

UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES

TRABAJO EXPERIMENTAL:

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES MEDIANTE LA
BACTERIA *BACILLUS LICHENIFORMIS*

AUTORA: GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS

CUENCA – ECUADOR

2017

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA con documento de identificación N° 1105137036, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: “BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES MEDIANTE LA BACTERIA *BACILLUS LICHENIFORMIS*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, diciembre del 2017

A handwritten signature in blue ink that reads "Grace | Ramirez C.". The signature is written over a horizontal line that has been underlined.

GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA

CI. 1105137036

CERTIFICACIÓN

Yo declaro que bajo mi **tutoría** fue desarrollado el trabajo de titulación: “**BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES MEDIANTE LA BACTERIA *BACILLUS LICHENIFORMIS***“, realizado por **GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA** obteniendo el Trabajo experimental, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, diciembre del 2017



Dra. INÉS P. MALO C. PhD

CI. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA con documento de identificación N° 1105137036, autora del trabajo de titulación: “BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES MEDIANTE LA BACTERIA *BACILLUS LICHENIFORMIS*” certifico que el total contenido del Trabajo Experimental es de mí exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, diciembre del 2017

A handwritten signature in blue ink that reads "Grace | Ramirez C.". The signature is stylized with a vertical line separating the first and last names.

GRACE STEFANÍA RAMÍREZ CÓRDOVA

CI. 1105137036

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, especialmente a mi madre quien me ha motivado y ha luchado conmigo hasta su último día para poder lograr mi tan anhelada meta.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a mi padre, Nicolás Ramírez Paz, por estar siempre presente cuando lo necesitaba: económica o emocionalmente; a mi mejor amiga, Alejandra Ordoñez, por nunca dejarme sola; de manera especial agradezco a mi madre por ser la mejor guía y ejemplo a seguir: ahora es un ángel que siempre me va a cuidar. Gracias a mis profesores por presionarme a cumplir mis propias metas, no solo en el ámbito académico sino personal; gracias por todos sus consejos.

RESUMEN

La presente investigación tiene el propósito de degradar residuos industriales, de empresas de laminados, mediante la utilización de la bacteria *Bacillus licheniformis*, para lo cual se procedió a su identificación mediante pruebas bioquímicas. Posteriormente se realizaron pruebas *in vitro* en las cuales se evaluaron los parámetros: tiempo de degradación, medio óptimo, residuo diluido o puro, agitación, temperatura en la que de mejor manera se realizó, la biodegradación. De esta forma se efectuó un análisis comparativo estableciendo condiciones óptimas y factibles para la investigación; se obtuvieron los siguientes resultados favorables:

Tiempo de degradación: 45 días

Medio de cultivo óptimo: medio especial líquido preparado en laboratorio

Temperatura de degradación: 37°C

Degradación apreciable del residuo puro

Una vez culminadas las pruebas *in vitro* se realizó un análisis cromatográfico determinándose, en algunos casos, hasta el 99% el porcentaje de degradación.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN.....	VI
CAPÍTULO 1.....	.
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	4
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.3 HIPÓTESIS	5
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.5 DELIMITACIÓN.....	6
CAPÍTULO 2 (Marco teórico)	.
2.1 LA BIORREMEDIACIÓN	7
2.2 LA BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS	8
2.3 RESTRICCIONES Y CONSIDERACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN	10

2.3.1 RESTRICCIONES	10
2.3.1.1 RESTRICCIONES DE TIEMPO	10
2.3.1.2 RESTRICCIONES DE COSTO	10
2.3.1.3 RESTRICCIONES DEL LUGAR	11
2.3.2 CONSIDERACIONES TÉCNICAS EN LA BIORREMEDIACIÓN	11
2.3.2.1 CONSIDERACIONES A ESCALA.....	12
2.4 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS	13
2.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's)	14
2.6 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS	15
2.7 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN IN SITU	16
2.7.1 BIOVENTEO	16
2.7.2 BIOAUMENTACIÓN	17
2.7.3 BIOESTIMULACIÓN	17
2.7.4 BIOLABRANZA	17
2.7.5 ATENUACIÓN NATURAL	18
2.7.6 FITORREMEDIACIÓN.....	18
2.8 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN <i>EX SITU</i>	19
2.8.1 COMPOSTEO	19
2.8.2 BIORREACTORES	19

2.8.3 BIODegradación por hongos	20
CAPÍTULO 3 (Estado del arte)	22
3.1 COMBUSTIBLE RESIDUAL	22
3.2 APLICABILIDAD Y VENTAJAS DE TRATAMIENTOS DE BIORREMEDIACIÓN <i>IN SITU</i>	22
3.3 ESTADÍSTICA SOBRE RESIDUOS.....	23
3.3.1 ¿QUÉ ES UN RESIDUO INDUSTRIAL?.....	23
3.3.2 RESIDUOS PELIGROSOS	23
3.3.3 GENERACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN LA UNION EUROPEA	24
3.4 CROMATOGRFÍA DE GASES	26
CAPÍTULO 4 (Materiales y métodos).....	28
4.1 MATERIALES	28
4.1.1 RECURSOS TÉCNICOS	28
4.1.2 MATERIALES DE EXPERIMENTACIÓN	28
4.2 MÉTODOS	28
4.2.1 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	29
4.2.1.1 MÉTODO CORRELACIONAL.....	29
4.2.3.2 OBSERVACIÓN	29
4.2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	29
4.2.4.1 DISEÑO FACTORIAL 2^3	29

4.2.4.2 ANÁLISIS ANOVA.....	29
4.2.4.3 DISEÑO ESTADÍSTICO DE REGRESIÓN LINEAL	29
4.2.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA CARACTERIZACIÓN DE <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	29
4.2.5.1 TINCIÓN DE GRAM.....	30
4.2.5.2 PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA CATALASA.....	30
4.2.5.3 TINCIÓN DE ESPORAS	30
4.2.5.4 UTILIZACIÓN DE CITRATO DE SODIO.....	30
4.2.5.5 SIEMBRA EN NaCl AL 7%	30
4.2.5.6 SIEMBRA EN AGAR SANGRE	30
4.2.5.7 ANAERÓBICO FACULTATIVO	30
4.2.5.8 OBSERVACIÓN DE COLONIAS	30
4.2.5.9 MORFOLOGÍA.....	31
4.2.5.10 VOGES-PROSKAUER	31
4.2.5.11 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	31
4.2.5.12 BACTERIA MESÓFILA	31
4.2.5.13 HIDRÓLISIS DE GELATINA.....	31
4.2.6 BIOENSAYOS EN CAJAS PETRI Y FRASCOS DE VIDRIO CON AGAR TSA..	31
4.2.6.1 DILUCIÓN DE RESIDUO INDUSTRIAL	31
4.2.6.2 BIOENSAYOS EN CAJAS PETRI	32

4.2.6.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO.....	32
4.2.7 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO.....	33
4.2.7.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BACTERIANA	33
4.2.7.2 PREPARACIÓN DEL CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO	33
4.2.7.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO.....	33
4.2.7.4 SEPARACIÓN POR EL MÉTODO QuEChERS	33
4.2.7.5 ANÁLISIS POR CROMATÓGRAFO DE GASES.....	34
5.1 RECOLECCIÓN DE DATOS	35
5.1.1 PRUEBAS PARA CARACTERIZACIÓN DE <i>Bacillus licheniformis</i>	35
5.2 ANÁLISIS DE DATOS.....	39
5.2.1 DATOS PARA ANÁLISIS ANOVA	39
5.2.2 ÁREA BAJO LA CURVA CONSIDERANDO LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS	39
5.3 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	40
5.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA DEGRADACIÓN	40
5.3.1.1 FACTORES QUE TIENEN REPERCUSIÓN EN EL PROCESO MEDIANTE ANÁLISIS DE VARIANZA.....	43
5.3.2 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON AGAR TSA.....	45
5.3.2.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	45

5.3.2.2 DISEÑOS ESTADÍSTICOS.....	48
5.3.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO.....	49
5.3.3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	49
5.4 DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO 6 (Conclusiones y recomendaciones)	55
6.1 RECOMENDACIONES	55
6.2 CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA.....	66

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Aplicabilidad y ventajas de tratamientos IN SITU	22
Ilustración 2: Esquema de un cromatógrafo de gases	27
Ilustración 3: Gráfica de efectos principales para biodegradación	41
Ilustración 4: Diagrama de Pareto	42
Ilustración 5: Gráficas de caja de contaminante presente	43
Ilustración 6: Valor p obtenido de tiempo en ANOVA	44
Ilustración 7: Valor p obtenido de medio nutritivo en ANOVA.....	44
Ilustración 8: Valor p obtenido de temperatura en ANOVA	44
Ilustración 9: Picos encontrados en la muestra de residuo sin diluir en ausencia de bacteria	47
Ilustración 10: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria	47
Ilustración 11: Diseño estadístico de regresión lineal con variable tiempo y temperatura.....	48
Ilustración 12: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria, (Cb) con bacteria después de 60 días, y (T.R) tiempos de retención	50
Ilustración 13: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria, (Cb) con bacteria después de 60 días, y (T.R) tiempos de retención	52
Ilustración 14: Residuo industrial sin diluir con Bacillus licheniformis en agar TSA.....	57
Ilustración 15: Residuo industrial sin diluir con Bacillus licheniformis a los 5 días a 37°C en agar TSA	57

Ilustración 16: Incubación en jarra Gaspak.....	58
Ilustración 17: Crecimiento en agar chocolate en jarra Gaspak a 37°C.....	58
Ilustración 18: Crecimiento de <i>Bacillus licheniformis</i> en agar sangre, ausencia de hemólisis	59
Ilustración 19: Burbujeo por presencia de la enzima catalasa	59
Ilustración 20: Prueba bioquímica positiva citrato de sodio en medio Simmons	60
Ilustración 21: Cambio de coloración de verde a azul del medio Simmons positivo	60
Ilustración 22: Prueba bioquímica fermentación de carbohidratos en agar manitol	61
Ilustración 23: Cambio de coloración de rojo a amarillo que indica la fermentación de carbohidratos.....	61
Ilustración 24: Tinción de esporas, células vegetativas rosadas, esporas verdes.....	62
Ilustración 25: Biodegradación a los 45 días en caldo especial preparado	63
Ilustración 26: Biodegradación a los 60 días en caldo especial preparado	64
Ilustración 27: Biodegradación a los 80 días en caldo especial preparado	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Total de residuos generados del 2010 al 2012 países miembros de la UE	25
Tabla 2: Repeticiones empleadas para análisis ANOVA.....	32
Tabla 3: Corrida de muestra sin dilución en ausencia de bacterias.....	35
Tabla 4: Tratamientos y niveles empleados para análisis ANOVA.....	36
Tabla 5: Área bajo la curva y representación en porcentaje de contaminante considerando los diversos tratamientos	39
Tabla 6: Listado de análisis para la caracterización de <i>Bacillus licheniformis</i>	39
Tabla 7: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en TSA, y (T.R) tiempos de retención	46
Tabla 8: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en TSA, y tiempos de retención (T.R)	46
Tabla 9: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en caldo especial sin diluir, y (T.R) tiempos de retención	49
Tabla 10: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en caldo especial, y tiempos de retención (T.R).....	50
Tabla 11: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en caldo especial diluido 1/10, y tiempos de retención (T.R)	51
Tabla 12: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en caldo especial diluido 1/10, y tiempos de retención (T.R);	51

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el mercado mundial de la industria laminada se sitúa alrededor de los 27 millones de toneladas por año; a nivel de Latinoamérica, el consumo de éstos se acerca a 1.5 millones de toneladas por año y representa el 5% del consumo mundial, y es el Mercosur el mercado más importante, con el 46% del consumo total, seguido por México con el 22%. La Comunidad Andina y Chile representan el 20% del mercado latinoamericano siendo aproximadamente el 1% del mercado mundial. (PVC: tendencias y oportunidades para la industria de América Latina, 2016)

En Ecuador, la tasa de crecimiento a nivel industrial es relativamente baja, con un porcentaje equivalente al 4.5% en los últimos años, en el que se incluye la industria laminada. En cuanto al plano local, de acuerdo con un estudio de la Cámara de Industrias de Cuenca, las empresas asociadas a la industria laminada han tenido un avance y desarrollo del 9.30% más que en el 2012. (Carvajal, 2016).

La problemática actual para las industrias se proyecta en el manejo adecuado de los residuos que se generan a partir de los diferentes procesos que llevan a cabo en sus instalaciones, ya que las técnicas que se emplean no son numerosas y las que se utilizan representan costos relativamente elevados, para superar este obstáculo se consideran normativas, ordenanzas y políticas vigentes a las cuales se rigen. A nivel nacional se encuentra como organismo regulador el Ministerio del Ambiente y a nivel local los municipios (GAD municipal) (Valencia, 2014)

La Universidad Politécnica Salesiana, en convenio con la empresa Plastiazuary, trabajan conjuntamente en la búsqueda de nuevas tecnologías aplicadas a la biorremediación para obtener un manejo adecuado de los residuos generados durante la elaboración de laminados; dichas tecnologías deben cumplir con la normativa de gestión de residuos de la Empresa Municipal de Aseo de Cuenca (EMAC) (Plastiazuary, 2016).

1.1 JUSTIFICACIÓN

La industria actual emplea diversos procesos para llevar a cabo la degradación de sus residuos; entre las técnicas se encuentran: oxidación, hidrólisis y degradación térmica, que resultan costosas y además generan sub-residuos como lacas, barnices o restos de aceites como capas superficiales; por tanto, son un problema por parte de la industria (Castells, Reciclaje de Residuos Industriales, 2012). Frente a esto se plantea el uso y manejo adecuado de microorganismos, que en relación a técnicas más sofisticadas, representa costos relativamente bajos, una capacidad degradativa alta, no requiere personal altamente especializado; lo que se traduce en un método ambiental y económicamente sustentable (Acosta & Herrera, 2015).

La empresa Plastiazuary invierte una cantidad significativa de dinero para la gestión de estos residuos, la posibilidad de gestionarlos en la misma Industria Plastiazuary reduciría los gastos en gran magnitud. Además de generar plazas de trabajo para la zona y ayudar de esta manera, a la política de disminución del desempleo que según el INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) se ubicó en 5.2% del mes de junio, mayor al 4.3% de igual mes del 2015. Conjuntamente se da la posibilidad de generación de nuevas tecnologías ya que se dispone del conocimiento e instrumentación.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un proceso de biorremediación de residuos de laminados plásticos mediante la utilización de *Bacillus licheniformis*.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización de la bacteria pura a través de pruebas bioquímicas.
- Determinar la efectividad de los procesos de degradación realizados en agar TSA con bioensayos en cajas Petri y frascos de vidrio; los productos obtenidos se analizarán mediante Cromatografía de Gases (CG).
- Determinar la efectividad de los procesos de degradación realizados en caldo líquido especializado en el desarrollo de bacterias biorremediadoras el cual será preparado en laboratorio de acuerdo a formulaciones existentes, con bioensayos en frascos de vidrio; se analizará mediante Cromatografía de Gases (CG) determinando su eficacia.

1.3 HIPÓTESIS

Mediante el uso de la bacteria *Bacillus licheniformis* se logra biodegradar residuos de empresas de laminados plásticos, por lo que se podría considerar un mecanismo eficaz para el tratamiento seguro de residuos provenientes de procesos de la industrial del PVC.

1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por residuos de laminados plásticos está en auge, lo que contribuye a un deterioro en la salud humana y medio ambiente, razón por la cual se debe indagar acerca de métodos que controlen esta situación, enfatizando, principalmente, en tecnologías amigables ambientalmente además de cumplir con las normativas y disposiciones hechas por los diversos GAD Municipales, en este caso el GAD de Cuenca y la Empresa Municipal de Aseo de Cuenca (EMAC).

A la bacteria *Bacillus licheniformis* se le atribuye la propiedad de ser biodegradativa por lo que se analizan diferentes variables que mejoren su eficacia tales como: temperatura, agitación y medio de cultivo.

1.5 DELIMITACIÓN

El presente trabajo de investigación consta de varias actividades, entre ellas: recolección y aislamiento del microorganismo realizado en la parroquia “El Valle” del cantón Cuenca; siembra de la bacteria en diferentes medios analizando varios factores; recolección de datos y cálculo del porcentaje degradado mediante comparación de las áreas totales obtenidas en el equipo de cromatografía de gases; desarrolladas en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la UPS.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 2 (Marco teórico)

2.1 LA BIORREMEDIACIÓN

La mayoría de las actividades humanas tienen consecuencias negativas sobre los recursos naturales del planeta, ya que generan compuestos contaminantes que alteran la estructura y función del ambiente. Existe una gran cantidad de contaminantes, pero los más importantes por su estructura, daño a la salud y al medio ambiente son los hidrocarburos y metales pesados. La biorremediación es la alternativa principal para recuperar los espacios que han sido alterados por esos contaminantes, actividad que consiste en utilizar microorganismos para regresar un medio alterado por contaminantes a su condición previa a la contaminación. Es decir, resolver o mitigar el problema, y es especialmente efectiva en el tratamiento de contaminantes orgánicos, incluido el petróleo. Para que los microorganismos actúen de mejor manera es necesario que el medio contaminado cuente con condiciones óptimas de temperatura, pH, nutrientes y oxígeno para su desarrollo. En casos en los que el ambiente no cuente con estas condiciones se debería adaptarlo mediante adición de nutrientes, agitación para una mejor aireación y adición de microorganismos con capacidad biodegradadora, para que su actividad sea más efectiva y rápida (Cornejo, 2017).

Mezclar el suelo puede hacer que algunas sustancias químicas dañinas se evaporen antes de que las bacterias puedan mediar con ellas. Para evitar que esas sustancias químicas contaminen el aire, se puede mezclar suelo dentro de tanques o edificaciones especiales, donde las sustancias químicas que se evaporan se pueden recolectar y tratar (Cornejo, 2017).

Los microorganismos pueden ayudar a eliminar la contaminación de las aguas subterráneas, al igual que del suelo. En este caso, el agua se mezcla con nutrientes y aire antes de que sea reinyectada al terreno. También pueden bombearse nutrientes y aire por los pozos, de forma que

la mezcla se produzca directamente en profundidad. Los nutrientes y el aire añadidos ayudan a las bacterias a biorremediar las aguas subterráneas. Una vez que se han eliminado las sustancias químicas dañinas, las bacterias ya no tienen nutrientes disponibles y mueren (Cornejo, 2017).

La biorremediación es muy segura, ya que dependen de microbios que existen normalmente en los suelos. Esos microbios son útiles y no representan un peligro para las personas en el sitio o la comunidad. Además, no se emplean sustancias químicas peligrosas. Los nutrientes que se añaden para que las bacterias crezcan son fertilizantes de uso corriente en el césped o el jardín. La biorremediación transforma las sustancias químicas dañinas en agua y gases inofensivos y, por lo tanto, las destruye totalmente (Cornejo, 2017).

2.2 LA BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS

Es extraño creer que los microorganismos sean capaces de desarrollarse a través de compuestos químicos como el benceno, naftaleno o pireno ya que eso es lo que abarca el término biodegradación microbiana. Los microbiólogos y geoquímicos tienen evidencia científica de que es posible; los microorganismos se encuentran en el planeta Tierra desde hace más de tres mil millones y medio de años, los organismos superiores hace menos de mil millones de años y los seres humanos desde hace solo seis millones de años.

En la actualidad ya no se discute que el petróleo y, por lo tanto, sus componentes mayoritarios, los hidrocarburos, tienen su origen en los compuestos que forman parte de los organismos, los denominados compuestos biogénicos. Una sucesión de reacciones químicas, ocurridas a altas temperaturas y durante millones de años, que los geoquímicos engloban con el término de procesos diagenéticos y catagenéticos, ha conducido a la conversión paulatina de estas

estructuras biogénicas en hidrocarburos. En lugares donde se han encontrado hidrocarburos, se ha podido demostrar la existencia en etapas geológicas anteriores de organismos que poseían en sus células compuestos biogénicos como el pigmento eritroafina o el alcaloide veratramina. Este fenómeno supone que los microorganismos, capaces de crecer en sus orígenes solamente a expensas de compuestos biogénicos, como los azúcares o las proteínas, han convivido a lo largo de millones de años con una serie de compuestos orgánicos que finalmente han dado lugar a los componentes de los crudos de petróleo actuales.

A lo largo de millones de años, han sido seleccionadas enzimas que han aparecido por mutación o intercambio genético en determinados microorganismos capaces de metabolizar los hidrocarburos. Ahora sí podemos entender que los microorganismos han desarrollado las capacidades necesarias para metabolizar los hidrocarburos y por el contrario presentan mayores dificultades en degradar pesticidas o explosivos, productos sintetizados por el hombre, y que a escala de los tiempos geológicos sólo haría un instante que estén en la tierra. Para algunos de estos compuestos, denominados xenobióticos, los microorganismos, pese a su rápida adaptación a nuevas situaciones, podrían no haber sintetizado todavía las enzimas necesarias (Izquierdo Romero, 2013).

2.3 RESTRICCIONES Y CONSIDERACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN

2.3.1 RESTRICCIONES

Las restricciones y consideraciones prácticas a la hora de desarrollar un plan de descontaminación incluyen:

2.3.1.1 RESTRICCIONES DE TIEMPO

Se seleccionan los microorganismos a emplear, dependiendo de la velocidad con la que se pretende degradar el contaminante ya que la adición de microorganismos resulta en un proceso más rápido que va desde meses hasta semanas a diferencia de otras metodologías de biorremediación, aunque también se toma en cuenta que la degradación *in situ* es mucho más rápida debido a que no se necesita de infraestructura compleja (Martínez, Pérez, Pinto, Gurrola, & Osorio, 2011)

2.3.1.2 RESTRICCIONES DE COSTO

Los biotratamientos son procesos largos que pueden durar años pero, sin embargo, son los más económicos comparados con otras tecnologías como la incineración, cuyo costo va de 1500 a 6000 USD/ton. Una forma de abaratar costos es realizar el tratamiento *in situ*, un ejemplo es el bioventeo, cuyo costo de operación va desde 10 a 70 USD/m³. La biorremediación es el único tratamiento en el cual los microorganismos mineralizan los contaminantes volviéndolos inocuos (Sarolina, 2011).

2.3.1.3 RESTRICCIONES DEL LUGAR

La composición física del lugar, donde se encuentran los materiales peligrosos, repercute de una forma importante sobre la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo la biorremediación. La localización de la zona contaminada afecta las perspectivas de la biorremediación en función de la temperatura, pH y humedad. En cuanto a la temperatura, incluso las variaciones climatológicas afectan la capacidad degradadora de los microbios. La temperatura no solo afecta la velocidad de la actividad enzimática, sino también la biodisponibilidad, el transporte en las membranas celulares, etc. La acidez o alcalinidad del medio también influye sobre la biorremediación, afectando, por ejemplo, al crecimiento de los microorganismos y a la especie celular por los xenobióticos presentes. Quizás lo más importante sea la disponibilidad de una humedad óptima, puesto que para la actividad biológica es imprescindible contar con un porcentaje del 15% al 18% en el medio (Rincón Lizcano, 2014).

En muchos casos, los microorganismos autóctonos pueden degradar el material contaminante si se suministran los nutrientes, humedad y receptores de electrones adecuados. Los nutrientes implicados son el nitrógeno, carbono, fósforo y sales minerales. Normalmente se añade oxígeno como receptor de electrones, aunque en ocasiones se añade nitrito o peróxido de hidrógeno en lugar de oxígeno. Además, pueden existir casos en los que se desee una degradación anoxigénica añadiéndose los nutrientes sin la adición de oxígeno (Rincón Lizcano, 2014).

2.3.2 CONSIDERACIONES TÉCNICAS EN LA BIORREMEDIACIÓN

Existen varios factores que deben considerarse cuando se desarrolla una propuesta para el uso de la biorremediación. De importancia inmediata es la presencia o ausencia de población microbiana en el lugar, capaz de degradar el residuo peligroso. Aunque existen algunos

materiales residuales que resisten la degradación microbiana, en general, se pueden obtener organismos capaces de atacar a la mayoría de los residuos. Puede ser necesario potenciar a los microorganismos en términos de densidad celular o actividad metabólica. Es posible que sea necesario tiempo o esfuerzo para desarrollar cepas adaptadas a un sitio en particular; el lugar puede requerir una serie de modificaciones para maximizar el potencial degradativo de los microorganismos; y los costos asociados a estos procesos pueden superar los disponibles para el proyecto. Otra consideración a tener en cuenta es la necesidad de un cosustrato u otra sustancia inductora para mejorar el metabolismo de un residuo específico. Si se trata de una sustancia demasiado costosa o tóxica, quizás no sea factible utilizarla, especialmente si las metodologías propuestas son el tratamiento *in situ* (Ferreira & Santos Oliveira, 2013).

2.3.2.1 CONSIDERACIONES A ESCALA

Para que un proyecto de biorremediación tenga éxito se debe considerar varios factores. En primer lugar se analiza si el procedimiento es factible; además, se realiza un estudio de ingeniería y costos del mismo.

La cantidad y tipo de contaminante son datos claves que se toman en cuenta a la hora de degradar, ya que según estos se puede elegir el microorganismo adecuado para añadir al medio, o si solo se potencializa a los organismos autóctonos de la zona para hacerlo. Otro punto importante es saber si las autoridades competentes permiten el uso de microorganismos transgénicos, además del límite de toxicidad reglamentario para el producto final.

Generalmente el uso de microorganismos, para la biorremediación, permite mineralizar los compuestos tóxicos haciéndoles descender del límite máximo permitido (Loya Del Angel, Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos, 2013).

2.4 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Los tres factores que condicionan la biodegradación son los relacionados con el medio, microorganismos y producto petrolífero (Dias, 2012). Los microorganismos tienen preferencia por ciertos hidrocarburos. Los crudos de petróleo están formados por cuatro familias de compuestos o fracciones: los hidrocarburos alifáticos, los hidrocarburos aromáticos, las resinas y los asfaltenos. Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque se han llegado a describir biodegradaciones de hidrocarburos de hasta 44 carbonos. Los isoprenoides, y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo, por tanto su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación (Pérez Vargas, Vigueras Carmona, Gómez Guzman, & Calva Calva, 2015).

Otro aspecto importante relacionado con las características de los productos petrolíferos son su hidrofobicidad y su facilidad para adsorberse en partículas del suelo como las arcillas o absorberse en la materia orgánica. Estos fenómenos, así como la difusión en microporos dan lugar a una disminución de su biodisponibilidad hacia los microorganismos que deben degradarlos. El lugar, donde está presente el contaminante, debe proporcionar condiciones aptas a los microorganismos para que sean capaces de degradar los hidrocarburos. Existen microorganismos que pueden degradar en presencia o ausencia de oxígeno aunque se sabe que una degradación más eficaz se realiza en un medio aeróbico; en el caso de la zona no saturada de

suelo la variable humedad es muy importante ya que se debe encontrar un equilibrio óptimo entre aquel que requieren los microorganismos para su metabolismo y el que permita una buena aireación. La transformación ideal de los hidrocarburos por parte de los microorganismos es la mineralización, suponiendo que el microorganismo utiliza el contaminante como sustrato de crecimiento.

Los hidrocarburos sólo contienen carbono (C) e hidrógeno (H), mientras que una célula microbiana contiene Carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P), además de otros micronutrientes, en proporciones determinadas. Para que el microorganismo pueda crecer a expensas de los hidrocarburos deberá disponer en el medio de las proporciones necesarias de N y de P además del C e H. Es por ello que en medios pobres en N y P se necesitará agregar con nutrientes o fertilizantes. En lo que respecta a los microorganismos, se toma en cuenta el periodo de aclimatación de los mismos para empezar la degradación de los contaminantes. En este sentido, se conocen distintos factores que pueden disminuir o aumentar este tiempo pero, en términos generales, están relacionados con el historial de contaminación del emplazamiento. Cuando los microorganismos están adaptados a la presencia de contaminantes, no necesitan periodo de aclimatación y la bioestimulación puede realizarse rápidamente; difiere de contaminaciones accidentales en cuyo caso la aclimatación se alarga. Sin embargo, cabe señalar que en el caso de la contaminación por hidrocarburos, al tratarse de unos contaminantes prácticamente omnipresentes, se ha podido constatar que se encuentran microorganismos degradadores de hidrocarburos en prácticamente cualquier emplazamiento (Ñustez Cuartas, 2012).

2.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's)

Los HAPs representan un grupo de compuestos químicos muy diversos formados por dos o más anillos bencénicos fusionados en forma linear, angular o agrupada. Actualmente se conocen unos

100 tipos diferentes de HAPs, ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La especial distribución de electrones en los anillos aromáticos (resonancia), les proporciona una elevada estabilidad, característica que los hace resistentes a la oxidación tanto química como biológica. Debido a su amplia distribución, toxicidad y persistencia se consideran agentes contaminantes de gran interés (Ñustez Cuartas, 2012).

2.6 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

Se ha aislado numerosas cepas bacterianas que pueden degradar alcanos y utilizarlos como fuentes de carbono y energía. La mayoría de estas bacterias pertenecen a las Alfa - Beta, y Gammaproteobacteria y, dentro de las Gram-positivas, destaca el grupo Actinobacteria. Las bacterias del suelo, capaces de degradar hidrocarburos del petróleo más comunes, pertenecen al género *Pseudomonas*. Otros degradadores de alcanos descritos en la literatura incluyen miembros de los géneros *Bacillus* (Firmicutes), *Flavobacterium* (Bacteroidetes), *Paracoccus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* (Proteobacteria), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Microbacterium* (Actinobacteria). Recientemente se han descrito algunas cepas bacterianas, como *Mycobacterium gilvum* AP1 o *Nocardia cyriacigeorgica*, que son capaces de degradar simultáneamente tanto alcanos, lineales y ramificados, como HAPs de bajo y elevado peso molecular (Koukkou & Vandera, 2011).

La mineralización de HAPs es realizada por un número limitado de cepas bacterianas, esto debido a que un gran porcentaje de microorganismos, presentes en el medio, no pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio. En efecto, aunque se conoce que la diversidad genética

de bacterias en el suelo es extremadamente alta (>10.000 millones de procariotas por gramo de suelo), los métodos de cultivo actuales solo nos permiten recuperar un número de células de 100 a 1000 veces menor (García Oliva, Tapia Torres, & Morón Cruz, 2015). Existen bacterias de crecimiento rápido y lento; las primeras se encargan de la primera etapa de degradación mientras que las segundas se encargan de degradar compuestos de mayor peso molecular como *Mycobacterium*. Según los métodos independientes de cultivo se revela que las especies no cultivadas del medio ambiente representan la mayor parte de la diversidad microbiana. Los métodos de cultivo se enfocan en especies de crecimiento rápido pertenecientes a Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. (Farfan Cama, 2012).

2.7 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN IN SITU

Es decir la tecnología aplicada en el lugar donde se produjo la contaminación, una de las principales ventajas es que se puede tratar el medio sin necesidad de excavar ni transportar, cuyo resultado es una disminución de costos. Sin embargo, este tipo de tratamientos generalmente requiere de periodos más largos, es menos seguro en cuanto a la uniformidad del tratamiento debido a la heterogeneidad propia del suelo y a que es más difícil verificar la eficacia del proceso. Las tecnologías de biorremediación *in situ*, incluyen el bioventeo, la bioaumentación, la bioestimulación, la biolabranza, la atenuación natural y la fitorremediación (Alegria, 2013).

2.7.1 BIOVENTEO

Consiste en inyectar aire al terreno contaminado, estimulando la actividad de los microorganismos presentes en el mismo y de esta manera acelerar la biodegradación de los contaminantes. Para emplear esta tecnología se necesita de buena permeabilidad y de poblaciones autóctonas de microorganismos en altas concentraciones, sin olvidar que esta

metodología se utiliza para contaminantes de baja volatilidad. Es necesario conocer la permeabilidad del suelo para el diseño de pozos, distancia entre ellos y dimensiones de los equipos de inyección y extracción (De la Cruz & Huerta, 2015).

2.7.2 BIOAUMENTACIÓN

Consiste en la adición de microorganismos capaces de degradar el contaminante; para esto se realiza un estudio previo analizando varios factores, entre ellos. tamaño del inóculo y supervivencia de los microorganismos añadidos en relación a la competencia con los autóctonos y aclimatación al medio. Esta tecnología se emplea cuando la microflora natural es insuficiente para degradar los contaminantes o si se necesita de un tratamiento inmediato. El tamaño del inóculo a utilizar depende del tamaño de la zona contaminada, de su dispersión y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Alonso Riesco, 2012).

2.7.3 BIOESTIMULACIÓN

Se trata de la modificación del ambiente donde se encuentra el contaminante, para estimular a los microorganismos en su actividad biodegradadora brindándoles condiciones óptimas para que se realice el proceso. Estas modificaciones se realizan a través de inyección de aire comprimido, aporte de nutrientes, ajuste de pH o en el control de variables físico-químicas claves, como la humedad, concentración de oxígeno o temperatura (Rueda Montilla, 2015).

2.7.4 BIOLABRANZA

Esta técnica consiste en la agitación periódica del suelo contaminado mezclado con nutrientes y agua para favorecer su aireación y por ende la actividad biológica. A través de esto se logra inmovilización, biodegradación o transformación del contaminante, generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviados (Alonso Riesco, 2012). La diferencia entre

la biolabranza y el composteo, es que en la biolabranza, se mezcla el suelo contaminado con suelo limpio, mientras que el composteo generalmente se realiza sobre el suelo (Alegria, 2013).

2.7.5 ATENUACIÓN NATURAL

Esta tecnología es lenta y poco eficaz. Consiste en la reducción de las concentraciones de los contaminantes mediante procesos naturales; es decir, se dejan los contaminantes donde están mientras se produce la atenuación natural. Se aprovecha los procesos biológicos por microorganismos autóctonos así como los fenómenos físicos (dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio iónico, transformación abiótica) (Muskus Morales, Santoyo Muñoz, & Silvia, 2013).

2.7.6 FITORREMEDIACIÓN

Consiste en el uso de ciertas plantas que tienen la capacidad de absorber y degradar los contaminantes, se emplea para descontaminar el suelo, aguas residuales y limpieza del aire. La cantidad de contaminación que puede reducir una planta depende entre otros factores de la profundidad hasta la que puedan crecer sus raíces. Las raíces de los árboles penetran más profundo que las raíces de las plantas más pequeñas, por lo que se emplean las raíces de los primeros para eliminar los contaminantes que se encuentran a mayor profundidad. El modo de acción es el siguiente: se deja que las plantas crezcan y absorban o metabolicen el contaminante, luego se cortan y se destruyen (en el caso de que los contaminantes se acumulen en el tallo y hojas) (Isan, 2016).

2.8 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN *EX SITU*

Además de que estas tecnologías son más rápidas que las anteriores, se debe señalar que entre sus ventajas existe una que es la uniformidad en tratamiento e igualmente que los subproductos obtenidos de la biodegradación se almacenan hasta que sean catalogados como menos tóxicos para la salud o el medio ambiente, en caso de que hayan resultado peligrosos. Sin embargo, este tipo de biorremediación es más costoso debido a la implementación de equipos, excavación y traslado del suelo contaminado (Loya Del Angel, Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos, 2013)

2.8.1 COMPOSTEO

El contaminante se mezcla con desechos agrícolas en un conjunto de pilas y por acción de los microorganismos presentes la materia orgánica se transforma en subproductos inocuos estables para el medio ambiente (Rodriguez, 2010).

2.8.2 BIORREACTORES

Existen biorreactores dinámicos y estáticos; en los primeros el material se agita mecánicamente y en los segundos el material se encuentra estático. Los biorreactores son la tecnología más adecuada para descontaminar material que resulte peligroso en casos de derrame o contaminación cruzada. Entre sus ventajas encontramos el factor tiempo y eficiencia en comparación con otros que son más lentos y de poca degradación. Con el uso de biorreactores, es posible combinar de manera controlada y eficiente procesos químicos, físicos y biológicos que mejoren y aceleren la biodegradación (Contreras, 2015).

2.8.3 BIODERADACIÓN POR HONGOS

Es una tecnología de remediación en desarrollo, en la cual se utilizan hongos de pudrición blanca de la madera para degradar una variedad de contaminantes orgánicos. Existen evidencias que demuestran la capacidad de estos hongos para mineralizar una gran cantidad de contaminantes, por acción de sus sistemas enzimáticos relativamente inespecíficos.

Sus enzimas ligninolíticas no solo degradan la lignina, sino también están involucradas en la biotransformación de polímeros orgánicos complejos responsables de la contaminación, por lo que se los consideran viables para la biorremediación (Domínguez Guilarte, Ramos Leal, Argüelles Álvarez, Sánchez López, & Guerra Rivera, 2011).

CAPÍTULO 3

ESTADO DEL ARTE

CAPÍTULO 3 (Estado del arte)

3.1 COMBUSTIBLE RESIDUAL

El combustible residual es un combustible que no ardería en condiciones normales y que se elabora a partir del residuo que queda de la destilación. Su composición es variada, mediante cromatografía de adsorción se puede identificar cuatro o cinco fracciones principales. El término incluye todos los aceites residuales, incluso el obtenido por reducción de la viscosidad, así como mediante la mezcla de productos residuales de otras operaciones. La variedad de grados de los combustibles pesados se produce de acuerdo a rígidas especificaciones con el fin de asegurar su idoneidad para su posterior aplicación específica. Para los hidrocarburos que involucran el fraccionamiento de aceites viscosos se utiliza cromatografía en columna (Speight, 2015).

3.2 APLICABILIDAD Y VENTAJAS DE TRATAMIENTOS DE BIORREMEDIACIÓN *IN SITU*

La bioestimulación es el tratamiento ideal para residuos industriales que contienen mezclas complejas de diversos tipos de hidrocarburos, entre ellos los HAP's, ya que la dificultad del uso de cepas bacterianas radica en que solo son capaces de degradar hidrocarburos específicos.

Para obtener una adecuada biorremediación, se adicionan nutrientes para estimular el desarrollo y actividad degradadora de los microorganismos autóctonos de la zona (Peñaloza Paez, 2012).

Tratamiento	Descripción	Aplicabilidad	Ventajas
Bioestimulación	Es la adición de oxígeno, agua y nutrientes minerales (usualmente combinaciones de nitrógeno, fósforo y trazas de metales)	Aguas subterráneas, suelos.	Aceleración de la reproducción de los organismos indígenas de hasta 100 veces.
Bioventilación	Combina la ventilación convencional del suelo con biodegradación. Los componentes menos volátiles son biodegradados y los componentes volátiles son desfogados mediante ventilación convencional.	Suelos	Aborda la gama completa de hidrocarburos de petróleo. Método eficaz en el suministro de microorganismos indígenas con oxígeno, como apoyo a la degradación.
Bioaumentación	Aplicación directa de microorganismos que pueden proceder del sitio de remediación, de un proveedor fuera de las instalaciones o producto de ingeniería genética.	Aguas subterráneas, suelos.	Una de las técnicas más eficaces de biorremediación. Los microorganismos han sido cultivados y adaptado, además, su capacidad degradadora puede incrementarse con contaminantes específicos y con las condiciones de su entorno.
Tensoactivos	Sustancias sintéticas o biogenéticas son usadas para incrementar la solubilidad acuosa de hidrocarburos sólidos y emulsificar hidrocarburos líquidos.	Alifáticos tanto sólidos como líquidos, además hidrocarburos aromáticos.	Mejora la accesibilidad de contaminantes para los microorganismos, nutrientes y posiblemente oxígeno.
Aplicación de fertilizantes	Suministro de nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, etc., para estimular el metabolismo microbiano de los microorganismos nativos degradadores de petróleo.	Suelo, aguas subterráneas, sedimentos.	Aceleración del proceso natural de biodegradación, especialmente en áreas deficientes de nutrientes.

Ilustración 1: Aplicabilidad y ventajas de tratamientos IN SITU; Fuente: (Korda, Santas, Santas, & A, 1997)

3.3 ESTADÍSTICA SOBRE RESIDUOS

3.3.1 ¿QUÉ ES UN RESIDUO INDUSTRIAL?

Es cualquier sustancia sólida, líquida o gaseosa proveniente de procesos industriales, por lo cual contaminan tierra, agua y aire. La clase de residuo producido depende del tipo de industria de origen; este tipo de residuos no solo pueden generarse como resultado de un proceso, sino también por eventuales emergencias o accidentes en los cuales el productor tiene la obligación de eliminarlos o realizar un tratamiento adecuado para los mismos.

Los residuos reflejan una ineficacia del proceso y la incapacidad de cerrar ciclos productivos apegados a las normativas (Castells, Clasificación y gestión de residuos: Reciclaje de residuos industriales, 2012).

3.3.2 RESIDUOS PELIGROSOS

Residuo peligroso es una terminología que engloba a todos los desechos de actividades productivas que pueden representar un determinado riesgo o peligro para el hombre o para cualquier otro tipo de organismo. De acuerdo con la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de los Estados Unidos, los residuos peligrosos se definen como residuos o combinación de residuos que presentan un determinado peligro, ya sea actual o potencial, para la salud humana o para otros organismos vivos, debido a alguno de los cuatro motivos genéricos siguientes:

- No degradabilidad y persistencia en el lugar de vertido.
- Posibilidad de efectos nocivos por efecto acumulativo.
- Posibilidad de sufrir transformaciones biológicas, con agravamiento de sus efectos.
- Contenido elevado en componentes letales.

Los residuos pueden ser peligrosos en virtud a las siguientes circunstancias:

- * La concentración de las sustancias que lo componen.
- * La forma física en que se presentan (Castells, Clasificación y gestión de residuos: Reciclaje de residuos industriales, 2012).

En la actualidad se sintetizan miles de productos como es el caso de los CFC, DDT, muchos plásticos, etc., los cuales permanecen en el medio ambiente muchos años antes de ser degradados, y no siempre se sabe exactamente qué puede suceder con ellos a mediano o largo

plazo. Otro hecho que aumenta el daño es la bioacumulación que se produce en sustancias, como algunos pesticidas del grupo del DDT. En otras ocasiones, los residuos se transforman en sustancias más tóxicas que ellos mismos. Residuos tóxicos y peligrosos (según las directivas de la Unión Europea) son los que contienen en determinadas concentraciones los metales: As, Cd, Be, Pb, Se, Te, Hg, Sb y sus compuestos

- Compuestos de cobre solubles.
- Fenol, éteres, solventes orgánicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos cancerígenos.
- Isocianatos, cianuros orgánicos e inorgánicos.
- Biocidas y compuestos fito farmacéuticos.
- Compuestos farmacéuticos.
- Polvo y fibras de asbesto.
- Peróxidos, cloratos y percloratos.
- Carbonilos de metales.
- Ácidos y bases usados en el tratamiento de metales, entre otros (Castells, Clasificación y

gestión de residuos: Reciclaje de residuos industriales, 2012).

3.3.3 GENERACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN LA UNION EUROPEA

Los residuos peligrosos suponen un riesgo para la salud humana y el medio ambiente si no se gestionan y se eliminan de forma segura. De los residuos generados en 2012, en la Unión Europea, alrededor de 100,7 millones de toneladas (4,0 % del total) se clasificaron como residuos peligrosos (tabla 1). Esta cifra equivale a una media de 200 kg de residuos peligrosos por cada habitante (de una media de 5,0 toneladas de residuos totales por habitante) (Eurostat, Estadística sobre residuos, 2015).

En 2012, en comparación con 2010, se generó un 2,2 % más de residuos no peligrosos y un 3,3 % más de residuos peligrosos; el volumen de estos últimos aumentó de 97,5 a 100,7 millones de toneladas. Ese año, la proporción de residuos peligrosos en la generación total de residuos fue inferior al 10,0 % en todos los estados miembros de la UE excepto en Estonia, donde la proporción fue del 41,6 % del total, y en Irlanda, donde fue del 10,3 %. El elevadísimo porcentaje de Estonia se debió principalmente a la producción de energía a partir de esquisto bituminoso. Del tercer grupo de países que figuran en la tabla 1, Serbia fue el que registró la proporción más elevada de residuos peligrosos en la generación total de residuos (26,6 %), debido al elevado volumen de actividades extractivas, seguido de Bosnia y Herzegovina (21,2 %) y de Noruega (12,7 %) (Eurostat, Estadística sobre residuos, 2015).

Tabla 1: Total de residuos generados del 2010 al 2012 países miembros de la UE; Fuente: (Eurostat, Eurostat, 2012)

	Non-hazardous waste		Hazardous waste	
	2010	2012	2010	2012
EU-28	2 362 840	2 414 380	97 490	100 730
Belgium	58 058	63 373	4 479	4 258
Bulgaria	153 843	147 845	13 553	13 407
Czech Republic	22 395	21 690	1 363	1 481
Denmark	14 993	15 139	1 225	1 193
Germany	343 614	346 038	19 931	21 984
Estonia	10 038	12 833	8 962	9 159
Ireland	17 835	12 036	1 972	1 385
Greece	70 141	72 031	292	297
Spain	134 528	115 448	2 991	3 114
France	343 543	333 429	11 538	11 303
Croatia	3 085	3 256	73	123
Italy	150 084	153 290	8 543	9 474
Cyprus	2 335	2 055	37	31
Latvia	1 430	2 214	68	95
Lithuania	5 473	5 542	105	137
Luxembourg	10 061	8 082	380	315
Hungary	16 195	15 610	541	700
Malta	1 328	1 423	25	29
Netherlands	115 899	118 753	4 485	4 860
Austria	33 410	32 982	1 473	1 066
Poland	157 966	161 641	1 492	1 737
Portugal	16 646	13 639	667	545
Romania	218 643	266 305	666	671
Slovenia	5 869	4 413	117	133
Slovakia	8 969	8 055	415	370
Finland	101 778	90 170	2 559	1 654
Sweden	115 117	153 614	2 528	2 753
United Kingdom	229 564	233 470	7 004	8 452
Iceland	503	513	8	16
Liechtenstein	304	463	8	4
Norway	7 670	9 364	1 763	1 357
Montenegro	-	383	-	3
FYR of Macedonia	2 178	7 794	150	679
Serbia	22 455	40 545	11 161	14 457
Turkey	780 197	1 009 238	3 226	3 988
Bosnia and Herzegovina	-	3 511	-	946
Kosovo	-	1 165	-	1

Source: Eurostat (online data code: env_wasgen)

Entre 2004 y 2012 se registró un aumento del 11,1 % en cuanto a generación de residuos peligrosos por habitante. Los fuertes incrementos en algunos Estados miembros de la UE (por ejemplo, Letonia o Dinamarca) se vieron compensados, en cierta medida, por reducciones en otros once Estados miembros (por ejemplo, Chipre, Portugal y Rumanía) (Eurostat, Estadística sobre residuos, 2015).

3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica que se usa mucho en la determinación de compuestos orgánicos. Con esta técnica se pueden separar mezclas muy complejas; cuando se acopla con la espectrometría de masas, como sistema de detección, es posible la identificación de los eluados con una alta sensibilidad, creando un sistema analítico muy poderoso.

En la cromatografía la muestra se volatiliza y se inyecta en la columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Los adsorbentes, tales como carbón vegetal, gel de sílice y tamices moleculares, son las fases estacionarias en la CG. En el funcionamiento sistemático básico, la muestra a analizar pasa a estado de vapor inyectándola a la columna cromatográfica; el gas de la fase móvil se denomina gas portador y puede ser nitrógeno, helio, argón e hidrógeno. Estos gases están disponibles en tanques presurizados que requieren reguladores de presión, calibradores y medidores de flujo para controlar la velocidad de flujo del gas.

La fase estacionaria es un líquido no volátil soportado en una pared capilar con partículas sólidas inertes como la tierra de diatomeas. La separación se efectúa a medida que los componentes del vapor se equilibran con el gas portador y la fase estacionaria. La muestra se detecta automáticamente mediante una señal eléctrica; esta señal se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis. En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico, realiza los cálculos e imprime un reporte con los resultados cuantitativos y los tiempos de retención (Contreras López & Molero Meneses, 2012).

La velocidad de flujo del gas portador se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector.

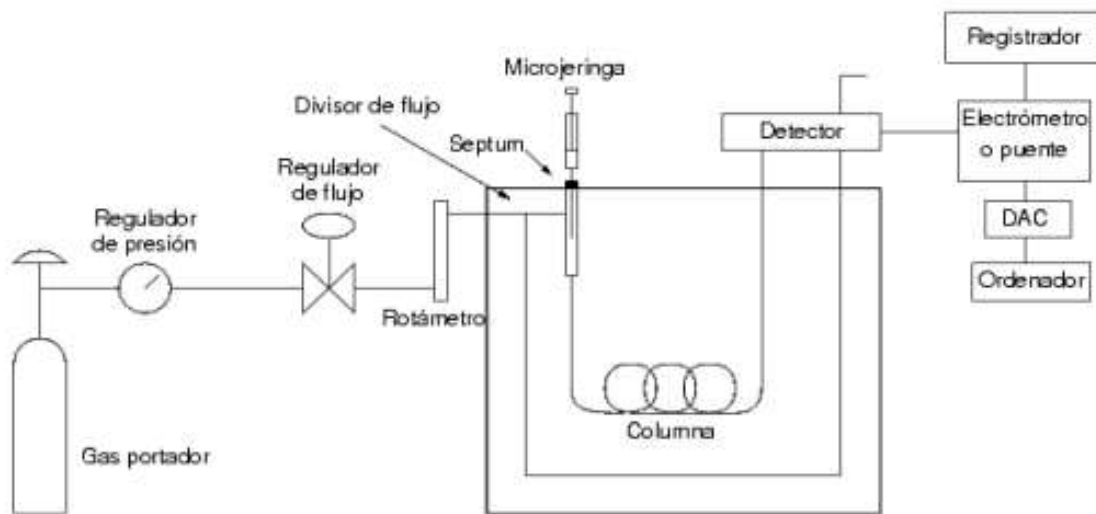


Ilustración 2: Esquema de un cromatógrafo de gases; Fuente: (McNair & Miller, 1998)

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 4 (Materiales y métodos)

4.1 MATERIALES

4.1.1 RECURSOS TÉCNICOS

Para la experimentación se utilizaron los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

4.1.2 MATERIALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizó tierra recolectada de la parroquia “El Valle” de la provincia del Azuay para realizar el aislamiento de la bacteria *Bacillus licheniformis* e igualmente equipos y reactivos de los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana conjuntamente con los desechos industriales de Plastiazuay.

4.2 MÉTODOS

Las siguientes metodologías se basan y han sido relacionadas con la tesis “Selección de microorganismos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos con potencial uso en procesos de biorremediación ambiental” cuyo autor Delgado Ernesto (2011) propone una metodología que puede ser aplicada a la presente investigación.

4.2.1 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

4.2.1.1 MÉTODO CORRELACIONAL

Explicación de la relación entre el *Bacillus licheniformis* mezclado con aceite industrial diluido y aceite industrial puro.

4.2.3.2 OBSERVACIÓN

Mediante la observación se puede realizar un análisis continuo de las variables a fin de verificar los cambios realizados en los diversos procesos de la investigación.

4.2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

4.2.4.1 DISEÑO FACTORIAL 2^3

Realizado en el programa Minitab 17, analizando tres factores como son: medio de crecimiento, temperatura y tiempo con dos niveles a probar.

4.2.4.2 ANÁLISIS ANOVA

Análisis de significancia de toda la información recopilada.

4.2.4.3 DISEÑO ESTADÍSTICO DE REGRESIÓN LINEAL

Permite realizar una proyección y análisis de las variables que se correlacionan.

4.2.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus licheniformis*

La técnica descrita a continuación es una adaptación de los estudios de Olmos, García, Bou, Nieto (2011) quienes han realizado pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias del género *Bacillus*.

4.2.5.1 TINCIÓN DE GRAM

Se realiza el frotis bacteriano y tinción de Gram teniendo en cuenta que *Bacillus licheniformis* es una bacteria Gram positiva facultativa.

4.2.5.2 PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA CATALASA

Se coloca una gota de agua oxigenada en el portaobjetos y posteriormente un poco de la colonia aislada; el burbujeo intenso indica la producción de la enzima.

4.2.5.3 TINCIÓN DE ESPORAS

Se realiza fijación al calor de las bacterias en el portaobjetos para cubrir con verde malaquita, se lava con agua y se agrega safranina para finalmente observar en el microscopio; las células vegetativas se tiñen de rosa y las esporas de verde.

4.2.5.4 UTILIZACIÓN DE CITRATO DE SODIO

Se siembra la bacteria en medio Simmons dispuesto en tubos de ensayo a pico de clarín en forma de estría durante 24 h a 35°C. Se produce un cambio de coloración a azul oscuro.

4.2.5.5 SIEMBRA EN NaCl AL 7%

Crecimiento positivo de la bacteria en un medio con NaCl a 37°C.

4.2.5.6 SIEMBRA EN AGAR SANGRE

No debe presentar hemólisis al sembrar la bacteria en agar sangre durante 24 – 48h a 37°C.

4.2.5.7 ANAERÓBICO FACULTATIVO

Existe crecimiento al sembrar la bacteria en agar chocolate en jarra gaspak durante 24h a 37°C.

4.2.5.8 OBSERVACIÓN DE COLONIAS

Observación de colonias lobuladas, color cremoso, 3-8 mm de diámetro.

4.2.5.9 MORFOLOGÍA

Bacilos largos de 4 a 6 um y mótils en cadena.

4.2.5.10 VOGES-PROSKAUER

Se siembra la bacteria en medio Clark-Lubs a 37°C durante 48 h, Se añade 0.6 mL de alfa naftol al 5%, se agita y se añade 0.2 mL de KOH al 40% finalmente se incuba durante 1 o 2 horas a 37°C, después de 20 minutos aparece una coloración roja.

4.2.5.11 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Se siembra la bacteria en agar manitol durante 24 h a 37°C y se produce un cambio de coloración a amarillo debido a que vira el indicador de pH indicando que fermentan el manitol.

4.2.5.12 BACTERIA MESÓFILA

Existe crecimiento al sembrar la bacteria en agar TSA a 37°C y a 50°C.

4.2.5.13 HIDRÓLISIS DE GELATINA

Hidrólisis positiva al sembrar la bacteria en medio gelatina nutritiva mediante una picadura en posición vertical hasta una profundidad de 2-2.5 cm durante 24 h a 37°C, finalmente se coloca el tubo en el refrigerador durante 2 h.

4.2.6 BIOENSAYOS EN CAJAS PETRI Y FRASCOS DE VIDRIO CON AGAR TSA

4.2.6.1 DILUCIÓN DE RESIDUO INDUSTRIAL

Se diluye el residuo industrial en 1/10 y 1/100 empleando aceite de vaselina estéril.

4.2.6.2 BIOENSAYOS EN CAJAS PETRI

En 9 cajas Petri con agar TSA se siembra la bacteria *Bacillus licheniformis* y se colocan cuatro discos de papel previamente esterilizados con una gota de residuo industrial durante 7 días a 37°C.

Se emplean tres tratamientos con tres repeticiones.

Tabla 2: Repeticiones empleadas para análisis ANOVA; Fuente: Autor

REPETICIONES	TRATAMIENTOS
3 Cajas Petri	Residuo industrial puro
3 Cajas Petri	Residuo industrial 1/10
3 Cajas Petri	Residuo industrial 1/100

4.2.6.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO

En nueve frascos de vidrio con agar TSA se siembra la bacteria y se colocan 2 mL de residuo industrial durante 45 días a temperatura ambiente, utilizando los mismos tratamientos empleados en la tabla 2.

4.2.7 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO

La técnica descrita a continuación es una recopilación de datos de Delgado, (2011) quien ha realizado varias investigaciones acerca de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) mediante microorganismos.

4.2.7.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BACTERIANA

Se siembra la bacteria en un matraz con 40 mL de medio TSA y se espera a que cubra toda la superficie del medio, se añade agua destilada previamente esterilizada y se agita lentamente para lograr el desprendimiento de la bacteria para finalmente almacenarlo y codificarlo.

4.2.7.2 PREPARACIÓN DEL CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO

Se esteriliza 1000 mL de agua destilada y se añaden 3 g de NaNO_3 0.25 g de MgSO_4 , 1 g de K_2HPO_4 y 0.5 g de KCl, se autoclava y se dispensa en los frascos de vidrio.

4.2.7.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO

A los frascos de vidrio con el medio líquido especializado se añaden respectivamente 2 mL de residuo industrial, 1 mL de la solución bacteriana, una gota de Tween y se deja en constante movimiento por 45 días a temperatura ambiente.

Los tratamientos empleados son los mismos utilizados en la tabla 2 en cuanto al residuo industrial añadido.

4.2.7.4 SEPARACIÓN POR EL MÉTODO QuEChERS

La técnica descrita a continuación es una adaptación de los diversos métodos empleados por Fuentes, García, & Fernández, (2015) para separar muestras y realizar las corridas mediante Cromatografía de gases.

4.2.7.4.1 FASE DE EXTRACCIÓN

Después de los 45 días se coloca 8.77 mL del contenido de los frascos en un tubo de centrífuga, se agrega 10 mL de acetonitrilo y se agita durante 1 minuto en el vortex, se agregan 6 g de MgSO_4 1.5 g de acetato de sodio y se agita por 1 minuto, finalmente centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Repetir para cada tratamiento.

4.2.7.4.2 FASE DISPERSIVA

Se transfiere una alícuota de 5 mL del proceso anterior en un tubo con 400 mg de difenilamina, 400 mg de silicagel y 1200 mg de MgSO_4 , centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Finalmente se extrae 2 mL de alícuota y se guarda en tubos cónicos con capacidad de 1.5 mL debidamente etiquetados en el congelador.

4.2.7.5 ANÁLISIS POR CROMATÓGRAFO DE GASES

Se analiza la muestra pura sin bacterias añadidas para establecer un rango de degradación, lo que da como resultado una gran cantidad de picos que no se analizan de manera cuantitativa sino cualitativa por lo que se procede a realizar una comparación de datos para verificar si hubo o no degradación.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

5.1 RECOLECCIÓN DE DATOS

5.1.1 PRUEBAS PARA CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus licheniformis*

Tabla 3: Listado de análisis para la caracterización de *Bacillus licheniformis*; Fuente: Autor

PRUEBAS	RESULTADOS
Tinción de Gram	Negativo
Producción de la enzima catalasa	Positivo
Tinción de esporas	Positivo
Utilización de citrato de sodio	Positivo
NaCl 7%	Crecimiento
Siembra en agar sangre	Ausencia de hemólisis
Anaeróbico facultativo	Crecimiento
Observación de colonias	Lobuladas, color cremoso, 3-4 mm de diámetro
Morfología del bacilo	Tamaño 2-4 um, presencia de esporas
Voges-Proskauer	Positivo
Fermentación de carbohidratos	Positivo
Temperatura de crecimiento	Mesófila
Hidrólisis de gelatina	Positivo

Los resultados presentados confirman que la bacteria aislada es *Bacillus licheniformis*.

Tabla 4: Corrida de muestra sin dilución en ausencia de bacterias; Fuente: Autor

Tiempo de retención	Area bajo la curva	Porcentaje en relación al total
1.980	935873886	27.08%
2.095	419281625	12.13%
2.137	615773099	17.82%
2.838	2489794	0.07%
3.027	1186911	0.03%
3.100	1200952	0.03%
3.270	1529915	0.04%
3.495	1246433	0.04%
3.672	5668320	0.16%
3.802	4487829	0.13%
3.878	2824617	0.08%
3.945	3876209	0.11%
4.132	12938479	0.37%
4.198	16344306	0.47%
4.327	4388078	0.13%
4.398	3113461	0.09%
4.487	14782302	0.43%
4.563	15104559	0.44%
4.707	4511280	0.13%
4.793	13255187	0.38%
4.882	31618407	0.91%
5.098	19939819	0.58%
5.172	21096879	0.61%
5.242	22245429	0.64%
5.428	18326102	0.53%
5.482	11335864	0.33%
5.590	29738293	0.86%
5.855	20097830	0.58%
5.923	9558386	0.28%
6.060	8515914	0.25%
6.185	7593548	0.22%
6.277	20840641	0.60%
6.482	82810610	2.40%
6.530	5365282	0.16%
6.622	5180096	0.15%

6.672	5930945	0.17%
6.805	4368955	0.13%
6.892	10903940	0.32%
6.983	4165788	0.12%
7.063	13501247	0.39%
7.173	3620159	0.10%
7.225	5343733	0.15%
7.378	15012590	0.43%
7.530	24219207	0.70%
7.702	1765756	0.05%
7.773	5305306	0.15%
7.962	9303764	0.27%
8.058	4658236	0.13%
8.152	7724083	0.22%
8.230	2307904	0.07%
8.338	6386034	0.18%
8.442	12359317	0.36%
8.517	2505473	0.07%
8.590	3684446	0.11%
8.690	17489287	0.51%
8.798	1820053	0.05%
8.887	12300012	0.36%
8.973	5732135	0.17%
9.092	3884638	0.11%
9.173	3037420	0.09%
9.235	3827027	0.11%
9.298	1829922	0.05%
9.457	9287866	0.27%
9.522	4247015	0.12%
9.700	7428441	0.21%
9.812	10886094	0.31%
9.970	22148465	0.64%
10.068	6403422	0.19%
10.192	13375356	0.39%
10.347	3220715	0.09%
10.423	9656219	0.28%
10.547	3784083	0.11%
10.617	5364870	0.16%
10.768	6015811	0.17%
10.880	1834414	0.05%
10.958	14784952	0.43%

11.032	7798786	0.23%
11.193	9053381	0.26%
11.270	1660208	0.05%
11.345	14979165	0.43%
11.508	4150137	0.12%
11.623	14634241	0.42%
11.858	414628322	12.00%
11.888	150377479	4.35%
12.062	2053222	0.06%
12.168	2425133	0.07%
12.230	5749339	0.17%
12.287	6407854	0.19%
12.477	5977794	0.17%
12.603	4546571	0.13%
12.705	8335763	0.24%
12.800	2009924	0.06%
12.937	9575168	0.28%
13.067	6340603	0.18%
13.158	5487912	0.16%
13.383	3718357	0.11%
13.477	1266613	0.04%
13.588	2537876	0.07%
13.645	2063995	0.06%
13.748	7063962	0.20%
13.878	5882223	0.17%
13.983	2599472	0.08%
14.132	1021735	0.03%
14.207	1025985	0.03%
14.298	2335512	0.07%
14.352	4357025	0.13%
14.520	4108882	0.12%
14.672	2428323	0.07%
14.773	1291279	0.04%
15.160	1343926	0.04%
15.238	2455148	0.07%
15.363	5177336	0.15%
15.450	3526822	0.10%
15.665	1863680	0.05%
16.107	1883181	0.05%
16.232	1104211	0.03%
17.033	1254561	0.04%

TOTAL	3456462448	100%
-------	------------	------

5.2 ANÁLISIS DE DATOS

La información recopilada, tras los procesos previamente descrito, permite analizar mediante los diseños estadísticos el de factores conjunto óptimos de biorremediación en cuanto a procesos de elaboración de laminados, además, de una comparación de sustancias degradadas antes de, y después de colocar la bacteria en el residuo puro y diluido.

5.2.1 DATOS PARA ANÁLISIS ANOVA

Tabla 5: Tratamientos y niveles empleados para análisis ANOVA: Fuente: Autor

Temperatura	Tiempo (Días)	Medio de crecimiento
21°C	5	TSA
37°C	45	Caldo especial

5.2.2 ÁREA BAJO LA CURVA CONSIDERANDO LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS

Tabla 6: Área bajo la curva y representación en porcentaje de contaminante considerando los diversos tratamientos; Fuente: Autor

Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Medio nutritivo	Área total bajo la curva	% Contaminante presente
5	21	TSA	3456462448	100
45	21	TSA	3238476166	93.69
5	37	TSA	2226475467	64.41
45	37	TSA	2002013244	57.92
5	21	Caldo especial	2279702941	65.95
45	21	Caldo especial	1394035049	40.33
5	37	Caldo especial	3150721825	91.15
45	37	Caldo especial	1421375467	41.12

5	21	TSA	3425334427	99.09
45	21	TSA	3455377230	99.96
5	37	TSA	2226990883	64.42
45	37	TSA	2083840811	60.28
5	21	Caldo especial	2250716492	65.11
45	21	Caldo especial	1003563098	29.03
5	37	Caldo especial	3025215123	87.52
45	37	Caldo especial	1891351892	54.71

Con la ayuda de ANOVA se realiza una mejor interpretación de datos mediante gráficos explicativos como son: gráficas de Pareto, de caja, y de efectos principales.

5.3 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

5.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA DEGRADACIÓN

Para evaluar el nivel apropiado de cada tratamiento, para una mejor respuesta en el proceso de degradación, se realizan tres tipos de gráfica a partir del análisis estadístico ANOVA y diseño factorial 2k determinando así que la temperatura que influye de mejor manera es de 37°C a 45 días en caldo especial preparado; según la gráfica de efectos principales, de Pareto y de caja.

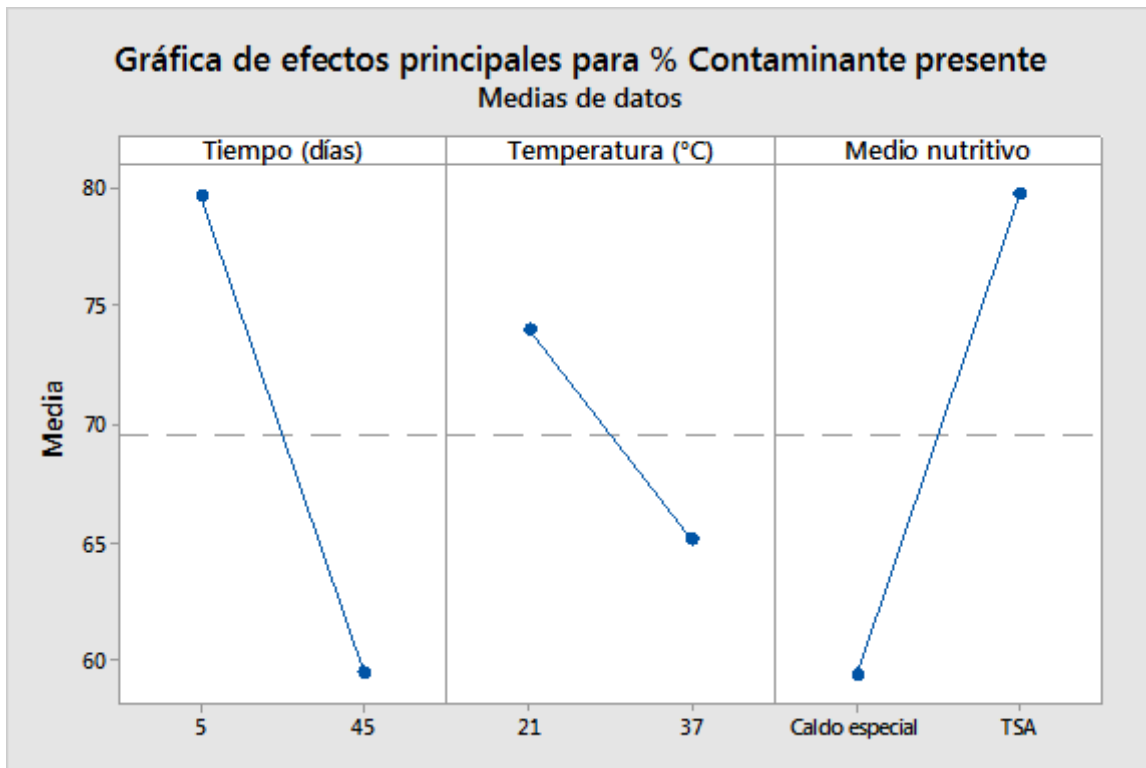


Ilustración 3: Gráfica de efectos principales para biodegradación; Fuente: Autor

En comparación con los dos niveles de cada tratamiento (tiempo, temperatura y medio de crecimiento) se determina que los siguientes valores son los adecuados para el proceso, debido a que la media de degradación es menor en estos valores, lo que indica la disminución de concentración del contaminante en dichos tratamientos; es decir, se obtuvo mayor biodegradación:

Tiempo: 45 días

Temperatura: 37°C

Medio de crecimiento: Caldo especial

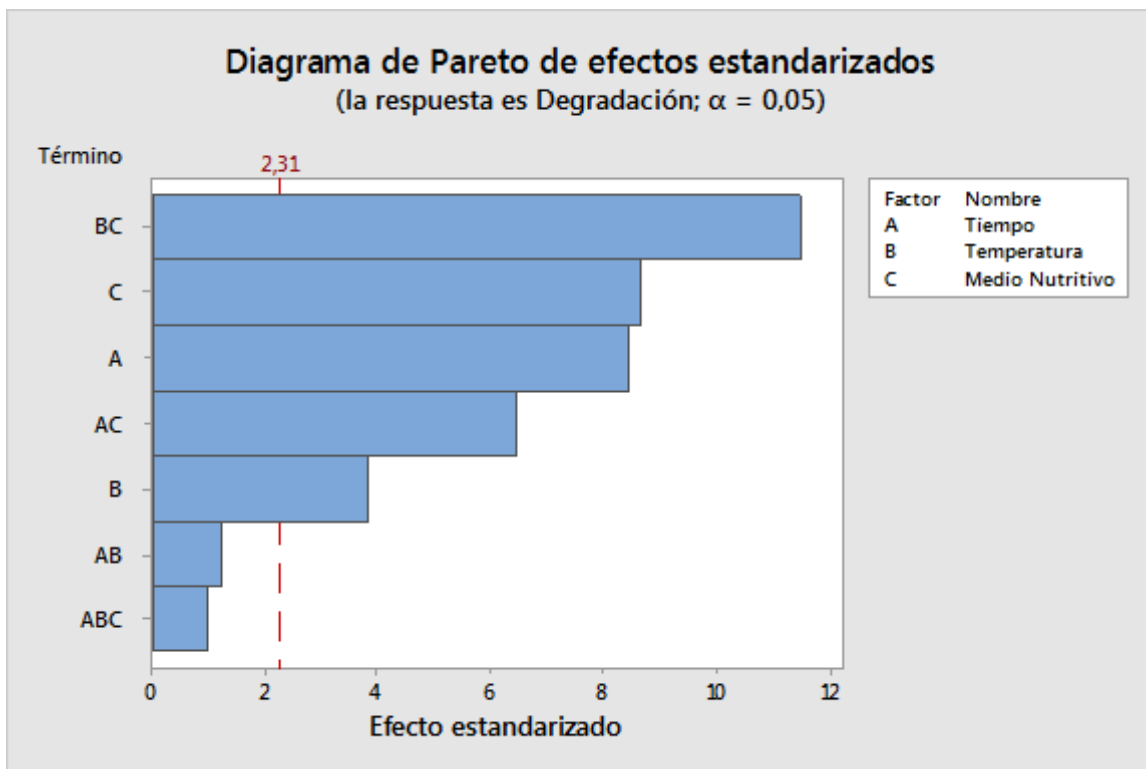


Ilustración 4: Diagrama de Pareto; Fuente: Autor

El diagrama de Pareto nos muestra la interacción de factores que tienen repercusión en el proceso degradativo; en este caso muestra que la temperatura conjuntamente con el medio nutritivo influyen más que el tiempo y el medio de crecimiento individualmente.

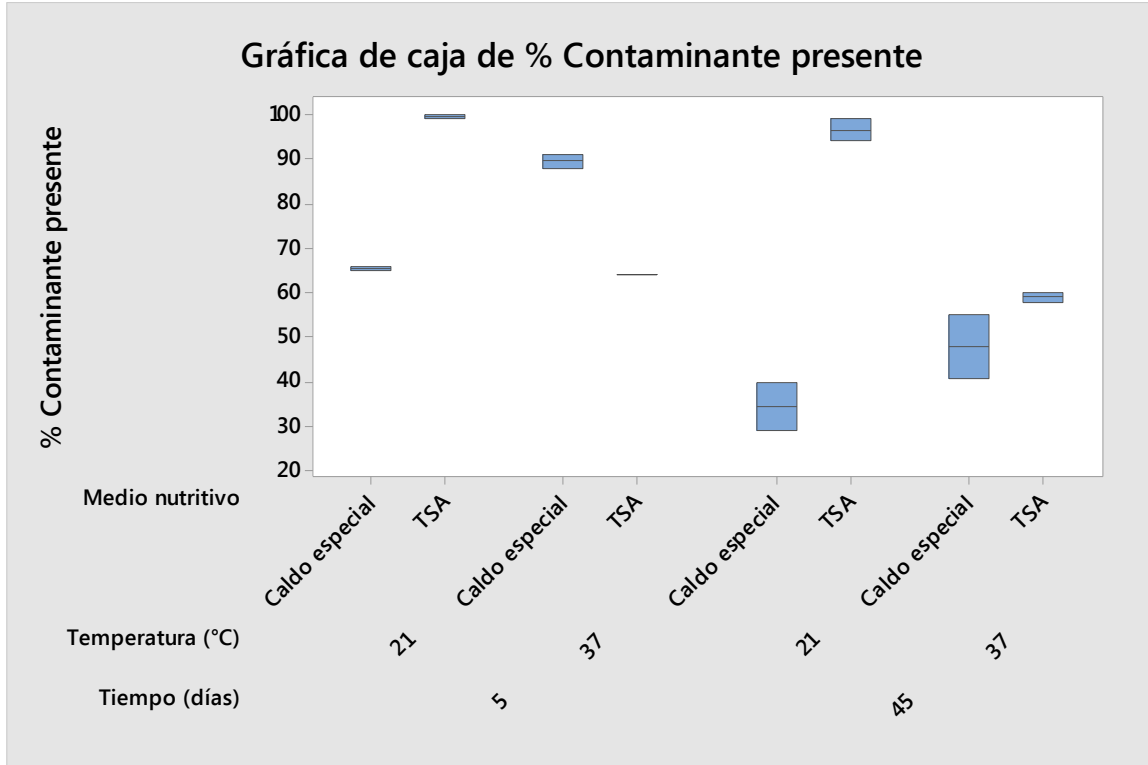


Ilustración 5: Gráficas de caja de contaminante presente. Fuente: Autor

Mediante el gráfico de cajas se observa la distribución de los datos, además de establecer comparaciones cuyo resultado es que los datos de los tres tratamientos son simétricos pero que existe mayor cantidad de los mismos en el medio caldo especial que en el TSA. De igual manera, se observa que la media de los datos ubicados en caldo especial tienen menos porcentaje de contaminante presente que en caldo TSA, lo que confirma así la significancia del tratamiento con medio nutritivo.

5.3.1.1 FACTORES QUE TIENEN REPERCUSIÓN EN EL PROCESO MEDIANTE ANÁLISIS DE VARIANZA

Gracias al valor p obtenido de cada factor se puede determinar la significancia del mismo en el proceso de biorremediación. Se debe tomar en cuenta que un valor p menor a 0.05 es significativo; es decir, es influyente en cuanto a la degradación (Ruiz Bueno, 2015).

Se comprueba que la temperatura tiene un valor p de 0,442; es decir, no tiene significancia. En tanto que el valor p de tiempo es de 0,077 y el valor p de medio nutritivo es de 0,069; o sea, es el más aproximado a ser significativo de los tres factores analizados mediante ANOVA.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	1	1,99628E+18	1,99628E+18	3,64	0,077
Error	14	7,68778E+18	5,49127E+17		
Total	15	9,68406E+18			

Ilustración 6: Valor p obtenido de tiempo en ANOVA. Fuente: Autor

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio Nutritivo	1	2,10126E+18	2,10126E+18	3,88	0,069
Error	14	7,58280E+18	5,41628E+17		
Total	15	9,68406E+18			

Ilustración 7: Valor p obtenido de medio nutritivo en ANOVA. Fuente: Autor

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura	1	4,14634E+17	4,14634E+17	0,63	0,442
Error	14	9,26942E+18	6,62102E+17		
Total	15	9,68406E+18			

Ilustración 8: Valor p obtenido de temperatura en ANOVA. Fuente: Autor

5.3.2 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON AGAR TSA

5.3.2.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La muestra utilizada para este análisis se la obtuvo luego de la degradación del residuo sin dilución en caldo TSA.

Los datos que se presentan a continuación son los más representativos del cromatograma, debido a que el área bajo la curva encontrada en estos picos es un indicativo que requeriría de más tiempo para culminar su degradación. Como se observa en algunos casos, aún existe un porcentaje de contaminante de hasta el 18%, por lo que se confirma la biodegradación; pero, al ser mayor el área bajo la curva, existiría mayor cantidad en dichos picos, por lo que es necesario más tiempo para eliminar el contaminante.

La muestra 1 representa el residuo sin la acción de las bacterias, por lo que se utiliza como base para efectuar una comparación con la muestra 2 y 3, en cuyos casos está presente el microorganismo. Cabe destacar que en el tiempo de retención 1.972 se encuentra la curva del diluyente por lo que no se toma en cuenta para el análisis.

Tabla 7: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en TSA, y (T.R) tiempos de retención. Fuente: Autor

	MUESTRA	T.R (10.953)		T.R (12.695)	
		Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área
Frasco Sb sin dilución	1	14784952	100	8335763	100
Muestra sin dilución en TSA Cb réplica 1	2	1001601	6	1536296	18.43
Muestra sin dilución en TSA Cb réplica 2	3	208048	1.40	327287	3.92

5.3.2.1.2 PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN

En la muestra 1 no existe degradación debido a que no están presentes las bacterias; en la muestra 2 y 3 si existe degradación de hasta el 98.60% en 45 días. Se estima que sea necesario más tiempo para la eliminación del contaminante, aproximadamente 3 meses.

Tabla 8: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en TSA, y tiempos de retención (T.R). Fuente: Autor

	MUESTRA	% DEGRADADO T.R (10.953)	% DEGRADADO T.R (12.695)
Frasco Sb sin diluir	1	0	0
Muestra sin diluir en TSA Cb réplica 1	2	94	81.57
Muestra sin diluir en TSA Cb réplica 2	3	98.60	96.08

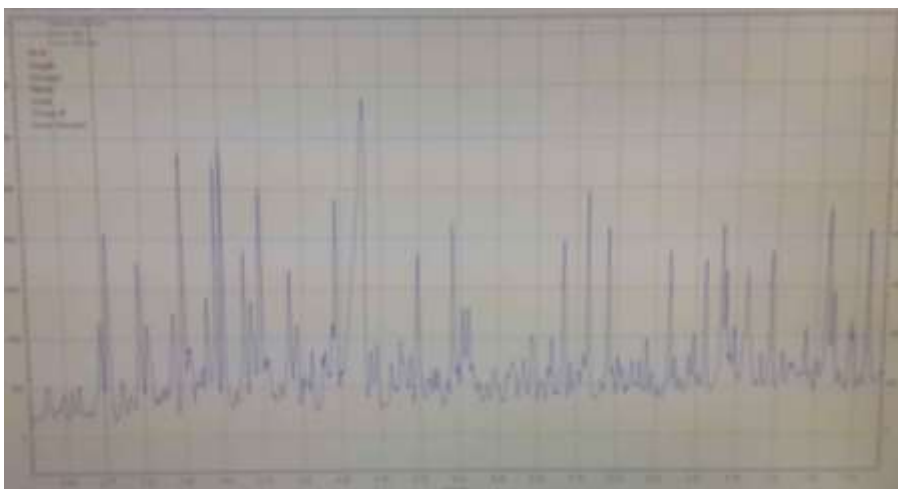


Ilustración 9: Picos encontrados en la muestra de residuo sin diluir en ausencia de bacteria. Fuente: Autor

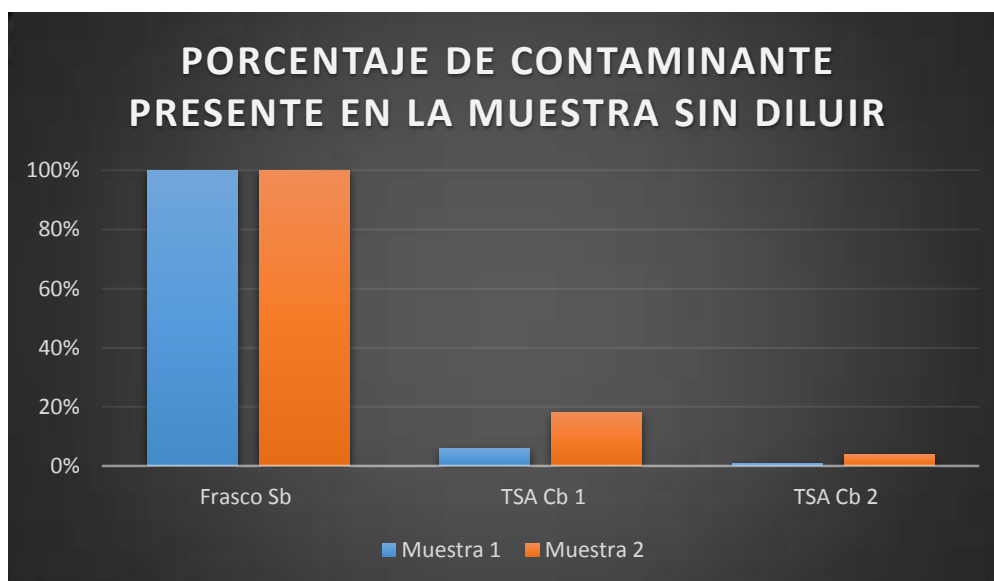


Ilustración 10: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria. Fuente: Autor

Se puede observar en el gráfico que existe menos del 20% de contaminante en las muestras en TSA, indicando así que se ha producido más del 80% de degradación.

5.3.2.2 DISEÑOS ESTADÍSTICOS

Según el diseño estadístico de regresión lineal se presenta una situación ideal en la que todos los puntos de un diagrama de dispersión se encuentran en una línea recta al cuantificar la relación entre las variables temperatura y tiempo de degradación, es decir, el 100%, en este caso el 92.57% ha obtenido una recta con mejor ajuste de puntos por lo que se va a poder explicar solo este porcentaje en cuanto a las variables tiempo de degradación y temperatura.

En cinco días a temperatura de 37°C empieza la biodegradación mientras que a 30°C la degradación empieza a los 25 días, es decir, entre los dos factores el más influyente es la temperatura.

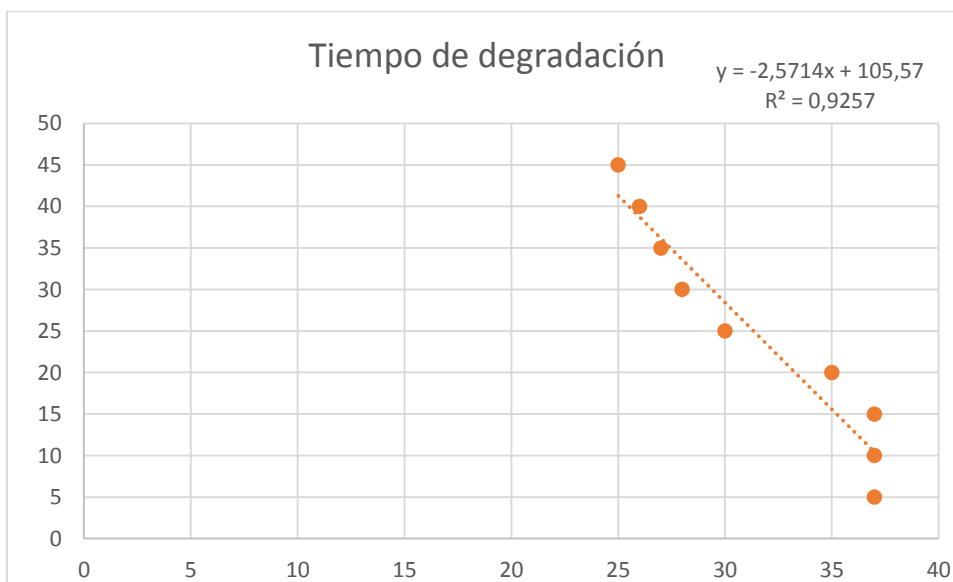


Ilustración 21: Diseño estadístico de regresión lineal con variable tiempo y temperatura. Fuente: Autor

5.3.3 BIOENSAYOS EN FRASCOS DE VIDRIO CON CALDO LÍQUIDO ESPECIALIZADO

5.3.3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Para una mejor presentación y comparación de áreas bajo la curva del contaminante degradado se toma la muestra sin dilución además de la diluida 1/10, y se efectúa el análisis. Se hace énfasis en los tiempos de retención: 6.338, 6.922, 9.015, 10.958, 11.817, 12.693 cuyas áreas bajo la curva son las más persistentes y necesitarían de más tiempo para degradarse, además, se toma en cuenta que son las de mayor concentración en la muestra sin diluir y en ausencia de microorganismos.

Tabla 9: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en caldo especial sin diluir después de 60 días, y (T.R) tiempos de retención. Fuente: Autor

	T.R (6.338)		T.R (6.922)		T.R (9.015)		T.R (10.958)		T.R (11.817)		T.R (12.693)	
	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área
Frasco Sb sin diluir	20840641	100	4165788	100	3884638	100	14784952	100	414628322	100	8335763	100
Frasco Cb sin diluir réplica 1	1563797	7.50	1747770	41.95	1762383	45.36	7690375	52.01	141607327	34.15	2639570	31.66
Frasco Cb sin diluir réplica 2	21966	0.10	46491	1.11	49319	1.26	28965	0.19	16375838	3.94	20997	0.25

5.3.3.1.2 PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN

Se puede observar que existe biodegradación del contaminante al analizar las áreas bajo la curva en tiempos de retención representativos después de 60 días.

Tabla 10: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en caldo especial después de 60 días, y tiempos de retención (T.R). Fuente: Autor

	% DEGRADADO T.R (6.338)	% DEGRADADO T.R (6.922)	% DEGRADADO T.R. (9.015)	% DEGRADADO T.R.(10.958)	% DEGRADADO T.R. (11.817)	% DEGRADADO T.R. (12.693)
Frasco Sb sin dilución	0	0	0	0	0	0
Frasco Cb sin dilución	92.50	58.05	54.64	47.99	65.85	68.34
Frasco Cb sin dilución	99.90	98.89	98.74	99.81	96.06	99.75

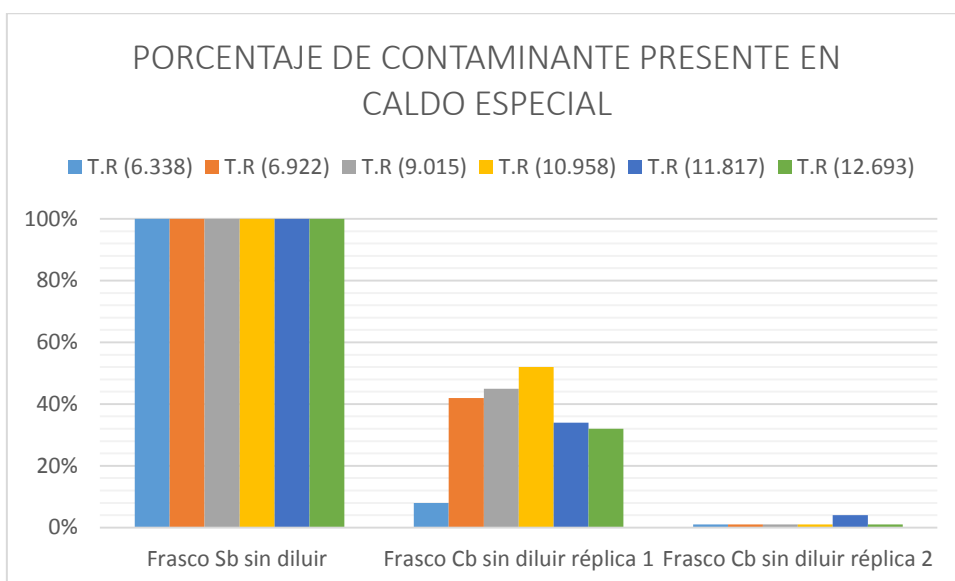


Ilustración 32: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria, (Cb) con bacteria después de 60 días, y (T.R) tiempos de retención. Fuente: Autor

En el gráfico se observa que los frascos Cb (con bacteria) presentan menos del 60% de contaminantes a diferencia del frasco Sb (sin bacteria) en residuo sin dilución que presentan el 100% del contaminante después de 60 días.

Tabla 11: Área bajo la curva de muestra Sb (sin bacteria) y Cb (con bacteria) en caldo especial diluido 1/10 después de 60 días, y tiempos de retención (T.R); Fuente: Autor

	T.R (2.078)		T.R (9.015)		T.R (10.967)		T.R (11.848)		T.R (12.698)	
	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área	Área bajo la curva	% Área
Frasco Sb sin diluir	4192816250	100	3884638	100	14784952	100	4146283220	100	8335763	100
Frasco 3 Cb 1/10	1024513656	24.43	1328953	34.21	10467969	70.80	1511096273	36.44	2627299	31.51
Frasco 4 Cb 1/10	1285227742	30.65	71566	1.84	32982	0.22	17765799	0.42	47620	0.57
Frasco 5 Cb 1/10	1100812087	26.25	164035	4.22	869841	5.88	341609847	8.23	255192	3.06

5.3.3.1.3 PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN

Tabla 12: Porcentaje de degradación en muestra (Sb) sin bacteria y (Cb) con bacteria en caldo especial diluido 1/10 después de 60 días, y tiempos de retención (T.R); Fuente: Autor

	% DEGRADADO T.R (2.078)	% DEGRADADO T.R (9.015)	% DEGRADADO T.R (10.967)	% DEGRADADO T.R (11.848)	% DEGRADADO T.R (12.698)
Frasco Sb	0	0	0	0	0
Frasco 1 Cb 1/10	75.57	65.79	29.20	63.56	68.49
Frasco 2 Cb 1/10	69.35	98.16	99.78	99.58	99.43
Frasco 3 Cb 1/10	73.75	95.78	94.12	91.77	96.94

Se puede apreciar en la tabla que existe biodegradación en los frascos que contienen caldo especial con residuo diluido 1/10 después de 60 días.

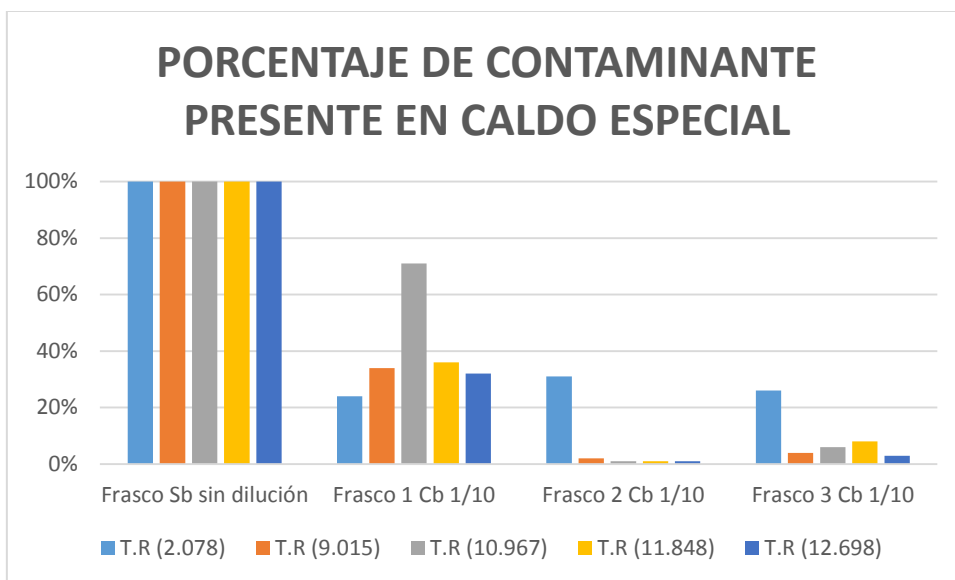


Ilustración 13: Porcentaje de contaminante presente en cada muestra (Sb) sin bacteria, (Cb) con bacteria después de 60 días, y (T.R) tiempos de retención; Fuente: Autor

5.4 DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue determinar la capacidad degradativa de la bacteria *Bacillus licheniformis* para residuos industriales de empresas de laminados plásticos. Sobre todo, se pretendió aportar a la gestión integral de residuos peligrosos empleando un método amigable con el medio ambiente y la salud humana.

De los tres factores (tiempo, temperatura y medio nutritivo) en los que se analizaron dos niveles de cada uno (5 – 45 días), (37°C - 21°C), (TSA - caldo nutritivo) respectivamente, se puede deducir que el tratamiento a 21°C en caldo nutritivo especial durante 45 días es el ideal para la biorremediación de residuos industriales de esta naturaleza. Al emplear una temperatura de 37°C la degradación resulta más rápida pero al mismo tiempo más costosa; parámetro que se desea evitar, debido a la temperatura promedio de la zona.

Existen aspectos que aún se deben considerar y que no han sido resueltos por no ir acorde al corte investigativo de este trabajo como la determinación y porcentaje de los contaminantes presentes, ya que es un estudio cualitativo y no cuantitativo.

A diferencia con el autor Meneses Parra (2014), el microorganismo utilizado para biorremediación de residuos provenientes de laminados fue *Bacillus licheniformis*, no solo *Trichoderma* como lo realiza él. Además de que la investigación se realizó en laboratorio y no en suelo a campo abierto. Estas diferencias se deben a los cortes investigativos de ambas monografías relacionadas con la biorremediación de residuos industriales. Por otro, lado el tiempo de degradación también difiere de la expuesta por Meneses Parra (2014) en 90 días, a diferencia de la expuesta por esta investigación durante 45 días a temperatura ambiente. Esta desigualdad es entendible debido a las distintas concentraciones de residuo industrial analizado entre los investigadores.

También existen congruencias con el investigador Cando Rodríguez (2011) en relación a la elaboración del medio nutritivo y la metodología empleada para la biorremediación. Es decir, el caldo utilizado como base para el desarrollo de la bacteria fue el mismo utilizado por Cando Rodríguez (2011) para biorremediación de residuos que presentan HAP's, al igual que los factores como: agitación, dilución del residuo y temperatura ambiente.

El tiempo de biorremediación es uno de los principales factores a considerarse porque se lo puede disminuir aumentando la temperatura; pero, al mismo tiempo esto generaría costos adicionales, por lo que se deja abierto este tema para futuras líneas de investigación.

Los hallazgos encontrados en este trabajo pueden aplicarse a otros sistemas de biorremediación, considerando las constantes halladas, además de consideraciones técnicas útiles para otros microorganismos que no sean *Bacillus licheniformis*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO 6 (Conclusiones y recomendaciones)

6.1 CONCLUSIONES

Según los diversos procedimientos aplicados y análisis de datos se ha concluido que la bacteria *Bacillus licheniformis* degrada con mayor rapidez a temperatura de 37°C en un caldo especializado, el mismo que cuenta con varios nutrientes que le permiten un ambiente óptimo para desarrollarse y biodegradar.

Los resultados son significativos ya que a dicha temperatura, la degradación empieza a los cinco días; mientras que a temperatura ambiente, la degradación comienza a los 45 días.

En cuanto a la diferencia entre agar TSA y caldo nutritivo preparado se concluye que en agar TSA solo se produce la biodegradación a temperatura de 37°C, en tanto que el caldo funciona a dos temperaturas (21°C y 37°C) existiendo solo una diferencia de tiempo de biodegradación entre las mismas.

La bacteria *Bacillus licheniformis* ha logrado degradar residuo industrial en sus diferentes tratamientos; es decir, puro y diluido. Los métodos empleados son más baratos a diferencia de otros métodos como incineración o estabilización y reutilización después de la retirada de plásticos y desechos que llegan a costar hasta \$16000 (EMAC, 2014). El tratamiento de los mismos está a cargo de una compañía llamada GADERE S.A. (Gestión Ambiental de Residuos) en una planta técnicamente adecuada en Guayaquil.

Según la información técnica de ITOPF (2014), existen estudios sobre hidrocarburos mezclados con plásticos, cuyo método de separación es:

- Recolección de hidrocarburos líquidos lixiviados durante almacenamiento temporal.

- Lavado con agua para separación.
- Retirada del agua libre.
- Compresión.

Las opciones de desecho son:

- Degradación mediante compostaje o técnicas de compost de hidrocarburos mezclados con algas marinas o adsorbentes naturales.
- Relleno Sanitario.
- Incineración.

Otra opción es el tratamiento térmico que con ayuda de desemulsificantes reducen la viscosidad de los hidrocarburos para que resulte más fácil bombearlos.

Estas opciones no son del todo positivas ya que en algunos casos pueden resultar más tóxicos y dañinos al medio ambiente, como la incineración; además de costosas, como se vio anteriormente. Por lo tanto el proceso de biorremediación, mediante el uso de *Bacillus licheniformis*, constituye una excelente idea para aplicarlo y adaptarlo a maneras industriales en empresas de laminados plásticos que cuentan con el mismo problema.

6.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda adaptar este procedimiento a condiciones de campo, es decir, cambiar diversos factores como son: temperatura, asepsia, caldo nutritivo empleado y agitación.

De esta manera está recomendado aplicar el proceso en el área misma de biorremediación reduciendo costos y obteniendo el resultado esperado.

ANEXOS

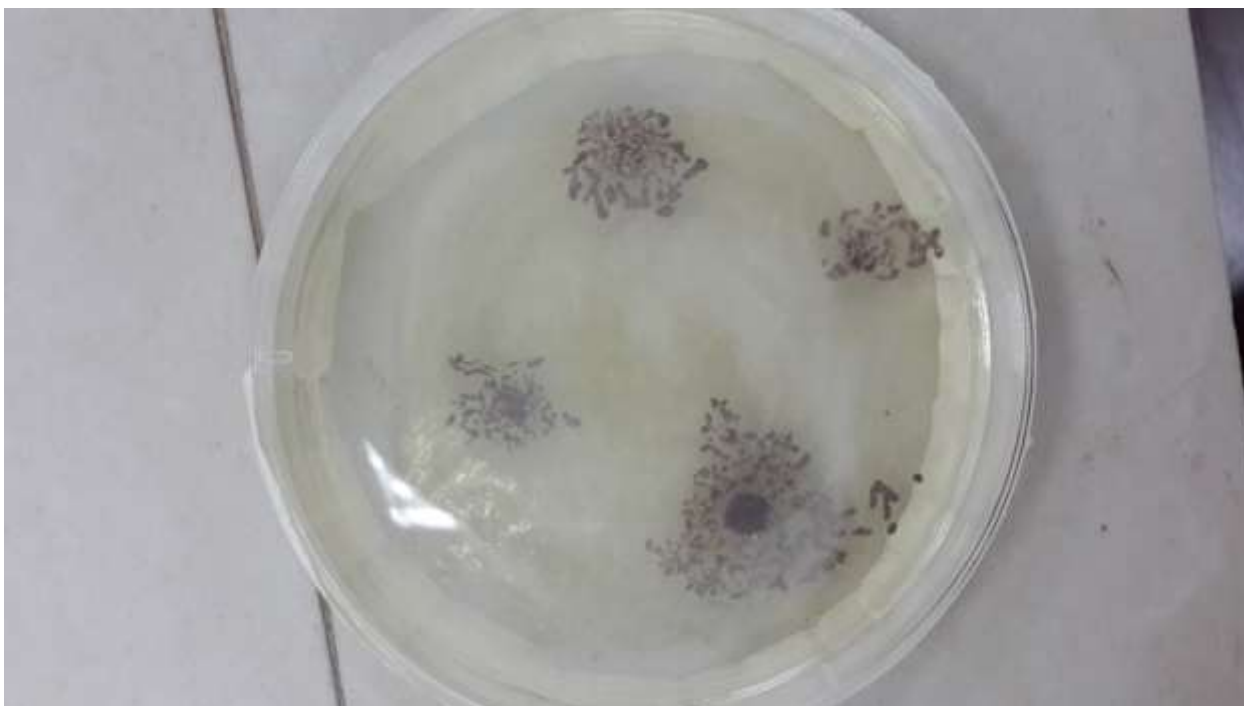


Ilustración 44: Residuo industrial sin diluir con Bacillus licheniformis en agar TSA. Fuente: Autor



Ilustración 55: Residuo industrial sin diluir con Bacillus licheniformis a los 5 días a 37°C en agar TSA. Fuente: Autor



Ilustración 6: Incubación en jarra Gaspak. Fuente: Autor



Ilustración 17: Crecimiento en agar chocolate en jarra Gaspak a 37°C. Fuente: Autor



Ilustración 18: Crecimiento de Bacillus licheniformis en agar sangre, ausencia de hemólisis. Fuente: Autor



Ilustración 19: Burbujeo por presencia de la enzima catalasa. Fuente: Autor



Ilustración 20: Prueba bioquímica positiva citrato de sodio en medio Simmons. Fuente: Autor



Ilustración 21: Cambio de coloración de verde a azul del medio Simmons positivo. Fuente: Autor

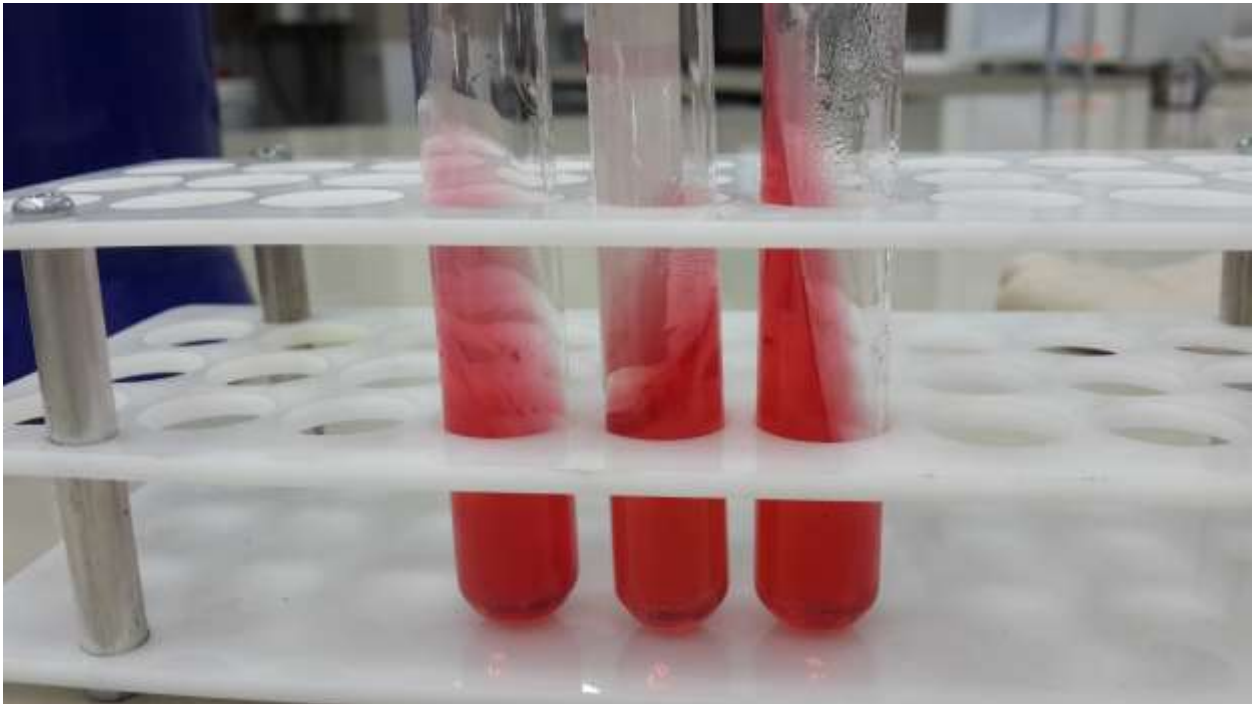


Ilustración 22: Prueba bioquímica fermentación de carbohidratos en agar manitol. Fuente: Autor



Ilustración 23: Cambio de coloración de rojo a amarillo que indica la fermentación de carbohidratos. Fuente: Autor

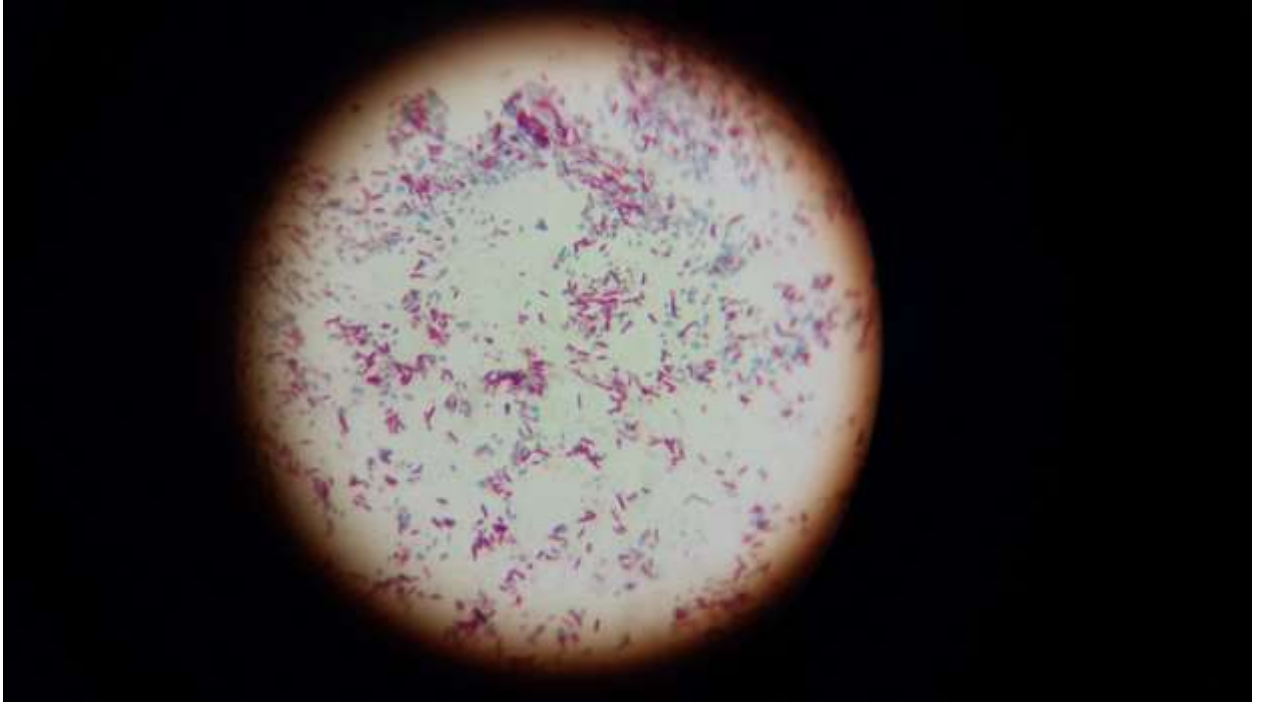


Ilustración 24: Tinción de esporas, células vegetativas rosadas, esporas verdes. Fuente: Autor



Ilustración 25: Biodegradación a los 45 días en caldo especial preparado. Fuente: Autor



Ilustración 26: Biodegradación a los 60 días en caldo especial preparado. Fuente: Autor



Ilustración 27: Biodegradación a los 80 días en caldo especial preparado. Fuente: Autor

7. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, P., & Herrera, L. (2015). *Biorremediación y biodegradación*. Lima: UAA.

Alegria, J. R. (5 de Junio de 2013). *Biotechnología y Biorremediación*. El Salvador, Argentina.

Obtenido de Technology Innovation office,EPA: <https://www.epa.gov/remedytech>

Alonso Riesco, R. (2012). *Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos*.

España: Etse.

Delgado, Ernesto (2011) Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs en microcosmos de suelo a campo abierto. UPS. Ecuador

Carvajal. (Agosto de 2016). PVC: tendencias y oportunidades para la industria de América

Latina. *Tecnología del plástico*, 4. Obtenido de <http://www.plastico.com/temas/PVC,-tendencias-y-oportunidades-para-la-industria-de-America-Latina+3033031>

Castells, X. E. (2012). *Clasificación y gestión de residuos: Reciclaje de residuos industriales*.

DIAZ DE SANTOS.

Bou, Germán, Olmos, Ana fernandez, García, Celia, Sáez Nieto, Juan Antonio (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. Elsevier, VIII(29), 601-608.

Contreras López, A., & Molero Meneses, M. (2012). *Ciencia y tecnología del medio ambiente*.

Madrid: UNED.

- Contreras, R. (2015). Biorreactor. *La guía*, VIII(3), 245-258.
- Cornejo, M. (2017). La Biorremediación como una estrategia para eliminar contaminantes. *Ciencia Activa*.
- De la Cruz, Z., & Huerta, E. (2015). *Bioventeo*. Colombia: Prezi.
- Delgado, E. (2011). *Selección de microorganismos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos con potencial uso en procesos de biorremediación ambiental*. Ecuador.
- Dias, R. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado*. Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Domínguez Guilarte, L., Ramos Leal, M., Argüelles Álvarez, J., Sánchez López, I., & Guerra Rivera, G. (2011). Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. *CENIC Ciencias Biológicas*, XLII(2).
- EMAC. (30 de Noviembre de 2014). *EMAC*. Obtenido de Empresa Pública Municipal de Aseo de Cuenca: <http://www.emac.gob.ec/?q=content/recolecci%C3%B3n-biopeligrosos>
- Eurostat. (2012). *Eurostat*. Obtenido de http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_wasgen&lang=en
- Eurostat. (2015). *Eurostat*. Obtenido de http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics/es
- Farfan Cama, L. M. (2012). *Desarrollo y crecimiento de microorganismos*. La biblioteca.

- Ferreira, T., & Santos Oliveira, F. (2013). Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 21-28.
- Fuentes, A., García, E., & Fernández, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. España.
- García Oliva, F., Tapia Torres, Y., & Morón Cruz, J. A. (2015). *Biodiversidad funcional del suelo*. México: CONACYT.
- Isan, A. (2016). Fitorremediación: plantas que limpian el suelo, agua o aire. *Ecología verde*.
- ITOPF. (30 de Junio de 2014). *Eliminación de hidrocarburos y desechos*. Obtenido de <http://www.itopf.com/es/knowledge-resources/documents-guides/document/9-eliminacion-de-hidrocarburos-y-desechos/>
- Izquierdo Romero, A. R. (2013). *Biodegradación de HAP's durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Koukkou, A. I., & Vandera, E. (2011). *Hydrocarbon-degrading Soil Bacteria: Current Research. Microbial Bioremediation of Non-metals*. Anna-Irini Koukkou.

- Loya Del Angel, D. I. (2013). Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos. *DSpace JSPUI*, 1-102.
- Martínez, A., Pérez, M. E., Pinto, J., Gurrola, B., & Osorio, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 241-252.
- Muskus Morales, A. M., Santoyo Muñoz, C., & Silvia, L. (2013). Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación - bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. *Gestión y Ambiente*, VI(2), 83-94.
- Ñustez Cuartas, D. C. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicios de combustible*. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Peñaloza Paez, J. A. (2012). *Contaminación*. España: EAE.
- Pérez Vargas, J., Viguera Carmona, S., Gómez Guzman, O., & Calva Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas. *Revista CENIC*, 46.
- Plastiazuary. (2016). Obtenido de <http://www.plastiazuary.com/quienes-somos>
- Rincón Lizcano, M. C. (2014). *3ESTUDIO DE LA BIORREMEDIACION COMO UNA ALTERNATIVA EN LA MITIGACION DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL*. Bucaramanga: UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.

- Rodriguez, D. I. (2010). *Aprovechamiento de residuos orgánicos a través de composteo y lombricomposteo*. Obtenido de Departamento de Fitomejoramiento UAAAN:
http://www.uaaan.mx/postgrado/images/files/hort/simposio5/05-aprov_residuos.pdf
- Rueda Montilla, V. (2015). Bioestimulación y Bioaugmentación. *Ecosistema Tierra*.
- Ruiz Bueno, A. (2015). *Fiabilidad y Validez*. Madrid: Universidad de Barcelona.
- Sarolina. (10 de Marzo de 2011). *Costos de la biorremediación*. Obtenido de Biorremediación:
<http://princesa-sari-sarolina.blogspot.com/2011/03/costos-de-la-biorremediacion-vs-otras.html>
- Speight, J. (2015). *Handbook of Petroleum Product Analysis, 2nd Edition*. Estados Unidos: Mark F. Vitha, Series Editor.
- Valencia, J. C. (2014). *Problemática de recolección de residuos industriales*. Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Meneses Parra, R. X. (2014). *Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's en microcosmos de suelo a campo abierto*. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Cando Rodríguez, M. A. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana