



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO AFECTADO POR DERRAME DE ÁCIDO  
SULFÚRICO EN EL ASENTAMIENTO CAMPESINO EL ESPINAL FUNDO  
AMARANTO, YAGUA, ESTADO CARABOBO.**

**Autor: Ing. Zoraya A. Rodriguez V.**

**Bárbula, Marzo 2018**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO AFECTADO POR DERRAME DE ÁCIDO  
SULFÚRICO EN EL ASENTAMIENTO CAMPESINO EL ESPINAL FUNDO  
AMARANTO, YAGUA, ESTADO CARABOBO**

**Autor: Ing. Zoraya Rodriguez**

**C.I: 7.142.784**

**Tutor: Prof. Ing. M.Sc. Auxilia Mallia**

**Bárbula, Marzo 2018.**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO AFECTADO POR DERRAME DE ÁCIDO  
SULFÚRICO EN EL ASENTAMIENTO CAMPESINO EL ESPINAL FUNDO  
AMARANTO, YAGUA, ESTADO CARABOBO**

**Autor: Ing. Zoraya Rodriguez**

**Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Carabobo  
como requisito para optar por al título de Magister en Ingeniería Ambiental**

**Bárbula, Marzo 2018.**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este esfuerzo plasmado en este trabajo a mi hijo Nelson Enrique, por ser lo más importante en mi vida, y para que este logro sirva de motivación para cumplir las metas que se proponga en este peregrinar.*

*A mis seres queridos, Madre, Padre, Hermanas y sobrinas, por su amor para la culminación de una meta más en mi vida.*

*A mi amado esposo por su amor, comprensión, compañía, estímulo para este grado.*

*A los hombres y mujeres que trabajamos y soñamos por un país más digno y próspero para las actuales y próximas generaciones.*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios todopoderoso por permitirme dar este paso y por colocarme ángeles a mí alrededor que me apoyaron para cumplir esta meta.

A mis padres por darme la vida y por acompañarme en todas los momentos importantes de mi vida.

A mi Hijo, Nelson Enrique, motor principal para llevar a feliz término esta responsabilidad académica.

A mi esposo por su comprensión y apoyo durante gran parte de mi vida.

Al apoyo y orientación dado por mi tutora la Prof Ing. MSc. Auxillia Mallia por su motivación durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al equipo de trabajo de Fundacite Carabobo, en especial al Ing Robert Rivas, gran compañero y amigo por su apoyo incondicional.

A mi amiga y compañera de esta travesía, Ing. Andreina Meléndez, por incentivar me a terminar este trabajo, siempre con la frase “Si se puede”.

Al productor Ricardo Lara y a su esposa Amacelis de Lara por su compromiso incondicional en el desarrollo de esta investigación en sus predios.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, por ofrecer una oportunidad para mi formación académica.

## INDICE GENERAL

**Pág.**

Introducción.....		1
<b>Capítulo I</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	
I.1.	Descripción del problema.....	3
I.2.	Formulación del problema.....	7
I.3.	Objetivos.....	7
I.3.1.	Objetivo General.....	7
I.3.2.	Objetivos específicos.....	8
I.4.	Justificación de la investigación.....	8
I.5.	Alcance.....	9
<b>Capitulo II</b>	<b>Marco Teórico</b>	
II.1.	Antecedentes de la Investigación.....	10
II.2	Fundamentos Teóricos.....	15
II.3	Marco Legal.....	19
<b>Capitulo III</b>	<b>Marco Metodológico</b>	
III.1	Diseño y Tipo de Investigación.....	22
III.2	Fases de la Investigación.....	23
III.2.1	Fase Diagnóstica.....	23
III.2.1.1	Caracterización del suelo.....	23
III.2.2	Análisis de datos obtenidos.....	25
III.2.3	Aplicación de la técnica de biorremediación al suelo.....	25
III.2.4	Caracterización del suelo sometido a la técnica de biorremediación.....	25
<b>Capitulo IV</b>	<b>Análisis de Resultados</b>	
IV.1	Diagnosticar a través de un estudio histórico la afectación del suelo sobre el cual hubo derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino el espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo.....	26
IV.2	Realizar la caracterización física, química y microbiológica del suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico en el asentamiento campesino El Espinal Fundo Amaranto, sector Yagua, para determinar su estado actual.....	27

IV.3	Aplicar técnicas de biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico a fin de mejorar sus características y recuperar parte de su capacidad de fertilidad.....	33
IV.4	Evaluar el efecto de la biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico objeto del estudio.....	34
V	Conclusiones.....	36
VI	Recomendaciones.....	37
VII	Referencias bibliográficas.....	38

## INDICE DE TABLAS

**Pág.**

Tabla N.º 1	Resultados del análisis físico del suelo no afectado (suelo cultivado) por derrame con ácido sulfúrico.....	28
Tabla N.º 2	Resultados del análisis químico del suelo no afectado (suelo cultivado) por derrame con ácido sulfúrico.....	28
Tabla N.º 3	Resultados del análisis físico del suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico.....	29
Tabla N.º 4	Resultados del análisis químico del suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico.....	31
Tabla N.º 5	Contenido de bacterias características del suelo.....	33
Tabla N.º 6	Resultados del análisis físico del suelo biorremediado.....	34
Tabla N.º 7	Resultados del análisis químico del suelo biorremediado.....	35



## INDICE DE FIGURAS

**Pág.**

Figura N.º 1	Ubicación relativa local del municipio Guacara.....	6
Figura N.º 2	Ubicación geográfica del fundo el Amaranto en Yagua, Carabobo.....	7
Figura N.º 3	Tipos de biorremediación.....	17
Figura N.º 4	Triángulo para la estimación de la clase textural del suelo.....	30



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO AFECTADO POR DERRAME DE ÁCIDO  
SULFÚRICO EN EL ASENTAMIENTO CAMPESINO EL ESPINAL FUNDO  
AMARANTO, YAGUA, ESTADO CARABOBO**

**Autor:** Ing. Zoraya Rodriguez

**Tutor:** Ing. M.Sc. Auxilia Mallia

**Fecha:** marzo 2017

**RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo biorremediar un suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino El Espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo, a fin de disminuir el impacto ambiental por la acumulación de ácido sulfúrico en el suelo y con esto aprovechar la fertilidad del suelo con fines agrícolas. La investigación se tipifica como experimental. Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron inspecciones de campo para realizar un diagnóstico a través de un estudio histórico de la situación actual del suelo, se realizó una caracterización físico-química y microbiológica del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico, antes y después de la aplicación de la bioaumentación como técnica de biorremediación empleada, para ello se trabajó con el hongo entomopatógeno *Trichoderma harzianum*. Los resultados obtenidos demostraron que es posible recuperar el suelo contaminado, para fines agrícolas, pues se observó la eliminación de bacterias Fitopatógenas, aumento conductividad eléctrica, pH y textura del suelo en estudio.

**Palabras clave:** biorremediación, ácido sulfúrico, fertilidad del suelo, bacterias Fitopatógenas, hongo entomopatógeno.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**BIORREMEDIATION OF AFFECTED SOIL BY SULFURIC ACID SPILLOVER  
IN THE PEASANT SETTLEMENT EL ESPINAL FUNDO AMARANTO, STATE  
OF CARABOBO**

**Author:** Ing. Zoraya Rodriguez  
**Academic tutor:** Ing. M.Sc. Auxilia Mallia

**Date:** Marzo 2018

**SUMMARY**

The objective of this research was to bioremediate an affected soil by sulfuric acid spillover in the peasant settlement El Espinal Fundo Amaranto, Carabobo state, in order to achieve a decrease of the environmental impact by the accumulation of sulfuric acid in the soil and taking advantage its fertility for agricultural purposes. The suggested research design is documentary and field. In order to collect the information, the documentary review was used, direct observation to the process to know the current situation of the place, as well as process requirements and unstructured interviews to the producers with the purpose of making a diagnosis of the current situation of the soil, aside from the physical, chemical and microbiological characterization of affected soil by sulfuric acid spillover, before and after the application of bioremediation. The obtained results showed that it is possible to recover the affected soil for agricultural purposes, because it was observed the elimination of Phytopathogenic bacteria and the few changes, although not relevant, were observed in the physical and chemical characterization of the soil after the application of the remediation technique (bioaumentation) specifically in the properties of soil pH, texture and nutrients, as well as electrical conductivity.

Key words: bioremediation, contaminated soil, sulfuric acid, soil fertility, Entomopathogenic fungus.

## INTRODUCCIÓN

Los impactos ambientales negativos al medio ambiente pueden ser generados de maneras accidentales o provocadas, en ambos casos se causan importantes estragos, dichos daños pueden revertirse en la naturaleza pero va a depender de la magnitud de los mismos llegando a pasar años o siglos para que esto suceda. Estos impactos ambientales pueden ser en diferentes elementos, tales como: el agua, suelo, aire y en la vegetación principalmente.

En el suelo, en ocasiones ocurren derrames de sustancias peligrosas constituyendo una fuente importante de contaminación y/o afectación de este recurso, sin embargo en las últimas décadas se ha incrementado el interés por desarrollar tecnologías que ayuden a solucionar el problema de contaminación en este recurso, la mayoría de estos se han orientado a la utilización de métodos de biorremediación, cuyo proceso reduciría la contaminación del suelo y de esta manera se cuidaría la vegetación, la fauna y la salud del ecosistema (Fernández C., 2012).

Por lo anteriormente descrito se presentó el siguiente proyecto de investigación que pretendió biorremediar un suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico, en el Fundo el Espinal en Yagua, estado Carabobo, con el propósito de contribuir a la solución o minimización de daños en el medio ambiente.

Este proyecto desarrolló primeramente, el capítulo I, titulado problema de investigación, en donde se plantea el problema que motivó la investigación, la justificación, así como los objetivos tanto generales como específicos como pasos a cumplir para su ejecución. En el Capítulo II, titulado marco teórico, se presentaron las bases teóricas, así como los antecedentes que sirvieron como referencia para la investigación desarrollada. El marco metodológico se presentó en el Capítulo III el cual expone una descripción del tipo de investigación que se utilizó, además de las actividades que se llevaron a cabo para lograr los objetivos planteados de forma secuencial.

Siguiendo con el orden del presente proyecto, se presentó el Capítulo IV, titulado presentación y discusión de los resultados, donde se plasmaron los resultados obtenidos para cada objetivo planteado y, comparándose con los conocimientos referentes al tema, ofrecer una solución a la formulación del problema presentado durante este trabajo de investigación.

Y por último, pero no menos importante, se encuentran las conclusiones y recomendaciones, en donde se resumió el trabajo de investigación dando respuesta a los objetivos planteados, así como la propuesta de soluciones a las necesidades detectadas.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **I.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

La expansión continua de la población, su mayor concentración en grandes centros urbanos, el crecimiento en el desarrollo industrial y la explotación agrícola, muchas veces se hacen sin planificación tanto de parte de autoridades gubernamentales como de los inversionistas, en ambos casos, igual ocasionan, día a día, contaminación de aire, agua; además de contaminación de los suelos, ocasionando un impacto ambiental donde se ejerce la actividad.

La contaminación del suelo podemos definirla como la degradación de la calidad del mismo, producida principalmente por actividades antropogénicas. Esta contaminación puede aparecer por varias vías, una muy frecuente es la que ocurre al producirse derramamiento de alguna sustancia química, desechos urbanos (peligrosos o no) o radioactivos, vertidos incontrolados en campos petrolíferos, prácticas agrícolas inadecuadas, como puede ser el uso indiscriminado de agroquímicos para el manejo integrado de plagas y enfermedades, así como también el exceso y/o mala aplicación de fertilizantes o utilizar productos de mala calidad, el sobre pastoreo de ganado, filtraciones de rellenos sanitarios o de acumulación directa de productos industriales, actividades de fundición de la minería, entre otras causas. (Casanelas y colaboradores, 2014).

Además de lo anteriormente descrito, podemos mencionar que también el manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado un problema de contaminación de suelos, aire y agua no solo en nuestro país sino a escala mundial. Entre las más fuertes contaminaciones se destacan las que se produjeron y todavía se producen en países con industrias petroquímicas a causa de la extracción y el manejo del petróleo y ocurre en todos los países productores de hidrocarburos Otro

contaminante del suelo y que causa un severo daño al medio ambiente es la minería y para este trabajo que nos ocupa una contaminación y/o muy importante que no podemos dejar de lado es la producida por derrames de ácidos, pues es utilizado ampliamente en la industria química.

Este es un problema mundial, y un país que destaca es Colombia, allí el transporte de petróleo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 40 años por una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras, en este caso el daño en el recurso suelo viene dado porque los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación, penetración y/o percolación, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, y son éstas condiciones las que dificultan enormemente su tratamiento. La salinidad de los suelos afecta la producción de alimentos a escala mundial mostrando una tendencia a aumentar en los próximos años; éste fenómeno medioambiental, independientemente de las condiciones climáticas, ha acarreado procesos de degradación de los suelos perjudicando los rendimientos de cultivos de gran interés en la economía. El estrés salino provoca cambios fisiológicos y bioquímicos en el metabolismo de las plantas, que determinan su subsistencia así como su productividad en éstas condiciones, para lo cual las plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia (Lanz y colaboradores 2013). Los altos desniveles de salinidad así como afectan el metabolismo de las plantas también influye negativamente en el metabolismo de los microorganismos presentes en el suelo, puesto que pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados interfiriendo en el proceso natural de biorremediación.

El riesgo de la afectación de suelos es primariamente de salud, al entrar en contacto directo con fuentes de agua potable. La delimitación de las zonas

contaminadas y la resultante limpieza de ésta son tareas que consumen mucho tiempo y dinero, requiriendo extensas habilidades de geología, hidrografía y química.

En el presente trabajo se proyecta biorremediar un suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico, producto de una actividad desarrollada por una industria química que funcionó durante 10 años en lo que hoy es el fundo El Amaranto, parroquia Yagua, municipio Guacara del estado Carabobo. Este proceso de biorremediación es usado como una alternativa “saludable” frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de contaminantes; problemática que genera una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales.

El municipio Guacara, lugar donde se desarrolla el proyecto, se caracteriza al norte por tener montañas, pertenecientes a la Cordillera de la costa y al sur es más plano y se extienden sus linderos hasta orillas del lago de Valencia. Su ubicación geográfica la cual podemos observar en la figura N° 1. El Municipio presenta algunas variaciones en su clima debido a la diferencia de altura desde su extremo norte a su extremo sur. Al norte, en las elevaciones de la cordillera del Litoral, se localiza el clima tropical de altura con temperaturas mínimas del mes más frío, inferior a los 18 °C. y ligeramente superiores durante los meses menos fríos; este tipo de clima se localiza sobre los 1.000 metros de altura. Hacia el sur, tanto en el sector central como en el sur se presenta un clima tropical con abundante lluviosidad y nítida separación de los períodos de lluvia y sequía y el registro de altas temperaturas, a excepción del mes de enero cuando se aproxima a los 20 °C.

En el sector norte, del municipio donde se ubican las selvas pluviales con promedio de 1.000 msnm y por sus temperaturas intermedias, con respecto a las selvas nubladas y a los valles, y su alta lluviosidad, la vegetación es muy variada predominando especies arbóreas como el Cedro, el Saqui-saqui, el Apamate, el Mijao y el Pardillo. En las tierras bajas que bordean al lago, la vegetación ha sido intervenida por el proceso agrícola (donde se ubica el predio en estudio) y el



industrial. También encontramos especies que aún sobreviven como el Jobo, el Bucare, el Samán, el Indio Desnudo, Camoruco, Cedro y Mamón, entre otras.

## UBICACIÓN RELATIVA LOCAL



Figura N.º 1. Ubicación relativa local del municipio Guacara

Aunque las tierras del sector descrito, por su ubicación geográfica, tienen alta fertilidad, pues durante años se han utilizado para la agricultura, en el Fundo El Amaranto luego de estos derrames, que ocurrieron durante mucho tiempo, nos encontramos con que aproximadamente 1 ha del fundo, se encuentra inutilizada por la afectación del suelo, por derrame de ácido sulfúrico.

En la figura N.º 2, se observa la ubicación geográfica del Fundo Amaranto, sus linderos y vía de penetración. En esta figura también podemos observar la fuente natural de agua como lo es el río Yagua.

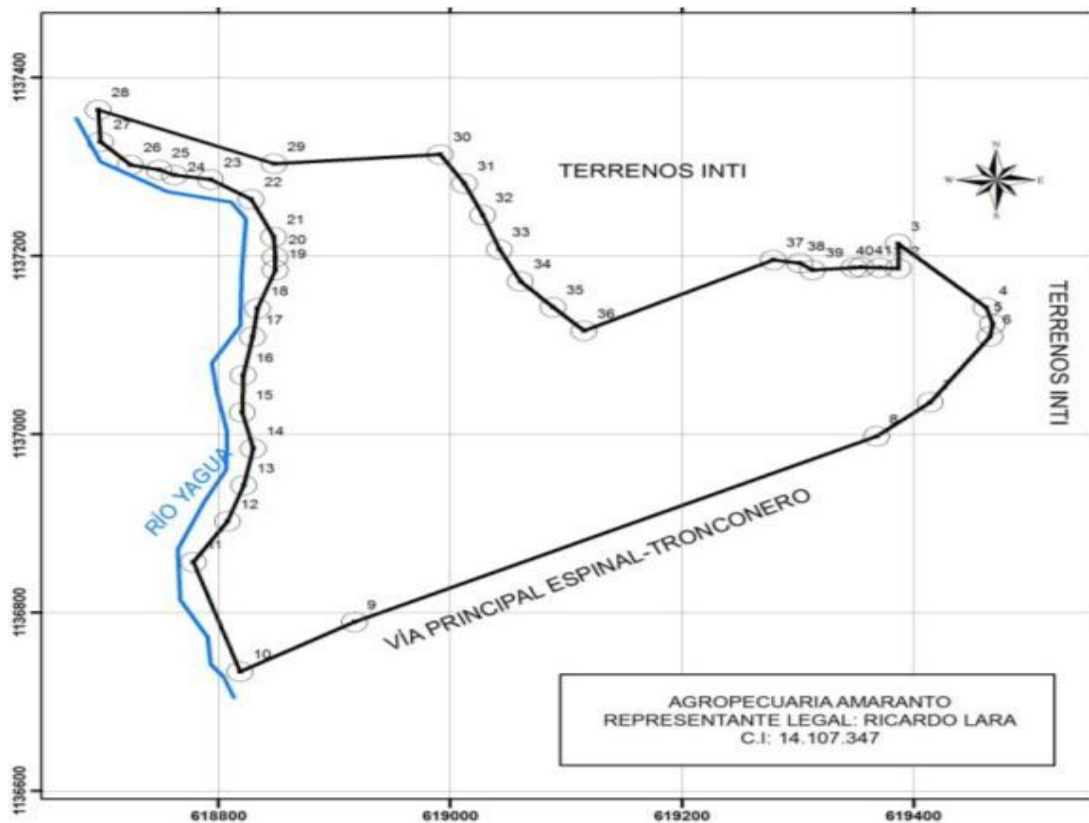


Figura N° 2 Ubicación geográfica del Fundo Amaranto, en Yagua Municipio Guacara, Carabobo.

## I.2. Formulación del problema

De acuerdo a la problemática planteada anteriormente, se plantean las siguientes interrogantes: ¿Se puede biorremediar un suelo afectado por derrames de ácido sulfúrico? ¿Cuales características del suelo se pueden ver afectadas por la biorremediación? ¿Este suelo biorremediado puede recuperar su vocación agrícola?

## I.3 OBJETIVOS

### I.3.1. Objetivo general

Biorremediar un suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino el espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo

### **I.3.2. Objetivos específicos**

I.3.2.1. Diagnosticar a través de un estudio histórico la afectación del suelo sobre el cual hubo derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino el Espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo.

I.3.2.2. Realizar la caracterización física, química y microbiológica del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino El Espinal Fundo Amaranto, sector Yagua, para determinar su estado actual.

I.3.2.2. Aplicar técnicas de biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico a fin de mejorar sus características y recuperar parte de su capacidad de fertilidad.

I.3.2.3. Evaluar el efecto de la biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico objeto del estudio.

### **I.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Debido a los requerimientos de evolución y/o desarrollo poblacional e industrial, que generalmente repercuten en la contaminación de suelos, se hace necesario realizar un estudio sobre el proceso de biorremediación de suelos, pues es un modo económico, tecnológico y natural de contrarrestar la contaminación y/o afectación de suelos, diferente a los procesos físicos y químicos de remoción de contaminantes, por otra parte, promover el diseño planteado en este proyecto permitirá a investigaciones relacionadas con este tema, estudios avanzados en relación a la manera más efectiva de recuperar el potencial de un suelo afectado por Ácido Sulfúrico.

Desde el punto de vista social, la investigación planteada en el proyecto, servirá de base a comunidades enteras o poblados, especialmente los del Sector El Espinal, Yagua Carabobo, que se han visto afectados por accidentes o derrames en suelos con ácidos, para recuperar de manera efectiva estos mismos medios que son centros de producción de alimentos. En muchas partes del mundo esta contaminación en suelos con vocación agrícola ha traído graves consecuencias pues luego de esa contaminación los suelos pierden muchas de sus propiedades y características, especialmente la capa vegetal que es donde se concentra la mayor actividad biológica y lugar donde se desarrollan principalmente las raíces de las plantas. Mediante ésta investigación grupos sociales pueden tener indicadores de la presencia de actividad microbiana y determinar si el proceso de biorremediación se está llevando a cabo.

## **I.5 ALCANCE**

Este proyecto se centra en aplicar el proceso de biorremediación (con la técnica de Bioaumentación) con el fin de disminuir la acumulación de ácido sulfúrico en el suelo, para disminuir el impacto ambiental y aprovechar su fertilidad con fines agrícolas. Experimentación realizada en los predios del Fundo Amaranto, sector El Espinal del municipio Guacara del estado Carabobo.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### II.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

A continuación se presenta los antecedentes más relevantes encontrados para el presente proyecto que sirvieron como sustento en la investigación del mismo.

**Cabarrubias y Colaboradores (2015)**, realizaron una investigación denominada: “*El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*” con el objetivo de exponer el incremento de la contaminación en México por metales pesados debido principalmente a la actividad industrial como la metalúrgica y la minería, la agricultura y las emisiones vehiculares, además, en algunos acuíferos por el aporte natural de minerales metálicos provenientes del material parental. En esta investigación, se evaluó la aplicación de la biorremediación por varios métodos, entre estos: métodos fisicoquímicos, que a pesar de ser eficientes, representan un costo económico y ambiental. También presenta métodos biológicos basados en el uso de las propiedades metabólicas de bacterias y hongos para la descontaminación de metales pesados como una opción complementaria a los métodos tradicionales. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre la diversidad microbiana de los sitios contaminados por metales pesados, pues es ahí donde pueden surgir cepas mejor adaptadas y con mejores capacidades para ser utilizadas en la biorremediación de estos contaminantes.

Este antecedente presenta similitud con el propuesto en el sentido que nos muestra varios métodos de recuperación de suelos, entre estos físico, químicos y biológicos (Biorremediación), llegando a la conclusión que estos últimos además de efectivos son económicos para reducir daños en un suelo contaminado.

**Balderas et al (2015)**, llevaron a cabo una investigación en América Latina, específicamente en México, donde trabajaron en suelo contaminado con alta concentración de aceite residual automotriz (ARA) que causó pérdida de su fertilidad. Una solución fue la biorremediación (BR) por doble y secuencial bioestimulación (BS) y posterior fitorremediación (FR) con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus*/*Burkholderia cepacia* o bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) para reducir el ARA remanente. El suelo contaminado con ARA se biorremedio por BS primero con solución mineral (SM), una segunda BS con *Phaseolus vulgaris* y BPCV incorporada como abono verde (AV), después por fitorremediación con *S. vulgare* y las BPCV para minimizar el ARA. Los resultados indicaron que la biorremediación del suelo por doble y secuencial BS: con SM el ARA decreció a 32500 ppm/30 días y con *P. vulgaris*; lo disminuyo hasta 10100 ppm/90 días. Su fitorremediación para minimizar el ARA remanente con *S. vulgare* y BPCV a floración lo redujo de 2500 ppm a 800 ppm. Esta investigación confirma que la mejor alternativa de biorestaurar un suelo impactado con elevada concentración de ARA es la integración de la BR/FR, que su aplicación por separado. Este trabajo se nos asemeja al presente en que busca recuperar la fertilidad del suelo contaminado a través de la biorremediación.

**Ramírez, M (2014)** realizó una investigación para evaluar el potencial como biorremediadoras de suelos contaminados con petróleo en 86 bacterias aisladas de la rizósfera de *Rhizophora mangle* 5 "mangle". En la selección se determinó la tolerancia al petróleo crudo ligero y la degradación del diesel; para lo cual las bacterias se cultivaron en medio mineral más el contaminante durante 21 días, a 28°C, con agitación constante (180 rpm). Se calculo el grado de turbidez y número de bacteria por ml, seleccionándose las bacterias hidrocarbonoclastas con una turbidez media de 6 en la escala de MacFarland y 106 UFC mL<sup>-1</sup>. La abundancia de hidrocarburos totales del petróleo crudo se determinó mediante cromatografía de gases acoplado de masas (GC:MS), obteniendo un valor inicial de 5000 uL mL<sup>-1</sup> y después de 21 días, 92% de degradación del petróleo crudo con *Pseudomonas* sp. y 9-4% de degradación del hidrocarburos de diesel con *Rhodococcus erythropolis*. Se

demonstró el potencial de estas bacterias para la biorremediación de zonas impactadas con petróleo.

**Mager y Valencia (2013)**, evaluaron en condiciones de invernadero la capacidad de *Panicum maximum* y *Urochloa brizantha* para biorremediar un suelo contaminado con crudo liviano al 3% m/m, así como los cambios en el tiempo del contenido de carbono microbiano (CM) y la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH). Se establecieron tres réplicas de cada pasto sembrado en envases con 20 kg de suelo contaminado con un crudo liviano. El control estuvo constituido de suelo contaminado y sin plantas. Muestras de suelo superficial (0-15 cm) fueron obtenidas a los 0, 30, 60, 120 y 240 días para estimar CM, ADH y el contenido de aceites y grasas. En los tratamientos con pasturas hubo una mayor reducción del contenido de aceites y grasas, aunque la tasa de fitorremediación obtenida en este estudio fue más lenta respecto a los resultados que se presentan en la literatura para la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en la capa arable del suelo. El CM y la ADH incrementaron en los primeros 60 días asociado a la degradación microbiana de compuestos biodisponibles; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin pastos y esto fue relacionado con la alta variabilidad de la data. Los resultados permiten concluir que pese al potencial de los pastos para disminuir la concentración de aceites y grasas en suelos contaminados, no hay evidencias claras de un mayor CM y ADH en los suelos contaminados con hidrocarburos livianos. En este trabajo podemos observar que se utilizan métodos de biorremediación para recuperar suelos contaminados y con ellos disminuir el impacto ambiental ocasionado por el hombre, con gran similitud con la investigación que se presenta.

**Zamora y colaboradores (2012)** evaluaron el “Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana”, el cual consistió en estudiar los cambios químicos y en la comunidad microbiana de un suelo contaminado con crudo mediano, y determinar la capacidad de restitución de la estructura funcional de las comunidades bacterianas luego de un

período de incubación en condiciones de laboratorio. Se estableció un grupo de microcosmos control (suelo sin contaminar) y otro con suelo contaminado con crudo mediano al 9 % p/p, y se incubaron durante 120 días. Se determinaron características químicas del suelo y la caracterización bioquímica de cepas bacterianas al inicio y al final del experimento. Se encontró que la contaminación con hidrocarburos ocasionó un aumento de la saturación con aluminio y disminución del pH, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico del suelo, modificación de la comunidad bacteriana y reducción de su diversidad por selectividad de grupos funcionales. Se concluye que la contaminación con hidrocarburos afecta la estructura funcional de la comunidad, pero aunque ésta no se restituye a su condición original, el funcionamiento del ecosistema no es afectado a largo plazo, ya que los procesos continúan ocurriendo.

**Ikkonen, et al (2012)**, estudiaron la producción de CO<sub>2</sub> asociada a la actividad de los microorganismos en suelos antropogénicos de chinampa, construidos por las culturas Pre-Hispánicas en México mediante la acumulación de materia orgánica, sedimentos lacustres limosos o por diferentes materiales utilizados para consolidarlos en islotes separados por un sistema de canales. Se tomaron muestras de suelo a las profundidades de 0-7, 7-18, 18-30, 30-40 y 40-50 cm para evaluar la sensibilidad a la temperatura de la producción de CO<sub>2</sub> y su variación en relación con la profundidad del suelo, la humedad y la disponibilidad de oxígeno. Se incubaron en condiciones aerobias y anaerobias a temperatura controlada (-5, 0, 5, 10, 20 y 30 °C) y a humedad controlada de 10, 30, 60 y 90% de las condiciones de saturación en agua del espacio poroso del suelo. Para todas las profundidades del suelo, temperaturas de incubación y humedad del suelo, la velocidad promedio de producción de CO<sub>2</sub> fue de 58.0 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en condiciones aerobias y de 31.2 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en condiciones anaerobias, obteniéndose la mayor producción de CO<sub>2</sub> en las muestras de suelo de la capa de 0-7 cm de profundidad. La disminución en el contenido de carbono orgánico del suelo inhibió la producción de CO<sub>2</sub> asociada a la actividad de los microorganismos del suelo con mayor intensidad bajo condiciones anaerobias que aerobias. A temperaturas inusualmente bajas o altas para el área de estudio, la



dependencia de la producción aerobia de CO<sub>2</sub> con respecto a la humedad del suelo aumentó. Puesto que la respuesta de la producción de CO<sub>2</sub> a la temperatura fue menor bajo condiciones anaerobias que aerobias, el aumento en el contenido de humedad del suelo condujo a la disminución de la sensibilidad a la temperatura de la producción del CO<sub>2</sub>. En condiciones limitantes de cualquier factor, la respuesta de la actividad microbiana a otros factores puede modificarse como se muestra a continuación: (i) el aumento de la anaerobiosis en el suelo aumenta el efecto limitante de la disponibilidad de sustrato sobre la actividad microbiana; (ii) bajo estrés de temperatura, la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> se hace más dependiente de la humedad del suelo; (iii) bajo el estrés de sequía, la sensibilidad de la producción de CO<sub>2</sub> a la temperatura es máxima.

Este trabajo desarrollado en México se asemeja al propuesto en que evaluaron la biorremediación por la actividad de microorganismos presentes y se diferencia en que se hacen evaluaciones del suelo a diferentes profundidades, mientras que en este proyecto se plantea utilizar muestras de suelo a una misma profundidad.

**Arrieta O. y colaboradores (2012)** realizaron en Medellín Colombia un estudio donde se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente un consorcio bacteriano capaz de degradar los diferentes hidrocarburos presentes en un combustible diesel, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguicater soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, a partir de un suelo contaminado con diesel a escala de laboratorios, y tratado mediante dos tecnologías de biorremediación: atenuación natural y bioestimulación. Se definió como parámetro de control la concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y para el cual, se obtuvo una reducción en la concentración en un período de 4 meses de 36,86% para atenuación natural y 50,99% para bioestimulación. La medición de la eficiencia de remoción de hidrocarburos se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a masas.

Esta investigación se asemeja a la presentada en esta propuesta, en el sentido que se hace un estudio a escala de laboratorio de la actividad bacteriana empleada en biodegradar contaminantes del suelo. Otras similitudes son la evaluación de suelos sin tratamiento, la cuantificación de la biorremediación por atenuación natural y la evaluación de suelos bioestimulados.

**Méndez M, y Colaboradores (2011)**, llevaron a cabo una investigación cuyo objetivo fue cuantificar los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en muestras de suelos tomadas de un patio de tanques en desuso localizado en Catia La Mar-Venezuela. Para realizar el análisis las muestras se recolectaron, almacenaron y sometieron a extracción Soxhlet usando n-pentano como solvente. Posteriormente, los extractos fueron inyectados en un Cromatógrafo de Gases con un detector FID para cuantificar la concentración de hidrocarburos. El valor de TPH más alto encontrado es 2426 mg/kg de suelo y el más bajo 410 mg/kg suelo. Adicionalmente, con los datos obtenidos, se realizó un estudio multifactorial de los valores de TPH, con lo que se corroboró que los valores encontrados en todas las muestras analizadas, están por debajo de los límites permitidos por la legislación venezolana.

Este trabajo se presenta como una investigación que demuestra que el uso de sustancias químicas aunque son necesarias para el desarrollo industrial de una nación, su uso debe hacerse comedido pues los daños al ambiente son tan altos que tendrán que pasar muchos años para que el suelo recupere sus condiciones naturales.

## **II.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. Sin embargo, este proceso es muy lento y puede acelerarse introduciendo determinadas bacterias o plantas en los ambientes contaminados. Esta intervención se denomina “biorremediación” o “biocorrección” y se define como el

empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. La biorremediación, como técnica medioambiental se utiliza para el tratamiento de aguas residuales, para descontaminar el aire o el agua, también para la limpieza de suelos que hayan recibido contaminantes. En el suelo, los contaminantes que se tratan de limpiar son fundamentalmente hidrocarburos procedentes sobre todo del petróleo utilizando microorganismos presentes en el medio como las bacterias, principalmente *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Pseudomonas*, o de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*. Estas bacterias eliminan los hidrocarburos al digerirlos en su metabolismo.

La biodegradación puede producirse en presencia de oxígeno (en condiciones aerobias) o sin él (en condiciones anaerobias). En la mayoría de los entornos subterráneos se produce la biodegradación de contaminantes tanto en forma aerobia como en forma anaerobia. Los microorganismos descomponen los contaminantes orgánicos en productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua en el caso de la biodegradación aerobia. Una vez degradados los contaminantes, la población de microorganismos disminuye porque ha agotado su fuente de alimentos (Rittmann y McCarty, 2001).

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos. Actualmente se están desarrollando microorganismos, algas (especialmente cianobacterias o algas azules) y plantas genéticamente modificadas para ser empleadas en biorremediación.

Una de las ventajas más importantes de la biorremediación: es un proceso natural, la recuperación de los productos remediados es principalmente inofensiva y los suelos descontaminados pueden ser reutilizados (Testa et al., 1991). La biorremediación es una atractiva técnica empleada en la limpieza de hidrocarburos del petróleo derramados en el suelo y de cualquier otra sustancia química; debido a

que es de simple mantenimiento, es aplicable sobre grandes extensiones, es de bajo costo y permite completar la eliminación del contaminante.

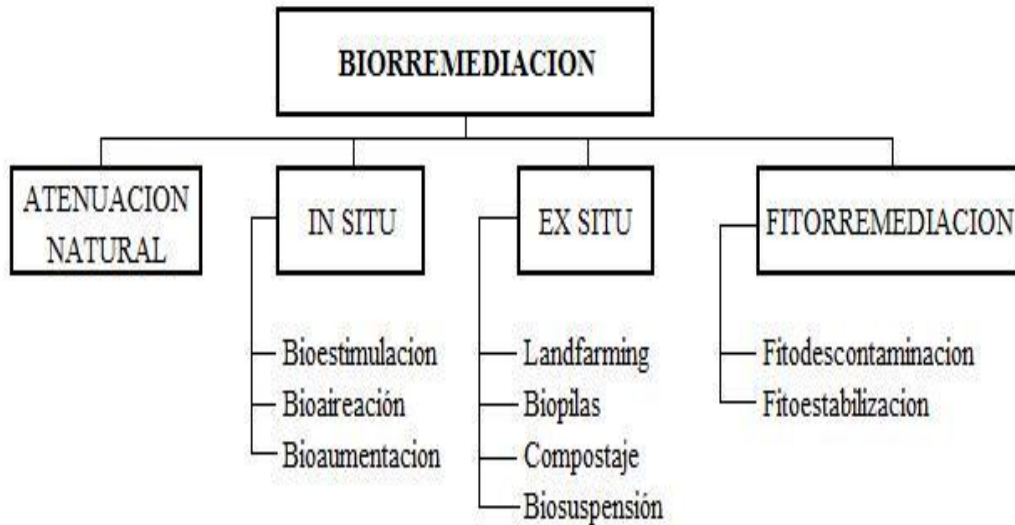


Figura N 3: Tipos de Biorremediación  
Fuente: Coria y De La Vega 2011

La biorremediación es un método muy empleado en el suelo, si la concentración de los contaminantes es moderada y las técnicas de carácter químico o físico no son económicamente aplicables. La elección del método de biorremediación depende del tipo, movilidad y concentración del contaminante y del futuro empleo del suelo (Maiké y Filser, 2007).

Los procesos de biorremediación pueden ser divididos en tres clases. Primero, en atenuación natural, donde la concentración de contaminantes es reducida por los Microorganismos nativos del suelo. Segundo, el empleo de la bioestimulación, donde se adicionan nutrientes y oxígeno al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación. Finalmente la bioaumentación, en donde se inocula el sistema con un microorganismo apropiado (Salinas et al., 2007). Se puede ver representado en la figura N 3.

El diesel es un hidrocarburo contaminante que puede llegar a matrices ambientales por diferentes fuentes y generar un gran impacto ambiental negativo. En este trabajo, el principal objetivo fue evaluar la biorremediación con bioestimulación y bioaumentación como metodología para la recuperación de suelos contaminados con diesel. Los ensayos se realizaron con muestras de suelo obtenidas de un lugar con historial de contaminación. Se llevaron a cabo 3 enfoques; atenuación natural bioaumentación con microorganismos aislados a partir del suelo y bioestimulación con nutrientes o con cascara de banano y durante 30 días se monitoreó la concentración de microorganismos, y de hidrocarburos dando como resultado que el mejor tratamiento fue el de adición de nutrientes con cáscara de banano, logrando una degradación del 93%, la más alta con respecto a los otros tratamientos. Los resultados sugieren que una adecuada aplicación de nutrientes contribuye al desarrollo de la población microbiana en el suelo con capacidad de degradar diesel, aumentando la efectividad del proceso. (Rodríguez N. y Colaboradores 2012).

En las últimas dos décadas se ha incrementado el interés por desarrollar tecnologías que ayuden a solucionar el problema de los suelos contaminados, la mayoría de éstas se han orientado hacia los procesos de remediación *in situ*, dentro de los cuales se ha propuesto a la electrorremediación por su capacidad de remover contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. El concepto de electrorremediación de suelos es aparentemente simple, sin embargo, al encontrarse involucrados diversos procesos fisicoquímicos, así como características del suelo se eleva la complejidad de la técnica. Se han desarrollado técnicas mejoradas para aumentar la eficiencia de la tecnología. Las mejoras se enfocan en el control del pH para mantener los contaminantes en solución, en utilizar materiales y arreglos de electrodos adecuados para cada caso, en facilitar la desorción de los contaminantes del suelo y en el acoplamiento de biotecnologías en el caso de contaminantes orgánicos, que ayuden a la degradación de los mismos. La electrorremediación tiene un gran potencial para descontaminar diversos tipos de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos en un amplio rango de concentraciones. Aunque en diversos estudios, tanto de laboratorio como de campo se han obtenido buenos resultados, todavía es necesario avanzar en las investigaciones para tener un mejor entendimiento de los

fenómenos de transporte involucrados. De esta manera se podrán desarrollar en el futuro mejores técnicas híbridas que aprovechen las capacidades de la electroremediación y obtener altas eficiencias de remoción en campo. (De La Rosa y colaboradores 2007).

En Ecuador, Toledo B. en el año 2009, utilizó dos técnicas de remediación de suelos: biorremediación (intervención de bacterias) y fitorremediación (uso de plantas para recuperar la capacidad del suelo) y encontró que debido a que los sitios contaminados por lo general no presentan la actividad biológica necesaria para que se produzca la degradación de los contaminantes, es conveniente introducir al medio, microorganismos, cuya efectividad haya sido probada previamente, bien sea en actividades de campo y/o en laboratorio. También concluyó que al dejar el suelo sin tratar, es decir, permitir la atenuación natural, requeriría demasiado tiempo y dependiendo de las concentraciones y tipo de contaminante no se puede asegurar la recuperación del suelo puesto que algunos componentes no son degradables total o parcialmente, esto porque en la atenuación natural actúan solo los microorganismos presentes naturalmente en el suelo.

## **II. MARCO LEGAL**

Años atrás, las malas prácticas empleadas en la explotación de hidrocarburos y el manejo de sustancias químicas y la ausencia de un marco legal apropiado, afectaron la calidad de muchos recursos naturales, entre estos el suelo. En la actualidad la principal causa de contaminación del suelo con sustancias químicas, se debe principalmente a imprudencias de los seres humanos. Estas circunstancias, originan la necesidad de recomponer el suelo contaminado siendo la biorremediación, una de las técnicas más empleadas para su restitución. Por lo anteriormente descrito, en otros países existe legislación vigente que busca que se haga un uso eficiente del recurso suelo, sin embargo en Venezuela aún no existe una ley que establezca los procedimientos para identificar la contaminación en suelos, ni los niveles de fondo, genéricos y de limpieza de contaminantes.

Para efectos del presente trabajo de investigación se procedió a considerar los fundamentos legales establecidos en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, leyes en materia ambiental y normativas ambientales aplicables en la región:

CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
Año 1999. Título III de los derechos humanos y garantías, y de los deberes, específicamente el capítulo IX (De los Derechos Ambientales), en los artículos 127 y 128.

La Ley Orgánica del Ambiente del año 2006, regula la conservación y la prevención y control del uso de suelos a través de los artículos que se describen a continuación:

Gestión integral del suelo y del subsuelo:

Artículo 61: La gestión integral del suelo y del subsuelo está orientada a asegurar su conservación para garantizar su capacidad y calidad.

Conservación del suelo y del subsuelo:

Artículo 62: La gestión para la conservación del suelo y del subsuelo debe realizarse atendiendo a los lineamientos siguientes:

La clasificación de los suelos en función de sus capacidades agroecológicas. El uso y aprovechamiento del suelo y del subsuelo debe realizarse en función a su vocación natural, la disponibilidad y acceso a las tecnologías ambientalmente seguras, a fin de evitar su degradación.

La adopción de medidas tendientes a evitar y corregir las acciones que generen erosión, salinización, desertificación o modificación de las características topográficas y otras formas de degradación del suelo y del paisaje.

La restauración y recuperación del suelo y del subsuelo que haya sido afectado por la ejecución de actividades.

#### Prevención y control

Artículo 63: A los fines de la conservación, prevención, control de la contaminación y degradación de los suelos y del subsuelo, las autoridades ambientales deberán velar por:

1. La utilización de prácticas adecuadas para la manipulación de sustancias químicas y en el manejo y disposición final de desechos domésticos, industriales, peligrosos o de cualquier otra naturaleza que puedan contaminar los suelos.
2. La realización de investigaciones y estudios de conservación de suelos.
3. La prevención y el control de incendios de vegetación.
4. El incremento de la cobertura vegetal a través de la reforestación.



## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

En este capítulo se describe la metodología a utilizar en el desarrollo de la investigación, se hace referencia al tipo de investigación, diseño de la investigación y los pasos a seguir para alcanzar los objetivos planteados en la presente investigación.

#### **III.1 DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El diseño de la investigación que se lleva a cabo es experimental, ya que se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas-antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador. (Hernández et.al., 2010). Esto es entonces, someter al suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico al tratamiento de biorremediación, para que como resultado se evalúe si se puede recuperar el suelo con fines agrícolas, evaluando los parámetros del suelo tales como pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, Potasio, Calcio, Sodio y magnesio.

De acuerdo con los objetivos planteados, la investigación es de tipo descriptiva, ya que buscan especificar las propiedades, las características y los perfiles de personas, grupos, comunidades, procesos, objetos o cualquier otro fenómeno que se someta a un análisis. Es decir, únicamente pretenden medir o recoger información de manera independiente o conjunta sobre los conceptos o las variables a las que se refieren, esto es, su objetivo no es indicar cómo se relacionan éstas. (Hernández et. al., 2010), por ello, se realiza el diagnóstico del suelo contaminado con ácido sulfúrico y su caracterización físico- química y

microbiológica para la posterior aplicación de la técnica de biorremediación utilizada como lo es la bioaumentación.

### **III.2 FASES DE LA INVESTIGACIÓN**

Para llevar a cabo los objetivos planteados fue necesaria la preparación previa de diversos pasos que anteceden su realización. En esta etapa se describieron las actividades a realizar antes de llevar a cabo cada objetivo y aquellas que se tienen que efectuar al finalizar la ejecución de los mismos.

#### **III.2.1 Fase diagnóstica**

Se realizó un diagnóstico de las condiciones del suelo contaminado con ácido sulfúrico dentro de los predios del Fundo El Amaranto, para ello se recabó información de campo y con esta determinar las condiciones actuales del suelo. También se realizaron reuniones periódicas con los productores agrícolas que hacen vida en el Fundo El Amaranto. Acá se aplicó entrevista no estructurada

##### **III.2.1.1. Caracterización del suelo**

- i) **Preparación del terreno**, en esta investigación se seleccionó el muestreo sistemático, en el cual se establece cierta distancia para ubicar los puntos diagnóstico de suelos pudiéndose ubicar de acuerdo a las dimensiones del terreno, el mismo tiene 32 ha., de las cuales 1 ha es donde se observa el suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico; dentro de esta hectárea se seleccionó 1m<sup>2</sup> que es donde se aplicara la bioaumentación como técnica de biorremediación empleada. Seguidamente se procedió a la limpieza del área y división del terreno (en forma de cuadrícula) e identificación con números las partes de donde se tomaron las muestras. Colocando al lado del punto de muestreo una hoja de plástico donde se depositaría la muestra a recolectar,

esta muestra es de los primeros 30 cm del suelo pues es allí donde se desarrollan principalmente las raíces de las plantas.

- ii) **Muestreo**, la cantidad de muestra a tomar se realizó en función del análisis a realizar. Para la caracterización química se necesitó una cantidad de 50 g por cada prueba, para la caracterización física de 500 a 2000 gramos y para las pruebas microbiológicas 100 gramos por lo que se tomó 1500 gramos/muestra. Dichas muestras se tomaron con ayuda de barrenos (introduciendo hasta 30 cm, que es una profundidad adecuada pues es allí donde se desarrolla la capa vegetal y sacando directamente la muestra), de palas y espátulas. Previo a la toma de muestras se descontaminó los dispositivos de muestreo entre muestras sucesivas lavándolo con agua y cloro.
  
- iii) **Traslado y almacenamiento de muestras**, las muestras se guardaron en bolsas de polietileno previamente identificadas con un formato que contiene toda la información necesaria para el posterior análisis en el laboratorio. El almacenamiento de muestras se realizó en frío a una temperatura de 4 °C. Las muestras se analizaron de acuerdo al máximo tiempo permisible en el que las muestras se consideraron como válidas.
  
- iv) **Laboratorio**, se llevaron al laboratorio especializado (laboratorio de edafología) las muestras de suelos afectados por derrame con ácido sulfúrico para la realización de análisis físico, químicos y microbiológicos, en el Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas (INIA Aragua).

### **III.2.2 Análisis de datos obtenidos**

Análisis de los resultados obtenidos del laboratorio, luego se propuso utilizar la técnica de bioaumentación en el suelo contaminado, analizando las ventajas y desventajas de la misma.

### **III.2.3. Aplicación de técnica de biorremediación al suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico**

En este punto se aplicó al suelo la técnica de biorremediación seleccionada: Bioaumentación, la misma consistió en aplicar la cepa del hongo entomopatógeno, *Trichoderma Harzianum* en 1m<sup>2</sup> de terreno contaminado y seleccionado por un periodo de tres (3) meses, dos veces por semana. La cepa comercial del hongo viene en presentación de 10 g la cual se diluyó en 10 litros de agua para su aplicación.

### **III.2.4. Caracterización del suelo sometido a la técnica de biorremediación.**

Por último, se tomaron nuevamente las muestras del suelo tratado fueron enviadas al laboratorio y luego analizaron los resultados obtenidos, se realizó la interpretación de los resultados a través de la bibliografía disponible e indicando las soluciones para un futuro aprovechamiento agrícola del suelo biorremediado.

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente capítulo se desarrollan los objetivos planteados en el trabajo de investigación para biorremediar un suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino el espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo, el cual, como ya se referenció en capítulos anteriores, cuenta con 32 hectáreas; de acuerdo al estudio se determinó que la contaminación está presente en 1 ha aproximadamente y de ésta se experimentó en 1m<sup>2</sup> de terreno. Para ello inicialmente se realizó el diagnóstico del suelo contaminado, por observación directa y entrevistas con los productores del sector, también se llevó a cabo una caracterización físico-química y microbiológica de ese suelo, luego se aplicó la técnica de biorremediación (Bioaumentación) para buscar desafectar el mismo y por último se realizó la evaluación del efecto de la técnica de biorremediación empleada en el suelo.

#### **IV.1 Diagnosticar a través de un estudio histórico la afectación del suelo sobre el cual hubo derrame de ácido sulfúrico en el asentamiento campesino el espinal Fundo Amaranto, estado Carabobo.**

Para realizar el diagnóstico del suelo afectado se procedió a realizar visitas de campo y a hacer una revisión de la documentación que presentan los productores del sector, en ellas se determina que en los predios funcionó una planta de producción de ácido sulfúrico, utilizado como materia prima en la industria química y los habitantes del sector observaban como dicho producto era vertido al suelo, bien sea cuando se iban a envasar para su posterior traslado o cuando se almacenaban para su comercialización, es decir, la empresa no tenía un control adecuado de éste compuesto químico. Luego de más de 10 años de funcionamiento la fábrica cierra sus puertas y los equipos son desmantelados, igual sin ningún control para prevenir derrames y evitar impactos ambientales negativos. Al poco tiempo dichas tierras son entregadas a productores de la zona y los mismos comienzan a desarrollar actividades

agrícolas, excepto en 1 ha. Aproximadamente, de terreno por la contaminación descrita anteriormente.

De acuerdo a un reconocimiento visual del suelo donde se derramó ácido sulfúrico se observa que el mismo, hay poco crecimiento de vegetación, solo se observa muy poco desarrollo de malezas y aunque los productores han sembrado plantas de algunos frutales (naranja, limón, lechosa, principalmente) las mismas no logran desarrollar un crecimiento vegetativo importante, pues no hay desarrollo radicular; por el contrario, esas plántulas mueren a los pocos días del trasplante. También en el suelo se observa coloración verde- negruzca en algunos sectores de la superficie del mismo, esto puede ser producto de la composición del suelo que al ser impactado por gotas de agua de lluvia o riego se forma ese sello superficial con las características descritas (Mendoza y colaboradores 2015).

#### **IV.2 Realizar la caracterización física, química y microbiológica del suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico en el asentamiento campesino El Espinal Fundo Amaranto, sector Yagua, para determinar su estado actual.**

Es de suma importancia realizar la caracterización física, química y microbiológica del suelo antes de la aplicación de la técnica de remediación para evaluar el impacto de ésta sobre la composición, textura y características del suelo. Para comparar la caracterización físico-química obtenida para el suelo sin tratamiento y posterior a la aplicación de la técnica de bioaumentación, con cepa del hongo antagonista *Trichoderma Harzianum*. Sin embargo en este objetivo también incluye la tabla de análisis físico químico y microbiológico del suelo del fundo, el cual no fue impactado por el derrame de ácido sulfúrico. A continuación esta información

Para la ejecución de este objetivo se procedió a la toma de muestras de suelo a una profundidad de 0-30 cm y fueron enviadas a los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en el estado Aragua, donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla N°1: Resultados de análisis físico del suelo no afectado por derrame de ácido sulfúrico

<b>COMPOSICIÓN DEL SUELO</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
Arena %	58
Limo %	32
Arcilla %	10

Clase Textural: Franco Arenoso

Metodología: Boyoucos

Fuente: INIA Aragua.

Tabla N°2: Resultados de análisis químico del suelo no afectado por derrame de ácido sulfúrico

<b>Parámetro</b>	<b>Valor / resultado</b>	<b>Metodologías</b>
PH 1:1 en agua	6,7	
C.E. 1:1 agua dS.m <sup>-1</sup>	0,07	Método Potenciométrico
Materia Orgánica %	2,5	Combustión Húmeda (Walkley yBlack)
Nitrógeno %	ND	Mehilch 1
Fósforo ( mg.kg-1)	12,75	Mehilch 1
Potasio (mg.kg-1)	47,2	Mehilch 1
Calcio (mg.kg-1)	823,3	Mehilch 1
Sodio (mg.kg-1)	28,5	Mehilch 1
Magnesio (mg.kg-1)	139,2	Mehilch 1

Fuente: INIA Aragua

Tabla N°3: Resultados de análisis físico del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico antes del tratamiento de biorremediación.

<b>COMPOSICIÓN DEL SUELO</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
Arena %	58
Limo %	32
Arcilla %	10

Clase Textural: Franco Arenoso

Metodología: Boyucos

Fuente: INIA Aragua.

Estas propiedades físicas de los suelos se refieren básicamente a la manifestación de su granulometría y el ordenamiento de las partículas primarias como la arena, limo y arcillas que influyen a otras de sus cualidades tales como el calor, permeabilidad, principalmente, y al contenido de agua y nutrientes. Los resultados que observamos en la Tabla N°3, se refieren al análisis físico del suelo afectado por derrame con ácido sulfúrico, allí se observa que el suelo tiene una alta proporción de arena, mediano contenido de limo y bajo contenido de arcilla, lo que refiere que debe tener un buen drenaje. De acuerdo a lo anterior visto, la clase textural del suelo es Franco arenoso, y lo podemos observar en la figura N° 4, en esta figura demarcamos de acuerdo a los resultados obtenidos el tipo de suelo que estamos evaluando.

Si comparamos éstos resultados obtenidos en las propiedades físicas del suelo impactado por el derrame de ácido sulfúrico y se compara con la tabla N° 1, donde observamos las características físicas del suelo no afectado por el derrame, podemos asegurar que el ácido sulfúrico no causó ningún efecto en el mismo, pues no cambia la estructura.

El análisis de la composición textural del suelo contaminado es un indicativo de que el suelo tiene buenas condiciones agrícolas pues los suelos francos, son los ideales para la agricultura.



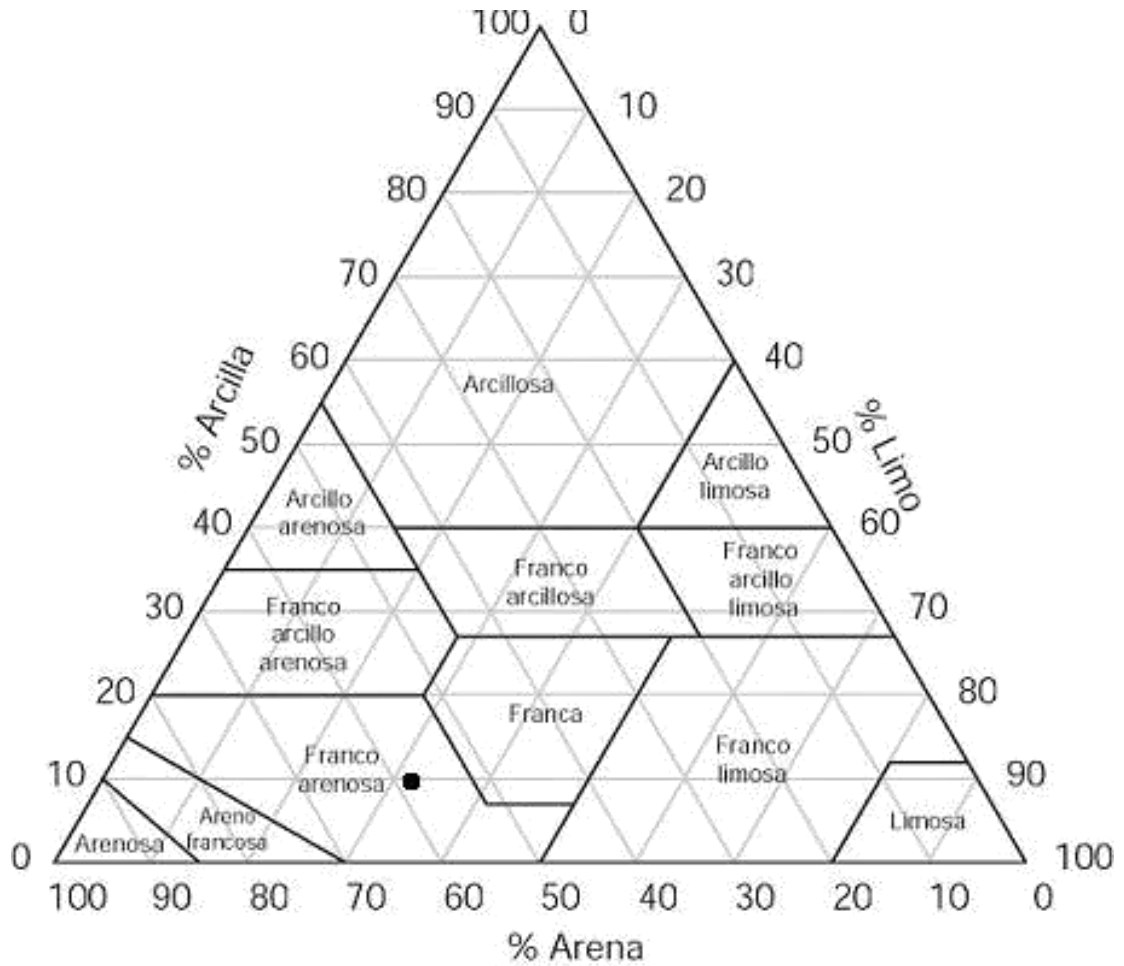


Figura 4: Triangulo para la estimación de la clase textural del suelo.

Fuente: Ogram A. (1997).

En relación a las propiedades químicas del suelo producto de su caracterización, podemos observarlas la tabla N°4.

Tabla N°4: Resultados de análisis químico del suelo del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico antes del tratamiento de biorremediación.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor / resultado</b>	<b>Metodologías</b>
pH 1:1 en agua	4,27	
C.E. 1:1 agua (dS.m <sup>-1</sup> )	0,07	Método Potenciométrico
Materia Orgánica (%)	1,98	Combustión Húmeda (Walkley y Black)
Nitrógeno (%)	ND	Mehilch 1
Fósforo ( mg.kg <sup>-1</sup> )	10,99	Mehilch 1
Potasio (mg.kg <sup>-1</sup> )	43,2	Mehilch 1
Calcio (mg.kg <sup>-1</sup> )	775,2	Mehilch 1
Sodio (mg.kg <sup>-1</sup> )	27,2	Mehilch 1
Magnesio (mg.kg <sup>-1</sup> )	135,2	Mehilch

Fuente: INIA Aragua.

El análisis químico es un poderoso instrumento para la caracterización del suelo, comportamiento y vocación, en éste se determina que la reacción del suelo tiene un valor ácido, por los valores de pH obtenidos (4,2), es decir es un suelo acidificado. Este parámetro afecta significativamente la actividad microbiana y por consiguiente el proceso de biorremediación, ya que la mayor parte de los microorganismos tiene un mejor crecimiento en un intervalo de pH situado entre 6 y 8 (Arroyo & Quesada, 2004).

Comparando el pH del suelo que observamos en la Tabla 2, que es un pH cercano a la neutralidad (6,7) con este resultado del suelo contaminado se observa la diferencia y por ende la acidificación del suelo. Es importante mencionar que como son suelos agrícolas, la capacidad de las plantas para absorber fósforo, calcio, magnesio y molibdeno se ve considerablemente disminuida. Si el boro, el cobre y el zinc están presentes, pueden representar toxicidad a esos pH bajos; el pH del suelo tiene relativamente poco efecto sobre el Nitrógeno en el suelo (Casanelas y colaboradores 2014).

En los suelos ácidos, especialmente en aquellos cuyo pH es menor a 4,5, el aluminio se solubiliza y se convierte en su catión trivalente  $Al^{3+}$ , que en alta cantidad es tóxico para la planta. La acidez del suelo hace que las raíces estén siempre expuestas al aluminio y evitan la absorción del calcio tan importante para las plantas; de acuerdo a esto en la zona afectada hay poco desarrollo de vegetación.

La Conductividad eléctrica tiene valores que representan un suelo no salino o normal, el cual debe estar entre valores menores de  $2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , esta característica del suelo es una medida de la cantidad de corriente que pasa a través de la solución del suelo, de acuerdo a nuestro resultado el suelo tiene una baja concentración de sales, de acuerdo a ello la planta podría nutrirse sin gastar energía, en este parámetro en relación al suelo del fundo donde no hubo derrame del ácido se observa que en el suelo “control”, que la conductividad también es baja.

La materia orgánica del suelo control es de 2.5% característico de suelos de bosque que oscilan entre 0,5% y 20%, luego del derrame con ácido sulfúrico, la materia orgánica bajó a 1.98% . En relación a otros parámetros, vemos que los niveles de Potasio y Calcio son altos para suelos con vocación agrícola, el contenido de fósforo es bajo y el contenido del magnesio medio lo que no lo hace potencialmente tóxico para los microorganismos.

En los análisis microbiológicos realizados al suelo contaminado nos encontramos la presencia de patógenos, que podemos observar en la tabla 5. De acuerdo a esto se afirma que gran parte de los procesos microbianos que contribuyen a la fertilidad de los agroecosistemas y el ciclo de nutrientes ocurren en el suelo. Este ciclo de nutrientes depende básicamente de la actividad microbiológica de los suelos, la cual a su vez está mediada por la estructura y funcionamiento de la microbiota edáfica (Di Ciocco y colaboradores 2014).

En el análisis microbiológico del suelo contaminado observamos la presencia de los siguientes hongos: *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Monilia* sp., *Aspergillus* spp, *Basidiomycete* y *Humicola* sp. Además de presencia de bacterias del género *Bacillus*

y flavobacterium. Si contrastamos con la tabla N°5, donde encontramos la composición de bacterias en el suelo de Ogram A. (1997), observamos que en el suelo en estudio se encuentran bacterias características de los suelos como son las del género Bacillus, usada en ocasiones como biocontrolador de hongos patógenos como el fusarium sp, que causa pudrición en las raíces de las plantas (Guillen y colaboradores 2006).

Tabla N°5 Contenido de bacterias características del suelo

Género	Bacterias en el suelo (%)
Arthrobacter	5-60
Bacillus	5-67
Pseudomonas	3-15
Agrobacterium	1-20
Alcaligenes	1-20
Flavobacterium	1-20
Corynebacterium	2-12
Micrococcus	2-10
Taphylococcus	<5
Xanthomonas	<5
Mycobacterium	<5

Fuente: Ogram A. (1997)

#### **IV.3 Aplicar técnicas de biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico a fin de mejorar sus características y recuperar parte de su capacidad de fertilidad.**

Una vez realizado el diagnóstico y la caracterización del suelo afectado por derrame de ácido, para aplicar la técnica de Bioaumentación como alternativa de biorremediación se procedió a trabajar con el hongo entomopatógeno y antagonista *Trichoderma harzianum*, el cual se aplicó dos veces por semana al suelo contaminado durante un periodo de 3 meses. La técnica consiste en diluir 10gr de la cepa del hongo en 10 litros de agua y verter sobre 1 m<sup>2</sup> de terreno afectado por derrama de ácido sulfúrico; esta porción de terreno fue previamente seleccionado y delimitado.

#### **IV.4 Evaluar el efecto de la biorremediación del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico objeto del estudio.**

Una vez incorporada la cepa del *Trichoderma Harzianum* al suelo durante un periodo de 3 meses, con una frecuencia de 2 veces por semana, se puede afirmar que en los análisis físicos y químicos realizados al suelo, no se observó una diferencia importante en los análisis físico- químicos del suelo afectado con derrame de ácido sulfúrico una vez terminado el proceso, cuyos resultados observaremos en las tablas N° 6 y N°7.

Tabla N° 6. Análisis físico del suelo una vez aplicada la Biorremediación.

<b>COMPOSICIÓN DEL SUELO</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
Arena %	58
Limo %	32
Arcilla %	10

Clase Textural: Franco Arenoso

Metodología: Boyoucos

Fuente: INIA Aragua.

Tabla N°7. Análisis químico del suelo una vez realizada la biorremediación

ANÁLISIS QUÍMICO DEL SUELO		
Parámetro	Valor	Metodologías
pH 1:1 en agua	5,7	
C.E. 1:1 agua (dS.m <sup>-1</sup> )	0,06	Método Potenciométrico
Materia Orgánica (%)	2,2	Combustión Húmeda (Walkley y Black)
Nitrógeno (%)	ND	Mehilch 1
Fósforo ( mg.kg <sup>-1</sup> )	10,99	Mehilch 1
Potasio (mg.kg <sup>-1</sup> )	101	Mehilch 1
Calcio (mg.kg <sup>-1</sup> )	466	Mehilch 1
Sodio (mg.kg <sup>-1</sup> )	27,2	Mehilch 1
Magnesio (mg.kg <sup>-1</sup> )	136	Mehilch 1

Fuente: INIA Aragua.

Los resultados obtenidos en el análisis químico observamos, que el pH tuvo un incremento de 4,2 a 5,7 acercándose a la neutralidad, la conductividad eléctrica se mantuvo baja, lo que es indicativo del contenido de pocas sales disueltas, por ende es un suelo no salino. También se observa un incremento mínimo de la cantidad de materia orgánica en el suelo, pues de 1,8 subió a 2,2%, que puede ser atribuido a la actividad microbiana del suelo. En los valores del contenido de magnesio, calcio, fósforo, potasio y sodio no hubo diferencias que se puedan referenciar.

Sin embargo donde si se observan diferencias es en el análisis microbiológico donde luego de la aplicación de *Trichoderma Harzianum* no hubo crecimiento de bacterias fitopatógenas, lo cual puede atribuirse a la acción del hongo sobre estas bacterias encontradas en los análisis al suelo contaminado con ácido sulfúrico (Bacillus y Flavobacterium) lo que referencia que el *Trichoderm Harzianum* tiene un gran potencial como biocontrolador y por ende para la biorremediación, pues, es un hongo que ataca, parasita y desplaza a otros hongos que producen enfermedades (Artoga y colaboradores 2014).

## V. CONCLUSIONES

- La caracterización del suelo en estudio, afectado por derrame de ácido sulfúrico, nos refleja que no presenta erosión severa, aunque se observó poco desarrollo vegetativo.
- Con la aplicación al suelo contaminado del hongo entomopatógeno *Trichoderma Harziarum* se observa que se disminuyen o eliminan la población de bacterias Fitopatógenas presentes en el mismo.
- La actividad microbiana genera cambios en algunas propiedades del suelo, entre estas: incrementos en el contenido de materia orgánica del suelo e incremento del ph. A diferencia de la clase textural que no se ve afectada por la biorremediación.
- La acidificación del suelo, no afecta las propiedades físicas del suelo.
- Es posible recuperar la capacidad de fertilidad del suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico y mitigar el impacto ambiental con la bioaumentación como técnica de biorremediación.
- La biorremediación por bioaumentación de suelo afectado por derrame de ácido sulfúrico empleando el *Trichoderma Harziarum* evidencia el potencial del hongo para el saneamiento de suelos impactados a bajos costos.

## V.I. RECOMENDACIONES

- Realizar campañas de educación en el área ambiental dirigidas a las comunidades organizadas, empresas públicas y privadas, centros de investigación, entre otros, sobre manejo de desechos sólidos, peligrosos o no peligrosos para promover el cuidado del ambiente, minimizando el impacto ambiental realizado principalmente actividades antropogénicas.
- Motivar la investigación de la aplicación de la técnica de biorremediación, en cualquiera de sus fases, de diferentes recursos, entre estos: aire, agua, vegetación y especialmente del suelo y utilizando otros hongos antagonistas.
- Promover desde las universidades la creación de cátedras orientadas a evitar y/o a disminuir el daño ambiental.



## V.II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrieta O. et al, (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. Revista Gestión y Ambiente. Vol. 15 N° 1. Medellín Colombia.
- Arroyo, M., Quesada, J. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental; Guadalajara-México. ATCC 2497. *Rhodoferrax* Médium, 1-1, Manassas, U.S.A.
- Astorga-Quirós, K; Meneses-Montero, K; ZúñigaVega, C; Brenes-Madriz, J; Rivera-Méndez, W, (2013). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp.y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha. 2013. Vol. 27, N° 2. Pág 82-91.
- Balderas-León, Iván, Sánchez-Yáñez, Juan Manuel. Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/ o *Burkholderia cepacia*Journal of the Selva Andina Research Society [en línea] 2015, 6 ( ):  
Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361336202005>>  
ISSN 2072-9294. [Fecha de consulta: 13 de julio de 2017].
- Casanellas, J. P., Reguerín, M. L. A., & Claret, R. M. P. (2014). Edafología: uso y protección de suelos. Mundi-Prensa Libros.
- Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial N° 5.453 (Extraordinaria) de fecha 24 de marzo del 2000.
- Coria I. y De la Vega M. (2011). Determinación de la efectividad de la remediación de suelos accidentalmente contaminados con ácido sulfúrico mediante métodos geofísicos. Información tecnológica. Vol. 22(1), 3-8
- Covarrubias, Sergio Abraham, García Berumen, José Abraham, Peña Cabriales, Juan José. *El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. Acta Universitaria [en línea] 2015, 25 (Octubre-Sin mes):  
Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41648311004>>  
ISSN 0188-6266. [Fecha de consulta: 13 de julio de 2017].
- De la Rosa D., Teutli M., y Ramírez M. 2007. *Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo*. Rev. int. contam. ambient. 23 (3) 129-138.

- Di Ciocco, César Augusto, Sandler, Rosana Verónica, Falco, Liliana Beatriz, & Coviella, Carlos Eduardo. (2014). *Actividad microbológica de un suelo sometido a distintos usos y su relación con variables físico-químicas*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo, 46(1)
- Fernández C. (2012). *Biodegradación de la fracción de asfalto proveniente de los crudos hamaca y guafita*. tesis doctoral UCV, Venezuela.
- Gallego, J.R., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., Belloch, C., Peláez, A.I., Sánchez, J. 2007. *Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia*. *Biodegradation* 18, 269-281.
- Gómez W., 2009. *Evaluación de la atenuación natural estimulada en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diesel a escala de laboratorio*. Tesis, Medellín, Colombia
- González-Rojas, E. 2009. *Técnicas de biorremediación en litorales afectados por el vertido de fuel pesado del Prestige*. Tesis Doctoral. Oviedo España.
- Guillén-Cruz, Raquel; Hernández-Castillo, Francisco Daniel; Gallegos-Morales, Gabriel; Rodríguez-Herrera, Raúl; Aguilar-González, Cristóbal Noé; Padrón-Corral, Emilio; Reyes-Valdés, Manuel Humberto; (2006). *Bacillus spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con Fusarium spp., Rhizoctonia solani Kühn y Phytophthora capsici Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (Capsicum annum L.)*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, julio-diciembre, 105-114.
- Ikkonen E., et al. 2012. *La producción de CO2 en suelos antropogénicos en Chinampas en la ciudad de México*. *Spanish Journal of Soil Science*. Vol. 2. ISSUE 2.
- Infante C. et al, 2010. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *BIOAGRO* (22: 2) 145-52.
- Lamz Piedra, Alexis, & González Cepero, María C. (2013). *La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata*. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.
- Ley Orgánica del Ambiente. 2006. Venezuela.

- Loayza P., J., Silva M., M., Najarro V., Y., & Tafur E., E. (2014). Análisis del Proceso de Producción del Ácido Sulfúrico aplicando los principios fundamentales para el diseño de procesos industriales sostenibles. *Revista Peruana De Química E Ingeniería Química*, 16(2), 9-20.
- Mager, D., & Valencia, I. H. (2013). Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 30(1).
- Maiké S. y Filser J. (2007). The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. *Applied Soil Ecology*. 36, 56-62.
- Méndez A., et al. 2011. Formas de carbono y actividad microbiana en suelos de manglar de Venezuela. Tesis. Venezuela.
- Ogram A. (1997). Methods of soil microbial community analysis. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC, ASM Press, pp 422-430.
- [Publicación Científica en Ciencias Biomédicas NOVA](#). 2006. Vol. 4, No. 5, enero-junio de 2006, 82-90.
- Ramírez, M.(2014). *Microorganismos degradadores de hidrocarburos de petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación*. (Tesis de Doctorado). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Riser E. (1992). *Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites*. Editorial C. K. Smoley, USA.
- Rittmann B. y McCarty P. (2001). *Biotecnología del Medio Ambiente. Principios y Aplicaciones*. Editorial McGraw Hill. España.
- Rodríguez N., et al. (2012). *Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. Producción más Limpia*. Vol.7, No.1 - 101•108.
- Sabaté J. Vinas M. y Solanas A. (2004). *Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soil*. *International Biodeterioration & biodegradation* 4, 19 –25.
- Salinas A., Santos M., Soto O., Delgado E., Pérez H., Aguad L. y Medrano H. (2008). *Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap*

*leaching technique*. Journal of Environmental Management 88, 115-119.

- Testa S., Winegarden y Duane L. (1991). *Restoration of Petroleum-Contaminated Aquifers*. Lewis Publishers. USA.
  
- Toledo B. (2009). *Aplicación de Procesos Biológicos como medida de Remediación para recuperar suelos Limo-Arcillosos contaminados con Gasolina* Tesis, Universidad de Guayaquil, Ecuador.
  
- USDA-NRCS. 2008. Soil Quality Institute, Ames, IA. Disponible en: <http://soils.usda.gov/sqi/>
  
- Zamora, Alejandra; Ramos, Jesús; Arias, Marianela; (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, Enero-Abril, 5-12.