamente para valores de pH neutro, a través de los cationes polivalente presentes en el suelo. Los agregados padecen una consolidación posterior debido a fuerzas físicas tales como evaporación, deshielo, el crecimiento de raíces y la compactación (Eweis et al., 1999).

2.4.1.5. Gases de un suelo

Existe una relación directa entre las cantidades de agua y aire contenidas en un volumen de suelo, ya que el espacio de poros que no ocupe el gas lo ocupa el agua. Los principales gases que conforman un suelo son, en esencia, los mismos que se encuentran en la atmósfera terrestre. El aire de la atmósfera está compuesto, aproximadamente, por un 78,08% de nitrógeno (N_2), un 20,94% de oxígeno (O_2), un 0,035% de dióxido de carbono (CO_2) y un 0,93% de gases inertes como el argón y el neón. Sin embargo, las concentraciones relativas de dichos gases en el suelo específicamente del O_2 y del CO_2 dependen de la aireación del mismo de la actividad microbiana en todo el perfil.

En un suelo con buena aireación la concentración de O₂ puede oscilar entre el 18% y 20% y la concentración del CO₂ puede alcanzar valores tan altos como del 1% al 2%. En suelos con menor aireación (como los suelos arcillosos con un alto contenido en agua y una actividad microbiana considerables) el CO₂ puede llegar a presentarse en una concentración del 10%.

En cuanto a la actividad microbiana, el nivel de aireación de un suelo no es tan importante como las condiciones en el interior de los agregados. Aquellos suelos que en general están bien aireados pueden tener zonas microscópicas anaeróbicas en el interior de las formaciones de agregados, las cuales constituyen una explicación relativa a la presencia de bacterias anaeróbicas, tales como los clostridium, en las capas superiores de un suelo (Eweis et al., 1999). Las bacterias aerobias al mismo tiempo que colonizan zonas microscópicas, consumen todo el oxígeno allí almacenado, dando lugar a las condiciones que las bacterias anaerobias necesitan para desarrollarse y sobrevivir. Se calcula que la transición de condiciones aerobias a anaerobias tiene lugar para valores de la concentración de oxígeno inferiores al 1% al mismo tiempo se cree que manteniendo una aireación adecuada del suelo, el porcentaje del espacio de los poros ocupado por aire no disminuiría por debajo de un 10% (Paul y Clark, 1989).

a. Difusión de gases

En el perfil de un suelo: la difusión de gases en el perfil de un suelo, como describe la ley de Fick, es directamente proporcional al gradiente de concentración en dicho perfil:

$$q_z = -D \frac{dC}{dz} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 1)$$

Donde:

Q = flujo difusivo, g/cm².s

D = coeficiente de difusión, cm²/s

C = concentración del gas, g/cm³

Z = profundidad, cm

Los gases se mueven bien en la fase aire, esto es, a través de los poros suponiendo que están conectados entre sí y en contacto con la atmósfera, o en fase líquida en forma disuelta. La solubilidad de los gases en agua depende de varios factores, incluyendo el propio gas, la temperatura y las presiones parciales de los gases en el espacio de poros (Eweis et al., 1999). Sin embargo, la difusión de gases en agua es una diez mil veces más lenta que en el aire (ver Tabla N° 3).

Tabla N° 3: Constantes de difusión de los principales

Gas	Difusividad, cm ² /s		Coeficientes adimensional de la ley de Henry*
	Aire	Agua	
CO ₂	0,161	0,177 x 10 ⁻⁴	1,07
O ₂	0,205	0,180 x 10 ⁻⁴	30,7
N ₂	0,205	0,164 x 10 ⁻⁴	60,4

Fuente: Paul y Clark, 1989

* $H = C_g/C_L$

2.4.1.6. Humedad de un suelo

Para darse una idea general de la importancia que tiene el agua para el suelo es necesario resaltar que junto con sus sales disueltas, forma la llamada solución del suelo; ésta es esencial para abastecer de nutrimentos a las plantas que en él se desarrollan.

La humedad del suelo influye significativamente en la actividad biológica, puesto que un suministro adecuado de agua es esencial para el crecimiento y la estabilidad microbianos. Un suelo con una humedad demasiado baja da

lugar a zonas secas y a una disminución en la actividad microbiana; sin embargo, demasiada humedad inhibe el intercambio de gases y el movimiento de oxígeno a través del suelo y deriva en la aparición de zonas anaerobias, lo cual daría lugar a la eliminación de las bacterias aerobias y el aumento de la presencia de anaerobios o anaerobios facultativos.

El agua que se encuentra en un suelo se clasifica en tres tipos:

- Gravitacional: es el agua que está disponible para los microorganismos y las raíces de las plantas. Ésta juega un papel importante en el transporte de contaminantes y otras materias.
- Capilar: es el agua que está contenida en los poros; también está disponible para los microorganismos del suelo.
- Osmótica: es el agua que está retenida por las partículas de arcilla y el humus y, opuesto a los otros tipos de agua, no es de fácil alcance para los microorganismos y las raíces de las plantas.

El contenido de agua en un suelo, en peso o volumen, es función de la presión de succión o, como también se le conoce, el potencial de la matriz. Como concepto, el potencial de la matriz constituye una medida de la tenacidad con la que es agua es retenida en los poros o en la matriz de un suelo. Principalmente, el agua es retenida en los poros por efecto capilar y por adsorción. En la práctica, el potencial de la matriz es una medida de la succión necesaria para que un determinado volumen de suelo contenga una cierta cantidad de agua. La relación entre el potencial de la matriz y la humedad del suelo se representa gráficamente mediante la curva característica de la humedad de un suelo, la cual es única para cada tipo de suelo. Según los diferentes tipos de suelo, cuanto mayor sea el contenido de arcilla de un suelo, mayor será su capacidad de retener agua y la variación de la pendiente de la curva características suelo-agua será más gradual (Eweis et al., 1999).

En la bibliografía la presión de succión puede expresarse en bares (bar) y algunas veces en atmósferas (atm) o en megapascales (MPa), pero en el

laboratorio normalmente se expresa en centímetros de succión de agua. La altura de la columna de agua se traduce como medida de presión mediante la Ecuación N° 2.

$$P = \rho gh$$

(Ecuación N° 2)

Donde:

P = presión, kg/m.s²

ρ = densidad de agua, km/m³

g = constante gravitacional, 9,81m/s²

h = altura de la columna de agua, m

Los tres tipos de agua anteriormente mencionados⁹, pueden ser eliminados de la matriz de un suelo si se aumenta la presión de succión, como se ve en la Tabla N° 4 se estima que la actividad microbiana óptima se obtiene para las humedades correspondientes a 0,5 bares de presión de succión (Paul y Clark, 1989). A presiones de succión menores el suelo tiene demasiada humedad y puede encharcarse, mientras que en presiones mayores el suelo está demasiado seco.

Tabla N° 4: Presión de succión necesaria para eliminar agua en el suelo

Tipo de agua	Presión de succión necesaria para eliminar todo el agua	
	m	Bares
Gravitacional	0 - 3	0 – 0,3
Capilar	3 - 150	0,3 - 15
Osmótica	150 - 1500	15 – 150

Fuente: Paul y Clark, 1989

⁹ Gravitacional, capilar y osmótica

2.4.1.7. Sistemas de Clasificación de Suelos

Los suelos son clasificados de acuerdo con su estructura y composición en órdenes, subórdenes, grandes grupos, subgrupos, familias y series. Se ha visto que las características del suelo enormemente de un lugar a otro; se han reconocido estas variaciones en los diferentes lugares y han establecido distintos sistemas de clasificación, ver Tabla N° 5.

Tabla N° 5: Clasificación de Suelos y su Porcentaje en el Mundo

Tipo de Suelo	% de superficie en el mundo
Aridisoles	19.2
Inseptisoles	15.8
Alfisolos	14.7
Entisoles	12.5
Oxisoles	9.2
Molisolos	9.0
Ultisoles	8.5
Espodosoles	5.4
Vertisoles	2.1
Histosoles	0.8
Suelos diversos	2.8
Total	100

Fuente: Paul y Clark, 1989

Las diferencias que presentan los suelos se utilizan para clasificarlos en diez órdenes principales:

- Ardisoles: son los suelos de climas áridos ya sean fríos o cálidos, que no disponen durante largos períodos de agua suficiente para el crecimiento de cultivos o pasturas polifíticas. La mayor parte del tiempo el agua presente es retenida a gran tensión, lo que la hace prácticamente inutilizable para las plantas o bien es agua salada. En general estos suelos se caracterizan

por un horizonte superficial claro y pobre en materia orgánica (epipedón ócrico) por debajo del cual puede aparecer una gran variedad de caracteres morfológicos de acuerdo a las condiciones y a los materiales a partir de los que se ha desarrollado.

- Entisoles: en este orden están incluidos los suelos que no evidencian o tienen escaso desarrollo de horizontes pedogenéticos. La mayoría de ellos solamente tiene un horizonte superficial claro, de poco espesor y generalmente pobre en materia orgánica (epipedón ócrico).
- Inceptisoles: son suelos de regiones subhúmedas y húmedas que no han alcanzado a desarrollar caracteres diagnósticos de otros órdenes pero poseen evidencias de desarrollo mayores que las de los Entisoles. Debe interpretárselos como suelos inmaduros que tienen débil expresión morfológica de los suelos maduros. Muestran horizontes alterados que han sufrido pérdida de bases, hierro y aluminio pero conservan reservas de minerales meteorizables.
- Alfisoles: son suelos que se desarrollan en climas que tienen períodos áridos; por lo tanto, el perfil se presenta seco en parte del año. El orden de los alfisoles se caracteriza por presentar un horizonte subsuperficial de enriquecimiento secundario de arcillas desarrollo en condiciones de acidez o de alcalinidad sódica, y asociado con un horizonte superficial claro, generalmente pobre en materia orgánica o de poco espesor.
- Oxisoles: este orden de suelos son bien conocidos por su presencia en selvas tropicales húmedas, 15 a 25° norte y sur del ecuador terrestre. Los oxisoles siempre tienen color rojo o amarillo, debido a la alta concentración de hierro (III) y óxidos e hidróxidos de aluminio. Además contienen cuarzo y arcilla caolinita, más pequeñas cantidades de otros minerales de arcilla y de materia orgánica.
- Molisoles: básicamente son suelos negros o pardos que se han desarrollado a partir de sedimentos minerales en climas templado húmedo a semiáridos, aunque también se presentan en regímenes fríos y cálidos

con una cobertura vegetal integrada fundamentalmente por gramíneas. Otras propiedades que caracterizan a los molisoles son: la estructura granular o migajosa moderada y fuerte que facilita el movimiento del agua y aire; la dominancia del catión calcio en el complejo de intercambio catiónico, que favorece la fluctuación de los coloides. Los molisoles son utilizados por el hombre, en un alto porcentaje, para la producción de alimentos.

- Ultisoles: se desarrollan en climas con superávit de precipitación, pero con una estación parcialmente seca. Lo anterior los hace ser lixiviados y pobres en bases. Fuerte desequilibrio entre la cantidad de bases liberadas por meteorización y las bases removidas por lixiviación. La agricultura es imposible sin el uso de fertilizantes.
- Espodosoles: son suelos desarrollados en climas húmedos y fríos, en presencia de vegetación de bosque. Existencia de un horizonte de eluviación, espódico, en el cual se acumulan sustancias amorfas, tanto coloides orgánicos, como sesquióxidos de aluminio.
- Vertisoles: son suelos en donde hay un alto contenido de arcilla expansiva conocida como montmorillonita que forma profundas grietas en las estaciones secas, o en años. Los vertisoles se forman típicamente de rocas altamente básicas tales como basalto en climas estacionalmente húmedos o sujetos a sequías erráticas y a inundación. Dependiendo del material parental y del clima pueden oscilar del gris o rojizo al más familiar negro, además son especialmente buenos para el cultivo del arroz debido a su impermeabilidad cuando se saturan.
- Histosoles: este orden comprende a los suelos orgánicos, que tienen su origen en la producción de materia orgánica en forma más rápida que su mineralización, lo que ocurre comúnmente bajo condiciones de saturación con agua casi continua que restringe la circulación del oxígeno a través del suelo. La lentitud resultante en la descomposición de la materia orgánica permite su acumulación. La mayoría tiene una densidad aparente baja (>

de 1 gr/cm³). Comúnmente están saturados con agua, tiene una capacidad de retención de humedad extremadamente alta.

- Andisoles: el material original lo constituyen fundamentalmente cenizas volcánicas, son suelos de regiones con temperatura media anual superiores a 0°. Se encuentran en áreas onduladas o montañosas de las regiones húmedas. Tienen una textura fina, aunque su contenido arcilloso no pasa de 20 a 25%, pobre en arenas, estructura muy porosa y permeabilidad elevada.

2.4.1.8. Causas y Efectos de la Contaminación del Suelo

Un suelo contaminado es aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de compuestos químicos de carácter peligroso de origen antropogénica, en concentraciones que superan los estándares de calidad ambiental y que conllevan a un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente.

Las causas de contaminación del suelo son (Riesco, 2012):

- Almacenamiento incorrecto de productos y/o residuos de actividades industriales
- Vertidos incontrolados de residuos
- Escombro industrial
- Bidones enterrados
- Accidentes en el transporte de material peligroso
- Fugas en tanques en operaciones
- Uso incorrecto de pesticidas y/o abonos
- Deposición de contaminantes atmosféricos

Los efectos de contaminación del suelo son (Riesco, 2012):

- Contaminación de las aguas subterráneas

- Sedimentación en los ríos
- Evaporación de compuestos volátiles
- Peligros en excavaciones

2.4.1.9. Fuentes de Contaminación por Hidrocarburos

La contaminación por hidrocarburos se produce en forma frecuente y los principales orígenes de aparición de hidrocarburos en el suelo-subsuelo son por orden de importancia (Riesco, 2012):

- Fuga de depósitos
- Vertidos accidentales
- Enterramiento de residuos que contienen hidrocarburos
- Lavado de maquinaria
- Riegos de caminos de tierra con residuos líquidos para evitar el polvo

2.4.1.10. Comportamiento del Hidrocarburo en el Subsuelo

Un derrame de hidrocarburos genera cambios progresivos de las propiedades físico-químicas del suelo. Los procesos de intemperización o meteorización ocurren cuando se inicia el derrame de crudo de petróleo, además se generan los siguientes procesos: evaporación, disolución, dispersión, oxidación, emulsión, sedimentación y biodegradación.

La tasa de intemperización varía en función de las características del producto derramado y de las condiciones climáticas existentes en el lugar del derrame.

Los hidrocarburos tienen las siguientes variables denominadas degradabilidad, comportamiento y la extensión en el medio. Cuando el hidrocarburo es vertido en la superficie, éste se propaga verticalmente hacia el nivel freático y cuando lo alcanza, se va diluyendo, desplazándose según el flujo del agua, siendo que la mayor parte de los hidrocarburos se acumulan directamente en el agua y bajo la zona de fuga, además extendiéndose hacia la zona de menor velocidad

de flujo. Lo siguiente es que los hidrocarburos se van diluyendo hasta alcanzar la saturación, valor por el cual el hidrocarburo deja de fluir, y así el hidrocarburo se desplaza rápidamente en el componente horizontal.

El derrame de crudo de petróleo en suelo puede percolar hasta los acuíferos, de manera que parte del hidrocarburo percolado puede sufrir, durante su movilización, los siguientes procesos:

- **Evaporación:** los compuestos más volátiles de los hidrocarburos son los que se evaporan, haciéndolo más pesado, pasadas las 24 horas casi el 40% del hidrocarburo se ha evaporado. Estos porcentajes varían de acuerdo al valor de la viscosidad de los hidrocarburos, por lo que este proceso de evaporación es muy trascendental en los derrames. La evaporación de los hidrocarburos es uno de los factores principales para determinar el destino del derrame. Durante las primeras 24 horas la evaporación es responsable por la pérdida de hidrocarburos de tamaño C_6 a C_{13} .
- **Disolución:** este proceso es de largo plazo y continúa durante todo el proceso de degradación del hidrocarburo. Los compuestos más ligeros son los más solubles, por lo tanto se convierten en los más tóxicos, por lo que es importante calcular su concentración para estimar los posibles efectos tóxicos.
- **Oxidación:** la descomposición del hidrocarburo se origina por la combinación del hidrocarburo con el oxígeno molecular. A mayor área expuesta exista mayor será la oxidación y mayor la velocidad de degradación. La radiación ultravioleta puede reducir diariamente 1% del derrame, pero va a depender de la intensidad de la radiación solar.
- **Emulsificación:** es el procedimiento por el cual un líquido se dispersa en sobre otro líquido en forma de pequeñas gotitas, es decir que queda como partículas en suspensión.

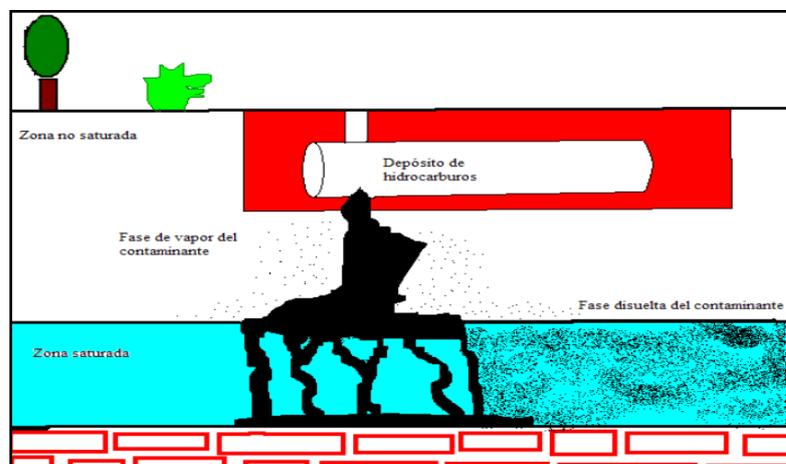
- **Sedimentación:** este proceso se da cuando el hidrocarburo se intertemperiza, provocando un incremento de su densidad respecto al agua circundante y por consiguiente se hunde.

Cuando los hidrocarburos vertidos logran alcanzar el nivel freático, se debe tener en cuenta que el nivel freático puede tener oscilaciones muy amplias en función del nivel de recarga del acuífero que puede ser bajo/alto, o en caso existan bombeos, porque estas variables hacen subir y bajar a los contaminantes a través del subsuelo.

Dependiendo si el hidrocarburo presenta una alta o baja densidad en las fases en que se encuentra se le denomina Dense Nonaqueous Phase Liquid (DNALPs) o Light Nonaqueous Phase Liquid (LNAPLs) y cada uno de ellos presenta una evolución diferente en el subsuelo.

- Los DNALPs o hidrocarburos pesados tienden a penetrar por la zona saturada, venciendo las fuerzas de presión de los poros. Debido a la diferencia de densidades y efectos de la capilaridad, el desplazamiento del hidrocarburo dentro de la zona saturada se hace inestable por lo que la migración se produce en forma de ramificaciones (ver Figura N° 5)

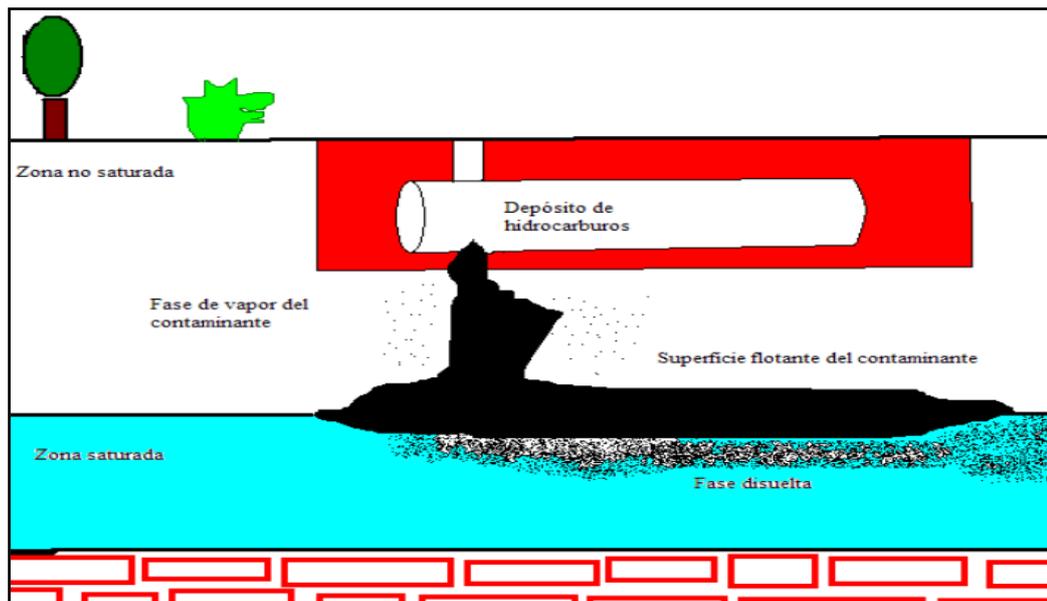
Figura N° 5: Movimiento de hidrocarburos pesados (DNALPs) en el subsuelo



Fuente: Proyecto de Recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, 2012

- Los LNAPLs o hidrocarburos ligeros tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en la dirección del flujo del agua subterránea. Este es el caso de las gasolinas, aceites y petróleo crudo (ver Figura N° 6)

Figura N° 6: Movimiento de hidrocarburos ligeros (LNAPLs) en el subsuelo



Fuente: Proyecto de Recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, 2012.

2.4.2. El Petróleo

Etimológicamente la palabra petróleo significa aceite de piedra, por su textura similar a la del aceite y hallarse principalmente en yacimientos de roca sedimentaria. Su color varía entre ámbar y negro, en función de su composición.

El petróleo, así como sus derivados, es un conjunto complejo de compuestos químicos (Henry, 1998), en el que coexisten fases sólidas, líquidas y gaseosas. En la literatura existen varias publicaciones acerca de la composición del petróleo (Postanogova, 1981; King, 1988; Henry, 1998), y a medida que se mejoran las técnicas analíticas de separación e identificación, se consigue identificar nuevos componentes. Está compuesto básicamente por carbono e

hidrógeno, y algunos hetero-átomos, principalmente nitrógeno, azufre y oxígeno (Alajbeg et al., 2000), formando hidrocarburos, moléculas altamente reducidas y con un gran potencial químico (Kenney et al. 2002).

El petróleo es el producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados aromáticos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, el benceno, tolueno y xileno (BTEX) y los hidrocarburos policíclicos (HAP's) tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno (García, 2012).

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993). Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnología de biorremediación (Alexander, 1999). El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación (García, 2012).

2.4.2.1. Formación

La formación del petróleo se basa en la transformación en hidrocarburos de restos orgánicos de plantas y animales principalmente por la acción de bacterias anaerobias. Para que este proceso pueda llevarse a cabo son necesarias altas temperaturas, una gran presión, que es ejercida por las capas terrestres de sedimentos y, por supuesto, condiciones de anoxia.

La variación de estas condiciones determinará la composición final del crudo (Schenk et al., 1997; Langrock and Stein, 2004), aunque existan ciertas discrepancias acerca de cuál de estas variables es la más importante, y algunos autores sugieren que los mecanismos relacionados con la temperatura son los más determinantes (Paschoa, 1997).

A finales de siglo pasado apareció en la comunidad científica cierto debate acerca del posible origen abiótico del petróleo, bajo condiciones muy concretas como sistemas hidrotermales de algunas zonas de rifts oceánicos que alcanzan temperaturas de entre 200 y 400 °C (Simoneit et al., 2004) y aunque el debate sigue abierto (Zhang, 2008), mayoritariamente, la idea original del origen del petróleo sigue siendo la más aceptada (Ding et al., 2008; Grosjean et al., 2009).

2.4.2.2. Producción

A finales de 2006, las reservas probadas de petróleo a nivel mundial ascendían a 168.600 millones de toneladas, de las cuales, el 75.5% se encuentran en los 11 países pertenecientes a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP). Si a esto le unimos las reservas de la antigua Unión Soviética, el 85.9% del petróleo cuya existencia es conocida se encuentra localizado en estos pocos países. El petróleo en crudo, tal y como se encuentra en los yacimientos no tiene utilidad práctica algunas. Es necesario realizar un proceso de separación en fracción o refinado.

2.4.2.3. Aplicaciones

Los productos derivados del petróleo tienen gran variedad de usos aunque principalmente sirven para el gasto energético de consumidores industriales y privados. El 90% de los derivados del crudo se destina a combustibles. En este sentido, se obtienen del refinado del petróleo, gasolinas de diferentes

octanajes, gasóleos, para vehículos y calefacciones, gases del petróleo, como butano o propano, combustibles de aviones, con alto octanaje como el querosene o fuelóleos, que se usan en la industria o como combustibles de buques.

Además del uso energético, los derivados del crudo se utilizan como aceites lubricantes, asfaltos para carreteras o pistas deportivas, o como aditivos para combustibles. Además algunos subproductos pueden ser utilizados en ceras, plásticos, detergentes, fibras sintéticas o medicinas. También durante el refinado del crudo pueden obtenerse grandes cantidades de azufre e hidrógeno.

2.4.2.4. Importancia Económica

El petróleo es la fuente de energía principal de la sociedad actual. Pero es un recurso no renovable, de que se dependerá hasta la entrada en vigor de nuevas fuentes energéticas, baratas, ecológicas y renovables. Su importancia no ha dejado de crecer desde que se descubrieran sus primeras aplicaciones a mediados del siglo XIX, incluso ha sido responsable de conflictos bélicos en algunas zonas del mundo.

El petróleo es el sustento económico de los países que son grandes productores, y las fluctuaciones en el precio del crudo, influyen en gran medida en la economía mundial.

2.4.2.5. Transporte

Geográficamente, podemos decir que el 61% de petróleo mundial se encuentra en Oriente medio, que sin embargo consume tan solo el 7.2% del crudo mundial. Sin embargo, América del Norte, que tal solo produce el 5.6% del total, consume el 28.7%, mientras que Asia y las islas del Pacífico son el menor

productos, con un 3.3%, y el máximo consumidor, ya que utiliza el 30% (BP2008).

Según estos datos, los pozos petrolíferos se encuentran muy alejados de los puntos de consumo, por lo que el transporte es un aspecto fundamental para la industria del petróleo, ya sea terrestre, a través de oleoductos o marítimo usando grandes petroleros. De hecho, el transporte marítimo de petróleo realizado durante 2002, corresponde el 40% del total de todos los productos transportados por esta vía (Fernández-Álvarez et al., 2006).

Un accidente en cualquiera de estos dos métodos de transporte masivo de crudo puede generar un desastre ecológico de grandes dimensiones.

2.4.2.6. Composición del crudo de petróleo

a. Composición General

El crudo de petróleo es la mezcla más compleja de compuestos orgánicos que se produce de forma natural en la tierra. Estudios recientes con espectrometría de masas de ultra-alta-resolución han permitido identificar más de 1700 componentes químicos distintos (Head et al., 2006).

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener un sin número de compuestos básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). En su composición predominan los hidrocarburos (50-98%), que a su vez constituyen uno de los principales grupos de contaminantes ambientales, tanto por su abundancia como por su persistencia en distintos compartimientos (Izquierdo, 2013).

Tabla N° 6: Composición elemental típica de un crudo de petróleo

Porcentaje	Composición elemental de un crudo de petróleo
84 -87%	C
11 – 14%	H
0 – 8%	S
0 – 4%	O, N, metales como el níquel y el vanadio

Fuente (Howe-Grant, 1996).

Los hidrocarburos hacen parte de la familia predominante de compuestos¹⁰, por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por sus persistencia en distintos compartimientos ambientales (Casellas et al., 1995).

En su mayoría son alcanos de cadena lineal (n – alcanos o n – parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), ciclo alcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández et al., 1992). La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburos: 84 a 87% de carbono (C), 11 a 14% de hidrógeno (H), de 0 a 8% de azufre (S), y de 0 a 4% de oxígeno (O) y nitrógeno (N) y metales como el níquel y el vanadio (Clark y Brown 1977; Howe-Grant, 1996). Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones:

- **Fracción saturada:** n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas, las ciclo parafinas o ciclo alcanos y los hopanos (García, 2012).
- **Fracción aromática:** hidrocarburos mono aromáticos, diaromático y aromáticos policíclicos (HAP) (García 2012).
- **Fracción de resinas:** agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas (García, 2012).

¹⁰ Un 50 a 98% de la composición

- **Fracción de asfaltenos:** agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados. Son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Speight, 1991).

b. Composición por familiar de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias:

Parafinas volátiles: representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son n-alcános e isoprenoides (alcános ramificados) de un tamaño C1 a C10. Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C1 a C5. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C10 (2,6 dimetil octano) (Howe-Grant, 1996).

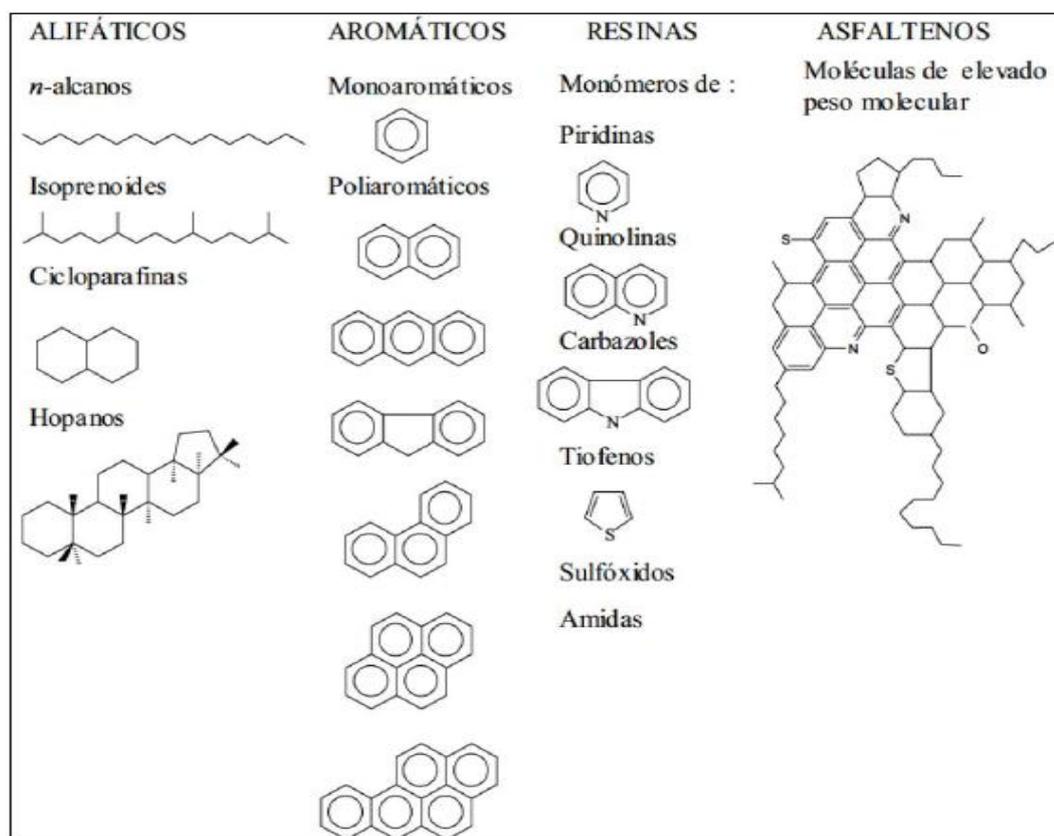
Parafinas no volátiles: se definen como aquellos n – alcános e isoprenoides entre C11 a C40. Los n – alcános oscilan entre C11 a C40, aunque se han descrito cadenas largas y pueden constituir entre el 15 y 20% de crudos no degradados; mientras que los isoprenoides varían de C12 a C22 y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. Los componentes entre C11 y C15 son de volatilidad intermedia (García, 2012).

- **Naftenos:** esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcános. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden entre el 50 y 55% de esta fracción, los tricíclicos

al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos. (García, 2012)

- **Oleofinas:** son aquellos, los cuales están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones trazas. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de cracking, existiendo un 30% en gasolinas y un 1% en fueles (García, 2012)
- **Aromáticos:** el crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así se encuentran hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAP's, con más de dos anillos bencénicos) (García, 2012).

Figura N° 7: Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo



Fuente: Howe – Grant 1996

- ✓ Hidrocarburos mono aromáticos: se encuentran el benceno y sus alquilados (mono alquilados como el tolueno y di alquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etil benceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad (García, 2012).
- ✓ Hidrocarburos poli aromáticos: entre los hidrocarburos di aromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetra metil naftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (García, 2012).

Entre los hidrocarburos poli aromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos.

Entre los hidrocarburos poli aromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a) pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos). Resinas y asfaltenos. Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor de recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados (Howe – Grant, 1996).

c. Composición del crudo según el origen

La composición de un crudo varía según su localización (Muller, 1987). Habitualmente, todos los crudos de petróleo (no degradados) contienen alcanos de cadena lineal y ramificada, de C1 a C40 aproximadamente, ciclo alcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las fracciones de punto de ebullición menor, están formadas por alcanos en todos los casos, mientras que la composición de las fracciones superiores varía según la fuente del petróleo. Se denomina crudo parafínico o ligero cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (n – alcanos y alcanos ramificados), y asfáltico o pesado si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C30 a C45) y HAP's (Howe – Grant, 1996). Según el origen se tienen crudos parafínico o asfálticos (ver Tabla N° 7):

Tabla N° 7: Tipo de crudo según el pozo de origen.

Pozo de Origen	Tipo de Crudo
Pennsylvania	Parafínico
Irán	Parafínico
Irak	Parafínico
Rumania	Parafínico
Méjico	Parafínico
Baku	Asfáltico
Venezuela	Asfáltico
Texas	Intermedio
Oklahoma	Intermedio

Fuente: Howe – Grant, 1996.

2.4.2.7. Clasificación del crudo según gravedad API

La gravedad API es una unidad implementada por el “American Petroleum Institute” en 1921. Básicamente creada para clasificar líquidos menos densos que el agua en una escala relacionada con la gravedad específica de dicho

fluido (García, 2012). Las propiedades tienen una gran importancia ya que influyen en el comportamiento de los hidrocarburos sobre la superficie del mar y en su velocidad de disipación mediante procesos naturales:

- Densidad relativa (gravedad específica): la densidad condiciona la flotabilidad de los hidrocarburos en el agua e influye en los procesos de su propagación y dispersión natural. La densidad de los hidrocarburos puede expresarse de dos formas; en unidades de masa por unidad de volumen (kg/m^3) (la densidad relativa es la medida de la densidad del hidrocarburos con relación al agua dulce, cuya densidad es 1 kg/m^3) o bien en función de la densidad API de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$API = \frac{141.5}{\text{Gravedad Específica del Fluido}} - 131,5 \quad (\text{Ecuación N}^\circ 3)$$

Como se ve en la ecuación, los petróleos con menores gravedades específicas (más livianos), tendrán mayores valores API. En líneas generales los petróleos con gravedades API entre 40 y 45 tienen más altos precios en el mercado. El petróleo se clasifica como liviano, mediano o pesado de acuerdo a su gravedad API:

- Petróleo liviano: es el que tiene una gravedad API mayor que 31.1° API.
- Petróleo mediano: está definido por una gravedad API entre 22.3° API y 31.1° API.
- Crudos pesados: se caracterizan por tener gravedades API por debajo de 22.3° API.
- Crudos extra pesados o bitumen: se caracterizan por tener gravedades API menores de 10 API.

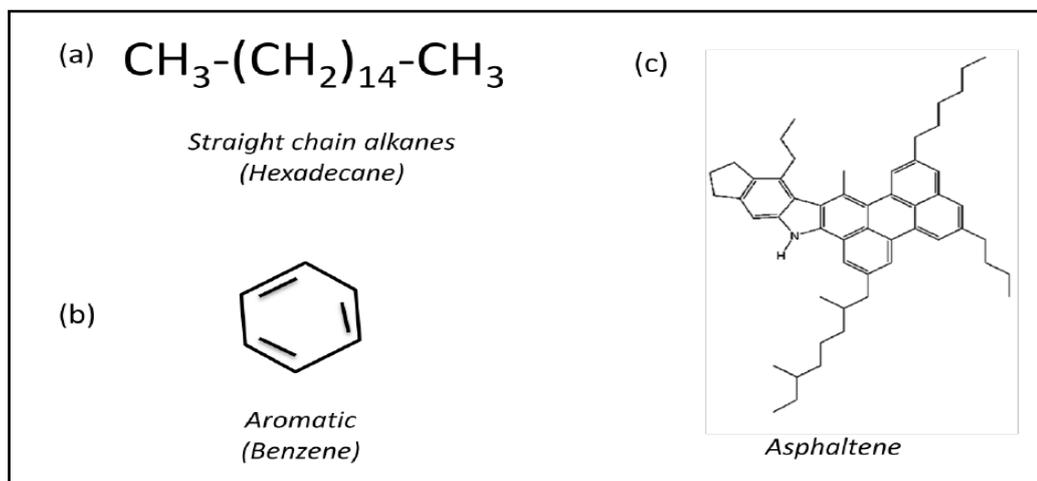
Estas clasificaciones pueden variar por regiones, especialmente en el caso de crudos pesados y extra pesados (bitumen). El bitumen se hunde en el agua mientras que el petróleo flota. Por regla general, los hidrocarburos que tienen

una baja densidad (alta densidad API) suelen tener viscosidades bajas y contienen una gran proporción de componentes volátiles (OMI, 2005).

2.4.2.8. Componentes del Petróleo

Los hidrocarburos de petróleo son de variadas estructuras, que pueden ir desde los alcanos alifáticos saturados simples a compuestos aromáticos policíclicos complejos (ver Figura N° 8) (Lindley, 1992). Los compuestos del petróleo que pueden ser separados mediante cromatografía de adsorción se dividen en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Harayama et al., 1999).

Figura N° 8: Ejemplos de estructuras de (a) un hidrocarburo alifático, (b) un carbono aromático y (c) una molécula de asfaltenos



Fuente: Reproducido desde Mullins et al., 2007

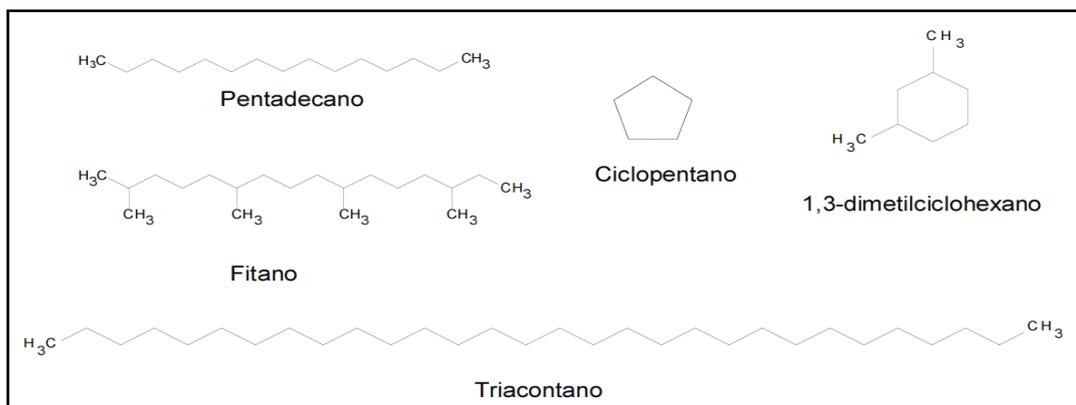
a. Hidrocarburos Saturados

Los hidrocarburos saturados son aquellos que no poseen dobles enlaces (ver Figura N° 9) y se componen de hidrocarburos alifáticos y son clasificados de acuerdo a su estructura química en grupos incluyendo alcanos (parafinas) y cicloalcanos (naftenos) (Sheppard, 2013). Los alcanos se pueden dividir a su vez en ramificados o no ramificados en función de su estructura química lineal. Están definidos por la fórmula general $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ (Harayama et al., 1999). Los

alcanos son los principales constituyentes de los hidrocarburos del petróleo (Margesin and Schinner, 2001).

Los componentes saturados de petróleo crudo, particularmente los n-alcanos de longitudes intermedias (C_{10} - C_{20}) se biodegradan más fácilmente en el suelo, en lodos, sedimentos y ambientes marinos (Lindley, 1992; Salanitro et al., 1997b; Yuste et al., 2000). Aquellos de longitudes de cadena más largas (C_{20} - C_{40}) son sólidos hidrófobos y son por lo tanto son difíciles de degradar debido a su baja solubilidad acuosa, biodisponibilidad y estructura (Yuste et al., 2000). Por lo tanto, estos compuestos de alto peso molecular son productos finales que a menudo denominados compuestos recalcitrantes no responden bien a los tratamientos de rehabilitación (Trindade et al., 2005)

Figura N° 9: Ejemplos de hidrocarburos saturados que forman parte de la mezcla de hidrocarburos del petróleo (hidrocarburos lineales y ramificados)



Fuente: Shepard, 2013

b. Hidrocarburos Aromáticos

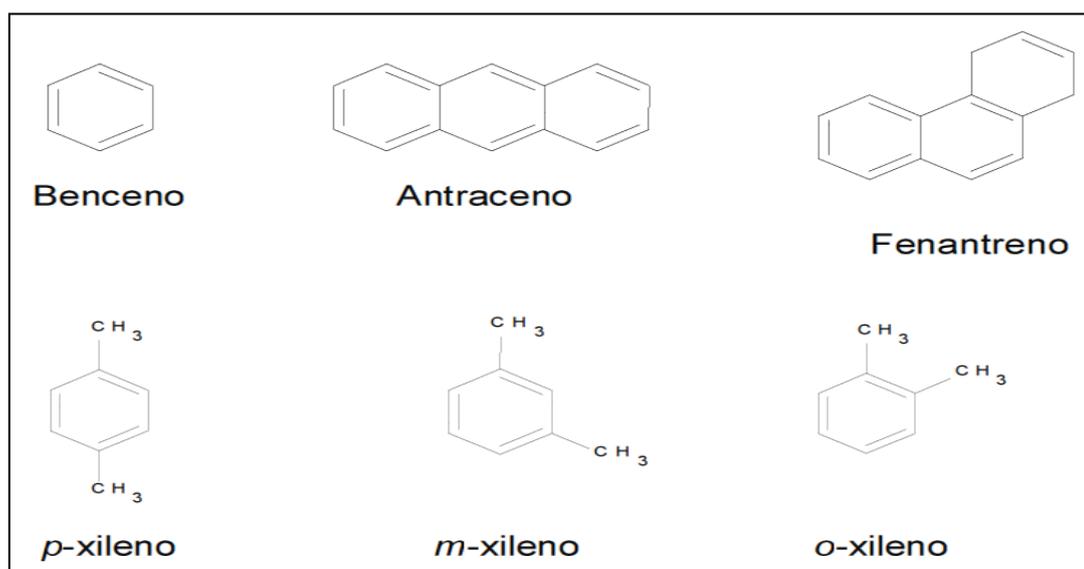
Los hidrocarburos aromáticos son aquellos que poseen uno o más anillos aromáticos, y pueden estar sustituidos, o no, por radicales alquilo (ver Figura N° 10) (Largo Pereda, 2008). Los Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) son de gran preocupación debido a su persistencia, mutagenicidad y toxicidad (Dyksterhouse et al., 1995). Como resultado de su pobre solubilidad en agua y de su naturaleza hidrófoba, se adhieren fuertemente a partículas materiales y en los ambientes marinos se depositan en el fondo marino y se acumulan

dentro del sedimento marino (Sheppard, 2013). El petróleo incluye compuestos que poseen de uno a cinco anillos aromáticos. Estos compuestos son más estables que los ciclo alcanos, debido a la compartición de sus electrones deslocalizados por los enlaces π (Eweis et al., 1999).

El benceno es el más simple, y junto al tolueno el Etilbenceno y los tres xilenos son conocidos como BTEX, un conjunto de compuestos relativamente solubles en agua, y por lo tanto son de los más móviles de la gasolina. Además poseen un potencial contaminante elevado, especialmente el benceno que es cancerígeno (Eweis et al., 1999), y por ello se suelen usar como indicadores de contaminación.

Los hidrocarburos con varios anillos aromáticos o poliaromáticos (PAH), como el antraceno y fenantreno, son productos de diversas operaciones industriales a altas temperaturas como el refinado del petróleo. Son en general poco solubles en agua y poco volátiles, y los incrementos en la masa molecular y el número de anillos, decrece aún más la volatilidad y solubilidad.

Figura N° 10: Ejemplos de hidrocarburos presentes en la fracción aromática del petróleo



Fuente: Eweis et al., 1999

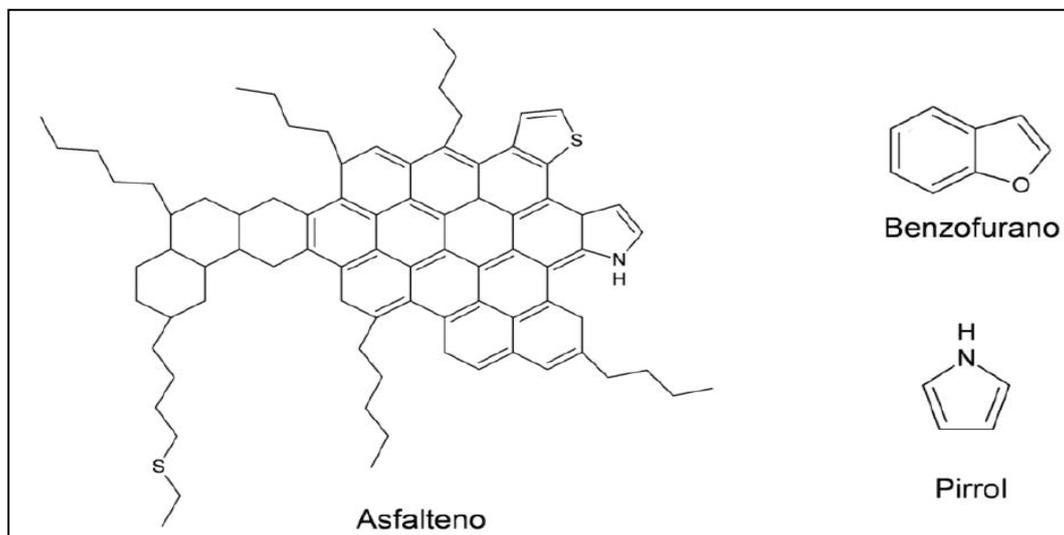
c. Resinas y Asfaltenos

Los asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos, y amidas) constituyen aproximadamente el 10 % de la composición de crudo de petróleo y su presencia puede ser un problema en la producción y refinación de crudo de petróleo (Gaspar et al., 2012; Leyva et al., 2013). La fracción del crudo conocida como resinas y asfaltenos, a diferencia de las anteriores, contiene compuestos polares no hidrocarbonados (Harayama et al., 1999). Son compuestos en general de alto peso molecular que además de carbono e hidrógeno, contienen trazas de oxígeno, nitrógeno y azufre (ver Figura N° 11). Su estructura puede incluir ramificaciones policíclicas aromáticas, incluso en ocasiones forman complejos con metales pesados como níquel y vanadio. Son compuestos recalcitrantes, debido a su insolubilidad y poseen grupos funcionales que les protegen de ataques microbianos, como las estructuras de anillos aromáticos (Eweis et al., 1999).

Para diferenciar entre resinas y asfaltenos se utiliza el parámetro de solubilidad en disolventes similares a n-heptano. Los asfaltenos son insolubles, mientras que las resinas, son compuestos que se disuelven en este tipo de disolventes (Harayama et al., 1999).

Los estudios han demostrado que las resinas y asfaltenos pueden ser alterados por la biodegradación microbiana, a pesar de que se consideran como recalcitrantes al ataque microbiano (Liao et al., 2009). Estos cambios químicos e isotópicos han sido asociados con la biodegradación anaeróbica, lo cual es lógico ya que el proceso primario se da en reservorios profundos.

Figura N° 11: Ejemplos de Asfaltenos (izquierda) y resinas (derecha)



Fuente: Eweis et al., 1999.

2.4.2.9. Propiedades de los hidrocarburos, fuente OMI 2005:

- **Punto de ebullición y gama de ebullición:** la velocidad a la que se evaporan los hidrocarburos depende de su punto de ebullición inicial y su gama de ebullición. Cuando menores sean estos valores, la evaporación se producirán con más rapidez.
- **Viscosidad:** la viscosidad de los hidrocarburos es un indicio de su resistencia a fluir. Los hidrocarburos que poseen una viscosidad baja resultan sumamente móviles. Los distintos grados de viscosidad disminuyen conforme aumenta la temperatura; de este modo, la temperatura que tenga el agua del mar y la absorción del calor del solo afectarán a la viscosidad aparente de los hidrocarburos derramados.
- **Punto de fluencia:** el punto de fluencia de los hidrocarburos es la temperatura por debajo de la cual los hidrocarburos no fluyen. Este efecto es el resultado de la formación de una estructura interna microcristalina. Si la temperatura ambiente se encuentra por debajo del punto de fluencia, los hidrocarburos se comportarán como sólidos.
- **Punto de inflamación:** el punto de inflamación es la temperatura mínima a la que existe suficiente vapor sobre los hidrocarburos derramados como

para formar una mezcla inflamable. Muchos hidrocarburos que acaban de ser derramados se pueden prender con facilidad hasta que los componentes más volátiles se hayan evaporado y dispersado en la atmósfera.

- **Dispersión natural:** La velocidad de la dispersión natural, junto con la evaporación, determina en gran parte la persistencia de los hidrocarburos sobre la superficie del mar. La dispersión natural reduce el volumen de los hidrocarburos existentes en la superficie del mar así como la pérdida por evaporación pero no produce cambios en las propiedades físico-químicas del material derramado, como si lo hace la evaporación. La mayor parte de las pequeñas manchas de hidrocarburos más ligeros desaparecerán del mar en pocas horas por este proceso de dispersión natural, siempre que haya una acción suficiente de las olas.
- **Evaporación:** el proceso más importante que elimina los hidrocarburos de la superficie del agua es la evaporación. La velocidad y la magnitud de la evaporación dependen principalmente de la proporción de fracciones con un bajo punto de ebullición que se encuentren en los hidrocarburos. Las velocidades de evaporación dependen también de la propagación inicial de los hidrocarburos ya que cuanto mayor sea la superficie, con más rapidez se evaporarán los componentes ligeros.

2.4.2.10. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, conocidos como HAP o PAH, por sus siglas en inglés, constituyen una familia ampliamente distribuida en el medio ambiente (Cabal, 2009). Son compuestos orgánicos formados al menos por dos anillos fusionados de benceno, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromáticos (Cabal, 2009). Se consideran compuestos orgánicos persistentes, porque pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas (Cabal, 2009). Las propiedades semivolátiles¹¹ de los HAP les otorgan gran movilidad, facilitando

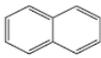
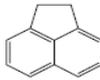
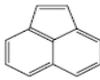
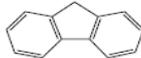
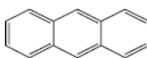
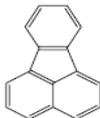
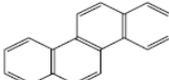
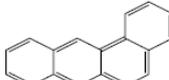
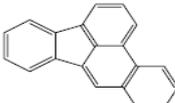
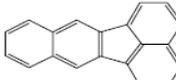
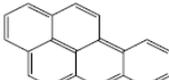
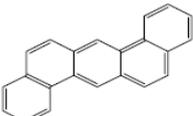
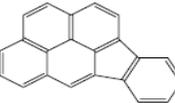
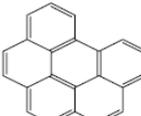
¹¹ Semivolátiles: pueden presentarse en fase vapor o ser adsorbidos por las partículas atmosféricas

así su transporte a grandes distancias antes de depositarse (Cabal, 2009). La combinación de dichas características resulta extremadamente peligrosa. Por ejemplo, su persistencia y movilidad hace que se les encuentra prácticamente en cualquier lugar del planeta, incluso donde no han sido utilizados (Cabal, 2009).

Los HAP son compuestos no polares o muy débilmente polares, que tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas, presentando una baja solubilidad en agua (Cabal, 2009). A pesar de ser muy liposolubles tienden a bioconcentrarse; a medida que los organismos que se encuentran en la base de la cadena alimentaria consumen HAP, estas sustancias se absorben y se almacenan en el tejido graso (Cabal, 2009). Como no se excretan con rapidez, el consumo continuo produce con el tiempo su bioacumulación (Cabal, 2009).

A pesar de estar presentes en el medio ambiente en pequeñas concentraciones, los HAP presentan efectos muy nocivos para la salud, ya que se les considera agentes potencialmente carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos (Cabal, 2009). La Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (US-EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea (UE), han declarado 16 de estos hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyen: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indenol(1,2,3-c,d)pireno, benzo(g,h,i)perileno y dibenzo(a,h)antraceno (ver Figura N° 12) (Cabal, 2009).

Figura N° 12: Lista de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos por la EPA, OMS y UE como contaminantes primarios

NAFTALENO	ACENAFTENO	ACENAFTILENO	FLUORENO
			
FENANTRENO	ANTRACENO	FLUORANTENO	PIRENO
			
CRISENO	BENZO(A)-ANTRACENO	BENZO(B)-FLUORANTENO	BENZO(K)-FLUORANTENO
			
BENZO(A)-PIRENO	DIBENZO(A,H)-ANTRACENO	INDENO(1,2,3-C,D)-PIRENO	BENZO(G,H,I)-PERILENO
			

Fuente: Cabal, 2009

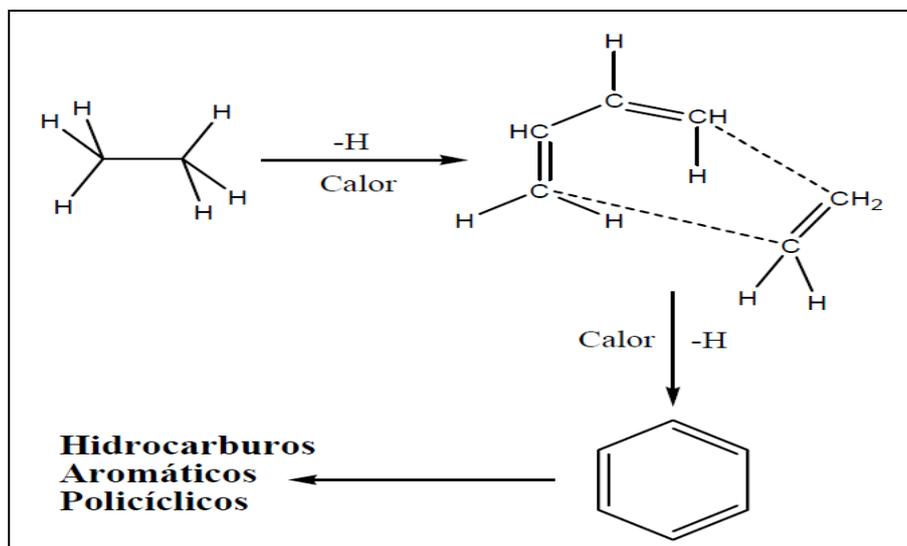
La mayoría de los HAP que se encuentran en el agua son de origen pirogénico (Blumer, 1976; Sues, 1976; Hites, 1977; NRC, 1985; WU, 2001). En general, los HAP de origen petrogénico aparecen asociados a focos locales o puntuales, como refinerías o industrias petrolíferas, mientras que los de origen pirogénico se localizan en una escala geográfica más amplia.

La fuente más importante de HAP es la combustión incompleta de cualquier material orgánico que contenga carbono e hidrógeno (Neff, 1979). Los HAP pueden sintetizarse a partir de los hidrocarburos saturados bajo condiciones deficientes de oxígeno (Cabal, 2009). Esto sucede a temperaturas que excedan aproximadamente los 500 °C, a las cuales se rompen los enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono, para formar moléculas más pequeñas y radicales libres (Cabal, 2009).

La tendencia de los hidrocarburos a formar HAP por pirosíntesis varía en el orden: aromáticos > cicloolefinas > olefinas > parafinas (Cabal, 2009). Los

compuestos insaturados son especialmente susceptibles a las reacciones de adición involucradas en la formación de HAP (Cabal, 2009).

Figura N° 13: Pirosíntesis de HAP a partir de etano



Fuente: Cabal, 2009

El comportamiento ambiental de los HAP's está determinado por varios aspectos, como su peso molecular, su configuración estructural, el grado de solubilidad, número de anillos aromáticos, volatilidad y su coeficiente octanol/agua ($\log K_{ow}$) (Harmsen, 2004). Los HAP's de bajo peso molecular (2 y 3 anillos) son más fácilmente degradables debido a su naturaleza semivolátil y mayor solubilidad (Wild et al. 1995). Por su parte los HAP's de elevado peso molecular (4 o más anillos) presentan una baja solubilidad en agua y se encuentran en suelo asociados principalmente a la materia orgánica, lo que limita notablemente su biodegradación (Howsam et al., 1998).

2.4.2.11. Efecto de los Hidrocarburos

a. Efectos ecológicos

Las investigaciones realizadas durante los años 70 y 80 trajeron como resultado un considerable aumento de la concienciación y el conocimiento de

los efectos que tienen los hidrocarburos (OMI, 2005). A éstas se le siguieron sumando investigaciones en curso y, más recientemente, en los años 90, han sido corroboradas por exhaustivos estudios realizados tras haberse producido casos importantes de contaminación por hidrocarburos (OMI 2005). Los efectos de una situación concreta en la que se haya producido un derrame dependerán de muchos factores, entre éstos se incluyen el volumen de hidrocarburos derramados, características físico-químicas y toxicológicas (partículas que determinan la capacidad que tengan los hidrocarburos para persistir en el entorno) y su condición (como mancha que posee flotabilidad o como mancha dispersa en columna de agua); las condiciones locales en el momento del derrames (por ejemplo, temperatura o viento); la época del año; la presencia de estructuras o recursos en la trayectoria del derrames; y el emplazamiento del derrames en relación con la naturaleza y la mezcla de sedimentos, la topografía del fondo marino y la geomorfología de la costa (OMI, 2005).

El valor final que se le adjudique a los diferentes efectos dependerá de las circunstancias que rodeen a un derrame concreto (OMI, 2005). Desde un principio se debe distinguir entre los efectos de los hidrocarburos derramados propiamente dichos y los efectos de las medidas de limpieza (OMI, 2005). Los tipos principales de medidas correctoras (control y recuperación) implican medios manuales, mecánicos y químicos, en algunos casos, las medidas correctoras pueden tener por sí mismas consecuencias negativas (OMI, 2005).

b. Efecto de uso de Dispersantes

Debido a la creciente preocupación pública sobre los efectos de los derrames de petróleo (tanto efectos agudos y crónicos) en el ecosistema acuático y terrestre, en los últimos 50 años se han desarrollado varias técnicas de lucha contra derrames de hidrocarburos (Karam, 2011).

Dispersantes químicos han ganado una amplia aprobación como una técnica potencialmente eficaz y beneficiosa como estrategia de respuesta frente a derrames de petróleo. La Organización Regional para la protección del medio marino (ROPME siglas en inglés) ha preparado un programa de respuesta para

derrame de petróleo en caso de una liberación accidental de petróleo en el Golfo Pérsico para minimizar la amenaza frente a las plantas, animales acuáticos y a los recursos marinos (CNEXO, 1981; Kocan et al., 1996; Marty et al., 1997).

Los dispersantes son formulas químicas que consisten en componentes individuales, llamados tensioactivos (Karam, 2011). Los tensioactivos son unos compuestos químicos específicos que poseen dos grupos distintivos llamados oleofílicos e hidrofílicos (Karam, 2011).

La función principal de estos productos químicos es reducir la tensión entre el crudo y el agua o el suelo, y ayuda en la formación de gotitas diminutas o micelas de tensioactivos (aceite mezclado) que se mueven y se dispersan en la columna de agua, este movimiento facilita aún más la biodegradación y dispersión (Karam, 2011). Por último, el tamaño de las gotitas de crudo se reducirá; y se dispersaran lo que conducirá a su vez a un aumento de la superficie que mejorara la biodegradación del petróleo (ROPME, 1998).

2.4.2.12. Formas de contaminación por la operación petrolera

a. Operación Sísmica

La sísmica es una técnica que tiene como propósito realizar estudios de la estructura de la Tierra, y en este caso puntual; donde se lanzan burbujas de aire que producen un sonido y que penetra en las capas de la Tierra. Cada capa, dependiendo de su composición y estructura, hace que este sonido rebote de forma diferente. Las ondas que rebotan son registradas y procesadas por un computador que al final produce una imagen de la estructura de la roca madre.

La Prospección sísmica consiste en emitir ondas de sonido, con la finalidad de ubicar posibles depósitos de hidrocarburos. Las ondas que rebotan son captadas por la embarcación que cuenta con sensores y equipos de cómputo donde luego se procesan para obtener finalmente un mapa de las capas.

La prospección sísmica 3D (tres dimensiones) se realiza bajo el mismo enfoque conceptual, con la diferencia que se realiza en una zona específica y registra en mayor detalle la estructura del subsuelo del área prospectada. Esta prospección se realiza sobre áreas donde previamente se han identificado prospectos y estructuras con potencial de contener reservas de hidrocarburos.

b. Fase de Perforación

La secuencia típica de operación de perforación de pozos, es sobre perforar uno de los pozos hasta la profundidad programada

- Bajar el casing conductor con zapato guía. Cementar, bombeando la lechada de cemento por el interior del forro hasta el anular externo entre el forro y la formación.
- Instalar el casing de superficie colocando zapato guía y collar retenedor de cemento
- Bombear la lechada de cemento por el interior del forro hasta el anular externo entre el forro y la formación
- Perforar un pozo de diámetro más pequeño desde el zapato guía del casing anterior hasta la profundidad programada
- Perfilar el pozo, bajar un casing de diámetros programado colocando un zapato guía y retenedor de cemento.
- Bombear lechada de cemento por el interior del casing hasta el anular externo entre el forro y la formación.

A partir del casing intermedio, se utiliza un Liner (Laina) de Producción que es un casing de revestimiento del pozo que no llega hasta la superficie. Generalmente cubre sólo la parte profunda y productiva del pozo. Los diseños de los distintos casing a ser instalados en el pozo, diámetros, tipos de conexión, grado de acero, peso, espesor de pared y los tramos respectivos están basados en el análisis previo de los esfuerzos que soportará el casing y de estudios anteriores de las formaciones atravesadas y a proteger, presiones estáticas porales y litostáticas de las formaciones, y la estabilidad del pozo en

las condiciones operativas a las cuales estará sometido en la etapa de producción.

Una vez cementada la tubería de Revestimiento, ésta debe ser probada con presión igual a la presión interna a la cual, según los cálculos estará expuesta. La presión no debe exceder el 85% de la máxima presión interna de la tubería de revestimiento y debe ser mantenida por lo menos por 10 minutos.

Para la perforación de los pozos, se emplea lodo de perforación, el cual debe controlar la presión poral del pozo, mantener estabilizado las paredes, refrigerar el trepano, transportar hacia la superficie los recortes de formación, no interactuar con las formaciones permeables disminuyendo la permeabilidad, proveer lubricidad a la tubería de perforación para disminuir el arrastre y rozamiento, y permitir la obtención de datos petrofísicos por medio de perfiles geofísicos. Este fluido de perforación (lodo) consiste en una solución a base de agua dulce con un polímero biodegradable (lodo ecológico), este fluido ingreso al tubo a una presión máxima de 3000 lb/pulg² y retorna a la superficie por el exterior de la tubería, siendo tratado en el tanque de control de sólidos retirando las partículas de la perforación con la ayuda de una zaranda, luego pasa al tanque de control de lodos donde es reacondicionado químicamente para ser reintroducido de nuevo a la perforación. El fluido de perforación requiere el uso de insumos para la formulación de los lodos.

c. Fase de Extracción

Comienza cuando alguno de los pozos exploratorios toca un yacimiento. En tierra o en mar las operaciones a realizarse en esta etapa alteran el ambiente natural y lo contaminan. Esta etapa presenta riesgos adicionales de accidentes, relacionados con gases tóxicos, aguas acidas y los depósitos de crudo (García, 2012).

d. Transporte

Se da después de la extracción del crudo (Garcia, 2012). El transporte del crudo es una de las etapas más riesgosas y costosas en términos de destrucción ambiental (Garcia, 2012). Desde que se transporta el crudo masivamente, son millones de barriles que se han derramado en zonas selváticas, ríos, lagos y mares (Garcia, 2012). Las consecuencias de tales derrames continúan afectando estos ecosistemas muchos años después (Garcia, 2012). Dentro de las etapas de exploración y explotación también se da una compactación de los suelos por la maquinaria pesada donde por la pérdida de vegetación, se produce una erosión y contaminación de los suelos de la zona (Garcia, 2012). Los microorganismos del suelo son alterados por la contaminación con hidrocarburos, desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes sin dejar atrás las altas tasas de mutaciones (Garcia, 2012). Las alteraciones al suelo producen cambios en el pH de este y del agua, que pueden causar un deterioro crónico de los ecosistemas (Garcia, 2012). Por lo tanto un manejo inadecuado de dicha fuente energética puede causar problemas de gran envergadura Socioambiental (Garcia, 2012).

2.4.3. Biorremediación

La biorremediación es el proceso en el que se utilizan organismos biológicos para remover sustancias peligrosas del ambiente (Booyjzsen, 2007). Una vez que el contaminante ha sido consumido por los microorganismos, esto debe desaparecer, por lo tanto presentan poco o ningún riesgo de contaminación en el medio ambiente (EPA, 1996; Blumenroth, 1998; Leung, 2004). El proceso se puede acelerar mediante la adición de aditivos, tales como el oxígeno o nutrientes, proporcionando así las condiciones para el crecimiento bacteriano y así aumentar la velocidad de biodegradación y la recuperación del sitio (Booyjzsen, 2007).

En general el término biorremediación o biorrecuperación se aplica a cualquier sistema o proceso en el que se emplean métodos biológicos para transformar o fijar contaminantes (Eweis et al., 1999). La biorremediación de contaminantes orgánicos incluyen los procesos que llevan su transformación en productos menos tóxicos o sin toxicidad, la evolución de los microorganismos ha permitido su uso y degradación pero existe la limitación de que generalmente son procesos lentos (Singh et al., 2008).

La biorremediación puede ser in o ex situ y mientras que algunos compuestos, como hidrocarburos, son susceptibles a la biorremediación, otros por ejemplo, como ciertos pesticidas, son más difíciles de biodegradar. Los métodos in situ tienen algunas ventajas: hay menos probabilidad que el contaminante sea movilizado, por lo general son menos costosos, crean menos polvo y es posible el tratamiento de grandes volúmenes (Booyjzsen, 2007).

Los microorganismos son capaces de degradar hidrocarburos que son comunes y que están distribuidos en la naturaleza (Atlas, 1981; Rosenberg, 1991; Van Hamme et al., 2003) y lo hacen principalmente con la finalidad de producir energía y biomasa pero también para reducir la toxicidad y realizar otras funciones (Booyjzen, 2007).

Se requiere de un consorcio bacteriano para realizar la biodegradación completa de una mezcla de hidrocarburos (Scott et al., 2000; Van Hamme et al., 2001). Los Consorcios bacterianos pueden proveer una gama de capacidades metabólicas que cubren el espectro completo de las reacciones necesarias para completar la mezcla de hidrocarburos y luego utilizar todos los productos de la degradación (Booyjzsen, 2007), esto es porque cada microorganismos tiene una capacidad metabólica específica, y sus deficiencias respectivamente (Booyjzsen, 2007). La degradación del petróleo requiere de un consorcio complejo, especialmente si se requiere completar la mineralización de CO₂ a H₂O (Ghazali et al., 2004).

Asimismo, la bacteria se beneficia de vivir en asociación debido a la relación comensalita y sinérgica, además la biodegradación es más rápida y completa cuando es un consorcio bacteriano (Gazhali et al., 2004). Esto se puede realizar cuando se agregan microorganismos a un sitio contaminado para facilitar la limpieza de la contaminación, conocida como bioaumentación (Booyjzsen, 2007).

En general, cuando se refiere a petróleo, la biorremediación es un proceso para acelerar la degradación normal de los contaminantes del crudo, es decir una solución natural para que los contaminantes causen el menor daño ecológico posible (Atlas, 1995). Dado el alto número de compuestos que forma el petróleo y su alta complejidad estructural, la biodegradación del petróleo produce un incremento en la resistencia a una posterior biodegradación de la mezcla residual. El petróleo crudo no llega nunca a degradarse completamente, y siempre deja algunos residuos complejos. Sin embargo, estos residuos que contienen principalmente asfaltenos, tienen una toxicidad muy baja y terminan convirtiéndose en residuos inertes sin efecto ecológico (Atlas, 1995).

a. Fundamento bioquímico de la Biorremediación

La biorremediación tiene como fundamento bioquímico las reacciones de óxido-reducción, que tiene como finalidad obtener energía, producida en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones. La cadena inicia con un sustrato orgánico (compuestos de hidrocarburos) que actúa como un dador de electrones, de modo así que la actividad metabólica degrada y consume dicha sustancia.

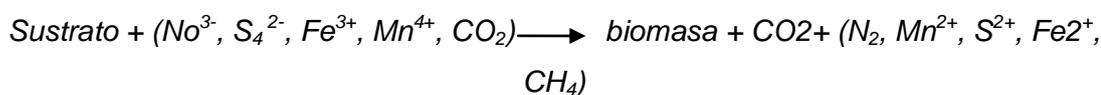
Los microorganismos utilizan mayormente aceptores como el oxígeno, nitratos, hierro (III), sulfatos y dióxido de carbono. Cuando se utiliza el oxígeno como un aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobia; sin embargo, si utiliza sulfatos o dióxido de carbono que se producen en condiciones

receptoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio como se muestra en las siguientes reacciones:

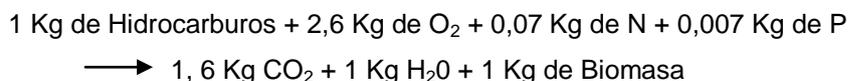
Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



La biodegradación de los hidrocarburos puede producirse en presencia de oxígeno (condiciones aeróbicas) o en ausencia de oxígeno (condiciones anaeróbicas). Sin embargo, en condiciones anaeróbicas el proceso se produce de una forma mucho más lenta y, desde el punto de vista operacional, tiene poco interés para la biorrehabilitación. Las bacterias, mohos, levaduras y algas que son responsables del proceso de biodegradación, también están necesitados de fuentes adicionales de alimento en forma de nitrógeno (N) y fósforo (P), los cuales se encuentran de forma habitual en el medio marino. La fórmula siguiente representa el modelo típico de biodegradación en condiciones aeróbicas, Fuente PECMAR¹², 2005:



En resumen, los productos del proceso de biodegradación son: dióxido de carbono, agua y biomasa de microorganismos. Esta reacción metabólica de origen natural puede emplearse como mecanismo de remediación de una contaminación por derrame de hidrocarburos (PECMAR, 2005).

¹² PECMAR: Plan Específico de Contaminación Marina Accidental de Canarias

b. Biorremediación según la acción humana

La biorremediación de acuerdo a la acción humana puede ser de dos tipos, el primer tipo, es la atenuación natural, que se define como la reducción en toxicidad, masa o movilidad de un contaminante sin intervención humana, y puede deberse a procesos físicos (dilución, adsorción), químicos (precipitación, evaporación) o biológicos (biodegradación). El proceso de biodegradación depende en gran medida de la presencia en el medio natural de donadores y aceptores de electrones y de la concentración de nutrientes.

El segundo tipo es la acción humana en los procesos de biorremediación o biorremediación aumentada, puede llevarse a cabo a través de dos procesos diferentes. El primero es la bioestimulación que es la mejora o el aumento de los nutrientes, donadores o aceptores de electrones o la modificación de algunas de las condiciones ambientales locales para estimular las poblaciones microbianas. La bioaumentación es la introducción de microorganismos en el medio natural que degraden específicamente los compuestos contaminantes, y además puede incluir la estimulación ex situ de biomasa nativa, la introducción de organismos o de cultivos mixtos wild-type no nativos, que degraden o co-metabolicen el contaminante, o la introducción de cepas modificadas genéticamente (Scow and Hicks, 2005).

c. Degradación de los Hidrocarburos del Petróleo

Los componentes de los hidrocarburos no presentan diferente grado de biodegradabilidad. Para el caso de la biorrehabilitación, es la complejidad de los componentes individuales la que determina si éstos pueden degradarse y en qué medida. Se pueden identificar diferentes grupos de compuestos, en orden de biodegradabilidad, que van desde hidrocarburos saturados (alcanos y cicloalcanos) a asfaltenos, resinas y compuestos polares, pasando por hidrocarburos insaturados y aromáticos (incluidos hidrocarburos poliaromáticos).

Tabla N° 8: Esquema de biodegradabilidad de los diversos hidrocarburos

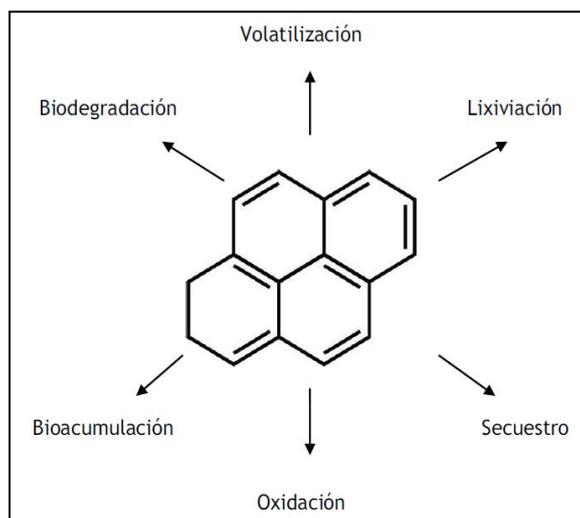
ALTA	Fracción de los alcanos que incluye alcanos normales, alcanos ramificados (isoalcanos) y cicloalcanos (naptenos)
INTERMEDIA	Compuestos aromáticos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Dentro de los cuales están los monoaromáticos volátiles como el benceno, tolueno, xileno, etc. Los naptenoaromáticos y compuestos aromáticos sulfurados como los tiopenos y benzotiopenos. Estos compuestos son los de mayor importancia debido a su toxicidad y tendencia a la bioacumulación
BAJA	Fracción polar que son las resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) y asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, esterres y porfirinas)

Fuente: PECMAR, 2005

d. Destino ambiental de los Hidrocarburos

Cuando los hidrocarburos son introducidos en el medio ambiente, estos pueden estar sujetos a distintos fenómenos físicos, químicos y biológicos, que pueden dar lugar a su transformación, eliminación o transporte a otros compartimientos ambientales (ver Figura N° 14) (Izquierdo, 2013).

Figura N° 14: Procesos que puede sufrir un contaminante en el ambiente



Fuente: Adaptado de Semple et al., 2003.

Los procesos a que se enfrentan estos contaminantes incluyen la evaporación, dilución, precipitación, reacciones abióticas (hidrólisis, fotooxidación, oxidaciones químicas, etc), biodegradación microbiana, bioacumulación y secuestro (Izquierdo, 2013). En la mayoría de los casos estos fenómenos tienen como resultado una redistribución de los contaminantes, siendo la

degradación microbiana, catalizada por bacterias, algas, hongos y levaduras, el proceso más importante que interviene en la eliminación total o parcial de los contaminantes mediante su mineralización o transformación. Las tecnologías de biorremediación explotan este potencial degradador de las poblaciones microbianas naturales, que son utilizada como alternativa, o de forma complementaria a los tratamientos físico-químicos en la descontaminación de suelos acuíferos, sedimentos y playas (Izquierdo, 2013).

2.4.3.1. Tratamientos de biorremediación

Como resultado de la gran afluencia de compuestos de hidrocarburos complejos en el medio ambiente marino cada año, ha surgido la necesidad de desarrollar de nuevas estrategias de remediación (Andersson et al, 2006). El crudo es eliminado en el ambiente cuando es transformado a dióxido de carbono y agua por dos procesos de combustión y biodegradación (Sheppard, 2013). Las técnicas de remediación que se usan para alcanzar estos procesos son métodos naturales, físicos, químicos y biológicos (Sheppard, 2013). Los objetivos principales de la remediación es minimizar el riesgo de los contaminantes para salud humana y el ambiente (se incluyen destrucción mínima del hábitat y/o modificaciones) (Perelo, 2010).

a. Método físico

Las técnicas físicas se utilizan como una respuesta primaria con la finalidad de restringir la propagación del petróleo. Estas técnicas incluyen el uso de equipos tales como barreras de contención, extracción manual a través de skimmers, uso de dispersantes y materiales oleofílicos. La recuperación mecánica es la transferencia de petróleo de la zona donde ocurrió el vertimiento hacia una zona de almacenamiento temporal donde el crudo puede ser transportado con ayuda de absorbentes de crudo o de skimmers (Wei et al., 2003)

Con la finalidad de reducir el impacto de un derrame de petróleo, la respuesta inicial es la contención de la marea negra (Millet et al., 2008). El éxito de la contención del derrame depende mucho de las condiciones ambientales (Nordvik, 1995). A pesar de la baja tasa de recuperación de los skimmers, que es menos del 20% (Prince y Clark, 2004) estos todavía están siendo utilizados como respuesta primaria como se demuestra en el Plan de Respuesta a derrames de petróleo en el mar de Australian National (AMSA, 2010).

b. Método químico

Como resultado de la acción de las olas y la dispersión natural, los derrames de petróleo se convierten en micro gotas que eventualmente se diluyen en concentraciones por debajo de los límites tóxicos (Shaw, 2003; Tkalich y Chan, 2002). Estudios detallados de OMA han revelado que los minerales y las partículas orgánicas pueden estabilizar las gotas de petróleo dentro de la columna de agua (Lee, 2002; Lee et al., 2003; Omotoso et al., 2002). Por lo tanto la aplicación de métodos químicos, tales como dispersantes y emulsificantes se destinan a mejorar la tasa de dispersión aumentando la tasa de biodegradación y protección ambiental

Los dispersantes están compuestos por un complejo de sorbentes y aditivos que pueden acelerar la dispersión del petróleo de la superficie del mar en la columna de agua. El rol del dispersante no es estimular la biodegradación del petróleo sino permitir la dispersión (Sheppard, 2013). Sin embargo, esto a su vez puede ayudar a acelerar la biodegradación, como el proceso hace que las gotas de petróleo sean altamente accesibles a las bacterias que degradan hidrocarburos, promoviendo la eliminación del petróleo en el medio ambiente por procesos naturales (Sheppard, 2013). En general, cuando se aplica a una película de crudo de petróleo, los surfactantes difunden la interfase petróleo/agua que penetra en las capas donde el crudo es más efectivo (Sheppard, 2013)

c. Método biológico

En la naturaleza existe una amplia variedad de microorganismos que se encuentran en el medio de forma natural y que descomponen sustancias, incluidos los hidrocarburos, en formas menos complejas. Este proceso de biodegradación es característico de todos los sistemas ambientales. La introducción de hidrocarburos, por ejemplo durante un vertimiento, concede a estos organismos la oportunidad de proliferar si las condiciones son adecuadas (PECMAR, 2005).

Los métodos biológicos tienen varias ventajas sobre otras tecnologías convencionales, como ser menos costoso, menos intrusivo para el sitio y más amigable con el ambiente el término de productos finales (Zhu et al., 2004). Los métodos biológicos incluyen plantas como material absorbente del petróleo, otro tipo de biorremediación consiste en la adición de enzimas que actúan como catalizadores en la degradación de hidrocarburos (PECMAR, 2005).

La Biorremediación se define como la acción de agregar materiales a ambientes contaminados para acelerar el proceso natural de biodegradación (Zhu et al.2004). Como las condiciones ambientales, como la baja temperatura, bajas concentraciones de microorganismos que degradan el petróleo, y nutrientes inorgánicos no son favorable (Oh et al., 2000), la adición de nutrientes (bioestimulación) y de microorganismos (bioaumentación) han sido introducidos para superar estas dificultades (Sheppard, 2013).

2.4.3.2. Técnicas de Biorremediación

Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar en in situ o ex situ (Hatzinger et al., 2002; Talley & Sleeper, 2006). En los tratamientos ex situ la muestra es transportada hasta la localización donde se implementará la tecnología. Esto implica la eliminación física de la contaminación en otra zona. La técnica in situ implica el tratamiento del material contaminado en su sitio.

La selección de la tecnología de biorremediación más adecuada depende de tres principios básicos; la susceptibilidad del contaminantes a la transformación biológica, la accesibilidad de los contaminantes a los microorganismos (biodisponibilidad) y la capacidad de optimizar la actividad biológica (Izquierdo, 2013)

a. In situ

Las técnicas de tratamiento in situ, es una de las más utilizadas para la recuperación de ecosistemas contaminados, ya que es la técnica que se aplican sin tener la necesidad de trasladar el medio contaminado. Las ventajas de la técnica in situ es que evita el contacto de los trabajadores con el suelo o agua contaminada, evita la liberación de gases dañinos al aire, generan pocos residuos, y resulta ser más económica.

La biorremediación in situ tiene como objetivo estimular el crecimiento de los microorganismos autóctonos (Rittman, 1994) o lo microorganismos importados para degradar los hidrocarburos (Atlas y Bartha, 1992). Los microorganismos autóctonos generalmente son escogidos por muchos factores, como el clima, las corrientes, el viento, las olas, la lluvia y la competencia microbiana y la depredación actúan como limitantes en la eficacia de la adición de bacterias u otros materiales a un derrame de petróleo en la costa del mar (Izquierdo, 2013).

a.1. Bioestimulación

La bioestimulación consiste en incrementar la actividad de los microorganismos nativos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes, humedad, aire u otros agentes destinados a aumentar la velocidad de biodegradación de los contaminantes en un emplazamiento contaminado (Swannell et al., 1996).

Identificar las condiciones limitantes para que los microorganismos nativos puedan llevar a cabo una remediación es un paso crítico. Los parámetros que

limitan la actividad microbiana generalmente son nutrientes inorgánicos y orgánicos (Izquierdo, 2013).

De estos lo más comunes son agua, oxígeno, nitrógeno y fósforo. La introducción de aire, oxígeno o peróxido de hidrógeno a través de galerías de infiltración, arado, burbujeo o volteo ha demostrado ser extremadamente eficaz en la biorremediación de contaminantes derivados del petróleo y una variedad de otros compuestos orgánicos que no son particularmente recalcitrantes (Thomas y Ward, 1992).

Otro parámetro importante que afecta a la biodegradación es la temperatura, que a parte de su influencia directa en el metabolismo, puede tener también un efecto sobre la viscosidad, solubilidad en agua y a la composición química de crudos de petróleo y derivados (Izquierdo, 2013).

Generalmente, los litorales más porosos (de arena, grava, bolos y cantos rodados) poseen cantidades muy limitadas de carbono disponible, por lo que éste constituye un recurso limitante, de manera que la introducción de hidrocarburos durante un derrame facilita la proliferación de microorganismos (PECMAR, 2005).

Con concentraciones bajas (según las investigaciones se ha estimado provisionalmente como menores a 1g de hidrocarburos por kg. De sedimento), la disponibilidad de oxígeno, así como las concentraciones ambientales de nitrógeno y fósforo, suelen ser suficientes para permitir que el proceso de degradación de los hidrocarburos se produzca con rapidez. Sin embargo, con elevadas concentraciones de los hidrocarburos, la actividad biológica reduce rápidamente los niveles de oxígeno y nutrientes, que se convierten en recursos limitantes del crecimiento microbiano, y este es inhibido (PECMAR, 2005).

La combinación de Bioaumentación, bioestimulación y la adición de biotensioactivos, dependiendo de las características del emplazamiento

contaminado, podría ser una estrategia prometedora para acelerar la biorremediación (Baek et al., 2007).

a.2. Adición de nutrientes

Se pueden aplicar nutrientes en la zona litoral con la finalidad de mantener las concentraciones suficientes. Una relación aceptada generalmente entre carbono, nitrógeno y fósforo es C:N:P = 120:10:1 (PECMAR, 2005).

El proceso de biodegradación se produce con la interfaz entre las moléculas de hidrocarburos y el agua. Por tanto, los nutrientes han de encontrarse disponibles en forma soluble entre las partículas individuales de sedimento que conforman el litoral (PECMAR, 2005).

Los gránulos cilíndricos y esféricos de liberación lenta pueden ser una alternativa, ya que liberan nutrientes en contacto con el agua de mar o el agua de lluvia, pero también pueden ser arrastrados antes de que resulten eficaces, cuando se estén aplicando nutrientes en cualquiera de estas formas, se deberá tener especial cuidado para evitar una sobreaplicación y la consiguiente acumulación de nutrientes, ya que esto podría producir fenómenos de eutrofización y afloramientos tóxicos de algas (PECMAR, 2005).

a.3. Atenuación natural

La atenuación natural se basa en el aprovechamiento de los procesos naturales para eliminar o reducir la contaminación en los suelos y las aguas subterráneas, y es considerada un proceso de degradación ventajosa ya que evita la destrucción de hábitat ecológicos mediante la mejora de las capacidades de degradación intrínseca de los microorganismos nativos para degradar contaminantes (Yu et al., 2005). Su característica principal es la utilización de los procesos fisicoquímicos de interacción contaminantes-medio y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio.

La atenuación natural puede darse en presencia (condiciones aerobias) o ausencia de oxígeno (condiciones anaerobias). Cuando el medio ambiente se halla contaminado con sustancias químicas, la naturaleza las elimina por cuatro vías:

- Acción bacteriana: las bacterias que viven en el suelo y en las aguas subterráneas utilizan algunas sustancias químicas como alimento, y cuando las sustancias químicas están completamente digeridas, las transforman en agua y gases inofensivos.
- Sorción: las sustancias químicas se pegan o sorben al suelo, que las fija al lugar. De ese modo no se eliminan las sustancias químicas pero sí se impide que contaminen las aguas subterráneas y que escapen del lugar, al menos mientras las condiciones físico-químicas del suelo permanezcan estables.
- Mezcla y dilución: al pasar las aguas subterráneas a través del suelo, la contaminación se puede mezclar con el agua limpia. De ese modo se diluye la contaminación.
- Evaporación: algunas sustancias químicas como el petróleo y los solventes, se evaporan, lo que significa que se convierten de líquidos a gases dentro del suelo. Además, si esos gases escapan al aire en la superficie del terreno, la luz del sol puede destruirlos.

En general, los procesos de atenuación natural incluyen una variedad de mecanismos físicos, químicos o biológicos tales como la biodegradación, dispersión, dilución, adsorción, volatilización, de manera favorable y sin intervención humana, con el fin de reducir la masa, la toxicidad, movilidad, volumen, o la concentración de contaminantes en el suelo y las aguas subterráneas, llegando incluso a la completa mineralización de un contaminante (Izquierdo, 2013).

Existen dos tipos de atenuación natural, uno de ellos es la atenuación natural monitorizada (MNA), que se refiere a la utilización de la atenuación natural (NA) como una opción de remediación de emplazamientos contaminados y gestiona

los procesos de NA para lograr los objetivos de remediación específicos de un emplazamiento en un plazo razonables y bien fundamentado (Izquierdo, 2013). La MNA debe incluir dos aspectos esenciales: control de las fuerzas y control del rendimiento del proceso a largo plazo. La MNA se debe utilizar como una técnica de remediación cuando cumpla con los criterios pertinentes de selección y objetivos de la remediación. Generalmente la MNA se utiliza en combinación con otros métodos de biorremediación (Izquierdo, 2013).

La US EPA¹³ fue la primera en proponer tres líneas de evidencia que se deben cumplir para demostrar que la atenuación natural se lleva a cabo: (i) disminución documentada de las concentraciones de contaminantes en el emplazamiento (datos históricos), (ii) presencia y distribución de indicadores geoquímicos y bioquímicos de biodegradación (evidencia indirecta), (iii) evidencia microbiológica directa.

Estos principios han sido adoptados por muchos países para la regulación de la atenuación natural monitorizada como estrategia de biorremediación (EPA, 1999).

a.4. Bioaumentación

El Bioaumentación o biorefuerzo consiste en la adición de la población microbiana especializada (cepas individuales o consorcios), que generalmente se cultivan por separado en condiciones definidas, para realizar una tarea específica de remediación en un ambiente dado (in situ o en un biorreactor) (Alvares y Illman, 2006).

La bioaumentación puede realizarse sembrando las áreas afectadas con microorganismos petroleolíticos autóctonos y adicionado nutrientes auxiliares (N, F y Fe) para favorecer el desarrollo de las especies, ya que el medio marino es deficitario en éstos y se deben utilizar las proporciones de carbono que

¹³ US EPA: United States Environmental Protection Agency

implica un vertido de petróleo. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (PECMAR, 2005)

Es una de las estrategias más utilizadas en procesos de biorremediación. Esta técnica es la más adecuada para emplazamientos que no poseen suficientes células microbianas o donde la población nativa no posea las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los contaminantes (Izquierdo, 2013).

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante, para promover su biodegradación o su biotransformación (PECMAR, 2005).

Se han desarrollado dos enfoques distintos para el bioaumento. Uno se basa en la inoculación con microorganismos con el potencial catabólico deseado para complementar o sustituir a una población de microorganismos nativos (Izquierdo, 2013). El segundo enfoque consiste en la adición de una gran concentración de células que actúan momentáneamente como biocatalizadores y que degradan significativamente un contaminante objetivo antes de convertirse en inactivas o morir (Duba et al., 1996; Krume et al., 1994). En este caso, los microorganismos inoculados no son capaces de establecerse debido al estrés abiótico y biológico encontrado en el nuevo entorno (Izquierdo, 2013).

Los inóculos utilizados para el Bioaumento pueden ser de diferentes tipos de microorganismos, incluyen tanto bacterias y hongos. Los inóculos más utilizados para Bioaumento incluyen:

- Cultivos mixtos, cultivos de bacterias nativas que han sido altamente enriquecidas utilizando el contaminante o los contaminantes de interés (Steffan et al., 1999; Ulrich y Edwards, 2003; Zheng et al., 2001).

- Cultivos puros, la inoculación con una única cepa capaz de degradar el contaminante, muchas cepas están disponibles en las colecciones de cultivos (Izquierdo, 2013).
- Elementos genéticos, introducción de genes mediante la utilización de vectores que serán incorporados por las bacterias nativas. Esta estrategia permite introducir nuevas funciones catabólicas minimizando las dificultades asociadas con la inyección, distribución y supervivencia de células bacterianas exógenas (Izquierdo, 2013).
- Los microorganismos genéticamente modificados (OGM). Aunque existe una vasta literatura sobre el desarrollo y potencial de bacterias degradadoras obtenidas por modificación genética.

La biomasa que va ser utilizada como inóculo para el Bioaumentación se produce en biorreactores, de modo que la transferencia de esos cultivos al emplazamiento a menudo resulta crítica. En casos reales, la población introducida comienza a disminuir poco después de su adición debido a varios tipos de estrés abióticos y bióticos. La tabla N° 9 resume los factores que pueden dificultar el éxito del Bioaumentación.

Tabla N° 9: Factores que influyen en los proceso de Bioaumentación

Factores	Descripción	Referencias
Pérdida de viabilidad microbiana durante la inoculación	Estrés debido a los cambios drásticos en condiciones medioambientales	vanVeen et al., 1997 Goldstein et al., 1985
Eventual muerte celular después de la inoculación	Agotamiento de los nutrientes o toxicidad causada por contaminantes	Goldstein et al., 1985 Liu et al., 2009
Competencia	Competencia por nutrientes con microorganismos nativos	Thompson et al., 2005 El Fantroussi y Agathos, 2005
Predación	Bioaumentación seguida por la desaparición de la población bacteriana y el crecimiento excesivo de protozoos	Bouchez et al., 2000
pH	pH extremos inhiben los procesos de la degradación microbiana	Dibble y Bartha, 1979
Temperatura	La temperatura influye en el crecimiento y la potencial degradación microbiana, así como la naturaleza física y química composición del contaminante	Atlas, 1981
Humedad	El contenido bajo de humedad limita el crecimiento microbiano y su metabolismo, los valores más altos reducen la aireación del suelo	Dibble y Bartha, 1979 Leahy y Colwell, 1990

Fuente: Tyagi et al., 2011.

a.5. Fitorremediación

Este proceso se basa en el crecimiento de las plantas para acelerar la biodegradación natural de los hidrocarburos, estos se encuentran infiltrados en el terreno, o bien transformados en el proceso de crecimiento de las plantas, o bien asimilados y metabolizados por la propia vegetación (PECMAR, 2005).

La Fitorremediación se práctica sólo en situaciones donde la contaminación es poco profunda (menos de 5 m), aunque en algunas situaciones de contaminación más profunda puede ser usada en conjunción con otras tecnologías. Las plantas facilitan la remediación a través de varios mecanismos: (i) captación directa e incorporación de contaminantes en la biomasa vegetal, (ii) inmovilización, o fitoestabilización de contaminantes en el subsuelo, (iii) secreción de enzimas de la planta en la rizosfera para que actúen directamente sobre los contaminantes y (iv) la estimulación de la degradación mediada por microorganismos en la rizosfera (Izquierdo, 2013).

Se puede usar para la remediación de aguas subterráneas contaminadas y de suelos con metales pesados tóxicos, radionúclidos, contaminantes orgánicas, tales como disolventes clorados, compuestos BTEX, hidrocarburos de petróleo y exceso de nutrientes (Schnoor et al., 1995). Otras aplicaciones de la Fitorremediación incluyen zonas de amortiguamiento de la escorrentía agrícola y tratamiento de aguas urbanas y residuales industriales. También se puede emplear como un paso de final de biorremediación, en conjunción con otras técnicas de tratamiento, a pesar de todo su aplicabilidad está limitada por varios factores (Izquierdo, 2013).

Existen diferentes métodos de Fitorremediación (PECMAR, 2005):

- Fitoextracción: durante la fitoextracción los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación), y posteriormente estos son traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción).

- Fitodegradación: consiste en el metabolismo de contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación
- Fitoestabilización: las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción en las raíces de compuestos químicos que pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interfase raíces: suelo.

a.6. Landfarming

Es un método más popular para la destrucción de productos de petróleo, así como de residuos sólidos y líquidos. Landfarming, es considerado una técnica de biorremediación mejorada mediante la cual el suelo o sedimentos contaminados se extienden en un espacio abierto. El laboreo regular se utiliza para mejorar la textura del suelo, y por tanto la permeabilidad, uniformidad y aireación del suelo, se puede instalar un sistema de riego o rociador para ser aplicado en condiciones acuáticas junto con nutrientes y surfactantes para incrementar los niveles de humedad y maximizar el crecimiento microbiano (Xu Ran, 2004)

b. Ex situ

La biorremediación ex situ requiere menos tiempo que la biorremediación in situ, pero es más caro. Se pueden degradar altas concentraciones de contaminantes, pero el sustrato del contaminante requiere que la biorremediación sea fuera del sitio (Xu Ran, 2004). Las técnicas de biorremediación ex situ que son usadas comúnmente incluyen el landfarming, biopiling, compostaje y el uso de un birreactor para manipular el ambiente microbiano (Xu Ran, 2004).

b.1. Biopiling

Biopiling es una versión modificada de Landfarming que aprovecha la degradación de los productos del petróleo. Es necesario la construcción de un canal donde van a drenar los lixiviados y aplicar en vacío para extraer el aire de la biopila y estimular el crecimiento de la comunidad microbiana. También se puede incluir un sistema de irrigación en el diseño de la biopila para optimizar el nivel de humedad y la eficiencia del tratamiento (Xu Ran, 2004).

b.2. Compostaje

El compostaje es otra versión modificada de landfarming en la que se añade un material de enmienda que permite el crecimiento microbiano y la posterior degradación de los derivados del petróleo. El compostaje es un método efectivo en la eliminación de compuestos orgánicos que tienen altas concentraciones de sólidos volátiles. El material de enmienda puede ser en base a estiércol, aserrín, recortes, heno, hojas, y virutas de madera o paja. El material de enmienda incrementa la permeabilidad del sustrato, mejora la transferencia de oxígeno, y proporciona una fuente de carbono más fácilmente degradable que ayuda a establecer una población microbiana que degrada el contaminante más rápido (Xu Ran, 2004).

b.3. Bioreactor

Altas cantidades de peso molecular (mayores que $n\text{-C}_{12}$) de compuestos alifáticos y aromáticos pueden permanecer en sedimentos durante varios años después de un derrame de petróleo en la costa marina. Especialmente la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) es limitada por su baja biodisponibilidad, resultado de una baja solubilidad del agua y de la gran adsorción en sedimentos (Cho y Kim, 1997; Bardi et al., 2000; Yuan et al., 2001).

En biorreactores en suspensión, la eficiencia de la biorremediación aumenta siempre que los sustratos sean transportados eficientemente a las células de los microorganismos (Woo et al., 1997). Por lo general, la arena es separada del limo y arcilla y tratadas mediante un método de lavado. La arena es tratada mediante un método de lavado siempre que el nivel de contaminantes sea menor que el área superficial del limo/arcilla. Sin embargo, el método de lavado requiere de un equipo adicional y de grandes cantidades de agua, por lo tanto sería deseable que los sustratos del contaminante sean tratados en una sola etapa sin que se tenga que remover la arena de las otras fases sólidas. Recientemente, se han utilizado los tambores de los reactores rotativos para manejar los niveles altos de sólidos (Gray et al., 1994). De acuerdo a los resultados de estudios previos, la adecuada adición de una cierta cantidad de agua es esencial para una mezcla eficiente de las partículas de sólidos (Xu Ran, 2004).

c. Ventajas e Inconvenientes de la Biodegradación

c.1. Ventajas, fuente PECMAR, 2005

- Generalmente solo origina cambios físicos menores sobre el medio, con lo que resulta una técnica de bajo impacto ambiental.
- Cuando se usa correctamente no produce efectos adversos significativos en la biota local del medio contaminado.
- Ofrece una solución más sencilla y completa que las tecnologías mecánicas, y resulta menos costosa que estas tecnologías.

c.2. Inconvenientes, fuente PECMAR, 2005

- Para muchos tipos de vertidos su efectividad no ha sido determinada, y en general es poco eficiente con compuestos pesados.
- Su aplicación en el mar reviste una elevada dificultad y en general no es viable debido a la inestabilidad del medio.

- El tiempo necesario para la actuación de los microorganismos es largo.
- Su implementación es específica para cada lugar contaminado, tanto en lo referente al tipo de microorganismos empleados como a las técnicas de enriquecimiento nutricional y técnicas de aplicación.
- Su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y las características del vertido, por lo que generalmente no es una técnica de aplicación inmediata.

2.4.3.3. Factores que afectan a la biodegradación de los hidrocarburos

Normalmente, los factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos se puede dividir en tres aspectos: físico, químico y biológico. Es necesaria realizar un análisis profundo de estos factores para poder llevar implementar las medidas correctivas y optimizar el proceso de tratamiento (Xu Ran, 2004)

a. Nutrientes

Los microorganismos dependen de diversos nutrientes para su supervivencia, así como otros minerales para incorporarla a la biomasa (Xu Ran, 2004). A pesar de que los requerimientos son diferentes en función del tipo de microorganismo de que se trate, todos necesitan nitrógeno, fósforo y carbono. Como resultado, la disponibilidad de estos nutrientes es crítica para la degradación de compuestos peligrosos, porque la población de los microorganismos aumenta rápidamente después de un evento de derrame de petróleo. Por lo general, el crecimiento de microorganismos se ve limitada por el agotamiento de nutrientes, incluso en la presencia de sustratos degradables (Atlas, 1991; Pritchard et al., 1992; Lessar et al., 1995; Sveum y Ramstad, 1995; Wright et al., 1996; Mearns, 1997; Venosa et al., 1997; Oudot et al., 1998; Lee y Merlin, 1999; Liebeg y Cutright, 1999; Ramsay et al., 2000; Swannell et al., 1999; Santas et al., 1999; Santas, 2000).

En una mancha de crudo en el mar, existe una masa disponible de carbono para el crecimiento microbiano dentro de un área limitada y los microorganismos que degradan los hidrocarburos dependen en la disponibilidad de los nutrientes en el volumen de agua de contacto directo con el crudo (Xu Ran, 2004).

En la descomposición del fuel, la fuente de carbono no representa ninguna limitación ya que proviene de las propias moléculas orgánicas. Existe cierta confusión y conflicto cuando se analiza la limitación de la biodegradación de petróleo debido a la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en agua de mar. Mientras que un gran número de investigadores han afirmado que se trata de nutrientes limitantes (Ahn et al., 1998; Head and Swannell, 1999); aunque con distintas conclusiones a cerca de la proporción C/N, C/P necesaria, otros han llegado a la conclusión opuesta, debido a que cuando se consideran hidrocarburos solubles la solubilidad de estos es tan baja que imposibilita que se dé un ratio C/N o C/P desfavorables (Atlas, 1981).

b. Variables ambientales

Además de estos factores nutricionales existen varias variables ambientales que influyen en la degradación de los contaminantes orgánicos, tanto en sistemas terrestres como en acuáticos. Estas variables incluyen la temperatura, pH, salinidad y, en particular la disponibilidad de oxígeno (Bauer y Capone, 1985).

b.1. Oxígeno

Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias que implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, las cuales requieren oxígeno molecular. Normalmente no existen condiciones limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos.

Se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y que, por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, posteriores investigaciones han puesto de manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación (Leahy y Colwell, 1990).

La respiración aerobia es la vía metabólica más eficiente que la respiración anaerobia y la fermentativa. Por lo tanto, es el método preferido que se utiliza en la biorremediación de crudo de petróleo. La oxidación del sustrato por acción de las oxigenasas durante el proceso de respiración aerobia, para lo cual se requiere oxígeno molecular, y esto ocurre en las etapas iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por bacterias y hongos (Leahy y Colwell, 1990). Como resultado, la velocidad de biorremediación puede ser mejorada con aireación (Atlas, 1981; Bossert y Bartha, 1984)

La disponibilidad de oxígeno es fundamental para las degradaciones aeróbicas, que son las que resultan más eficientes. Aunque su disponibilidad no suele ser limitante en ambientes marinos, la concentración del mismo depende de su ubicación en el ambiente marino, por ejemplo, es mucho menos en sedimentos de baja granulometría.

b.2. Salinidad

Cuando la concentración de sal en las zonas afectadas por un vertido son elevados, la eliminación de contaminantes con métodos de biorremediación convencionales resulta difícil. Concentraciones de sal elevadas provocan alteraciones en las membranas de las células, pueden desnaturalizar las enzimas implicadas en el proceso o provocar la desecación osmótica de las células provocándoles su muerte (Kargi y Dincer, 2000). El número de estudios que analizar el efecto de la salinidad en la degradación microbiológica de fueles es escaso, aunque su efecto perjudicial sobre la actividad microbiana si ha sido

descrito (Díaz et al., 2000). No obstante, se han obtenido diversos microorganismos capaces de vivir y mantener las tasa de biodegradación en condiciones de salinidad elevadas (Díaz et al., 2000).

b.3. Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación in situ, ya que tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de este parámetro. Un incremento en la temperatura provoca un descenso de la viscosidad y, por tanto, afecta al grado de dispersión y al aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos.

Generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos en torno a un valor medio típico de cada zona.

Temperaturas altas incrementan la metabolización de los hidrocarburos normalmente hasta un máximo entorno a los 30° - 40°C, por encima de la cual la toxicidad de los hidrocarburos aumenta para la membrana celular (Leahy y Colwell, 1990).

La biodegradación decrece por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C, mientras que se inhibe con temperaturas bajas. Una temperatura óptima de crecimiento bacteriano suele estar en torno a los 25°C. La tasa de degradación decrece exponencialmente cuando se baja de esta temperatura, habiéndose comprobado que es 10 veces inferior a 5°C.

La biodegradación de hidrocarburos se produce en un amplio intervalo de temperaturas (Xu Ran, 2004). La temperatura determina la tasa de degradación de hidrocarburos a través de su efecto sobre la naturaleza física y su composición química en el crudo, y la tasa metabólica de microorganismos.

b.4. pH

El efecto del pH sobre la biodegradación del petróleo ha recibido poca atención porque el agua de mar soporta alrededor un pH de 8,5 (Xu Ran, 2004). Se permite un pH de 8.0 o un pH natural en el agua de mar en altas tasas de biodegradación de petróleo cuando se eliminan otras limitaciones. Al tener las bacterias un pH óptimo o por encima de la neutralidad, esto es favorable en la biodegradación de los hidrocarburos y consistente en que las bacterias sean dominantes en la biodegradación de hidrocarburos (Xu Ran, 2004).

Afecta a la solubilidad de muchos compuestos y, por tanto, a la disponibilidad de productos que pueden afectar a la actividad biológica. El pH óptimo para la actividad del sistema enzimático naftaleno dioxigenasa, que cataliza el primer paso de la ruta catabólica del naftaleno es 7.

b.5. Necesidad de nutrientes

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentran disponibles para su asimilación y síntesis. Los nutrientes requeridos son el fósforo y el nitrógeno, cuya disponibilidad suele ser más limitante que la del oxígeno, siendo la mayoría de los ambientes marinos deficitarios en estos nutrientes, así como en el hierro.

2.4.4. Microrremediación

La microrremediación es la disciplina que estudia esta habilidad de los hongos para contribuir a la descontaminación del medioambiente, la microrremediación es posible gracias a su habilidad biodegradadora; es decir su capacidad metabólica de descomponer la materia orgánica muerta en moléculas más sencillas, bajando los niveles de contaminación. De esta manera permite que

otros organismos menos resistentes, como plantas o bacterias, puedan colonizar, generando una sucesión biológica.¹⁴

Hay una serie de ventajas en el uso de hongos en relación al uso de plantas (Hernando, 2012):

- La infiltración del hongo al sustrato es muy superior al de las plantas (debido a que su cuerpo constituido por hifas puede penetrar más profundo por su diámetro más pequeño).
- La actividad descomponedora del micelio sobre el sustrato, permite no solo seguir la depuración de contaminantes, sino también la degradación de xenobióticos orgánicos en las pilas de compost o el reciclado para un posterior uso agrícola.

2.4.5. Organismos Hidrocarburoclásticos

Los llamados organismos Hidrocarburoclásticos o petroleolíticos son bacterias y hongo capaces de degradar petróleo fisiológica y metabólicamente. Más de 100 especies de 30 géneros microbianos son capaces de usar hidrocarburos, como método de subsistencia. Los géneros de organismos hidrocarbonoclasticos son: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Candida*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycrobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. La fracción del total de organismos que metabolizan hidrocarburos es altamente variable, 6 a 82% para hongos terrestres, 0.13% a 50% para bacterias de la tierra y del 0,03% a 100% para bacterias marinas (PECMAR, 2005).

¹⁴ <http://regiones.explora.cl/ohiggins/noticias-ohiggins/4148-mico>

En ecosistemas no contaminados, los microorganismos degradadores de hidrocarburos constituyen menos del 0,1% de la comunidad microbiana; mientras que en ecosistemas contaminados con hidrocarburos pueden constituir el 100% de la comunidad microbianas (PECMAR, 2005).

Las poblaciones dominantes en estas comunidades poseen características nutricionales relacionadas al contaminante y pueden ser también resistentes a muchas formas de estrés ambiental, cuando la fuente de carbono es un sustrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes. Los microorganismos utilizan estos compuestos a manera de un biofilm alrededor de la molécula del hidrocarburo, para posteriormente ingerirlo o romperlo en compuestos simples de carbono y oxígeno. Estos microorganismos usan la energía liberada para manejar los procesos termodinámicamente no espontáneos como la síntesis de componentes celulares.

2.4.6. Cepa *Aspergillus niger*

La cepa *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*Aspergillus flavus*), negro (*Aspergillus niger*), marrón (*Aspergillus terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales.

Aspergillus es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo

durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos

Aspergillus niger crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición. Es un contaminante habitual de los conductos de climatización-ventilación. Es termotolerante, puede vivir entre los 12°C y 57°C.

Las esporas de *Aspergillus niger* pueden sobrevivir a 70°C.

La taxonomía de *Aspergillus niger* se basa principalmente en las características morfológicas, en lugar de las características bioquímicas, fisiológicas y características genéticas a menudo utilizan para clasificar bacterias. El género *Aspergillus niger* se define generalmente como hongos saprófitos asexuales que producen gran conidios negros o marrones por fiálides. Esta definición lleva a la inclusión de una compleja variedad de organismos dentro del taxón. Esto se ilustra por las 132 especies dispuestas en 18 grupos por Raper y Fennell (1965) debido a la superposición de características morfológicas o fisiológicas. *Aspergillus niger* es a la vez una especie y un grupo dentro del género *Aspergillus*.

El enfoque morfológico a la taxonomía ha dado lugar a la existencia de varios sinónimos para el género *Aspergillus*. Ellos son: *Alliospora pim*; *Aspergillonsis spegazzini*; *Cladaspergillus ritg*; *Cladosparum yuill y yuill*; *Euaspergilus ludwig*; *Gutturomyces rivolta*; *Raperia subramaniam y grove*; *Sceptromyces corda*; *Spermatoloncha spegazzini*; *Sphaeromyces montagne*; *Sterigmatocystis cramer*; y *Stilbothamnium hennings* (Bennett, 1985).

Aspergillus niger no es un patógeno humano significativo. A lo largo de años de uso y la exposición generalizada a *Aspergillus niger* en el medio ambiente, sólo hay varios informes de la *Aspergillonsis* con *Aspergillus niger*, y en Nigeria, se informó sobre un número de casos de otomicosis. No ha habido sólo varios informes de reacciones alérgicas, que no son infrecuentes para *aspergillus* en general, y no es exclusivo de *Aspergillus niger*.

2.4.7. Inmovilización de la Biomasa Microbiana

Una aproximación efectiva para encontrar una solución práctica a la contaminación es concentrar los biodegradadores inmovilizándolos por medio de soportes naturales o sintéticos con alta porosidad que permitan su uso en diferentes tipos de reactor, o biofiltros a través de los cuales se haga pasar el agua contaminada.

La inmovilización de células viables se ha definido como la localización o el confinamiento físico de células intactas en una región concreta que incluye el mantenimiento de las actividades enzimáticas deseadas (Karel *et al.*, 1985). A menudo la inmovilización de biomasa imita los procesos que ocurren en la naturaleza cuando crecen sobre superficies o dentro de estructuras naturales (Kourkoutas *et al.*, 2004).

La biodegradación de compuestos orgánicos como el fenol, ácido dicloroacético, piridina o acetofenona se ha visto muy favorecida por la inmovilización de los microorganismos en fibras o micro partículas elaboradas con distintos polímeros naturales y/o sintéticos: Los polímeros protegen a los microorganismos de la toxicidad del xenobiótico y/o mejoran las velocidad de degradación (Cassidy *et.*, 1997; Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar *et al.*, 2001; Gardin y Pauss, 2011).

La biorremediación de compuestos tóxicos usando la tecnología de inmovilización de microorganismos ha sido estudiada empleando diferentes transportadores que incluyen poliacrilamida (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar *et al.*, 2001; White y Thomas, 1990), alginato (Manohar y Karegoudar, 1998; Manohar *et al.*, 2001; Weir *et al.*, 1995).

La inmovilización de las bacterias aumenta significativamente la biodegradación de crudo en comparación con células libres en un amplia rango de salinidad (Díaz *et al.*, 2002).

Un buen número de procesos biotecnológicos se ven favorecidos usando biomasa inmovilizada, y por ello, se han desarrollado gran número de tecnologías y métodos de inmovilización de células vivas desde su aparición a principios de los 80 (Junter and Jouenne, 2004). Existen gran variedad de aplicaciones que emplean células inmovilizadas en soportes o matrices sólidas (Pereda, 2010). Algunas de ellas se resumen en la Tabla N° 10 (Pereda, 2010):

Tabla N° 10: Aplicaciones en las que se emplean células enteras inmovilizadas

Actividades enzimáticas	α -amilasa, celulosa, enzimas quitinolíticos, L-glutaminasa, inulasa, lipasas, penicilina V acilasa, peroxidadas, polimetilgalacturonasas, proteasas ácidas y básicas, ribonucleasa, xilasa
Antibióticos	Ampicilina, candicidina, cefalosporina, ácido clavulínico, cicloesporina A, penicilina G, rifamicina B
Esteroides	Androstenediona, hidrocortisona, prednisolona, progesterona
Aminoácidos	Alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, fenilalanina, serina, triptófano
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico, málico, ácidos propiónicos
Alcoholes	Butanol, etanol, sorbitol, xilitol
Polisacáridos	Alginato, dextrano, levano, exopolisacáridos sulfatados
Otros	Pigmentos, vitaminas, saborizantes y aromatizantes
<i>Medio ambiente</i>	
Tratamiento de aguas	Eliminación de carbono, nitrógeno, metales pesados, biodegradación de contaminantes (fenoles y compuestos fenólicos, policíclicos aromáticos, cianuro, surfactantes, hidrocarburos...)
Biofertilización	Inoculación de suelos con organismo promotores del crecimiento de plantas
Biorremediación	Degradación de contaminantes en suelos, acuíferos y ambientes marinos
Combustibles	Producción de hidrógeno y metano, etanol, células de biocombustibles.
<i>Procesado de alimentos</i>	
Bebidas alcohólicas	Elaboración de cerveza, vinificación, fermentación de sidra y kéfir, generación de bioflavores
Productos lácteos	Inóculos continuos de la leche (iniciadores del ácido láctico), hidrólisis de lactosa en el suero de la leche.

Fuente: Junter y Jouenne, 2004;

a. Ventajas de las células inmovilizadas sobre las libre

Existen numerosas ventajas derivadas del uso de células enteras y viables inmovilizadas tanto en procesos industriales como en procesos de biorremediación, ya sea comparándolo con el uso de células libres o con el uso de enzimas aislados e inmovilizados (Pereda, 2010). Algunas de ellas se muestran en la Tabla N° 11 (Pereda, 2010):

Tabla N° 11: Ventajas de la inmovilización de células viables frente a la inmovilización de enzimas o a las células libres

<i>Frente a enzimas inmovilizados</i>	<i>Frente a células libres</i>
No es necesario un proceso de purificación o extracción del enzima o conjunto de enzimas necesario, que a menudo lleva consigo un costo económico, y una pérdida de actividad y estabilidad enzimática.	Prolongación de la actividad catalítica. El soporte actúa como agente protector frente a los efectos físico-químicos del pH, temperatura, solventes o contaminantes.
Puesto que las células viables pueden continuar creciendo y aumentando la densidad celular, la actividad puede verse aumentada.	Alta densidad celular. La inmovilización evita la dispersión y concentra los nutrientes, mejorando la actividad biológica y acortando los tiempos de reacción.
La actividad enzimática es más estable con el tiempo debido a la protección ejercida por la célula.	Facilita procesos continuos.
	Posibilita procesos inhibidos por altas concentraciones de sustrato.
	Minimiza los riesgos de contaminación debido a la alta densidad celular.
	Facilita la recogida y procesamiento de los productos.
	Permite reutilizar la biomasa en procesos industriales.

Fuente: Junter y Jouenne, 2004;

Las principales ventajas de la inmovilización son: (i) estabilidad, (ii) elevada densidad celular, (iii) elevadas tasas de conversión, (iv) limitación de la inhibición por sustrato y toxicidad debido a límites difusionales (Abou Seoud y Maachi, 2003), y (v) uso en reactores continuos (Manohar y Karegoudar, 20019

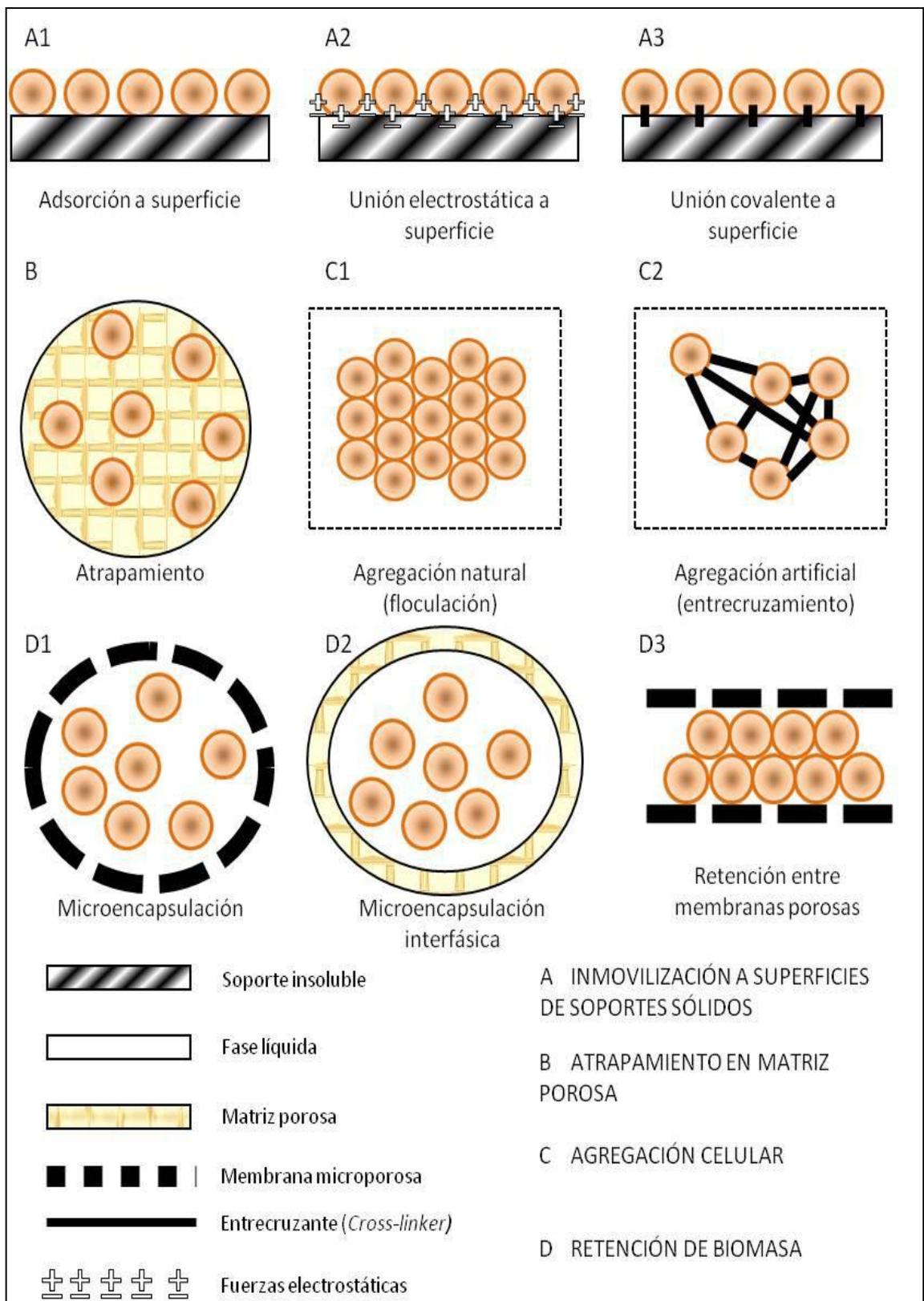
En el caso concreto de la biorremediación, las zonas naturales en las que se introducen microorganismos suelen resultar ambientes hostiles para los mismos, por lo que la estrategia de la introducción del inóculo inmovilizado en

una matriz sólida resulta muy atractiva para solventar el problema (van Veen *et al.*, 1997). Además en el medio marino se producen procesos de extrema dilución de la biomasa y de los nutrientes, que son subsanables mediante la inmovilización de los mismos (Swannell *et al.*, 1996).

2.4.7.1. Tipos de inmovilización celular

Podemos definir las diferentes técnicas de inmovilización de biomasa viable en 4 categorías en función de los mecanismos físicos empleados: unión o adsorción a la superficie de un soporte sólido, atrapamiento en matriz porosa, agregación celular y contención de biomasa entre barreras físicas (ver Figura N° 15) (Pereda, 2010).

Figura N° 15: Representación esquemática de los principales tipos de inmovilización de biomasa



Fuente: (Kourkoutas *et al.*, 200

a. Inmovilización a superficies de soportes líquidos

Se lleva a cabo a través de la adsorción física debido a fuerzas electroestáticas o unión covalente entre la biomasa y el soporte sólido (Pereda, 2010). Su grosor varía entre una única capa de células y aproximadamente 1 mm (Pereda, 2010). Es muy conocida por la facilidad con la que se puede revertir la inmovilización, y no existen barreras físicas entre las células y el solvente (Pereda, 2010). Algunos ejemplos de estos soportes son materiales de tipo celulósico (DEAE-celulosa, madera o serrín) o algunos materiales inorgánicos (porcelana o cristal poroso) (Pereda, 2010). Se pueden usar además activadores para mejorar la adsorción a superficies (Kourkoutas *et al.*, 2004).

b. Atrapamiento en matriz porosa

En este tipo de inmovilización, existen dos métodos principales (Pereda, 2010). En uno de ellos, se utiliza la matriz preformada y las células penetran en el soporte hasta que otras células o la propia matriz impidan seguir avanzando en el interior del soporte (Pereda, 2010). En el otro método la matriz se forma *in situ*, en torno al cultivo celular (Pereda, 2010). Ambos métodos se basan en la inclusión de células en una matriz rígida y porosa, que minimiza la liberación de biomasa, pero que permite la transferencia de materia de nutrientes y metabolitos (Pereda, 2010).

El crecimiento celular dentro de la matriz depende en principio de las limitaciones impuestas por el propio soporte y del impedimento estérico derivado de la acumulación de biomasa (Pereda, 2010). Es posible la formación de patrones poblacionales diferentes en función de si las células se encuentran en el interior o en la superficie de la matriz (Freeman and Lilly, 1998). Uno de los problemas de este tipo de inmovilización es la posibilidad de crecimiento de la biomasa más cercana a la superficie y su liberación al medio (Kourkoutas *et al.*, 2004).

c. Agregación celular

Se define la floculación como el fenómeno por el cual las células se adhieren rápidamente formando grupos y sedimentos en el medio en el que se encuentran suspendidas (Jin and Alex Speers, 1998). Los flóculos que se producen son de gran tamaño, lo que permite que sea una técnica de inmovilización utilizada en el uso de biomasa para reactores (Pereda, 2010). Se usa principalmente en mohos, hongos y células vegetales (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Se pueden usar entrecruzantes artificiales para mejorar la agregación celular o para inducirla en cultivos en los que no se produce de forma natural (Pereda, 2010). Tiene importancia sobre todo en la industria alimentaria, concretamente en la fermentación de la cerveza (Pereda, 2010). Los factores que influyen en la agregación son principalmente la composición de la pared celular, el pH, el oxígeno disuelto y la composición del medio (Kourkoutas *et al.*, 2004).

d. Retención de biomasa

Los métodos más utilizados para inmovilizar biomasa mediante la retención mecánica son encapsulación entre filtros microporosos, atrapamiento en microcápsulas e inmovilización de biomasa en la interfase de dos líquidos inmiscibles (Pereda, 2010). La mayor desventaja de este tipo de inmovilización es la baja transferencia de materia, lo que dificulta la obtención del producto y el *biofouling* debido al crecimiento de la biomasa entre las membranas (Pereda, 2010).

e. Requisitos del soporte para inmovilización

Un soporte óptimo para la biorremediación no debe ser tóxico para la biomasa ni para el medio ambiente, y debe ser estable en el tiempo que la biomasa mantenga su actividad degradadora y tener, además, un bajo coste de

producción (Leenen *et al.*, 1996). También es importante que una vez que haya completado su acción, este soporte pueda ser eliminado con facilidad, es decir, sea biodegradable (Pometto *et al.*, 1998).

Además el proceso de inmovilización no debe tener efectos adversos sobre la actividad catalítica de la biomasa, y llevarse a cabo de manera sencilla y con productos que posibiliten un escalado (Pereda, 2010). Es necesario asimismo, que el soporte permita el paso a través de los poros de los sustratos y nutrientes, así como de los gases necesarios para que la biomasa lleve a cabo su actividad biológica (Kourkoutas *et al.*, 2004).

2.4.8. Inmovilización en hidrogeles

Si bien no existe una definición concreta y precisa de hidrogel, generalmente se les define como materiales poliméricos obtenidos por entrecruzamiento formando una red tridimensional, cuya propiedad principal es que se hinchan al contacto con el agua, formando materiales blandos y de alta elasticidad (Pereda, 2010). Además retienen una cantidad importante de agua, hinchándose, sin llegar a disolverse (Pereda, 2010). Pueden ser tanto de origen natural como de origen sintético (Pereda, 2010). Los polisacáridos como la goma xantano o el quitosano son unos de los principales formadores de hidrogeles (d'Ayala *et al.*, 2008).

Los hidrogeles han sido ampliamente utilizados como soporte para la inmovilización de enzimas y células (Chia-Hong *et al.*, 1996; Chellat *et al.*, 2000; Magnin *et al.*, 2001; Magnin *et al.*, 2003; Farris *et al.*, 2009). Sus principales ventajas son una elevada permeabilidad a determinados sustratos, productos y nutrientes, una excelente estabilidad química y compatibilidad biológica, así como la capacidad de intercambio iónico controlable y una importante resistencia al hinchamiento y encogimiento en soluciones electrolíticas (Pereda, 2010). Además son sencillos de preparar y de usar, y

pueden ser usados con una gran variedad de biocatalizadores, desde enzimas hasta células (Salter and Kell, 1992).

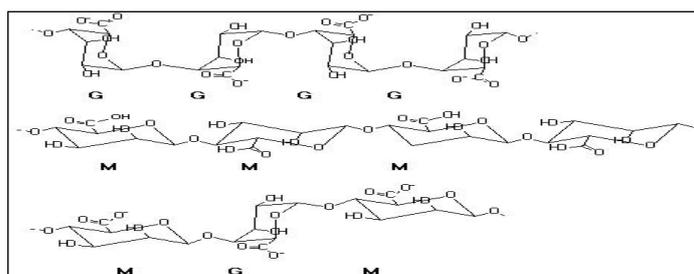
f. Alginato

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido natural, no tóxico, que se obtiene de algunas “algas marrones” como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria hyperborea*.

Está compuesto de dos unidades monoméricas, el ácido- β -D-manurónico (M) y el α -L-gulurónico (G). El contenido relativo de cada uno de estos bloques depende del tipo de alga, de su grado de desarrollo y en menor medida, de las condiciones de su crecimiento. La presencia mayoritaria de uno u otro monómero repercute ostensiblemente en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de gelificación de los alginatos (Serp et al., 2000). Este hecho, unido a la gran variedad de alginatos existentes, ha suscitado un debate acerca de la composición más adecuada para la elaboración de las cápsulas.

Estos monómeros se unen como bloques formando una cadena. La cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques. Los bloques G contienen sólo unidades derivadas del ácido L-gulurónico, los M se basan enteramente en ácido D-manurónico y las regiones MG, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos, (ver Figura N° 16).

Figura N° 16: Bloques G (ácido L-gulurónico); bloques M (ácido D-manurónico) y regiones MG.



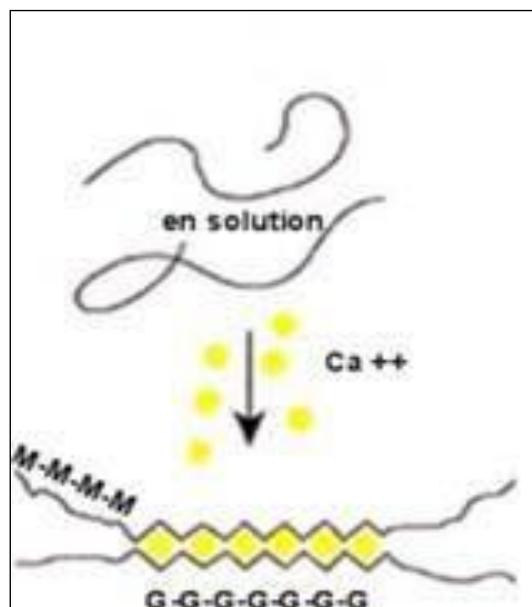
Fuente: Pereda, 2010

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica.

El alginato forma geles insolubles como consecuencia de su unión a cationes multivalentes como el calcio (Albarghouthi et al., 2000). El calcio es el ión divalente de mayor uso en la formación de geles de alginato debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad y no tóxicas. Las más usadas son el carbonato de calcio, sulfato, cloruro, fosfato o tartrato.

El modelo que explica la formación de los geles de alginato con sales cálcicas se denomina “egg-box” (ver Figura N° 17) y se basa en la formación de una unidad dimérica entre los iones calcio y las cadenas del polímero en forma de bucles (regiones de bloques GG) (Grant et al., 1973).

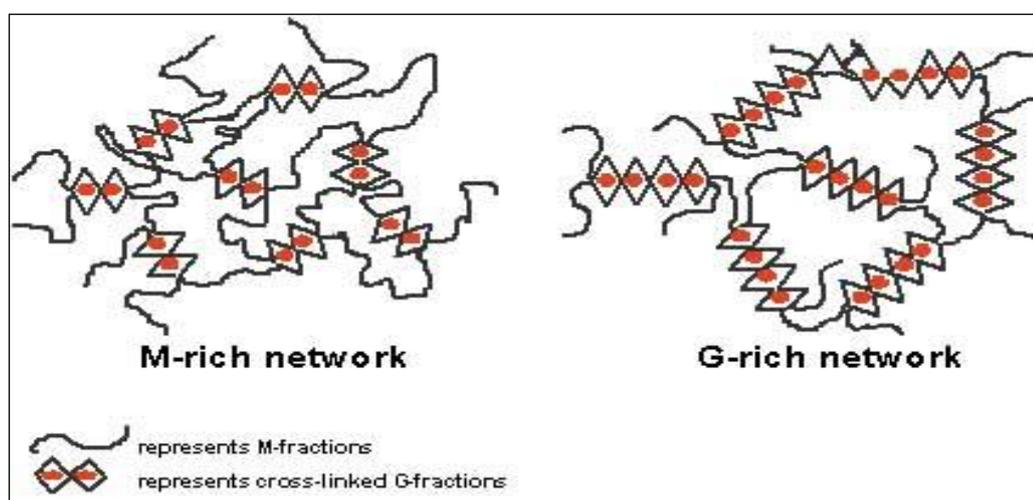
Figura N° 17 Representación gráfica del modelo “Egg-box”



Fuente: Pereda, 2010

La secuencia de residuos de ácido gulurónico se cree que es la responsables de las propiedades gelificantes del alginato con cationes divalentes, mientras que las de manurónico son las de interacción preferente con el agua. Por lo tanto, un alginato con elevados niveles de secuencias G presentará una mayor afinidad por agentes de entrecruzamiento (cationes polivalentes) que un alginato con bajo contenido en G.

Figura N° 18: Redes de Alginato



Fuente: Pereda, 2010.

El uso del alginato como matriz destinada a la inmovilización presenta una serie de ventajas, como son: una elevada porosidad y estabilidad química junto con un método de inmovilización rápido, simple y de bajo coste (Abou Seoud y Maachi, 2003). Además la inmovilización de las bacterias en alginato permite que estas se puedan reutilizar después de la biodegradación sobre crudo, sin que se vea comprometida su capacidad degradativa y evita que las células sean “lavadas” en sistemas de aguas “abiertas” con lo cual se reduce el coste (Rahman, 2006; Quek et al., 2006; Manohar y Karegoudar, 2001).

La principal desventaja que presenta es la desestabilización que sufre en presencia de agentes quelantes de Ca^{+2} o cationes monovalentes (Serp et al., 2000) así como su inestabilidad cuando entra en contacto con elevadas concentraciones de aniones fosfato, citrato y lactato, los cuales tienen afinidad por los iones calcio (Albarghouthi et al., 2000).

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

3.1. Metodología

3.1.1. Método de la Investigación

Para la elaboración del terrario se extrajo suelo a una profundidad de 15 centímetros desde la superficie, utilizando una pala y un pico para excavar la profundidad indicada. Se extrajo aproximadamente 60 kg de suelo, luego este lote es homogenizado haciendo uso de un mortero de porcelana, y se hace pasar por una malla metálica de 2mm.

Este material, luego de haber sido tamizado, debe tener una apariencia y textura arenosa, luego este material es depositado en dos bateas plásticas, (ver Figura N° 19).

Figura N°19: Preparación del suelo contaminado



Fuente: Elaboración Propia

De la elaboración de los terrarios, se utilizó 300 gr. de suelo como muestra para su envío al laboratorio para el análisis fisicoquímico, y poder contar con una línea base previa a la simulación de contaminación por derrame de crudo de petróleo.

En la muestra del suelo se analizó el contenido de sales minerales a través del Método Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Para la medición de la Materia Orgánica se realizó a través del Método de Walkley y Black $\% \text{ MO} = \% \text{ C} \times 1,724$

Para la medición de la Textura se realizó a través del Método de Hidrómetro

Para la medición de la pH se realizó a través del Método de potenciómetros, relación suelo-agua 1:1 y en la pasta saturada.

Para la medición de la Conductividad eléctrica se realizó mediante la Lectura de extracto de relación suelo agua 1:1 y extracto de la pasta saturada.

Contenido de fósforo se realizó a través del Método de Olsen Modificado, Extracto, NaHCO_3 0.5M, pH = 8.5

Luego de la elaboración de los terrarios, se procedió a realizar la simulación de la contaminación, vertiendo 1 Lt. de crudo de petróleo, sobre el cual se realizó un análisis previo de cromatografía de gases, (ver Figura N°20).

Figura N° 20: Suelo contaminado con crudo de petróleo



Fuente: Elaboración Propia

Preparación de Células Inmovilizadas

Para el desarrollo de la investigación se llevo las Placas Petri, tubos de ensayo (ver Figura N° 22), al horno seco que se encuentra a una temperatura de 180°C por un período de 2 horas, (ver Figura N° 21), para esterilizar el material de vidrio a utilizar. En el proceso se utilizaron un total de 20 Placas Petri y 24 tubos de ensayo.

Figura N° 21: Preparación de la Cámara de Flujo Laminar



Fuente: Elaboración Propia

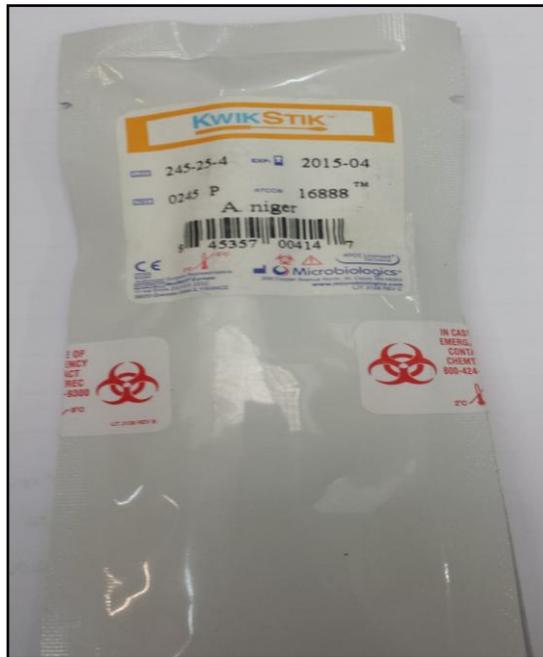
Figura N° 22: Material de vidrio a esterilizar



Fuente: Elaboración Propia

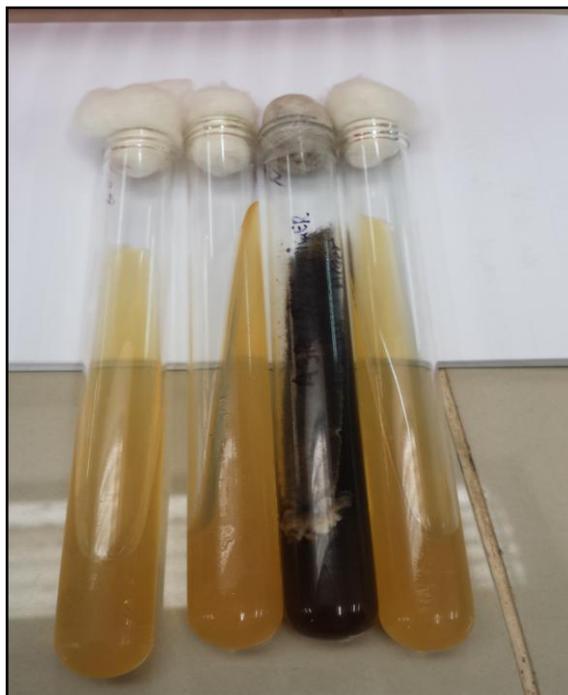
Para la presente investigación se traslapo la cepa del hongo de *Aspergillus niger* a tres tubos de ensayo, (ver Figura N° 23) que incluía previamente Sabouraud Dextrose Agar, (ver Figura N° 24), en la cámara de flujo laminar, la cual se procedió a encenderla por 15 minutos antes de utilizarla para el proceso de esterilización por radiación UV.

Figura N° 23: Cepas *Aspergillus niger*, ACTT 16888



Fuente: Elaboración Propia

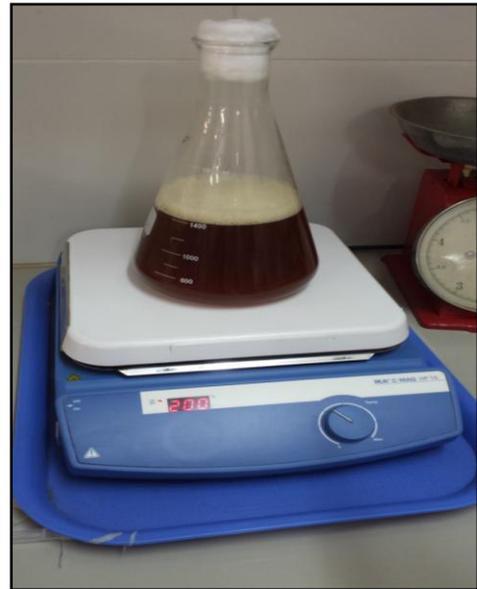
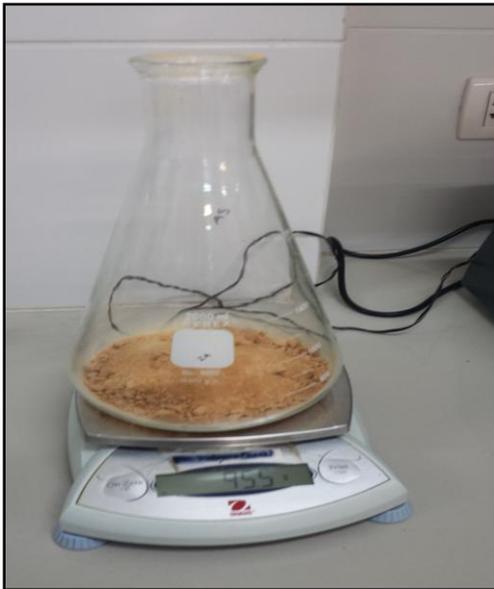
Figura N° 24: Tubos de Ensayo con la Cepas *A. Niger* y el medio Agar S.



Fuente: Elaboración Propia

Se procedió a desarrollar el medio de Sabouraud Dextrose Agar, (ver Figura N° 25), con un 1,5 Lt. de agua destilada y 95,5 gr de Sabouraud Agar, luego se procedió a calentar el medio por tiempo aproximado de 10 a 15 minutos, luego el medio es llevado al Autoclave por un período de 3 horas para su esterilización.

Figura N° 25: Sabouraud Dextrose Agar



Fuente: Elaboración Propia

El medio de Sabouraud Agar, ya esterilizado es dispuesto en las placas petris y en los tubos de ensayo, (ver Figura N° 26).

Figura N° 26: Sabouraud Agar dispuesto en Placas Petris



Fuente: Elaboración Propia

Para la activación de la cepa *Aspergillus niger*, se realizó el medio líquido en el Extractor, utilizando una balanza, 7 espátulas para cada uno de los reactivos a utilizarse junto con un 1 Lt de agua destilada, en el proceso se uso 1 Matraz Erlenmeyer de capacidad de 2 Lt., luego el medio se llevo a la autoclave para su correcta esterilización, (ver Figura N° 27).

Figura N° 27: Realizando el Medio Líquido en el Extractor



Fuente: Elaboración Propia

Lo siguiente, fue realizar el traslapo de la cepa *Aspergillus niger* en las Placas Petri y los Tubos de Ensayo previamente esterilizadas, replicándola para mantener activa la cepa, luego se procedió a llevar las placas petris y los tubos de ensayo con la cepa hacia la incubadora a una temperatura constante de 21°C, para su correcto crecimiento, (ver Figura N° 28).

Figura N° 28: Crecimiento de *Aspergillus niger* en Placa Petri y Tubo de Ensayo



Fuente: Elaboración Propia

Lo siguiente fue realizar el medio de crecimiento con 270 ml de medio líquido 250 gr de arroz y 20 ml de crudo, en 1 matraz con una capacidad de 1 Lt., también se realizó el procedimiento con 50 ml de crudo de petróleo para observar el crecimiento de la cepa *Aspergillus niger*, luego se llevó el medio al autoclave para su esterilización. Posteriormente, el medio fue llevado para la inoculación de la cepa *Aspergillus niger* activada, (ver Figura N° 29).

Figura N° 29: Semilla, *Aspergillus niger* en el medio de crecimiento



Fuente: Elaboración Propia

La siguiente etapa del proceso es desarrollar el Alginato de Sodio, el cual se define como un material polimérico que se obtiene por el entrecruzamiento formando una red tridimensional, cuya propiedad principal es hincharse al contacto con el agua, formando un material blando llamado Pelet. Se conoce que el xantano o el quitosano son unos de los principales formadores de los hidrogeles.

Estos hidrogeles son ampliamente utilizados como soporte para la inmovilización de enzimas y células, por tener estas propiedades se decidió utilizar las macroalgas pardas ó *Macrocystis peryfera* sp. Proveniente de Marcona, (ver Figura N° 30).

Figura N° 30: Macroalga *Macrocystis peryfera* sp.



Fuente: Elaboración Propia

Para la elaboración de Alginato, se procedió a pesar 200 gr de macroalga, y lavarla con abundante agua de caño, luego enjuagarla con aproximadamente 2 Lt. de agua destilada para eliminar las impurezas, lo siguiente es lavar la macroalga con HCl a una concentración de 0,2 M, y volver a lavarla con agua destilada para eliminar completamente las sales. , Posteriormente, se procedió a remojar las macroalgas en un 1 Lt de agua destilada de solución de NaHCO_3^- con un pH de 9, en un biker de una capacidad de 2 Lt. Finalmente, se llevo la macroalga a calentarla a una temperatura de 200°c , hasta obtener su total disgregación, (ver Figura N° 31).

Figura N°31: Preparación de Alginato en base a la macroalga *Macrocystis peryfera* sp.



Fuente: Elaboración Propia

Por último, luego de obtener la semilla de *Aspergillus niger*, ver Figura N° y el alginato, se procede a llevarlo a la licuadora, para obtener la mezcla final y homogénea.

Figura N° 32: Semilla Final de *Aspergillus niger*



Fuente: Elaboración Propia

Lo siguiente es ubicar en un biker de capacidad de 1 Lt. con una solución de CaCl_2 al 2%, junto a un agitador magnético, se procede a agregar la mezcla gota a gota formando los pellets, (ver Figura N° 33).

Figura N° 33: Mezcla Final (Cepa/Alginato)



Fuente: Elaboración Propia

Finalmente se obtuvieron las células inmovilizadas en los pellets, (ver Figura N° 34), luego se procedió a llevar la mezcla al suelo contaminado con crudo de petróleo, (ver Figura N° 35).

Figura N° 34: Células Inmovilizadas en base a *Aspergillus niger*



Fuente: Elaboración Propia

Figura N°35: Aplicación de Cédulas Inmovilizadas en los terrarios de suelo contaminado



Fuente: Elaboración Propia

3.1.2. Tipo de la Investigación

La investigación que se propone en este proyecto de tesis es del tipo aplicada-experimental.

3.1.3. Nivel de la Investigación

La investigación del presente proyecto tiene el nivel de aplicada.

3.2. Diseño de la Investigación

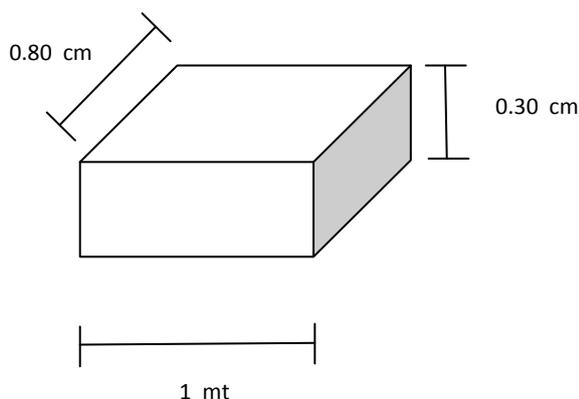
La presente investigación se ha realizado mediante un tratamiento de remediación a través de la inmovilización de la cepa *Aspergillus niger*, a nivel de laboratorio en terrarios en base a la muestra de suelo.

En esta investigación se desarrollaron pruebas para determinar el nivel de degradación de los hidrocarburos en función a la capacidad degradativa de la cepa *Aspergillus niger* empleada, la cual fue seleccionada de acuerdo a los siguientes criterios:

- Los hongos son los que mejor se adaptan a cualquier condición de supervivencia.
- Los hongos, en especial la cepa *Aspergillus niger* tiene la capacidad de degradar y tolerar altas concentraciones de tóxicos con excelentes resultados, como se indicó en los antecedentes.
- Los hongos cuentan con sistemas enzimáticos altamente eficientes que logran mineralizar los compuestos tóxicos sin dejar residuos.
- Los hongos tienen una alta capacidad de crecer eficientemente en suelos contaminados con crudo de petróleo
- Los hongos, a través de los micelios, en los ecosistemas tienen entre sus funciones descomponer toda materia orgánica. Éstos segregan enzimas y ácidos que sirven para degradar las largas cadenas de carbono e hidrógeno de los contaminantes del petróleo.

- Lo más importante en la microrremediación es identificar la cepa de hongos más apropiada para remediar el medio contaminado.
- Los hongos son una de las especies con mayor capacidad de acumulación y de degradación de contaminantes.
- Ciertas cepas de hongos son muy efectivas en la remoción de contaminantes tal como ciertas sustancias empleadas en la preservación de la madera, hidrocarburos aromáticos policíclicos, organoclorados, bifenilos policlorados, tinturas, pesticidas, fungicidas, herbicidas y lignina.

Los ensayos realizados a los terrarios en las bandejas de plástico, como se muestra, tiene las siguientes dimensiones, y debido a que las dimensiones del terrario no permitían mantenerlo en un calentador el desarrollo de la investigación se realizo a temperatura ambiente.



Se realizaron 02 ensayos en las bandejas de plásticos con 02 repeticiones¹⁵ cada uno y un testigo:

Ensayos		
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Testigo
5 Kg de suelo contaminado con 1 Lt de crudo de petróleo + cepa <i>Aspergillus niger</i> inmovilizada	5 kg de suelo contaminado + 1 Lt de crudo de petróleo	5 kg de suelo no contaminado

¹⁵ Biodegradación bacteriana por estimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Samanez G. Elizabet. 2008

Para el procedimiento de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger*, el criterio a utilizar es el Recuento Estándar en Placa por la técnica de agar volcado “Pour Plate”, en esta técnica se realizan diluciones de la muestra en forma similar a la técnica del “Número más Probable”. De cada dilución se toman 3 muestras de 1 ml. y se depositan en una placa Petri estéril, a continuación se agrega a cada placa 11 ml de agar fundido, luego las placas son colocadas en una mesa lisa y son enfriadas a temperatura ambiente hasta esperar su solidificación, posteriormente se deben invertir las placas a incubar. Esta técnica puede ser usada para determinar unidades formadoras de colonias por mililitro o por gramo de muestra.¹⁶

En los resultados descritos en el siguiente capítulo se describen el producto obtenido de los 02 ensayos ya descritos.

Reactivos y materiales utilizados en el presente estudio:

Para la realización del presente trabajo se ha utilizado los siguientes reactivos y materiales de laboratorio:

a. Reactivos de Laboratorio:

- Almidón
- Alcohol
- Sabouraud Dextrose Agar
- Cepa *Aspergillus niger*
- Agua destilada
- Macroalga *Macrocystis Peryfera*
- Sulfato de Amoníaco $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
- Fosfato Monobásico de potasio K_2HPO_4
- Sulfato de Magnesio $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato monobásico de Calcio $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato Férrico $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

¹⁶ Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos. Zajonskovsky Irene. 2006.

- Sulfato de Manganeso $MnSO_4 \cdot H_2O$
- Ácido muriático HCL
- Bicarbonato de sodio $NaHCO_3$
- Cloruro de Calcio $CaCl_2$

3.3. Hipótesis de la Investigación

3.3.1. Hipótesis General

Es posible que la inmovilización de *Apergillus niger*, como método de biorremediación, sea viable en la reducción de los efectos negativos ocasionados por derrames de hidrocarburos de petróleo en lo suelos.

3.3.2. Hipótesis Específicas

- Los niveles de contaminación del suelo contaminado son significativos para la población microbiana del suelo.
- La contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo muestra un nivel de pH ligeramente alcalino, contenido de sales minerales altas.
- Las variables del método de biorremediación influyen en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo de petróleo.

3.4. Variables

3.4.1. Variable Independiente

1. Concentración de células inmovilizadas en los pellets (granos) de alginato.
2. Humedad del suelo contaminado.
3. Temperatura del suelo contaminado.
4. pH del suelo contaminado.

5. Período de aplicación del método de biorremediación

3.4.2. Variable Dependiente

1. Concentración de Hidrocarburos Totales de petróleo en el suelo.

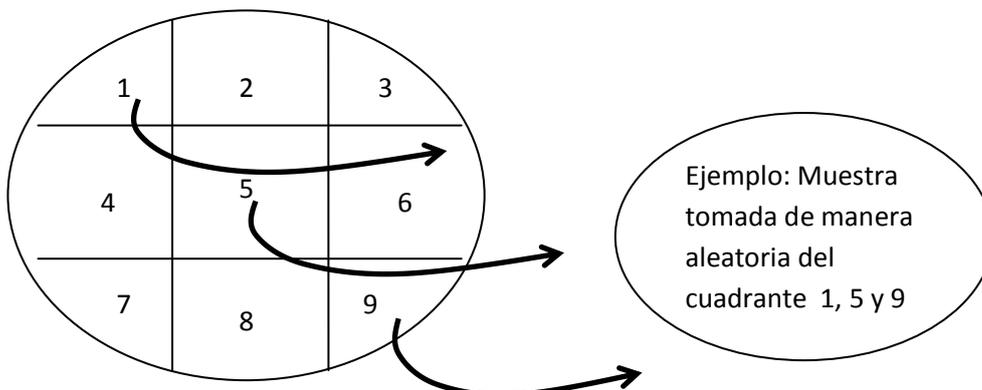
3.5. Cobertura del Estudio.

3.5.1. Población.

La población se determina mediante la toma de 9 muestras de suelo de la Universidad Alas Peruanas ubicada en el distrito de Pachacamac, estas mismas se homogenizaron y se dividieron dentro de una batea de plástico formando 9 cuadrantes, de las cuales se escogieron 3 de manera aleatoria, y se procedieron a ubicar las 3 muestras en 3 bandejas de plásticas.

3.5.2. Muestra

Para determinar la proporción de la muestra se tomó una alícuota del terrario, luego se procedió a homogenizar la alícuota empleando una espátula; la porción se ubica sobre una superficie lisa para dividirla en 9 cuadrantes, de esto 3 porciones se escogen al azar y se vuelve a homogenizar.



Preparación de muestras de suelo para extracción.

Aunque el análisis de hidrocarburos puede hacerse con muestras húmedas se recomienda secarlas y molerlas para obtener muestras más homogéneas. El secado de suelo para la extracción se lleva a cabo de la siguiente forma:

Material:

- Espátula
- Mortero
- Papel aluminio
- Frascos de vidrio de 30 ml
- Equipo para extracción por Soxhlet

Procedimiento:

- Poner a secar la muestra (8-15g de suelo) extendida en un papel aluminio a 30°C, durante 48 horas, en un cuarto de temperatura controlada o a la sombra.
- Moler la muestra en un mortero hasta obtener partículas finas
- Colocar la muestra seca en un frasco seco y limpio.

3.5.3. Muestreo

Extracción de Hidrocarburos por reflujo (Soxhlet)

La extracción Soxhlet es una de las técnicas analíticas más ampliamente usadas, es un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles de sólidos, como suelos, lodos y residuos. Este método asegura el contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción. La extracción de hidrocarburos del petróleo por Soxhlet provee fracciones de C6 a C50. Para la óptima extracción de los compuestos orgánicos, los sólidos deben estar en partículas pequeñas; mientras más pequeñas sean las partículas, más área de superficie y contacto y, por lo tanto, mejor extracción. Así, sólidos de mayor tamaño deben ser reducidos a

pequeñas partículas antes de la extracción. El desarrollo del método de extracción Soxhlet incluye encontrar un solvente o mezclas de solventes que tengan una alta afinidad por lo analíticas y una baja afinidad por la matriz de la muestra sólida. El solvente debe tener una alta volatilidad porque debe ser removida al final de la extracción para concentrar el analito de interés (Weisman, 1998).

Para extraer los hidrocarburos de suelos contaminados se utiliza el método de reflujo con equipos Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994).

Este método consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el suelo, mediante la acción de un solvente orgánico volátil apropiado, que es reflujo a través de la muestra varias veces durante un tiempo determinado. El solvente es evaporado y posteriormente condensado en un refrigerante, se le hace pasar por la muestra y se le regresa al origen para ser nuevamente evaporado. La muestra sólida es mezclada con sulfato de sodio anhídrido para eliminar el agua residual, se le coloca en un dedal o cartucho de papel o fibra de vidrio y se usa un solvente orgánico apropiado para su extracción en un equipo Soxhlet. Mediante los reflujos del solvente y la temperatura se permite el contacto íntimo de la muestra con el solvente de extracción, de esta manera se logra la liberación de los hidrocarburos presentes en la muestra. El extracto orgánico se concentra (si es necesario) o bien se evapora para realizar el intercambio de solvente, acorde con el método de cuantificación.

Extracción de hidrocarburos mediante la 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.

La técnica para la extracción de los hidrocarburos del petróleo del suelo se basa en los métodos 3500B y 3540C de la US EPA (1996) y el reportado por Schwab et al (1999), con algunas modificaciones (Arce et al., 2004) en cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de solvente por utilizar.

Este método se basa en la extracción de hidrocarburos no volátiles y semivolátiles de muestras sólidas (suelo) a través del contacto íntimo de la muestra con el solvente, mediante la agitación en un matraz o tubo (lavado), produciendo un efecto de extracciones sucesivas, y separando posteriormente el solvente del suelo por centrifugación.

3.6. Técnicas e Instrumentos

3.6.1. Técnicas de la Investigación.

Medición de Fracción de Hidrocarburos F1 (C₅ – C₁₀)

EPA 8015 C, Rev. 3, Febrero 2007

Este método se puede usar para determinar las concentraciones de diversos compuestos orgánicos no halogenados volátiles y compuestos orgánicos semivolátiles por cromatografía de gases.

Este método proporciona condiciones cromatográficas de gas para la detección de determinadas compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados.

Las muestras de agua subterránea o de agua superficial en general deben ser analizadas en conjunto con los métodos 5021, 5030, 5031, 5032, 3510, 3520, u otros métodos de preparación adecuados para obtener los límites inferiores de cuantificación necesarios. El método 3535 (extracción en fase sólida) también

puede ser aplicable a algunos de los analitos, sin embargo, este método no ha sido validado por la EPA en conjunción con este método determinante.

Se utiliza un programa apropiado de temperatura en el cromatógrafo de gas para separar los compuestos orgánicos. La detección se consigue mediante un detector de ionización de llama (FID).

Al analizar los compuestos orgánicos volátiles, las muestras pueden ser contaminadas por difusión de compuestos orgánicos volátiles (en particular los clorofluorocarbonos y cloruro de metileno) a través del septo recipiente de la muestra durante el transporte y almacenamiento.

Medición de pH

EPA 9045 D, Rev. 4 2004

Este método es un procedimiento electrométrico para medir el pH en los suelos y muestras de desecho. Los residuos pueden ser sólidos, lodos o líquidos no acuosos. Si el agua está presente, debe constituir menos del 20% del volumen total de la muestra.

La muestra se mezcla con agua de grado reactivo, y se mide el pH de la solución acuosa resultante.

Materiales

- Medidor de pH con medios para la compensación de temperatura.
- Electrodo de vidrio
- Beaker – 50 ml
- Termómetro y/o la temperatura del sensor de compensación automática.
- Balanza analítica

Procedimiento

- Cada sistema de instrumentos/electrodo debe ser calibrado en un mínimo de dos puntos que enmarquen el pH esperado de las muestras y

las cuales son aproximadamente tres unidades de pH o más. Se debe repetir los ajustes en porciones sucesivas de las dos soluciones tampón hasta lecturas que estén dentro de 0,05 unidades de pH del valor.

- En un beaker de 50 ml con 20 gr de suelo, se debe agregar 20 ml de agua con grado reactivo, y remover la suspensión cada 5 minutos.
- Dejar que la suspensión del suelo repose durante aproximadamente 1 hora para permitir que la mayor parte de la arcilla suspendida se establezca fuera de la suspensión de la fase acuosa para la medición de pH.
- Ajuste los electrodos en las mordazas de la pinza portaelectrodos de modo que, tras la reducción de los electrodos en el vaso, el electrodo de vidrio se sumerge simplemente lo suficientemente profundo en la solución para establecer un buen contacto eléctrico a través de la junta de vidrio esmerilado o el agujero en fibra capilar.

Medición de Contenido de Humedad de Suelo

NOM-021-RECNAT-2000, Sección 7.1.5. (AS-05)

7.1.5. La determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría, se realizará a través del método AS-05.

Método gravimétrico para la determinación del contenido de humedad de los suelos, sean estos orgánicos o minerales. El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo. Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seco de la muestra. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquél secado a la estufa a 105°C hasta obtener un peso constante.

Material y equipo

- Botes de aluminio para humedad
- Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada

- Balanza con aproximación de 0.01 g
- Pinzas
- Desecador

Procedimiento

1. Lave y limpie perfectamente e identifique los botes de aluminio a utilizar.
2. Los botes con todo y tapa introdúzcalos a la estufa durante 8 horas como mínimo a una temperatura de 105°C posteriormente registre el peso y vuelva a introducir los botes a la estufa hasta que se logre un peso constante en las muestras, todo este procedimiento previo al enfriamiento de los botes que se colocan en un desecador.
3. Utilizando las pinzas, saque los botes del desecador de vacío hasta que se enfríen y péselos con todo y tapa, éste será el peso del bote (PB).
4. Obtenga la muestra deseada, se recomienda sean de 30 a 50 gramos, aproximadamente, y colóquela en el bote de aluminio, en caso de que la muestra vaya a ser transportada es necesario tapar y sellar herméticamente el bote con parafilm.
5. Pese el bote con el suelo húmedo, este peso deberá ser el peso del bote más el suelo húmedo (PB + Psh).
6. Destape el bote con el suelo húmedo, coloque la tapa en la parte inferior e introdúzcalo a la estufa a una temperatura de 105°C.
7. Después de 24 horas saque el bote de la estufa tápelo y colóquelo en el desecador de vacío hasta que se enfríe, posteriormente pese el bote con la muestra seca, este peso será el peso del bote más el peso del suelo seco (PB + Pss).
8. Vuelva a introducir el bote a la estufa y una hora después sáquelo, enfríe en un desecador y pese; repetir este procedimiento hasta obtener el peso constante.

3.6.2. Instrumentos de la Investigación.

El Instrumento utilizado a utilizar son:

- Tubos de Ensayo
- Placas petri
- Matraz Erlenmeyer
- Autoclave
- Incubadora a 28°C
- Mechero
- Espátulas
- Horno seco
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar (rayos UV)
- Extractor
- Estufa para esterilización
- Estufa para cultivo de bacterias
- Probeta (250 ml)
- Parafilm
- Agitador magnético
- Mortero de porcelana
- Tamiz, 2 mm
- Balde (1.5 Lt capacidad)
- Licuadora

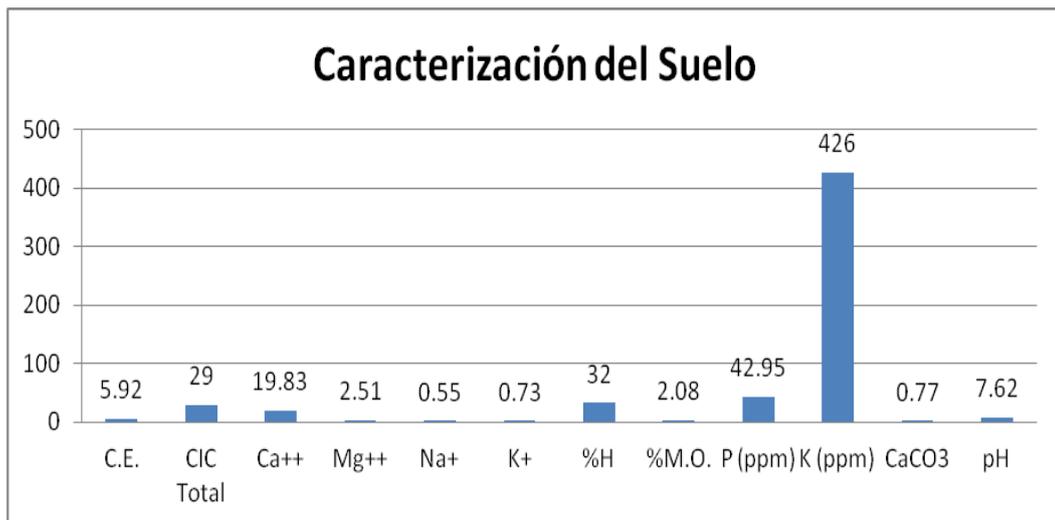
CAPITULO IV

ORGANIZACIÓN, PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Análisis e Interpretación de los Resultados

4.1.1. Caracterización del Suelo

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos de la caracterización del suelo



Fuente: Elaboración propia

4.1.1.1. Determinación de la Conductividad Eléctrica del Suelo

Este análisis se realiza para medir el potencial de transporte de una corriente eléctrica en agua, y determinar la capacidad de los electrones para desplazarse, y si las sales solubles se encuentran en cantidades suficientes como para afectar la germinación de las semillas, la absorción del agua, los resultados se indican en la siguiente Tabla N° 12:

Tabla N° 12: Resultados de la Conductividad Eléctrica del Suelo

C.E. (Sales) Según respuesta de los cultivos (dS/m)		Número de Muestra		CE dS / m Relación 1 : 1
Lab.	Campo	Lab.	Campo	
Muy Ligeramente Salino :	< 2	8738	Suelo	5.92
Ligeramente Salino :	2 – 4			
Moderadamente Salino :	4 – 8			
Fuertemente Salino :	8 – 16			
Extremadamente Salino :	> 16			

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.1.2. Análisis Mecánico del Suelo

Para el análisis mecánico del suelo se realiza las siguientes mediciones que se indican a continuación en la Tabla N° 13.

Tabla N° 13: Resultados del Análisis Mecánico del Suelo

Número de Muestra		Análisis Mecánico			
Lab.	Campo	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura %
8738	Suelo	49.12	35.44	15.44	Franco

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015.

4.1.1.3. Determinación del Contenido de Sales Minerales

El contenido de sales minerales del suelo, se realiza mediante el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica, mediante el cual se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14: Resultados de contenido de sales minerales

Número de Muestra		Cationes Cambiables				
Lab.	Campo	CIC Total	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
		Cmol (+) / Kg				
8738	Suelo	29.00	19.83	2.51	0.55	0.73

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

CIC Efectiva CIC : Capacidad Intercambiable de Cationes	
Muy Baja:	< 5 meq/100 gr
Baja :	5 – 10
Medio :	10 – 15
Alto :	15 – 20
Fuertemente Salino :	> 20

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.1.4. Determinación del Porcentaje de Humedad del Suelo

Para el análisis de porcentaje de humedad del suelo se realiza la siguiente medición que se indica a continuación en la Tabla N° 15.

Tabla N° 15: Resultados de la Humedad del Suelo

Número de Muestra		%H
Lab.	Campo	
8738	Suelo	32.00

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.1.5. Determinación de la Materia Orgánica del suelo

El análisis de cantidad de materia orgánica se realiza mediante el método de Walkley y Black y se obtuvo el siguiente resultado que se indica a continuación en la Tabla N° 16.

Tabla N° 16: Resultados de la Materia Orgánica del Suelo

Clase	Materia Orgánica	Número de Muestra		M.O.
		Lab.	Campo	%
Bajo	< 2 %	8738	Suelo	2.08
Medio	2 – 4 %			
Alto	> 4 %			

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.1.6. Determinación del Contenido de Fósforo, Potasio y Calcáreo total CaCO₃ del suelo

Para el análisis de Fósforo, potasio y calcáreo total del suelo se realiza la siguiente medición que se indica a continuación en la Tabla N° 17.

Tabla N° 17: Resultados de contenido de fósforo, potasio y calcáreo total del suelo

Número de Muestra		P	K	CaCO ₃
Lab.	Campo	ppm	ppm	%
8738	Suelo	42.95	426.00	0.77

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

Clase	Calcáreo Total CaCO ₃	Fósforo P (ppm)	Potasio K (ppm)
Bajo	< 1%	<7%	<100
Medio	1 – 5 %	7 – 14 %	100-240
Alto	> 5%	>14%	<240

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.1.7. Determinación del pH del suelo

Para el análisis de pH del suelo se realiza la siguiente medición que se indica a continuación en la Tabla N° 18.

Tabla N° 18: Determinación del pH del Suelo

Relación del Suelo	
5.1 – 5.5	Fuertemente ácido
5.6 – 6.0	Moderadamente ácido
6.1 – 6.5	Ligeramente ácido
6.6 – 7.3	Neutro
7.4 – 7.8	Ligeramente alcalino
7.9 - 8.4	Moderadamente alcalino

Número de Muestra		pH Relación 1 : 1
Lab.	Campo	
8738	Suelo	7.62

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015

4.1.2. Caracterización de los microorganismos durante el proceso de remediación sobre el suelo contaminado con petróleo

- La población microbiana llegó a su mayor cantidad al finalizar el proceso de remediación (valor elevado se debe a que los microorganismos se encuentran en gran concentración en cada uno de los pellets formados).

Conteo de la Cantidad de U.F.C. (unidades formadoras de colonias)

	Días	U.F.C.
Inicio	1	10^{12} por cada gr. de tierra
Fin	28	10^{22} por cada ml. de pellet

- Debido al tiempo de exposición y al agotamiento de la fuente de carbono que fue extraída por descomposición del hidrocarburo, puesto que inicialmente no había una fuente de carbono en los terrarios, porque de los análisis realizados a la muestra de suelo se obtuvo que no había presencia de carbono
- Siendo el petróleo la única fuente de carbono presente en los terrarios, y como se señala en los resultados de determinación de hidrocarburos de petróleo, los microorganismos utilizaron el petróleo como única fuente de alimento para su crecimiento, por tal razón se obtiene que el petróleo se descompuso a raíz de las reacciones químicas de óxido reducción de los

microorganismos que tiene como finalidad obtener biomasa, dióxido de carbono y agua, elementos que son inocuos en el medio ambiente.

- De los resultados obtenidos en el tratamiento se obtiene que la materia orgánica ya no es inocua para el medio analizado.
- Sin embargo, se indica que por encontrarse los microorganismos inmovilizados, no se pudo identificar el tipo de especie presente en los terrarios.

4.1.3. Variación de los Parámetros pH, Porcentaje de Humedad y Temperatura del suelo contaminado

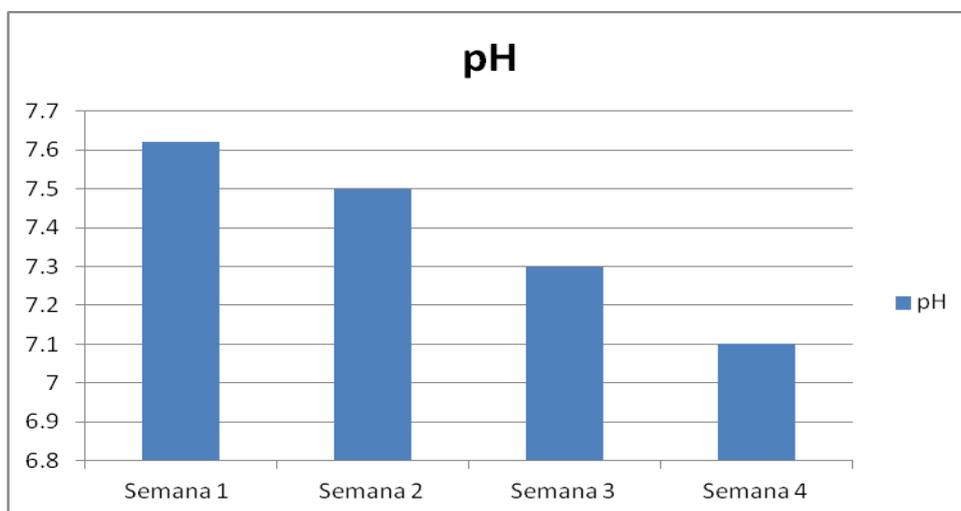
Tabla N°19: Resultados de pH, %H y T° del suelo contaminado

	%H	pH	T°
Semana 1	32	7.62	20.6
Semana 2	30.5	7.5	20
Semana 3	29.4	7.3	19.8
Semana 4	29	7.1	19.2

Fuente: Elaboración Propia

4.1.3.1. Variación del pH en suelo no contaminado

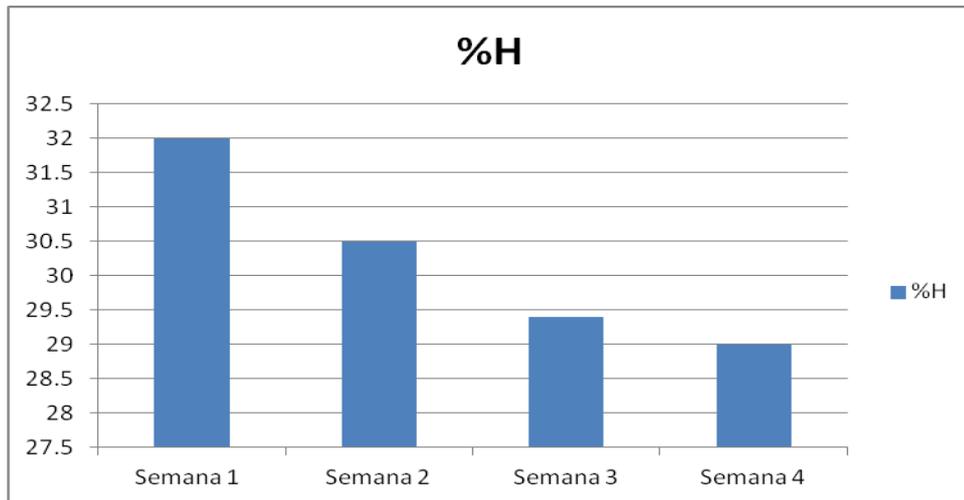
Gráfico N° 1: Variación del pH en suelo no contaminado



Fuente: Elaboración Propia

4.1.3.2. Variación del Porcentaje de Humedad en suelo no contaminado

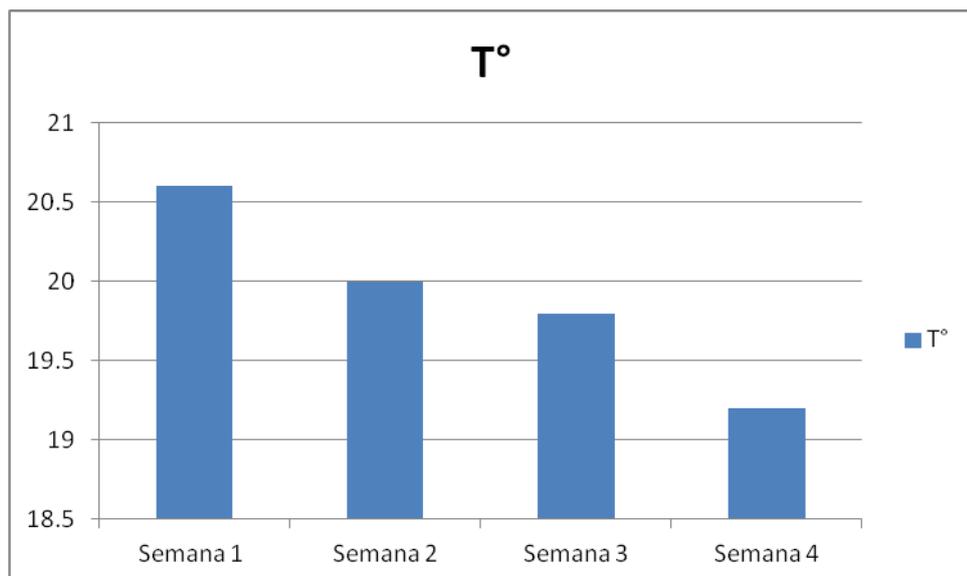
Gráfico N°2: Variación del porcentaje de humedad en suelo no contaminado



Fuente: elaboración propia

4.1.3.3. Variación de la Temperatura en suelo no contaminado

Gráfico N° 3: Variación de la Temperatura en suelo no contaminado



Fuente: elaboración propia

4.1.4. Variación de los Parámetros: pH, Porcentaje de Humedad, Temperatura y HTP (Hidrocarburos Totales de Petróleo) durante el proceso de remediación sobre el suelo contaminado con petróleo

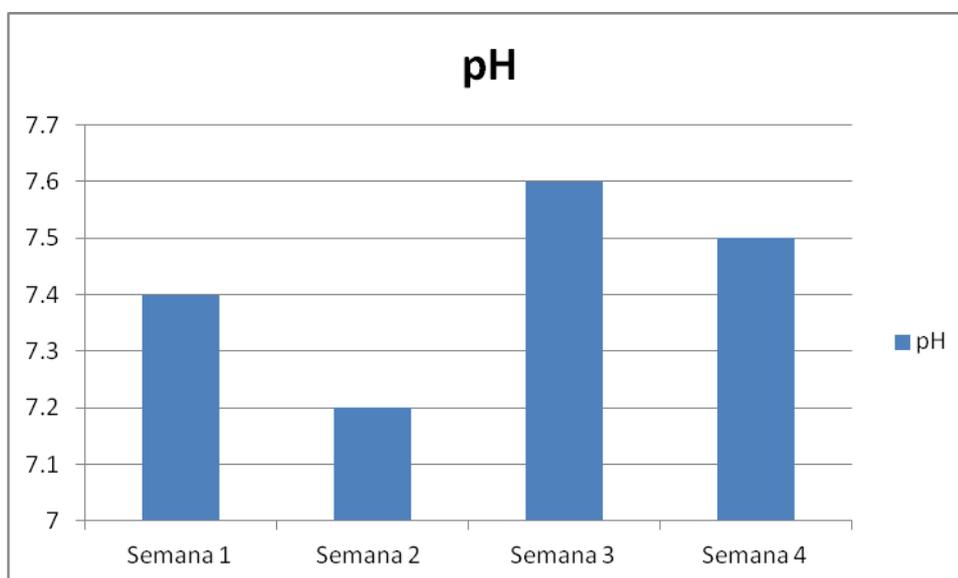
Tabla N° 20: Resultados de pH, %H, T° y HTP durante el proceso de Biorremediación sobre suelo contaminado con petróleo

	HTP (F1) (mg/kg)	%H	pH	T°
Semana 1	12	9.9	7.4	21
Semana 2	0	9.5	7.2	20.6
Semana 3	0	23.1	7.6	21.1
Semana 4	4	22.3	7.5	20.7

Fuente: elaboración propia

4.1.4.1. Variación del pH durante el proceso de remediación

Gráfico N° 4: Variación del pH sobre el suelo contaminado con petróleo



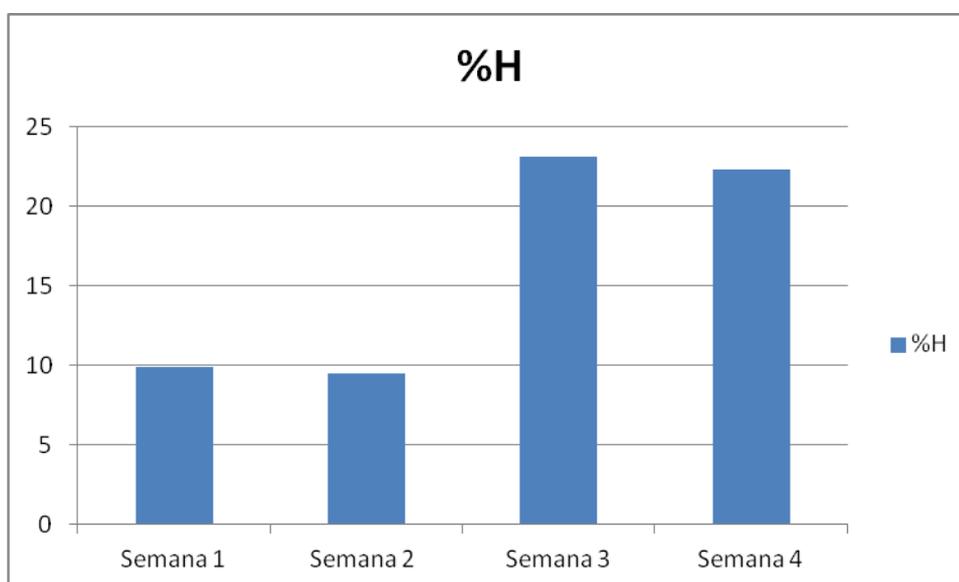
Fuente: elaboración propia

En las muestras de suelo analizadas se encontró el suelo ligeramente alcalinos (pH 7.4 – 7.8), tomando en cuenta que está condición favorece el crecimiento de los microorganismos existentes en el suelo. La variación del pH, puede provenir de la posible conversión del nitrógeno orgánico en amoníaco, el cual al

disolverse en el agua libera iones hidróxidos. Sobre los resultados obtenidos, los microorganismos pueden sobrevivir encargándose de la remediación del suelo contaminado.

4.1.4.2. Variación del Porcentaje de Humedad durante el proceso de remediación

Gráfico N° 5: Variación del Porcentaje de Humedad en suelo contaminado

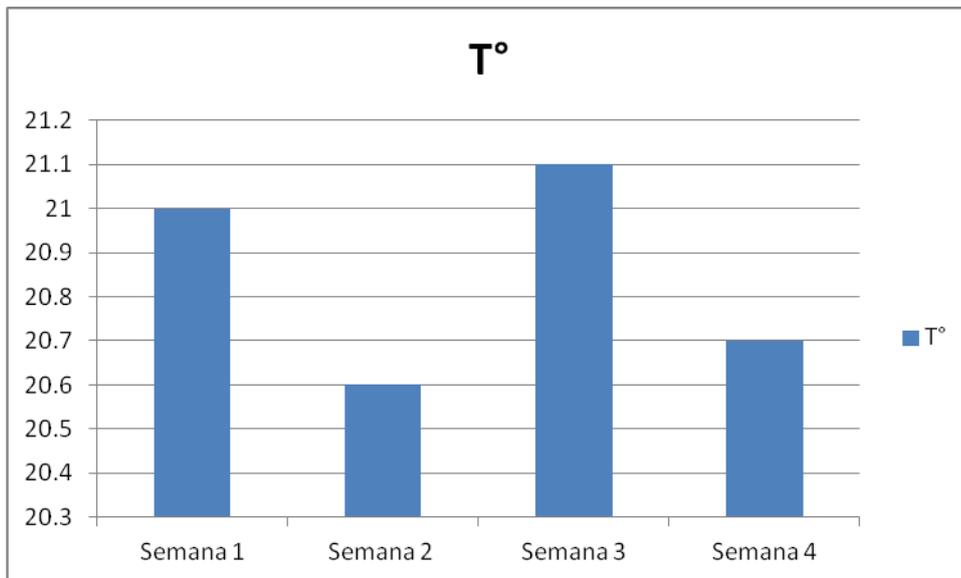


Fuente: elaboración propia

El porcentaje de humedad ha variado hasta alcanzar un máximo de 23%. Esta variación se explica dado que el material polimérico de las macroalgas necesita una gran cantidad de agua, por tener como propiedad principal, que al entrar en contacto con el agua se hinchan formando un material donde los microorganismos se encuentran inmovilizados y que son capaces de degradar los hidrocarburos de petróleo.

4.1.4.3. Variación de la Temperatura durante el proceso de remediación

Gráfico N° 6: Variación de la Temperatura en suelo contaminado



Fuente: elaboración propia

Respecto a la variación de los datos obtenidos del parámetro Temperatura, los resultados del proceso varían entre 20 °C y 21°C, la variación del parámetro puede deberse a la energía que se genera durante la reacción de descomposición de los compuestos del crudo de petróleo.

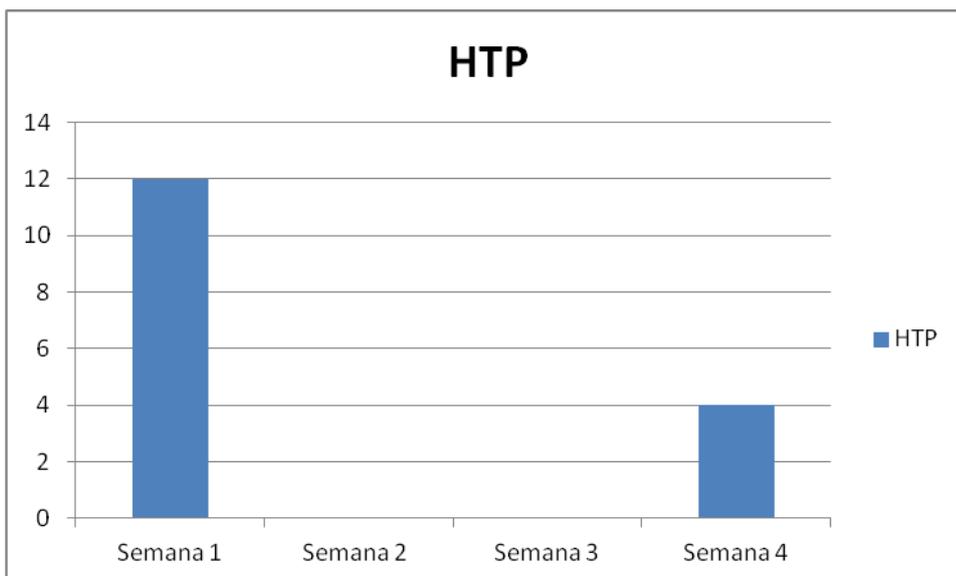
4.1.4.4. Variación de los HTP durante el proceso de remediación

Tabla N°21: Medición de los HTP (Hidrocarburos Totales de Petróleo) antes y después del proceso de biorremediación.

	Antes de la Inmovilización microorganismos	Despuésde la Inmovilización microorganismos
Peso de tierra contaminado (gr)	3000	3000
Peso de petróleo extraído (mg/kg)	12	4

Fuente: elaboración propia

Gráfico N°7: Variación de HTP antes y después del proceso de remediación



Fuente: elaboración propia

Para el proceso de biodegradación ex situ se procedió a armar bandejas de plástico, donde se colocó tierra de suelo no contaminado, sobre el cual se procedió a verter 1 Lt de crudo de petróleo controlado, por un período de 8 días. Lo siguiente fue adicionar una cantidad de células inmovilizadas de *Aspergillus niger*, y mezclarlos sobre el suelo contaminado con crudo de petróleo.

El presente ensayo se realiza con la finalidad de observar la disminución de la concentración de los hidrocarburos de petróleo, durante un período de 28 días- Estos resultados indican que la cantidad de los hidrocarburos de petróleo ha disminuido en un 66.67%.

4.1.5. Análisis Estadístico

Las hipótesis planteadas en la investigación son las siguientes:

H0 = Los niveles de Hidrocarburos totales de petróleo son iguales luego de utilizar la cepa *Aspergillus niger*.

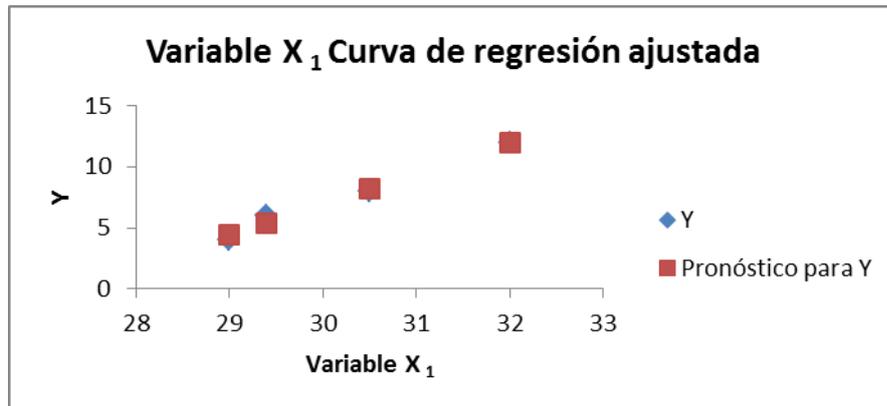
H1 = Los niveles de Hidrocarburos totales de petróleo disminuyeron luego de utilizar la cepa *Aspergillus niger*.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99220261
Coefficiente de determinación R ²	0.984466019
R ² ajustado	0.976699029
Error típico	0.521387246
Observaciones	4

<i>Análisis de varianza</i>					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	34.45631068	34.45631068	126.75	0.00779739
Residuos	2	0.54368932	0.27184466		
Total	3	35			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-68.7961165	6.78187134	-10.14411997	0.009578474	-97.97615374	-39.61607927	-97.97615374	-39.61607927
Variable X 1	2.524271845	0.224213697	11.25833025	0.00779739	1.55955817	3.488985519	1.55955817	3.488985519

<i>Análisis de los residuales</i>		
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
1	11.98058252	0.019417476
2	8.194174757	-0.194174757
3	5.417475728	0.582524272
4	4.40776699	-0.40776699



Si el valor P es menor o igual que el nivel de significancia predeterminado, se rechaza la hipótesis nula, el análisis de la prueba de hipótesis se basa en el valor de la probabilidad P; De acuerdo a los resultados podemos inferir que existe diferencia significativa entre los resultados iniciales y finales de los Hidrocarburos totales de petróleo.

P- value < 0.05 → Se rechaza la Hipótesis nula

De la gráfica se puede observar:

- Cuando la variable independiente disminuye progresivamente, la variable dependiente disminuye drásticamente, dando como resultado un resultado significativo en la aplicación del tratamiento de remediación de suelo contaminado mediante la inmovilización de la cepa *Aspergillus niger*.

CONCLUSIONES

Del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

1. De acuerdo al análisis estadístico realizado se puede concluir que la cantidad de hidrocarburos en el suelo disminuye producto de la técnica utilizada en el experimento (inmovilización de *Aspergillus niger*), se llega a esta conclusión a través del contraste de la hipótesis nula y la hipótesis alternativa, usando como variable de decisión el p-value. En este caso el p-value es menor a 0.05, por tanto se rechaza la hipótesis nula: Los niveles de Hidrocarburos totales de petróleo son iguales luego de utilizar la cepa *Aspergillus Niger*.
2. La variación del contenido de humedad aumentó considerablemente durante el proceso de remediación, brindando las condiciones adecuadas para que la cepa *Aspergillus niger* realice con mayor efectividad la degradación de los HTP.

3. Los resultados del parámetro pH presentan variaciones significativas, lo que permitió el crecimiento de la cepa *A. Niger sp.* y en su función como un actor degradativo.

4. La variación de los resultados de la temperatura tuvo un rol importante en la eficacia de la técnica de remediación, porque facilitó el consumo de energía por parte de la cepa *Aspergillus niger* transformando los compuestos complejos de los hidrocarburos en simples.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente estudio y con el fin de continuar profundizando el estudio respecto a la técnica de remediación utilizada se recomienda lo siguiente:

1. Se recomienda evaluar la viabilidad de la realización del análisis de identificación taxonómica de los microorganismos como parte del experimento, teniendo en cuenta que si bien se ha utilizado la cepa *Aspergillus niger* en el experimento, es posible que durante el desarrollo del mismo, se hayan generado otros microorganismos debido a la exposición de los terrarios a condiciones ambientales no controladas, dichos microorganismos podrían haber tenido algún efecto sobre el suelo contaminado.
2. Se recomienda evaluar en futuras investigaciones, el incremento del número de muestras para tener una mejor representación de la población estudiada. Si bien se han realizado las muestras necesarias para lograr obtener conclusiones rigurosas la potencia del experimento podría ser mayor.
3. Se recomienda desarrollar la técnica de inmovilización de microorganismos por un período mayor al que se encuentra en la

presente investigación y comparar la eficacia del método en función al tiempo remediación, de forma tal que se puedan lograr resultados más robustos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrios San Martín, Y. (2011). *Biorremediación: Una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo*. *Biotecnología Aplicada*, 28(2), 60 - 68.
- Booyjzsen, C. (2007). *Bioremediation of Hydrocarbon Water Pollution by Bioaugmentation using*. Master of Science. University of the Witwatersrand.
- Buddhadasa, S. (2002). *Methodologies for the Analysis of Petroleum Hydrocarbons Extracted from Contaminated Soild* (Doctor of Philosophy). Victoria University of Technology.
- Cabal Álvarez, M. (2009). *Depuración de efluentes contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante carbones activados: Evaluación del Proceso de Adsorción*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Chikere, C., Chijoke Okpokwasili, G., & Ositadinma Chikere, B. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech*, 3(1), 117 - 138.
- Díaz, R. (2011). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Echeverri Jaramillo, G., Manjarrez Paba, G., & Cabrera Ospino, M. (2010). *Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia*. *NOVA - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 8(13), 76 - 86.
- Eramo, A. (2009). *Bioremediation of Diesel Contaminated Soil Using Spent Mushroom Compost (Degree of Master of Scienice)*. The Pennsylvania State University.

- Escalante Guzmán, R. (2002). *Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios*. Magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- García Orbe, N. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por petróleo mediante compostaje con estiércol de porcino y equino*. Título Profesional de Ingeniero Ambiental. Universidad Alas Peruanas.
- Ghazali, F. (2004). *Biodegradation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia* (Doctor of Philosophy). Universiti Putra Malaysia.
- González Villa, T. (2003). *Eliminación de naftaleno en aguas marinas contaminadas por vertidos de crudo de petróleo mediante involucración de bacterias degradadoras* (Título Académico). Departamento de Microbiología Facultad de Farmacia de la USC.
- Hassan Metwaly, H. (1999). *A study of groundwater contamination and bioremediation treatment using natural soil and vegetation* (Doctor of Philosophy). Minia University, Egypt.
- Izquierdo Romero, A. (2013). *Biodegradación de HAP's durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. Doctorado. Universitat de Barcelona.
- Jaya Sheppard, P. (2013). *Impacts of bioremediation strategy on the activity and diversity of hydrocarbonoclastic bacteria in a petrogenic contaminated aquatic system*. Doctor of Philosophy. Royal Melbourne Institute of Technology.
- Karam, Q. (2011). *Toxicity of Kuwait Crude Oil and Dispersed Oil on Selected Marine Fish Species of Kuwait*. PhD on Science. Newcastle University.
- Kauppi, S. (2011). *Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water*. University of Helsinki, Lahiti Finland.

- Largo Pereda, E. (2010). *Degradación de alcanos por células de Alcanivorax Venustenis Inmovilizadas en Hidrogeles Adhesivos y Biodegradables*. Doctorado. Universidad del País Vasco.
- Leal Castillo, M. (2003). *Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz* (Doctor en Ciencias). Universidad de Colima.
- Lin Hou, F. (2000). *Phytoremediation and Bioremediation of Petroleum Contaminated Soils and Wastes* (Doctor of Philosophy). University of Canterbury.
- M. Aburas, M. (2010). *Enhancing Bioremediation of Sandi Desert Soild Polluted with Hydrocarbons* (Ph.D. Thesis). University of Surrey, Guildford.
- Martínez Altamirano, M. (2013). *Remediación de agua contaminada con petróleo utilizado pennisetum clandestinum como bioadsorbente*. Título Profesional de Químico. Universidad Central de Ecuador.
- McGenity, T., Folwell, B., Mckew, b., & Sanni, G. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(10), 1 - 19.
- Medina, J., García, F., & Paricaguán, B. (2014). *Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la Bahía de Amuay del Estado Falcón*. *Revista Ingeniería*, 21(1), 62 - 69.
- Mohamad Ghazali, F. (2004). *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Microbial Consortia*. Degree of Doctor of Philosophy. Universiti Putra Malaysia.
- Myrland, T. (2009). *Temperature dependence of naphthalene biodegradation in seawater (0.5-15°C)* (Master). University of Stavanger.
- Narváez Flórez, S., L. Gómez, M., & M. Martínez, M. (2008). Selección de Bacterias con Capacidad Degradadora de Hidrocarburos Aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. *Instituto De Investigación Marinas Y Costeras - INVEMAR*, 31(1), 61 - 75.

- Okoh, A. (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology And Molecular Biology Review*, 1(2), 38 - 50.
- Oller Alberola, I. (2008). *Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica* (Doctorado). Universidad de Almería.
- Orosco Verdezoto, V., & Soria Guano, M. (2008). *Biorremediación de vegetación contaminada con petróleo por derrames en el campamento Guarumo - Petroproducción* (Título en Biotecnología Ambiental). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Pasaye Anaya, L. (2011). *Biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz* (Magister en Ciencias en Ingeniería Ambiental). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Pons Jiménez, M. (2010). *Extracción de hidrocarburos y compuesto derivados del petróleo en suelos agrícolas de la cuenca baja del río Tonalá* (Magister en Ciencias). Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, México.
- Preston, T. (2011). *Reexamining saline contamination associated with oil and gas development in the Prairie Pothole region* (Master of Science). Montana State University.
- Purswani, J. (2011). *Desarrollo y estudio biológico de un sistema de bajo costo para el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con compuestos oxigenantes de gasolinas: MTBE, ETBE y TAME* (Doctorado). Universidad de Granada.
- Ran, X. (2004). *Bioremediation of Petroleum Contaminated Beach Sediments in Singapore*. Doctor of Philosophy. National University of Singapore.

- Samanez Gibaja, E. (2008). *Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo*. Magister en Biotecnología. Universidad Nacional de San Marcos.
- Serna Murillo, J. (2008). *Investigación sobre acondicionamiento ambiental y sostenibilidad en las prospecciones petrolíferas*. Título Ingeniero Ambiental. Universidad Politécnica de Madrid.
- Singh, T. (2011). *Removal of petroleum hydrocarbons by using microbial mats* (Master of Technology). National Institute of Technology.
- Torres Delgado, K., & Zulugaga Montoya, T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos* (Título de Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia.
- Ur Rehman, F. (2011). *Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Soil Bacteria* (Doctor of Philosophy in Microbiology). Department of Microbiology Quaid-i-Azam University.
- Yagnetkowsky, N. (2011). *Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados* (Doctorado). Universidad Nacional de la Plata.
- Yee Kin, M. (2001). *The Potential for Bioremediation Hong Kong Waters*. Master of Science. University of Hong Kong.
- Zhang, B., Zhu, Z., Jing, L., Cai, Q., & Li, Z. (2012). *Pilot-scale demonstration of biosurfactant-enhanced-In situ bioremediation of a contaminated site in Newfoundland and Labrador*. The Harris Centre, Memorial University of Newfoundland.
- Zajonskovsky, Irene E. (2006). *Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Doctorado) Universidad Nacional de Comahue.

ANEXOS

ANEXO I: Matriz de Consistencia

Título: Tratamiento de suelo contaminado por vertidos de crudo de petróleo mediante la inmovilización de células *Aspergillus Niger sp.*

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables	Indicadores	Métodos	Técnicas	Instrumentos
Problema Principal	Objetivo General	Hipótesis General	Definición/Conceptualización				
¿En qué medida la inmovilización de <i>Aspergillus niger</i> , como método de biorremediación, reduce los efectos negativos ocasionados por el derrame de hidrocarburos de petróleo en los suelos?	Comprobar la viabilidad de la inmovilización de <i>Aspergillus niger</i> , como método de biorremediación, en la reducción de los efectos negativos ocasionados por derrames de hidrocarburos de petróleo en los suelos.	Es posible que la inmovilización de <i>Aspergillus niger</i> , como método de biorremediación, sea viable en la reducción de los efectos negativos ocasionados por derrames de hidrocarburos de petróleo en los suelos.	<p>Dependiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Concentración de Hidrocarburos Totales de petróleo en el suelo. <p>Independiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Concentración de células inmovilizadas en los pellets (granos) de alginato. 2. Humedad del suelo contaminado. 3. Temperatura del suelo contaminado. 4. pH del suelo contaminado. 5. Período de aplicación del método de biorremediación 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de Hidrocarburos totales de petróleo medidos en gramos de petróleo por kg de tierra - Porcentaje de Humedad - pH - Temperatura - Contenido de Sales Minerales - Materia Orgánica - Textura - pH - Conductividad Eléctrica - Contenido de Fósforo - Cantidad de células inmovilizadas 	<p><u>Tipo de Investigación:</u> Experimental</p> <p><u>Nivel de Investigación:</u> Aplicada</p> <p><u>Diseño de la Investigación:</u> Tipo Correlacional</p>	<ul style="list-style-type: none"> - EPA 8015 C, Rev. 3, Febrero 2007 - EPA 905 D, Rev. 4 2004 - NOM-021-RECNAT-2000 Sección 7.1.5 (AS-05) - Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica. - Método de Walkley y Black % MO = %C x 1,724 - Método de Hidrómetro - Método de potenciómetros - Método de Olsen Modificado 	<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave - Encubadora a 28°C - Mechero - Algodón - Papel kraft - Pavilo - Espatulas - Horno seco - Balanza - Campana de flujo laminar - Extractor - Probeta - Agar Saboured - Parafilm - Agitador magentico - Agua destilada - Tubos de ensayo - Placa petris - Matraz de boca ancha - Tubo de ensayo
Problema Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas					
¿Cuáles son los niveles de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo?	Determinar los niveles de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo.	Los niveles de contaminación del suelo contaminado son significativos para la población microbiana del suelo.					
¿Cuáles son los tipos de contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo?	Caracterizar la contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo.	La contaminación del suelo ocasionado por derrame de crudo de petróleo muestra un nivel de pH ligeramente alcalino, contenido de sales minerales altas.					
¿Cómo influyen las variables del método de biorremediación en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo de petróleo?	Determinar cómo influyen las variables en el método de biorremediación en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo de petróleo.	Las variables del método de biorremediación influyen en la reducción de los efectos negativos de los derrames de crudo de petróleo.					

ANEXO II: Histórico de derrames en el Perú y en el Mundo.

Derrames en el Perú (hasta el 2014)

AÑO	DEPARTAMENTO	LUGAR	RESPONSABLE
1995	Lima	Playa Conchán	Petroperú
2000		Terminal Salaverry	GMP S.A. Oil Tanking S.A.C.
2001	Chiclayo	Puerto Eten	Petroperú
	Talara	Punta Arenas	Petroperú
	Loreto	Lote 192	Pluspetrol
2002	Talara	Estación Tanque PTS	Petrotech
2004	Cajamarca	Río Jequetepeque	Yanacocha
	Loreto	Río Marañón	Pluspetrol
2005	Lima	Refinería Conchán	Marina de Guerra del Perú
2006	Callao	Muelle de Pescadores	Buque Tanque Sebastián
2007	Talara	Cabo Hellas	Petroperú
	Amazonas	Bagua	Oleoducto Nor-Peruano
	Callao	Buque Lydia Oldendorff	Empresa Nacional de Puertos del Perú (ENAPU)
	Selva Peruana	Río Corrientes (FECONACO)	Pluspetrol
2008	Ilo	Torata	Camión Boliviano
	Tumbes	Plataforma Corvina Lote Z-1	BPZ Energy
	La Libertad	Sembrío del Caserío de Plaza Pampa	Primax
	Selva Peruana	Río Corrientes (FECONACO)	Pluspetrol
2009	Amazonas	Barrio Florido	Petroperú
	Piura	Lote Z-2B	Petrotech
	Talara	Barco de la Marina de Guerra del Perú	Petroperú
	Pucallpa	Oleoducto	Maple
	Loreto	Río Itaya	Grifo Flotante
	Selva Peruana	Río Corrientes (FECONACO)	Pluspetrol
2010	Talara	Lote Z-2B	Savia del Perú (Ex Petrotech)
	Ica	Pisco	Consorcio Terminales Camisea (GMP)
	Talara	Cargador "Kodiak Island"	IMI S.A.C.
	Talara	Línea de manga slog	Petroperú
	Carretera de Cajamarca a Hualgayoc	Río Pabellón	Norte Medio S.R.L.
	Amazonas	Río Marañón	Pluspetrol
2013	Amazonía	Río Napa	Sistema Oleoducto Transecuatoriano
	Piura	Costas de playas Punta Lobos	Savia
	Loreto (Lote 8X)	Reserva Nacional Pacaya Samiria	Pluspetrol
	Bagua- Amazonas	Kilómetro 504 Tramo II del Oleoducto Nor-Peruano	Petroperú
2014	Tumbes	Plataforma Corvina CX-11 Lote Z-1	BPZ Exploración & Producción

Extraído de www.mundoazul.org

Fuente: Elaboración propia

Derrames a nivel mundial (hasta el 2007)

Posición	Barco	Año	Locación	Tamaño derrame (toneladas)
1	Atlantic Empress	1979	Off Tobajo, West Indies	287,000
2	ABT Summer	1991	700 nautical miles off Angola	260,00
3	Castillo de Believer	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252,000
4	Amoco Cadiz	1978	Off Brittany, France	223,000
5	Haven	1991	Genoa, Italy	144,000
6	Odyssey	1988	700 nautical miles of Nova Scotia, Canada	132,000
7	Torrey Canyon	1967	Scilly Isles, UK	199,000
8	Sea Star	1972	Gulf of Oman	115,000
9	Irenes Serenade	1980	Navarino Bay, Greece	100,000
10	Urquiola	1976	La Coruna, Spain	100,000
11	Hawaiian Patriot	1977	300 nautical miles off Honolulu	95,000
12	Independent	1979	Bosphorus, Turkey	94,000
13	Jakob Maersk	1975	Oporto, Portugal	88,000
14	Braer	1993	Shetland Islands, UK	85,000
15	Aegean Sea	1992	La Coruna, Spain	74,000
16	Sea Empress	1996	Milford Haven, UK	72,000
17	Khark 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	70,000
18	Nova	1985	Off Kharg Island, Gulf of Iran	70,000
19	Katina P	1992	Off Maputo, Mozambique	67,000
20	Prestige	2002	Off Galicia, Spain	63,000
35	Exxon Valdez	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37,000
131	Hebei Spirit	2007	Taeon, Republic of Korea	11,000

Fuente: The International tanker owner's pollution federation limited, 2015.

Elaboración: Propi

ANEXO III: Resultados de laboratorio del suelo no contaminado



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH

LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO

Av. La Molina s/n. Telefex: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fa@lamolina.edu.pe



Nº 008738

ANÁLISIS DE SUELO - CARACTERIZACIÓN

SOLICITANTE : LOURDES CYNTHIA VALLADARES ROBLES
 PROCEDENCIA : LIMA
 RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
 FECHA DE ANALISIS : La Molina, 02 de Diciembre del 2015

Número de muestra	CE	Análisis Mecánico				pH	M.O. %	P ppm	K ppm	CaCO ₃ %	Cationes Cambiables						
		ds / m Relación 1:1	Arena %	Limo %	Arcilla %						Textura	Relación 1:1	CIC total	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
8738	5.92		49.12	35.44	15.44	Franco	7.62	2.08	42.95	426.00	0.77	29.00	19.83	2.51	0.55	0.73	

Número de muestra		% H
Lab.	Campo	
8738	Suelo	32.00

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y SUELO
 ING. ANTONIO ENRICO GUTIERREZ
 JEFE DE LABORATORIO



MÉTODOS SEGUIDOS EN EL ANÁLISIS

1. Análisis Mecánico: Textura por el Método de Hidrómetro.
2. Conductividad eléctrica: C. E. Lectura de extracto de relación suelo agua 1:1 y extracto de la pasta saturada.
3. pH. Método de potenciómetro, relación suelo-agua 1:1 y en la pasta saturada.
4. Calceño total: Método gaso-volumétrico.
5. Materia orgánica: Método de Walkley y Black % M.O. = %C x 1,724
6. Nitrogeno total: Método Micro Kjeldahl.
7. Fósforo: Método de Olson Modificado, Extracto, NaHCO_3 0.5M, pH = 8.5
8. Potasio Disponible: Extracto Acetato de Amonio 1N, pH 7,0
9. Capacidad de Intercambio Catiónico: Acetato de Amonio 1N pH 7,0
10. Cambiables: Determinaciones en extracto Amónico.
 - Ca^{2+} : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - Mg^{2+} : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - K^+ : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - Na^+ : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
11. Iones Solubles
 - a. Cationes Solubles:
 - Ca^{2+} : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - Mg^{2+} : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - K^+ : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - Na^+ : Espectrofotometría de Absorción Atómica.
 - b. Aniones Solubles:
 - Cl^- : Volumétrico; Nitrato de Plata.
 - CO_3^{2-} : Volumétrico; Ácido Clorhídrico.
 - HCO_3^- : Volumétrico; Ácido Clorhídrico.
 - SO_4^{2-} : Turbidimétrico; Sulfato de Bario.
 - NO_3^- : Colorimétrico.
12. Yeso Soluble: Solubilización con agua y precipitación con acetona.
13. Boro Soluble: Colorimétrico, Método de la Curcumina.

INTERPRETACIÓN

C.E. (Sales)
Según respuesta de los cultivos
(ds/m)

Muy ligeramente Salino : < 2
Ligeramente Salino : 2 - 4
Moderadamente Salino : 4 - 8
Fuertemente Salino : 8 - 16
Extremadamente Salino : > 16

DISPONIBLES

Clase	Materia Orgánica	Calceño Total $\text{CaCO}_3\%$	Fósforo P (ppm)	Potasio K (ppm)
Bajo	< 2%	< 1%	< 7%	< 100
Medio	2 - 4%	1 - 5%	7 - 14%	100 - 240
Alto	> 4%	> 5%	> 14%	> 240

CIC Efectiva

< 5 meq/100 gr	Muy baja
5 - 10	Baja
10 - 15	Medio
15 - 20	Alto
> 20	Muy alto

Reacción del Suelo (pH)

5.1 - 5.5 Fuertemente ácido.
5.6 - 6.0 Moderadamente ácido.
6.1 - 6.5 Ligeramente ácido.
6.6 - 7.3 Neutro.
7.4 - 7.8 Ligeramente alcalino.
7.9 - 8.4 Moderadamente alcalino.

EQUIVALENCIAS

1 mmhos/cm = 1 ds/m
1 cmol(+)kg = 1 meq/100gr

* CIC: Capacidad Intercambiable de Cationes.

**ANEXO IV: Resultados de laboratorio de temperatura, pH,
porcentaje de humedad, Fracción de Hidrocarburos F1 (C₅ –
C₁₀)**



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE - 031



INSPECTORATE

Registro N° LE - 031

Pág. 01/1

INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL No. 111624L/15-MA

Cliente : LOURDES CYNTHIA VALLADARES ROBLES
Dirección : AL ENRIQUE VILLAR NRO 445 LIMA- LIMA - LIMA
 Lima
Producto : Suelos
Número de muestras : 3
Presentación de las muestras : Frascos de vidrio y plástico proporcionados por Inspectorate Services Perú S.A.C.
Procedencia de la muestra : Muestras enviadas por el cliente indicando fecha de muestreo: 2015-11-23; 11:30
Referencia del Cliente : Estudio de Suelo - Lima
Fecha de Recepción de las muestras : 2015-11-20
Fecha de Inicio de Análisis : 2015-11-20
Fecha de Término de Análisis : 2015-11-30
Solicitud de Servicio : S/S 004087-15-LMA
Orden de Servicio : O/S 011063-15-LMA

Código de Laboratorio	Descripción de Muestra	Fracción de Hidrocarburos F1 (C5-C10)	pH	Humedad (*)
Declarado por el Cliente		mg/kg	Unidades de pH	%
09272-36092	Pachca	11,54	7,4	9,9
	Límite de Cuantificación	6,00	-	-

Métodos de ensayo:

Fracción de Hidrocarburos F1 (C5-C10) : EPA 8015 C, Rev. 3, Febrero, 2007. Nonhalogenated Organics By Gas Chromatography.
pH : EPA 9045D Rev4, 2004. Soil and Waste Ph.
(*)Humedad : NTP-ISO 287/2001

Las muestras ingresaron al Laboratorio, en cooler.

El Informe de Control de Calidad les será proporcionado a su solicitud.

(*) Los métodos indicados no han sido acreditados por INACAL-DA.
 Callao, 30 de Noviembre del 2015

Inspectorate Services Perú S.A.C.
 A Bureau Veritas Group Company

(Firma)
QUIM. LUIS A. ZEGARRA RUIZ
 C.Q.P. 1112
 LABORATORIO MEDIO AMBIENTE

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin autorización de Inspectorate Services Perú S.A.C.

Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.

No deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

«Valor» significa el cuantificable debajo del límite de cuantificación indicado.

A excepción de los productos perecibles los tiempos de custodia dependerán del laboratorio que realice el análisis.

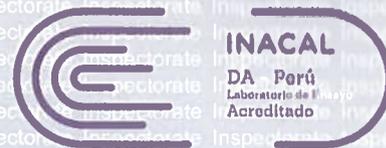
Este tiempo variará desde 7 días hasta 6 meses como máximo.

TÉRMINOS Y CONDICIONES GENERALES

- A menos que esté específicamente acordado por escrito, Inspectorate Services Perú SAC, de ahora en adelante, llamado "LA COMPAÑÍA", realiza servicios de acuerdo con estos "Términos y Condiciones Generales" y consecuentemente, todas las ofertas o cotizaciones de servicios, estarán sujetas a estas Condiciones Generales, así como también todos los contratos, acuerdos y arreglos. Estas Condiciones Generales están reguladas por el artículo 1764 y siguiente, del Código Civil de la República Peruana.
- LA COMPAÑÍA es una empresa dedicada a prestar servicios de inspección y análisis tales como:
 - Servicios básicos como los descritos en la condición número 6.
 - Prestación servicios especiales, aceptados por LA COMPAÑÍA según lo indicado en la condición número 7.
 - Expedir reporte y/o certificados según lo indicado en la condición número 8.
- LA COMPAÑÍA actúa para la persona o instituciones de quienes las instrucciones para ejecutar el servicio han sido recibidas (de ahora en adelante llamado EL CONTRATANTE). Ningún individuo o institución tiene derecho a dar instrucciones, particularmente con respecto al alcance de un servicio dado o al envío de reportes o certificados, a menos que sea autorizado por EL CONTRATANTE y aceptado por LA COMPAÑÍA. Sin embargo, LA COMPAÑÍA será considerada como autorizada irrevocablemente enviar a su discreción, los reportes o certificados a terceras personas, si se encuentra siguiendo instrucciones de EL CONTRATANTE.
- LA COMPAÑÍA suministrará sus servicios de acuerdo con:
 - Instrucciones específicas del contratante y confirmadas por LA COMPAÑÍA
 - Los términos del formato estándar de orden de servicios de LA COMPAÑÍA.
 - Las prácticas comunes de comercio, uso y manejo.
 - Los métodos que LA COMPAÑÍA pueda considerar apropiados en los campos técnicos, operacionales y/o financieros.
- Todas las preguntas y ordenes por parte del EL CONTRATANTE de servicios deben estar acompañadas de suficiente información, especificaciones e instrucciones que le permitan a LA COMPAÑÍA evaluar y/o realizar los servicios requeridos.
- Documentos que reflejen contratos entre EL CONTRATANTE y terceras personas, o documentos de terceras personas, tales como copias de contratos de venta, nota de crédito, conocimientos de embarque, etc., son considerados (si son recibidos por LA COMPAÑÍA) solamente como informativos, sin extender o restringir los compromisos aceptados por LA COMPAÑÍA.
- Los servicios estándares de LA COMPAÑÍA pueden incluir todos o algunos de los mencionados a continuación:
 - Inspección cualitativa o cuantitativa.
 - Inspección de bienes, plantas, equipos, empaquetado, tanques, contenedores y medios de transporte.
 - Inspección de carga y descarga.
 - Muestreo.
 - Análisis en el laboratorio u otro tipo de prueba.
 - Estudios y auditorías
- Servicios especiales: cuando los mismos exceden el campo de servicios estándares referidos en la condición número 6, serán reforzados por LA COMPAÑÍA, mediante acuerdos particulares. Los siguientes servicios especiales son ilustrativos y no excluyentes:
 - Garantías cualitativas o cuantitativas.
 - Calibración de tanques, calibración métrica o mediciones
 - Provisión de técnicos o algún otro personal.
 - Inspecciones pre-embarque bajo regulaciones gubernamentales de importaciones o aduanas.
 - Supervisión de proyectos industriales completos, incluyendo ingeniería y reportes de progreso.
 - Servicios de Consultoría.
- Sujeto a las instrucciones de EL CONTRATANTE y aceptadas por LA COMPAÑÍA, esta última emitirá reportes y certificados del servicio realizado los cuales incluirán opiniones emitidas en el marco de las limitaciones de las instrucciones recibidas. LA COMPAÑÍA, no está en obligación de referirse o reportar acerca de cualquier hecho o circunstancia fuera de estas instrucciones específicas recibidas.
- Los reportes o certificados emitidos a partir de pruebas o análisis realizados a "muestras articulares", contienen las opiniones específicas de LA COMPAÑÍA de dichas muestras, y no expresan una opinión con respecto al total (lote) del material de donde estas fueron obtenidas. Si se requiere una opinión acerca del material completo, se deberá coordinar en forma anticipada con LA COMPAÑÍA, la inspección y toma de muestras del total del material.
- Obligaciones de EL CONTRATANTE:
 - Asegurarse que las instrucciones dadas a LA COMPAÑÍA contengan la suficiente información y sean suministradas oportunamente, para disponer que los servicios requeridos sean realizados efectivamente.
 - Procurará todo el acceso necesario a los representantes de LA COMPAÑÍA, para así permitir asegurar que todos los servicios sean realizados en forma efectiva.
 - Suministrar, si es necesario, equipos especiales o personal para la realización de los servicios requeridos.
 - Se asegurará que sean tomadas todas las medidas necesarias para la seguridad de las condiciones de trabajo e instalaciones, durante el desarrollo de los servicios y no se limitará solamente a atender las sugerencias de LA COMPAÑÍA en este respecto, sean o no solicitadas.
 - Tomar todas las acciones necesarias para eliminar o resolver obstrucciones o interrupciones en la realización de los servicios contratados.
 - Informar con anticipación a LA COMPAÑÍA acerca de riesgos o peligros conocidos, actuales o potenciales, relacionados con alguna instrucción e muestreo o análisis, incluyendo por ejemplo, la presencia de riesgo por radiación, elementos tóxicos, nocivos o explosivos, venenos o contaminación ambiental.
 - Ejercer todos sus derechos y liberarse de todas sus obligaciones con respecto a algún contrato en particular, independientemente de si se han emitido reportes o no; debido al incumplimiento de LA COMPAÑÍA, en alguna de sus obligaciones.
 - Puede permitir a LA COMPAÑÍA delegar a su discreción la realización del trabajo para el cual fue contratada, en forma completa o parcial a cualquier agente o subcontratista.
 - Todos los técnicos y otro personal proporcionados por la Compañía en el ejercicio de cualquiera de los servicios siempre y en todo momento serán los empleados, agentes o subcontratista (Como puede ser el caso) de la Compañía como tal, todas esas personas serán responsables y sujeto a las instrucciones de la compañía en todo momento. Salvo acuerdo en contrario de la Compañía, estas personas no estarán obligados a seguir todas las instrucciones del CONTRATANTE.
 - Si los requerimientos de EL CONTRATANTE exigen el análisis de muestras por parte de EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA emitirá los resultados pero sin responsabilidad por la exactitud de los mismos. Del mismo modo, cuando LA COMPAÑÍA solo actúe como testigo en la realización de análisis por EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA dará confirmación de que la muestra correcta fue analizada, pero no tendrá ningún responsabilidad sobre la exactitud de los resultados.
 - Debido a la posibilidad de estratificación de algunas cargas y/o las limitaciones impuestas a nosotros por cerradas o restringidas sistemas de toma de muestras, la compañía no puede garantizar que estas muestras son representativas de la carga o a bordo o los resultados de las pruebas obtenidos e informó sobre nuestros certificados de calidad son representativas de dicha carga.
 - LA COMPAÑÍA tomará el debido cuidado y buena práctica en la realización de sus servicios y aceptará responsabilidad solo cuando tales cuidados y prácticas no hayan sido ejecutados y se pruebe algún, tipo de negligencia por parte de LA COMPAÑÍA.
 - La responsabilidad de LA COMPAÑÍA respecto a quejas por pérdidas, daños a los bienes de cualquier naturaleza, ocurridas en cualquier momento, debido a cualquier infracción al contrato o alguna falla en el cuidado y buena práctica por parte de LA COMPAÑÍA, no deberá en ninguna circunstancia exceder 10 (diez) veces la tarifa o cantidad pagable con respecto al servicio específico requerido, el cual a su vez está bajo un contrato en particular con LA COMPAÑÍA, que da lugar a las reclamaciones en cuestión. Sin embargo, LA COMPAÑÍA no tendrá responsabilidad con respecto a cualquier reclamo por pérdida indirecta o consecuente, incluyendo pérdidas de ganancias y/o negocios futuros y/o producción y/o cancelación de contratos en los cuales participa EL CONTRATANTE. En el caso que la tarifa o cantidad a pagar por servicio, se refiera a un grupo de servicios y el reclamo se sucede con respecto a uno de dichos servicios de la tarifa deberá ser indicada, para el propósito de este numeral, mediante referencia al tiempo total involucrado en el desarrollo de cada servicio.
 - El límite de responsabilidad de LA COMPAÑÍA bajo los términos de la condición número 14.2, puede ser aumentado por solicitud recibida con anterioridad a la ejecución de un servicio o como acuerdo por el pago de una tarifa más alta, equivalente a una fracción adecuada del incremento de la compensación.
 - Todas las garantías, condiciones y otros términos implícitos por la ley o de derecho común son, en la máxima medida permitida por la ley, excluidas de las presentes Condiciones Generales.
 - Nada de lo dispuesto en estas Condiciones Generales, limite o excluya a la responsabilidad de la Empresa:
 - En caso de muerte o lesiones personales resultantes de negligencia, o
 - De cualquier daño o responsabilidad incurrida por el principal como resultado de fraude o tergiversación fraudulenta por la compañía, o
 - De cualquier responsabilidad que no puede ser restringida o excluida por la ley.
 - Esta condición 14 establece la totalidad de la responsabilidad financiera de la Compañía (incluyendo cualquier responsabilidad por los actos u omisiones de sus empleados, agentes y sub-contratistas) a la principal con respecto a cualquier incumplimiento de estas Condiciones Generales, cualquier uso que se haga por el director de los servicios y toda representación, declaración o acto delictivo u omisión (incluyendo negligencia) que surjan en relación con estas Condiciones Generales.
 - EL CONTRATANTE podrá garantizar que protegerá o indemnizará a LA COMPAÑÍA y sus representantes, empleados, agentes o sub-contratistas, frente a todos los reclamos hechos por terceros respecto a pérdidas, costos por daños de cualquier naturaleza debido a reclamos o cualquier otra circunstancia relacionada con el desarrollo, intención de desarrollar o no desarrollo, de cualquier servicio, que exceda lo estipulado, según la condición número 14.
 - Cada empleada, agente o subcontratista de LA COMPAÑÍA, podrá tener el beneficio de las limitaciones de compensación o indemnización contenidas en estas Condiciones Generales y en consecuencia en los que a tales limitaciones respecta, cualquier contrato asumido por LA COMPAÑÍA es asumido no solos en su propio beneficio, sino también como agente y garante de las personas aquí mencionadas.
 - En el evento que surja cualquier problema o costo imprevisto durante la ejecución de algún servicio contratado, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada para realizar cobros adicionales para cubrir los costos para cubrir tiempo de trabajo adicional y gastos en los que necesariamente se incurra para cumplir con el Servicio
 - 18.1 EL CONTRATANTE pagará puntualmente en un plazo no mayor de 30 (treinta) días después de la fecha de emisión de la factura o dentro de cualquier otro plazo que halla sido acordado por escrito con LA COMPAÑÍA, todos los respectivos cargos hechos por LA COMPAÑÍA. El no cumplimiento del plazo acarreará el pago de intereses a razón de 15% anual a partir de la fecha de emisión de la factura hasta la fecha de pago más los gastos e impuestos producto de la demanda.
 - 18.2 Todos los precios y las tasas debidas en virtud de las presentes Condiciones Generales, a menos que la compañía confirme por escrito, ser exclusiva de ningún valor añadido o impuesto sobre las ventas que se cobrará en adición a la tasa vigente que corresponda.
 - 18.3 EL CONTRATANTE no está autorizado para retener o diferir el pago de cualquier suma que se le adeude a LA COMPAÑÍA, aduciendo alguna disputa o reclamos que pueda alegar en contra de LA COMPAÑÍA.
 - 18.4 En el caso de cualquier suspensión de los compromisos de pago con acreedores, quiebra, liquidez, embargo o cesación de actividades por parte de EL CONTRATANTE, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada automáticamente para suspender el desarrollo de sus servicios y sin responsabilidad alguna.
 - 19 En el caso que LA COMPAÑÍA sea prevenida, por alguna causa fuera de su control de efectuar o completar algún servicio acordado, EL CONTRATANTE pagará a LA COMPAÑÍA:
 - Costos realizados o aún por hacer con el objeto de poder detener los trabajos.
 - Una porción de la tarifa acordada equivalente a la proporción del servicio efectivamente realizado, quedando LA COMPAÑÍA dispensada de toda responsabilidad en absoluto, por la parcial o total no ejecución del servicio.
 20. LA COMPAÑÍA podrá ser dispensada de toda responsabilidad con EL CONTRATANTE, por reclamos de pérdidas o costos por daños dentro de los seis meses subsiguientes a la ejecución por parte de LA COMPAÑÍA de los servicios que dan lugar al reclamo, a menos que se estable una demanda o en caso se alegue la no ejecución de algún servicio, si no es durante los seis meses subsiguientes a fecha en que el servicio debió haber sido ejecutado.
 21. Sin perjuicio de cualesquiera otros derechos o recursos que puede tener, la Compañía puede terminar cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales, sin que la principal responsabilidad de dar aviso de inmediato a la principal sí:
 - Principal comete un incumplimiento sustancial de cualquiera de los términos de estas Condiciones Generales y (si esa violación es remediable) no remedia dicho incumplimiento dentro de los 30 días de la principal que se notificará por escrito de la violación, o
 - se hace un pedido o se aprueba una resolución para la liquidación de la principal, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente para hacer una disolución de la principal
 - se hace una orden, o los documentos que se presentan en un tribunal de jurisdicción competente, para el nombramiento de un administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o
 - se nombra un receptor de cualquiera de los principales activos o empresa, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente o un acreedor de nombrar a un síndico o administrador de la principal, o
 - 21.5 principal hace cualquier acuerdo o convenio con sus acreedores, o hace una solicitud a un tribunal de jurisdicción competente para la protección de sus acreedores en forma alguna, o
 - 21.6 Principal cesa, o amenaza con cesar, al comercio, o
 - 21.7 de la principal toma o sufre cualquiera otra similar o análogo de acción en cualquier jurisdicción, en consecuencia, de la deuda.
 - 22 En caso de cese de cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios por cualquier razón:
 - El Director de pagar inmediatamente a la Compañía todos los pendientes de la empresa las facturas impagadas e intereses y, en el caso de los servicios prestados, pero para los que no se ha presentado la factura, la empresa podrá presentar una factura, en la que se pagarán inmediatamente después de la recepción,
 - Los derechos adquiridos de las partes en cuanto a la rescisión no se verá afectada
 - 23 LA COMPAÑÍA no es un asegurador ni un garante y está liberada de responsabilidad con respecto a esas atribuciones. EL CONTRATANTE que requiera garantías contra pérdidas o daños, deberá obtener el seguro apropiado.
 - 24 Ninguna alteración, enmienda o renuncia a cualquiera de estas Condiciones Generales, tendrá algún efecto a menos que sean hechas por escrito y firmadas por un representante autorizado de LA COMPAÑÍA
 - 25.1 Si cualquiera de las disposiciones (o parte de una disposición) de las presentes Condiciones Generales se encuentra por cualquier tribunal u órgano administrativo de la jurisdicción competente para ser inválida, ilegal o inaplicable, las demás disposiciones seguirán en vigor.
 - 25.2 Si cualquier inválida, inaplicable o ilegal disposición sería válida y ejecutable o jurídica, si alguna parte de ella se han suprimido, esta disposición se aplicará a cualquier modificación es necesario para que sea válida y exigible y legal.
 - 26 Cada una de las partes reconoce y acepta que, en la celebración de cualquier contrato de prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales no cuenta con ninguna empresa, promesa, garantía, declaración representación, garantía o entendimiento (ya sea por escrito o no) de cualquier persona (ya sea parte en estas condiciones o no) relacionados con el objeto de estas Condiciones Generales, con excepción de los expresamente establecido en el o mencionada en las presentes Condiciones Generales
 - 27 Todos los contratos para la prestación de servicios entró en conformidad con las presentes Condiciones Generales se realizan para el beneficio de la Sociedad y la única y principal (en su caso) de sus sucesores y cesionarios autorizados y que no están destinados a beneficiar, o ser exigible por cualquier otra persona.
 - 28 Avisos dados bajo las presentes Condiciones Generales se realizarán por escrito, enviado a las atención de la persona, y que dicha dirección o número de fax de la parte podrá notificar a la otra parte de vez en cuando y se entregarán personalmente o enviarse por correo enviado por pre-pago, de primera clase de correo o correo certificado. Un aviso se considerará que se han recibido, en caso de entrega personal, en el momento de la entrega, en el caso de pre-pago o post de primera clase correo certificado, 48 horas a partir de la fecha de envío y, si se considera la recepción en virtud de la presente Condición 28 se no en el horario comercial (es decir, 9.00 a 5.30 pm. de Lunes a Viernes en un día que es un día hábil), a las 9:00 horas en el primer día hábil tras la entrega. Para probar el servicio es suficiente para demostrar la notificación fue debidamente y se publicará.
 - 29.1 Cualquier controversia o demanda que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de sus materias, se regirá e interpretará de conformidad con las leyes del Estado Peruano.
 - 29.2 Las partes irrevocablemente de acuerdo en que los tribunales del Estado Peruano no tendrá competencia exclusiva para resolver cualquier controversia o reclamación que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales: o de su materia.



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE - 031



Registro N° LE - 031

INSPECTORATE

Pág 01/1

INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL No. 111936L/15-MA

Cliente : LOURDES CYNTHIA VALLADARES ROBLES
Dirección : AL ENRIQUE VILLAR NRO 445 LIMA- LIMA - LIMA
Producto : Suelos
Número de muestras : 01e
Presentación de las muestras : Frasco de plástico proporcionados por Inspectorate Services Perú S.A.C
Procedencia de la muestra : Muestras enviadas por el cliente indicando fecha de muestreo 2015-11-27 10:00
Referencia del Cliente : Pachacamac - Pachacamac - Lima - Lima
Fecha de Recepción de las muestras : 2015-11-27
Fecha de Inicio de Análisis : 2015-12-07
Fecha de Término de Análisis : 2015-12-07
Solicitud de Servicio : S/S 004194-15-LMA
Orden de Servicio : O/S 11063-15-LMA

Código de Laboratorio	Descripción de Muestra	Declarado por el Cliente	Unidades de pH	pH	Humedad (%)
09531-37356	N°1		7,2		9,6
Límite de Cuantificación					

Métodos de ensayo.

pH EPA 9045D Rev4 2004 Soil and Waste Ph

(*)Humedad NTP-ISO 287/2001

Las muestras ingresaron al Laboratorio, en cooler

El informe de Control de Calidad les será proporcionado a su solicitud.

(*) Los métodos indicados no han sido acreditados por INACAL-DA.

Callao, 07 de Diciembre del 2015

Inspectorate Services Perú S.A.C.
A Bureau Veritas Group Company

[Firma]

QUIM. LUIS A. ZEGARRA RUIZ
C.Q.P. 1112
LABORATORIO MEDIO AMBIENTE

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin autorización de Inspectorate Services Perú S.A.C.

Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada

No deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce

"valor" significa no cuantificable debajo del límite de cuantificación indicado

A excepción de los productos perecibles los tiempos de entrega dependerán del laboratorio que realice el análisis

Este tiempo variará desde 7 días hasta 8 meses como máximo

TÉRMINOS Y CONDICIONES GENERALES

- A menos que esté específicamente acordado por escrito, Inspectorate Services Perú SAC de ahora en adelante, llamado "LA COMPAÑÍA", realiza servicios de acuerdo con estos "Términos y Condiciones Generales" y consecuentemente, todas las ofertas o cotizaciones de servicios, estarán sujetas a estas Condiciones Generales, así como también todos los contratos, acuerdos y arreglos. Estas Condiciones Generales están reguladas por el artículo 1764° y siguiente, del Código Civil de la República Peruana.
- LA COMPAÑÍA es una empresa dedicada a prestar servicios de Inspección y análisis tales como:
 - Servicios básicos como los descritos en la condición número 6.
 - Prestación servicios especiales, aceptados por LA COMPAÑÍA según lo indicado en la condición número 7.
 - Expedir reporte y/o certificados según lo indicado en la condición número 8.
- LA COMPAÑÍA actúa para la persona o instituciones de quienes las instrucciones para ejecutar el servicio han sido recibidas (de ahora en adelante llamado EL CONTRATANTE). Ningún individuo o institución tiene derecho a dar instrucciones, particularmente con respecto al alcance de un servicio dado o al envío de reportes o certificados, a menos que sea autorizado por EL CONTRATANTE y aceptado por LA COMPAÑÍA. Sin embargo, LA COMPAÑÍA será considerada como autorizada irrevocablemente enviar a su discreción, los reportes o certificados a terceras personas, si se encuentra siguiendo instrucciones de EL CONTRATANTE.
- LA COMPAÑÍA suministrará sus servicios de acuerdo con:
 - Instrucciones específicas del contratante y confirmadas por LA COMPAÑÍA
 - Los términos del formato estándar de orden de servicios de LA COMPAÑÍA.
 - Las prácticas comunes de comercio, uso y manejo.
 - Los métodos que LA COMPAÑÍA pueda considerar apropiados en los campos técnicos, operacionales y/o financieros.
- Todas las preguntas y ordenes por parte del CONTRATANTE de servicios deben estar acompañadas de suficiente información, especificaciones e instrucciones que le permitan a LA COMPAÑÍA evaluar y/o realizar los servicios requeridos.
- Documentos que reflejen contratos entre EL CONTRATANTE y terceras personas, o documentos de terceras personas, tales como copias de contratos de venta, nota de crédito, conocimientos de embarque, etc., son considerados (si son recibidos por LA COMPAÑÍA) solamente como informativos, sin extender o restringir los compromisos aceptados por LA COMPAÑÍA.
- Los servicios estándares de LA COMPAÑÍA pueden incluir todos o algunos de los mencionados a continuación:
 - Inspección cualitativa o cuantitativa.
 - Inspección de bienes, plantas, equipos, empaquetado, tanques, contenedores y medios de transporte.
 - Inspección de carga y descarga.
 - Muestreo.
 - Análisis en el laboratorio u otro tipo de prueba.
 - Estudios y auditorías
- Servicios especiales cuando los mismos exceden el campo de servicios estándares referidos en la condición número 6, serán realizados por LA COMPAÑÍA, mediante acuerdos particulares. Los siguientes servicios especiales son ilustrativos y no excluyentes:
 - Garantías cualitativas o cuantitativas.
 - Calibración de tanques, calibración métrica o mediciones
 - Provisión de técnicos o algún otro personal.
 - Inspecciones pre-embarque bajo regulaciones gubernamentales de importaciones o aduanas.
 - Supervisión de proyectos industriales completos. Incluyendo Ingeniería y reportes de progreso.
 - Servicios de Consultoría.
- Sujeto a las instrucciones de EL CONTRATANTE y aceptadas por LA COMPAÑÍA, esta última emitirá reportes y certificados del servicio realizado los cuales incluirán opiniones emitidas en el marco de las limitaciones de las Instrucciones recibidas. LA COMPAÑÍA no está en obligación de referirse o reportar acerca de cualquier hecho o circunstancia fuera de estas Instrucciones específicas recibidas.
 - Los reportes o certificados emitidos a partir de pruebas o análisis realizados a "muestras articulares", contienen las opiniones específicas de LA COMPAÑÍA de dichas muestras, y no expresan una opinión con respecto al total (lote) del material de donde estas fueron obtenidas. Si se requiere una opinión acerca del material completo, se deberá coordinar en forma anticipada con LA COMPAÑÍA, la Inspección y toma de muestras del total del material.
- Obligaciones de EL CONTRATANTE:
 - Asegurarse que las Instrucciones dadas a LA COMPAÑÍA contengan la suficiente información y sean suministradas oportunamente, para disponer que los servicios requeridos sean realizados efectivamente.
 - Procurará todo el acceso necesario a los representantes de LA COMPAÑÍA, para así permitir asegurar que todos los servicios sean realizados en forma efectiva.
 - Suministrar, si es necesario, equipos especiales o personal para la realización de los servicios requeridos.
 - Se asegurará que sean tomadas todas las medidas necesarias para la seguridad de las condiciones de trabajo e instalaciones, durante el desarrollo de los servicios y no se limitará solamente a atender las sugerencias de LA COMPAÑÍA en este respecto, sean o no solicitadas.
 - Tomar todas las acciones necesarias para eliminar o resolver obstrucciones o interrupciones en la realización de los servicios contratados.
 - Informar con anticipación a LA COMPAÑÍA acerca de riesgos o peligros conocidos, actuales o potenciales, relacionados con alguna instrucción e muestreo o análisis, incluyendo por ejemplo, la presencia de riesgo por radiación, elementos tóxicos, nocivos o explosivos, venenos o contaminación ambiental.
 - Ejercer todos sus derechos y liberarse de todas sus obligaciones con respecto a algún contrato en particular, independientemente de si se han emitido reportes o no; debido al incumplimiento de LA COMPAÑÍA, en alguna de sus obligaciones.
 - Puede permitir a LA COMPAÑÍA delegar a su discreción la realización del trabajo para el cual fue contratada, en forma completa o parcial a cualquier agente o subcontratista.
 - Todos los técnicos y otro personal proporcionados por la Compañía en el ejercicio de cualquiera de los servicios siempre y en todo momento serán los empleados, agentes o subcontratista (Como puede ser el caso) de la Compañía como tal, todas esas personas serán responsables y sujeto a las instrucciones de la compañía en todo momento. Salvo acuerdo en contrario de la Compañía, estas personas no estarán obligados a seguir todas las instrucciones del CONTRATANTE.
 - Si los requerimientos de EL CONTRATANTE exigen el análisis de muestras por parte de EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA emitirá los resultados pero sin responsabilidad por la exactitud de los mismos. Del mismo modo, cuando LA COMPAÑÍA solo actúe como testigo en la realización de análisis por EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA dará confirmación de que la muestra correcta fue analizada, pero no tendrá ningún responsabilidad sobre la exactitud de los resultados.
 - Debido a la posibilidad de estratificación de algunas cargas y/o las limitaciones impuestas a nosotros por cerradas o restringidas sistemas de toma de muestras, la compañía no puede garantizar que estas muestras son representativas de la carga o a bordo o los resultados de las pruebas obtenidos e informados sobre nuestros certificados de calidad son representativas de dicha carga.
- LA COMPAÑÍA tomará el debido cuidado y buena práctica en la realización de sus servicios y aceptará responsabilidad solo cuando tales cuidados y prácticas no hayan sido ejecutados y se pruebe algún, tipo de negligencia por parte de LA COMPAÑÍA.
- La responsabilidad de LA COMPAÑÍA respecto a quejas por pérdidas, daños o gastos de cualquier naturaleza, ocurridas en cualquier momento, debido a cualquier infracción al contrato o alguna falla en el cuidado y buena práctica por parte de LA COMPAÑÍA, no deberá en ninguna circunstancia exceder 10(diez) veces la tarifa o cantidad pagable con respecto al servicio específico requerido, el cual a su vez está bajo un contrato en particular con LA COMPAÑÍA, que da lugar a las reclamaciones en cuestión. Sin embargo, LA COMPAÑÍA no tendrá responsabilidad con respecto a cualquier reclamo por pérdida indirecta o consecuente, incluyendo pérdidas de ganancias y/o negocios futuros y/o producción y/o cancelación de contratos en los cuales participa EL CONTRATANTE. En el caso que la tarifa o cantidad a pagar por servicio, se refiera a un grupo de servicios y el reclamo se sucede con respecto a uno de dichos servicios de la tarifa deberá ser indicada, para el propósito de este numeral, mediante referencia al tiempo total involucrado en el desarrollo de cada servicio.
- El límite de responsabilidad de LA COMPAÑÍA bajo los términos de la condición número 14.2, puede ser aumentado por solicitud recibida con anterioridad a la ejecución de un servicio o como acuerdo por el pago de una tarifa más alta, equivalente a una fracción adecuada del incremento de la compensación.
- Todas las garantías, condiciones y otros términos implícitos por la ley o de derecho común son, en la máxima medida permitida por la ley, excluidas de las presentes Condiciones Generales.
- Nada de lo dispuesto en estas Condiciones Generales, limite o excluya a la responsabilidad de la Empresa:
 - En caso de muerte o lesiones personales resultantes de negligencia, o
 - De cualquier daño o responsabilidad incurrida por e principal como resultado de fraude o tergiversación fraudulenta por la compañía, o
 - De cualquier responsabilidad que no puede ser restringida o excluida por la ley.
- Esta condición 14 establece la totalidad de la responsabilidad financiera de la Compañía (incluyendo cualquier responsabilidad por los actos u omisiones de sus empleados, agentes y sub-contratistas) a la principal con respecto a cualquier incumplimiento de estas Condiciones Generales, cualquier uso que se haga por el director de los servicios y toda representación, declaración o acto delictivo u omisión (incluyendo negligencia) que surjan en relación con estas Condiciones Generales.
- EL CONTRATANTE podrá garantizar que protegerá o indemnizará a LA COMPAÑÍA y sus representantes, empleados, agentes o sub-contratistas, frente a todos los reclamos hechos por terceros respecto a pérdidas, costos por daños de cualquier naturaleza debido a reclamos o cualquier otra circunstancia relacionada con el desarrollo, intención de desarrollar o no desarrollo, de cualquier servicio, que exceda lo estipulado, según la condición número 14.
- Cada empleada, agente o subcontratista de LA COMPAÑÍA, podrá tener el beneficio de las limitaciones de compensación o indemnización contenidas en estas Condiciones Generales y en consecuencia en los que a tales limitaciones respecta, cualquier contrato asumido por LA COMPAÑÍA es asumido no solos en su propio beneficio, sino también como agente y garante de las personas aquí mencionadas.
- En el evento que surja cualquier problema o costo imprevisto durante la ejecución de algún servicio contratado, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada para realizar cobros adicionales para cubrir los costos para cubrir tiempo de trabajo adicional y gastos en los que necesariamente se incurra para cumplir con el Servicio
- 18.1 EL CONTRATANTE pagará puntualmente en un plazo no mayor de 30(trinta) días después de la fecha de emisión de la factura o dentro de cualquier otro plazo que halla sido acordado por escrito con LA COMPAÑÍA, todos los respectivos cargos hechos por LA COMPAÑÍA. El no cumplimiento del plazo acarreará el pago de intereses a razón de 15% anual a partir de la fecha de emisión de la factura hasta la fecha de pago más los gastos e impuestos producto de la demanda.
- 18.2 Todos los precios y las tasas debidas en virtud de las presentes Condiciones Generales, a menos que la compañía confirma por escrito, ser exclusiva de ningún valor añadido o impuesto sobre las ventas que se cobrará en adición a la tasa vigente que corresponda.
- 18.3 EL CONTRATANTE no está autorizado para retener o diferir el pago de cualquier suma que se le adeude a LA COMPAÑÍA, aduciendo alguna disputa o reclamos que pueda alegar en contra de LA COMPAÑÍA.
- 18.4 En el caso de cualquier suspensión de los compromisos de pago con acreedores, quiebra, liquidez, embargo o cesación de actividades por parte de EL CONTRATANTE, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada automáticamente para suspender el desarrollo de sus servicios y sin responsabilidad alguna.
- 19 En el caso que LA COMPAÑÍA sea prevenida, por alguna causa fuera de su control de efectuar o completar algún servicio acordado, EL CONTRATANTE pagará a LA COMPAÑÍA:
 - Costos realizados o aún por hacer con el objeto de poder detener los trabajos.
 - Una porción de la tarifa acordada equivalente a la proporción del servicio efectivamente realizado, quedando LA COMPAÑÍA dispensada de toda responsabilidad en absoluto, por la parcial o total no ejecución del servicio.
20. LA COMPAÑÍA podrá ser dispensada de toda responsabilidad con EL CONTRATANTE, por reclamos de pérdidas o costos por daños dentro de los seis meses subsiguientes a la ejecución por parte de LA COMPAÑÍA de los servicios que dan lugar al reclamo, a menos que se estable una demanda o en caso se alegue la no ejecución de algún servicio, si no es dura nte los seis meses subsiguientes a fecha en que el servicio debió haber sido ejecutado.
21. Sin perjuicio de cualesquiera otros derechos o recursos que puede tener, la Compañía puede terminar cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales, sin que la principal responsabilidad de dar aviso de inmediato a la principal si:
 - Principal comete un incumplimiento sustancial de cualquiera de los términos de estas Condiciones Generales y (si esa violación es remediable) no remedia dicho incumplimiento dentro de los 30 días de la principal que se notificará por escrito de la violación, o
 - se hace un peddo o se aprueba una resolución para la liquidación de la principal, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente para hacer una disolución de la principal
- 21.3 se hace una orden, o los documentos que se presentan en un tribunal de jurisdicción competente, para el nombramiento de un administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o
- 21.4 se nombra un receptor de cualquiera de los principales activos o empresa, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente o un acreedor de nombrar a un síndico o administrador de la principal, o
- 21.5 principal hace cualquier acuerdo o convenio con sus acreedores, o hace una solicitud a un tribunal de jurisdicción competente para la protección de sus acreedores en forma alguna, o
- 21.6 Principal cesa, o amenaza con cesar, al comercio, o
- 21.7 de la principal toma o sufre cualquiera otra similar o análogo de acción en cualquier jurisdicción, en consecuencia, de la deuda. En caso de cese de cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios por cualquier razón:
- 22.1 El Director de pagar inmediatamente a la Compañía todos los pendientes de la empresa las facturas impagadas e intereses y, en el caso de los servicios prestados, pero para los que no se ha presentado la factura, la empresa podrá presentar una factura, en la que se pagarán inmediatamente después de la recepción,
- 22.2 los derechos adquiridos de las partes en cuanto a la rescisión no se verá afectada
- 23 LA COMPAÑÍA no es un asegurador ni un garante y está liberada de responsabilidad con respecto a esas atribuciones. EL CONTRATANTE que requiera garantías contra pérdidas o daños, deberá obtener el seguro apropiado.
- 24 Ninguna alteración, enmienda o renuncia a cualquiera de estas Condiciones Generales, tendrá algún efecto a menos que sean hechas por escrito y firmadas por un representante autorizado de la COMPAÑÍA
25. Si cualquiera de las disposiciones (o parte de una disposición) de las presentes Condiciones Generales se encuentra por cualquier tribunal u órgano administrativo de la jurisdicción competente para ser inválida, ilegal o inaplicable, las demás disposiciones seguirán en vigor.
- 25.2 Si cualquier inválida, inaplicable o ilegal disposición sería válida y ejecutable o jurídica, si alguna parte de ella se han suprimido, esta disposición se aplicara a cualquier modificación es necesario para que sea válida y exigible y legal. Cada una de las partes reconoce y acepta que, en la celebración de cualquier contrato de prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales no cuenta con ninguna empresa, promesa, garantía, declaración representación, garantía o entendimiento (ya sea por escrito o no) de cualquier persona (ya sea parte en estas condiciones o no) relacionados con el objeto de estas Condiciones Generales, con excepción de los expresamente establecido en el o mencionada en las presentes Condiciones Generales
- 27 Todos los contratos para la prestación de servicios entró en conformidad con las presentes Condiciones Generales se realizan para el beneficio de la Sociedad y la única y principal (en su caso) de sus sucesores y cesionarios autorizados y que no están destinados a beneficiar, o ser exigible por cualquier otra persona.
- 28 Avisos dados bajo las presentes Condiciones Generales se realizarán por escrito, enviado a las atención de la persona, y que dicha dirección o número de fax de la parte podrá notificar a la otra parte de vez en cuando y se entregarán personalmente o enviarse por correo enviado por pre-pago, de primero clase de correo o correo certificado. Un aviso se considerará que se han recibido, en caso de entrega personal, en el momento de la entrega, en el caso de pre-pago o post de primera clase correo certificado, 48 horas a partir de la fecha de envío y, si se considera la recepción en virtud de la presente Condición 28 se no en el horario comercial (es decir, 9:00 a 5:30 pm. de Lunes a Viernes en un día que es un día hábil), a las 9:00 horas en el primer día hábil tras la entrega. Para probar el servicio es suficiente para demostrar la notificación fue debidamente y se publicará.
- 29
- 29.1 Cualquier controversia o demanda que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de sus materias, se regirán e Interpretarán de conformidad con las leyes del Estado Peruano. Las partes irrevocablemente de acuerdo en que los tribunales del Estado Peruano no tendrá competencia exclusiva para resolver cualquier controversia o reclamación que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de su materia.



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE - 031



INSPECTORATE

Registro N°LE - 031

Pág. 01/1

INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL No. 122363L/15-MA

Cliente : LOURDES CYNTHIA VALLADARES ROBLES
Dirección : AL ENRIQUE VILLAR NRO.445 LIMA- LIMA - LIMA LIMA
Producto : Suelos
Número de muestras : 01
Presentación de las muestras : Frasco de plástico proporcionados por Inspectorate Services Perú S.A.C.
Procedencia de la muestra : Muestras enviadas por el cliente indicando fecha de muestreo: 2015-12-07, 08:30
Referencia del Cliente : Pachacamac - Pachacamac - Lima - Lima
Fecha de Recepción de las muestras : 2015-12-07
Fecha de Inicio de Análisis : 2015-12-07
Fecha de Término de Análisis : 2015-12-17
Solicitud de Servicio : S/S 004368-15-LMA
Orden de Servicio : O/S 11063-15-LMA

Código de Laboratorio	Descripción de Muestra	pH	Humedad (%)
09855-38975	N°1	7,8	23,1
	Límite de Cuantificación	-	-

Métodos de ensayo:
 pH : EPA 9045D Rev4 2004. Soil and Waste Ph.
 (*)Humedad : NTP-ISO 287/2001

Las muestras ingresaron al Laboratorio, en cooler.
 El informe de Control de Calidad les será proporcionado a su solicitud.
 (*) Los métodos indicados no han sido acreditados por INACAL-DA.
 Callao, 17 de Diciembre del 2015

Inspectorate Services Perú S.A.C.
A Bureau Veritas Group Company

QUIM. LUIS A. ZEGARRA RUIZ
 C.Q.P.1112
 LABORATORIO MEDIO AMBIENTE

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin autorización de Inspectorate Services Perú S.A.C.

Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada

No deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce

<"valor" significa no cuantificable debajo del límite de cuantificación indicado

A excepción de los productos perecibles los tiempos de custodia dependerán del laboratorio que realice el análisis.

Este tiempo variará desde 7 días hasta 6 meses como máximo.

Av. Elmer Faucett N° 444 Callao - Perú / Central: (511) 613-8080 Fax : (511) 628-9016

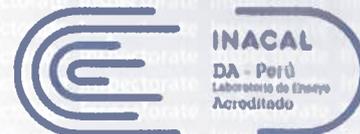
www.inspectorato.com.pe

TÉRMINOS Y CONDICIONES GENERALES

- A menos que esté específicamente acordado por escrito, Inspectorate Services Perú SAC, de ahora en adelante, llamado "LA COMPAÑÍA", realiza servicios de acuerdo con estos "Términos y Condiciones Generales" y consecuentemente, todas las ofertas o cotizaciones de servicios, estarán sujetas a estas Condiciones Generales, así como también todos los contratos, acuerdos y arreglos. Estas Condiciones Generales están reguladas por el artículo 1764° y siguiente, del Código Civil de la República Peruana.
- LA COMPAÑÍA es una empresa dedicada a prestar servicios de Inspección y análisis tales como:
 - Servicios básicos como los descritos en la condición número 6.
 - Prestación servicios especiales, aceptados por LA COMPAÑÍA según lo indicado en la condición número 7.
 - Exipde reporte y/o certificados según lo indicado en la condición número 8.
- LA COMPAÑÍA actúa para la persona o instituciones de quienes las instrucciones para ejecutar el servicio han sido recibidas (de ahora en adelante llamado EL CONTRATANTE). Ningún individuo o institución tiene derecho a dar instrucciones, particularmente con respecto al alcance de un servicio dado o al envío de reportes o certificados, a menos que sea autorizado por EL CONTRATANTE y aceptado por LA COMPAÑÍA. Sin embargo, LA COMPAÑÍA será considerada como autorizada irrevocablemente enviar a su discreción, los reportes o certificados a terceras personas, si se encuentra siguiendo instrucciones de EL CONTRATANTE.
- LA COMPAÑÍA suministrará sus servicios de acuerdo con:
 - Instrucciones específicas del contratante y confirmadas por LA COMPAÑÍA
 - Los términos del formato estándar de orden de servicios de LA COMPAÑÍA.
 - Las prácticas comunes de comercio, uso y manejo.
 - Los métodos que LA COMPAÑÍA pueda considerar apropiados en los campos técnicos, operacionales y/o financieros.
- Todas las preguntas y ordenes por parte del EL CONTRATANTE de servicios deben estar acompañadas de suficiente información, especificaciones e instrucciones que permitan a LA COMPAÑÍA evaluar y/o realizar los servicios requeridos.
 - Documentos que reflejen contratos entre EL CONTRATANTE y terceras personas, o documentos de terceras personas, tales como copias de contratos de venta, nota de crédito, conocimientos de embarque, etc., son considerados (si son recibidos por LA COMPAÑÍA) solamente como informativos, sin extender o restringir los compromisos aceptados por LA COMPAÑÍA.
- Los servicios estándares de LA COMPAÑÍA pueden incluir todos o algunos de los mencionados a continuación:
 - Inspección cualitativa o cuantitativa.
 - Inspección de bienes, plantas, equipos, empaquetado, tanques, contenedores y medios de transporte.
 - Inspección de carga y descarga.
 - Muestreo.
 - Análisis en el laboratorio u otro tipo de prueba.
 - Estudios y auditorias
- Servicios especiales cuando los mismos exceden el campo de servicios estándares referidos en la condición número 6, serán reafirmados por LA COMPAÑÍA, mediante acuerdos particulares, los siguientes servicios especiales son ilustrativos y no excluyentes:
 - Garantías cualitativas o cuantitativas.
 - Calibración de tanques, calibración métrica o mediciones
 - Provisión de técnicos o algún otro personal.
 - Inspecciones pre-embarque bajo regulaciones gubernamentales de Importaciones o aduanas.
 - Supervisión de proyectos industriales completos, incluyendo Ingeniería y reportes de progreso.
 - Servicios de Consultoría.
- Sujeto a las Instrucciones de EL CONTRATANTE y aceptadas por LA COMPAÑÍA, esta última emitirá reportes y certificados del servicio realizado los cuales incluirán opiniones emitidas en el marco de las limitaciones de la instrucciones recibidas. LA COMPAÑÍA no está en obligación de referirse o reportar acerca de cualquier hecho o circunstancia fuera de estas instrucciones específicas recibidas.
- Los reportes o certificados emitidos a partir de pruebas o análisis realizados a "muestras articulares", contienen las opiniones específicas de LA COMPAÑÍA de dichas muestras, y no expresan una opinión con respecto al total (lote) del material de donde estas fueron obtenidas. Si se requiere una opinión acerca del material completo, se deberá coordinar en forma anticipada con LA COMPAÑÍA, la Inspección y toma de muestras del total del material.
- Obligaciones de EL CONTRATANTE:
 - Asegurarse que las instrucciones dadas a LA COMPAÑÍA contengan la suficiente información y sean suministradas oportunamente, para disponer que los servicios requeridos sean realizados efectivamente.
 - Procurará todo el acceso necesario a los representantes de LA COMPAÑÍA, para así permitir asegurar que todos los servicios sean realizados en forma efectiva.
 - Suministrar, si es necesario, equipos especiales o personal para la realización de los servicios requeridos.
 - Se asegurará que sean tomadas todas las medidas necesarias para la seguridad de las condiciones de trabajo e instalaciones, durante el desarrollo de los servicios y no se limitará solamente a atender las sugerencias de LA COMPAÑÍA en este respecto, sean o no solicitadas.
 - Tomar todas las acciones necesarias para eliminar o resolver obstrucciones o interrupciones en la realización de los servicios contratados.
 - Informar con anticipación a LA COMPAÑÍA acerca de riesgos o peligros conocidos, actuales o potenciales, relacionados con alguna instrucción e muestreo o análisis, incluyendo por ejemplo, la presencia de riesgo por radiación, elementos tóxicos, nocivos o explosivos, venenos o contaminación ambiental.
 - Ejercer todos sus derechos y liberarse de todas sus obligaciones con respecto a algún contrato en particular, independientemente de si se han emitido reportes o no; debido al incumplimiento de LA COMPAÑÍA, en alguna de sus obligaciones.
 - Puede permitir a LA COMPAÑÍA delegar a su discreción la realización del trabajo para el cual fue contratada, en forma completa o parcial a cualquier agente o subcontratista.
 - Todos los técnicos y otro personal proporcionados por la Compañía en el ejercicio de cualquiera de los servicios siempre y en todo momento serán los empleados, agentes o subcontratista (Como puede ser el caso) de la Compañía como tal, todas esas personas serán responsables y sujeto a las instrucciones de la compañía en todo momento. Salvo acuerdo en contrario de la Compañía, estas personas no estarán obligados a seguir todas las instrucciones del CONTRATANTE.
 - Si los requerimientos de EL CONTRATANTE exigen el análisis de muestras por parte de EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA emitirá los resultados pero sin responsabilidad por la exactitud de los mismos. del mismo modo, cuando LA COMPAÑÍA solo actúe como testigo en la realización de análisis por EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPAÑÍA dará confirmación de que la muestra correcta fue analizada, pero no tendrá ningún responsabilidad sobre la exactitud de los resultados.
 - Debido a la posibilidad de estratificación de algunas cargas y/o las limitaciones impuestas a nosotros por cerradas o restringidas sistemas de toma de muestras, la compañía no puede garantizar que estas muestras son representativas de la carga o a bordo o los resultados de las pruebas obtenidos e informó sobre nuestros certificados de calidad son representativas de dicha carga.
 - LA COMPAÑÍA tomará el debido cuidado y buena práctica en la realización de sus servicios y aceptará responsabilidad solo cuando tales cuidados y prácticas no hayan sido ejecutados y se pruebe algún, tipo de negligencia por parte de LA COMPAÑÍA.
 - La responsabilidad de LA COMPAÑÍA respecto a quejas por pérdidas, daños o gastos de cualquier naturaleza, ocurridas en cualquier momento, debido a cualquier infracción al contrato o alguna falla en el cuidado y buena práctica por parte de LA COMPAÑÍA, no deberá en ninguna circunstancia exceder 10(diez) veces la tarifa o cantidad pagable con respecto al servicio específico requerido, el cual a su vez está bajo un contrato en particular con LA COMPAÑÍA, que da lugar a las reclamaciones en cuestión. Sin embargo, LA COMPAÑÍA no tendrá responsabilidad con respecto a cualquier reclamo por pérdida indirecta o consecuente, incluyendo pérdidas de ganancias y/o negocios futuros y/o producción y/o cancelación de contratos en los cuales participa EL CONTRATANTE. En el caso que la tarifa o cantidad a pagar por servicio, se refiera a un grupo de servicios y el reclamo se sucede con respecto a uno de dichos servicios de la tarifa deberá ser indicada, para el propósito de este numeral, mediante referencia al tiempo total involucrado en el desarrollo de cada servicio.
 - El límite de responsabilidad de LA COMPAÑÍA bajo los términos de la condición número 14.2, puede ser aumentado por solicitud recibida con anterioridad a la ejecución de un servicio o como acuerdo por el pago de una tarifa más alta, equivalente a una fracción adecuada del incremento de la compensación.
 - Todas las garantías, condiciones y otros términos implícitos por la ley o de derecho común son, en la máxima medida permitida por la ley, excluidas de las presentes Condiciones Generales.
 - Nada de lo dispuesto en estas Condiciones Generales, limite o excluya a la responsabilidad de la Empresa:
 - En caso de muerte o lesiones personales resultantes de negligencia, o
 - De cualquier daño o responsabilidad incurrida por el principal como resultado de fraude o tergiversación fraudulenta por la compañía, o
 - De cualquier responsabilidad que no puede ser restringida o excluida por la ley.
 - Esta condición 14 establece la totalidad de la responsabilidad financiera de la Compañía (incluyendo cualquier responsabilidad por los actos u omisiones de sus empleados, agentes y sub-contratistas) a la principal con respecto a cualquier incumplimiento de estas Condiciones Generales, cualquier uso que se haga por el director de los servicios y toda representación, declaración o acto delictivo u omisión (incluyendo negligencia) que surjan en relación con estas Condiciones Generales.
 - EL CONTRATANTE podrá garantizar que protegerá e indemnizará a LA COMPAÑÍA y sus representantes, empleados, agentes o sub-contratistas, frente a todos los reclamos hechos por terceros respecto a pérdidas, costos por daños de cualquier naturaleza debido a reclamos o cualquier otra circunstancia relacionada con el desarrollo, intención de desarrollar o el desarrollo, de cualquier servicio, que exceda lo estipulado, según la condición número 14.
 - Cada empleada, agente o subcontratista de LA COMPAÑÍA, podrá tener el beneficio de las limitaciones de compensación o indemnización contenidas en estas Condiciones Generales y en consecuencia en los que a tales limitaciones respecta, cualquier contrato asumido por LA COMPAÑÍA es asumido no solos en su propio beneficio, sino también como agente y garante de las personas aquí mencionadas.
 - En el evento que surja cualquier problema o costo imprevisto durante la ejecución de algún servicio contratado, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada para realizar cobros adicionales para cubrir los costos para cubrir tiempo de trabajo adicional y gastos en los que necesariamente se incurra para cumplir con el Servicio
 - 18.1 EL CONTRATANTE pagará puntualmente en un plazo no mayor de 30(treinta) días después de la fecha de emisión de la factura o dentro de cualquier otro plazo que halla sido acordado por escrito con LA COMPAÑÍA, todos los respectivos cargos hechos por LA COMPAÑÍA. El no cumplimiento del plazo acarreará el pago de intereses a razón de 15% anual a partir de la fecha de emisión de la factura hasta la fecha de pago más los gastos e impuestos producto de la demanda.
 - 18.2 Todos los precios y las tasas debidas en virtud de las presentes Condiciones Generales, a menos que la compañía confirma por escrito, ser exclusiva de ningún valor añadido o impuesto sobre las ventas que se cobrará en adición a la tasa vigente que corresponda.
 - 18.3 EL CONTRATANTE no está autorizado para retener o diferir el pago de cualquier suma que se le adeude a LA COMPAÑÍA, aduciendo alguna disputa o reclamos que pueda alegar en contra de LA COMPAÑÍA.
 - 18.4 En el caso de cualquier suspensión de los compromisos de pago con acreedores, quiebra, liquidez, embargo o cesación de actividades por parte de EL CONTRATANTE, LA COMPAÑÍA podrá ser autorizada automáticamente para suspender el desarrollo de sus servicios y sin responsabilidad alguna.
 - 19 En el caso que LA COMPAÑÍA sea prevenida, por alguna causa fuera de su control de efectuar o completar algún servicio acordado, EL CONTRATANTE pagará a LA COMPAÑÍA:
 - Costos realizados o aún por hacer con el objeto de poder detener los trabajos.
 - Una porción de la tarifa acordada equivalente a la proporción del servicio efectivamente realizado, quedando LA COMPAÑÍA dispensada de toda responsabilidad en absoluto, por la parcial o total no ejecución del servicio.
 20. LA COMPAÑÍA podrá ser dispensada de toda responsabilidad con EL CONTRATANTE, por reclamos de pérdidas o costos por daños dentro de los seis meses subsiguientes a la ejecución por parte de LA COMPAÑÍA de los servicios que dan lugar al reclamo, a menos que se estable una demanda o en caso se alegue la no ejecución de algún servicio, si no es dura nte los seis meses subsiguientes a fecha en que el servicio debió haber sido ejecutado.
 21. Sin perjuicio de cualesquiera otros derechos o recursos que puede tener, la Compañía puede terminar cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales, sin que la principal responsabilidad de dar aviso de inmediato a la principal si:
 - Principal comete un incumplimiento sustancial de cualquiera de los términos de estas Condiciones Generales y (si esa violación es remediable) no remedia dicho incumplimiento dentro de los 30 días de la principal que se notificará por escrito de la violación, o
 - se hace un pedido o se aprueba una resolución para la liquidación de la principal, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente para hacer una disolución de la principal
 - se hace una orden, o los documentos que se presentan en un tribunal de jurisdicción competente, para el nombramiento de un administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o
 - se nombra un receptor de cualquiera de los principales activos o empresa, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente o un acreedor de nombrar a un síndico o administrador de la principal, o
 - 21.5 principal hace cualquier acuerdo o convenio con sus acreedores, o hace una solicitud a un tribunal de jurisdicción competente para la protección de sus acreedores en forma alguna, o
 - 21.6 Principal cesa, o amenaza con cesar, al comercio, o
 - 21.7 de la principal toma o sufre cualquiera otra similar o análogo de acción en cualquier jurisdicción, en consecuencia, de la deuda.
 - 22 En caso de cese de cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios por cualquier razón:
 - 22.1 El Director de pagar inmediatamente a la Compañía todos los pendientes de la empresa las facturas impagadas e intereses y, en el caso de los servicios prestados, pero para los que no se ha presentado la factura, la empresa podrá presentar una factura, en la que se pagarán inmediatamente después de la recepción ,
 - 22.2 los derechos adquiridos de las partes en cuanto a la rescisión no se verá afectada
 - 23 LA COMPAÑÍA no es un asegurador ni un garante y está liberada de responsabilidad con respecto a esas atribuciones. EL CONTRATANTE que requiera garantías contra pérdidas o daños, deberá obtener el seguro apropiado.
 - 24 Ninguna alteración, enmienda o renuncia a cualquiera de estas Condiciones Generales, tendrá algún efecto a menos que sean hechas por escrito y firmadas por un representante autorizado de la COMPAÑÍA
 - 25
 - 25.1 Si cualquiera de las disposiciones (o parte de una disposición) de las presentes Condiciones Generales se encuentra por cualquier tribunal u órgano administrativo de la jurisdicción competente para ser inválida, ilegal o inaplicable, las demás disposiciones seguirán en vigor.
 - 25.2 Si cualquier inválida, inaplicable o ilegal disposición sería válida y ejecutable o jurídica, si alguna parte de ella se han suprimido, esta disposición se aplicara a cualquier modificación es necesario para que sea válida y exigible y legal.
 - 26 Cada una de las partes reconoce y acepta que, en la celebración de cualquier contrato de prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales no cuenta con ninguna empresa, promesa, garantía, declaración representación, garantía o entendimiento (ya sea por escrito o no) de cualquier persona (ya sea parte en estas condiciones o no) relacionados con el objeto de estas Condiciones Generales, con excepción de los expresamente establecido en el o mencionada en las presentes Condiciones Generales
 - 27 Todos los contratos para la prestación de servicios entró en conformidad con las presentes Condiciones Generales se realizan para el beneficio de la Sociedad y la única y principal (en su caso) de sus sucesores y cesionarios autorizados y que no están destinados a beneficiar, o ser exigible por cualquier otra persona.
 - 28 Avisos dados bajo las presentes Condiciones Generales se realizarán por escrito, enviado a las atención de la persona, y que dicha dirección o número de fax de la parte podrá notificar a la otra parte de vez en cuando y se entregarán personalmente o enviarse por correo enviado por pre-pago, de primero clase de correo o correo certificado. Un aviso se considerará que se han recibido, en caso de entrega personal, en el momento de la entrega, en el caso de pre-pago o post de primera clase correo certificado, 48 horas a partir de la fecha de envío y, si se considera la recepción en virtud de la presente Condición 28 se no en el horario comercial (es decir, 9.00 a 5.30 pm, de Lunes a Viernes en un día que es un día hábil), a las 9:00 horas en el primer día hábil tras la entrega. Para probar el servicio es suficiente para demostrar la notificación fue debidamente y se publicará.
 - 29
 - 29.1 Cualquier controversia o demanda que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de sus materias, se regirán e Interpretarán de conformidad con las leyes del Estado Peruano.
 - 29.2 Las partes irrevocablemente de acuerdo en que los tribunales del Estado Peruano no tendrá competencia exclusiva para resolver cualquier controversia o reclamación que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de su materia.



**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL
ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA
CON REGISTRO N° LE - 031**



Registro N° LE - 031

INSPECTORATE

Pág. 01/1

INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL No. 122799L/15-MA

Cliente : LOURDES CYNTHIA VALLADARES ROBLES
 Dirección : AL. ENRIQUE VILLAR NRO.445 LIMA- LIMA - LIMA
 LIMA
 Producto : Suelos
 Número de muestras : 3
 Presentación de las muestras : Frascos de plástico y vidrio proporcionados por Inspectorate Services Perú S.A.C.
 Procedencia de la muestra : Muestras enviadas por el cliente indicando fecha de muestreo: 2015-12-14; 08:40
 Referencia del Cliente : Pachacamac
 Fecha de Recepción de las muestras : 2015-12-14
 Fecha de Inicio de Análisis : 2015-12-14
 Fecha de Término de Análisis : 2015-12-28
 Solicitud de Servicio : S/S 004477-15-LMA
 Orden de Servicio : O/S 11063-15-LMA

Código de Laboratorio	Descripción de Muestra	Fracción de Hidrocarburos F1 (C5-C10) mg/kg	pH Unidades de pH	Humedad (%) %
10200-40250	PACHACAMA	<6.00	7.5	22.3
	Límite de Cuantificación	6.00	-	-

Métodos de ensayo:
 Fracción de Hidrocarburos F1 (C5-C10) EPA 8015 C, Rev. 3, Febrero, 2007. Nonhalogenated Organics By Gas Chromatography.
 pH EPA 9045D Rev4, 2004. Soil and Waste Ph.
 (*)Humedad NTP-ISO 287/2001

Las muestras ingresaron al Laboratorio, en cooler.
 El informe de Control de Calidad les será proporcionado a su solicitud.
 (*) Los métodos indicados no han sido acreditados por INACAL-DA.
 Callao, 28 de Diciembre del 2015

**Inspectorate Services Perú S.A.C.
 A Bureau Veritas Group Company**

QUIM. LUIS A. ZEGARRA RUIZ
 C.O.P. 1112
 LABORATORIO MEDIO AMBIENTE

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin autorización de Inspectorate Services Peru S A C
 Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada
 No deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce
 < "valor" significa no cuantificable debajo del límite de cuantificación indicado
 A excepción de los productos perecibles los tiempos de custodia dependerán del laboratorio que realice el análisis
 Este tiempo variará desde 7 días hasta 6 meses como máximo

**Av. Elmor Faucett N° 444 Callao - Perú / Central: (511) 613-8080 Fax : (511) 628-9016
 www.inspectorate.com.pe**

TÉRMINOS Y CONDICIONES GENERALES

1. A menos que esté específicamente acordado por escrito, Inspectorate Servicios Perú SAC, de ahora en adelante, llamado "LA COMPANHIA", realiza servicios de acuerdo con estos "Términos y Condiciones Generales" y consecuentemente, todas las ofertas o cotizaciones de servicios, estarán sujetas a estas Condiciones Generales, así como también todos los contratos, acuerdos y arreglos. Estas Condiciones Generales están reguladas por el artículo 1764^o y siguiente, del Código Civil de la República Peruana.
2. LA COMPANHIA es una empresa dedicada a prestar servicios de inspección y análisis tales como:
 - 2.1 Servicios básicos como los descritos en la condición número 6.
 - 2.2 Prestación servicios especiales, aceptados por LA COMPANHIA según lo indicado en la condición número 7.
 - 2.3 Expedir reporte y/o certificados según lo indicado en la condición número 8.
3. LA COMPANHIA actúa para la persona o instituciones de quienes las instrucciones para ejecutar el servicio han sido recibidas (de ahora en adelante llamado EL CONTRATANTE). Ningún individuo o institución tiene derecho a dar instrucciones, particularmente con respecto al alcance de un servicio dado o al envío de reportes o certificados, a menos que sea autorizado por EL CONTRATANTE y aceptado por LA COMPANHIA. Sin embargo, LA COMPANHIA será considerada como autorizada irrevocablemente enviar a su discreción, los reportes o certificados a terceras personas, si se encuentra siguiendo instrucciones de EL CONTRATANTE.
4. LA COMPANHIA suministrará sus servicios de acuerdo con:
 - 4.1 Instrucciones específicas del contratante y confirmadas por LA COMPANHIA.
 - 4.2 Los términos del formato estándar de orden de servicios de LA COMPANHIA.
 - 4.3 Las prácticas comunes de comercio, uso y manejo.
 - 4.4 Los métodos que LA COMPANHIA pueda considerar apropiados en los campos técnicos, operacionales y/o financieros.
5. Todas las preguntas y órdenes por parte de EL CONTRATANTE de servicios deben estar acompañadas de suficiente información, especificaciones e instrucciones que le permitan a LA COMPANHIA evaluar y/o realizar los servicios requeridos.
6. Documentos que reflejen contratos entre EL CONTRATANTE y terceras personas, o documentos de terceras personas, tales como copias de contratos de venta, notas de crédito, conocimientos de embarque, etc., son considerados (si son recibidos por LA COMPANHIA) solamente como informativos, sin extender o restringir los compromisos aceptados por LA COMPANHIA.
7. Los servicios estándares de LA COMPANHIA pueden incluir todos o algunos de los mencionados a continuación:
 - 7.1. Inspección cualitativa o cuantitativa.
 - 7.2. Inspección de bienes, plantas, equipos, empaquetado, tanques, contenedores y medios de transporte.
 - 7.3. Inspección de carga y descarga.
 - 7.4. Muestreo.
 - 7.5. Análisis en el laboratorio u otro tipo de prueba.
 - 7.6. Estudios y auditorías
8. Servicios especiales cuando los mismos exceden el campo de servicios estándares referidos en la condición número 6, serán realizados por LA COMPANHIA, mediante acuerdos particulares. Los siguientes servicios especiales son ilustrativos y no excluyentes:
 - 8.1. Garantías cualitativas o cuantitativas
 - 8.2. Calibración de tanques, calibración métrica o mediciones
 - 8.3. Provisión de técnicos o algún otro personal.
 - 8.4. Inspecciones pre-embarque bajo regulaciones gubernamentales de importaciones o aduanas.
 - 8.5. Supervisión de proyectos industriales completos, incluyendo ingeniería y reportes de progreso.
 - 8.6. Servicios de Consultoría.
9. Sujeto a las instrucciones de EL CONTRATANTE y aceptadas por LA COMPANHIA, ésta última emitirá reportes y certificados del servicio realizado los cuales incluirán opiniones emitidas en el marco de las limitaciones de las Instrucciones recibidas. LA COMPANHIA, no está en obligación de referirse o reportar acerca de cualquier hecho o circunstancia fuera de estas instrucciones específicas recibidas.
10. Los reportes o certificados emitidos a partir de pruebas o análisis realizados a "muestras articulares", contienen las opiniones específicas de LA COMPANHIA de dichas muestras, y no expresan una opinión con respecto al total (lote) del material de donde éstas fueron obtenidas. Si se requiere una opinión acerca del material completo, se deberá coordinar en forma anticipada con LA COMPANHIA, la inspección y toma de muestras del total del material.
11. Obligaciones de EL CONTRATANTE:
 - 11.1 Asegurarse que las instrucciones dadas a LA COMPANHIA contengan la suficiente información y sean suministradas oportunamente, para disponer que los servicios requeridos sean realizados efectivamente.
 - 11.2 Procurará todo el acceso necesario a los representantes de LA COMPANHIA, para así permitir asegurar que todos los servicios sean realizados en forma efectiva.
 - 11.3 Suministrar, si es necesario, equipos especiales o personal para la realización de los servicios requeridos.
 - 11.4 Se asegurará que sean tomadas todas las medidas necesarias para la seguridad de las condiciones de trabajo e instalaciones, durante el desarrollo de los servicios y no se limitará solamente a atender las sugerencias de LA COMPANHIA en este respecto, sean o no solicitadas.
 - 11.5 Tomar todas las acciones necesarias para eliminar o resolver obstrucciones o interrupciones en la realización de los servicios contratados.
 - 11.6 Informar con anticipación a LA COMPANHIA acerca de riesgos o peligros conocidos, actuales o potenciales, relacionados con alguna instrucción e muestreo o análisis, incluyendo por ejemplo, la presencia de riesgo por radiación, elementos tóxicos, nocivos o explosivos; venenos o contaminación ambiental.
 - 11.7 Ejercer todos sus derechos y liberarse de todas sus obligaciones con respecto a algún contrato en particular, independientemente de si se han emitido reportes o no; debido al incumplimiento de LA COMPANHIA, en alguna de sus obligaciones.
 - 11.8 Puede permitir a la COMPANHIA delegar a su discreción la realización del trabajo para el cual fue contratada, en forma completa o parcial, a cualquier agente o subcontratista.
 - 11.9 Todos los técnicos y otro personal proporcionados por la Compañía en el ejercicio de cualquiera de los servicios siempre y en todo momento serán los empleados, agentes o subcontratistas (Como puede ser el caso) de la Compañía como tal, todas esas personas serán responsables y sujeto a las instrucciones de la Compañía en todo momento. Salvo acuerdo en contrario de la Compañía, estas personas no estarán obligados a seguir todas las instrucciones del CONTRATANTE.
 - 11.10 Si los requerimientos de EL CONTRATANTE exigen el análisis de muestras por parte de EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPANHIA emitirá los resultados pero sin responsabilidad por la exactitud de los mismos. Del mismo modo, cuando LA COMPANHIA solo actué como testigo en la realización del análisis por EL CONTRATANTE o por un tercer laboratorio, LA COMPANHIA dará confirmación de que la muestra correcta fue analizada, pero no tendrá ninguna responsabilidad sobre la exactitud de los resultados.
 - 11.11 Debido a la posibilidad de estratificación de algunas cargas y/o las limitaciones impuestas a nosotros por cerradas o restringidas sistemas de toma de muestras, LA Compañía no puede garantizar que estas muestras son representativas de la carga a bordo o los resultados de las pruebas obtenidos e informó sobre nuestros certificados de calidad son representativas de dicha carga.
 - 11.12 LA COMPANHIA tomará el debido cuidado y buena práctica en la realización de sus servicios y aceptará responsabilidad sólo cuando tales cuidados y prácticas no hayan sido ejecutados y se prueba algún, tipo de negligencia por parte de LA COMPANHIA.
 - 11.13 La responsabilidad de LA COMPANHIA respecto a quejas por pérdidas, daños o gastos de cualquier naturaleza, ocurridas en cualquier momento, debido a cualquier infracción al contrato o alguna falla en el cuidado y buena práctica por parte de LA COMPANHIA, no deberá en ninguna circunstancia exceder 10(diez) veces la tarifa o cantidad pagable con respecto al servicio especifico requerido, el cual a su vez está bajo un contrato en particular con LA COMPANHIA, que da lugar a las reclamaciones en cuestión. Sin embargo, LA COMPANHIA no tendrá responsabilidad con respecto a cualquier reclamo por pérdida indirecta o consecuente, incluyendo pérdidas de ganancias y/o negocios futuros y/o producción y/o cancelación de contratos en los cuales participa EL CONTRATANTE. En el caso que la tarifa o cantidad a pagar por servicio, se refiera a un grupo de servicios y el reclamo se sucede con respecto a uno de dichos servicios la tarifa deberá ser indicada, para el propósito de este numeral, mediante referencia al tiempo total involucrado en el desarrollo de cada servicio.
 - 11.14 El límite de responsabilidad de LA COMPANHIA bajo los términos de la condición número 14.2, puede ser aumentado por solicitud recibida con anterioridad a la ejecución de un servicio o como acuerdo por el pago de una tarifa más alta, equivalente a una fracción adecuada del incremento de la compensación.
 - 11.15 Todas las garantías, condiciones y otros términos implícitos por la ley o de derecho común son, en la máxima medida permitida por la ley, excluidas de las presentes Condiciones Generales.
 - 11.16 Nada de lo dispuesto en estas Condiciones Generales, limite o excluya la responsabilidad de la Empresa:
 - 11.16.1 en caso de muerte o lesiones personales resultantes de negligencia, o
 - 11.16.2 de cualquier daño o responsabilidad incurrida por el principal como resultado de fraude o tergiversación fraudulenta por la Compañía, o
 - 11.16.3 de cualquier responsabilidad que no puede ser restringida o excluida por la ley.
12. Esta condición 14 establece la totalidad de la responsabilidad financiera de la Compañía (incluyendo cualquier responsabilidad por los actos u omisiones de sus empleados, agentes y sub-contratistas) a la principal con respecto a cualquier incumplimiento de estas Condiciones Generales, cualquier uso que se haga por el director de los servicios y toda representación, declaración o acto delictivo u omisión (incluyendo negligencia) que surjan en relación con estas Condiciones Generales.
13. EL CONTRATANTE podrá garantizar que protegerá o indemnizará a LA COMPANHIA y sus representantes, empleados, agentes o sub-contratistas, frente a todos los reclamos hechos por terceros, respecto a pérdidas, costos por daños de cualquier naturaleza debido a reclamos o cualquier otra circunstancia relacionada con el desarrollo, intención de desarrollar o no desarrollo, de cualquier servicio, que exceda lo estipulado, según la condición número 14.
14. Cada empleada, agente o subcontratista de LA COMPANHIA, podrá tener el beneficio de las limitaciones de compensación o indemnización contenidas en estas Condiciones Generales y en consecuencia en los que a tales limitaciones respecta, cualquier contrato asumido por LA COMPANHIA es asumido no solo en su propio beneficio, sino también como agente y garante de las personas aquí mencionadas.
15. En el evento que surja cualquier problema o costo imprevisto durante la ejecución de algún servicio contratado, LA COMPANHIA podrá ser autorizada para realizar cobros adicionales para cubrir los costos para cubrir tiempo de trabajo adicional y gastos en los que necesariamente se incurra para cumplir con el Servicio.
16. EL CONTRATANTE pagará puntualmente en un plazo no mayor de 30 (treinta) días después de la fecha de emisión de la factura o dentro de cualquier otro plazo que halla sido acordado por escrito con LA COMPANHIA, todos los respectivos cargos hechos por LA COMPANHIA. El no cumplimiento del plazo acarreará el pago de intereses a razón de 15% anual a partir de la fecha de emisión de la factura hasta la fecha de pago más los gastos e impuestos producto de la demanda.
17. Todos los precios y las tasas debidas en virtud de las presentes Condiciones Generales, a menos que la compañía confirma por escrito, ser exclusiva de ningún valor añadido o impuesto sobre las ventas que se cobrará en adición a la tasa vigente que corresponda.
18. EL CONTRATANTE no está autorizado para retener o diferir el pago de cualquier suma que se le adeude a LA COMPANHIA, aduciendo alguna disputa o reclamos que pueda alegar en contra de LA COMPANHIA.
19. En el caso de cualquier suspensión de los compromisos de pago con acreedores, quiebra, liquidez, embargo o cesación de actividades por parte de EL CONTRATANTE, LA COMPANHIA podrá ser autorizada automáticamente para suspender el desarrollo de sus servicios y sin responsabilidad alguna.
20. En el caso que LA COMPANHIA sea prevenida, por alguna causa fuera de su control de efectuar o completar algún servicio acordado, EL CONTRATANTE pagará a LA COMPANHIA:
 - 20.1 Costos realizados o aún por hacer con el objeto de poder detener los trabajos.
 - 20.2 Una porción de la tarifa acordada equivalente a la proporción del servicio efectivamente realizado, quedando LA COMPANHIA dispensada de toda responsabilidad en absoluto, por la parcial o total no ejecución del servicio.
 - 20.3 LA COMPANHIA podrá ser dispensada de toda responsabilidad con EL CONTRATANTE, por reclamos de pérdidas o costos por daños dentro de los seis meses subsiguientes a la ejecución por parte de LA COMPANHIA de los servicios quedan lugar al reclamo, a menos que se estable una demanda o en caso se alegue la no ejecución de algún servicio, si no es durante los seis meses subsiguientes a fecha en que el servicio debió haber sido ejecutado.
21. Sin perjuicio de cualesquiera otros derechos o recursos que puede tener, la Compañía puede terminar cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales, sin que la principal responsabilidad de dar aviso de inmediato a la principal:
 - 21.1 Principal comete un incumplimiento sustancial de cualquiera de los términos de estas Condiciones Generales y (si esa violación es remediable) no remedia dicho incumplimiento dentro de los 30 días de la principal que se notificará por escrito de la violación, o
 - 21.2 se hace un pedido o se aprueba una resolución para la liquidación de la principal, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente para hacer una disolución de la principal
 - 21.3 se hace una orden, o los documentos que se presentan en un tribunal de jurisdicción competente, para el nombramiento de un administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o administrador para administrar los negocios, las empresas y la propiedad de la principal, o
 - 21.4 se nombra un receptor de cualquiera de los principales activos o empresa, o de circunstancias que autoricen un tribunal de jurisdicción competente o un acreedor de
22. nombrar a un síndico o administrador de la principal, o
23. Principal hace cualquier acuerdo o convenio con sus acreedores, o hace una solicitud a un tribunal de jurisdicción competente para la protección de sus acreedores en forma alguna, o
24. Principal cesa, o amenaza con cesar, al comercio, o
25. De la principal toma o sufre cualquier otra similar o análogo de acción en cualquier jurisdicción, en consecuencia, de la deuda.
26. En caso de cese de cualquier o todos los contratos para la prestación de servicios por cualquier razón:
 - 26.1 El Director de pagar inmediatamente a la Compañía todos los pendientes de la empresa las facturas impagadas e intereses y, en el caso de los servicios prestados, pero para los que no se ha presentado la factura, la empresa podrá presentar una factura, en la que se pagarán inmediatamente después de la recepción,
 - 26.2 los derechos adquiridos de las partes en cuanto a la rescisión no se verá afectada
 - 26.3 LA COMPANHIA no es un asegurador ni un garante y está liberada de responsabilidad con respecto a esas atribuciones. EL CONTRATANTE que requiera garantías contra pérdidas o daños, deberá obtener el seguro apropiado.
 - 26.4 Ninguna alteración, enmienda o renuncia a cualquiera de estas Condiciones Generales, tendrá algún efecto a menos que sean hechas por escrito y firmadas por un representante autorizado de LA COMPANHIA.
27. Si cualquiera de las disposiciones (o parte de una disposición) de las presentes Condiciones Generales se encuentra por cualquier tribunal u órgano administrativo de la jurisdicción competente para ser inválida, ilegal o inaplicable, las demás disposiciones seguirán en vigor.
28. Si cualquier inválida, inaplicable o ilegal disposición sería válida y ejecutable o jurídica, si alguna parte de ella se han suprimido, esta disposición se aplicará a cualquier modificación es necesaria para que sea válida y exigible y legal.
29. Cada una de las partes reconoce y acepta que, en la celebración de cualquier contrato de prestación de servicios de conformidad con estas Condiciones Generales no cuenta con ninguna empresa, promesa, garantía, declaración, representación, garantía o entendimiento (ya sea por escrito o no) de cualquier persona (ya sea por escrito en estas condiciones o no) relacionados con el objeto de estas Condiciones Generales, con excepción de lo expresamente establecido en el o mencionadas en las presentes Condiciones Generales.
30. Todos los contratos para la prestación de servicios entró en conformidad con las presentes Condiciones Generales se realizan para el beneficio de la Sociedad y la única y principal (en su caso) de sus sucesores y cesionarios autorizados y que no están destinados a beneficiar, o ser exigible por cualquier otra persona.
31. Avisos dados bajo las presentes Condiciones Generales se realizarán por escrito, enviado a la atención de la persona, y que dicha dirección o número de fax de la parte podrá notificar a la otra parte de vez en cuando y se entregarán personalmente, o enviarse por correo enviado por pre-pago, de primera clase de correo o correo certificado. Un aviso se considerará que se han recibido, en caso de entrega personal, en el momento de la entrega, en el caso de pre-pago o post de primera clase correo certificado, 48 horas a partir de la fecha de envío y, si se considera la recepción en virtud de la presente Condición 28 se no en el horario comercial (es decir, 9.00 a 5.30 pm de lunes a viernes en un día que es un día hábil), a las 9.00 horas en el primer día hábil tras la entrega. Para probar el servicio, es suficiente para demostrar que la notificación fue debidamente y se publicará.
32. Cualquier controversia o demanda que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de sus materias, se regirán e interpretarán de conformidad con las leyes del Estado Peruano.
33. Las partes irrevocablemente de acuerdo en que los tribunales del Estado Peruano no tendrá competencia exclusiva para resolver cualquier controversia o reclamación que surja de o en conexión con estas Condiciones Generales o de su materia

**ANEXO V: Resultados de análisis de cromatografía de gases
del crudo de petróleo**



SUPLEMENTO DE INFORME DE ENSAYO N° QPP-G-01082014(1)

Gas Natural

BPZ Exploración y Explotación



Quimpetrol Peru se dedica al Servicio de análisis de petróleo Crudo, Agua y Gas, tratamientos químicos en depósitos orgánicos, inorgánicos, control de corrosión. Servicio de Monitoreo y análisis Ambientales. Desarrollo de proyectos, Formando parte de una corporación Regional.

Nuestra sede se encuentra en Talara-Peru.



STAFF DE PROFESIONAL DE CAMPO Y LABORATORIO

QUIMPETROL PERU cuenta con recursos humanos constituidos por profesionales altamente calificados y entrenados, con una vasta experiencia en muestreo y análisis de muestras, y con los criterios para detectar problemas de contaminación ambiental que requiera ser analizada in-situ o en el laboratorio. Nuestro personal es evaluado y capacitado en forma permanente.

CERTIFICACIONES Y ACREDITACIONES

QUIMPETROL PERU posee certificados de calibración de los equipos para análisis de crudo y agua.

QA/QC

Hoy en día las empresas necesitan demostrar ante las autoridades, el cumplimiento estricto de sus operaciones con las exigencias de la legislación ambiental.

QUIMPETROL PERU asegura la validez de los resultados analíticos a través de un cumplimiento estricto de los estándares ISO. La aplicación de extensos Programas de Aseguramiento y Control de Calidad (QA/QC) permite garantizar y validar el dato analítico, logrando confiabilidad y consistencia de la información técnica.

Para cada grupo de muestras se realizan controles para asegurar la calidad de los resultados, como análisis de blanco de método, estándares de control de concentración conocida, adiciones de estándares a muestras reales y análisis de duplicados de muestras.

METODOLOGÍAS NORMALIZADAS Y VALIDADAS

QUIMPETROL PERÚ aplica métodos normalizados, publicados por organismos internacionales tales como APHA (Métodos Estándares), EPA y ASTM, los cuales son revisados y actualizados. Los métodos son validados, mediante la determinación del límite de detección, comprobación de la matriz, linealidad, exactitud, precisión y reproducibilidad.



TECNOLOGÍA

QUIMPETROL PERÚ posee Instrumental y Equipamiento de último nivel tecnológico que abarca todas las Matrices Ambientales: Agua, Suelo, y con la posibilidad de cubrir necesidades de distintos segmentos del mercado, sean estos de Hidrocarburos, Minería, Energía, Ingeniería, Pesca e Industria en general. Todos los equipos de medición utilizados en campo y laboratorio cuentan con un Programa de Calibración y Mantenimiento Preventivo, parte integrante de nuestro Sistema de Gestión de Calidad.



INFORME DE ENSAYO N° QPP-G-01082014

Datos del cliente	
Solicitante:	BPZ EXPLORACION & PRODUCCION S.R.L.
Dirección:	AV. EL DERBY NRO. 055 INT. 401 URB. LIMA POLO AND HUNT CLUB (EDIFICIO CRONOS - TORRE 1) LIMA - LIMA - SANTIAGO DE SURCO

Datos de muestreo			
Código de muestra	Origen de la muestra	Punto de muestreo	Suministrado por
GNBPZ	Separador de prueba	Pozo Caracol 1 X	Ing. Rigo Rojas

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Datos			
Equipo Utilizado	CROMATOGRAFO DE GASES VARIAN 450 GC	Unidad	Resultados
Fecha de muestreo	08/08/2014		
Hora de muestreo	12:00		
Fecha de análisis	18/08/2014		
Hora de análisis	09:30		
Compuestos Identificados/ Formula			
n- Metano	n-C1	%	96.6
n-Etano	n-C2	%	0.07
n- Propano	n-C3	%	0.05
i-Butano	n-C4	%	0.01
n-Butano	n-C4	%	0.02
n-Pentano	n-C5	%	N.D.(*)
n-Hexano	n-C6	%	N.D.(*)
n-Heptano	n-C7	%	N.D.(*)
n-Octano	n-C8	%	N.D.(*)
n-Nonano	n-C9	%	N.D.(*)
Nitrógeno	N2	%	3.25
Dióxido de Carbono	CO2	%	N.D.(*)

N.D. (*) No detectado por el Equipo

Condiciones Ambientales: Temperatura: 20.0 °C; Humedad relativa: 71 %



ANEXOS

Condiciones Cromatografías

Método 1

Para análisis de Gases Ligeros

- *Columna empacada: porapack N
 - *Temperatura de horno: temp. Inicial 40°C hasta 100 °C durante 0.5 min con rampa 15°C/min.
 - * Temperatura del inyector oncolumn: 60°C.
 - * Temperatura del detector TCD: 150°C.Tempfilamento:100°C.
 - * Temperatura del detector FID: 200°C.
- Carrier gas (He): 10PSI
Flujos al detector FID:
-Make-up (helio):25mL/min.
-Combustión (H₂):30mL/min.
-Combustión (air):300mL/min.

Límite de detección del FID: 0.0001ppm (w/v)

Método 2

Para análisis de hidrocarburos (gaseosos y líquidos)

- *Columna: rt - alúmina 30 x 0.53µm.
 - *Temperatura de horno: temp. Inicial 40°C hasta 120 °C durante 0.5 min con rampa 5°C/min.
 - * Temperatura del inyector split: 200°C.Split: 1/30
 - * Temperatura del detector FID: 300°C.
- Carrier gas (He): 3mL/min
Flujos al detector FID:
-Make-up (helio):25mL/min.
-Combustión (H₂):30mL/min.
-Combustión (air):300mL/min.

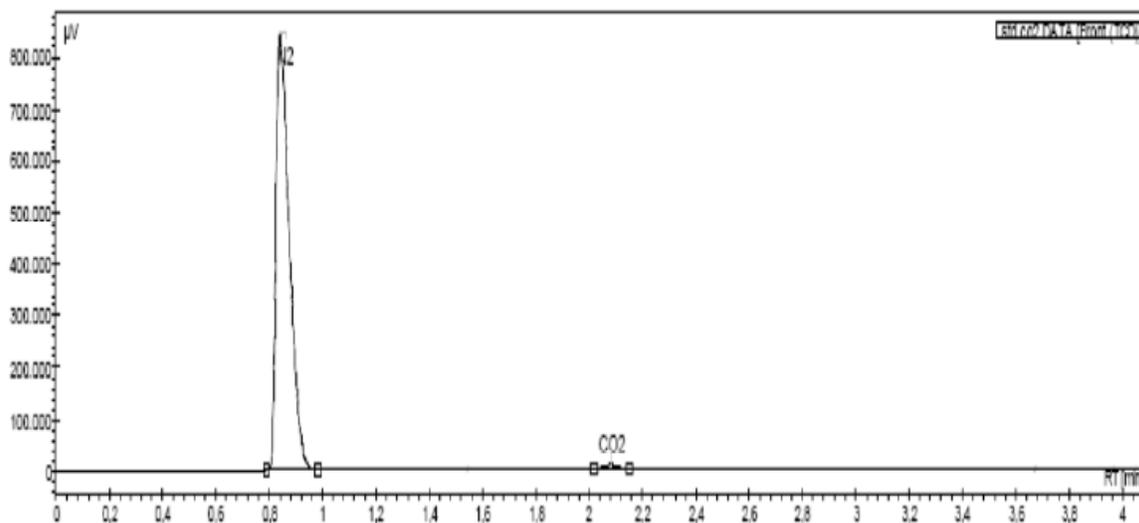
Límite de detección del FID: 0.0001ppm (w/v)



CROMATOGRAMAS DE ESTÁNDARES

a) Cromatogramas de los estándares de gases ligeros (Método 1)

Gráfica N°1: Cromatograma del Nitrógeno (N₂).

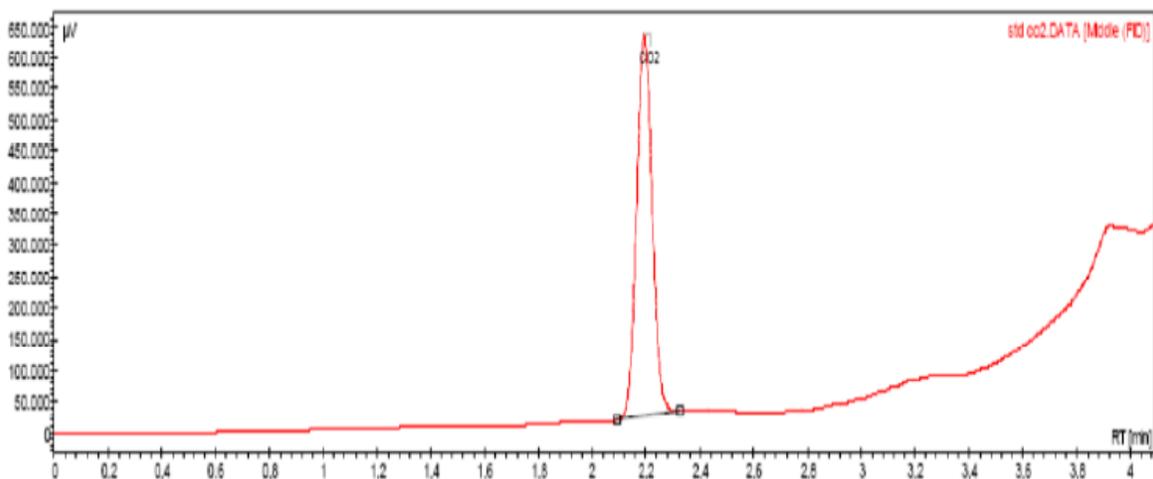


std co2.DATA [Front (TCD)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]
1	N2	0,84	843166,2	48740,5
2	CO2	2,08	6512,4	401,6
Total			849678,7	49142,2



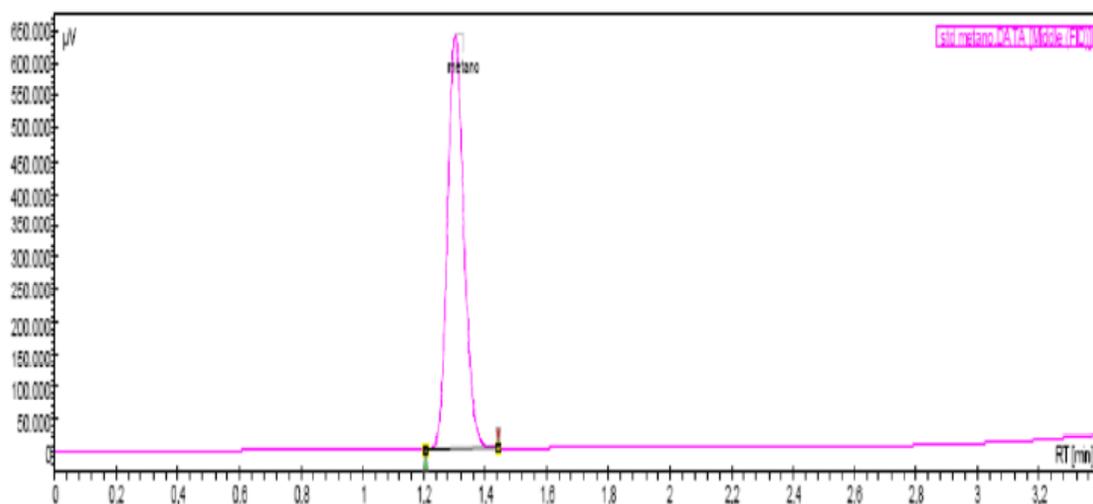
Gráfica N°2: Cromatograma del Dióxido de Carbono (CO₂).



std co2.DAT [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]
1	CO2	2.19	612503.5	40922.0
Total				
			612503.5	40922.0

Gráfica N°3: Cromatograma del Metano.



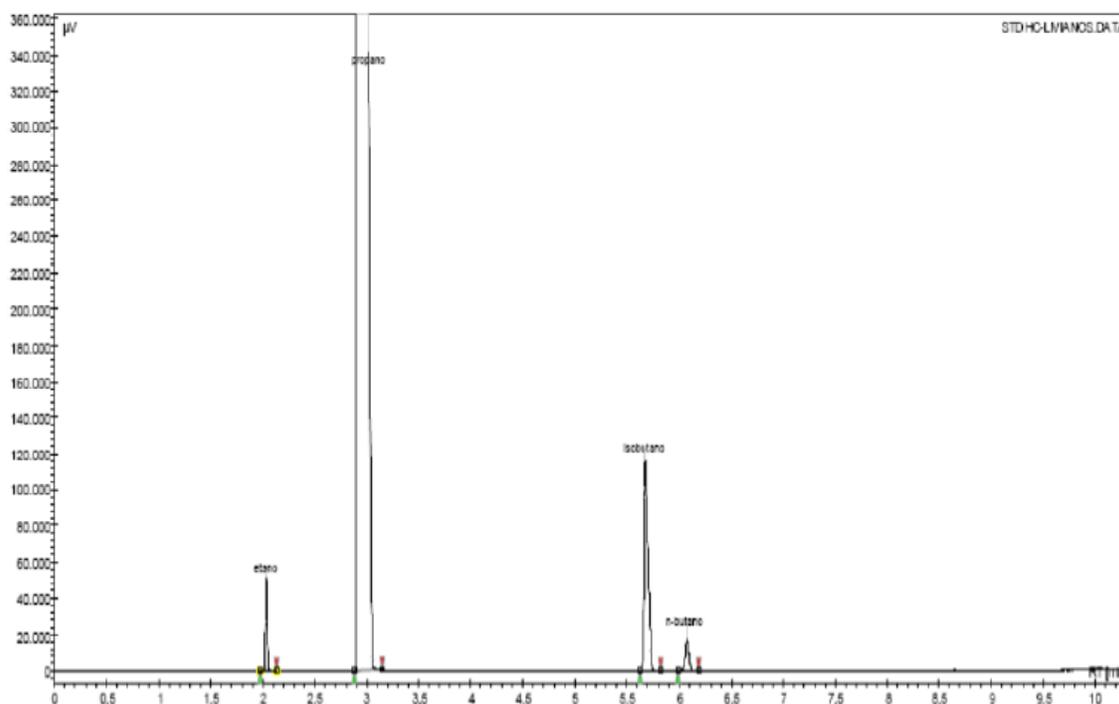


std metano.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μ V]	Area [μ V.Min]
1	metano	1.30	639459.4	39984.8
Total				
			639459.4	39984.8

b) Cromatogramas de los estándares de hidrocarburos gaseosos (Método 2)

Gráfica N°4: Cromatograma de hidrocarburos livianos: Etano, Propano, Butano.



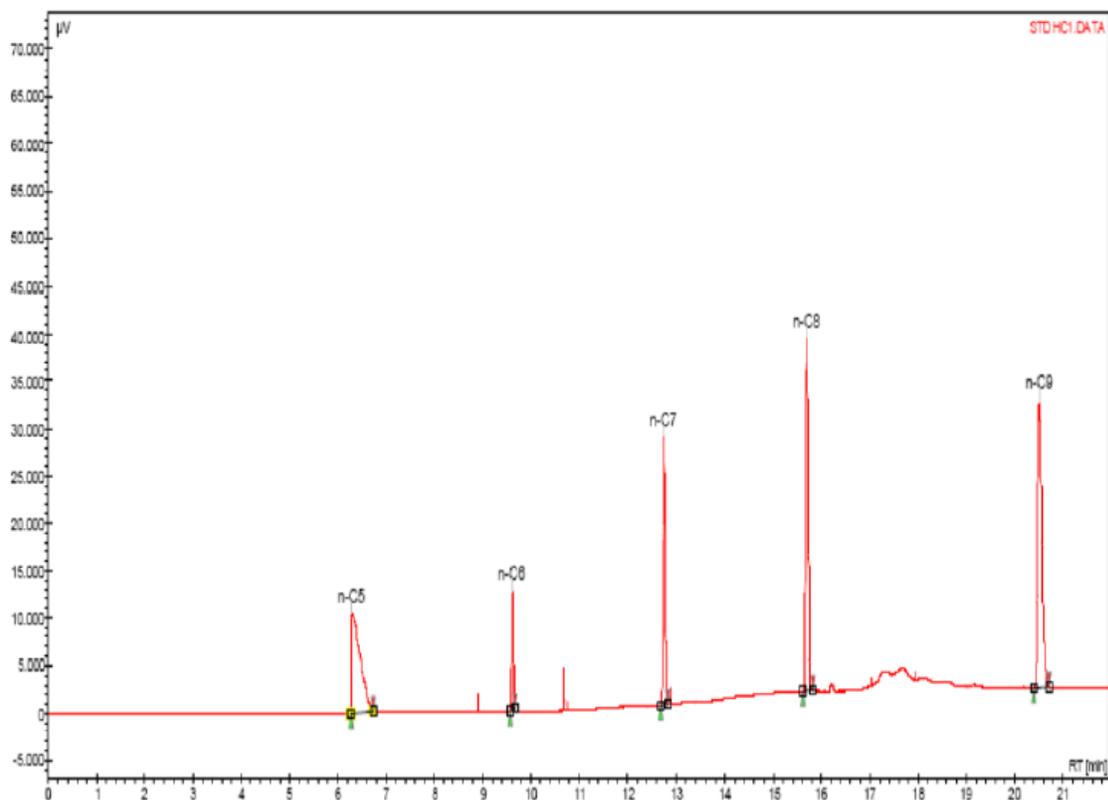


STD HC-LIVIANOS.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]
1	etano	2.04	51814,7	894,1
2	propano	2.90	5044654,1	320614,0
3	isobutano	5.68	115878,2	4826,7
4	n-butano	6.07	19245,4	721,4
Total			5231592,5	327056,3

c)Cromatograma de estándares de hidrocarburos líquidos (Método 2).

Gráfica N°5: Cromatograma de hidrocarburos pesados: Pentano, Hexano, Heptano, Octano y Nonano.





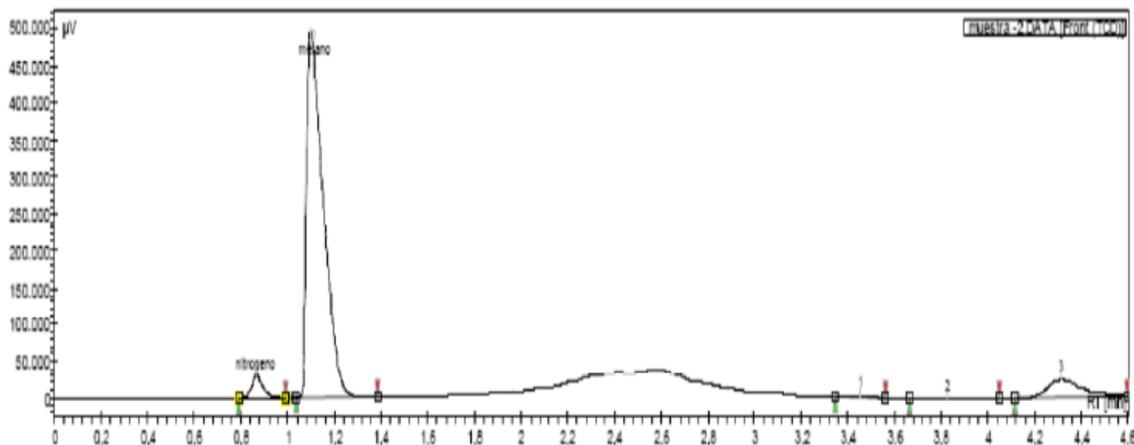
STD HC1.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]
1	n-C5	6,30	10283,1	2207,0
2	n-C6	9,62	12217,7	476,5
3	n-C7	12,76	28336,8	1098,6
4	n-C8	15,69	37379,0	1965,3
5	n-C9	20,52	30195,2	3039,9
Total			118411,7	8787,4

CROMATOGRAMAS DE LA MUESTRA

a) Cromatogramas de la muestra (Método 1)

Gráfica N°6: Cromatograma de la muestra para el Nitrógeno y Metano.

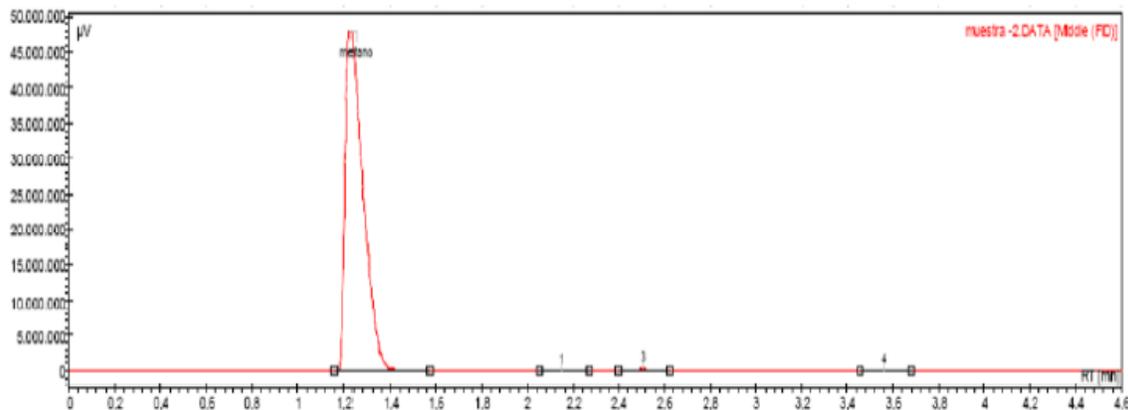




muestra -2.DATA [Front (TCD)]

Index	Name	Time [Min]	Height [µV]	Area [µV.Min]
1	nitrogeno	0,87	28471,8	1538,4
2	metano	1,10	497950,7	40894,4
3	1	3,46	1361,9	157,9
4	2	3,83	1050,1	132,8
5	3	4,31	24109,5	4055,4
Total			552944,1	46778,8

Gráfica N°7: Cromatograma de la muestra para el Dióxido de Carbono y Metano.



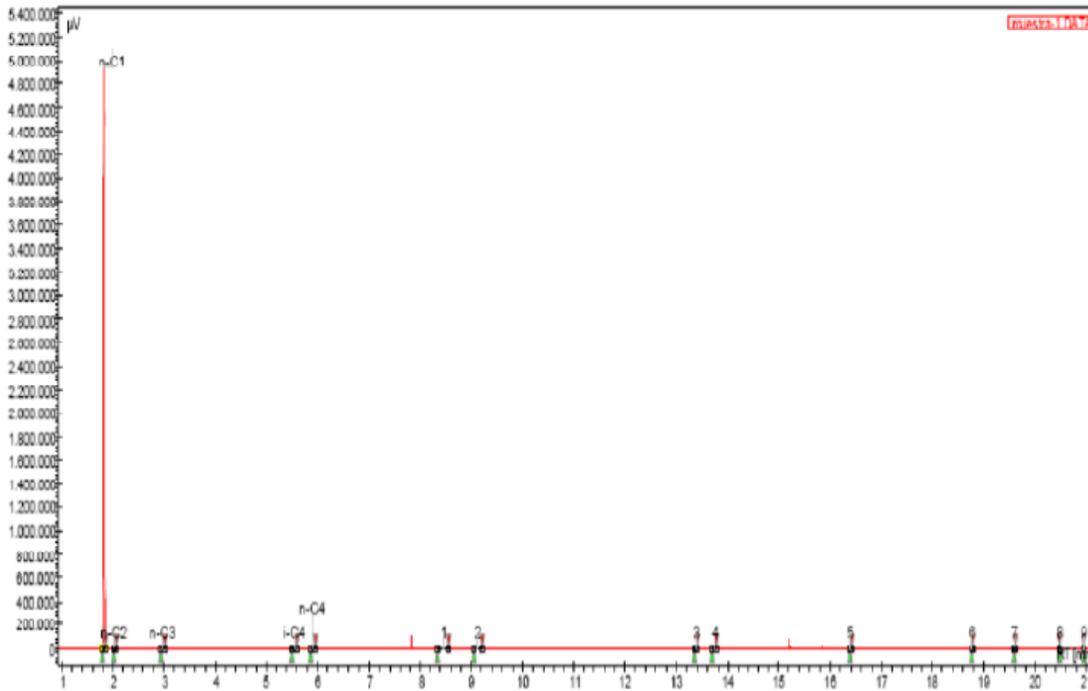
muestra -2.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [µV]	Area [µV.Min]
1	metano	1,23	47978905,6	4065671,5
2	1	2,15	70007,7	4663,5
3	3	2,50	180636,4	10589,1
4	4	3,56	127575,9	8454,3
Total			48357125,6	4089378,4



c) Cromatograma de la muestra (Método 2)

Gráfica N°8: Cromatograma de los hidrocarburos gaseosos y líquidos.





muestra-1.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Height [μ V]	Area [μ V.Min]	Area % [%]
1	n-C1	1.83	4942626.7	87971.2	99.426
2	n-C2	2.04	13520.3	234.5	0.265
3	n-C3	2.98	6111.7	158.8	0.180
4	i-C4	5.54	901.7	30.7	0.035
5	n-C4	5.90	1836.6	62.7	0.071
6	1	8.45	41.5	1.7	0.002
7	2	9.12	24.1	0.7	0.001
8	3	13.39	49.8	1.3	0.001
9	4	13.76	21.7	0.3	0.000
10	5	16.39	6.1	0.1	0.000
11	6	18.77	17.8	0.1	0.000
12	7	19.60	7605.5	16.7	0.019
13	8	20.49	4.0	0.0	0.000
14	9	20.95	8.2	0.1	0.000
Total			4972775.7	88479.0	100.000

Atentamente:

Olga Perales Navarro
Ingeniero de Procesos
Quimpetrol Peru

www.quimpetrolperu.com

ANEXO VI: Composición del Sabouraud Dextrose Agar

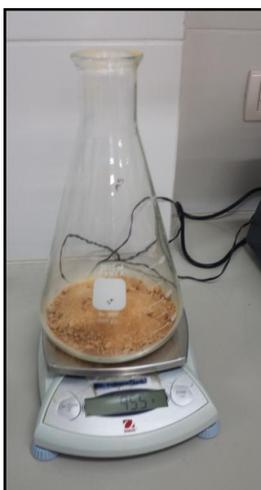
Identify Specifications	
Difco™ Sabouraud Dextrose Agar	
Dehydrated Appearance:	Light beige, free flowing, homogeneous
Solution	6.5% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium amber, very slightly to slightly opalescent
Prepared Appearance	Light to medium amber, slightly opalescent
Reacción of 6.5% Solution al 25°C	Ph 5.6 ± 0.2

Fuente: Difco, Manual of Culture Media

Formula: Difco™ Sabouraud Dextrose Agar	
Formula Aproximada por 1000 mL	
Componente	Peso
Péptico de tejido animal digerido	5.0 gr
Digerido enzimático de caseína	5.0 gr
Dextrosa	40.0 gr
Agar	15.0 gr

Fuente: Difco, Manual of Culture Media

Figura: Sabouraud Dextrose Agar utilizado en la investigación



Fuente: Elaboración Propia

ANEXO VII: Diagrama del diseño experimental

