



Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo

María Catalina Trejos Delgado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio ambiente
Medellín, Colombia
2017

Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo

María Catalina Trejos Delgado

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Medio Ambiente y Desarrollo

Director:

Ph.D Santiago Alonso Cardona Gallo

Codirectoras:

Dr. rer. nat. Angelina Hormaza Anaguano

Ph.D Gloria Ester Cadavid Restrepo

Línea de Investigación:

Biotechnología ambiental

Grupo de Investigación:

Biorremediación y Desarrollo Tecnológico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2017

A mis padres y mi hermanita. Los que siempre han creído en mí.

Agradecimientos

A mis padres y hermanita, gracias por apoyarme en cada momento de mi vida, son el motor que me impulsa día a día a ser mejor.

Al Profesor Santiago Cardona Gallo por su acompañamiento como Director de esta Tesis y por sus grandes enseñanzas a lo largo de este proceso.

A la Profesora Angelina Hormaza Anaguano por su constante apoyo a lo largo de mi proceso de formación como investigadora.

A la Profesora Gloria Ester Cadavid por su cordial y grata asesoría en el desarrollo de esta investigación.

A Diego Sánchez Guiral por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos a lo largo de este proceso.

A Alexander Agudelo por su valiosa asesoría y apoyo a lo largo de esta investigación.

A Alejandro Martínez y Alejandra Delgado por su gran amistad y apoyo en el desarrollo de mi tesis.

A Diego Grajales y Daniela Cano por su grata ayuda y amistad.

A Lizeth Puerres, Michelle Maceas, David Quintero y León Ramírez por compartir su grata amistad.

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, por el apoyo a través de la infraestructura del Laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico y el Laboratorio de Biología Molecular y Celular.

A la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia por otorgarme la beca de exención de derechos académicos.

Al departamento administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación–COLCIENCIAS por el apoyo con la beca Jóvenes Investigadores de la convocatoria nacional No 706 de 2016.

Y a todas aquellas personas que no alcanzo a mencionar, pero que con su apoyo y buenas energías hicieron posible la realización de este proyecto.

Resumen

La degradación del suelo representa una de las problemáticas más grave que atraviesa actualmente el planeta. En el año internacional del suelo celebrado por la FAO en el año 2015, se determinó que el suelo estaba degradado en un 33 % debido a un sinnúmero de factores entre los que se encuentran los contaminantes orgánicos derivados de la industria del petróleo. Para mitigar esta problemática se han estudiado alternativas sostenibles, altamente efectivas y amigables con el medio ambiente. Dentro de estas alternativas se encuentra la biorremediación la cual es considerada una tecnología económica que logra altas tasas de remoción de Hidrocarburos Totales del Petróleo.

El objetivo de esta investigación se centró en evaluar la aplicación de agentes surfactantes y estimulantes en un tratamiento de biorremediación aerobio para tratar un suelo contaminado con petróleo crudo. Este estudio se realizó sobre un suelo perteneciente al municipio de la Hormiga, Putumayo, sobre el cual había sucedido varios derrames de crudo. La presente investigación se llevó a cabo en dos etapas; la primera desarrollada a escala de laboratorio y la segunda a escala piloto.

Así, en la primera etapa se procedió a evaluar esta técnica de biorremediación utilizando estimuladores orgánicos (Tween® 80 y Leonardita) en la microbiota autóctona del suelo a escala de laboratorio en condiciones aerobias, para propiciar una descomposición acelerada de los hidrocarburos petrogénicos con los que estaba contaminado este suelo. De esta manera, se aplicaron 4 tratamientos de bioestimulación variando la concentración de Tween® 80 (0-0.05-0.75-1.5 g/L) y manteniendo una concentración constante de Leonardita (3%) y nutrientes. Además, se estableció un tratamiento de atenuación natural y uno de control. La eficiencia de la biodegradación se midió simultáneamente por la determinación de las siguientes variables: producción de CO₂ microbiano (respirometría), cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) remanentes por cromatografía de gases, Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g) de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas y pH durante 80 días. Adicionalmente para establecer las bacterias dominantes en el proceso, se realizaron una serie de aislados de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas en los microcosmos, para posteriormente ser sometidos a estudios de identificación molecular.

En las variables evaluadas se pudo corroborar que la aplicación de Tween® 80 junto con Leonardita y nutrientes genera un efecto positivo en la degradación de este tipo de contaminantes, presentando porcentajes de degradación de HTP superiores al 50% en tan solo 80 días de tratamiento, que superan en casi un 45 % con respecto al valor obtenido en el tratamiento de atenuación natural. Así, se determinó que el mejor tratamiento fue BIII, en el que se adicionó la mayor concentración de Tween® 80 (1,5 g/L), lográndose un 52% de remoción de los HTP, la mayor producción de dióxido de carbono y la mayor cantidad de UFC/g.

Además se determinó que los aislados bacterianos dominantes en los tratamientos fueron: *Bacillus siamensis*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus warneri* y *Brevundimonas olei*.

La segunda etapa consistió en evaluar la tasa de degradación del petróleo crudo en condiciones aerobias aplicando la estrategia de bioestimulación seleccionada en un reactor de lecho estático. Para ello se empleó el diseño realizado en el grupo de investigación de Biorremediación y Desarrollo tecnológico en un estudio anterior. Adicionalmente, para el tratamiento del suelo a escala piloto fue necesario adicionar compost y un cosustrato (melaza) para mantener el proceso activo en el tiempo. La concentración de HTP se monitoreó cada 15 días por un periodo de 2 meses.

Finalmente, se alcanzó una concentración en el reactor de 5000 ppm de HTP remanentes. Además, se obtuvo dos velocidades de biodegradación de -0.04 y -0.017 dia^{-1} y dos tiempos de vida media de 17 y 34 días.

PALABRAS CLAVE: Petróleo crudo, Tween® 80, Leonardita, reactor de lecho estático, tratamiento aerobio, bacterias, suelo.

Abstract

Soil degradation is one of the most important problematic that the planet is currently experiencing. In the International Soil Year celebrated by FAO in 2015, it was determined that the soil was degraded by 33% for a number of factors including pollutants derived from the oil industry. To mitigate this problem, it has studied sustainable, highly effective alternatives that are environmentally friendly. Within these alternatives is the bioremediation of which is an economic technology that does high rates of removal of Total Petroleum Hydrocarbons.

The objective of this research was to evaluate the application of surfactants and stimulants in an aerobic bioremediation treatment to treat soil contaminated with crude oil. This study was carried out on a soil belonging to the municipality of Hormiga, Putumayo, on which several oil spills occurred.

The research has been carried out in two stages; the first was developed at the laboratory scale and the second at pilot scale.

In the first stage, an evaluation of this technique of evaluation using the organic stimulators (Tween® 80 and Leonardite) in the autochthonous soil microbiota was carried out on a laboratory scale under aerobic conditions, in order to promote an accelerated decomposition of the petroleum hydrocarbons with which it was contaminated this soil. In this way 4 biostimulation treatments were applied varying the concentration of Tween® 80 (0-0.05-0.75-1.5 g / L) and maintaining a constant concentration of Leonardite (3%) and nutrients. In addition, natural attenuation and control treatment were evaluated. The efficiency of biodegradation was measured simultaneously by measuring: microbial CO₂ production (respirometry), quantification of TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) remnants by gas chromatography, pH and CFU/g (Colony Forming Unit) of heterotrophic and hydrocarbons bacteria for 80 days. In addition to establishing the dominant bacteria in the process, a series of heterotrophic bacteria and hydrocarbons's isolates were made in the microcosms, and subsequently subjected to molecular identification method.

Therefore, in the evaluated variables, it was possible to corroborate that the application of Tween® 80 with Leonardite and nutrients generates a positive effect in the degradation of this type of pollutants, with percentages of the degradation of TPH greater than 50% in only 80 days. These treatment were superior by almost 45% with respect to the value obtained in the treatment of natural attenuation. Thus, it was determined that the best treatment was BIII, in which it was added to the majority concentration of Tween® 80 (1.5 g / L), achieving a 52% removal of TPH, increased carbon dioxide production and the mayor Quantity of CFU/g.

The most important strains founded were *Bacillus siamensis*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus warneri* and *Brevundimonas olei*.

The second stage consisted of evaluating the degradation rate of crude oil under aerobic conditions applying the selected biostimulation strategy in a static bed reactor. For this purpose, the design of the research group was used in an earlier study. In addition, for soil treatment and molasses to keep the process active over time. The concentration of TPH was monitored every 15 days for a period of 2 months.

Finally, concentration in the reactor was 5000 ppm of TPH. In addition, two biodegradation rates were obtained of -0.04 and -0.017 day^{-1} and two average life times of 17 and 34 days.

KEYWORDS: Crude oil, Tween® 80, Leonardite, static bed reactor, aerobic treatment, bacteria, soil.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VII
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	4
1.1. Objetivo general.....	5
1.2. Objetivos específicos	5
1.3. Hipótesis	5
1.4. Preguntas de investigación	5
1.5. Alcances	6
1.6. Justificación	6
2. Estado del arte	8
3. Marco teórico	11
3.1. Suelo.....	11
3.1.1. Degradación de suelo por contaminantes	12
3.2. Hidrocarburos.....	12
3.2.1. Hidrocarburos petrogénicos	13
3.2.2. Hidrocarburos biogénicos	14
3.2.3. Hidrocarburos pirogénicos	15
3.2.4. Comportamiento de los hidrocarburos petrogénicos en el ambiente	15
3.3. Tratamientos	16
3.4. Biorremediación	17
3.4.1. Bioaumentación	18
3.4.2. Bioestimulación.....	19
3.5. Factores que intervienen en los procesos de biorremediación	20
3.5.1. Textura del suelo	20
3.5.2. Temperatura	20
3.5.3. pH.....	21
3.5.4. Humedad	21
3.5.5. Disponibilidad de nutrientes	21
3.5.6. Presencia de aceptor y donador de electrones	22

3.6.	Estrategias para incrementar la biodegradación	22
3.6.1.	Surfactante.....	22
3.6.2.	Leonardita.....	24
3.7.	Reactor de lecho estático de aireación pasiva	26
3.7.1.	Variables de diseño del biorreactor	27
3.7.2.	Modelo cinético de biodegradación	28
4.	Metodología.....	30
4.1.	Equipos.....	30
4.2.	Muestreo del suelo contaminado	31
4.3.	Pretratamiento de la muestra de suelo.....	31
4.4.	Caracterización del suelo contaminado.....	31
4.5.	Creación de los microcosmos a escala de laboratorio	32
4.5.1.	Diseño de experimentos.....	33
4.6.	Seguimiento del proceso.....	33
4.6.1.	Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo.....	33
4.6.2.	Respirometría.....	34
4.6.3.	Crecimiento bacteriano en el proceso	35
4.6.4.	Potencial de hidrógeno pH	35
4.6.5.	Determinación humedad del suelo	35
4.6.6.	Recuento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas	36
4.6.7.	Aislamiento y caracterización bacteriana.....	36
4.6.8.	Caracterización molecular de las cepas bacterianas aisladas	36
4.6.8.1.	Extracción de ADN de las cepas	37
4.6.8.2.	Amplificación del ADNr 16S mediante PCR.....	37
4.6.8.3.	Secuenciamiento de los productos de PCR y análisis filogenético	37
4.7.	Montaje del reactor de lecho estático con aireación pasiva.....	37
5.	Resultados y Discusión.....	40
5.1.	Caracterización fisicoquímica del suelo	40
5.2.	Tratamientos de biorremediación a escala de laboratorio	42
5.2.1.	Respirometría en los microcosmos	42
5.2.2.	Concentración remanente de HTP en los microcosmos.....	45
5.2.3.	Variación pH en las microcosmos	48
5.2.4.	Caracterización microbiológica de los tratamientos.....	49
5.3.	Montaje reactor de lecho estático.	53
5.3.1.	Respirometría en el reactor	54
5.3.2.	Tasa de remoción hidrocarburos totales del petróleo en el reactor.....	55
5.3.3.	Variación pH en el reactor	56
5.3.4.	Caracterización microbiológica en el reactor	57
5.3.5.	Variación Temperatura interna y externa en el reactor	58
5.3.6.	Variación de la Humedad interna y externa en el reactor	59
6.	Conclusiones y Recomendaciones	60
6.1.	Conclusiones.....	60
6.2.	Recomendaciones.....	61
A.	Anexo: Muestreo del suelo.....	63
B.	Anexo: Determinación fórmula molecular petróleo crudo.....	67
C.	Anexo: Ruta degradativa del contaminante.....	70

D. Anexo: Dosificación de nutrientes.....	72
E. Anexo: Cálculos montaje reactor.....	74
F. Anexo: Registro Fotográfico	76
Bibliografía	78

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos según sus enlaces.....	13
Figura 2. Hidrocarburos característicos presentes en el petróleo (Rossinil, 1960).....	14
Figura 3. Interacción fase líquida-surfactante-suelo.(Mao et al., 2015).....	23
Figura 4. Formación de micelas al saturarse la superficie del líquido (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005).....	23
Figura 5. Estructura molecular Tween® 80 (Karjiban, Basri, Rahman, & Salleh, 2012) ..	24
Figura 6. Estructura primaria hipotética de la Leonardita (Erro et al., 2016)	26
Figura 7. Estructura de un biorreactor de lecho estático de aireación pasiva (Barrios, 2012)	27
Figura 8. Diagrama de la metodología	30
Figura 9. Mapa del sector de muestreo del suelo	31
Figura 10. Montaje del reactor.....	38
Figura 11. Respirometría de los microcosmos a lo largo del tratamiento.....	43
Figura 12. Porcentaje de degradación de HTP en los tratamientos evaluados	47
Figura 13. Variación del pH en los microcosmos.....	49
Figura 14. Crecimiento de bacterias heterótrofas en los tratamientos durante 80 días a una temperatura de 32°C.....	49
Figura 15. Crecimiento de bacterias hidrocarburoclastas en los tratamientos durante 80 días a una temperatura de 32°C	50
Figura 16. Análisis filogenético basado en secuencias de genes 16S rRNA, de aislados de suelo con secuencias de referencia.	53
Figura 17. Producción de dióxido de carbono vs tiempo	54
Figura 18. Remoción de HTP vs tiempo.....	56
Figura 19. Variación del pH a los largo del tratamiento	57
Figura 20. Crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas en el reactor....	57
Figura 21. Temperatura vs tiempo dentro y fuera del reactor	58
Figura 22. Porcentaje de Humedad vs tiempo dentro y fuera del reactor	59
Figura 23. Municipio de la Hormiga	63
Figura 24. Sector muestreo del suelo.....	64
Figura 25. Sector muestreo registro fotográfico.....	65
Figura 26. Registro fotográfico proceso de muestreo	66
Figura 27. Espectro cromatografía de gases-masas del suelo contaminado inicial	69
Figura 28. Adición de nutrientes al microcosmos	76
Figura 29. Montaje de los microcosmos	76
Figura 30. Aislados obtenidos de los microcosmos	77

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Ventajas y desventajas de los tratamientos utilizados para la descontaminación de suelo.(Agudelo, 2010; Asquith et al., 2012; Ball et al., 2012; Sepúlveda & Trejo, 2002)	16
Tabla 2. Ficha técnica Leonardita	25
Tabla 3. Variables relevantes en el biorreactor	27
Tabla 4. Pruebas físicas y químicas aplicadas para la caracterización del suelo.	32
Tabla 5. Microcosmos evaluados a escala de laboratorio	32
Tabla 6. Diseño de experimentos en los microcosmos.....	33
Tabla 7. Características fisicoquímicas del compostaje	39
Tabla 8. Características físicas y químicas del suelo contaminado previo y posterior al tratamiento.	40
Tabla 9. Cantidad de CO ₂ producido por tratamiento	43
Tabla 10. Análisis de Varianza (Día 0-16)	44
Tabla 11. Análisis de Varianza (Día 17-80)	44
Tabla 12. Producción diaria de dióxido de carbono (Día 0-16) por Prueba de LSD de Fisher	44
Tabla 13. Producción diaria de dióxido de carbono (Día 17-80) por Prueba de LSD de Fisher	44
Tabla 14. Concentración de HTP en los tratamientos evaluados	46
Tabla 15. Porcentaje de biodegradación aplicando prueba de LSD de Fisher	47
Tabla 16. Identificación taxonómica de bacterias aisladas de suelos identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S	52
Tabla 17. Cantidad de dióxido de carbono producido en el reactor	55
Tabla 18. Valor k en diferentes intervalos en el reactor	56
Tabla 19. Porcentaje de HTP en suelo sin contaminar y contaminado	67
Tabla 20. Hidrocarburos con mayor compatibilidad en el cromatograma del suelo contaminado.....	68
Tabla 21. Condiciones físicas y bioquímicas para el montaje del reactor	74

Lista de abreviaturas

ARNr 16S: ARN ribosomal 16S

ATP: Adenosin trifosfato

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

C: N: P: Proporción molar de carbono, nitrógeno y fósforo.

DAMA: Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

IGAC: Instituto Geográfico Agustín Codazzi

Kg: Kilogramo

M: Molaridad (mol/Litro)

mg: Miligramo

M.O: Materia orgánica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pH: Potencial de hidrógeno

ppm: Partes por millón (mg/kg suelo)

UFC/g: Unidades formadoras de Colonia por gramo de suelo

Introducción

El suelo es un recurso natural no renovable que se ha visto seriamente afectado por el uso desmedido del mismo, debido a que se ha considerado desde siempre como un vertedero infinito de desechos capaz de remediar por sí solo cualquier tipo de contaminación. Pero la capacidad tampón de suelo tiene un límite, es así que en el año 2015 la FAO informó la grave crisis que está sufriendo más del 33% de los suelos del mundo.

Dentro de los contaminantes más importantes se encuentra el petróleo y sus derivados, cuyas descargas en el ambiente han ocasionado un deterioro marcado del mismo. Además, según las cifras de crecimiento poblacional estipuladas para el año 2030 el petróleo será la segunda fuente de energía más utilizada a nivel mundial, después del carbón; por tanto se estima que la contaminación asociada a estos compuestos aumentará debido a una mayor demanda de combustibles fósiles, ocasionará un deterioro más marcado al recurso suelo.

Los hidrocarburos son recalcitrantes y tóxicos, llegando a afectar diversos órganos del cuerpo humano. Además presentan diferente grado de toxicidad dependiendo de sus propiedades químicas siendo los hidrocarburos halogenados más tóxicos que los aromáticos y alifáticos (Ramnarine & Santoriello, 2015). Por tanto el grupo técnico intergubernamental y la Alianza Mundial para los suelos recomiendan promover regulaciones estrictas, y controles eficaces por parte de los gobiernos para limitar la acumulación de contaminantes por encima de los límites críticos para la salud humana y, y disminuir el porcentaje de suelos contaminados (FAO, 2015).

Es conocido que en Colombia la legislación relacionada con el control de vertimiento de agentes tóxicos al suelo es poco estricta, generando un deterioro continuo a este recurso. A pesar de ello, la resolución 1170 de 1997 del DAMA se encarga de dictar normas sobre la construcción, remodelación, operación y el desmantelamiento de las Estaciones de Servicio para disminuir los riesgos e impactos ambientales ocasionados por el derrame de hidrocarburos en el ambiente.

Para mitigar el impacto ocasionado por la contaminación de derrames de hidrocarburo, la implementación de tecnologías eficientes y sostenibles con el ambiente, como la biorremediación, se han convertido en la solución más adecuada y económica.

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos, para tratar un sin número de agentes tóxicos, como es el caso del petróleo. Diversos métodos se han planteado para optimizar este tipo de técnicas, dentro de los que sobresale la aplicación de agentes surfactantes, los cuales mejoran la

biodisponibilidad del contaminante que se encuentra adherido fuertemente en el suelo para que así sea consumido con mayor facilidad por los microorganismos. Diversos estudios han comprobado su eficiencia y han reportado altas tasas de degradación de hidrocarburos y sus derivados (Asquith, Geary, Nolan, & Evans, 2012; Jayashree & Vasudevan, 2007; Pinto, Arruda, Angelis, Franceschi, & Bonotto, 2007). Además, el uso de agentes estimulantes que mejoren las condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo luego del tratamiento, como la Leonardita, son pieza fundamental para garantizar un mejor uso potencial del suelo a largo plazo.

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficiencia del sistema de bioestimulación en la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo crudo, mediante la aplicación de agentes estimulantes y surfactantes. Se realizaron dos fases de experimentación. La primera fase, se planteó un proceso a escala de laboratorio en el que se evaluó la degradación de los HTP mediante la aplicación de diferentes protocolos de bioestimulación. El diseño experimental consistió en un diseño estadístico completamente al azar con un factor, y 6 niveles correspondientes a los tratamientos con cada microcosmo. A saber; Control (C), Atenuación Natural (AT), Bioestimulación sin Tween® 80 (BS), Bioestimulación 0.015 g/L Tween® 80 (BI), Bioestimulación 0.75 g/L Tween® 80 (BII) y Bioestimulación 1.5 g/L Tween® 80 (BIII). La dosificación de nutrientes fue calculada mediante relaciones estequiométricas (método de McCarty) entre la concentración de HTP presente en el suelo y la cantidad de nitrógeno y fósforo requeridos para la producción de biomasa y energía. En la segunda fase se estudió la tasa de biodegradación de los HTP, utilizando el mejor tratamiento de la primera fase en un reactor de lecho estático de aireación pasiva, siguiendo el diseño y los parámetros establecidos por Barrios (2012). Para lo cual se utilizó 120 kilos de suelo contaminado con una concentración inicial de HTP conocida y se adicionó un 20% de agente de esponjamiento (compostaje) para mejorar las condiciones de transferencia de oxígeno y garantizar un rango adecuado de UFC/g.

El tiempo de los tratamientos de biorremediación fue de 80 días en la primera fase y de 60 días para la segunda. Se cuantificó una concentración de HTP inicial y final a través de Soxhlet, mientras que en la escala piloto se midió la concentración de HTP por esta misma técnica cada 15 días. Se realizó la caracterización físico-química del suelo al inicio y final del tratamiento, donde se midieron parámetros de interés como textura, pH, materia orgánica, contenido de nitrógeno y fósforo, entre otros, para ambas fases. Se caracterizó el crecimiento de las bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas cada 7 días durante el tiempo de experimentación para ambas etapas de este estudio. Se aislaron y se identificaron mediante la secuenciación del gen ribosomal ARNr 16S las cepas predominantes en el ecosistema de los microcosmos.

Los surfactantes ejercieron un efecto positivo en la remoción de los TPHs, superior a estudios previos. La microbiota identificada presentó un alto potencial biodegradador. Esta tesis está estructurada en 6 capítulos. El primer capítulo de esta investigación comprende el planteamiento del problema en el que se detallan los impactos ambientales negativos asociados al petróleo y sus derivados, la posible solución a esta problemática y la

importancia de la implementación de medidas de mitigación. Así como el objetivo general, objetivos específicos y los alcances de esta investigación. El segundo capítulo presenta los antecedentes relacionados con este tipo de proceso biológico, las tasas de remoción de HTP obtenidas y los valores para los agentes surfactantes y estimulantes aplicados.

En el tercer capítulo se desarrolla un marco teórico relacionado con el proceso de biorremediación, las variables más importantes de este y las características más relevantes de los agentes estimulantes empleados para mejorar este proceso.

El cuarto capítulo se centra en explicar la metodología empleada para la implementación de los diferentes tratamientos, en la fase de laboratorio y piloto.

Un quinto capítulo se centra en la discusión de los resultados obtenidos en las dos fases evaluadas, teniendo en cuenta los resultados de los análisis estadísticos realizados.

El sexto y último capítulo aborda las conclusiones y recomendaciones producto de esta investigación.

1. Planteamiento del problema

En el presente capítulo se identifica el problema de investigación y se presentan los objetivos y alcances propuestos para su mitigación, teniendo como base una justificación que soporta cada uno de los mismos y los posibles interrogantes a los que se darán respuesta durante el desarrollo de esta investigación.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) el suelo es considerado como un recurso natural no renovable, lo que implica que su pérdida y degradación no son reversibles en el curso de una vida humana. A pesar de ser un recurso tan valioso, se tiene reportes a la fecha de que el 33 % de la tierra está moderada o altamente degradada debido a problemas de erosión, salinización, compactación, acidificación y contaminación de suelos con productos químicos (FAO, 2015), entre los que sobresalen compuestos orgánicos como el petróleo.

El petróleo aporta el mayor porcentaje del total de la energía requerida en el planeta, lo que le convierte en una industria indispensable para el mantenimiento del sistema económico, político, social y cultural existente (Aconcha, Garzón, & Arévalo, 2010). Se espera que para el 2035 la población mundial necesite una producción de combustibles líquidos (derivados del petróleo) de 26.6 millones de barriles, lo que representa un incremento de 30,9% en 37 años (Ministerio de Minas y Energía, 2013). Este incremento aumenta la probabilidad de contaminación del recurso suelo como resultado de la actividad antrópica (FAO, 2015).

A este hecho se suma un alto porcentaje de los procesos en la industria petroquímica pueden ocasionar descargas involuntarias al ambiente, tales como fugas de los tanques, derrames en el proceso de transporte (carga y descarga) y fugas en la tubería (Chen et al., 2015; Helmy, Laksmono, & Kardenia, 2015).

El impacto ambiental en los ecosistemas por estos procesos es severo, debido a que el petróleo persiste en el agua o en la matriz suelo por un tiempo prolongado, evidenciando efectos que se ven reflejados en el cambio de características físicas, químicas, bioquímicas y en la diversidad microbológica del suelo (Roy et al., 2014), causando así un impacto negativo a corto, mediano y largo plazo.

Esta problemática se ha tratado de mitigar mediante el uso de técnicas de remediación físicas, químicas y térmicas, procesos que necesitan altos consumos de energía, maquinaria, recursos económicos y personal calificado (Ball, Stewart, & Schliephake, 2012). Por tanto, la implementación de tratamientos biológicos en la descontaminación de suelos degradados por el petróleo y sus derivados (Franco, Corrêa, Marques, & Perez, 2015) ha sido un tema de estudio constante debido a que son métodos no convencionales ambiental y económicamente sostenibles (Rojas, 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación evalúa una técnica para biorremediación mediante la utilización de estimuladores orgánicos en la microbiota autóctona del suelo a escala piloto y de laboratorio, haciendo posible la descomposición acelerada de los hidrocarburos petrogénicos vertidos en el suelo para el departamento del Putumayo, Colombia.

1.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia del sistema de bioestimulación en la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo crudo.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el suelo antes y después del tratamiento de biorremediación mediante diferentes análisis físicos y químicos.
- Determinar la concentración adecuada de Tween® 80 (TW80), para ser implementada en el tratamiento de bioestimulación.
- Caracterizar el crecimiento de las bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas tanto en las pruebas de laboratorio como en el reactor.
- Calcular la tasa de remoción de los hidrocarburos totales del petróleo en un reactor de lecho estático, utilizando el proceso de bioestimulación más eficiente.

1.3. Hipótesis

La biorremediación en condiciones aerobias a través de bioestimulación con Tween® 80 y Leonardita mediante un reactor de lecho estático, es un proceso útil para tratar suelos contaminados con petróleo crudo.

1.4. Preguntas de investigación

La problemática a afrontar con esta propuesta se basa en el tratamiento de un suelo contaminado con petróleo crudo aplicando la bioestimulación, permitiendo dar respuesta a los siguientes interrogantes:

- ¿Qué tipo de bacterias son las potenciales biodegradadoras del petróleo crudo?
- ¿Cómo influye la aplicación de compuestos orgánicos como el Tween® 80 y la Leonardita en el tratamiento de un suelo contaminado con petróleo crudo?
- ¿Cuáles son los valores de parámetros fisicoquímicos óptimos en el proceso de biorremediación que permiten degradar el petróleo crudo en un reactor aerobio?

- ¿Cuál es la remoción de hidrocarburos totales del petróleo lograda en el reactor de lecho estático?

1.5. Alcances

Con el desarrollo de este trabajo investigativo se pretende desarrollar una técnica de bioestimulación capaz de tratar de manera eficiente suelos contaminados con petróleo crudo a escala de laboratorio y piloto.

1.6. Justificación

La economía Colombiana está fuertemente influenciada por la industria petrolera, la cual ocupa uno de los primeros lugares en la generación de divisas para el país (Aconcha et al., 2010). Esto se debe a que dicha industria cuenta con una amplia gama de reservas petrolíferas distribuidas entre las regiones de los Llanos Orientales, el Valle Inferior, Medio y Superior del Magdalena; el valle del río Sinú, el Putumayo y el Catatumbo (Ministerio de Minas y Energía, 2013).

Como caso particular, el departamento del Putumayo cuenta con una vasta región petrolera, especialmente en el sector del Valle del Guamuez, donde se encuentran en funcionamiento nueve pozos petroleros: Loro 2, 4, 5, 7, 8, 9 y 11, Hormiga 1 y San Antonio, con una producción diaria promedio de 900 barriles/día (Municipio del Valle del Guamuez, 2012).

Debido a los conflictos territoriales entre grupos armados al margen de la ley (Autodefensas Unidas de Colombia (AUC) y la guerrilla) se han perpetuado varios incidentes de orden público que han afectado las estructuras petroleras (líneas de distribución de crudo), y que han ocasionado un sin número de impactos negativos al ecosistema de la región, tales como incendios, pérdida de material vegetal, contaminación de suelos y de fuentes hídricas, generando un deterioro marcado en una región con características únicas en el mundo, ya que se trata de un territorio de transición entre la cordillera de los andes y la amazonia.

El petróleo se compone en un 75% de compuestos aromáticos y alifáticos (Fukui et al., 1999), los cuales presentan características tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, que se pueden transportar con facilidad en la matriz del suelo hacia aguas subterráneas, perjudicando la salud de la población aledaña al derrame (Halder, Warne, Little, & Garvin, 1984; Wolicka, Suszek, Borkowski, & Bielecka, 2009). Según la EPA, el petróleo y sus derivados se clasifican como contaminantes ambientales prioritarios, producto de los efectos adversos que generan en la salud humana y en el medio ambiente (Grace Liu et al., 2011).

En la zona de estudio se presenta esta problemática, por lo tanto es necesario implementar una tecnología eficiente que mitigue los daños ocasionados al ecosistema, y

que no requiera del uso de tecnología costosas para su ejecución y que generando un impacto positivo en el ambiente. Por esta razón, la implementación de un proceso biológico para descontaminar suelos afectados por derrames de hidrocarburos en el departamento del Putumayo, puede ser una alternativa viable para este fin.

Dentro de los procesos biológicos sobresalen las tecnologías de bioestimulación y de bioaumentación, las cuales mejoran las condiciones nutritivas del suelo e introducen microorganismos activos al sitio contaminado respectivamente (Chen et al., 2015). (Bento, Camargo, Okeke, & Frankenberger, 2005; Gómez, Gaviria, & Cardona, 2009) han estudiado procesos de bioaumentación en la biodegradación de hidrocarburos, logrando tasas de degradación de hasta el 74 y 64.2. % respectivamente. En tanto que, en el caso de la bioestimulación, se han obtenido remociones del contaminante cercanas al cien por ciento (S.-H. Lee, Oh, & Kim, 2008).

Tanto la bioestimulación como la bioaumentación tienen como objetivo mejorar la biodisponibilidad del contaminante para ser procesado por la microbiota autóctona del suelo, y así mejorar las condiciones físico- químicas del suelo afectado. En el caso concreto del tratamiento de suelos afectados por derrames de petróleo crudo, se conoce que este tipo de contaminantes, debido a su naturaleza química se fijan fuertemente a la matriz del suelo, limitando la biodegradación de los contaminantes por parte de los microorganismos, generando un desbalance en las condiciones físico químicas del suelo (Rojas-Avelizapa, Roldán-Carrillo, Zegarra-Martínez, Muñoz-Colunga, & Fernández-Linares, 2007).

Se han planteado diversas soluciones para este fenómeno generado por la característica hidrofóbica del petróleo crudo. Diversos estudios concluyen que la utilización de tensoactivos no iónicos como el Tween® 80 mejora esta condición (Jayashree & Vasudevan, 2007; Pinto et al., 2007). La adición de un compuesto orgánico como la leonardita facilita el intercambio iónico del suelo, mejorando las condiciones físicas y químicas del mismo (Turgay, Erdogan, & Karaca, 2010).

Para la implementación de este sistema a escala piloto es necesario tener en cuenta la transferencia efectiva de oxígeno en volúmenes grandes de suelo. Los reactores de lecho estático con aireación pasiva son una alternativa adecuada ya que son económicos en cuanto a su diseño y mantenimiento (S. Yu, Grant Clark, & Leonard, 2009). La implementación de estrategias de biorremediación usando este tipo de compuestos orgánicos a escala piloto, son una alternativa viable para descontaminar sitios afectados por derrames de hidrocarburos, siendo una estrategia no convencional, novedosa, de alta eficiencia y de mínimo impacto ambiental.

2. Estado del arte

En este capítulo se presenta el estado en materia de biorremediación sus avances, desarrollo para sistemas aerobios en suelos, a escala de laboratorio y piloto.

Tras la era de la industrialización la actividad petrolera ha sido una de las más importantes en la economía mundial. Este tipo de industrias anualmente realizan gran número de descargas involuntarias tales como; fugas en tanques, derrames en el proceso de transporte (carga y descarga) y fugas en tuberías, perjudicando al ecosistema circundante (Helmy et al., 2015). Para contrarrestar este inconveniente se han desarrollado diversas tecnologías que implementan procesos físicos, químicos y térmicos. Son procesos eficientes, pero en su mayoría presentan un alto costo y generan subproductos difíciles de estabilizar (Ball et al., 2012).

Por tanto, los procesos biológicos como la biorremediación han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas, debido a su alto potencial de degradación de compuestos tóxicos y recalcitrantes, cuya biorremediación no requiere gran cantidad de productos, energía y tiempo (Haritash & Kaushik, 2009).

Como caso especial, en la matriz del suelo se han manejado diversos tratamientos de bioestimulación y bioaumentación de tipo aerobio, obteniéndose valores significativos de degradación de compuestos recalcitrantes (Gómez et al., 2009).

Andreolli et al. (2015), trataron un suelo afectado por un incendio forestal (hidrocarburos pirogénicos) mediante la aplicación de los métodos de bioestimulación y bioaumentación. En el estudio de campo se demostró que la bioestimulación fue el tratamiento más efectivo con un porcentaje de degradación del 70% de los hidrocarburos de alto peso molecular en comparación con la bioaumentación y atenuación natural con un 55% y 45% de degradación respectivamente. De la misma forma, otros estudios reportan que se pueden aplicar enmiendas orgánicas y agentes "bulking" para mejorar las condiciones de suelos contaminados con derrames (tratamiento simulado) de diésel, logrando porcentajes de degradación del 80% (Khamforoush, Bijan-Manesh, & Hatami, 2012). Adicionalmente, se ha reportado el uso de enmiendas orgánicas al 25% y 50% obteniéndose porcentajes de remoción del 50 % - 66% y 34% - 59% de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) respectivamente, y altos porcentajes de remoción (hasta 80%) mediante la aplicación de productos comerciales como Daramend® (Geary & Evans, 2012).

La adición de un sin número de compuestos ha sido estudiada para mejorar el proceso de bioestimulación en los suelos contaminados con hidrocarburos. Entre ellos sobresale la aplicación de agentes surfactantes que mejoran la disponibilidad del contaminante en la matriz del suelo para las bacterias degradadoras (Tonini, Rezende, & Grativol, 2010). (Paria, 2008), ha evaluado diversos tipos de surfactantes, aniónicos, catiónicos y no iónicos, siendo estos últimos los más utilizados en los procesos de biorremediación debido a su baja concentración micelar crítica (CMC).

Estudios recientes han demostrado que varios tipos de bacterias, hongos y levaduras son capaces de producir biosurfactantes, con características similares a sus homólogos sintéticos con la ventaja de que son completamente biodegradables (Selberg, Juuram, & Budashova, 2013). Chandankere et.al. (2013) reportó la utilización de la bacteria *Bacillus methylotrophicus* USTBa para la producción de un biosurfactante apto para emulsificar petróleo crudo. Los resultados obtenidos por estos autores evidenciaron que esta bacteria tenía la capacidad de producir un biosurfactante con propiedades de formación de espuma excesiva que emulsionaba en un 78% al petróleo evaluado. Aunque estos compuestos presentan una alta eficiencia en los sistemas de biorremediación a escala de laboratorio, su producción a gran escala es compleja debido a los problemas de purificación y separación, generando altos costos de producción (Holmberg, 2001).

Por lo anterior, para tratamientos a escala industrial se ha trabajado con aplicaciones del surfactante Tween® 80, debido a su carácter no iónico, no tóxico y biodegradable (Mao, Jiang, Xiao, & Yu, 2015). Adicionalmente, este surfactante presenta una baja concentración micelar crítica, mayor grado de reducción de la tensión superficial, y propiedades relativamente constantes en presencia de sal que dan como resultado, un mejor rendimiento y un requerimiento de menor concentración del mismo para lograr los resultados deseados (Paria, 2008).

Varias aplicaciones realizadas por (Franzetti, Di Gennaro, Bevilacqua, Papacchini, & Bestetti, 2006) utilizando el surfactante no iónico Tween® 80, muestran eficiencias marcadas en los procesos de bioestimulación, biodegradación, garantizando la sostenibilidad del proceso en el ecosistema afectado. Wang et al. (2014), han conseguido tasas de remoción de hasta el 92% de compuestos orgánicos como el benzopireno, utilizando una concentración de 5g/kg de Tween® 80. Un estudio realizado por Agarry et.al. (2012), obtuvo un porcentaje del 83.79% de degradación de petróleo crudo en un suelo contaminado, con un tratamiento de 4.24 mg de un fertilizante NPK, 10.22 mg/L de Tween® 80 y 0.46 mg/L del cultivo microbiano mixto.

Adicional a la utilización de agentes surfactantes como el Tween® 80, el uso de compuestos orgánicos como la leonardita tiene la capacidad de mejorar las condiciones de intercambio iónico favoreciendo la disponibilidad de nutrientes, y generando una influencia positiva en la fertilidad del suelo (Akinremi, Janzen, Lemke, & Larney, 2000). En estudios realizados por Turgay et al. (2009), se adicionó una concentración de 5% de leonardita en un suelo contaminado con un 2,5% de HTP manteniendo un concentración de Carbono, Nitrógeno y Fósforo (C: N: P) de 100:15:1. Los resultados para este estudio mostraron que la actividad enzimática de la ureasa y la fosfatasa alcalina, se vio incrementada con respecto a los tratamientos que no tenían leonardita en aproximadamente un 100% de los 40 días. Estos resultados evidencian que la presencia de estas enzimas garantiza una mayor disponibilidad de nutrientes para los microorganismos generando un ambiente propicio para la biorremediación de suelos contaminados.

Todos estos resultados fueron obtenidos en estudios a escala de laboratorio. Para volúmenes de suelos superiores la implementación de reactores de lecho estático es una alternativa para tratar esta problemática, garantizando las condiciones óptimas para el metabolismo microbiano. Yu et al. (2009), evaluó un reactor de lecho estático con aireación pasiva para estabilizar compost manteniendo una transferencia de oxígeno efectiva al sistema. Dicha transferencia es vital, ya que garantiza condiciones adecuadas para el proceso de biorremediación. Estudios realizados por Germaine et al. (2015), reportaron remociones de hasta el 80% en 18 semanas, para un suelo contaminado con 12000 ppm de HTP (Germaine et al., 2015).

3. Marco teórico

En el presente capítulo se presentan los conceptos teóricos más relevantes asociados a esta investigación, los cuales sirvieron de base para entender los fenómenos que ocurren durante el proceso de biorremediación para un suelo contaminado con petróleo crudo.

3.1. Suelo

Desde el punto de vista edáfico, el suelo es un cuerpo natural, tridimensional formado por la progresiva alteración física y química de un material original o roca madre a lo largo del tiempo, bajo unas condiciones climáticas y topográficas determinadas, y sometido a la actividad de organismos vivos (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007).

El suelo está conformado por minerales, aire, agua, organismos vivos y materia orgánica: Los minerales constituyen los principales componentes estructurales de los suelos y suponen más del 50% del volumen total. El agua y el aire en conjunto conforman el volumen de poros, que, por lo general, ocupa entre el 25 y 50% del volumen total. La proporción aire y agua varía considerablemente con la humedad del suelo. Los organismos vivos ocupan el 1% mientras que la materia orgánica oscila entre el 3 y 6% del volumen (Torres & Zuluaga, 2009).

El suelo es un ente dinámico en el ambiente donde ocurren un sin número de procesos de intercambio de materia y energía (Arrieta, 2011). Esto lo convierte en una pieza clave en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos superficiales, a través de los microorganismos presentes en el mismo tales como; bacterias, hongos, actinomicetos, algas y protozoos (Alexander, 1994).

Entre las características ambientales más importantes que presenta el suelo se encuentran:

- “Proporciona los nutrientes, el agua y el soporte físico necesarios para el crecimiento vegetal y la producción de biomasa en general, desempeñando un papel fundamental como fuente de alimentación para los seres vivos.”
- “Es un componente esencial del ciclo hidrológico, actuando como elemento distribuidor de las aguas superficiales y contribuyendo al almacenaje y recarga de las aguas subterráneas.”
- “Gracias a su poder de amortiguación o desactivación natural de la contaminación, filtra, almacena, degrada, neutraliza e inmoviliza sustancias orgánicas e inorgánicas tóxicas, impidiendo que alcancen las aguas subterráneas y el aire o que entren en la cadena alimenticia.”

- “Es el hábitat natural biológico de muchos organismos de todo tipo y constituye un elemento de reserva genética.”
- “Desarrolla un importante papel como fuente de materias primas.”
- “Sirve de plataforma para el desarrollo de las actividades humanas como soporte de la estructura socioeconómica formando parte del paisaje y del patrimonio cultural.”(Ortiz et al., 2007)

3.1.1. Degradación de suelo por contaminantes

La degradación del suelo se puede definir como todo proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios (Ortiz et al., 2007).

Según un informe realizado por la FAO en el año internacional de suelo en el 2015 el suelo es un recurso finito, cuya pérdida y degradación no son reversibles en el transcurso de una vida humana. El 33 % de la tierra está moderada o altamente degradada debido a la erosión, la salinización, la compactación, la acidificación y la contaminación de los suelos por productos químicos. La tasa actual de degradación de suelos amenaza la necesidad de las generaciones futuras de atender sus necesidades básicas para el 2050 la población mundial será superior a los 9000 millones de habitantes (FAO, 2015).

Un suelo degradado producto de la contaminación por productos químicos, es aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de compuestos de carácter peligroso de origen antropogénico, en concentraciones que superan los niveles genéricos de referencia y que conllevan un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente (Riesco, 2012).

En la actualidad la producción y el uso masivo de compuestos orgánicos han generado un impacto negativo en el suelo, deteriorando sus principales características físicas, químicas y biológicas (Ortiz et al., 2007). Existen un sin número de compuestos orgánicos causantes de este impacto, entre ellos sobresalen los hidrocarburos, los cuales han sido responsables del deterioro en varios ecosistemas (Cavazos-Arroyo, Pérez-Armendáriz, & Mauricio-Gutiérrez, 2014; Gómez et al., 2009; Rojas-Avelizapa et al., 2007; Wolicka et al., 2009)

3.2. Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos abundantes en la naturaleza, conformados por átomos de carbono e hidrógeno. Éstos se clasifican según la estructura de los enlaces existentes entre los átomos de carbono que componen la molécula (Riesco, 2012).

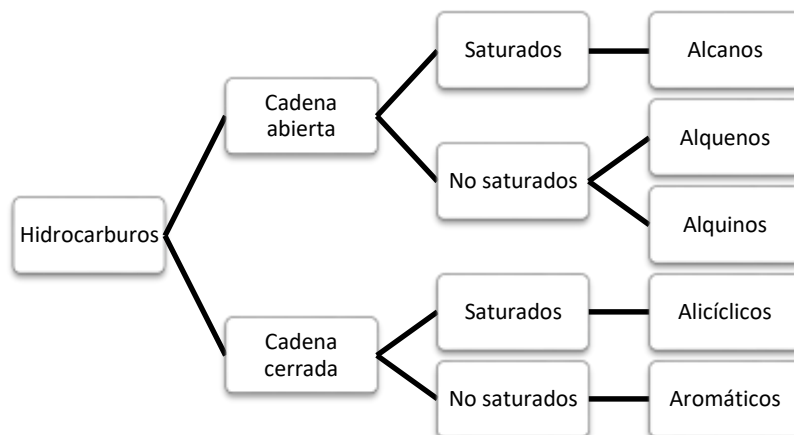


Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos según sus enlaces (Fuente propia)

Estos compuestos orgánicos se pueden clasificar según su origen así; origen mineral (petrogénico), origen biológico (biogénico) y pirogénico.

Los hidrocarburos de origen mineral son generados por rocas ricas en compuestos orgánicos expuestas a elevadas temperaturas por largos periodos de tiempo (Worley et al., 2007). Los hidrocarburos biogénicos son generados por procesos biológicos involucrados en el compost y los pirogénicos son aquellos que se forman en procesos de combustión producto de las actividades humanas (Riccardi et al., 2013).

3.2.1. Hidrocarburos petrogénicos

El petróleo es un hidrocarburo de origen petrogénico producto de la degradación anaeróbica de la materia orgánica, durante largos periodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura (Rossinil, 1960). Está conformado en su mayoría por una compleja mezcla de hidrocarburos y en una menor proporción de constituyentes como nitrógeno, azufre, y metales pesados (Arrieta, 2011).

El petróleo se puede encontrar en dos estados, como crudo o como gas natural (Worley Parsons Komex, 2007). El petróleo en forma de crudo está constituido por hidrocarburos alifáticos (cadena abierta) y aromáticos (cadena cerrada) (Killops & Al-Juboori, 1990), mientras que el gas natural está conformado por hidrocarburos alifáticos de cadena corta con una temperatura de ebullición inferior a los 40°C (Rossinil, 1960).

Es conocido que los hidrocarburos aromáticos se subdividen a su vez en monoaromáticos (un anillo de benceno) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (varios anillos de benceno). Por su parte los hidrocarburos alifáticos están subdivididos en: alcanos (parafinas y cicloparafinas), alquenos (oleofinas) y alquinos (Worley et al., 2007).

En general el petróleo está constituido substancialmente por tres tipos de hidrocarburos: las parafinas, las cicloparafinas y los aromáticos (Rossinil, 1960). Ver Figura 2.

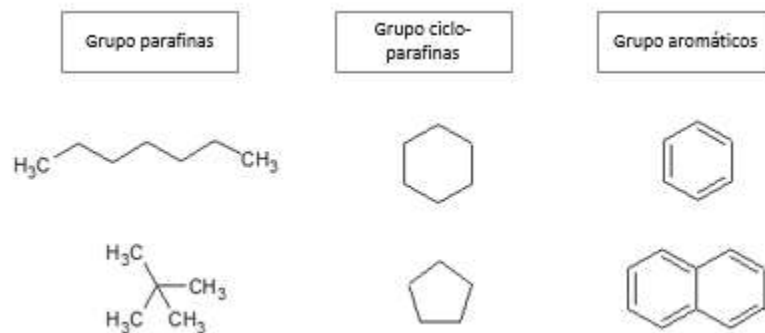


Figura 2. Hidrocarburos característicos presentes en el petróleo (Rossinil, 1960)

Dentro de estos grupos de hidrocarburos están presentes las siguientes familias:

Parafinas volátiles: El petróleo está conformado en un 30% por esta familia; constituida por parafinas como n-alcenos y alcanos ramificados con tamaños de cadena de entre 1 y 10 átomos de carbono (Arrieta, 2011). Dentro de las parafinas volátiles se encuentran los hidrocarburos pertenecientes al gas natural (C_1 - C_5) (Rossinil, 1960). Esta es la fracción más volátil del petróleo, por tanto gran parte de esta se pierde por medio de procesos físicos como la volatilización.

Parafinas no volátiles son aquellos n-alcenos y alcanos ramificados con tamaños de cadena de entre 11 y 40 átomos de carbono. Los n-alcenos oscilan entre los valores de C_{11} - C_{40} , mientras que los alcanos ramificados oscilan entre C_{12} - C_{22} (Torres & Zuluaga, 2009).

Naftenos: conformada por las cicloparafinas y los cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25% (Arrieta, 2011; Torres & Zuluaga, 2009).

Oleofinas: son alquenos que se encuentran en concentraciones muy baja (trazas) (Torres & Zuluaga, 2009).

Aromáticos: Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Pueden ser hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos) (Torres & Zuluaga, 2009).

3.2.2. Hidrocarburos biogénicos

Los hidrocarburos biogénicos son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Bedair & Al-Saad, 1992).

Se caracterizan por exhibir un alto nivel de n-alcanos de número impar cuando están recientemente formados. Además, los compuestos de tipo aromático no se presentan frecuentemente o al menos en proporciones significativas. Finalmente, los hidrocarburos derivados de los aportes de detritus de plantas terrígenas se caracterizan por n-alcanos de número impar en la región de C₂₃-C₃₃. (Castro Varela, 2007)

3.2.3. Hidrocarburos pirogénicos

Son procedentes de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales como; incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc. o por causas antropogénicas siendo la utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, emisiones de vehículos, procesos industriales de gasificación y licuefacción del carbón, craqueo del petróleo, etc., los más representativos (Salinas et al., 2012). Predominan los compuestos no alquilados sobre sus alquil homólogos (Álvarez, 2009).

3.2.4. Comportamiento de los hidrocarburos petrogénicos en el ambiente

Al ocurrir un derrame de un hidrocarburo petrogénico como el petróleo en el ambiente, este sufre una serie de cambios sucesivos de sus propiedades físico-químicas. Como primera instancia ocurre la intemperización, la cual varía según las características del producto derramado y de las condiciones climáticas (Riesco, 2012).

Posterior a este proceso ocurren una serie de etapas: evaporación, disolución, sedimentación, oxidación, y biodegradación (Riesco, 2012); el avance que se logre en esta secuencia de etapas determinará el grado de toxicidad del hidrocarburo, entre más cercano este al proceso de biodegradación la toxicidad de este será menor (Riesco, 2012).

- **Evaporación:** Suele ocurrir en las primeras 24 horas tras haberse perpetuado el derrame, la cantidad de hidrocarburo depende de la proporción de hidrocarburos volátiles que presente el petróleo (Riesco, 2012).
- **Sedimentación:** Este proceso se da cuando el hidrocarburo se intemperiza, provocando un incremento de su densidad respecto al agua circundante y por consiguiente se hunde (Riesco, 2012).
- **Disolución:** Este proceso empieza inmediatamente, es de largo plazo y continúa durante todo el proceso de degradación del hidrocarburo (Riesco, 2012).
- **Oxidación:** Es un proceso que depende de la cantidad de oxígeno disponible en el ambiente circundante, de esta forma si el derrame se encuentra en un área libre y despejada, mayor será la tasa de degradación del mismo. Adicionalmente, la oxidación fotocatalítica producto de la exposición a la radiación solar también contribuye a la degradación (Geary & Evans, 2012).
- **Biodegradación:** Es un proceso de oxidación generado por microorganismos tales como bacterias y hongos. Dependiendo del tipo de hidrocarburo y de su composición química, pueden ser más o menos susceptibles a la degradación

microbiana. De esta manera se ha establecido un orden en el que estos compuestos son asimilados con mayor facilidad por los microorganismos (Riesco, 2012)., así:

n-alcanos > alcanos Ramificados > CABPM > alcanos cíclicos

*CABPM: Compuestos aromáticos de bajo peso molecular (Hamme et al, 2003).

Todos los procesos mencionados anteriormente ocurren de manera natural pero requieren de muchos años (escala geológica) para que el compuesto pueda ser degradado totalmente, tornándose recalcitrante en el transcurso de una vida humana (Geary & Evans, 2012). Así, el petróleo persiste por mucho tiempo y los efectos se ven reflejados en el cambio de características físicas, fisiológicas, propiedades bioquímicas y de diversidad microbiológica del suelo (Roy et al., 2014). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias que disminuyan el tiempo de vida media del contaminante en el ambiente son opciones altamente valoradas para disminuir el impacto en el ambiente a mediano y largo plazo.

3.3. Tratamientos

Debido a las continuas descargas de hidrocarburos al recurso suelo, se han estudiado un sinnúmero de técnicas que acaban parcial o totalmente dicha contaminación en un tiempo menor comparado con los procesos de degradación natural. Entre los procesos más estudiados se encuentran los métodos físicos, térmicos, químicos y biológicos.

A continuación, se evidencian las características más relevantes de cada uno de los métodos de tratamiento, Tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los tratamientos utilizados para la descontaminación de suelo.(Adaptado de Sepúlveda & Trejo, 2002; Agudelo, 2010; Asquith et al., 2012; Ball et al., 2012;)

Tipo de proceso	Explicación del proceso	Ventajas	Desventajas
Procesos Físicos y Químicos	Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.	Son efectivos en cuanto a costos. Pueden realizarse en periodos cortos. No requiere equipos sofisticados y no se necesita de mucha energía para su ejecución. Requieren un espacio reducido.	Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse generando un aumento en costos y necesidad de radicar permisos. Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación.
Procesos Térmicos	Utilizan el calor para remover o destruir contaminantes por incineración, gasificación, desorción, volatilización, pirólisis.	Permite tiempos rápidos de limpieza y no necesita un espacio amplio para su procesamiento lo que genera un desecho de menor volumen con	Es el grupo de tratamientos más costoso. Los costos aumentan en función del empleo de energía y equipo. Intensivos en mano de obra y capital.

		respecto al que se trató inicialmente.	
Procesos Biológicos	Se considera cualquier proceso que utilice organismos (bacterias, plantas, hongos) o sus enzimas para degradar biológicamente residuos contaminados en residuos no tóxicos presentes en el suelo.	Son efectivos en cuanto a costos. Son tecnologías más benéficas para el ambiente. Los contaminantes generalmente son destruidos. Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior.	Requieren mayores tiempos de tratamiento. Es necesario verificar la toxicidad de productos intermedios y finales. No pueden emplearse si el tipo de residuo no favorece el crecimiento microbiano.

3.4. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de agentes biológicos (microorganismos y plantas) y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en formas menos tóxicas, y en algunos casos alcanzando la mineralización del compuesto (producción de CO₂ y H₂O) (Solanas, 2009). Se considera una de las metodologías con mayor expansión gracias a su alta competitividad y bajo costo (Arrieta, 2011). Dentro de esta metodología sobresalen las técnicas de bioestimulación y bioaumentación, las cuales mejoran las condiciones nutritivas del suelo e introducen microorganismos activos al sitio contaminado respectivamente (Chen et al., 2015).

Cabe resaltar que para la aplicación de alguna de las técnicas de biorremediación es de suma importancia conocer el lugar en donde se aplicará el proceso, ya que cada sitio presenta condiciones especiales que le permite desarrollarse de la mejor manera, es importante conocer el tipo de suelo a tratar según su clasificación taxonómica (Torres & Zuluaga, 2009).

La Bioaumentación consiste en la adición de poblaciones altamente concentradas y especializadas al sitio contaminado con compuestos tóxicos recalcitrantes (Gentry et al., 2004). Este método es adecuado para lugares en donde no existen suficientes células microbianas o la población nativa no posee las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los compuestos recalcitrantes (Tyagi et al., 2011). La bioestimulación suministra al suelo los componentes limitantes tales como nutrientes y aceptores de electrones que estimulan el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos, acelerando las tasas de biodegradación dependiendo de las condiciones ambientales. (Margesin & Schinner, 1997; Margesin et al., 2000). Los sitios contaminados con derrames de petróleo representan una substancial fuente de carbono; sin embargo, los niveles de nitrógeno y fósforo generalmente son limitados (Tyagi et al., 2011; Vallejo et al., 2007), allí la aplicación de técnicas como la bioestimulación pueden ser de interés.

Dichas metodologías pueden aplicarse de forma *in situ* y *ex situ*, la escogencia de cualquiera de las anteriores depende de los niveles de contaminación que presente el suelo. En los tratamientos *ex situ*, el suelo es excavado y transportado hasta la

localización donde se implementará la tecnología, mientras que en los tratamientos *in situ* el suelo es tratado en su emplazamiento natural (Prada, 2016).

En gran parte de los derrames de petróleo se observan altas concentración de hidrocarburos tóxicos y recalcitrantes, por tanto los procesos de descontaminación se desarrollan generalmente de manera *ex situ* (Robles-González et al, 2008).

3.4.1. Bioaumentación

Esta técnica consiste en la adición de microorganismos con capacidad para degradar el contaminante, promoviendo su biodegradación o su biotransformación (Sepúlveda & Trejo, 2002). Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Dicha técnica se puede implementar siguiendo las siguientes opciones; adición de una cepa bacteriana pura previamente adaptada, adición de un consorcio pre-adaptado, introducción de bacterias modificadas genéticamente y/o adición de genes relevantes para la biodegradación quienes van empacados en un vector, el cual se transfiere por conjugación en los microorganismos autóctonos (Fantroussi & Agathos, 2005). Se ha encontrado que varias cepas bacterianas poseen las rutas metabólicas requeridas para la degradación de compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos (bacterias hidrocarburoclastas). Bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Ralstonia*, son algunos de los más extensamente estudiados por su capacidad de biorremediación de hidrocarburos y sus derivados (Tyagi et al., 2011).

Para la identificación de estos y otros géneros bacterianos con propiedades biorremediadoras, se conocen las técnicas de cultivo dependiente en las cuales los aislados obtenidos se pueden identificar por pruebas bioquímicas, o por la secuenciación del gen Ribosomal rARN 16S; así mismo, puede amplificarse la región espaciadora intergénica entre los genes ribosomales 16S y 23S (ITS), y analizar su diversidad de acuerdo al perfil de bandas en electroforesis de poliacrilamida (Sanders & Miller, 2010). El gran inconveniente de los métodos microbiológicos clásicos dependientes de cultivo, se relacionan con la imposibilidad de llegar a tener una visión precisa de la biodiversidad de estos ecosistemas tan complejos (Cocolin et al., 2006). Al utilizar los métodos de enriquecimiento y crecimiento en medios microbiológicos, la microbiota que se encuentra en la muestra es sometida a importantes cambios debido a la capacidad de ciertas especies para dominar el entorno y superar a los otros componentes microbianos, en ambientes como el suelo donde el 80 - 90% de los microorganismos son desconocidos (Alexander 1977). Esto representa una limitante para descubrir el verdadero potencial genético de estos sistemas. Se han evaluado diversas estrategias para lograr aumentar la cantidad de microorganismos cultivables presentes en un sector contaminado y así obtener una aproximación más valedera de un porcentaje del ecosistema en estudio. Entre las estrategias más estudiadas se encuentran, imitar el medio natural, realizar una separación física de las células para disminuir la competencia entre ellas o con los inhibidores de crecimiento y modificar el medio de cultivo para que sea lo más parecido al medio natural (Tanaka et al., 2014).

A pesar de las desventajas descritas, el obtener microorganismos aislados puros, nos permite el uso de los mismos en la obtención de metabolitos secundarios de interés biotecnológico, permitiendo la realización de bioensayos como por ejemplo la evaluación de la degradación de compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos.

Desde los años ochenta, se vienen realizando estudios de estimación de diversidad y funciones microbianas sin necesidad de cultivo comúnmente llamados métodos independientes de cultivo en muestras ambientales (Case et al., 2007; Riesenfeld et al., 2004), estos métodos incluyen: Electroforesis en gel en gradiente desnaturizante o de temperatura (DGGE o TGGE), polimorfismo de conformación de cadena simple o de longitud de fragmentos de restricción (SSCP, RFLP), PCR en tiempo real (qPCR), microarreglos y FISH (hibridación con fluorescencia *in situ*) (Su et al, 2012).

Estas técnicas utilizan marcadores moleculares para determinar la diversidad bacteriana, principalmente genes de DNA girasa, Subunidad β de la RNA polimerasa y el RNA ribosomal 16S (Riesenfeld et al., 2004), siendo que este último gen es el más utilizado para determinar la diversidad bacteriana en un ambiente dado (Tringe & Hugenholtz, 2008). Luego del desarrollo de estas tecnologías surgió la metagenómica, definida inicialmente como el estudio del genoma de la microbiota total presente en una muestra ambiental (Di Bella et al, 2013). Con este propósito, en los últimos 10 años se han desarrollado diferentes tecnologías de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS), las cuales han venido desplazando o complementando los demás métodos independientes de cultivo y mejorando el desarrollo de la metagenómica.

3.4.2. Bioestimulación

La bioestimulación implica la adición de soluciones provistas de nutrientes y aceptores de electrones, a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos (Sepúlveda & Trejo, 2002). Dentro de esta técnica es posible controlar la temperatura y el pH para lograr tasas de remoción de contaminantes más altas. Para la implementación de esta técnica es de suma importancia determinar si la población autóctona de microorganismos en donde se perpetuó el derrame, tiene capacidad biorremediadora, si no la posee esta técnica no será factible de aplicar en este lugar (Tonini et al., 2010).

La importancia de la población autóctona radica en que esta ya está presente y esta adecuada al ambiente subsuperficial, y tienen una buena distribución espacial en la superficie del suelo (Adams et al, 2015).

En los tratamientos de bioestimulación se puede adicionar nutrientes orgánicos e inorgánicos. En el caso de nutrientes orgánicos es posible adicionar compost de aserrín, lodos de aguas residuales, excremento de aves y estiércol para regular la relación C: N, ya que estos compuestos presentan altas concentraciones de este elemento (Adams et al., 2015). En un estudio reciente, se demuestra que la adición de estiércol a un suelo contaminado con 14103.2 ppm de HTP resultó en una degradación del 62.96% de este contaminante al término de 70 días (Orji et al, 2012).

La adición de nutrientes inorgánicos al suelo permite lograr restablecer la relación C: N: P, entre ellos sobresalen los fertilizantes inorgánicos NPK, la urea, el nitrato de potasio y el tripolifosfato de sodio.

En un estudio realizado por Agarry y Ogunleye (2012), se estudió la biorremediación mejorada de suelos artificialmente contaminados con aceite de motor de manera ex situ, utilizando el fertilizante NPK inorgánico y una concentración de surfactante no iónico, estas se usaron como variables de bioestimulación independientes con el objetivo de evaluar la reducción de HTP como variables dependientes. Los resultados muestran que después de 42 días, se presentó una reducción del 67,20% en la concentración de HTP en estos tratamientos. En otro estudio Gómez et al. (2009), utilizaron como fuente de nitrógeno la urea, y el fosfato de potasio dibásico como fuente de potasio. En este proceso se logró una remoción del 60,45% de HTP presentes en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina y diésel.

Para determinar la cantidad de nutrientes a suministrar en el suelo, se utiliza el modelo conceptual de McCarty (Rittmann & McCarty, 2001), el cual consiste en proponer la degradación del contaminante hasta su forma más oxidada, y ajustar el balance estequiométricos con fuentes de fósforo y nitrógeno.

3.5. Factores que intervienen en los procesos de biorremediación

Las condiciones en las que se desarrolla el proceso de biorremediación determinan el éxito o el fracaso de este proceso. Dentro de las condiciones más importantes que se deben tener en cuenta en todo proceso de biorremediación se encuentran las condiciones del suelo, tales como: textura del suelo, temperatura, pH, humedad y disponibilidad de nutrientes, de aceptor y donador de electrones.

3.5.1. Textura del suelo

La textura del suelo tiene un efecto importante en las propiedades físicas y características químicas del suelo afectando el comportamiento del mismo, especialmente la capacidad de retención de nutrientes (Erro et al., 2016). Además, las partículas del suelo (limo, arcilla, arena) influyen en otras propiedades y/o comportamiento de los suelos incluyendo: aireación, contenido y descomposición de materia orgánica, resistencia al cambio de pH y potencial de lixiviación de contaminantes. En general, se considera que los suelos con textura fina (alto contenido de arcilla o limo) presentan un mayor número de bacterias que los suelos de textura gruesa (alto contenido de arena) (Kogbara et al, 2015). Los suelos de texturas finas contienen una mayor cantidad de bacterias, y se compactan con más facilidad evitando la transferencia de oxígeno y de nutrientes en la matriz del tratamiento (Prada, 2016).

3.5.2. Temperatura

La temperatura del suelo es una variable que afecta considerablemente el crecimiento de los microorganismos y por ende su metabolismo. En general se conoce que las bacterias que habitan en el suelo son mesófilas, por tanto el rango de temperatura en el que son

capaces de desempeñarse oscila entre los 15°C y 45°C, con un rango óptimo entre los 25°C y 35°C (Castellanos, 2002).

3.5.3. pH

El pH del suelo es fundamental para el buen funcionamiento enzimático de los microorganismos, se han reportado valores de pH (7- 8) neutros como los que generan condiciones adecuadas para los procesos de biodegradación (Pawar, 2015). Es por esta razón que muchos microorganismos no son capaces de tolerar valores extremos de pH, debido a que algunos compuestos naturales tienden a hidrolizarse o se desnaturalizan las enzimas (Atlas & Bartha, 2001). En general los hongos son más acidotolerantes que las bacterias, las cuales a su vez se desarrollan con mayor facilidad en ambientes neutros y alcalinos (Atlas & Bartha, 2001).

3.5.4. Humedad

Los microorganismos requieren de un medio acuoso para transportar los nutrientes y llevar a cabo su metabolismo (Madigan, Martinko, & Parker, 2004). Debido a que el agua es el mayor componente del citoplasma de las células, una cantidad adecuada permitirá el movimiento de nutrientes tanto al interior de las células, como en la matriz del sistema (Prada, 2016). Por tanto la humedad es un factor clave en el crecimiento bacteriano, una cantidad baja de humedad, refleja una baja actividad microbiana producto de la poca transferencia de nutrientes y una cantidad elevada de agua, produce una reducción significativa en la transferencia de oxígeno por tanto el metabolismo bacteriano carecerá de su aceptor final de electrones (Ramos & Zúñiga, 2008).

Para los procesos de biorremediación aerobios los rangos de humedad que presentan tasas de degradación de contaminantes más altas oscilan entre 20% - 40% de humedad (Agudelo, 2010; Butenschoen, Scheu, & Eisenhauer, 2011; Cho, Rhee, & Lee, 2000)

3.5.5. Disponibilidad de nutrientes

La disponibilidad de nutrientes es un factor esencial para el desarrollo del proceso de biorremediación. Las células bacterianas requieren una fuente de nitrógeno (Nitrato o Amonio), para llevar a cabo todas las reacciones relacionadas con la replicación de los ácidos nucleicos y con la síntesis de proteína. Adicionalmente, se requiere de fósforo para la síntesis de ATP, siendo la molécula esencial que brinda energía a la célula. Otro factor a tener en cuenta es el grado de biodisponibilidad que esté presente debido a que no todas las formas de nitrógeno ni de fósforo son asimilables por las bacterias. En el caso del fósforo se conoce que la mayoría de suelos tienen un bajo contenido de fósforo debido a su baja solubilidad y biodisponibilidad, pues precipita en presencia de cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+3} en un pH desde neutro, hasta alcalino (Prada, 2016). Además, se debe considerar que el nitrógeno puede perderse rápidamente en el suelo debido a la lixiviación del amonio y el nitrato, y debido a procesos de desnitrificación del suelo (Prada, 2016). Es necesario adicionar fuentes de nitrógeno como nitratos y amonio y

fuentes de fósforo como los fosfatos para garantizar la presencia de estos en el suelo, para que estos puedan ser asimilados por las bacterias.

3.5.6. Presencia de aceptor y donador de electrones

La respiración microbiana es la energía que requieren para desarrollar sus funciones vitales, mediante una secuencia compleja de reacciones de óxido-reducción. Mediante la respiración, los electrones son transferidos desde un donante a un aceptor a través de un transportador biológico de electrones, produciendo energía química, la cual es almacenada en moléculas de adenosín trifosfato (ATP). El tipo de aceptor de electrones utilizado establece el tipo de metabolismo, determinando las reacciones específicas que pueden ocurrir o no ocurrir (Prada, 2016). En el caso del proceso de biorremediación, el donador de electrones puede ser el contaminante o algunos cofactores reducidos, mientras que el aceptor depende del tipo de proceso a implementar (aerobio o anaerobio). En los procesos aerobios el aceptor final de electrones es el oxígeno, mientras que en los anaerobios puede ser el ion nitrato o sulfato (Adams et al., 2015). Para descontaminar suelos impactados por hidrocarburos los procesos aeróbicos son más eficientes debido a que en los procesos anaerobios la degradación de hidrocarburos ocurre de una manera más lenta (Yu et al., 2012; Stasik et al., 2015).

3.6. Estrategias para incrementar la biodegradación

3.6.1. Surfactante

Un factor importante en el éxito o fracaso de un proceso de biorremediación es la biodisponibilidad del contaminante para los microorganismos, si éste se encuentra muy adherido al suelo, el uso de agentes surfactantes es de suma importancia para llevar a cabo este proceso (Arrieta, 2011).

El surfactante conocido también como el agente de superficie activa o “tensoactivo” representa una molécula de cadena larga y heterogénea que contiene grupos hidrófilos (cabeza) como grupo hidrófobos (cola)(Mao et al., 2015). El grupo hidrófilo del tensoactivo es un grupo iónico o altamente polar, dependiendo de la naturaleza del grupo hidrófilo, los tensoactivos se pueden clasificar como agentes tensoactivos aniónicos, catiónicos, de ion híbrido, y no iónicos (Rosen, 2004). Normalmente, los grupos hidrófilos (o grupos de cabeza) son aptos para interactuar en fase acuosa y los grupos lipófilos (o grupos de cola) tienden a combinarse con los contaminantes hidrófobos de las partículas del suelo (Mao et al, 2015),Figura 3.

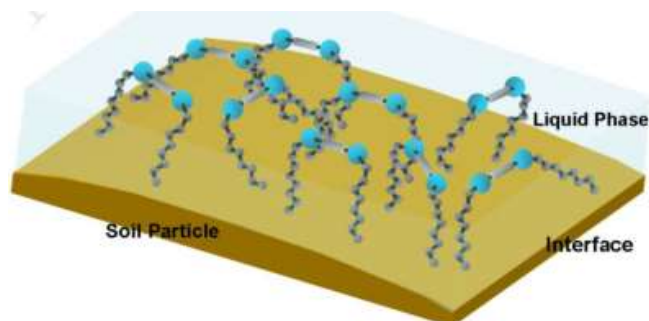


Figura 3. Interacción fase líquida-surfactante-suelo (Mao et al., 2015).

Para lograr solubilizar los contaminantes adheridos a la matriz del suelo es de suma importancia la formación de micelas en la solución del surfactante. Las micelas se forman cuando la superficie de la disolución se encuentra totalmente ocupada por el agente superficial (tensoactivo), por tanto, las moléculas en el seno de la solución recurren a una segunda alternativa energética, que consiste en la agregación espontánea o formación de micelas en solución, donde los grupos polares se reúnen adoptando la forma esférica sobre las cadenas hidrocarbonadas, estado que refleja un mínimo en energía (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005), Figura 4. Estos agregados, distribuidos en el seno del líquido, mantienen un equilibrio con las moléculas libres del tensoactivo en disolución y en la superficie (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005).

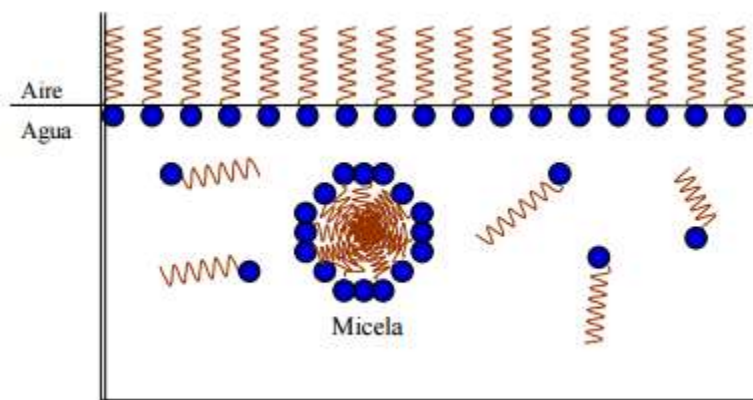


Figura 4. Formación de micelas al saturarse la superficie del líquido (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005)

Existe una concentración del agente surfactante mínimo para que se de esta formación de micelas. Esta concentración se conoce como la concentración micelar crítica (CMC) (Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005). Esta propiedad determina la mínima concentración en la cual las micelas pueden ser detectadas experimentalmente (Katime et al., 2003). Tanto los surfactantes aniónicos y catiónicos presentan CMC altas, mientras que los no iónicos presentan CMC más bajas.

Se ha demostrado que los surfactantes aniónicos cambian las funciones biológicas de los microorganismos (Cserhádi et al., 2002) y los catiónicos afectan la membrana citoplasmática de las bacterias. En tanto que los no iónicos son menos agresivos con las poblaciones microbianas. Adicionalmente se conoce que la micelización en los tensioactivos no iónicos se lleva a cabo de manera más fácil porque la agregación tiene lugar debido a la atracción hidrófoba entre las cadenas no polares, mientras que las cadenas hidrófilas se separan fácilmente en una fase acuosa (Mao et al., 2015).

Los tensoactivos utilizados para el lavado de suelos deben tener un buen potencial de solubilización, manteniendo al mismo tiempo la mínima adsorción en la matriz del suelo (Mao et al., 2015). Este incremento en el potencial depende de la estructura molecular, siendo beneficiosa las cadenas hidrofóbicas largas (Zhu et al., 2012), la cantidad de grupos hidroxilos y la presencia de grupos sustitutos (Laha et al., 2009).

Dentro de los tensoactivos no iónicos se encuentra el tensoactivo sintético Tween® 80 el cual no es tóxico para los microorganismos del suelo y es inerte para la matriz del suelo, teniendo la ventaja adicional de causar una velocidad de disolución mejorada para diversos compuestos como los hidrocarburos (Mousset et al., 2013). Dicha característica se logra por los veinte grupos sustitutos que presenta en su estructura molecular, Figura 5. Además su baja CMC 0,015 g/L (Kim et al., 2001) lo hace ideal para solubilizar a este tipo de contaminantes utilizando una baja cantidad de este surfactante.

Por esta razón su uso en tratamientos de biorremediación ha sido ampliamente utilizado, como en el caso de suelos contaminados con 30.000 ppm de diésel donde se obtuvo un porcentaje de reducción de HTP superior al 50% (Lee et al., 2011).

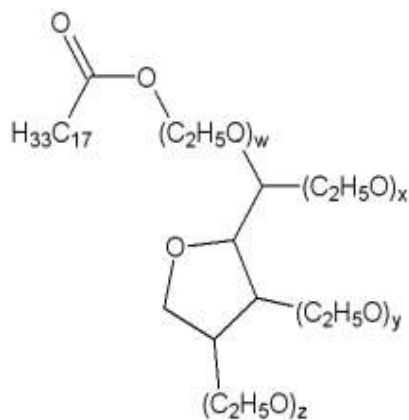


Figura 5. Estructura molecular Tween® 80 (Karjiban et al., 2012)

3.6.2. Leonardita

Es un material orgánico natural que se originó a través de un proceso de descomposición durante más de varios millones de años (David et al., 2014). Es una subclase de las

sustancias húmicas caracterizándose por ser lignitos altamente oxidados presentando fracciones de ácidos húmicos, fúlvicos, huminas y algunas cantidades de materia mineral (Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008). En general presenta un contenido elevado de ácidos húmicos que oscila entre el 30 y el 80% considerándose en su mayoría ácidos fúlvicos los cuales son las sustancias húmicas con mayor número de grupos funcionales lo que le hace propicio para su utilización como enmienda orgánica (Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008; Ratanaprommanee & Shutsrirung, 2013), En la Tabla 2 puede observarse la composición de la Leonardita.

Tabla 2. Ficha técnica Leonardita

Compuesto	Concentración (g/L)
K ₂ O	68.5
Carbono del extracto Húmico Total	50.0
Carbono de ácidos húmicos	45.0
Carbono de ácidos fúlvicos	5.0
Sólidos insolubles	22.6
Sodio soluble en Agua	0.15

La importancia de la presencia de sustancias húmicas y sus derivados confiere estabilidad al suelo, evitando procesos de erosión, asegurando además una mayor actividad biológica, generando condiciones propicias para su estabilidad física, química y biológica (David et al., 2014). Además, se los considera como materiales polifuncionales operando como agentes aglutinantes, mediadores de agentes abióticos y reacciones bióticas, desintoxicantes, portadores de nutrientes redox y estimuladores de crecimiento (Turgay et al., 2010).

Estudios recientes se han enfocado en probar la capacidad de las sustancias húmicas como la leonardita para cambiar las propiedades de los contaminantes orgánicos, aumentando la solubilidad de las sustancias hidrofóbicas no iónicas (Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008) . Evaluaciones en un proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el que se aplicó como agente bioestimulante la leonardita. En este estudio se determinó que estas sustancias húmicas ejercen un papel importante en los proceso del suelo relacionados con la liberación lenta de nutrientes para las plantas, aumenta el intercambio catiónico, genera un efecto tampón en el suelo actuando como una sustancia buffer , además interactúa con los compuestos xenobióticos y los iones metálicos tóxicos (Bratkova, Nikolova, Chakalov, & Rilski, 2012). De acuerdo con Turgay et al. (2010) los suelos tratados con la leonardita presentan un incremento en la producción de enzimas como ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa, mejorando sus condiciones a largo plazo.

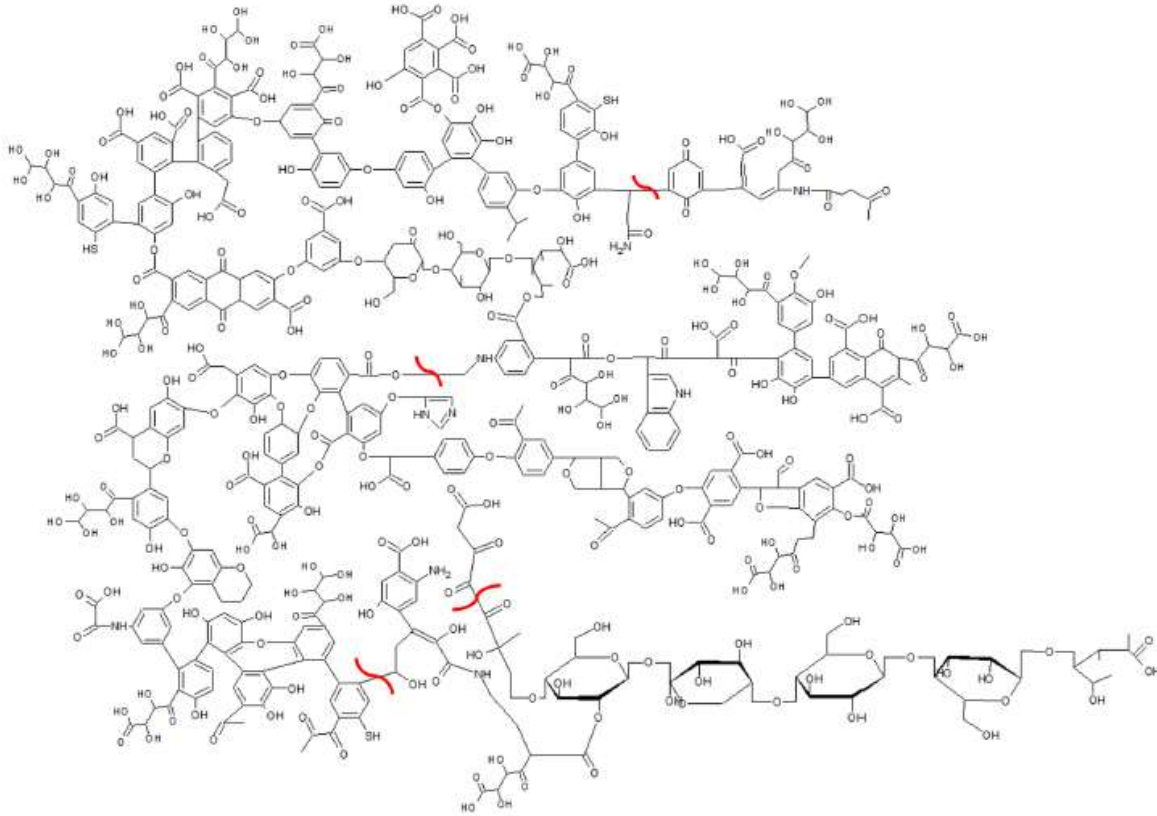


Figura 6. Estructura primaria hipotética de la Leonardita (Erro et al., 2016)

3.7. Reactor de lecho estático de aireación pasiva

Para el tratamiento de sistemas contaminados con sustancias recalcitrantes se pueden diseñar tratamientos de tipo aerobio y anaerobio. En general, los tratamientos aerobios han demostrado ser altamente eficientes para la descontaminación de sitios impactados por hidrocarburos. En este tipo de tratamientos aerobios, es de suma importancia suministrar la cantidad de oxígeno necesaria para que el proceso se desarrolle de manera adecuada. Cuando se tratan grandes volúmenes de suelo la presencia de este aceptor de electrones en toda la matriz de suelo es una limitante. Por esta razón, se han diseñado estrategias capaces de distribuirlo de una manera homogénea en todo el suelo impactado.

Entre las tecnologías más estudiadas se encuentran la aireación activa, aireación mecánica y aireación pasiva (Barrington, Choiniere, Trigui, & Knight, 2003). La primera requiere a parte de la instalación de ductos bajo la pila, el uso de ventiladores o sopladores que impulsen el aire al interior de la pila para garantizar una completa aireación de la masa a compostar (Haug, 1993). Una excesiva aireación puede enfriar el compost y generar grandes pérdidas de nitrógeno y un defecto en la aireación no permitiría el desarrollo de las temperaturas de estabilización del producto. La segunda metodología requiere de la instalación de costosos equipos de volteo mecánico, para garantizar un cierto nivel de oxígeno en la pila. Es decir, requieren costos de capital iniciales muchos mayores. Mientras

que la tercera requiere de la instalación de ductos en el interior de la pila, para aumentar las fuerzas convectivas, creadas entre el material a compostar y la temperatura ambiente.

Por tanto, la estrategia de implementar sistemas de aireación pasiva es la más adecuada en cuanto a economía. Además se ha demostrado en diversos estudios que presenta eficiencias tan altas como los tratamientos de aireación activa, mostrando resultados muy similares en cuanto a la velocidad de degradación del material y la calidad del producto final (Barrington et al. 2003; Yu et al., 2009).

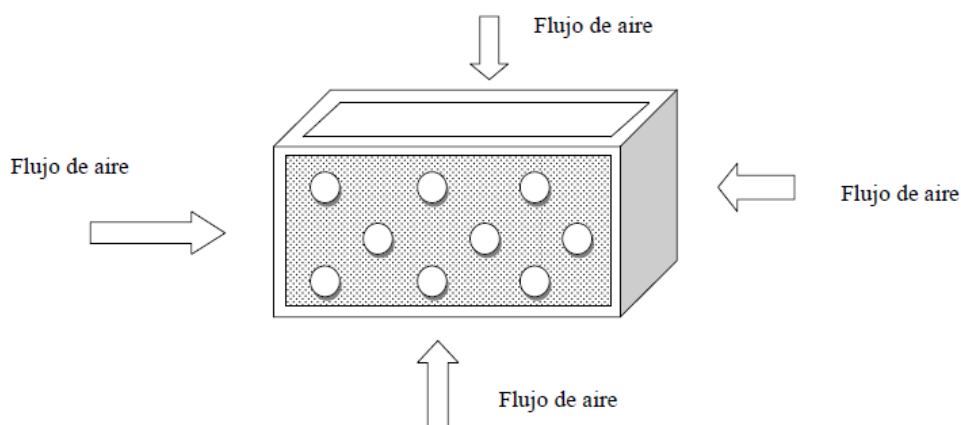


Figura 7. Estructura de un biorreactor de lecho estático de aireación pasiva (Barrios, 2012)

3.7.1. Variables de diseño del biorreactor

Para la aplicación del diseño de aireación y de biodegradación dentro del sistema, es de suma importancia controlar diversas variables. En general, se conoce que estos sistemas al depender de organismos vivos, son sistemas autocatalíticos que se regeneran constantemente (Doran, 1998), permitiendo así, transformar los compuestos orgánicos en general, en compuestos más estables mediante el establecimiento y el control adecuado de parámetros como, la relación Carbono-Nitrógeno (C:N), humedad, porosidad, pH, temperatura y oxígeno (Barrios, 2012).

Tabla 3. Variables relevantes en el biorreactor

Variables del proceso	Descripción
Relación Carbono-Nitrógeno (C:N)	Dicha relación puede ser estimada mediante la metodología expuesta por Cookson 2005. Para estos procesos se recomienda un rango de esta relación entre : 20:1 a 40:1 con puntos ideales entre 25:1 a 30:1 (Rynk et al., 1992).
Humedad interna	La humedad es la que permite el intercambio de nutrientes y oxígeno, debido a que el metabolismo celular se produce en un medio acuoso (Cookson, 1995). Para procesos en los que se traten sustancias tóxicas la humedad óptima está en el rango de 30-40% (Agudelo, 2010)

Humedad externa	Este parámetro indica el contenido de humedad o de vapor de agua presente en una masa de aire a una T° y presión característica. De esta manera entre más humedad relativa presente el aire menor será el flujo volumétrico que ingrese al sistema de biorremediación.
Porosidad	La porosidad son los espacios de aire disponibles en el suelo. Por tanto, es en este espacio, en donde se permite la disposición de las moléculas de oxígeno y además el acoplamiento de la humedad suministrada. Los valores recomendados para una aireación adecuada en el sistema oscilan entre 50-70% (Rynk et al., 1992)
pH	La variación de pH es consecuencia de la transformación de las moléculas orgánicas complejas, en ácidos orgánicos de cadena corta. En los procesos biorremediativos se estima que el pH óptimo se encuentra entre 6.0 y 8.0 siendo el amoníaco el causante de producir condiciones básicas en el medio (Adams et al., 2015; Barrios, 2012)
Temperatura interna	Afecta directamente la tasa del metabolismo microbiano y consecuentemente la actividad microbiana en el medio ambiente. La tasa de biodegradación en cierta medida aumenta con el aumento de la temperatura y disminuye con la disminución de la misma.(Adams et al., 2015)
Temperatura externa	La temperatura ambiental genera cambios en las características de una sustancia gaseosa. Por tanto el aire al ser un gas aumenta o disminuye su densidad y de esta forma su concentración en el medio dependiendo de la variación en la temperatura ambiente (Barrios, 2012)
Concentración de oxígeno	Es fundamental la presencia de oxígeno en todo el sistema, ya que es un proceso aerobio en el que el aceptor final de electrones es el oxígeno. La concentración de oxígeno requerida en el sistema se determina mediante el método de Cookson (2005). En general se sugiere dispones un exceso de oxígeno entre el 5 y el 8%. (Barrios, 2012)

3.7.2. Modelo cinético de biodegradación

Las reacciones de degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo pueden seguir cinéticas de distinto orden. No obstante, de forma general, se pueden describir como modelos cinéticos de primer orden donde la degradación del hidrocarburo varía en función del tiempo (Doran, 1998).

Para esto es necesario realizar un balance de masa en el reactor de lecho estático, el cual se muestra en la ecuación 1(Doran, 1998):

$$V \frac{dC}{dt} = \sum Q_{entrada} C_{entrada} - \sum Q_{salida} C_{salida} \pm (V * \gamma) \text{ (Ecuación 1)}$$

En donde:

V: Es el volumen del reactor

C: Concentración del petróleo crudo

Q: Velocidad de flujo

γ : Velocidad de reacción

Como el sistema no tiene ni entradas ni salidas, la ecuación 1 se reduce a la ecuación 2 (Doran, 1998).

$$V \frac{dC}{dt} = \pm (V * \gamma) \text{ (Ecuación 2)}$$

De esta manera se obtiene la ecuación 3 (Doran, 1998):

$$\gamma = \frac{dC}{dt} = -kC^n \text{ (Ecuación 3)}$$

Conociendo que es una reacción de primer orden, n equivale a 1, lo que implica que la velocidad de reacción depende exclusivamente de la concentración de las especies en el tiempo. Por tanto es necesario integrar la ecuación 3, que da lugar a la ecuación 4:

$$\ln \left[\frac{C}{C_0} \right] = -kt \text{ (Ecuación 4)}$$

Aplicando logaritmo natural a ambos lados de la ecuación se obtiene finalmente la siguiente expresión mostrada en la ecuación 5 (Doran, 1998):

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \text{ (Ecuación 5)}$$

En donde:

C_0 : Concentración inicial de petróleo expresada en [HTP] en el tiempo cero

C : Concentración en el tiempo t

Por lo tanto, una representación gráfica del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo arroja una línea recta, cuya pendiente se puede relacionar con la constante de degradación (k).

De la ecuación 6 es posible determinar el tiempo de vida media del contaminante, este indica el tiempo en el cual la concentración del contaminante que se encontraba inicialmente se reduce a la mitad.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} = \frac{0,693}{k} \text{ (Ecuación 6)}$$

4. Metodología

En este capítulo se presenta la metodología llevada a cabo durante todo el proceso de la investigación, los pasos realizados para la ejecución del mismo junto con los procesos que se evaluaron en cada uno de ellos (Ver Figura 8). Asimismo, los equipos utilizados y los análisis estadísticos planteados. La propuesta investigativa se realizó en el laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico del Departamento de Geociencias y Medioambiente, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, figura 8.

A continuación, se muestra el esquema llevado a cabo para el desarrollo de la metodología.

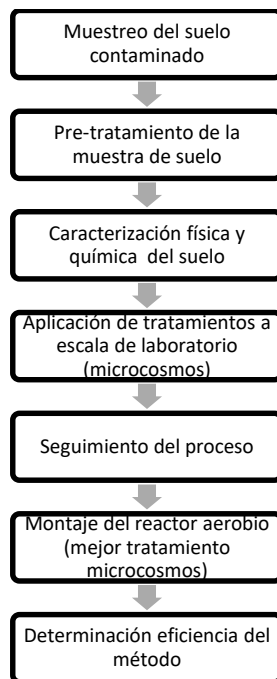


Figura 8. Diagrama metodológico

4.1. Equipos

Cromatógrafo Agilent GC, medidor multiparámetro portátil modelo: HQ40d de pH, Ro-tap, cabina de flujo laminar horizontal, plancha de calentamiento, balanza analítica APX-203, horno de secado, autoclave, medidor de humedad relativa marca Thermopro, ubicados en el laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico, Facultad de Minas. Termociclador, cámaras de electroforesis, digitalizador de imagen y software Gelcompare ubicados en el laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Sede.

4.2. Muestreo del suelo contaminado

Se tomaron muestras representativas del sitio donde ocurrió el derrame de petróleo, municipio de la Hormiga, departamento del Putumayo. Se realizó un muestreo aleatorio en el área afectada, homogenizando las muestras de suelo para lograr las mismas condiciones en todo el volumen muestreado. Todo el proceso se llevó a cabo según los parámetros establecido en el manual del Environmental Protection Agency (EPA, 1991).

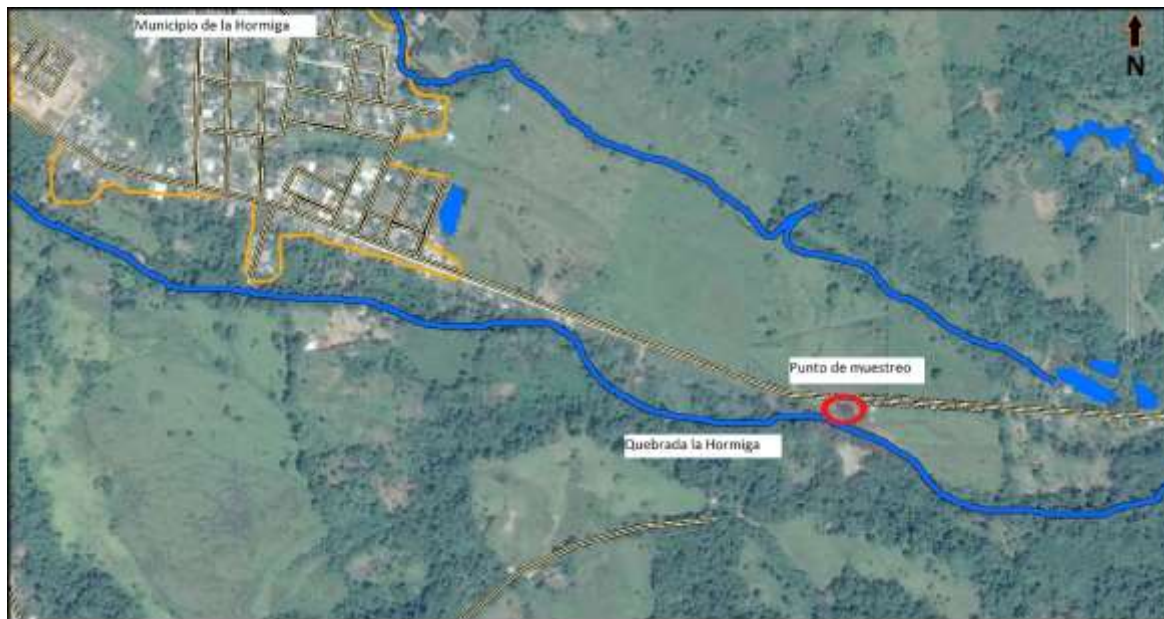


Figura 9. Mapa del sector de muestreo del suelo .Modificado Google Maps

4.3. Pretratamiento de la muestra de suelo

La muestra de suelo se tamizo a 2mm, utilizando un equipo mecánico Ro-tap®. Posteriormente las muestras fueron secadas al sol.

4.4. Caracterización del suelo contaminado

Dicha caracterización se llevó a cabo en el Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia–Sede Medellín. En él, se determinaron las principales propiedades físicas y químicas. Esta caracterización se realizó antes y después del tratamiento de biorremediación tanto en los microcosmos a escala de laboratorio como en el reactor de lecho estático. A continuación, se describen las propiedades a determinar y la técnica a utilizar en cada caso:

Tabla 4. Pruebas físicas y químicas aplicadas para la caracterización del suelo.

PRUEBA EXPERIMENTAL	TÉCNICA ANALÍTICA
Densidad aparente	Método de la probeta (Dominguez & Aguilera, 1989)
Densidad real	Método del picnómetro (Dominguez & Aguilera, 1989)
Potencial de Hidrogeno	Método dilución (Jackson, 1964)
Contenido de agua	Método del horno (Jackson, 1964)
Porosidad	Método por diferencia porcentual
Nitrógeno total	Nitrógeno Kjendahl (Jackson, 1964)
Contenido nitrato	Sulfato de aluminio
Contenido nitrógeno amoniacal	Método de Nessler (Nessler, 1999)
Fósforo disponible	Método de Bray II (Bray & Kurtz, 1945)
Fracción de carbono orgánico	Método de Walkley-Black (Walkley & Black, 1934)

4.5. Creación de los microcosmos a escala de laboratorio

En primera instancia se estableció el tratamiento de bioestimulación más adecuado para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo, evaluando la eficacia del Tween® 80 como agente bioestimulante acompañado de la Leonardita. Este experimento fue llevado a cabo en bandejas de aluminio con un área de 25cm x 25cm en donde se adicionaron 2 kg de suelo. En el anexo D se muestran las fotografías del montaje.

Tabla 5. Microcosmos evaluados a escala de laboratorio

Tratamiento	Abreviatura	Características
Control	C	Suelo con petróleo crudo + HCl 2M
Atenuación	AT	Suelo con petróleo crudo
Bioestimulación con Leonardita	BS	Suelo con petróleo crudo + un bioestimulante
Bioestimulación con Leonardita 3% y 0.015 g/L Tween® 80	BI	Suelo con petróleo crudo + dos bioestimulantes
Bioestimulación con Leonardita 3% y 0.75 g/L Tween® 80	BII	Suelo con petróleo crudo + dos bioestimulantes
Bioestimulación con Leonardita 3% y 1.5 g/L Tween® 80	BIII	Suelo con petróleo crudo + dos bioestimulantes

La humedad se mantuvo al 30% en todos los tratamientos. La dosificación de nutrientes en los tratamientos de bioestimulación, fue calculada mediante relaciones estequiométricas establecidas por el método de McCarty (Rittmann & McCarty, 2001), entre la concentración de HTPs presentes en el suelo y la cantidad de nitrógeno y fósforo requeridos para producir biomasa y energía. La aplicación de este método se muestra en el Anexo C. Adicionalmente, se establecieron tres concentraciones de Tween® 80 para ser evaluadas y una concentración constante de Leonardita 3%. Se cuantificó la concentración

inicial y final de HTP a través de la técnica de Soxhlet, Tabla 5, a continuación se especifican los diferentes tratamientos:

- **Control:** se utilizó una concentración de HCl de 2M para garantizar la inhibición del crecimiento microbiano, adicionada en el agua empleada para control de humedad.
- **Atenuación Natural:** Se mantuvo el suelo sin la adición de nutrientes ni de fuentes de energía adicionales.
- **Bioestimulación:** Se manejó una relación de C: N: P de 100:12:2, la fuente de nitrógeno utilizada fue urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) y la fuente de fósforo el polifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$). La concentración de Tween® 80 varió dependiendo del tratamiento a razón de 0.015, 0.75, 1.5 mg/L. La leonardita se adicionó en todos los tratamientos en una concentración del 3% al suelo seco (Turgay et al., 2010). Estos nutrientes se suministraron en el agua empleada para control de humedad.

4.5.1. Diseño de experimentos

Sobre los tratamientos se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones por experimento, teniendo así un total de 18 experimentos (fuente propia) ver tabla 6.

Tabla 6. Diseño de experimentos en los microcosmos (fuente propia)

Número experimento	Nivel tratamiento					
	C	AT	BS	BI	BII	BIII
[HTP] _i	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1
[HTP] _f	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3

En donde:

X: factor medible (concentración de HTP en el suelo)

i: estado inicial

f: estado final

4.6. Seguimiento del proceso

4.6.1. Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo

El contenido de hidrocarburos totales se determinó mediante una metodología adaptada del Estándar Métodos 5520F, junto con un perfil cromatográfico obtenido por CG-MS (Cromatografía de gases acoplado a masas). Estos ensayos se realizaron para muestras de los ensayos a escala de laboratorio y escala piloto, en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

Para la cuantificación de los HTP se utilizaron viales de polipropileno de 50mL para centrifuga en donde se depositó 1.0g de suelo seco al cual se le adicionaron 2.5g de

Na_2SO_4 anhidro (Panreac®). Posteriormente se le agregó a cada vial 5ml de diclorometano (Chemi®), grado analítico y se llevó al vortex Grant PV-1 por 90 segundos. Las muestras fueron centrifugadas en un equipo Jouan serie MR22 a 7000 rpm durante 20 minutos. El proceso de lavado del suelo se repitió dos veces más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen aproximado de 15mL de sobrenadante. Se empleó un roto evaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40°C y a una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente. Este último se resuspendió en 1.0mL de diclorometano (Agilent®) en viales de 1.5 mL ámbar provistos de tapas roscadas con tapón de teflón.

En la cualificación de los HTP se utilizó un cromatógrafo marca Agilent® serie 6890N con un detector selectivo de masas Agilent® 5973 Network y un inyector Agilent® 7683. Se empleó una columna DB-TPH -123-1632 marca Agilent® Technologies de 30m de longitud, 0.32mm de diámetro y una película del empaque de 0.25 μm . Todas las muestras fueron corridas bajo las siguientes condiciones: una temperatura inicial de 60°C durante 2 minutos, posteriormente la temperatura aumentó 8°C por minuto hasta alcanzar los 300°C, manteniéndose a esta temperatura por 8 minutos más. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C, mientras que la temperatura del detector fue de 340°C, el gas de arrastre usado fue hidrógeno a un flujo constante de 2.0 mL por minuto. La concentración de contaminante en las muestras fue identificada y cuantificada con un estándar que contenía una mezcla de hidrocarburos alifáticos de C8-C40 (S-4149-500-MX, Chiron AS) con un total de 35 analitos resuspendidos en disulfuro de carbono-diclorometano (3:1).

4.6.2. Respirometría

Para el proceso de cuantificación del dióxido de carbono se siguieron los parámetros establecidos por Celis et.al. (2009) en cada uno de los tratamientos. Cabe resaltar que este proceso se realizó tanto a escala de laboratorio como en la prueba piloto.

Se colocó un recipiente invertido de 1.0L sobre la superficie del suelo. Dentro de cada uno de ellos se ubicó un recipiente con 15 mL de una solución de NaOH 1M para absorber el CO_2 producido. Se realizaron mediciones de la cantidad de NaOH remanente (no neutralizado) a través del tiempo de incubación (cada 3-4 días), mediante titulación con 0,1 M de HCl, reemplazando la respectiva trampa de NaOH por una nueva en cada ocasión.

Para la lectura de la concentración de dióxido de carbono para cada tratamiento se extrajo 1.0mL de NaOH de cada tratamiento al cual se adicionó 2.0mL de BaCl_2 1.0 M para precipitar el C inorgánico como BaCO_3 insoluble. Posteriormente, se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína como indicador ácido base, y se tituló el NaOH, no neutralizado, directamente con HCl (Iannotti et al., 1993). La cantidad de CO_2 desprendido desde las mezclas incubadas fue calculada mediante la fórmula de Anderson (1982) (Lourdes et al., 2012).

4.6.3. Crecimiento bacteriano en el proceso

En el proceso de biorremediación planteado se estudió el crecimiento de dos tipos de bacterias: heterótrofas e hidrocarburoclastas. De esta manera se empleó un medio nutritivo para el aislamiento de las primeras y uno selectivo para las últimas. Cabe resaltar que este proceso se realizó tanto en la escala de laboratorio como piloto.

El medio de cultivo empleado para el estudio de las bacterias heterótrofas fue el Agar Nutritivo Difco™, cuya fórmula aproximada es Extracto de carne 3.0g/L, Peptona 5.0g/L y Agar 15g/L.

Para el medio selectivo se utilizó el medio mineral Bushnell – Hass cuya fórmula aproximada es Sulfato de Magnesio 0.2g/L, Cloruro de Calcio 0.02g/L, Fosfato monopotásico 1g/L, Nitrato de Amonio 1.0g/L, Cloruro férrico 0,05 g/L, Fosfato dipotásico 1.0g/L y Agar Bacteriológico 20g/L. La fuente de carbono utilizada fue una solución de petróleo crudo al 1% en hexano.

Para la preparación de ambos medios se siguieron las recomendaciones del fabricante, en el caso específico del medio de cultivo selectivo se sirvió en la caja Petri la solución mineral excepto la fuente de carbono, cuya adición (170 µL) se realizó posterior a la inoculación de la muestra en la caja.

4.6.4. Potencial de hidrógeno pH

Se determinó mediante el método de dilución. Se pesó 1.0 g de muestra de suelo y se llevó a un volumen de 10 mL de agua destilada, manteniendo una relación de 1:10. Dicha solución se llevó a un vortex Grant PV-1 por 1 min, para ser leído posteriormente por el electrodo de pH del equipo Hach® Modelo HQ40d.

4.6.5. Determinación humedad del suelo

Se midió el contenido de humedad en el suelo tanto al inicio del tratamiento como en el transcurso de este. Como primera instancia se pesó el crisol vacío (C_v), luego se obtuvo el peso del crisol con la muestra de suelo (C_i). Finalmente se llevó este crisol con la muestra de suelo húmedo a un horno de secado a una temperatura de 106°C por 24 horas para obtener así el peso del crisol final (C_f). El contenido de agua se calculó utilizando la ecuación 7.

$$\% \text{ humedad} = \frac{C_i - C_f}{C_f - C_v} \quad (\text{Ecuación 7})$$

4.6.6. Recuento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas

Se utilizó el método de recuento en placa por siembra superficial en el Agar correspondiente (Nutritivo y Selectivo), cabe resaltar que este proceso se realizó tanto en escala de laboratorio como en el piloto.

Para ello, se preparó una dilución de 1.0 g de suelo en 9.0 mL de agua destilada previamente esterilizada (10^{-1}). Posteriormente se tomaron 10 μ L de cada muestra y se transfirieron cada una a un tubo con 9.9 mL de agua destilada estéril 10^{-3} respectivamente. A partir de estas últimas muestras se tomó 1.0 mL de cada muestra y se transfirió cada una a un tubo con 9.0 mL de agua destilada para así conseguir la dilución 10^{-4} por cada muestra. Finalmente, se tomó de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} , 0.1 mL de muestra y se depositó este volumen en la superficie del medio selectivo y nutritivo respectivamente. Dicha alícuota se sembró y se incubó a 30°C durante 2 días para el medio nutritivo y durante 5 días para el medio selectivo siguiendo la metodología utilizada por (Madigan et al., 2004).

La ecuación utilizada para el cálculo de las UFC/g suelo es:

$$\frac{UFC}{g \text{ suelo}} = No \text{ de colonias} * \frac{volumen \text{ dilución}}{factor \text{ dilución}} * \frac{1}{gr \text{ suelo}} \text{ (Ecuación 8)}$$

4.6.7. Aislamiento y caracterización bacteriana

Se aislaron las bacterias predominantes en los microcosmos implementados. Se escogieron las bacterias con morfotipos diferentes visualmente comparando su color, forma y bordeado, para posteriormente ser identificadas por marcadores moleculares.

Se tomó una muestra de la colonia con diferente morfotipo y se sembró en una caja Petri suplementada con agar nutritivo, para el caso de las bacterias heterótrofas y en agar selectivo para el caso de las hidrocarburoclastas. El método de siembra utilizado fue el de agotamiento para obtener cepas puras. Se manejaron las mismas condiciones de crecimiento estipulados en el apartado 4.6.6 para cada tipo de bacteria. Para el caso específico de las bacterias hidrocarburoclastas, tras haber realizado el aislamiento en el agar selectivo, se llevó la cepa a un medio nutritivo para brindarle un ambiente más propicio de crecimiento durante 5 días.

4.6.8. Caracterización molecular de las cepas bacterianas aisladas

Esta fase de la metodología se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede-Medellín, adscrito al grupo Microbiop. Para ello se utilizó la técnica de extracción de ADN de las colonias aisladas y posterior amplificación del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) utilizando la técnica de PCR. El producto de PCR fue secuenciado, comparado los resultados con las secuencias depositadas en bases de datos para determinar la identidad de las cepas bacterianas presentes en los tratamientos.

4.6.8.1. Extracción de ADN de las cepas

Se determinaron las diferentes colonias en los tratamientos mediante su evaluación morfológica macroscópica. Posteriormente, se aislaron estos morfotipos en los medios correspondientes, selectivo y nutritivo, estos fueron incubados y aislados por 24 horas a 32 °C. Tras culminar el tiempo de incubación se tomó una muestra de la colonia diferenciada y se transfirió a 50 µL de TE con una concentración de 0.1X TRIS HCl en tubos de 1.5 mL. Luego se llevaron los tubos al baño de maría a 100°C por 5 minutos, se aplicó vortex rápidamente y se colocaron los tubos de nuevo al baño de maría. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugo a 5000 rpm por 5 minutos, finalmente se tomaron 5.0 µL del sobrenadante y se adicionaron a 45 µL de agua ultra pura, de acuerdo con la metodología de Silva-Bedoya et al., (2016).

4.6.8.2. Amplificación del ADNr 16S mediante PCR

El gen ribosomal 16S (ARNr 16S) fue amplificado usando los cebadores universales Eubac 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Dunbar et al., 1999). La amplificación se realizó en un volumen final de 30 µL, conteniendo 3 µL de ADN, 3 µL de Buffer Taq 10x, 2.4 µL de $MgCl_2$, 0.6 µL de dNTPs, 0.3 µL de primer 1492R, 0.3 µL de primer 27F, 0.3 µL de Taq Polimerasa y 20.1 µL de agua. La amplificación fue realizada en un termociclador iCycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). La purificación del producto de PCR se efectuó utilizando el kit QIAquick® PCR Purification Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.6.8.3. Secuenciamiento de los productos de PCR y análisis filogenético

Las muestras de PCR purificadas fueron secuenciadas por el método de Sanger/capilar por la empresa Macrogen (Korea). Para la edición de las secuencias se utilizaron los programas Chromas Pro y Mega para la eliminación de fragmentos de baja calidad. A partir de la secuencia editada se realizó la búsqueda de secuencias con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), utilizando Standard Nucleotide BLAST, con la base de datos de secuencias de ARN ribosomal 16S de Bacterias y Arqueas. Esta búsqueda se optimizó mediante la opción Megablast, que permite la búsqueda de secuencias altamente similares. Adicionalmente, fue realizado un análisis filogenético a partir de las secuencias obtenidas. El árbol fue producido por el método de Neighbor-Joining con 1000 repeticiones modelo Tamura 3, teniendo en cuenta la distribución Gamma con 5 tasas de categoría, mediante el software Mega 6.0.

4.7. Montaje del reactor de lecho estático con aireación pasiva

Para el escalado del mejor tratamiento de biorremediación obtenido en los microcosmos, se utilizó un reactor de lecho estático con aireación pasiva. Este modelo se obtuvo en estudios previos llevados a cabo en el laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico de la Facultad de Minas (Barrios, 2012). Mediante un diseño estadístico de superficie de respuesta (2^5) en el que se varió parámetros como humedad del aire,

humedad del reactor, temperatura interna del reactor, temperatura ambiente, porosidad del sistema y altura del reactor (Barrios, 2012), figura 10.



Figura 10. Montaje del reactor de lecho estático de aireación pasiva

De esta forma se obtuvo un polinomio característico en el que se estableció el flujo de aire que iba a ser suministrado al sistema para las condiciones evaluadas. Teniendo en cuenta este flujo y los requerimientos de suministro de oxígeno proporcionados por el modelo de McCarty se determinó el área de transferencia de oxígeno requerida para que el proceso se desarrolle de manera efectiva (Rittmann & McCarty, 2001).

Las dimensiones del reactor fueron, 0.8 m de ancho, 1.0 m de largo y 30 cm de alto con un volumen total de 0.24 m^3 , el material del reactor fue elaborado con material plástico reciclado. La cantidad de suelo que se agregó al reactor de lecho estático (Barrios, 2012) fue de 120 kg de suelo con un 20% adicional de tierra de capote y el 80% de suelo contaminado (compost). Este compost se adicionó debido a que con este se logró

mantener una cantidad de UFC/g desde el inicio del tratamiento, equivalente a la cantidad de UFC/g lograda en el mejor tratamiento de los microcosmos ($1 \cdot 10^7$), garantizando una degradación más rápida del contaminante. Adicionalmente, con esta cantidad de compost se generó un efecto de esponjamiento en el sistema, mejorando la transferencia de oxígeno. La cantidad total de la mezcla fue de 144 kg. Cabe resaltar que el compost maduro se obtuvo en un mercado local, el cual tiene las siguientes características fisicoquímicas, tabla 7.

Tabla 7. Características fisicoquímicas del compostaje

Característica	Valor	Unidad de medida
Arena	76	%
Limo	16	%
Arcilla	8	%
Clase	Franco Arenoso	--
Materia orgánica	18.3	%
Fosforo	358	mg/kg
Nitratos	51	mg/kg
Amonio	34	mg/kg
Nitrógeno total	1.1	%

Para el seguimiento del proceso en el reactor de lecho estático se evaluaron las siguientes variables: pH, UFC de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas, respirometría, HTP, humedad relativa, humedad interna del reactor, temperatura interna del reactor y temperatura del ambiente. Dichas variables fueron tomadas en 5 puntos del reactor ubicados 4 en las esquinas del reactor y uno en el centro del mismo.

Los nutrientes (N: P), el Tween® 80 y la leonardita se agregaron al reactor en el primer día del tratamiento, junto con la cantidad de agua necesaria para lograr un 30% de humedad.

5. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan los resultados y su discusión con relación a la caracterización física química del suelo realizada antes y después del proceso a escala de laboratorio y piloto. Se analiza el porcentaje de remoción de HTP en los microcosmos evaluando diferentes concentraciones de Tween® 80. Este análisis se complementa con un estudio de pH, de producción de CO₂ y una caracterización microbiológica de los tratamientos. Finalmente, se evalúa el comportamiento de la tasa de degradación de los HTP en el reactor a lo largo del tiempo de experimentación junto con otras variables que influyen en la transferencia de oxígeno al sistema.

5.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

Las muestras de suelo iniciales fueron tomadas según lo descrito en el Anexo A. Estas muestras fueron llevadas al Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia –Sede Medellín para su análisis fisicoquímico. El cálculo de los HTP de origen petrogénico se encuentra en el Anexo B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características físicas y químicas del suelo contaminado antes y después del tratamiento.

Característica	Tipo de suelo			Unidad de medida
	Suelo contaminado (SC)	Suelo microcosmos (SM)	Suelo reactor (SR)	
Arena	68	84	74	%
Limo	24	12	20	%
Arcilla	8	4	6	%
Clase	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	--
pH	6.5	7.1	7.4	
Contenido de agua	1,8	30	30	%
Densidad real	2.47	2.54	2.1	g/cm ³
Densidad aparente	1.24	1.24	0.84	g/cm ³
Porosidad	49	51	60	%
Materia Orgánica	9.1	7.3	7.4	%
Fósforo	34	20	177	mg/kg
Nitratos	1	90	175	mg/kg
Amonio	9	180	7	mg/kg
Nitrógeno total	0.12	0.27	0.39	%
HTP petrogénicos	20900	10000	5000	ppm

Los suelos de este sector se caracterizan por ser bien drenados y por desarrollarse a partir de depósitos aluviales y cenizas volcánicas, en general suelen ser de estructura franco arenosa (IGAC, 2014; Servicio Geológico Colombiano, 2015). Estas características se evidencian en los resultados obtenidos, donde se corrobora su estructura Franco Arenosa tanto al inicio como al final del tratamiento.

Para determinar si los parámetros químicos y físicos son los adecuados, se debe determinar el posible uso potencial del suelo posterior al proceso de biorremediación que se está aplicando, debido a que los rangos óptimos de estas variables cambian según el uso al que se destine. Debido a que el suelo fue extraído de una finca ganadera, se esperaba que el suelo cumpla con las condiciones necesarias para producir especies forrajeras.

En los tres tratamientos de suelo SC, SM y SR, el pH se mantuvo en rangos neutros a medianamente básicos. En general se puede afirmar que los valores son adecuados debido a que los suelos más adecuados para cultivar son los que tienen un pH comprendido entre 5,8 y 7,5, ya que los nutrientes de las plantas en general presentan su máxima solubilidad en este intervalo (Gonzales-Naranjo et al., 2010).

La porosidad aumentó tras la aplicación de los tratamientos tanto en el reactor como en los microcosmos. El aumento en la porosidad del reactor fue más notoria debido a la adición de compostaje que generó un efecto de esponjamiento en el suelo. En el caso de los microcosmos la porosidad aumentó en un 2% con respecto al suelo contaminado inicial; este aumento se puede atribuir al efecto de la leonardita, la cual mejora la porosidad del suelo debido al efecto de agregación de partículas finas, generando que el oxígeno fluya con mayor facilidad en la matriz del suelo y así sean más eficientes los procesos aerobios (David et al., 2014).

La materia orgánica (M.O) se mantuvo en el rango muy alto para los tres tipos de suelo, según el método de Walkley-Black, con valores superiores a 3.6%. En SC se presentó un porcentaje de 9.1 mientras que en el suelo con tratamiento se evidenció un valor de 7.3 % para SM y de 7.4% en SR. Comparando la cantidad de materia orgánica antes y después del tratamiento en los microcosmos, se puede evidenciar una disminución en este porcentaje, el cual se debe a que en el proceso de biorremediación se consumió parte del petróleo crudo, el cual al ser un hidrato de carbono, se incorporó a la materia orgánica nativa del suelo aumentando drásticamente su valor (Gonzales-Naranjo et al., 2010). La aplicación de Leonardita evitó que la cantidad de materia orgánica disminuyera drásticamente, debido a que en un estudio previo realizado sobre un suelo cercano al sitio de impacto sin contaminación, se evidenció un valor de tan solo 0.75% de materia orgánica. Por tanto gran parte de la materia orgánica que fue encontrada en el suelo contaminado consistía en los hidratos de carbono pertenecientes al petróleo crudo.

El nitrógeno total en SC presenta un nivel medio (0.1-0.2%), mientras que en SM su nivel fue alto (0.20-0.3%). La aplicación del tratamiento de biorremediación aumentó la cantidad

de nitratos e ion amonio disponible para ser consumido por los organismos vivos presentes en el suelo, por tanto compensó la relación tan alta de C:N que tenía inicialmente este, lo que ocasionaba la disminución en la biodisponibilidad de este nutriente (Garcia et al., 2009). En el reactor se observa una mayor concentración de ion nitrato respecto al ion amonio. Esto demuestra que el proceso de biorremediación se está dando de una manera adecuada, ya que todo el amonio se transformó a nitrato, convirtiéndose en una fuente de nitrógeno más asimilable por las bacterias. A pesar de que en SM hay una alta concentración del ion nitrato, la cantidad del ion amonio es superior, esto puede suponer que en la comunidad bacteriana de SM no había suficientes deberse a la escasa cantidad de microorganismos pertenecientes al género *Nitrosomas* y *Nitrobacter*, los cuales se encargan de transformar el amonio en nitrato.

En SC hubo un valor muy alto de fósforo según su textura (34 mg/kg), el cual tras la aplicación del tratamiento disminuyó a 20 mg/kg en SM, siendo aún un valor alto de fósforo para este tipo de suelo (Gonzales-Naranjo et al., 2010). La disminución se debe al consumo de fósforo por parte de las bacterias para desarrollar sus procesos metabólicos, ya que este elemento es indispensable para la formación de ATP (Adenosin trifosfato), o quizá debido a que parte del fósforo se pudo absorber en las sustancias húmicas adicionadas en forma de Leonardita. En SR la cantidad de fósforo fue muy alta 177 mg/kg este aumento se asocia a la elevada cantidad de P en el compostaje (358 mg/kg).

5.2. Tratamientos de biorremediación a escala de laboratorio

En esta fase del experimento se comprobó cual era la mejor concentración de Tween® 80 para ser aplicada posteriormente en la escala piloto. Para ello fue necesario la medición de diversas variables que permitieron escoger el tratamiento más adecuado

5.2.1. Respirimetría en los microcosmos

La respirometría es una medida indirecta de la degradación de un contaminante, debido a que la cantidad de dióxido de carbono producido es aproximadamente el 60 % (Ver Anexo D) de la cantidad de contaminante consumido por los microorganismos.

En la figura 11 se presenta la producción de CO_2 para cada uno de los tratamientos evaluados en función del tiempo.

Para determinar el mejor tratamiento se calculó la pendiente de cada una de las curvas cuyo significado permitía entender la cantidad de dióxido de carbono que se producía por día. Adicional a esto, se observó que la curva presentaba un comportamiento diferente en ciertos tramos, siendo más inclinada desde el día 0 al 16 y comportándose de manera más estable del día 16 en adelante. Esto se evidencia en un cambio abrupto de pendiente en los dos periodos de tiempo mencionados y dos mecanismos de reacción diferentes (Ver figura 11 y tabla 9). La línea roja denota el cambio de pendiente. A continuación se muestran las medias de las pendientes de cada tratamiento.

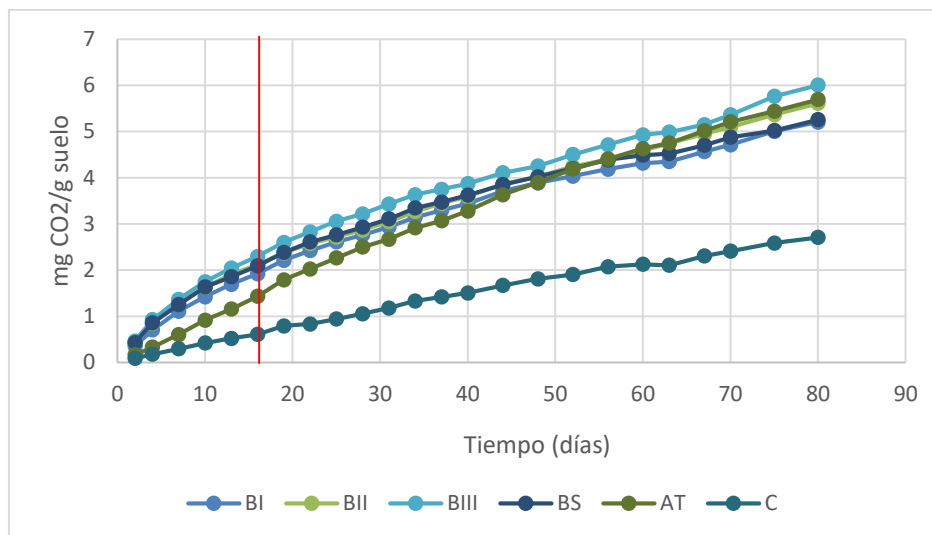


Figura 11. Respirometría de los microcosmos a lo largo del tratamiento.

Tabla 9. Cantidad de CO_2 producido por tratamiento

Tratamiento	Replicas	Producción media de CO_2 $\left(\frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}\right)$	
		Día 0-16	Día 17-80
BI	3	0.119	0.047
BII	3	0.131	0.052
BIII	3	0.141	0.053
BS	3	0.125	0.045
AT	3	0.087	0.051
C	3	0.037	0.032

De esta manera fue posible demostrar que la cinética de producción de CO_2 presenta dos comportamientos, en el primer lapso de tiempo, la pendiente de las curvas es aproximadamente dos veces la pendiente del segundo lapso de tiempo. Lo que sugiere la presencia de dos mecanismos de reacción, de orden uno y orden cero. Presentando una fase estacionaria tras los 16 días de tratamiento.

Por tanto, para la determinación del tratamiento que producía mayor cantidad de dióxido de carbono, se evaluó los dos lapsos de tiempo. Para ello se realizó un estudio estadístico implementando un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples para determinar si existía diferencia significativa entre estos y así comprobar cuál era el mejor:

Tabla 10. Análisis de Varianza (Día 0-16)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0222897	5	0.00445794	120.37	<0.0001
Error	0.000444413	12	0.0000370344		
Total	0.0227341	17			

Tabla 11. Análisis de Varianza (Día 17-80)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,000946423	5	0,000189285	31,28	<0.0001
Error	0,0000726133	12	0,000006051		
Total	0,00101904	17			

Los resultados obtenidos en la tabla 10 y 11, muestran que el valor de $F > 1$ y el valor bajo de p en los dos lapsos de tiempo ($p < 0.0001$), muestran que las aplicaciones de Tween® 80 producen un efecto en el aumento la producción de CO_2 en los diferentes tratamientos de biorremediación en un 60% aproximadamente, lo que indica que si existe diferencia significativa (valor $p < 0.0001$) entre las medias de los 6 tratamientos en ambos lapsos de tiempo, ver tabla 10 y 11.

Para corroborar esta hipótesis y establecer que tratamientos difieren entre sí, se realizó una prueba de comparaciones múltiples para ambos lapsos de tiempos utilizando la prueba de LSD de Fisher (Ver Tabla 12 y 13).

Tabla 12. Producción diaria de dióxido de carbono (Día 0-16) por Prueba de LSD de Fisher

Tratamientos	Medias $\left(\frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}\right)$	Agrupamiento LSD
BIII	0.141	A
BII	0.131	AB
BS	0.125	BC
BI	0.119	C
AT	0.087	D
C	0.037	E

Tabla 13. Producción diaria de dióxido de carbono (Día 17-80) por Prueba de LSD de Fisher

Tratamientos	Medias $\left(\frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}\right)$	Agrupamiento LSD
BIII	0.05297	A
BII	0.05263	A
AT	0.05167	A
BI	0.04707	B
BS	0.04583	B
C	0.032	C

Para el primer lapso de tiempo se observó que a pesar de que los tratamientos BII y BIII no presentaban diferencia significativa, ver tabla 12. Este último difiere de los demás tratamientos, ya que presenta una media de producción de dióxido de carbono superior a las demás. En el segundo lapso de tiempo, la producción de dióxido de carbono de este tratamiento (BIII) disminuyó a la mitad. Este tratamiento no presentó diferencia significativa con BII y AT, pero si con los demás tratamientos

Estudios realizados por Tahhan et al. (2011), muestran que a pesar de adicionar un consorcio bacteriano con cepas hidrocarburoclastas y nutrientes, a un suelo contaminado con un lodo de perforación con un 82 % de HTP, los niveles de producción de dióxido de carbono son bajos, 4 mg/g suelo a los 200 días de tratamiento. Pinto et al. (2007) analizó la ausencia y presencia de Tween® 80 en la producción de dióxido de carbono en un suelo contaminado con diésel, encontrando que la producción para el primer tratamiento (ausencia) era aproximadamente un 30% inferior a la obtenida en el segundo tratamiento (presencia).

En esta investigación la producción más alta de dióxido de carbono se obtuvo en el tratamiento BIII (1.5 g/L Tween® 80), registrando los valores de máxima producción de dióxido de carbono a los 80 días de tratamiento con un valor de 6 mg/g suelo. Estos valores son comparables con el estudio realizado por Pinto et al. (2007), quien evaluó la aplicación de nitrógeno, fósforo y 2.0 g/L de Tween® 80 como agentes estimulantes en el suelo, obteniendo una producción de dióxido de carbono de 4.84 mg/g suelo a los 55 días, superior en tan sólo un 3 % al valor encontrado en la presente investigación en el mismo lapso de tiempo. La concentración que se degrada en la investigación realizada por Pinto et al. (2007), fue de 5561 ppm, un 25% menos del valor de HTP encontrado en esta investigación. De acuerdo con lo anterior, el proceso de biodegradación para el microcosmos BIII fue altamente eficiente comparado con otros estudios previos. Esta eficiencia se le puede atribuir a la adición de Leonardita, propiciando un ambiente en el suelo que favorece las reacciones de biodegradación aumentando la rapidez y eficiencia de estas. Estudios realizados por Turgay et al. (2010) reportan que la degradación de hidrocarburos está ampliamente relacionada con la producción enzimática (ureasa, fosfatasa, deshidrogenasas) y que la aplicación de Leonardita mejora la producción de estas enzimas en un suelo contaminado con hidrocarburos.

5.2.2. Concentración remanente de HTP en los microcosmos

En la tabla 14 se muestran las concentraciones remanentes medias de HTP obtenidos en los 6 tratamientos de biorremediación.

Tabla 14. Concentración de HTP en los tratamientos evaluados

Tratamiento	Replicas	Concentración remanente de HTP [ppm]
BI	3	11000
BII	3	11600
BIII	3	10000
BS	3	10600
AT	3	17000
C	3	6300

Conociendo estos valores fue posible determinar el porcentaje de degradación obtenido en cada uno de los tratamientos. Este valor se calculó teniendo en cuenta los HTP presentes inicialmente en la muestra del suelo. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ degradación} = 100 - \left(\frac{HTP_i - HTP_f}{HTP_i} \times 100 \right) \text{ (Ecuación 9)}$$

En la Figura 12 se muestran los porcentajes de degradación obtenidos en cada tratamiento. El mayor porcentaje de degradación se obtuvo en el tratamiento control con un 69.69%, esto se debe a la concentración elevada de HCl (2M) que se adicionó para controlar el crecimiento microbiano. La concentración de HCl fue eficaz para evitar el crecimiento microbiano, generando al mismo tiempo una remoción de los hidrocarburos presentes en el suelo. Esto coincide con lo reportado por (Dike et al., 2013). El tratamiento de atenuación natural presentó un porcentaje de degradación del 23.44 %, estos valores son bajos en comparación con los tratamientos en los que se adicionaron nutrientes y agentes estimulantes, para los cuales el porcentaje de degradación fue aproximadamente de un 48% en promedio, aumentando en un 50% respecto a la atenuación natural. Para los tratamientos en los que se aplicó Tween® 80, nutrientes y Leonardita los porcentajes de remoción fueron similares, el tratamiento BIII con un porcentaje de degradación del 52% muestra un mejor comportamiento. Para el tratamiento BS al cual no se aplicó Tween® 80, este presentó un porcentaje de degradación del 48.9%, el cual es elevado en comparación con los tratamientos en los que se aplicó este surfactante.

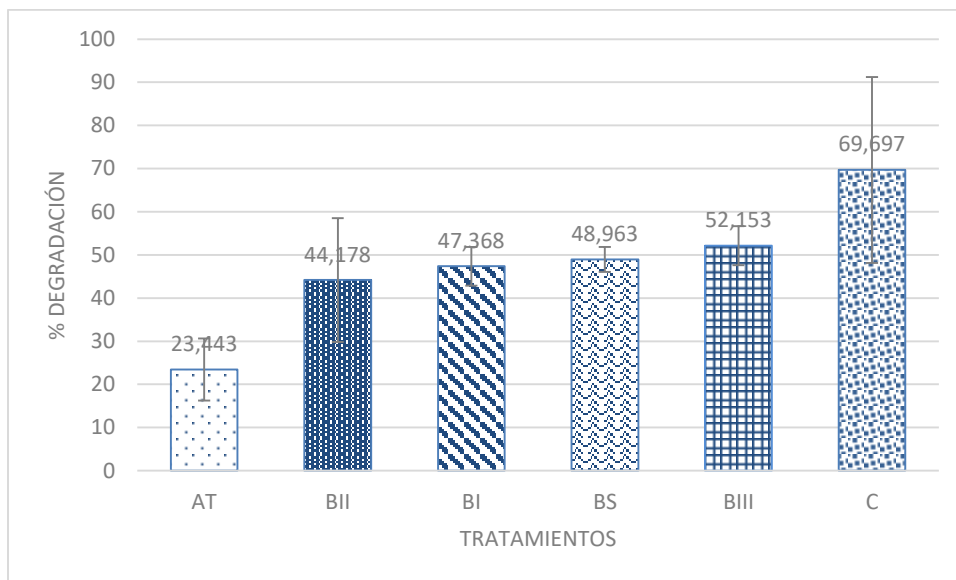


Figura 12. Porcentaje de degradación de HTP en los tratamientos evaluados

Debido a la cercanía de los datos en los tratamientos en estudio, fue necesario determinar si existía diferencia significativa entre estos para así poder determinar el mejor tratamiento.

Para ello, fue necesario realizar un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples mediante el test de LSD de Fisher (Ver tabla 15)

Tabla 15. Porcentaje de biodegradación aplicando prueba de LSD de Fisher

Tratamientos	Medias $\left(\frac{mg CO_2}{g\ suelo \cdot día}\right)$	Agrupamiento LSD
C	69.70	A
BIII	52.15	AB
BS	48.96	BC
BI	47.37	BC
BII	44.18	BC
AT	31.42	C

Así, se pudo corroborar que no existía diferencia significativa entre los 4 tratamientos en estudio (BS, BI, BII y BIII), por tanto la aplicación de Tween® 80 no ejerce un efecto significativo en la remoción de HTP según la prueba estadística aplicada. A pesar de ello, el valor más elevado de remoción de HTP exceptuando el Control fue BIII, cuya producción diaria de dióxido de carbono es superior con respecto a los demás tratamientos. De esta manera, BIII es la alternativa más adecuada para implementar un sistema de biorremediación a escala piloto.

El porcentajes de remoción para el mejor tratamiento es de 52.15%, este valor es similar al reportado por Pinto et al. (2007), para tratamiento con aplicación de nutrientes y Tween® 80, con un porcentaje de degradación de HTP del 40 %, un 12% menor a los resultados

de esta investigación. La molécula degradada en el estudio de Pinto et al. (2007) “diésel” es de menor complejidad respecto al petróleo crudo, lo cual sustenta la eficiencia del tratamiento aplicado en este estudio. Este porcentaje de biodegradación del contaminante se vio influenciado igualmente por la presencia de Leonardita, cuyo número de grupos funcionales de naturaleza reactiva, como hidroxilos, carbonilos y carboxilos; mejoran la eficiencia de la ruta biodegradativa del contaminante (Ver Anexo C).

Tahhan et al. (2011), reporta para un tratamiento con aplicación de nutrientes y un consorcio bacteriano, una tasa de remoción de hidrocarburos del 42% en un periodo de 80 días. Los valores obtenidos en el tratamiento BIII superan en un 10 % los valores de biodegradación encontrados en las investigaciones de Tahhan et al. (2011).

5.2.3. Variación pH en las microcosmos

La figura 13 muestra la variación del pH para cada uno de los tratamientos. En la etapa inicial, sin la aplicación de ningún aditivo, el pH del suelo tuvo un valor de 6.6. En la mayoría de los microcosmos el pH osciló entre 6.6 y 8.5, llegando a estabilizarse desde el día 50 hasta el final del experimento en un valor neutro cercano a 7. La única excepción se presentó en el tratamiento control, en el que el pH de 2.5 (ácido) en todo el transcurso del proceso, debido a la adición de una solución de HCl 2.0 M para evitar el crecimiento microbiano. Se presentó un incremento del pH en los tratamientos BS, BI, BII y BIII en la primera semana, debido al proceso de hidrólisis de la urea. De acuerdo con González et al. (2015), esto se debe a la acción de la enzima ureasa que genera un ambiente de basicidad alcanzando un valor de pH igual o superior a ocho (Hernan González Osorio, Siavosh Sadeghian Khalajabadi, Rubèn Dario Medina Rivera, 2015).

Para Pinto et al. (2007), en los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se puede observar un comportamiento del pH final entre 6.5 a 7.5, lo cual coincide con lo obtenido en el presente estudio. De acuerdo con Pawar (2015), los valores de pH determinan el éxito del proceso de biorremediación, pH entre 6.0 a 8.0 favorecen la mayoría de procesos involucrados en la biorremediación, siendo el pH de 7.5 el más adecuado, debido a que se favorece el incremento en la población bacteriana y mayores tasas de producción de ATP.

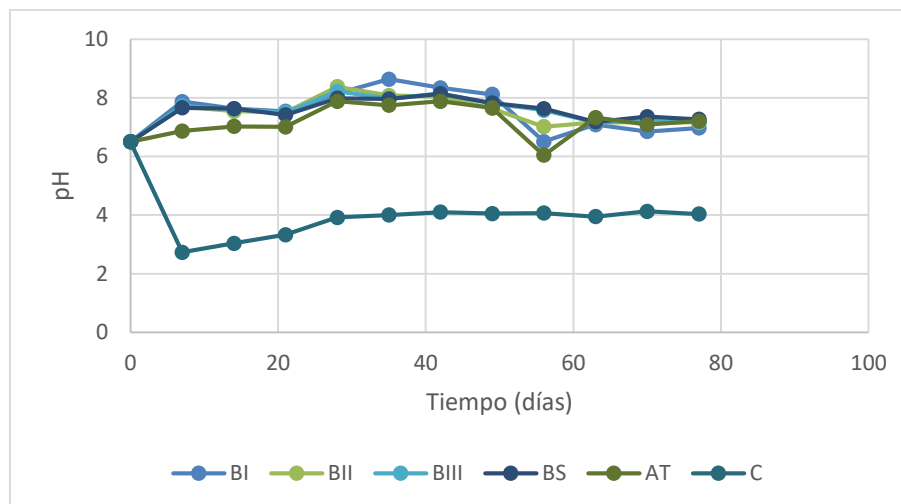


Figura 13. Variación del pH en los microcosmos

5.2.4. Caracterización microbiológica de los tratamientos

5.2.4.1. Caracterización del crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas

En las Figuras 14 y 15 se muestra el comportamiento para el crecimiento de las bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas a lo largo de los diferentes tratamientos.

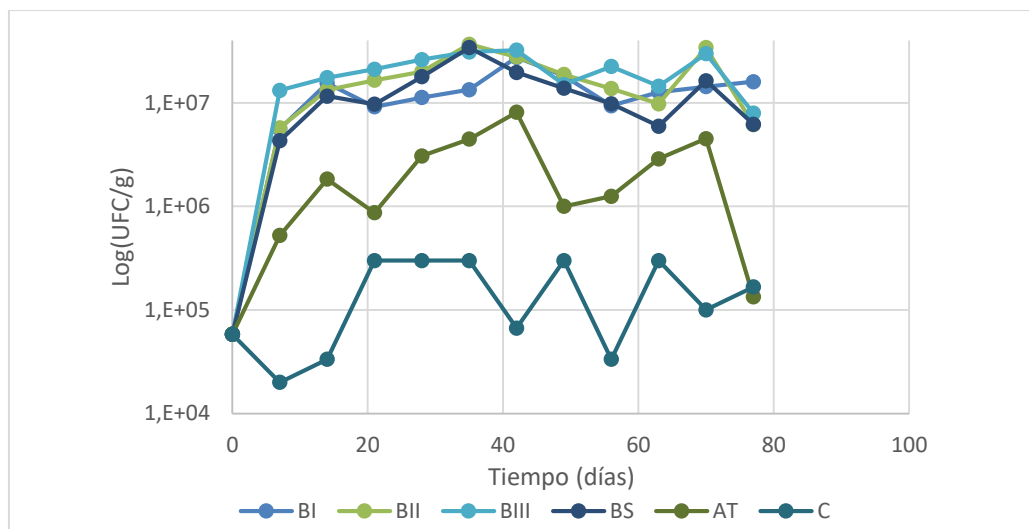


Figura 14. Crecimiento de bacterias heterótrofas en los tratamientos para los diferentes tratamientos para 80 días a 32°C.

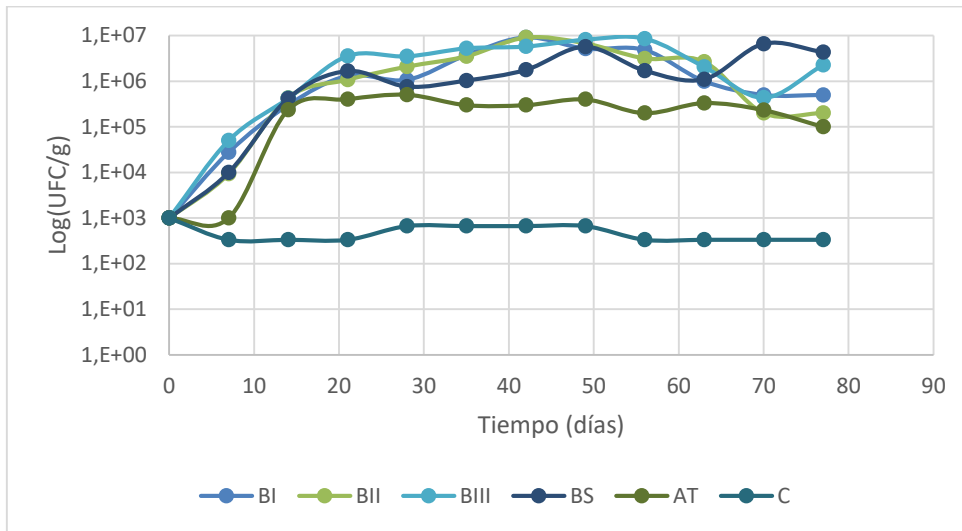


Figura 15. Crecimiento de bacterias hidrocarburoclastas para los diferentes tratamientos para 80 días a 32°C.

En todos los tratamientos se pueden observar 3 fases de crecimiento bacteriano: una fase exponencial (0-10 días), una fase estacionaria (10-65 días) y una fase de muerte celular (65-78 días). Esto coincide con Madigan et al. (2004), quien reporta la presencia de estas tres fases en el crecimiento bacteriano junto con una fase de adaptación la cual en el caso de estudio no se distingue con claridad.

Se presentó un crecimiento considerable de las bacterias heterótrofas en los microcosmos BI, BII, BIII y BS tras la primera semana de tratamiento, pasando de 5.8×10^4 UFC/g a aproximadamente 1.0×10^7 UFC/g. Este valor se mantuvo casi constante (con algunos crecimientos leves) hasta el día 35, momento en el cual comenzó la etapa de decrecimiento celular. Dicho comportamiento fue similar en el tratamiento de Atenuación Natural, salvo que el crecimiento bacteriano fue de un 86% menos respecto a los demás tratamientos. En el caso del tratamiento control se presentó una disminución considerable en la cantidad de UFC/g en los primeros 14 días para luego estabilizarse.

En el caso de las bacterias hidrocarburoclastas el comportamiento fue diferente, debido a que el medio de cultivo selectivo en el que crecieron las bacterias es más deficiente comparado con el medio nutritivo, por tanto la cantidad de UFC/g alcanzada en los primeros siete días en las bacterias heterótrofas se logró en las hidrocarburoclastas a los 40 días. En general, el comportamiento de las UFC/g en los tratamientos BI, BII, BIII y BS se mantuvo creciendo de forma acelerada en los primeros 20 días, para posteriormente estabilizarse entre el día 20 y 56, decreciendo hasta el día 80. En AT se presentó un incremento de las UFC/g a los 14 días, para luego mantenerse estable hasta el día 63 en el que se evidencia un leve decrecimiento hasta el día 80. Finalmente, en el tratamiento control se observó un descenso en el número de UFC/g desde los primeros días de tratamiento para luego mantenerse estable en el día 22 hasta el final del proceso. Los

valores de UFC/g en BI, BII, BIII y BS son de un 95% superior al tratamiento de AT. Confirma lo reportado por Jayashree et al. (2007), la aplicación de nutrientes y de agentes orgánicos como la leonardita y el Tween® 80 estimulan el crecimiento microbiano.

Entre los 4 tratamientos BI, BII, BIII y BS, el que produjo una mayor cantidad promedio de UFC/g tanto en las bacterias heterótrofas como en las hidrocarburoclastas fue BIII, manteniéndose siempre por encima de BII, BI y BS.

Los rangos y comportamiento de las UFC/g obtenidos en ambos medios de cultivo son semejantes con los encontrados en estudios previos. Es el caso del estudio realizado por Roy et al. (2014), quien biorremedió un suelo contaminado con petróleo, adicionando nutrientes y un inóculo de bacterias hidrocarburoclastas, obteniendo una producción de UFC para bacterias heterótrofas y bacterias hidrocarburoclastas de $1.2 \cdot 10^7$ y de $5.2 \cdot 10^{10}$, respectivamente. Para la presente investigación, la cantidad de bacterias heterótrofas fue superior a $3.4 \cdot 10^7$, respecto a los resultados de Roy et al. (2014). En el caso de las bacterias hidrocarburoclastas fue inferior a lo reportado por Roy en casi 3 unidades logarítmicas. Este incremento fue causado por la concentración tan elevada de inóculo bacteriano de cepas hidrocarburoclastas aplicado a los tratamientos ($4.7 \cdot 10^{13}$) en el trabajo de Roy et al. (2014).

Existe una relación directa entre el crecimiento bacteriano y la producción de dióxido de carbono en los microcosmos, debido a que tanto el pico de crecimiento bacteriano como el de la producción de dióxido de carbono se obtuvo en los primeros 20 días de tratamiento, periodo en el cual se genera el consumo de hidrocarburos con mayor biodisponibilidad en la matriz del suelo (Prada, 2016; Sayara, Sarrà, & Sánchez, 2009). Posteriormente, comenzó una fase estacionaria en la cual el crecimiento bacteriano se mantuvo constante y la producción de dióxido de carbono disminuyó notablemente, producto de la poca biodisponibilidad del contaminante para ser consumido por las bacterias. Para mejorar el proceso de biorremediación, es necesario mantener el metabolismo bacteriano activo, como en los primeros 20 días de tratamiento (Prada, 2016; Sayara et al., 2009). Se hace necesario adicionar co-sustratos en lapsos específicos de tiempo para garantizar que la curva de crecimiento bacteriano y la tasa de producción de dióxido de carbono se encuentre siempre en fase exponencial, para así lograr un porcentaje elevado de remoción del contaminante en menos tiempo (Prada, 2016; Sayara et al., 2009).

5.2.4.2. Caracterización molecular de las bacterias

En todos los tratamientos aplicados excepto el control y la atenuación natural, se seleccionaron aislados con características morfológicas diferentes, tanto en el medio selectivo como en el nutritivo. Se obtuvieron 4 aislados del medio nutritivo (A, B, C, E) y 3 aislados del medio selectivo (F, G, H). Estos aislamientos se realizaron en la mitad del tratamiento de biorremediación de los microcosmos, momento en el cual las bacterias presentaban un comportamiento estable de crecimiento. En el anexo D se observan los aislados con características morfológicas diferentes.

Tras realizar la extracción de ADN de los aislados, su amplificación exitosa del gen ARNr 16S, la secuenciación y comparación con secuencias de bancos de datos, se realizó un dendograma, que muestra la relación entre los géneros obtenidos, teniendo la formación de dos clusters muy relacionados (Ver figura 16). Los aislados fueron predominantemente de la familia Bacillaceae (Tabla 16), sin embargo, otras cepas identificadas pertenecen a los géneros *Brevundimonas* y *Staphylococcus* (ver tabla 16). En el género *Bacillus*, han encontrado bacterias que producen biosurfactantes capaces de mejorar la biodisponibilidad del contaminante y acelerar el proceso de biorremediación (ver tabla 16). Estas bacterias son capaces de tolerar altas concentraciones de hidrocarburos y sus derivados. En cuanto a los aislados F y H a pesar de no pertenecen al género *Bacillus*, han sido descritas como altamente tolerantes a ambientes contaminados con petróleo crudo y actividad biodegradativa de HAP respectivamente (ver tabla 16).

Tabla 16. Identificación taxonómica de bacterias aisladas de suelos identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S

Código aislado	Organismo relacionado/ No de acceso Gen Bank	% Similitud	Tamaño de secuencia	Actividad	Referencia
SecA	<i>Bacillus siamensis</i> strain PD-A10/ NR_117274.1	96	1380 pb	Producción de biosurfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos	(Varadavenkatesan & Murty, 2013)
SecB	<i>Bacillus pseudomycooides</i> / NR_113991	96	1467 pb	Cepa encontrada en el medio ambiente	(Nanclares, 2016)
SecC	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K/ NR_118439	92	1509 pb	Cepa aislada de sedimentos de aceite crudo	(Mansur, 2015)
SecE	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579/ NR_074540	98	1406 pb	Producción de biosurfactantes y actividad biodegradativa de hidrocarburos	(Borah & Yadav, 2016)
SecF	<i>Brevundimonas olei</i> strain MJ15/ NR_117268	96	1339 pb	Cepa aislada en sector contaminado con petróleo crudo	(M. Lee, Srinivasan, & Kim, 2010)
SecG	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792/ NR_114581	97	1417 pb	Potencial biodegradadora de crudo ligero	(Thamer et al., 2013)
SecH	<i>Staphylococcus warneri</i> strain AW 25/ NR_025922	98	1403 pb	Biodegradación de HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos)	(Moscoso, Teijiz, Deive, & Sanromán, 2012)

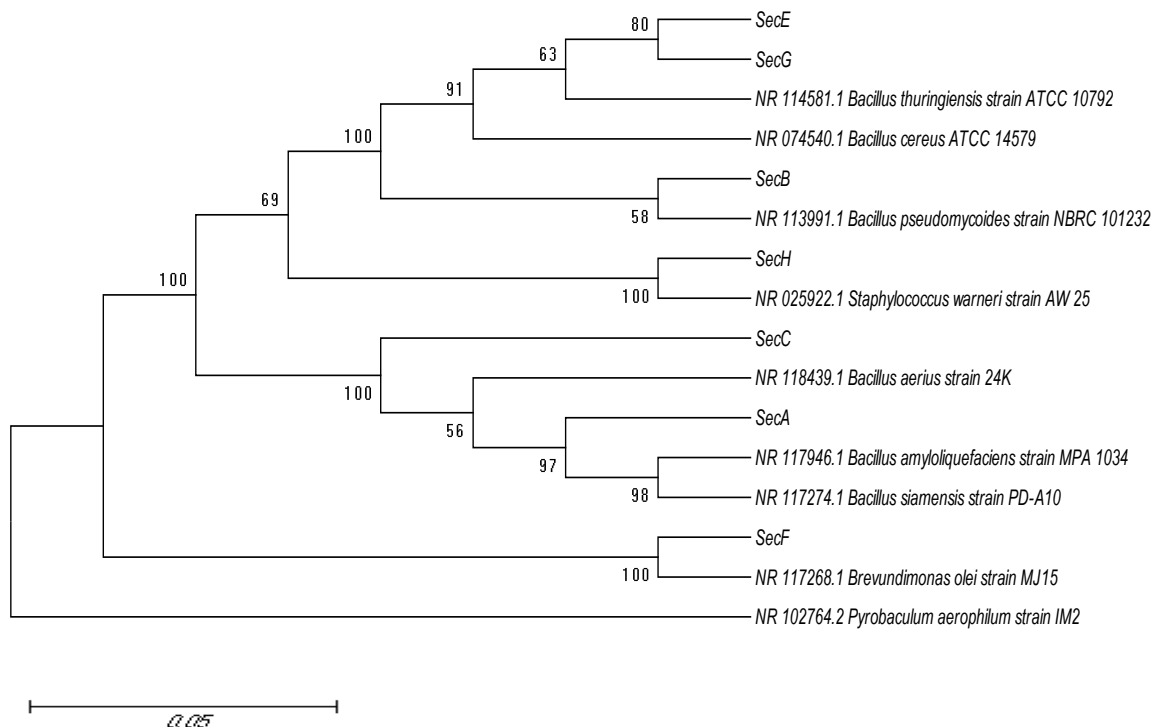


Figura 16. Análisis filogenético basado en secuencias de genes 16S rRNA, de aislados de suelo con secuencias de referencia. El árbol fue producido por el método de Neighbor-Joining con 1000 repeticiones modelo Tamura 3 parámetros teniendo en cuenta la distribución Gamma con 5 tasas de categoría, mediante el software Mega 6.0.

Las cepas encontradas en este estudio hacen parte del ecosistema del suelo contaminado, las cuales han sufrido un proceso de adaptación y han sobrevivido a niveles tan altos de contaminación. Cabe resaltar la importancia de conocer el tipo de bacterias presentes en el suelo, ya que con esta información, es posible conocer de una manera más precisa el proceso que se desarrolla en el suelo y las posibles rutas degradativas que llevan a cabo estas bacterias por medio de su metabolismo. Además, el conocimiento de estas cepas, dominantes en este ecosistema, puede servir para realizar procesos de bioaumentación en sitios donde la población bacteriana es escasa.

5.3. Montaje reactor de lecho estático.

Tras los resultados obtenidos en los microcosmos, se seleccionó el tratamiento a ser llevado a escala piloto: BIII. Esta decisión fue tomada analizando los resultados encontrados en cada una de las variables medidas en estos experimentos.

Dentro de los análisis se encontró que el tratamiento requería un cosustrato adicional para que la cinética biodegradativa se mantuviera ascendente en el tiempo, garantizando así una mayor cantidad de contaminante biodegradado. Esto se debe a que las bacterias

requieren un estímulo primario proveniente de una fuente de carbono fácilmente asimilable para comenzar su metabolismo.

Según la cinética de producción de dióxido de carbono encontrada en BIII, en el día 16 la curva disminuía su pendiente en casi un 60% hasta el día 80. Esta disminución se debe a la falta de estímulo generado hacia las bacterias, por ello se adicionó melaza como fuente primaria de carbono cada 15 días en el transcurso del tratamiento en el reactor, para garantizar que el metabolismo bacteriano se mantuviera activo. La melaza adicionada se calculó teniendo en cuenta la cantidad de contaminante que se degradaba en el tiempo; este valor se determinó mediante la pendiente de producción de dióxido de carbono en el lapso de 0 a 16 días.

5.3.1. Respirometría en el reactor

En la figura 17 se observa la producción de dióxido de carbono en el reactor en el tiempo. Cabe mencionar que cada punto corresponde a un promedio de los cinco puntos muestreados en el reactor. El comportamiento de la curva sugiere que en el periodo de tratamiento la producción de dióxido de carbono no mantuvo una cinética constante, si no que cambio en distintos momentos del proceso. De esta manera se determinaron cinco mecanismos de reacción diferentes (A, B, C, D, E) que explican el comportamiento del metabolismo microbiano teniendo en cuenta las nuevas condiciones a las que fue sometido el reactor. Cabe resaltar que en los días 15,30 y 45 se adicionó la melaza (cosustrato) para acelerar el metabolismo microbiano.

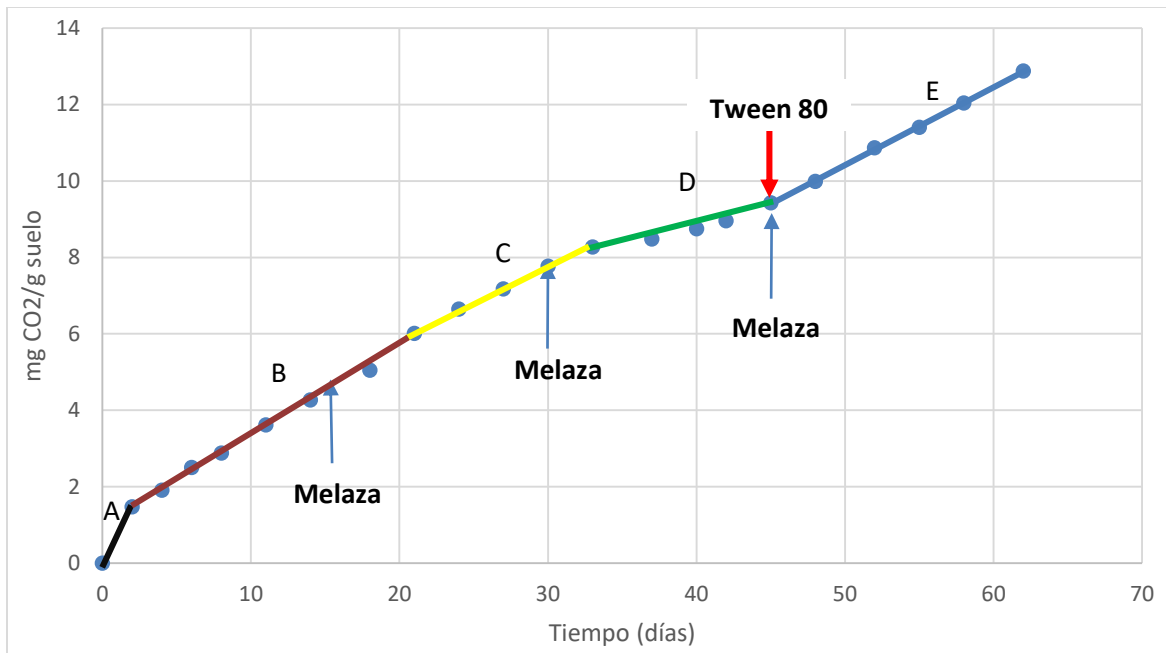


Figura 17. Producción de dióxido de carbono vs tiempo

En la tabla 17 se presentan la variación de la producción de dióxido de carbono a lo largo del tratamiento.

Tabla 17. Cantidad de dióxido de carbono producido en el reactor

Producción Media de dióxido de carbono		
Sigla	Intervalo de Tiempo (Días)	Cantidad ($\frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}$)
A	[0-2]	0.74
B	(2-21]	0.23
C	(21-33]	0.19
D	(33-45]	0.07
E	(45-62]	0.20

De estos datos se puede interpretar, que la producción de dióxido de carbono aumento drásticamente en los primeros días de tratamiento, alcanzando la producción más alta ($0.74 \frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}$) en el intervalo de tiempo A. Tras culminar este intervalo, la producción de CO_2 disminuyó en casi un 70% ($0.23 \frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}$) en el intervalo de tiempo B; manteniendo una tendencia casi constante, hasta el día 33 en el que hubo un descenso marcado alcanzando $0.07 \frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}$ en el intervalo de tiempo D. Por esta razón, se añadió junto con la melaza una dosis adicional de Tween® 80 (1.5 g/L) para lograr desorber y biodisponer la mayor cantidad de crudo en la matriz del suelo. Esta adición se reflejó en el aumento de la producción de dióxido de carbono en casi un 60% en el día 45 ($0.20 \frac{mg\ CO_2}{g\ suelo \cdot día}$) manteniéndose está pendiente por un lapso de 17 días.

5.3.2. Tasa de remoción hidrocarburos totales del petróleo en el reactor

La lectura de remoción de hidrocarburos totales, se determinó en 5 momentos durante el tratamiento. En el tiempo cero, a los 15, 30,45 y 60 días de tratamiento. A continuación, se muestra en la gráfica 18 la cinética de degradación residual de HTP, la cual presenta dos mecanismos de reacción delimitados por la línea roja.

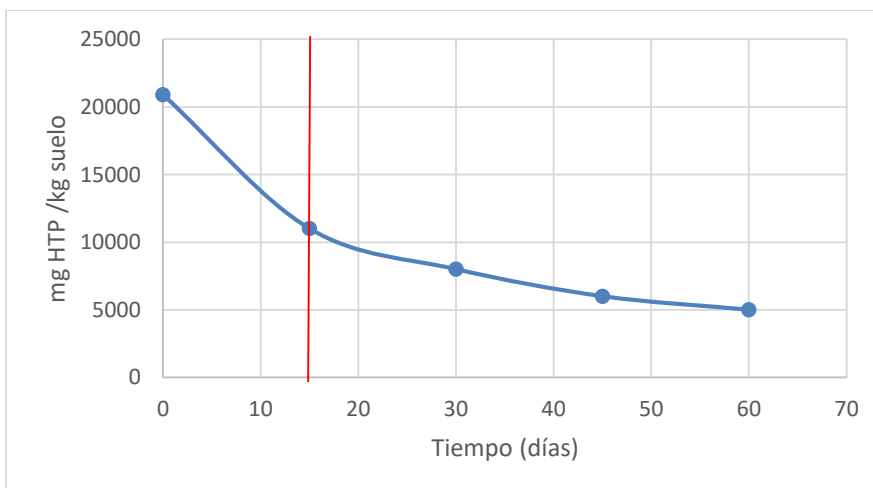


Figura 18. Remoción de HTP vs tiempo.

Se observa que la cantidad inicial de HTP disminuyó a casi un 53% en tan sólo 15 días, igualando el valor obtenido en los microcosmos a los 80 días de tratamiento. Luego de este periodo, la cantidad de HTP residual disminuye en una proporción menor comparada con los primeros quince días. Al final del tratamiento se obtuvo una remoción del 76 % de los HTP residuales.

La remoción obtenida es comparable con el estudio realizado por Sayara et al. 2010, en el que se adicionó una relación 1:1 de compost a un suelo contaminado con HAPs en diferentes estadios de estabilización del compost. En él, se comprobó que entre mayor sea el grado de estabilización del compost mejores son las tasas de degradación obtenidas de este tipo de contaminantes, lográndose un porcentaje de remoción de hasta un 92% de HAPs en tan solo 30 días. Esto demuestra que el estudio realizado en esta investigación, presenta un porcentaje alto de degradación (76%) debido a que solamente se adicionó el 20% de compost al suelo contaminado comparado con un 50% de compost adicionado en el estudio de Sayara et al. Cabe aclarar que el compost utilizado en este estudio estaba estabilizado, por un proceso de maduración superior a 3 meses.

Para determinar la tasa de remoción de los HTP fue necesario calcular la pendiente de la gráfica $\ln [C/C_0]$ vs tiempo en diferentes intervalos de tiempo en el tratamiento, debido a que la cinética de remoción no es la misma en todo el proceso (Ver Figura 18). Los datos se listan en la tabla 18.

Tabla 18. Valor k en diferentes intervalos en el reactor

Intervalo de tiempo	Tasa remoción (k) [día ⁻¹]
[0-15]	-0.040
(15-45]	-0.017

Con esto valores es posible determinar la vida media del contaminante calculada mediante la ecuación 6. Por tanto, se obtienen dos valores para $t_{1/2}$, 17 días para el primer intervalo y 34 días para el segundo intervalo de tiempo.

La mitad del contaminante se degrada a los 17 días para el primer intervalo bajando de 20900 ppm a 11000 ppm, y a los 34 días para el segundo intervalo bajando de 11000 ppm a 5000 ppm.

El segundo valor del tiempo de vida media es superior al primero, debido a que en este lapso de tiempo la biodisponibilidad del contaminante disminuye, evitando que las bacterias puedan consumirlo con facilidad. La aplicación de Tween® 80 en este periodo de tiempo permite aumentar la biodisponibilidad del contaminante y lograr así, mejores resultados.

5.3.3. Variación pH en el reactor

En la figura 19 se muestra la variación del pH vs el tiempo de tratamiento

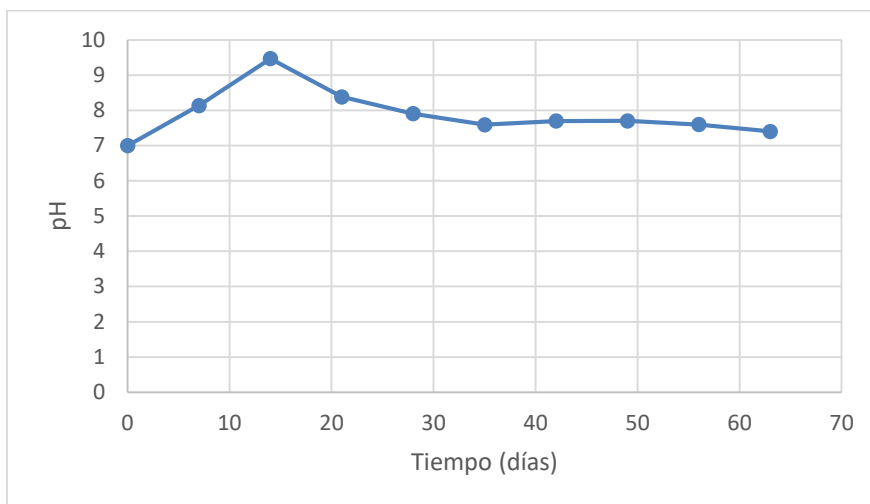


Figura 19. Variación del pH a los largo del tratamiento

Al igual que en los microcosmos el pH presentó un incremento en los primeros días de tratamiento producto de la hidrólisis de la urea, para luego mantener un valor relativamente constante hasta el final del tratamiento, alcanzando un valor de 7.5. En el estudio realizado por Pawar (2015) éste valor de pH fue el más adecuado para la biodegradación de HAPs presentes en un suelo contaminado por este tipo de hidrocarburos, debido a que se presentó la mayor cantidad de producción bacteriana y así mismo la mayor tasa degradativa del contaminante, logrando una porcentaje de degradación del 50% en tan sólo 4 días de tratamiento.

5.3.4. Caracterización microbiológica en el reactor

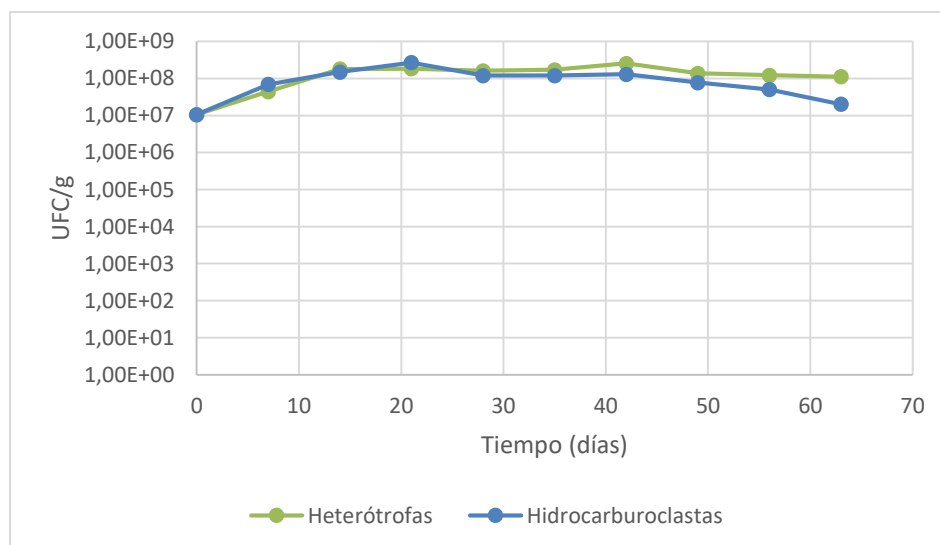


Figura 20. Crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas en el reactor

Tanto las bacterias heterótrofas como en las hidrocarburoclastas se observó una cantidad elevada de UFC/g desde el inicio del tratamiento, alcanzando el objetivo propuesto relacionado con la adición de un 20% de compost, el cual ayudó a incrementar la cantidad de bacterias desde el inicio del tratamiento en 3 unidades logarítmicas en promedio. Los dos tipos de bacterias presentaron un aumento de una unidad logarítmica hasta el día 20, en el que se evidenció la máxima cantidad de UFC/g en el reactor $11 \times 10^8 \text{ UFC/g}$. Este valor de UFC/g se relaciona con la cantidad de dióxido de carbono producido en el intervalo de tiempo A y B ([0-2] y (2-21)) en donde se obtuvieron las máximas tasas de producción de CO_2 alcanzando valores de 0.74 y 0.23 $\left(\frac{\text{mg CO}_2}{\text{g suelo} \cdot \text{día}}\right)$. Además, fue en este mismo intervalo en que se obtuvo la máxima remoción de HTP en el reactor (53%).

5.3.5. Variación Temperatura interna y externa en el reactor

La temperatura del reactor fue en promedio de 20°C, un poco menor comparada con la del ambiente (23°C). Según el diseño del proceso, se esperaba un aumento en la temperatura del reactor, pero esto no sucedió, debido a que los reportes en los que se ha estudiado este tipo de reactores tratan o transforman materiales orgánicos de desecho, que presentan mayor disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente asimilables, produciendo un proceso de fermentación en el que el interior del reactor aumenta drásticamente su temperatura llegando a alcanzar los 60 °C (Barrington et al., 2003; S. Yu et al., 2009) .El contaminante que se trató en este estudio fue un hidrocarburo de difícil asimilación, por tanto el proceso de descomposición del mismo es diferente comparado con las fuentes de carbono presentes en los residuos orgánicos. En la gráfica 21 se muestra la variación de la temperatura en el reactor y en el ambiente circundante a lo largo del proceso.

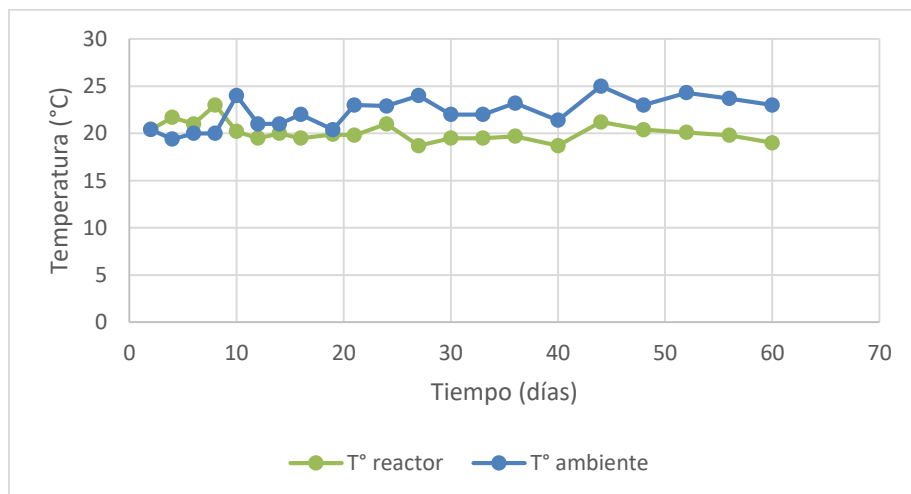


Figura 21. Temperatura vs tiempo dentro y fuera del reactor

5.3.6. Variación de la Humedad interna y externa en el reactor

La humedad en el ambiente fluctuó mucho en el tiempo alcanzando valores máximos en promedio de 80%. Y mínimos de 60%, este es un parámetro difícil de controlar ya que no se contaba con un cuarto aislado en el que se pudiera suministrar una humedad constante. La humedad interna en el reactor se mantuvo relativamente constante (30%) a lo largo del tratamiento, y monitoreada de manera continúa. Lo cual garantiza un proceso de biorremediación efectivo para la transferencia de oxígeno y la disolución de los nutrientes como Cho et al., (2000)

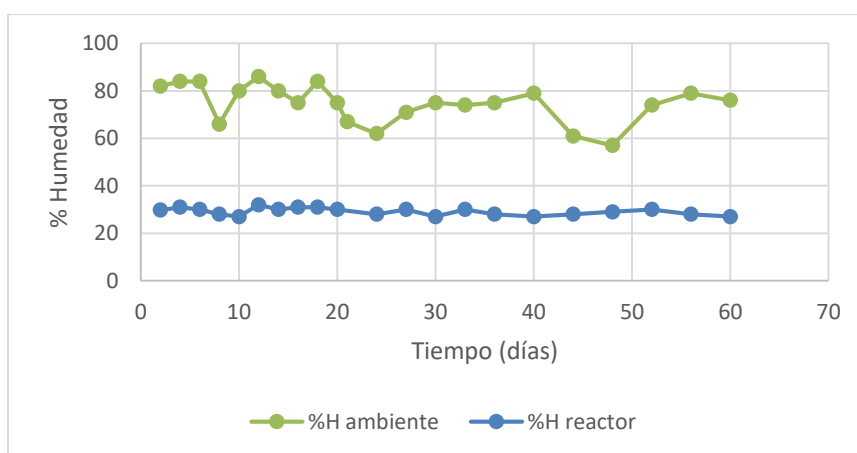


Figura 22. Porcentaje de Humedad vs tiempo dentro y fuera del reactor

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

Los porcentajes de degradación obtenidos en esta investigación evidencian la eficiencia del sistema de bioestimulación evaluado en la biorremediación en un suelo contaminado con petróleo crudo. La bioestimulación con Tween® 80 y Leonardita, constituye un método de biorremediación adecuado para el tratamiento de suelos impactados con derrames de hidrocarburos.

La caracterización fisicoquímica del suelo antes y después del tratamiento permitió establecer el efecto positivo de la aplicación de este tipo de tratamientos en las propiedades del suelo. Por tanto, el tratamiento es efectivo para disminuir la carga contaminante de un suelo y permite lograr características fisicoquímicas adecuadas, mejorando así su uso potencial a largo plazo.

La concentración de Leonardita aplicada generó un efecto positivo en los tratamientos, mejorando la porosidad del suelo y contribuyendo con sus grupos funcionales en los procesos metabólicos de los microorganismos.

La aplicación de Tween® 80 en los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, es un factor determinante para la producción de dióxido de carbono, por tanto se puede concluir que la aplicación de este surfactante sí ejerce un efecto significativo en la producción de dióxido de carbono, siendo conveniente la aplicación de Tween® 80 superior a los 0.075 g/L.

Dentro de las variables evaluadas en todo el proceso, la respirometría fue fundamental, debido a que con ella fue posible entender el comportamiento del sistema en cuanto a adición de cosustratos y bioestimulantes como el Tween 80.

En cuanto a la caracterización de las bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas en los microcosmos a escala de laboratorio, se evidenció un crecimiento elevado de estas posterior a la aplicación de los tratamientos. Este pico de crecimiento se relaciona con la máxima tasa de producción de dióxido de carbono en los primeros 16 días. Por tanto a mayor cantidad de bacterias, mayor producción de dióxido de carbono, el cual equivale al 60% del contaminante degradado.

Mediante la caracterización molecular de las bacterias que presentaban morfotipos diferentes en los microcosmos, fue posible comprobar que el ecosistema bacteriano dominante en este suelo había evolucionado para subsistir en ambientes con un alto grado

de contaminación y utilizar este compuesto como fuente de carbono, mediante el desarrollo de estrategias de adaptación

Finalmente, el diseño del reactor aplicado en este proceso demostró que la aireación pasiva junto con los bioestimuladores evaluados (leonardita, Tween 80 y compostaje) es una técnica eficiente y económica para descontaminar suelos impactados por derrames de hidrocarburo, logrando reducir hasta en un 70% la concentración de HTP en tan solo 2 meses.

6.2. Recomendaciones

Se sugiere en experimentos futuros evaluar diferentes cantidades de Leonardita en los tratamientos, y así determinar una dosis óptima de la misma que genere un efecto significativo tanto en la degradación del contaminante como en las características fisicoquímicas del suelo.

Conociendo que en la microbiota autóctona del suelo hay presencia de bacterias potenciales productoras de biosurfactantes, se recomienda estudiarlas, determinando su eficiencia en la mejora de los procesos degradativos de contaminantes que se adicionan fuertemente a la matriz del suelo.

Con el fin de entender y conocer el ecosistema completo de este tipo de procesos, sería necesario en futuras investigaciones realizar un análisis de la microbiota total por métodos de secuenciación masiva, estudiando las varianzas en la biodiversidad a través del tiempo del proceso de biorremediación.

Se sugiere para futuras experimentaciones, mejorar las condiciones en el reactor de lecho estático, brindando una atmosfera y temperatura constante que no dependa de las condiciones climáticas externas, permitiendo así que el proceso se pueda desarrollar de una forma más eficiente.

Es recomendable probar este tipo de protocolo de bioestimulación en suelos afectados con altos niveles de contaminación, no solo con hidrocarburos si no también con otro tipo de compuesto tóxicos como pesticidas.

En futuros ensayos, estudiar el potencial del suelo tratado, comprobando si es apto para el cultivo de especies vegetales. Esto junto con bioensayos de toxicidad para garantizar que el poco contaminante remanente no se bioacumula en los organismos.

A. Anexo: Muestreo del suelo

- **Caracterización sector de muestreo**

El sector escogido para la realización del muestreo del suelo, se encuentra en el municipio del Valle del Guamuez en el departamento del Putumayo, ubicado en el piso térmico cálido localizado entre los 0 y 1000 msnm, con temperaturas medias anuales superiores a 24 °C (Ver Figura 23).

Los suelos de la zona se caracterizan por desarrollarse a partir de depósitos aluviales heterogéneos y cenizas volcánicas; son bien drenados; de textura franco arenosa, muy superficiales y pertenecientes al periodo cuaternario (Servicio Geológico Colombiano, 2015). La geomorfología característica en el punto de muestreo es la de una terraza aluvial (IGAC, 2014).

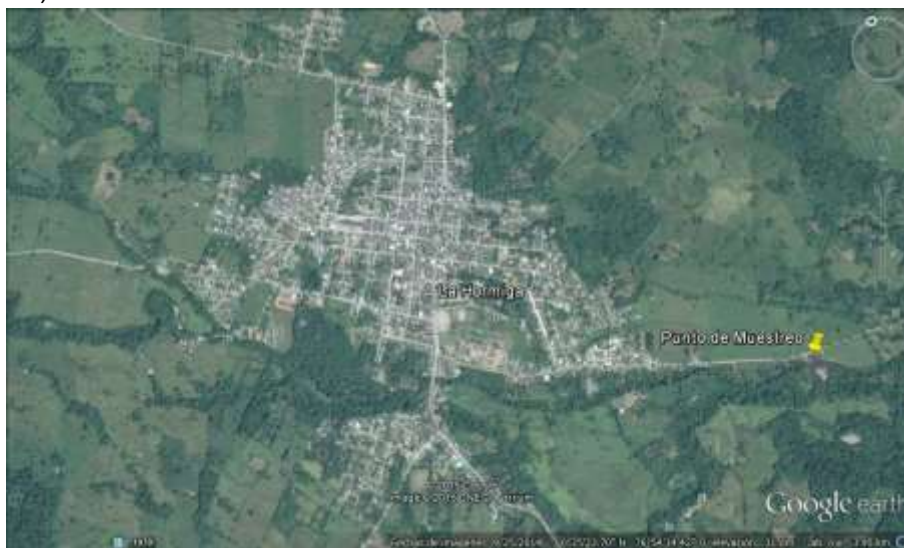


Figura 23. Municipio de la Hormiga

Este municipio es atravesado por el segmento del oleoducto transandino conocido como oleoducto Oso en dirección sur –norte, el cual transporta el crudo hacia el municipio de Orito. La válvula de bombeo ubicada en la latitud: 0°24'53.75"N y longitud: 76°53'31.05"O está asociada a este oleoducto y ha sido blanco en numerosas ocasiones de ataques terroristas debido a su ubicación estratégica y al alto flujo de hidrocarburo que bombea. Dicha válvula se encuentra ubicada a 9 metros de la quebrada la hormiga y a 60 metros de una vivienda habitada (Ver Figura 24).



Figura 24. Sector muestreo del suelo

Se determinó la zona de influencia directa de los derrames de crudo la cual tiene un perímetro y área aproximados de 170,48 m y 3882 m² respectivamente. La zona de influencia indirecta es de aproximadamente 1 Km quebrada abajo.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el muestreo se llevó a cabo en la zona de influencia directa ubicada en latitud: 0°24'53.74"N y longitud: 76°53'30.64"O (Ver Figura 25). Este predio le pertenece a una persona natural, la cual autorizó la toma de las muestras.





Figura 25. Sector muestreo registro fotográfico

- **Proceso de muestreo**

Como primera instancia, se realizó un muestreo aleatorio en el sector descrito para determinar los puntos que presentaban mayor afectación. Así se comenzó descapotando el material vegetal en los puntos escogidos para efectuar el muestreo (Figura 26a).

Se observó que en los puntos más próximos a la válvula, la afectación en el suelo era mayor debido a que el crudo había descendido 40 cm en el suelo (Figura 26b) mientras que los puntos más alejados a la válvula en dirección Este presentaban una afectación superficial de solo 7 cm (Figura 26c).

Por tanto se decidió tomar las muestras en el sector más cercano a la válvula, muestreando los primeros 40 cm de suelo que presentaban altos niveles de contaminación (Figura 26b). Aunque se recomienda que el muestreo de un sitio contaminado debe hacerse a 40 cm por debajo de la superficie del suelo (USEPA, 1991), las herramientas con las que se contaba para el muestreo impidieron realizar dicha labor debido a la presencia de rocas aluviales por debajo de los 50 cm de la superficie del suelo (Ver Figura 26d).

En total se recolectaron 400 kg de suelo que posteriormente fueron conducidos a la ciudad de Medellín.



Figura 26. Registro fotográfico proceso de muestreo

B. Anexo: Determinación fórmula molecular petróleo crudo

- **Determinación de hidrocarburos petrogénicos en el suelo**

Las muestras de suelo se llevaron al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín para ser analizadas en cuanto a su contenido de hidrocarburos totales del petróleo. A continuación se evidencian los resultados obtenidos mediante la prueba de Soxhlet de cada una de las muestras de suelo y el Cromatograma de Masas del suelo contaminado.

En este estudio se determinó la cantidad de HTP presentes en la muestra de suelo contaminado tanto de tipo biogénico como petrogénico. Para el proceso de biorremediación aplicado, el interés principal radica en tratar los hidrocarburos de tipo petrogénico, por tanto se estableció un valor aproximado de los hidrocarburos biogénicos presentes en la muestra de suelo. Este valor se obtuvo de un análisis de hidrocarburos realizado a una muestra de suelo no contaminada, tomada cerca al sector del impacto quebrada arriba. A continuación se muestran los valores obtenidos en las dos muestras de suelo:

Tabla 19. Porcentaje de HTP en suelo sin contaminar y contaminado

Tipo de suelo	Unidades	Valor
Suelo contaminado	%	2.12
Suelo sin contaminar	%	0.03

De esta manera fue posible calcular el valor aproximado de la concentración de hidrocarburos petrogénicos presentes en el suelo a biorremediar, teniendo en cuenta la Ecuación 10.

$$HTP_{petrógenicos-SC} = HTP_{SC} - HTP_{SSC} \text{ (Ecuación 10)}$$

$$HTP_{petrógenicos-SC} = 2.12\% - 0.03\% = 2.09\% \text{ HTP}$$

- **Determinación fórmula del petróleo crudo**

Conociendo el valor aproximado de la concentración de hidrocarburos petrogénicos presentes en el suelo contaminado, se requiere conocer una fórmula estimativa del crudo. Debido a que dentro del petróleo crudo es posible encontrar un sin número de hidrocarburos, es necesario calcular un promedio de ellos para encontrar una fórmula molecular aproximado del mismo. Este proceso se llevó a cabo según lo establecido en Agudelo 2009.

Para ello fue necesario realizar un estudio cualitativo por cromatografía de gases con detector Selectivo de masas GC-MS. Este estudio reveló los hidrocarburos característicos

presentes en la muestra de suelo. En general, se encontró hidrocarburos alifáticos de cadena larga, con una estructura de entre 12 y 40 carbonos.

Se analizaron los picos más significativos y los compuestos que presentaban un porcentaje de compatibilidad superior al 94%.

A continuación se evidencia los hidrocarburos escogidos:

Tabla 20. Hidrocarburos con mayor compatibilidad en el cromatograma del suelo contaminado

Nombre hidrocarburo	Formula	Porcentaje compatibilidad en cromatograma (%)
Hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil-	$C_{20}H_{42}$	95
Heptadecano	$C_{17}H_{36}$	94
Pentadecano, 2,6,10,14-tetrametil	$C_{19}H_{38}$	96
Nonadecano	$C_{16}H_{34}$	98
Eicosano	$C_{20}H_{42}$	96
Docosano	$C_{22}H_{46}$	98
Heptacosano, 1-cloro	$C_{27}H_{55}Cl$	97

De esta manera se realizó un promedio simple entre los carbonos e hidrógenos presentes en las moléculas de los hidrocarburos escogidos. Finalmente se obtuvo una formula molecular tentativa para el petróleo crudo en estudio: **C₂₁H₄₃**.

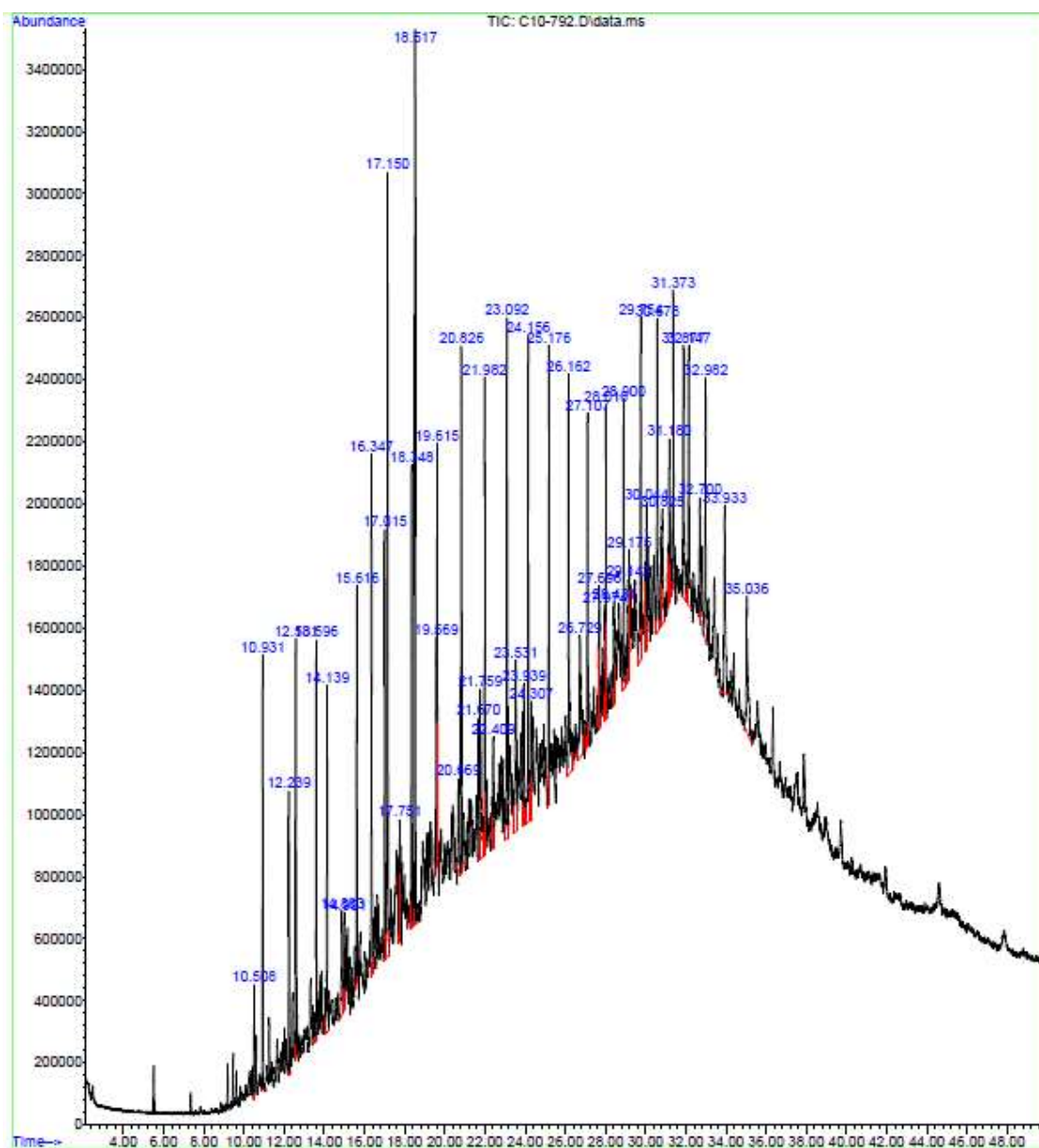
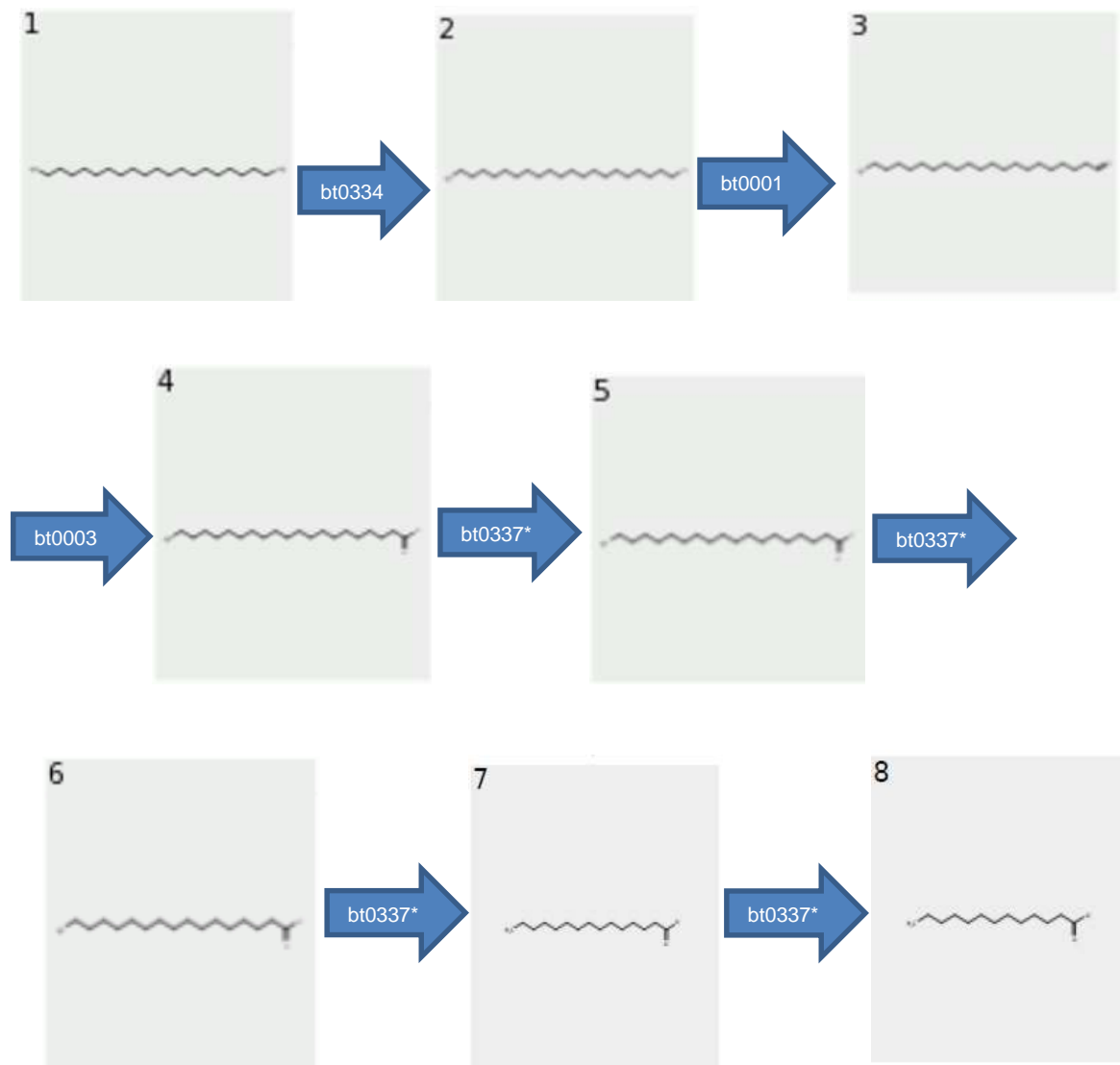
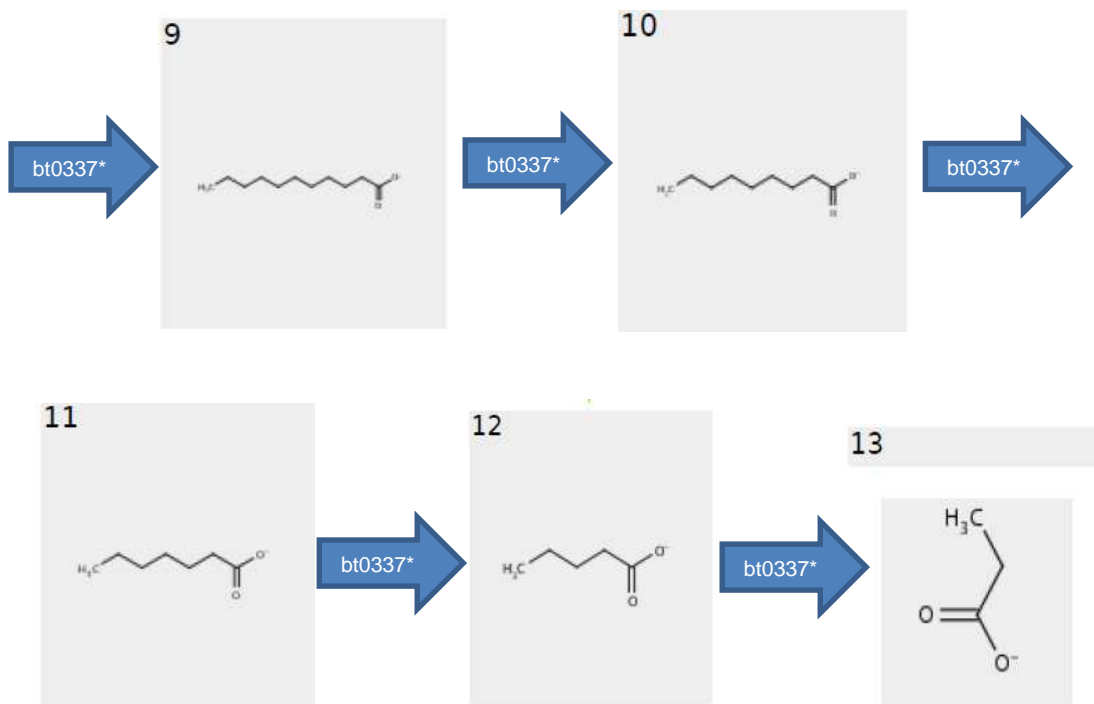


Figura 27. Espectro cromatografía de gases-masas del suelo contaminado inicial

C. Anexo: Ruta degradativa del contaminante

Esta ruta degradativa fue obtenida en la base de datos de biocatálisis y biodegradación de la Universidad de Minnesota (Minnesota, 1997)





D. Anexo: Dosificación de nutrientes

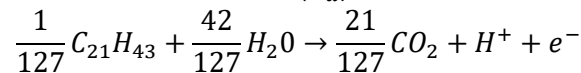
- **Cálculo dosificación de nutrientes**

Tras conocer la formula tentativa del petróleo crudo se procedió a calcular la reacción global del proceso según los parámetros establecidos por McCarty. En el estudio de los parámetros químicos del suelo se obtuvo la concentración de nitrógeno y fósforo presente en el mismo; estos valores se tuvieron en cuenta para el cálculo exacto del nitrógeno y fósforo requeridos para el tratamiento.

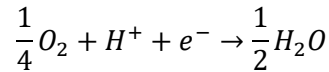
Se realizó un proceso aerobio utilizando como fuente de nitrógeno el ion amonio suministrado en forma de urea y tripolifosfato de sodio ($Na_5P_3O_{10}$) como fuente de fósforo.

A continuación se enuncian las semireacciones del proceso:

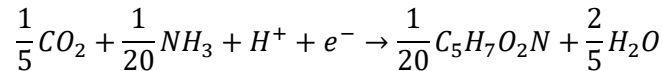
- Semireacción donador de electrones (R_d)



- Semireacción aceptor de electrones (R_a)



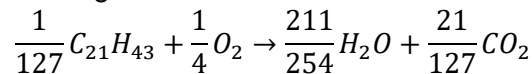
- Semireacción de síntesis (R_c)



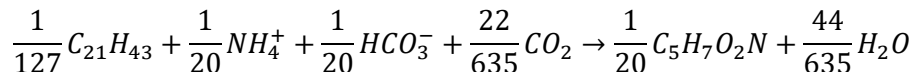
La reacción de energía es: $R_e = R_a - R_d$

La reacción de síntesis es: $R_s = R_c - R_d$

Calculando la reacción de energía se obtiene:



Calculando la reacción de síntesis se obtiene

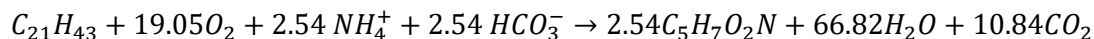


La reacción global del proceso se obtiene mediante la ecuación 11:

$$R = f_s R_s + f_e R_e \text{ (Ecuación 11)}$$

La fracción del carbono destinada tanto para el proceso de síntesis bacteriana como para los procesos energéticos será de $f_s = 0,4$ y $f_e = 0,6$ respectivamente, estos valores son utilizados ampliamente en procesos aerobios (Agudelo, 2010)

La reacción global realizando todas las operaciones resulta:



Para la obtención de las relaciones molares de las especies reactantes (C: O: N: P) se realiza el siguiente cálculo teniendo en cuenta que el peso molecular del donador de electrones es 295 g/mol, del nitrógeno es 14 g/mol y del oxígeno es 32 g/mol:

$$1: 19.05 \times \frac{32}{295} : 2.54 \times \frac{14}{295} : \frac{1}{6} \left(2.54 \times \frac{14}{295} \right)$$

De esta manera se obtiene la relación C: O: N: P para el tratamiento en estudio:

$$1: 2.06: 0.12: 0.02$$

Por lo tanto, por cada 100 gr de petróleo crudo se necesitan 206 gramos de oxígeno como aceptor de electrones, 12 gramos de nitrógeno y 2 gramos de fosforo.

Así la relación C: N: P aproximada es:

$$100:12:2$$

E. Anexo: Cálculos montaje reactor

El mejor tratamiento encontrado en los microcosmos fue BIII. Para escalar el proceso al reactor de lecho estático, fue necesario encontrar la cantidad de dióxido de carbono que se consumía, el cual equivale al 60% de la cantidad de contaminante degradado. Por tanto fue necesario aplicar el modelo cinético de Monod en el consumo de dióxido de carbono de este tratamiento, para así conocer la tasa de suministro de oxígeno que requería el reactor. Se tomó la máxima tasa de producción de dióxido de carbono desde el día 0 al 16 en el tratamiento BIII para llevarla al reactor (Fase exponencial). Para una cinética de primer orden el crecimiento microbiano está dado por la ecuación 12.

$$x = x_0 e^{\mu t} \text{ (Ecuación 12)}$$

Aplicando logaritmo natural a ambos lados de la ecuación se tiene:

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu t$$

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t$$

$$\frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{t} = \mu$$

En donde μ equivale a la pendiente de $\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)$ vs t

Para el caso del tratamiento BIII la pendiente μ equivale a 0.073

Según el diseño realizado por Barrios 2012 los parámetros que se tienen en cuenta para calcular el suministro de oxígeno requerido y el área del reactor asociada a esta cantidad son:

Tabla 21. Condiciones físicas y bioquímicas para el montaje del reactor

Variable	Valor	Unidades
Temperatura ambiente	25	°C
Temperatura dentro del reactor	20	°C
Humedad en el reactor	30	%
Porosidad mezcla (Compost 20%-Suelo 80%)	61	%
Altura material	30	cm
Humedad relativa ambiente	60	%
Cantidad de suelo	147	Kg
Rendimiento McCarty (g O ₂ /g C ₂₁ H ₄₃)	2.06	g O ₂ /g C ₂₁ H ₄₃
Constante de degradación	0.073	1/día

Teniendo en cuenta estas especificaciones, la cantidad de oxígeno requerido para lograr la descontaminación del contaminante será:

$$0.00361 \frac{gr O_2}{cm^2 * min}$$

De esta manera el área de transferencia requerida efectiva debe ser igual a 2.54 m² para que el proceso de biorremediación aerobio sea efectivo.

Por tanto se procedió a calcular el área efectiva presente en el reactor de lecho estático y compararlo con el área requerida:

El área efectiva de transferencia de oxígeno será la suma del área del reactor más el área de los ductos de ventilación.

$$A_{reactor} = 2 \times (0.3m \times 1m) + 2 \times (0.3 \times 0.8m) + (0.8m \times 1m)$$

$$A_{reactor} = 1.88 m^2$$

$$A_{ductos} = 0.23 m^2 \times 4$$

$$A_{ductos} = 0.92 m^2$$

De esta manera el área total de transferencia que tiene el reactor es:

$$A_{Total} = 1.88 m^2 + 0.92 m^2 = 2.8 m^2$$

Por tanto, el área de transferencia que se tiene en el reactor es superior al área de transferencia requerida. Esto garantiza que haya un exceso de oxígeno en el sistema, mejorando el proceso de biorremediación.

F. Anexo: Registro Fotográfico

- Montaje microcosmos a escala de laboratorio



Figura 28. Adición de nutrientes al microcosmos



Figura 29. Montaje de los microcosmos

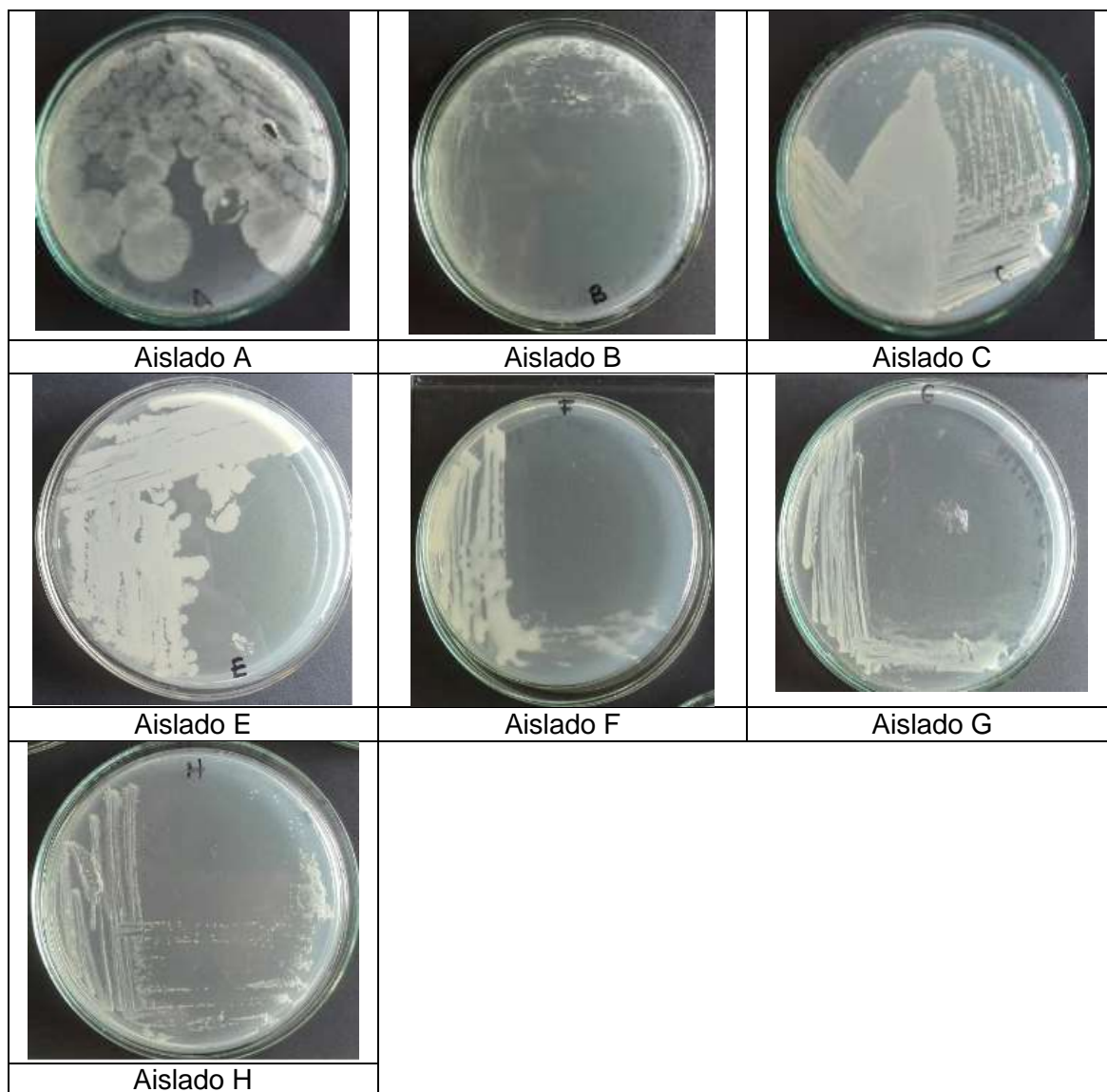


Figura 30. Aislados obtenidos de los microcosmos

Bibliografía

- Aconcha, I., Garzón, H., & Arévalo, J. (2010). Formulación Del Estudio De Impacto Ambiental Para El Área De Perforación Exploratoria Yaraguapo, Municipio De Trinidad, Departamento Del Casanare Formulation. *Revista Gestión Integral En Ingeniería Neogranadina*, 2(12), 17. Retrieved from http://www.umng.edu.co/documents/10162/745277/V2N1_14.pdf
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28–39. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>
- Agudelo, A. (2010). *Un método de gestión ambiental adecuado para el tratamiento y la disposición final de un residuo peligroso caso: tierra fuller contaminada con aceite dieléctrico. Tesis de Maestría*. Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Akinremi, O. O., Janzen, R. L., Lemke, R. L., & Larney, F. J. (2000). Response of canola, wheat and green beans to leonardite additions. *Canadian Journal of Soil Science*, 80, 437–443.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego, California: Academic Press.
- Álvarez, M. B. C. (2009). *Depuración de efluentes contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante carbones activados: Evaluación del proceso de adsorción*. Universidad de Oviedo.
- Arrieta, O. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental (Tesis de Maestría)*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Asquith, E. a, Geary, P. M., Nolan, A. L., & Evans, C. a. (2012). Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 1(August 2015), 637–650.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación.

- Ball, a. S., Stewart, R. J., & Schliephake, K. (2012). A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cuttings. *Waste Management & Research*, 30, 457–473. <https://doi.org/10.1177/0734242X11419892>
- Barrington, S., Choiniere, D., Trigui, M., & Knight, W. (2003). Compost convective airflow under passive aeration. *Bioresource Technology*, 86(3), 259–266. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00155-4)
- Barrios, L. (2012). *Determinación de curvas características de flujo de aire y modelamiento de cinéticas degradativas en reactor de lecho estático convectivo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Bedair, H. M., & Al-Saad, H. T. (1992). Dissolved and particulate - adsorbed hydrocarbons in the waters of shatt al-arab river, Iraq. *Water, Air, and Soil Pollution*, 61, 397–408.
- Bento, F. M., Camargo, F. a O., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049–1055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Borah, D., & Yadav, R. N. S. (2016). Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>
- Bratkova, S., Nikolova, K., Chakalov, K., & Rilski, I. (2012). Potential for Bioremediation of Calcareous Soils By Rhizospheric Bacteria and Humic Acids. *Mining and Mineral Processing*, 55.
- Bray, R., & Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59(1), 39–46.
- Butenschoen, O., Scheu, S., & Eisenhauer, N. (2011). Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1902–1907. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.011>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castellanos, P. R. (2002). *Medio ambiente : calidad ambiental*. (E. U. de Salamanca, Ed.). Salamanca, España.

- Castro Varela, G. (2007). *Informe Final Diseño Monitoreo Frente Derrames De Hidrocarburos*. Quillota.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*, 11(4), 539–550.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Cho, Y., Rhee, S., & Lee, S. (2000). Effect of Soil Moisture on Development. *Florida Entomologist*, 3, 915–919.
- Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2006). Métodos independientes y dependientes de cultivo para estudiar y caracterizar la ecología microbiana en la fermentación vínica. *Tecnología Del Vino*, 34, 62–67.
- Cookson, J. (1995). *Bioremediation Engineering: Design and Applications*. McGraw-Hill Education.
- Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28, 337–348. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00032-6)
- David, J., Smejkalová, D., Hudecová, S., Zmeškal, O., von Wandruszka, R., Gregor, T., & Kučerík, J. (2014). The physico-chemical properties and biostimulative activities of humic substances regenerated from lignite. *SpringerPlus*, 3(2010), 156. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-156>
- Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., & Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.011>
- Dike, B. U., Okoro, B. C., Nwakwasi, N. N., & Agbo, K. C. (2013). Remediation of Used Motor Engine Oil Contaminated Soil : A Soil Washing Treatment Approach. *Journal of Civil Environmental Engineer*, 3(1), 3–5. <https://doi.org/10.4172/2165-784X.1000129>
- Dominguez, R., & Aguilera, H. (1989). Metodología de análisis físico-químicos de suelos. In F. de Ciencias.UNAM (Ed.), *Metodología de análisis físico-químicos de suelos*. México.

- Doran, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. (Acribia, Ed.).
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Jody, A., Kuske, C. R., & Davis, J. a. (1999). Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1662–1669.
- Erro, J., Urrutia, O., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarreño, A. M., & Garcia-Mina, J. M. (2016). Incorporation of humic-derived active molecules into compound NPK granulated fertilizers: main technical difficulties and potential solutions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0071-7>
- Fantroussi, S. El, & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Ecology and Industrial Microbiology*, 8, 268–275.
- FAO. (2015). El suelo es un recurso no renovable. Retrieved from fao.org/soils-2015
- Franco, M. G., Corrêa, S. M., Marques, M., & Perez, D. V. (2015). Emission of Volatile Organic Compounds and Greenhouse Gases from the Aerobic Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(August), 50. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2349-y>
- Franzetti, A., Di Gennaro, P., Bevilacqua, A., Papacchini, M., & Bestetti, G. (2006). Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere*, 62, 1474–1480. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.009>
- Garcia, P., Lucena, J., Ruano, S., & Nogales, M. (2009). *Guía práctica de fertilización racional de los cultivos en España*.
- Geary, P. M., & Evans, C. (2012). Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soil by Surfactant Addition . Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation , Bioaugmentation and Surfactant Addition, (August 2015).
- Gentry, T., Rensing, C., & Pepper, I. (2004). New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(August 2014), 447–494. <https://doi.org/10.1080/10643380490452362>
- Germaine, K., Byrne, J., Liu, X., Keohane, J., Culhane, J., Lally, R., ... Dowling, D. (2015). Ecopiling: a combined phytoremediation and passive biopiling system for remediating

- hydrocarbon impacted soils at field scale. *Frontiers in Plant Science*, 5, 6.
- Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Atenuación Natural Y La Bioaumentación En Un Suelo Contaminado Con Una Mezcla De Gasolina - Diesel. *Dyna*, (160), 83–93.
- Gonzales-Naranjo, V., Leal, M., Lillo, J., Bustamante, I., & Palacios-Díaz, P. (2010). Guía de Caracterización Edáfica para Actividades de Regeneración de Aguas Residuales en Usos Ambientales. *Ministerio de Economía Y Competitividad, Gobierno de España*, 42. Retrieved from www.consolider-tragua.com
- Grace Liu, P. W., Chang, T. C., Whang, L. M., Kao, C. H., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(8), 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.002>
- Halder, C. a, Warne, T. M., Little, R. Q., & Garvin, P. J. (1984). Carcinogenicity of petroleum lubricating oil distillates: effects of solvent refining, hydroprocessing, and blending. *American Journal of Industrial Medicine*, 5, 265–274.
- Hamme, J. D. Van, Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503>
- Haritash, a. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Haug, R. T. (1993). *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Washington DC: Lewis Publisher.
- Helmy, Q., Laksmono, R., & Kardena, E. (2015). Bioremediation of Aged Petroleum Oil Contaminated Soil: From Laboratory Scale to Full Scale Application. *Procedia Chemistry*, 14, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.045>
- Hernan González Osorio, Siavosh Sadeghian Khalajabadi, Rubèn Darío Medina Rivera, A. F. C. Q. (2015). Alternativas para disminuir la volatilización de nitrógeno producida por la fertilización con urea. *Cenicafe*, 66(1), 7–16.
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 6, 148–159. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(01\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(01)00074-7)
- Iannotti, D. A., Pang, T., Toth, B. L., Elwell, D. L., Keener, H. M., & Hoitink, H. A. J. (1993). A Quantitative Respirometric Method for Monitoring Compost Stability. *Compost*

- Science & Utilization*, 1(3), 52–65. <https://doi.org/10.1080/1065657X.1993.10757890>
- IGAC. (2014). Estudio general de suelos y zonificación de tierras, Departamento de Putumayo., 382.
- Jackson, M. (1964). *Análisis Químico de suelos*. (Omega, Ed.).
- Jayashree, R., & Vasudevan, N. (2007). Effect of tween 80 added to the soil on the degradation of endosulfan by *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 203–210. Retrieved from <Go to ISI>://000254743700006
- Karjiban, R. A., Basri, M., Rahman, M. B. A., & Salleh, A. B. (2012). Structural Properties of Nonionic Tween80 Micelle in Water Elucidated by Molecular Dynamics Simulation. *APCBEE Procedia*, 3(October 2015), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.084>
- Katime, I., Quintana, J., & Villacampa, M. (2003). Micelas. *Revista Iberoamericana*, 4(2), 123–151.
- Khamforoush, M., Bijan-Manesh, M.-J., & Hatami, T. (2012). Application of the Haug model for process design of petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation by composting process. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10, 533–544. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0129-4>
- Killops, S. D., & Al-Juboori, M. a H. a. (1990). Characterisation of the unresolved complex mixture (UCM) in the gas chromatograms of biodegraded petroleums. *Organic Geochemistry*, 15(2), 147–160. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(90\)90079-F](https://doi.org/10.1016/0146-6380(90)90079-F)
- Kim, I. S., Park, J., & Kim, K. (2001). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry, 16, 1419–1428.
- Kogbara, R. B., Ayotamuno, J. M., Worlu, D. C., & Fubara-Manuel, I. (2015). A case study of petroleum degradation in different soil textural classes. *Recent Patents on Biotechnology*, 9(2), 1–15.
- Laha, S., Tansel, B., & Ussawarujikulchai, A. (2009). Surfactant-soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.08.006>
- Lee, E. H., Kang, Y. S., & Cho, K. S. (2011). Bioremediation of diesel-contaminated soils by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation employing *Rhodococcus* sp. EH831. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 86–92.

- Lee, M., Srinivasan, S., & Kim, M. K. (2010). New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. *Journal of Microbiology*, *48*(5), 616–622. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-9367-7>
- Lee, S.-H., Oh, B.-I., & Kim, J. (2008). Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology*, *99*, 2578–2587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.039>
- Lipczynska-Kochany, E., & Kochany, J. (2008). Humic substances in bioremediation of industrial wastewater - mitigation of inhibition of activated sludge caused by phenol and formaldehyde. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, *43*(6), 619–626. <https://doi.org/10.1080/10934520801893675>
- Lourdes, P., Sergio, G., & Jesús, M. De. (2012). RESPIRACIÓN DE CO₂ COMO INDICADOR DE LA ACTIVIDAD Respiration of CO₂ as an Indicator of Microbial Activity in Organic Fertilizers of Lupinus.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock Microbiología de los Microorganismos*. (Pearson Prentice Hall, Ed.). Illinois.
- Mansur, A. A. (2015). *Bioremediation of Libyan soil contaminated with crude oil tank bottom sludge*. RMIT University.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, *285*, 419–435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>
- Margesin, R., & Schinner, F. (1997). Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *47*, 462–468. <https://doi.org/10.1007/s002530050957>
- Margesin, R., Zimmerbauer, a., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, *40*(April 1999), 339–346. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0)
- Ministerio de Minas y Energía. (2013). Cadena De Petroleo 2013.
- Minnesota, U. of. (1997). University of Minnesota Biocatalysis and Biodegradation Database. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-1>
- Moscoso, F., Teijiz, I., Deive, F. J., & Sanromán, M. A. (2012). Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*, *119*, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.095>
- Mousset, E., Oturan, N., Van Hullebusch, E. D., Guibaud, G., Esposito, G., & Oturan, M. a.

- (2013). A new micelle-based method to quantify the Tween 80® surfactant for soil remediation. *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 839–846. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0140-2>
- Municipio del Valle del Guamuez. (2012). Plan de Desarrollo Integral Municipio del Valle del Guamuez 2012-2015.
- Nanclares, D. (2016). *Evaluación de las bacterias aisladas de material particulado PM2.5 captado en tres estaciones de la Red de Monitoreo de Calidad de Aire del Área Metropolitana Valle de Aburrá*. Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Nessler. (1999). Determination of ammonia-nitrogen. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1–6.
- Novelo-Torres, M. A., & Gracia-Fadrique, J. (2005). Concentración micelar crítica mediante la ecuación de absorción de Gibbs. *Educación Química*, 16(1), 63–67.
- Orji, F. A., Ibiene, A. A., & Dike, E. N. (2012). Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon - polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(4), 219–228.
- Ortiz, B., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados (pp. 7–8). Madrid, España: Elecé Industria Gráfica. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:T?cnicas+de+reucperaci?n+de+suelos+contaminados#0>
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:T?cnicas+de+recuperaci?n+de+suelos+contaminados#0>
- Paria, S. (2008). Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science*, 138, 24–58. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.11.001>
- Pawar, R. M. (2015). The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(3). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000291>
- Pinto, A., Arruda, A. P. De, Angelis, G. De, Franceschi, D. De, & Bonotto, D. M. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346–353. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200030>
- Prada, M. A. (2016). *Un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con 1,1,1- tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) mediante un*

- reactor de lecho estático*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ramnarine, M., & Santoriello, L. M. (2015). Hydrocarbons toxicity. *Medscape*, 7–10. Retrieved from <http://emedicine.medscape.com/article/1010734-overview>
- Ramos, E., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel del laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7, 123–130.
- Ratanaprommanee, C., & Shutsrirung, A. (2013). Chemical Properties and Potential Use in Agriculture of Leonardite from Different Sources in Thailand, 1236–1246.
- Riccardi, C., Di Filippo, P., Pomata, D., Di Basilio, M., Spicaglia, S., & Buiarelli, F. (2013). Identification of hydrocarbon sources in contaminated soils of three industrial areas. *Science of the Total Environment*, 450–451, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.082>
- Riesco, R. A. (2012). *Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Universidad Autónoma de Barcelona. Retrieved from <http://www.jaravalencia.com/docu/suelconthidroc.pdf>
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*, 38, 525–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>
- Rittmann, B. E. ., & McCarty, P. L. . (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. (McGraw-Hill, Ed.).
- Robles-González, I. V, Fava, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-5>
- Rojas, J. (2014). *Biodegradación del colorante azul brillante, mediante Fermentación en Estado Sólido, sobre residuos de flores*. Universidad Nacional de Colombia.
- Rojas-Avelizapa, N. G., Roldán-Carrillo, T., Zegarra-Martínez, H., Muñoz-Colunga, a. M., & Fernández-Linares, L. C. (2007). A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere*, 66, 1595–1600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.011>
- Rosen, M. J. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena. Colloids and Surfaces* (Tercera Ed, Vol. 40). New Jersey, USA: John Wiley & Sons. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(89\)80030-7](https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80030-7)
- Rossinil, F. D. (1960). Hydrocarbons in Petroleum. *Journal of Chemical Education*, 37(111), 554–561.

- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Deka Boruah, H. P., Saikia, N., ... Chandra Bora, T. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94(August 2015), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.024>
- Rynk, R., Kamp, M. van de, B. Willson, G., Singley, M. E., Kay, D., & Brinton, W. (1992). *On-Farm Composting Handbook*. (Cooperative Extension, Ed.). Ithaca.
- Salinas, R. O., Cram, S., & Sommer, I. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in soils of the low alluvial plain in the state of Tabasco, Mexico. *Universidad Y Ciencia*, 28(2), 131–144.
- Sanders, E. ., & Miller, J. . (2010). *Microbiologist: a discovery-based course in microbial ecology and molecular evolution*. ASM press.
- Sayara, T., Sarrà, M., & Sánchez, A. (2009). Preliminary screening of co-substrates for bioremediation of pyrene-contaminated soil through composting. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 1695–1698. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.142>
- Selberg, A., Juuram, K., & Budashova, J. (2013). Biodegradation and Leaching of Surfactants During Surfactant-Amended Bioremediation of Oil-Polluted Soil. *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*, 123–147.
- Sepúlveda, T. V., & Trejo, J. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Jiménez Editores. México: Instituto Nacional de Ecología. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Servicio Geologico Colombiano. (2015). Mapa Geologico de Colombia. Retrieved April 16, 2017, from <http://www2.sgc.gov.co/Geologia/Mapa-geologico-de-Colombia.aspx>
- Silva-Bedoya, L. M., Sánchez-Pinzón, M. S., Cadavid-Restrepo, G. E., & Moreno-Herrera, C. X. (2016). Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. *Microbiological Research*, 192, 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.006>
- Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios En La Zona No Saturada Del Suelo*, IX, 8.
- Stasik, S., Wick, L. Y., & Wendt-Potthoff, K. (2015). Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, 138, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.068>

- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Hideyuki, T., ... Kamagata, Y. (2014). A Hidden Pitfall in the Preparation of Agar Media Undermines Microorganism Cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7659–7666.
- Thamer, M., Al-kubaisi, A. R., Zahraw, Z., Abdullah, H. A., Hindy, I., & Khadium, A. A. (2013). Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq, 5(7), 865–873. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.57104>
- Tonini, R. M. C. W., Rezende, C. E., & Grativol, A. D. (2010). Degradação E Biorremediação De Compostos Do Petróleo Por Bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, 14(August), 1010–1020. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1404.11>
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tringe, S. G., & Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 442–446. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>
- Turgay, O. C., Erdogan, E. E., & Karaca, A. (2010). Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 170(1–4), 45–58. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1213-1>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- USEPA. (1991). *Geochemical Sampling of Subsurface Solids and Ground Water*. In *Publication Site Characterization for Subsurface Remediation* (pp. 83–98). Washington DC.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2007). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 67–78. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/501/899>
- Varadavenkatesan, T., & Murty, V. R. (2013). Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 2013, 8. <https://doi.org/10.1155/2013/621519>

-
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A., & Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, *100*(13), 3221–3227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.020>
- Worley Parsons Komex. (2007). *Bioremediation of Oil Field Waste Containing Elevated Concentrations of Weathered Petroleum Hydrocarbons*. Worley Parsons Komex. Edmonton, Canada.
- Yu, J., Tao, R., & Yu, K. (2012). Anaerobic biodegradation of benzene in salt marsh sediment of the Louisiana Gulf coast. *Ecological Engineering*, *40*, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.12.025>
- Yu, S., Grant Clark, O., & Leonard, J. J. (2009). Influence of free air space on microbial kinetics in passively aerated compost. *Bioresource Technology*, *100*(2), 782–790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.051>
- Zhu, J., Shen, W., Ma, Y., Ma, L., Zhou, Q., Yuan, P., ... He, H. (2012). The influence of alkyl chain length on surfactant distribution within organo-montmorillonites and their thermal stability. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *109*, 301–309. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1761-9>