



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Biorremediación bacteriana de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos

Alejandro Martínez Rivera

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2018

Biorremediación bacteriana de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos

Alejandro Martínez Rivera

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Ph.D. Santiago Alonso Cardona Gallo

Línea de Investigación:

Biotecnología ambiental

Grupo de Investigación:

Biorremediación y Desarrollo Tecnológico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2018

Dedicatoria

A mis padres y familiares.

Agradecimientos

- A Dios en primer lugar, por todos los favores recibidos.
- A mis padres y familiares por estar siempre en actitud de ayuda y compromiso.
- Al profesor Santiago Alonso Cardona Gallo por su orientación y confianza durante el desarrollo del proyecto.
- A la Universidad Nacional de Colombia – Medellín por el apoyo a través la infraestructura del Laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico.
- Al posgrado en Ciencias – Biotecnología por su apoyo económico en el desarrollo de los análisis.
- Al posgrado en Ciencias – Biotecnología por otorgarme la beca de exención parcial de derechos académicos.
- Al laboratorio de Biomateriales, al profesor Hugo Estupiñan y Benjamín Zuluaga por su colaboración en el análisis de microscopia electrónica de barrido.
- Al profesor Juan Alzate de la Universidad de Antioquia, por su orientación en el análisis de diversidad bacteriana.
- A la profesora Alejandra Arbeláez Londoño por su colaboración.
- A Catalina Trejos Delgado, María Angélica Prada y Alexander Agudelo por sus valiosas orientaciones, consejos y fortaleza en los momentos difíciles y amistad.
- A Alejandra Daniela Delgado Vallejo por su gran apoyo durante el desarrollo de la investigación y su gran amistad.
- A Aura Yazmin Coronel Delgado por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos a lo largo de este proceso.

Resumen

Se conoce que la industria del petróleo aunque posee programas eficientes de seguridad en sus operaciones, no obstante, al realizarlas produce impactos al ambiente circundante, desde la disposición final de los fluidos y residuos de perforación hasta derrames de crudo como consecuencia de grupos ilegales. Estas afectaciones al ambiente han sido tratadas mediante métodos físicos y químicos, sin embargo los tratamientos biológicos como la biorremediación han demostrado alta efectividad costo-beneficio.

Por lo tanto, la presente investigación se propuso evaluar la influencia de la biorremediación bacteriana empleando atenuación natural, bioaumentación y bioestimulación a escala de laboratorio en suelos impactados con fluidos y residuos de perforación.

Para el desarrollo de la investigación, se propusieron varios estimulantes orgánicos (melaza, Tween 80, Leonardita, D-limoneno) para activar los consorcios autóctonos presentes en el suelo. De esta manera se implementaron 7 tratamientos correspondientes a un control (C), Atenuación Natural (A), Bioaumentación (B) mediante adición de 10% (p/p) compost para incrementar la densidad bacteriana, Bioestimulación (Bs), Bioestimulación + Tween 80 (BsT) con concentración de 25 CMC, Bioestimulación + Tween 80 + Leonardita (BsTL) con concentración al 3% (P/V) y finalmente Bioaumentación estimulada + Tween 80 + Leonardita + D-limoneno (BL); para los tratamientos de bioestimulación se usó Urea como fuente de nitrógeno y Tripolifosfato de sodio como fuente de fósforo, los cuales fueron determinados mediante el método de McCarty, además de adiciones periódicas de melaza como co-sustrato.

Los métodos propuestos se evaluaron durante 90 días, con lo cual el tratamiento de atenuación natural (A) obtuvo el menor porcentaje de degradación llegando a 28%, del mismo modo el tratamiento de control (C) presentó una degradación del 76% que fue atribuida a la presencia de HCl al 2M como inhibidor del crecimiento bacteriano. La bioaumentación (B) tuvo una disminución del 76% que fue superior al 66% obtenido por la bioestimulación (Bs) y el 69% de la bioestimulación + T80 + Leonardita (BsTL). Los tratamientos más eficientes fueron la bioestimulación + T80 (BsT) con 83% y la bioaumentación estimulada (BL) con 88%.

Mediante una prueba de toxicidad con el organismo *Eisenia Fetida*, se demostró una estabilidad en la toxicidad de los tratamientos más eficientes, que puede ser atribuida a la presencia de aditivos desconocidos de los fluidos y residuos de perforación, igualmente, con un análisis de diversidad microbiana se pudo visualizar un cambio en los géneros al finalizar los tratamientos, promoviendo aquellos que presentan mayor tolerancia a los hidrocarburos.

Con base en los resultados anteriormente mostrados, se pudo concluir un efecto positivo de los estimulantes propuestos, en los tratamientos B, Bs, BsT, BsTL y BL, llegando a obtener concentraciones menores a 5000 ppm de HTP remanentes como dicta la resolución 1170 de 1997.

Palabras clave: Fluidos de perforación, residuos, bioaumentación estimulada, bacterias, biorremediación aerobia, Tween 80, suelo.

Abstract

It is known that the petroleum industry although it has efficient safety programs in its operations, nevertheless, when carried out, it produces impacts to the surrounding environment, from the final disposal of fluids and drilling residues to oil spills as a consequence of illegal groups. These effects on the environment have been treated by physical and chemical methods, however biological treatments such as bioremediation have shown high cost-benefit effectiveness.

Therefore, the present investigation aimed to evaluate the influence of bacterial bioremediation using natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation at a laboratory scale in impacted soils with fluids and drilling residues.

For the development of the research, several organic stimulants (molasses, Tween 80, Leonardite, D-limonene) were proposed to activate the autochthonous consortiums present in the soil. In this way, 7 treatments were implemented corresponding to a control (C), Natural Attenuation (A), Bioaugmentation (B) by adding 10% (w / w) compost to increase bacterial density, Biostimulation (Bs), Biostimulation + Tween 80 (BsT) with concentration of 25 CMC, Biostimulation + Tween 80 + Leonardite (BsTL) with 3% concentration (P / V) and finally stimulated bioaugmentation + Tween 80 + Leonardite + D-limonene (BL); for the biostimulation treatments Urea was used as a source of nitrogen and sodium tripolyphosphate as a source of phosphorus, which were determined by the McCarty method, in addition to periodic additions of molasses as a co-substrate.

The proposed methods were evaluated during 90 days, with which the natural attenuation treatment (A) obtained the lowest percentage of degradation reaching 28%, in the same way the control treatment (C) presented a degradation of 76% that was attributed to the presence of 2M HCl as an inhibitor of bacterial growth. Bioaugmentation (B) had a decrease of 76%, which was higher than 66% obtained by biostimulation (Bs) and 69% of biostimulation + T80 + Leonardite (BsTL). The most efficient treatments were biostimulation + T80 (BsT) with 83% and stimulated bioaugmentation (BL) with 88%.

Through a toxicity test with the *Eisenia Fetida* organism, a stability in the toxicity of the most efficient treatments was demonstrated, which can be attributed to the presence of unknown additives from fluids and drilling residues, also, with an analysis of microbial diversity It was possible to visualize a change in the genera at the end of the treatments, promoting those that have greater tolerance to hydrocarbons.

Based on the results previously shown, it was possible to conclude a positive effect of the proposed stimulants, in the treatments B, Bs, BsT, BsTL and BL, reaching lower concentrations of 5000 ppm of HTP as dictated by resolution 1170 of 1997.

Keywords: Drilling fluids, residues, stimulated bioaugmentation, bacteria, aerobic bioremediation, Tween 80, soil.

Contenido

	Pág.
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVI
Lista de abreviaturas	XVII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	3
1.1 Objetivo general	4
1.2 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	4
1.4 Pregunta de investigación	4
1.5 Alcances	5
1.6 Justificación.....	5
2. Antecedentes	8
3. Marco teórico	12
3.1 Suelo.....	12
3.1.1 Clima	12
3.1.2 Material parental.....	13
3.1.3 Organismos	14
3.1.4 Relieve	14
3.1.5 Tiempo	14
3.2 Generalidades de la industria del petróleo	15
3.2.1 Etapas de un proyecto de extracción de hidrocarburos.....	15
3.2.2 Hidrocarburos	17
3.2.3 Fluidos de perforación	18
3.3 Biorremediación	22
3.3.1 Atenuación natural.....	22
3.3.2 Bioaugmentación	23
3.3.3 Bioestimulación.....	24
3.4 Factores físicos y químicos que intervienen en la biorremediación	24
3.4.1 Temperatura	24
3.4.2 Humedad.....	25
3.4.3 Textura	25
3.4.4 pH.....	25
3.4.5 Aceptor y donador de electrones	25
3.4.6 Disponibilidad de nutrientes.....	25
3.5 Estrategias de optimización de la biodegradación	26
3.5.1 Surfactantes	26
3.5.2 Leonardita.....	27

3.5.3	Limoneno	28
3.5.4	Melaza	28
4.	Metodología.....	30
4.1	Equipos y reactivos.....	31
4.2	Muestreo de suelo base.....	31
4.3	Pretratamiento de suelo base	31
4.4	Obtención de muestra de fluidos y residuos de perforación	31
4.4.1	Microscopia electrónica de barrido	32
4.5	Incorporación manual de los fluidos y residuos de perforación en el suelo	32
4.6	Obtención de concentración óptima de Tween 80.....	32
4.7	Caracterización física y química del suelo.....	33
4.8	Montaje de tratamientos a escala de laboratorio	33
4.9	Diseño de experimentos	34
4.10	Seguimiento del proceso.....	35
4.10.1	Potencial de hidrógeno.....	35
4.10.2	Medición de humedad	35
4.10.3	Respirometría.....	35
4.10.4	Recuento de bacterias.....	36
4.10.5	Análisis de diversidad bacteriana	37
4.10.6	Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo.....	38
4.11	Prueba de toxicidad	39
5.	Resultados y Discusión.....	40
5.1	Microscopia electrónica de barrido.....	40
5.2	Concentración óptima de Tween 80.....	41
5.3	Caracterización fisicoquímica del suelo	44
5.3.1	Índice de Shannon	46
5.4	Monitoreo de los tratamientos a escala de laboratorio	46
5.4.1	Variación de pH.....	46
5.4.2	Respirometría.....	48
5.4.3	Concentración remanente de HTP	52
5.4.4	Caracterización microbiológica de los tratamientos	55
5.5	Prueba de Toxicidad	59
6.	Conclusiones y recomendaciones	62
6.1	Conclusiones	62
6.2	Recomendaciones	64

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema de la metodología de trabajo.....	30
Figura 2. Microscopia electrónica de barrido de tres zonas diferentes (A, B y C).....	41
Figura 3. Respirimetría para concentración óptima de Tween 80	42
Figura 4. Variación del pH en los tratamientos.....	48
Figura 5. Respirimetría de los tratamientos propuestos.....	49
Figura 6. Porcentajes de degradación en los tratamientos propuestos	53
Figura 7. Crecimiento de bacterias heterótrofas durante el desarrollo de los tratamientos	56
Figura 8. Crecimiento de bacterias hidrocarburoclastas durante el desarrollo de los tratamientos	57
Figura 9. Registro fotográfico proceso de muestreo de suelo base.....	66
Figura 10. Pretratamiento del suelo base	68
Figura 11. Muestra de Fluidos y residuos de perforación.....	69
Figura 12. Incorporación manual de los fluidos de perforación	70
Figura 13. Incorporación manual de los residuos y cortes de perforación.....	70
Figura 14. Suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación.....	71
Figura 15. Montaje prueba de concentración óptima de Tween 80	72
Figura 16. Prueba de respirometría para concentración óptima de Tween 80	73
Figura 17. Montaje de los tratamientos.....	74
Figura 18. Espectro cromatográfico de gases-masas del suelo contaminado inicial	78
Figura 19. Ruta degradativa del hidrocarburo.....	82
Figura 20. Montaje de los tratamientos a evaluar	83
Figura 21. Prueba de mortalidad	83

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Aditivos de Fluidos de perforación	19
Tabla 2. Composición general de un fluido de perforación	20
Tabla 3. Propiedades físicas químicas del Limoneno	28
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica del suelo	33
Tabla 5. Tratamientos evaluados a escala de laboratorio	34
Tabla 6. Diseño de experimentos	34
Tabla 7. Pendientes resultantes por concentración evaluada	42
Tabla 8. Análisis de Varianza (Día 0-14).....	42
Tabla 9. Prueba de Scheffé (Día 0-14)	43
Tabla 10. Caracterización fisicoquímica del suelo inicial y al finalizar los tratamientos ...	44
Tabla 11. Índice de Shannon de suelo contaminado inicial.....	46
Tabla 12. Pendientes resultantes por tratamiento propuesto	49
Tabla 13. Análisis de Varianza (Día 0-30).....	50
Tabla 14. Análisis de Varianza (Día 31-90).....	50
Tabla 15. Prueba de Scheffé (Día 0-30)	50
Tabla 16. Prueba de Scheffé (Día 31-90)	51
Tabla 17. Concentración de HTP en los tratamientos propuestos.....	52
Tabla 18. Análisis de varianza de porcentajes de degradación.....	53
Tabla 19. Prueba de Scheffé de porcentajes de degradación.....	54
Tabla 20. Resultados generales de los análisis de diversidad alfa.....	57
Tabla 21. Resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de Phylum.....	58
Tabla 22. Propiedades que presentan variaciones en los suelos evaluados.....	59
Tabla 23. Resultados de los conteos de lombrices	60
Tabla 24. Análisis de varianza (24 horas)	60
Tabla 25. Prueba de Scheffé (24 horas)	61
Tabla 26. Determinación del hidrocarburo representativo	77
Tabla 27. Resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de género.	84

Lista de abreviaturas

CMC: Concentración Micelar Crítica

C:N:P: Relación molar de Carbono, Nitrógeno y Fósforo

IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HTP: Hidrocarburos Totales del Petróleo

mg: Miligramo

g: gramo

°C: Grado Celsius

M.O: Materia orgánica

CIC: Capacidad de intercambio catiónico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno

ppm: Partes por millón

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

Introducción

El suelo ha sido un factor importante en el desarrollo de la humanidad, pero se tiene registros que desde la revolución industrial fue donde empezó a disminuir su capacidad de asimilación (Arrieta, 2011; Castillo et al., 2005). Actualmente el suelo es un destinatario de la contaminación producida por varias actividades humanas, como agrícola, construcción, industria petroquímica entre otras (D. Jaramillo, 2014; Uphoff et al., 2006). Sin embargo, esta última ha sido desde sus inicios, la de mayor impacto ambiental, debido que su cadena de producción que inicia con exploración del lugar hasta la etapa final correspondiente a transporte y refinamiento tiene gran relación con su entorno y ambiente (Ecopetrol, 2017).

Ahora bien, la mayoría de investigaciones se han centrado en remediar sitios impactados por hidrocarburos, producto de actividades al margen de la ley y/o errores técnicos, pero un residuo en gran crecimiento son los fluidos de perforación y sus cortes (Yan, Lu, Guan, Zhang, & Zhang, 2011). Los cuales poseen igual o mayor grado de toxicidad dependiendo de varios factores, principalmente el fluido base y los aditivos implementados para mantener sus propiedades de desempeño (Adekunle, Igbuku, Oguns, & Shekwolo, 2013).

Con base en los efectos negativos de los hidrocarburos, el marco legal de los países ha evolucionado, teniendo mayores restricciones en la presencia de estos agentes en el suelo dependiendo de su uso, un ejemplo importante es México que mediante su norma 138 de 2003 fija topes estrictos (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2005), del mismo modo Colombia mediante la resolución 1170 de 1997 del Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente promulga los límites permisibles para operaciones de construcción, remodelación y desmantelamiento de las Estaciones de Servicio (D.A.M.A., 1997).

De lo anterior se visualiza la necesidad de implementar métodos para mitigar la contaminación proveniente de estos fluidos y residuos de perforación, razón por la cual se han desarrollado opciones físicas y químicas como incineración u oxidación química entre otros (Adekunle et al., 2013; Ayyaswami & Vishwanathan, 2010; Ball, Stewart, & Schliephake, 2012), que producen efectos colaterales y además costos económicos muy altos. No obstante, la biorremediación correspondiente a un tratamiento biológico ha demostrado gran capacidad de degradación de hidrocarburos (Alexander, 1999). Esta tecnología implementa diversos métodos para aumentar su eficiencia, uno corresponde a la bioaumentación que se centra en la adición de microorganismos (Adams, Fufeyin, Okoro, & Ehinomen, 2015; Ball et al., 2012; Wu et al., 2016), otro es la bioestimulación donde se emplea la incorporación de nutrientes para aumentar la biodegradación (Qin, Gong, & Fan, 2013; Wu et al., 2016), también se usan varios estimulante adicionales como surfactantes, solubilizantes, cosustratos y demás (Adams et al., 2015) dependiendo de las necesidades del caso.

El objetivo de la presente investigación se basó en evaluar la influencia de la biorremediación bacteriana empleando atenuación natural, bioaumentación y bioestimulación a escala de laboratorio en suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación. Para lo cual se empleó un proceso a escala de laboratorio durante un periodo de 90 días, donde se usó un diseño estadístico completamente al azar de un factor y 7 niveles, Control (C), Atenuación Natural (A), Bioaumentación (B), Bioestimulación (Bs), Bioestimulación + Tween 80 (BsT), Bioestimulación + Tween 80 + Leonardita (BsTL) y Bioaumentación estimulada + Tween 80 + Leonardita + Limoneno (BL). La dosificación de nutrientes se calculó mediante el método de McCarty que mejora la relación C:N:P, en la bioaumentación se empleó 10% de Compost que presentaba una población bacteriana de 1.8×10^8 UFC/gr Suelo.

Para los microcosmos se realizó una caracterización fisicoquímica de los tratamientos al inicio y al finalizarlos, igualmente se cuantificó la concentración de HTP inicial y final. Para monitorear los factores influyentes en los procesos de biorremediación se evaluó el comportamiento de propiedades como pH, producción de CO_2 y el crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas cada 7 días, también se realizó un estudio de diversidad bacteriana para notar cambios en los géneros de bacterias presentes y adicionalmente se evaluó la toxicidad de los tratamientos más eficientes mediante el organismo *Eisenia Fetida*.

Los resultados demostraron un cambio en la microbiota al aplicar los tratamientos además de una relación entre el porcentaje de degradación de HTP y los estimulantes adicionados obteniendo tasas de remoción superiores a estudios conexos, así mismo se visualiza un nivel de toxicidad estable al finalizar la investigación.

El primer capítulo de la investigación presenta el planteamiento del problema donde se detalla el accionar de los hidrocarburos en el ambiente y una solución viable, además de mostrar los objetivos, tanto general como específicos, alcances e hipótesis a evaluar. El segundo capítulo se centra en los antecedentes de trabajos sobre biorremediación aerobia de hidrocarburos, fluidos y residuos de perforación, dando a conocer sus protocolos y porcentajes de degradación alcanzados. Para el tercer capítulo se dan a conocer los conceptos y definiciones más importantes relacionadas con el presente estudio. El siguiente capítulo se basa en la metodología implementada para la ejecución de la investigación. En el quinto capítulo se dan a conocer los resultados obtenidos y discusión con base en los análisis estadísticos. En el capítulo final se presentan las conclusiones y recomendaciones que arrojó la presente investigación.

1. Planteamiento del problema

A continuación se ilustra el problema, seguido de los objetivos y la pregunta de investigación para el normal desarrollo del presente estudio.

La industria del petróleo suple la necesidad energética de las mayorías de industrias como el sector de transportes, productos agroquímicos y cosméticos entre otros. Para lo anterior realiza operaciones en cadena que inician con la exploración o sísmica, incluyen perforación, producción y terminan con la disposición final del pozo cuando el yacimiento ha terminado su vida útil (productiva). Todo esto implica un vínculo con el ambiente, el cual sale ampliamente perjudicado, debido a los impactos negativos sobre el ecosistema (Ecopetrol, 2015; Restrepo, 1999), razón por la cual se deben efectuar trabajos para prevenir, minimizar y/o mitigar dichos impactos.

Debido a la necesidad de encontrar nuevas reservas de crudo para la alta demanda mundial y mejorar el recobro de las existentes (Khan & Islam, 2007), se pueden cometer errores optimizando el proceso de extracción, producción y refinación, dejando de lado la cuantificación de los impactos ambientales que llegan a ser considerables (Ecopetrol, 2017). Por lo tanto se deben implementar procedimientos y tecnologías más costosas sin asegurar un alto grado de efectividad.

Como se ha indicado, la principal problemática de esta industria radica en el aspecto ambiental; de las principales etapas de extracción y procesamiento del hidrocarburo, se percibe que la más dinámica para contaminar es la perforación, debido que afecta directamente al suelo, aguas subterráneas y/o el ambiente marino cuando se realizan perforaciones costa afuera (Offshore) (Caenn, Darley, & Gray, 2011a; Geehan, Gilmour, & Guo, 2007; Z. X. Yang et al., 2013).

Ahora bien, al momento de mitigar o reducir la contaminación presente, se pueden emplear métodos físicos y químicos con buen porcentaje de remoción pero altos índices de consumo de energía, lo cual conlleva a resultados mediocres teniendo en cuenta la complejidad, demanda de espacio y recursos de estos sistemas (Castebianco Casallas & Niño Avendaño, 2011; Ecopetrol, 2017; Rincón, 2004). Con esto, se visualiza a la Biorremediación como la alternativa idónea para reducir la contaminación por medio del trabajo activo de microorganismos (consorcios bacterianos) que transforman sustancias complejas en estructuras químicas más simples (Alexander, 1999; Hamza, Adly, & Afifi, 2008; Hatzikioseyan, 2010; Rittman & McCarty, 2001).

1.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de la biorremediación bacteriana empleando atenuación natural, bioaumentación y bioestimulación a escala de laboratorio en suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar las características físicas y químicas del suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación al momento de iniciar y terminar la aplicación de los tratamientos de biorremediación.
- Determinar la variación de la diversidad microbiana durante la aplicación del tratamiento más eficiente.
- Cuantificar la concentración de hidrocarburos totales del petróleo en las muestras al inicio y al finalizar los procesos de biorremediación.
- Monitorear la tasa de degradación del contaminante en los diferentes tratamientos aplicados a nivel de laboratorio, verificando y controlando los factores influyentes durante el proceso de degradación en los distintos tratamientos.
- Evaluar la toxicidad del suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación al final de los diferentes tratamientos como mecanismo de evaluación del proceso de biorremediación.
- Establecer el tratamiento de biorremediación a nivel de laboratorio más eficiente para las muestras estudiadas en condiciones aerobias.

1.3 Hipótesis

Los métodos propuestos presentan altas tasas de degradación si poseen buena planeación y ejecución de los factores influyentes al momento de implementar un protocolo de biorremediación.

La bioestimulación obtendrá el mayor porcentaje de biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo siendo así un método óptimo para ser empleado en suelos contaminados con fluidos y residuos de perforación.

1.4 Pregunta de investigación

El presente estudio se basa en tratar un suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos de biorremediación (Atenuación natural, Bioestimulación, Bioaumentación) para solucionar los siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es la variación de la eficiencia de degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante la aplicación de los métodos propuestos?
- ¿Cómo influye la presencia y aplicación de compuestos orgánicos como la Leonardita, Tween 80 y el Limoneno al emplearse en tratamientos aerobios en suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación?

1.5 Alcances

Con el presente estudio se pretende obtener un método de biorremediación aerobio a nivel de laboratorio con alto porcentaje de degradación de hidrocarburos totales del petróleo evaluando la adición de compuestos orgánicos (Tween 80, Leonardita y Limoneno) en suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación.

1.6 Justificación

Es importante mostrar que la contaminación en general del suelo no empezó con la industria del petróleo; esto inició con la revolución industrial, donde se comenzó a desnivelar la relación entre contaminación y asimilación del mismo (Arrieta, 2011; Castillo et al., 2005), ya que la constante generación de residuos y contaminación superó la capacidad del medio para asimilarlos, lo anterior se debió a que el suelo ha sido un destinatario de la polución ya que en él se realizan labores agrícolas, forestales, intervenciones mineras, construcciones urbanas, explotaciones petroleras, entre otras, gracias a que es un recurso económico clave (Arrieta, 2011; Daniel Jaramillo, 2002; Uphoff et al., 2006).

Adicionalmente se conoce que el suelo es un sistema dinámico, por lo tanto toda contaminación o material presente en este se va a modificar y transportar por procesos como sorción, escorrentía, lixiviación, advección y evaporación que hacen parte de los ciclos biogeoquímicos presentes en todos los ecosistemas (Daniel Jaramillo, 2002; Osorio, 2015; Sanchez, 2012; WANG et al., 2008).

Ahora bien, la industria del petróleo a nivel mundial tuvo un gran crecimiento gracias a los altos precios del barril durante la primera década del siglo XXI, razón por la cual las empresas se motivaron a realizar proyectos de manera acelerada. Debido a esto, en los países productores se realizaron exploraciones seguidas de un gran número de perforación de pozos, con la intención de hallar nuevas reservas de hidrocarburos (Ecopetrol, 2014). Este comportamiento se puede evidenciar en países petroleros vecinos como lo son la República del Ecuador, donde según la asociación de la industria hidrocarburífera del Ecuador (AIHE), desde el año 2001 se han perforado un poco más de 2700 pozos (AIHE, 2017), de igual forma, en México, gracias a datos de la empresa estatal PEMEX, se perforaron una cifra cercana a los 10000 pozos desde 2002 (PEMEX,

2013) y finalmente con cifras de la Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH), el Ministerio de Minas y Energía (MME) y el Sistema de Información de Petróleo y Gas Colombiano (SIPG), desde el año 2000 se han perforado en Colombia más de 1100 pozos (Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH), 2014; Cámara Colombiana de Bienes & Servicios Petroleros, 2015; Sistema de Información de Petróleo y Gas Colombiano, 2016).

Paralelamente, en Colombia, con información de la empresa estatal Ecopetrol, se puede afirmar que el suelo termina siendo un destinatario de residuos, ya que el procedimiento empleado para tratar los residuos de perforación de la empresa inicia desde que son arrastrados hasta superficie, seguidos de una limpieza mecánica mediante equipos de control de sólidos, luego se separan de la fase sólida mediante un proceso de deshidratación y los sólidos resultantes son depositados en zonas de disposición o piscinas donde se mezclan con material y suelo nativo para reducir el contenido de humedad, posteriormente se realiza su compactación y disposición final. El volumen de cortes y sólidos (fluidos y residuos de perforación) generados durante el año 2012 fue de 503074 barriles (Bbls) y los generados en el año 2015 fue de 1065463 barriles (Bbls) dando un total durante este periodo de 3354886 barriles (Bbls) que representa un aumento de más del 100% de residuos de perforación (Ecopetrol, 2013, 2017). De forma análoga se tiene que durante los años 2015 y 2016 se generaron 2599780 kg de residuos adicionales que contienen químicos, impregnados, material reciclable y aceites usados, los cuales luego del proceso de gestión de residuos de la empresa son dispuestos en rellenos sanitarios (Ecopetrol, 2016, 2017).

De igual manera la contaminación existente principalmente en los fluidos y residuos de perforación base aceite empleados, se debe a la presencia de factores como la temperatura y presión del pozo en construcción, además de mezcla con elementos traza radioactivos (en pocos casos) o metales pesados presentes en las formaciones intervenidas, presencia de salmueras de alta densidad como cloruro de calcio, bromuro de calcio, entre otras, también poseen diésel, kerosene, parafinas, aditivos e incluso petróleo crudo proveniente del yacimiento si se está perforando en cercanías al estrato productor (Adekunle et al., 2013; Caenn et al., 2011a; Caenn, Darley, & Gray, 2011b; Castebianco Casallas & Niño Avendaño, 2011; Geehan et al., 2007; Khan & Islam, 2007; Roy et al., 2014), por lo tanto, al momento de intervenir un sitio contaminado con estos materiales, debe ser analizado por separado revisando exhaustivamente su composición y propiedades.

Dentro de las posibles consecuencias al interactuar con estos residuos, están algunos efectos negativos a la salud humana, gracias a las propiedades físicas y químicas de los mismos, por ejemplo, la presencia de diésel o kerosene puede causar irritación en la piel, dermatitis, dolor de cabeza, náuseas, irritación en los ojos debido a exposición en la dermis, inhalación, ingestión u otra vía de exposición (Adekunle et al., 2013). Estos materiales poseen en su mayoría hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) además de hidrocarburos conocidos como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) que son

volátiles y tienen propiedades cancerígenas, mutagénicas y tóxicas llegando a afectar gravemente la vida de los seres humanos que estén en contacto con ellos(Adekunle et al., 2013; Alexander, 1999; Koul & Fulekar, 2013).

Finalmente, teniendo en cuenta los altos índices de material contaminante producido durante la etapa de perforación en nuestro país y sus efectos sobre la salud humana se hace necesario establecer un procedimiento eficaz para mitigar sus consecuencias, con un balance ideal entre el factor económico y su rendimiento en la remoción de contaminantes como lo es la biorremediación(Ayyaswami & Vishwanathan, 2010).

2. Antecedentes

En el presente capítulo se abarcarán los principales trabajos y desarrollos que se han obtenido en la biorremediación aerobia de matrices sólidas contaminadas con hidrocarburos, fluidos y residuos de perforación a escala de laboratorio.

Para empezar, se hace relevante conocer que el uso de microorganismos ha estado ligado a la evolución humana, actualmente denominada biotecnología, término acuñado por el ingeniero Húngaro Karl Ereky (P. Alvarez & Illman, 2006); de la misma manera, la primera referencia de uso de microorganismos en procesos de transformación de contaminantes, específicamente hidrocarburos, se remonta a 1895 con Manabu Miyoshi que trató la degradación de hidrocarburos por hongos (Gómez, 2009; Szoboszlai, Solymosi, & Kriszt, 2002).

Razón por la cual, se hace evidente la histórica huella ambiental dejada por la Industria del petróleo en general, como por ejemplo en 1989, donde el derrame del buque Exxon Valdez, sucedido en la costa de Prince William, Alaska, se vertieron 42 millones de litros de crudo (US EPA, 2017); para esto se empleó un tratamiento de biorremediación, que consistió principalmente en la adición de fertilizantes a base de nitrógeno en más de 100 kilómetros de costa, dando como resultado un método eficiente para tratar sitios contaminados de cualquier envergadura (Atlas & Hazen, 2011; Hatzikioseyan, 2010; Rodríguez, 2003). Sin embargo, se han desarrollado varios métodos basados en procesos físicos y químicos para disminuir la presencia de estos agentes contaminantes; pero con resultados ineficientes debido a la presencia de dificultades técnicas, altos costos económicos y ambientales (A. Alvarez & Polti, 2014; Castebianco Casallas & Niño Avendaño, 2011; Cristaldi et al., 2017; Manacorda & Cuadros, 2005; Sheppard et al., 2014; Talley, 2005).

Por ende, se incentivó la investigación de procesos biológicos para tratar sitios degradados, una de las más desarrolladas es la fitorremediación que se basa en el tratamiento de lugares afectados con plantas especializadas para reducir su concentración, como lo muestra García-Sánchez et al. 2018 donde trataron un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) comparando micoaumentación (*Crucibulum leave*), atenuación natural, fitorremediación (plantas de maíz) y fitorremediación con adición de microorganismos durante un período de 180 días, dando como resultado una mayor degradación de compuestos de 2, 3 y 4 anillos que en los demás tratamientos estudiados (García-Sánchez, Košnář, Mercl, Aranda, & Tlustoš, 2018). De la misma forma se han estudiado en matrices con altos porcentajes de metales pesados, arrojando muy buenos resultados; sin embargo esta tecnología tiene varias falencias, una de ellas es la concerniente al tiempo de tratamiento que en promedio es extenso (Cristaldi et al., 2017; Petrová, Rezek, Soudek, & Vaněk, 2017).

Otro proceso biológico ampliamente estudiado es la biorremediación y sus tecnologías dando grandes avances en la remoción de polución en general (pesticidas, metales pesados, entre otros), pero con un gran énfasis en hidrocarburos (A. Alvarez & Polti, 2014).

Desde principios de 1990, la atenuación natural empezó a generar interés para el manejo de sitios degradados, especialmente en Estados Unidos, lo que llevó a que otros países exploraran este concepto y actualmente esta tecnología es reconocida como un mecanismo económico y viable para remediación de ecosistemas en Estados Unidos y países de Europa(Declercq, Cappuyns, & Duclos, 2012).

Así mismo, se han tratado otras tecnologías como lo son la bioaumentación, bioestimulación y recientemente se han acoplado estas dos. Un caso de esto es el estudio realizado a un suelo impactado con hidrocarburos, donde se evaluaron 3 enfoques, atenuación natural, landfarming y bioaumentación (bacterias autóctonas del suelo) + landfarming durante un periodo de 90 días, con porcentajes de remoción de 57%, 70% y 86% respectivamente, concluyendo que el incremento de población bacteriana aumenta la remoción biológica(Guarino, Spada, & Sciarrillo, 2017). Adicionalmente Lladó et al. 2012 estudió estrategias de bioaumentación y bioestimulación para un suelo contaminado con hidrocarburos, empleando consorcios microbianos hidrocarburoclastas, adición de nutrientes y adición de cepa del hongo *T. Versicolor*, durante un período de 200 días en el cual se obtuvieron porcentajes de remoción del 30% al 50% donde el mejor tratamiento resultante fue bioaumentación con *T. Versicolor* (Lladó, Solanas, de Lapuente, Borràs, & Viñas, 2012).

De igual forma, Safdari et al. 2018 comparó a escala de laboratorio atenuación natural, bioestimulación (oxígeno y nutrientes), bioaumentación (aislados de bacterias hidrocarburoclastas) y una combinación de bioestimulación con bioaumentación para un suelo con presencia de hidrocarburo en una concentración de 20000 mg/kg (ppm), en este estudio, los resultados de degradación fueron de 51,4%, 81,9%, 62,89% y 89,7% respectivamente, demostrando así que el mejor tratamiento fue la combinación de bioestimulación y bioaumentación(Safdari et al., 2018).

En este contexto, los estudios realizados muestran un alto porcentaje de remoción de hidrocarburos, pero con la intención de reducir tiempos de operación y aumentar porcentajes de degradación se ha generado interés en la aplicación de compuestos con propiedades específicas, como lo son los surfactantes, ácidos orgánicos, o también la implementación de microorganismos capaces de producir biosurfactantes; simplemente buscando aumentar la biodisponibilidad del contaminante (crudo) con lo cual se optimiza la remoción(Riojas, Gortáres, Mondaca, & Balderas, 2011).

En el caso de los biosurfactantes, Xia et al. 2014 obtuvo resultados alentadores para remediación ambiental de la industria del petróleo, gracias al microorganismo *Pseudomonas sp. WJ16*, con el cual realizaba el proceso de degradación de alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como n-dodecano, fluoreno, pireno, donde demostró la capacidad de producir biosurfactantes como lipopéptidos cíclicos, con los cuales obtuvo 92,5% de eficiencia en procesos de lavado de crudo pesado(Xia et al., 2014). También se estudió mediante pruebas de lavado, desarrolladas con biosurfactantes (ramnolípidos) y surfactantes sintéticos, su influencia en la remoción de crudo en dos

suelos con concentraciones de 3000 ppm y 9000 ppm, presentando porcentajes de remoción de 4% a 23% y de 35% a 63% respectivamente, mostrando así mayor eficiencia con mayor presencia de hidrocarburos pero esta no varía mucho al modificar el tiempo de contacto(Lai, Huang, Wei, & Chang, 2009). Por otro lado, Cheng et al. 2017 realizó una revisión exhaustiva de los trabajos donde se han implementado surfactantes sintéticos para biodegradar compuestos orgánicos hidrofóbicos, centrándose en el Tween 80, concluyendo finalmente que los tratamientos con presencia de Tween 80 muestran mejor desempeño, sin embargo afirma que la mayoría han sido solo a escala de laboratorio con lo cual podrían presentar inconvenientes al momento de llevarlos a escala de campo(M. Cheng et al., 2017).

De igual manera, García et al. 2007 realizó un estudio que demostró un 50% de remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) mediante lavado con ácidos húmicos (extracto de Leonardita)(García, Ferrera, Poggi, Meléndez, & Barrera, 2007), simultáneamente otro estudio empleo ácidos húmicos procedentes de Leonardita en procesos de recuperación de suelos de alta salinidad, influyendo en el mejoramiento de las propiedades físicas del mismo, con disminución de la compactación(Zuñiga, Osorio, Cuero, & Peña, 2011) y adicionalmente se estudió el efecto de los ácidos húmicos, comprobando un resultado significativo en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) con rangos superiores al 70%(García, 2008). El uso de aditivos como los agentes surfactantes, ácidos orgánicos u otros en conjunto para intervenir un sitio específico, se hace con la intención de crear una cooperación entre los mismos y los microorganismos presentes que son pieza clave en el proceso de degradación(Riojas et al., 2011).

Los tratamientos de biorremediación en sitios degradados por hidrocarburos ha sido ampliamente estudiado pero la alta polución debida a los fluidos y residuos de perforación base aceite no se ha tratado lo suficiente, sin embargo en Lagos, Nigeria se llevó a cabo un estudio donde cepas bacterianas hidrocarburoclastas fueron aisladas de un suelo contaminado con diésel y empleadas en degradación de fluidos de perforación base aceite con resultados de 92,3% al 99,4% con lo cual se pudo concluir su utilidad en biorremediación en ambientes tropicales impactados con lodos base aceite(Agwu, Ilori, & Nwachukwu, 2013), de igual manera Alavi et al. 2014 trabajó dos relaciones C:N:P en suelo con presencia de fluidos de perforación base aceite obteniendo degradaciones de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) de 90,5% a 92,5%, con lo cual afirmo la eficiencia de los procesos biológicos(Alavi et al., 2014).

Así mismo, se trabajó con un lodo de perforación base aceite que fue homogenizado con nutrientes y un agente "Bulking", variando su relación, este estudio obtuvo tasas de degradación del 98% en solo 3 semanas y 99,5% en 7 semanas de tratamiento(Osei-Twumasi et al., 2016), por su parte, Rojas et al. 2007 implementó un proceso de biorremediación exsitu a escala de campo al sur este de México en un sitio contaminado con fluido de perforación, mediante compostaje en 4 biopilas de 1 tonelada cada una (empleando 3 con adición de nutrientes y un agente "Bulking" que en este caso fue

hojarasca y finalmente una sin adiciones) durante un periodo de 180 días, las biopilas obtuvieron porcentajes de degradación de hidrocarburos totales del petróleo superior al 94% y en la biopila "control" se obtuvo apenas un 76% de degradación, con estos resultados se corrobora la importancia de un agente como la hojarasca y la adición de nutrientes (Rojas-Avelizapa, Roldán-Carrillo, Zegarra-Martínez, Muñoz-Colunga, & Fernández-Linares, 2007).

3. Marco teórico

En este capítulo se tratarán los conceptos y definiciones más importantes relacionadas con el presente estudio para una mejor comprensión de los fenómenos y procesos que ocurren en un tratamiento de biorremediación en términos generales.

3.1 Suelo

Al momento de definir el suelo se pueden llegar a confusiones, debido a su gran utilidad en los diferentes campos del saber. Por ejemplo el suelo para un Ingeniero Civil es simplemente el lugar donde posiciona las estructuras y/o edificaciones(D. Jaramillo, 2014), para un Geólogo, este medio es simplemente una capa que cubre la mayoría de la superficie terrestre(Tarback & Lutgens, 2010). Sin embargo la definición más acorde con el presente estudio es la dada por el Soil Survey Staff (2010): *“El suelo es un cuerpo natural compuesto de sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que ocurre en la superficie de la tierra, ocupa un espacio y se caracteriza o porque tiene horizontes o capas que se diferencian del material inicial como resultado de las adiciones, pérdidas, traslocaciones y transformaciones de energía y materia o porque es capaz de soportar plantas arraigadas en un ambiente natural”*(D. Jaramillo, 2014; Daniel Jaramillo, 2002; Soil Survey Staff, 2010).

Con la anterior definición se concreta que el suelo como tal tiene factores y procesos que ayudan su formación de manera simultánea proporcionando un entorno adecuado, lo que se conoce como pedogénesis; los factores de formación del suelo son los siguientes:

3.1.1 Clima

Se considera como el de mayor influencia, sus principales componentes en la formación y/o transformación del suelo son la temperatura y las precipitaciones, sin embargo el viento presenta condicionamientos en los procesos de evaporación del agua. Es importante resaltar que alteraciones en la temperatura y las precipitaciones resultan en predominancia de procesos de meteorización física o química realizando cambios en la velocidad y profundidad del proceso(D. Jaramillo, 2014; Tarback & Lutgens, 2010).De manera adicional con el presente cambio climático, se están dando algunas consecuencias en la transformación de los suelos, como por ejemplo, desecación de arcillas debido a veranos secos, aumento de la pérdida por evapotranspiración y posibles inundaciones de zonas costeras, entre otros(Gutiérrez, 2008).

3.1.2 Material parental

Este factor se compone de los materiales que le dan origen al suelo, como sedimentos no consolidados y saprolitos que son producto de alteraciones de las rocas, los cuales se clasifican en 3 grupos, descritos a continuación:

- **Rocas ígneas**

Son aquellas formadas por el comportamiento del magma, expresado en 2 procesos, primero el enfriamiento, que determinará la textura de la roca (tipo, forma, arreglo espacial y cristalinidad de sus componentes), seguido de la fragmentación que es el proceso de cambio de fase(D. Jaramillo, 2014)

De igual manera, el magma se puede solidificar bajo diferentes condiciones de temperatura y presión, dando como resultado 3 subtipos de rocas, rocas intrusivas que son producto de magma solidificado a grandes profundidades y altas temperaturas, por lo tanto conllevan largos periodos de tiempo dando como resultado cristales grandes y bien definidos, el segundo subtipo son las rocas extrusivas que son resultado de magma solidificado en la superficie terrestre, con tiempos muy cortos, por lo cual la roca desarrolla cristales no observables conocido como textura afanítica y el tercer subtipo son las rocas hipoabisales, que son producto de magma enfriado en condiciones intermedias de profundidad, resultando en cristales grandes conocidos como fenocristales normalmente rodeados de una capa de cristales con textura afanítica, este tipo de rocas se conocen como pórfidos(D. Jaramillo, 2014; Tarbuck & Lutgens, 2010).

- **Rocas sedimentarias**

Se forman por litificación de sedimentos no consolidados, estos normalmente son producto de acumulación de rocas preexistentes erosionadas, presencia de restos orgánicos y movimiento de compuestos químicos. Se clasifican en Clásticas, conformadas por los dos primeros tipos de sedimentos y en No clásticas, conformadas por sedimentos de compuestos químicos(D. Jaramillo, 2014; Tarbuck & Lutgens, 2010).

- **Rocas Metamórficas**

Son resultantes de rocas preexistentes sometidas a condiciones de altas temperaturas y presiones, obteniendo un reordenamiento y/o separación de los minerales en ellas.

La textura y composición mineralógica del material parental tienen alta incidencia en la formación de un suelo, estableciendo propiedades como su comportamiento hídrico, resistencia a la erosión, fertilidad y cantidad y distribución de los minerales(D. Jaramillo, 2014).

3.1.3 Organismos

El suelo posee una biota variada compuesta principalmente por micro, meso y macroorganismos, animales y vegetales. Que entre sus funciones está aportar y modificar materia orgánica, participar activamente en los ciclos biogeoquímicos de variados elementos e interactuar con los minerales presentes. Esta biota puede ser clasificada en 3 grupos de manera general, Bacteria (Eubacterias), Archae (Arqueobacterias) y Eucarya (Eucariotas). Paralelamente, dependiendo de la naturaleza y tipo de suelo existen variados organismos que se pueden definir de la siguiente manera:

- Según la obtención de energía se presentan Fotótrofos que utilizan la luz como fuente de energía, Litótrofos que la obtienen de oxidación de compuestos inorgánicos y Organótrofos que oxidan compuestos orgánicos para obtener energía.
- Según la fuente de carbono implementada se dividen en Autótrofos que usan el dióxido de carbono (CO₂) y Heterótrofos que utilizan compuestos orgánicos.
- Según los requerimientos de oxígeno, existen Aerobios que requieren oxígeno, Anaerobios que se inhiben con presencia de oxígeno, Microaerófilos que tienen bajos requerimientos de oxígeno y Anaeróbicos facultativos que persisten bajo condiciones con o sin oxígeno.

3.1.4 Relieve

Se conoce como el conglomerado de geoformas presentes en la superficie, con diferencias de altitud. Existen agentes moldeadores del relieve que son capaces de movilizar y descargar materiales en la superficie, algunos son la lluvia, gravedad, hielo y viento entre otros. Estos van de la mano de procesos como la meteorización, remoción, transporte y depositación(Gutiérrez, 2008; D. Jaramillo, 2014).

La vertiente es un atributo habitual e importante del relieve, debido que sus características como forma, longitud, gradiente y rugosidad colaboran en la formación de suelo, además de intervenir en procesos de erosión y drenaje del mismo; normalmente el suelo es más grueso y desarrollado en la zona inferior de la vertiente(D. Jaramillo, 2014).

3.1.5 Tiempo

Este factor varía según el material parental presente, con períodos desde 100 años hasta miles o millones de años como los suelos más comunes. Al clasificar los suelos según el desarrollo del perfil, se tiene que los suelos jóvenes no presentan una diferencia clara de horizontes, los suelos maduros posee horizontes claramente definidos y los suelos viejos, normalmente son aquellos sin aireación debido a la alta presencia de arcillas. Con esto se afirma que a mayor evolución del suelo presenta menor fertilidad, ya que se aumenta la

remoción de nutrientes y la formación de minerales con una drástica reducción de calidad nutricional para la vida vegetal(D. Jaramillo, 2014).

3.2 Generalidades de la industria del petróleo

Actualmente debido a la creciente población humana hay unos requerimientos de energía desmedidos, estos son suplidos en su mayoría por la industria petrolera, convirtiéndola en uno de los sectores más grandes de la economía mundial, sin embargo hoy en día tiene mayores controles ambientales ya que durante el ciclo de operaciones (exploración, perforación, producción, transporte/refinación y distribución) se producen variados tipos de desechos altamente contaminantes, en gran parte como consecuencia a la falta de sostenibilidad en sus procesos. Este término tiene variadas connotaciones, pero en un contexto ambiental internacional, se basa en la noción que los recursos del planeta son finitos y por ende no se debe afectar a la biosfera con procesos invasivos. Esta sostenibilidad conlleva a reducciones de los gases de invernadero, minimizar los problemas de salud (aire más limpio) y cero residuos de las operaciones de petróleo entre otros(Khan & Islam, 2007).

3.2.1 Etapas de un proyecto de extracción de hidrocarburos

Un proyecto de esta industria está centrado normalmente en extraer la mayoría de barriles de petróleo en el menor tiempo posible (factor económico) dejando de lado la creciente preocupación ambiental. La mayoría de estos proyectos se componen de cuatro etapas generales, tales como, Exploración, perforación, producción y transporte/refinación.

- **Exploración**

Su función principal es obtener una imagen del yacimiento en estudio, mediante la colección de información geológica y operaciones de sísmica. Con esto se decide la ubicación con mayor probabilidad de presencia de hidrocarburos a una concentración económicamente explotable(Khan & Islam, 2007). En una operación de sísmica, se sitúa una línea de receptores de información llamados geófonos para aplicaciones en tierra e hidrófonos para operaciones acuáticas (Operaciones Offshore), las técnicas de exploración sísmica más populares son las de 3 y 2 dimensiones (3D y 2D).

Para sísmica terrestre se usa dinamita o equipos Vibroseis para poder generar las ondas de energía y ser enviadas posteriormente al estrato en estudio, con la ayuda de los geófonos se obtiene la energía como ondas sísmicas de reflexión provenientes del subsuelo, finalmente estas son convertidas en impulsos eléctricos y enviadas a un computador donde se procesa e interpreta para obtener una imagen geológica del subsuelo. Para sísmica costa afuera (Offshore) se hace uso de un barco con remolque y un gran número de pistolas de aire para generar la onda inicial que se reflejara en el suelo marino y obtener una imagen de las formaciones geológicas marinas. Un trabajo de

sísmica puede tener una duración de 20 a 30 días pero genera gran contaminación auditiva debido a las explosiones y ondas generadas(Khan & Islam, 2007).

- **Perforación**

Este paso es el más costoso y complicado, incluye retrasos en las misiones y en algunos casos extremos fatalidades (Blow out). Aunque la mayoría de técnicas de perforación usadas en la actualidad, fueron propuestas y desarrolladas en el siglo pasado, aún presentan inconvenientes, como el tiempo de operación, la falta de precisión en pozos verticales y horizontales y formación de sello (cake) alrededor del pozo, entre otros(Khan & Islam, 2007).

El proceso de perforación inicia luego de obtener la ubicación mediante la sísmica, existen en general, dos tipos de pozos, exploratorios y de producción, los primeros se realizan con diámetros menores, solo para confirmar la presencia de hidrocarburos. Para cualquiera de los dos pozos se empieza escogiendo la torre con base en las condiciones ambientales y geotécnicas del lugar (hay dispositivos con torres especializadas para perforaciones costa afuera), junto a la sarta de perforación y broca a usar dependiendo de las características del yacimiento (profundidad, dirección, orientación del pozo y demás); luego dependiendo de la ubicación del estrato productor se especifica la profundidad para cementar y revestir el pozo, con la intención de evitar colapsos dentro del mismo, la cual se realiza normalmente antes de los 1000 m, de igual manera se debe evaluar la selección del fluido de perforación óptimo para el yacimiento en cuestión, al finalizar la perforación se realizan los procedimientos de terminación y acondicionamiento del pozo(Khan & Islam, 2007; Restrepo, 1999). El tiempo empleado normalmente para realizar la perforación de un pozo dependiendo de su dirección y profundidad es de 3 a 5 años, además durante el proceso se obtienen muchos desechos que en su mayoría son fluidos y residuos de perforación, pero también se presentan arenas de producción, fluidos de tratamiento de pozo, salmuera, descargas accidentales como derrames de crudo, químicos y demás(Khan & Islam, 2007).

- **Producción**

Luego del proceso de perforación, se realiza una evaluación y planeación para encontrar la mejor manera de producir los hidrocarburos y desarrollar el campo. Para dicho proceso de extracción, en primera medida se aprovecha la presión natural del yacimiento que usualmente tiene capacidad para subir hasta superficie el crudo y gas, sin embargo, algunos no poseen presión suficiente para transportarlo hasta superficie, por lo tanto se realizan operaciones de recuperación mejorada o levantamiento artificial, estas albergan técnicas como inyección de vapor de agua, bombeo mecánico, uso de balancines (varillas), entre otros(Khan & Islam, 2007). El tiempo normal de producción de un pozo es de 25 a 35 años dependiendo de sus reservas, dando también residuos peligrosos como agua y arenas de producción, salmueras, descargas accidentales de aceite y demás(Khan & Islam, 2007).

- **Transporte/Refinación**

Posterior a la obtención del petróleo crudo y/o gas en superficie, se traslada hacia los centros de refinación. Esto se realiza en su mayoría mediante oleoductos (otros medios son buques tanques y transporte por carretera), que son sistemas específicos, adaptados al volumen de producción de los yacimientos y sus reservas variando el diámetro (COLFECAR, 2014; Khan & Islam, 2007). En Colombia existen oleoductos de 4 a 36 pulgadas de diámetro, ubicadas sobre o bajo tierra (profundidades de 1,2 a 2 metros) atravesando el país (COLFECAR, 2014; Upne, 2005).

Cuando el petróleo crudo llega a la refinería, se lleva a cabo su transformación, mediante rupturas y recombinación de las moléculas del material con el uso de procesos térmicos y químicos, para crear productos de valor agregado como son los diferentes combustibles (gasolina, kerosene, ACPM, GLP y Gasoil entre otros) (Khan & Islam, 2007; Upne, 2005). Finalmente se realiza el último paso del proceso, que es la distribución, donde se transporta nuevamente el producto final para su comercialización y posterior uso.

Durante los procesos de transporte, refinación y distribución se producen una amplia gama de residuos (partículas); por ejemplo, por cada tonelada de petróleo procesado, se producirán en promedio 0,8 kg de material particulado, 1,3 kg de óxidos de azufre, 0,3 kg de óxidos de nitrógeno, 1 kg de Compuestos orgánicos volátiles (COV) y 2,5 g de benceno, tolueno y xileno (BTEX) (Khan & Islam, 2007; World Bank, 1998).

3.2.2 Hidrocarburos

Son compuestos orgánicos presentes ampliamente en la naturaleza, conformados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno (McMurry, 2008). Estos poseen diferentes clasificaciones, una de ellas es según su origen donde se presentan hidrocarburos biogénicos provenientes de procesos biológicos, hidrocarburos pirogénicos resultantes de combustiones incompletas de materia orgánica e hidrocarburos petrogénicos (petróleo crudo) que son aquellos provenientes de la degradación de materia orgánica a condiciones de alta temperatura y presión durante un periodo largo de tiempo (Trejos, 2017).

El petróleo crudo está compuesto hasta un 99% aproximadamente de hidrocarburos de distintos tipos y el resto se compone de contaminantes orgánicos e inorgánicos tales como presencia de compuestos sulfurados, oxigenados, nitrogenados y metales (hierro, níquel y vanadio) (Cristancho & Hoyos, 2008). Los hidrocarburos presentes en un petróleo crudo se pueden clasificar según su tipo:

- **Parafinas**

Son hidrocarburos de enlace simple saturados (alcanos), con un grupo de naturaleza volátil, compuesto por n-alcanos y alcanos ramificados (isoprenoides) con tamaño hasta C₁₀ y otro grupo de naturaleza no volátil, conformado principalmente por n-alcanos e isoprenoides con tamaños de molécula desde C₁₀ hasta C₄₀. (Poma, 2004; Torres & Zuluaga, 2009)

- **Naftenos**

Este grupo está constituido por compuestos alicíclicos que son alcanos cíclicos saturados con gran presencia de grupos metil, denominados cicloparafinas o cicloalcanos(Poma, 2004; Torres & Zuluaga, 2009)

- **Olefinas**

Son hidrocarburos alifáticos insaturados (alquenos y alquinos), tiene muy poca presencia en el crudo dando concentraciones traza(Torres & Zuluaga, 2009).

- **Aromáticos**

Son hidrocarburos con propiedades asociadas al núcleo o anillo del Benceno, que contiene 6 grupos de carbono-hidrógeno unidos formando un hexágono; debido a su condición de insaturación poseen alta reactividad(P. Alvarez & Illman, 2006; Organización Internacional del Trabajo, 2012; Poma, 2004; Torres & Zuluaga, 2009). Entre sus variados componentes se encuentran además el xileno, tolueno y etilbenceno que conforman el denominado BTEX, que posee solubilidad en agua y por tanto capacidad de ser transportado en aguas subterráneas(P. Alvarez & Illman, 2006), además, gracias a su estabilidad termodinámica y su facilidad de ser absorbido en el suelo tiende a acumularse en el ambiente(Koul & Fulekar, 2013). Por lo tanto se convierte en un peligroso contaminante, con alta toxicidad y propiedades cancerígenas y mutagénicas(P. Alvarez & Illman, 2006; Koul & Fulekar, 2013; Organización Internacional del Trabajo, 2012).

3.2.3 Fluidos de perforación

Los fluidos de perforación son una parte vital en la industria del petróleo, se definen como una fase coloidal acuosa conformada de un fluido base, una arcilla y varios aditivos químicos que es circulada desde superficie hasta el estrato perforado y nuevamente hasta superficie donde es tratado debido a su alto costo económico para mantener sus propiedades y posteriormente es nuevamente recirculado(Khan & Islam, 2007; Sierra, 2000). Estos lodos han estado presentes desde el inicio de la industria y como consecuencia a la gran trayectoria de la misma, se han encontrado un alto número de tipos de yacimientos con diferentes propiedades(Khan & Islam, 2007; Restrepo, 1999), por lo tanto empezaron a diversificarse obteniendo resultados satisfactorios. Entre las numerosas funciones de un fluido de perforación (Hernández, 2010; Restrepo, 1999; Sierra, 2000) se encuentran:

- Transporte y suspensión de recortes de las formaciones perforadas.
- Control de presiones del subsuelo.
- Lubricación y enfriamiento de la broca y la sarta de perforación.
- Soporte de las paredes del hoyo.
- Suspensión de la sarta de perforación y de tuberías de revestimiento.
- Servir como medio apropiado para operaciones de registro eléctrico.

- Transmisión de fuerza hidráulica.

Con base en lo anterior, se pueden diferenciar 3 tipos de fluidos de perforación:

- **Fluido de perforación base agua**

Fue el primer fluido usado, su composición es simple, compuesto principalmente por agua, bentonita, minerales de alta densidad para obtener peso y presencia de químicos para estabilizar el fluido, reducir corrosión de los equipos y disminuir la actividad bacteriana durante su uso (Caenn et al., 2011b; Hernández, 2010).

- **Fluido de perforación base aceite**

Fueron desarrollados para mejorar algunas fallencias presentes en los fluidos base agua, por ejemplo disolver sales durante la perforación, interferir con el flujo de crudo y gas a través de los poros de la roca, promover la desintegración y dispersión de arcillas y el efecto de la corrosión en los equipos. De forma análoga presenta algunas ventajas como mejor lubricación, mayores puntos de ebullición, menores puntos de congelación y mejor desempeño en secciones más profundas del pozo y en perforaciones direccional (ángulo de desviación), sin embargo tiene un alto costo de preparación (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007). En general este fluido se compone de barita, aditivos químicos y una base aceite que puede ser parafinas (alcanos), olefinas (alquenos) o ésteres (Caenn et al., 2011b; Hernández, 2010).

- **Fluido de perforación sintéticos**

Se emplearon para reemplazar el uso de los fluidos base aceite en operaciones costa afuera (offshore), debido a las nuevas reglamentaciones que los prohíben ya que anteriormente los cortes y residuos eran depositados directamente en el mar sin tratamiento previo. Su base es un aceite "sintético" con características similares al aceite mineral y a los hidrocarburos normalmente usados, pero sin las propiedades tóxicas de los hidrocarburos aromáticos (Caenn et al., 2011b; Sierra, 2000).

A continuación en la tabla 1 se pueden observar algunos aditivos usados normalmente con su respectiva función (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007).

Tabla 1. Aditivos de Fluidos de perforación

Función	Compuestos
Fluidos Base	Agua, Diésel, Aceite mineral, Montmorillonita de sodio, Hidróxido de sodio.
Aditivos	Lignosulfonato, Asbesto, Fosfatos, Lignito, Estearato de aluminio.
Control de densidad	Barita (Sulfato de Bario), Mineral de ferrofosfato, Calcita siderita.

Control de pérdida de fluido	Almidón, Polímero de celulosa polianiónica, Goma xanthum, Carboximtil-celulosa sódica, lignito.
Perdida de circulación	Cáscaras de nuez de tierra, Micas, Celofán molida, Diatomita, Cáscaras de semillas de algodón, Papel molido o triturado.
Control de óxido y corrosión	Sulfito de sodio, Cromato de zinc, Aminas, sodio control de óxido, Fosfatos, bactericidas.
Solventes	Isopropanol, Glicerol, Isobutano, Éster, Diésel
Lubricantes	Asfaltenos, Diésel, jabones grasos, perlas de vidrio, jabón de colofonia, Gilsonita, Glicerol.

Nota: Tomado de (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007)

De forma análoga se muestra en la tabla 2 los compuestos que integran de forma general un fluido de perforación.

Tabla 2. Composición general de un fluido de perforación

Base Agua	Base aceite	Sintético
• Bentonita	• Barita	• Aceite sintético
• Barita	• Aceite Base	• Aditivos
• Soda Cáustica	• Cloruro de Calcio	
• Bicarbonato de sodio	• Emulsificante	
• Agua de mar o Agua fresca	• Agente de control de filtrado	
• Polímeros orgánicos	• Lima	
• Aditivos	• Viscosificante	

Nota: Tomado de (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007)

Estos fluidos, al momento de subir a superficie llegan con cortes y residuos de perforación, que son simplemente pequeñas partículas de roca del tamaño de arena y grava con presencia de hidrocarburos, agua, sales solubles como cloruros, sulfatos y además metales pesados, algunos reportan que su volumen puede alcanzar hasta 1200 m³ en un pozo exploratorio estándar (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007). En este sentido los residuos de perforación junto a los fluidos descartados, se han convertido en una preocupación ambiental mayor (Caenn et al., 2011a). Las siguientes opciones son las más usadas al momento de tratar y/o disponer estos materiales.

- **Disponer en sitio**

Los cortes y fluidos son dejados en el lugar, normalmente en una piscina o simplemente sobre la superficie (Caenn et al., 2011a; Rojas-Avelizapa et al., 2007).

- **Extender en tierra**

Los residuos son dejados en el sitio o transportados a un relleno y cubiertos con material benigno(Caenn et al., 2011a; Mkpaooro, Okpokwasili, & Joel, 2015).

- **Enterramiento**

Los materiales son enterrados en un solo lugar o en sitios separados con la ayuda de un proceso de solidificación(Ball et al., 2012; Caenn et al., 2011a).

- **Desorción térmica**

Tratamiento físico para remediar suelos aceitosos, mediante el secado, implementando altas temperaturas (200 a 600°C) que evaporan los hidrocarburos presentes de la mezcla, posteriormente estos se recolectan en forma de cenizas y son procesadas para una correcta disposición final(Adekunle et al., 2013; Hamza et al., 2008; Mkpaooro et al., 2015).

- **Incineración**

Este método físico emplea temperaturas de 1200 a 1500°C que son superiores al implementado en el proceso de desorción. Con este método se busca oxidar a los hidrocarburos presentes, produciendo cenizas sólidas y vapor que debe pasar por un oxidante, depurador húmedo y una cámara antes de ser liberado al ambiente(Adekunle et al., 2013; Ball et al., 2012).

- **Oxidación química**

Para este proceso se emplean compuestos químicos para oxidar, como permanganato de potasio, persulfato de sodio, mezclas de peróxido-hidrógeno. Su principal falencia es la incapacidad de uso en todos los sitios(Ayyaswami & Vishwanathan, 2010).

- **Reinyección de cortes y residuos**

Es un proceso donde se inyectan los residuos y fluidos de perforación en pozos abandonados a presiones que fracturan la formación que recibe la suspensión, con la intención que este entre en las fracturas inducidas y quede confinado allí(Ball et al., 2012; Caenn et al., 2011a; Mkpaooro et al., 2015; Rojas-Avelizapa et al., 2007).

- **Procesos biológicos**

Se implementan procesos como la fitorremediación donde se usan plantas para acumular y/o degradar los contaminantes orgánicos e inorgánicos mediante procesos bioquímicos, también se han usado tecnologías de biorremediación para convertir estos materiales potencialmente peligrosos en suelo fértil para uso agrícola(Adekunle et al., 2013; Ayyaswami & Vishwanathan, 2010; Hamza et al., 2008; Mkpaooro et al., 2015; Rojas-Avelizapa et al., 2007).

3.3 Biorremediación

Es una tecnología que desarrolla y aplica estrategias de limpieza al medio ambiente basándose en procesos biológicos, para remover los contaminantes peligrosos presentes en su mayoría desde el siglo XVIII, en el suelo y acuíferos. Dicha tecnología conforma la Ingeniería de la remediación y esta a su vez la Ingeniería Ambiental (Alexander, 1999; Arrieta, 2011; Olajire, 2014). Su principal objetivo es conocer los procesos de tratamiento eficientes que puedan alcanzar los estándares de limpieza, dependiendo de los requerimientos mínimos de los ciudadanos y su uso, además de proveer una adecuada seguridad y salud para los trabajadores que instalan, operan y mantienen los sistemas de biorremediación (Rittman & McCarty, 2001).

Ha demostrado un gran rendimiento al momento de tratar sitios contaminados con hidrocarburos, apoyándose en el uso de consorcios bacterianos identificados como degradadores eficaces ya que poseen capacidad de adaptación y amortiguación (Alexander, 1999; Roy et al., 2014), además de un buen diseño y monitoreo de factores físicos y químicos que intervienen (Mulas, 2008), debido que el suelo es un sistema dinámico con propiedades que pueden afectar el tratamiento de biorremediación (Hatzikioseyan, 2010; Iturbe, 2010). Se puede afirmar que en el caso de los hidrocarburos, se sigue un orden de degradación, que está condicionado por la complejidad de la molécula, en otras palabras, a mayor complejidad se requiere un mayor tiempo para llevar a cabo el proceso (P. Alvarez & Illman, 2006; Olajire, 2014; Rittman & McCarty, 2001).

Cabe resaltar que aunque esta tecnología puede ser usada en cualquier condición, es vital conocer el lugar de aplicación para estudiar las condiciones del entorno y sus propiedades, con la intención de realizar un buen diseño. Entre los tratamientos más implementados de esta tecnología, están:

3.3.1 Atenuación natural

Es un método intrínseco de remediación pasiva, basado en procesos físicos, químicos y biológicos como biodegradación, sorción, advección, evaporación, dilución, dispersión y reacciones químicas, que suceden de manera natural en el ambiente gracias a su capacidad de resiliencia, para evitar y reducir la migración, cantidad, toxicidad, movilidad y concentración de los contaminantes en el suelo y/o acuíferos (Hatzikioseyan, 2010; Mulas, 2008; Rittman & McCarty, 2001). Esta tecnología natural posee 4 vías principales para tratar la polución presente (Mulas, 2008; Rincón, 2004):

- Mediante procesos físicos se puede adherir o sorber los materiales peligrosos en la matriz del suelo, esto aunque no realiza un proceso de remoción como tal, ayuda a impedir su transporte hacia aguas subterráneas.

- En ocasiones, los contaminantes que no tienen la capacidad de ser retenidos en la matriz sólida, son transportados hasta llegar al agua subterránea y por tanto mezclarse con esta, lo cual reduce el nivel de contaminación en el suelo por dilución.
- Debido a las propiedades volátiles de algunos compuestos, al momento de llegar al suelo, por procesos de evaporación y dispersión, se pueden escapar al aire donde gracias a la presencia de la luz solar se puede dar fotodegradación.
- La presencia de microorganismos, que utilizan las sustancias químicas nocivas como fuente principal de nutrientes, lo cual resulta en compuestos inocuos, agua y dióxido de carbono (CO₂) (biodegradación).

La atenuación natural puede reducir los riesgos de un amplio número de sustancias orgánicas e inorgánicas peligrosas, de manera autónoma, pero se debe haber eliminado la fuente de contaminación con anterioridad, para que mediante los procesos naturales se pueda reducir la cantidad presente en la matriz sólida o líquida (Rincón, 2004; Rittman & McCarty, 2001). Sin embargo, es necesario demostrar su papel limpiador mediante pruebas de concentración, construyendo así un gradiente, con la adquisición de datos geoquímicos del sitio para proveer indicios de la degradación y realizando pruebas microbiológicas para comprobar la existencia de microorganismos que catalizan la degradación de forma biológica (P. Alvarez & Illman, 2006).

Entre las ventajas de esta tecnología se encuentra su autonomía de desempeño por lo tanto no es necesario realizar excavaciones o construcciones (únicamente para eliminar la fuente) ni presencia de trabajadores para realizar labores, con lo cual tiene muy bajo costo económico y ambiental, por otro lado, al ser un proceso natural sin ayuda alguna externa, emplea largos periodos de tiempo (meses y hasta años) por ende, no es una opción viable para sitios con grandes cantidades de contaminantes (P. Alvarez & Illman, 2006; Declercq et al., 2012; Hatzikioseyan, 2010; Mulas, 2008; Rincón, 2004).

3.3.2 Bioaumentación

Esta técnica se basa en la introducción de microorganismos alóctonos especializados para mejorar la capacidad del suelo de degradar la polución presente, gracias al aumento de biomasa (A. Alvarez & Polti, 2014; Hatzikioseyan, 2010; Mulas, 2008). Lo anterior basándose en el principio ecológico que los organismos autóctonos no desarrollan fácilmente la capacidad de biodegradar contaminantes como un nicho ecológico y además que el cambio en las propiedades físicas y químicas del suelo podrían producir estrés fisiológico en esta población (A. Alvarez & Polti, 2014; Gómez, 2009; Osorio, 2015), por lo tanto la presencia del inóculo promueve la competencia y a su vez la biodegradación (P. Alvarez & Illman, 2006).

Para tener un buen desempeño, se deben tener en cuenta 3 factores generales, una población capaz de competir en el nuevo ambiente, que los microorganismos inoculados mantengan sus capacidades sobresalientes de degradación con las nuevas condiciones y

garantizarles la interacción con el material en cuestión(Berg, Gruden, & Hutzinger, 2010; Hatzikioseyan, 2010). Esta tecnología ha demostrado grandes tasas de remoción de hidrocarburos empleando tiempos cortos y con bajos costos económicos(A. Alvarez & Polti, 2014; P. Alvarez & Illman, 2006; Heipieper, 2007), sin embargo, existen algunos inconvenientes al aplicarla a escala de campo, debido a los procesos de transporte naturales del suelo con lo cual se aumentaría la dificultad de asegurar los factores generales necesarios anteriormente mencionados(Rittman & McCarty, 2001).

3.3.3 Bioestimulación

Tecnología basada en la estimulación de la capacidad de degradación de la población autóctona mediante la modificación de las condiciones ambientales, que en su forma más básica se alcanza con la adición de donadores o aceptores de electrones: nutrientes y oxígeno (proceso aerobio)(Hatzikioseyan, 2010; Sheppard et al., 2014; Shukla, Mangwani, Rao, & Das, 2014); sin embargo en algunas ocasiones donde el contaminante tiene baja capacidad de solubilizarse en el suelo, se hace necesario la presencia de emulsificantes o surfactantes para asegurar su biodisponibilidad(Dellagnezze et al., 2014). Lo anterior se justifica con el desbalance de la relación C:N:P principalmente dada por la presencia del agente peligroso en la matriz(Ekwuabu, Chikere, & Akaranta, 2016).

A pesar de los numerosos casos de éxito en la remoción principalmente de hidrocarburos en matrices sólidas(Hatzikioseyan, 2010), esta técnica presenta algunas limitaciones, por ejemplo restricciones de uso en suelos arcillosos, estratificados o demasiado heterogéneos ya que se observan limitaciones en la transferencia de oxígeno, implementación en suelos con poca o nula población microbiana y en casos donde se puedan movilizar los contaminantes(Mulas, 2008).

3.4 Factores físicos y químicos que intervienen en la biorremediación

La biorremediación es una tecnología biológica con gran eficiencia, ya que puede degradar casi cualquier residuo, dada las condiciones correctas. Entre los factores más influyentes se encuentran:

3.4.1 Temperatura

Variable importante en el metabolismo de los microorganismos, debido que al disminuir la temperatura disminuye la tasa de biodegradación, de forma similar, tiene influencia en la química y solubilidad de los contaminantes(Chandra, Sharma, Singh, & Sharma, 2013; Hatzikioseyan, 2010). Para resultados adecuados se debe manejar un rango de temperatura de 10°C a 45°C (Das & Dash, 2014; Mkpaoro et al., 2015).

3.4.2 Humedad

La humedad de un suelo tiene implicaciones en la biodisponibilidad del material de interés, afecta la transferencia de gases, el crecimiento, metabolismo y movilidad de los microorganismos ya que se ubican en el agua intersticial de los poros del suelo(Hatzikioseyan, 2010; Tyagi, da Fonseca, & de Carvalho, 2011). Para rangos recomendables de biodegradación este factor debe controlarse entre 20% y 35% de la capacidad de campo empleando tratamientos aerobios para mantener la presencia y transporte de oxígeno(Hatzikioseyan, 2010; Talley, 2005).

3.4.3 Textura

Determina el área superficial de las diferentes partículas presentes en el suelo, ligado al accionar de los microorganismos, además define procesos físicos (lixiviación, escorrentías, capilaridad, etc...) del suelo que afectan finalmente el proceso de biodegradación(Talley, 2005); se tiene que para mantener un transporte y presencia optima de oxigeno se debe presentar poco contenido de limo y arcillas(Das & Dash, 2014).

3.4.4 pH

El pH está influenciado por los microorganismos presentes, la química del contaminante y propiedades físicas y químicas del suelo(Hatzikioseyan, 2010), e igualmente puede interferir en el metabolismo microbiano, solubilidad de gases en la fase agua-suelo, disponibilidad de nutrientes y en solubilidad de metales pesados(Talley, 2005), por lo cual, se recomienda mantenerlo entre 5.5 y 8.5 para eficiencia en la biorremediación(Das & Dash, 2014).

3.4.5 Aceptor y donador de electrones

Los microorganismos obtienen energía para subsistir mediante reacciones de óxido-reducción, por ejemplo en la respiración. Esto se da mediante la transferencia de electrones de un donante a un aceptor(P. Alvarez & Illman, 2006). Para los tratamientos de biorremediación el donador de electrones normalmente es el contaminante, por otro lado, el tipo de aceptor a usar determina la clase de metabolismo (anaerobio o aerobio) (Hatzikioseyan, 2010; YANG et al., 2009). El metabolismo aerobio posee el régimen de aceptación de electrones más energético para oxidar compuestos con lo cual resulta en tasas de oxidación de contaminantes más rápidas(P. Alvarez & Illman, 2006).

3.4.6 Disponibilidad de nutrientes

Los microorganismos tienen requerimientos principalmente de nitrógeno y fósforo, para realizar procesos como síntesis de proteínas, síntesis de ATP, entre otros, sin embargo,

en el suelo su presencia debe estar ligada a la disponibilidad de los mismos para ser asimilables por las bacterias, ya que puede presentarse pérdidas por lixiviación o desnitrificación del suelo, además de precipitación de cationes debido a variaciones del pH, por lo tanto, es recomendable la adición de nitratos y amonio como fuentes de nitrógeno y fosfatos como fuente de fósforo (Osorio, 2015; Prada, 2016; Trejos, 2017).

Con lo anterior, para obtener una biorremediación exitosa es necesaria la presencia y biodisponibilidad de nutrientes, debido a su influencia en el metabolismo; más aún en sitios con contaminantes orgánicos donde se da un desequilibrio marcado de la relación C:N:P, resultando como factores limitantes la concentración de nitrógeno y fósforo (Chandra et al., 2013; Rittman & McCarty, 2001).

3.5 Estrategias de optimización de la biodegradación

3.5.1 Surfactantes

Se denominan agentes de superficie activa, estos agentes tensoactivos son moléculas orgánicas con dos componentes, uno hidrofóbico compuesto por una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada y otro hidrofílico formado principalmente por grupos polares ionizados (carboxilatos, sulfonatos, fosfatos, sulfatos, entre otros) para poder interactuar con superficies polares y no polares (Orantes, 2002; Riojas et al., 2011; S. C. Yang, Lei, & Chen, 2014). Ahora bien, los surfactantes tienen la capacidad de formar micelas a partir de cierta concentración que se denomina concentración micelar crítica (CMC) la cual es característica de cada uno, antes de ella se mantienen como monómeros en la interfase, al obtener la CMC se da la formación de micelas que son esferas con una porción exterior polar y una interior no polar debido a su naturaleza dual (Polar y No polar) (Orantes, 2002; S. C. Yang et al., 2014), con lo cual tienen la capacidad de aumentar la solubilidad de compuestos hidrofóbicos como son los hidrocarburos, obteniendo así un aumento de la biodisponibilidad de estos (K. Y. Cheng & Wong, 2006). Es importante notar que con la intención de aumentar la solubilidad del contaminante, se tiende a adicionar más cantidad que la CMC, resultando en una mayor solubilidad pero inhibiendo la acción de los microorganismos debido a la disminución de la población o al uso del surfactante como fuente de carbono principal en lugar de la sustancia tóxica (M. Cheng et al., 2017).

Por lo anterior, se han realizado muchos estudios acerca de la eficiencia de los surfactantes en los procesos de biorremediación con grandes resultados (Agnello, Huguenot, van Hullebusch, & Esposito, 2015; Martienssen & Schirmer, 2007; X. Wang et al., 2017), teniendo en cuenta dos propósitos, uno de ellos es dispersar el compuesto (solubilización) y hacerlo disponible para la biodegradación con lo cual se puede acelerar el proceso (X. Wang et al., 2017) y el otro, es disminuir la tensión superficial del contaminante para aumentar su movilización (Martienssen & Schirmer, 2007; Orantes, 2002).

Los agentes tensoactivos se clasifican de acuerdo a la naturaleza del grupo polar:

- **Surfactantes aniónicos**

Tienen una molécula cargada negativamente, por lo tanto su superficie activa es el anión. Poseen gran capacidad de disolver y presentan baja toxicidad, son muy frecuentes en la mayoría de sistemas detergentes (lavavajillas, detergentes en polvo o líquido, entre otros)(Orantes, 2002).

- **Surfactantes catiónicos**

Su superficie activa está cargada positivamente, presentan baja capacidad surfactante, alta toxicidad y su eliminación de la matriz sólida o líquida es compleja debido a las interacciones electrostáticas, se usan principalmente como germicidas, suavizantes y emulsificantes especiales(Orantes, 2002).

- **Surfactantes no iónicos**

Su grupo principal no tiene carga, aunque son polares(Orantes, 2002). Esta clase de surfactantes ha demostrado mayor eficiencia en procesos de remediación de suelos ya que no son sorbidos en las partículas del suelo ni se precipitan(M. Cheng et al., 2017).

3.5.2 Leonardita

La leonardita es un acondicionador líquido compuesto principalmente de ácidos húmicos y fúlvicos que tienen propiedades de fertilizantes y mejoran las condiciones químicas, biológicas y físicas del suelo(Turgay, Erdogan, & Karaca, 2010) (NARPES Colombia). Este compuesto se encuentra conformado principalmente por sustancias húmicas que son el resultado de transformaciones químicas y microbianas de material orgánico, estas sustancias se pueden diferenciar en 3 grupos dependiendo de su fuente u origen, clima y propiedades(Jednak et al., 2017; Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008):

- Ácidos fúlvicos: Compuestos de color amarillento y solubles en agua a cualquier condición de pH.
- Ácidos húmicos: Son sólidos amorfos de color marrón oscuro, normalmente insolubles en condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$) pero soluble en ambientes más alcalinos ($\text{pH} > 2$).
- Humina: Insoluble en agua a cualquier condición de pH.

Las sustancias húmicas tienen ensamblajes supramoleculares conformados por un gran número de moléculas orgánicas relativamente pequeñas con diferente estructura y afinidad química(Fava, Berselli, Conte, Piccolo, & Marchetti, 2004; Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008; Sannino, Spaccini, Savy, & Piccolo, 2013), con lo cual tienen características de solubilizar compuestos orgánicos y así facilitar la desorción de los contaminantes hidrofóbicos de la fase sólida del suelo, por consiguiente aumenta la transferencia de masa y biodisponibilidad de los mismos (Park, Kim, Kim, Kang, & Sung, 2011), resultando así en la aceleración de la biodegradación de hidrocarburos(Tejeda-Agredano, Mayer, & Ortega-

Calvo, 2014), ampliamente comprobada(Ke, Bao, Chen, Wong, & Tam, 2009; Sannino et al., 2013).

3.5.3 Limoneno

El limoneno es un terpeno, proveniente de aceites esenciales de plantas aromáticas como las frutas cítricas (limón, naranja, mandarina, entre otras), tiene propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. Es usado ampliamente como aromatizante en perfumes, alimentos y fragancias y además se puede emplear como co-sustrato en procesos biológicos gracias a su bajo costo(Filippson, Bard, & Karlsson, 1998; Li et al., 2018; Riojas et al., 2011).

Normalmente se cataloga como solvente ya que una parte de su estructura se inserta en la película interfacial mientras que el resto se distribuye entre las fases acuosas e hidrofóbica, por lo cual se aprovecha en la composición de agentes desengrasantes y dispersantes(Riojas et al., 2011). Con base en todo lo anterior, se afirma que este compuesto aumenta el proceso de biodegradación aerobia(A. Alvarez & Polti, 2014; Dudášová, Lukáčová, Murínová, & Dercová, 2012; Megharaj, Ramakrishnan, Venkateswarlu, Sethunathan, & Naidu, 2011; Passatore, Rossetti, Juwarkar, & Massacci, 2014).

Con información publicada por la Organización Mundial de la Salud, se muestran a continuación algunas propiedades físicas y químicas del Limoneno(Filippson et al., 1998):

Tabla 3. Propiedades físicas químicas del Limoneno

Limoneno	
CAS	5989-275
Nombre químico	1-metil-4-(1-metileténil)-ciclohexeno
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136,23
Punto de fusión (°C)	74,35
Punto de ebullición (°C)	176
Densidad (g/cm³ a 20 °C)	0,841
Presión de vapor (Pascales a 20°C)	190

Nota: Tomado de (Filippson et al., 1998)

3.5.4 Melaza

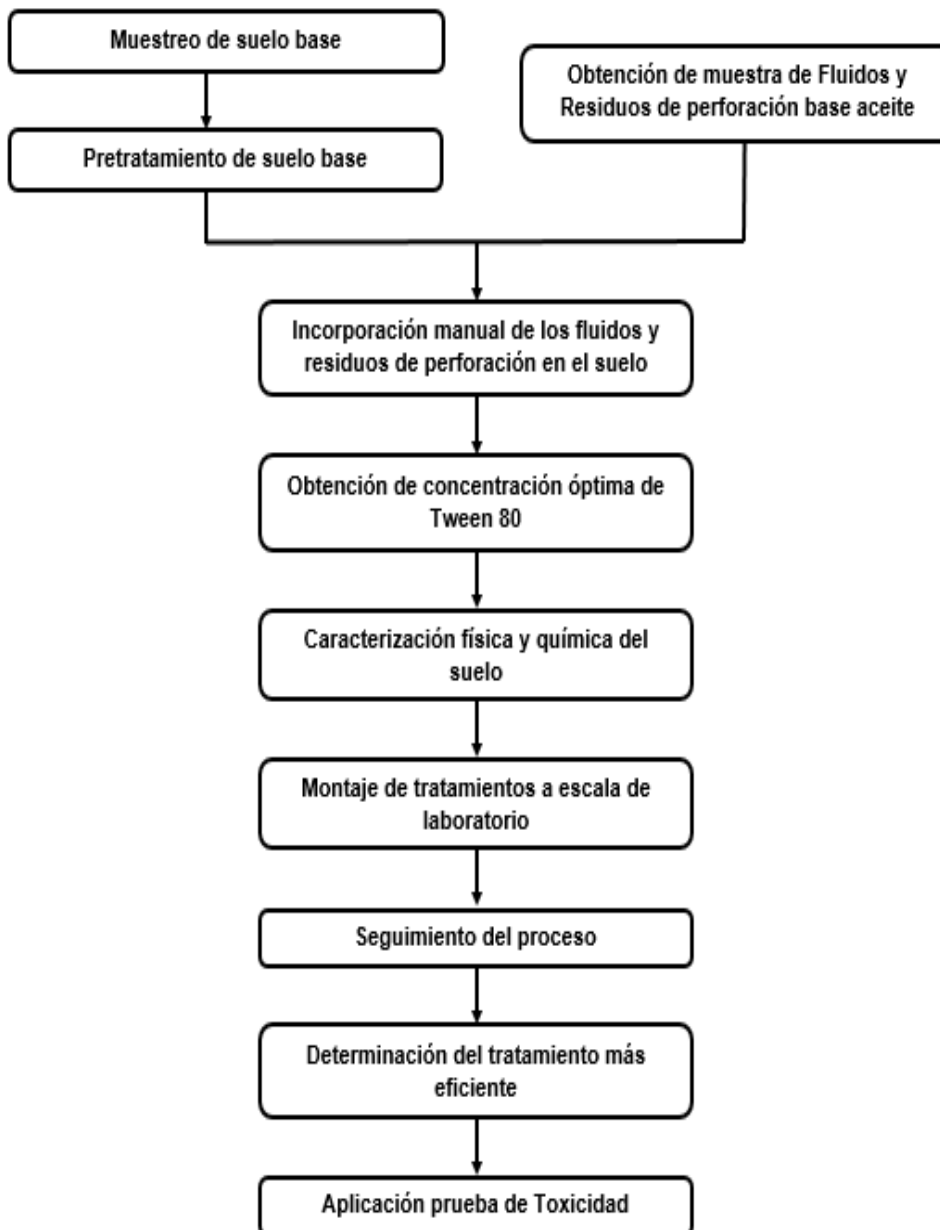
La melaza es un subproducto de la producción de azúcar y se compone principalmente de agua y carbohidratos como la sacarosa, glucosa y fructosa(Vega, Delgado, Sibaja, Alvarado Aguilar, & Barrientos, 2008), por lo tanto, es conveniente su uso como fuente suplementaria de carbono para los microorganismos en procesos de biorremediación, con

base en que los microorganismos van a preferir como primera instancia el material orgánico antes que los contaminantes (hidrocarburos), resultando en un aumento en la producción de CO₂ debido al desglose de los compuestos alifáticos y con esto se incrementaría la tasa de biodegradación, lo cual está ampliamente documentado (Lamichhane, Babcock, Turnbull, & Schenck, 2012; Nikolopoulou & Kalogerakis, 2008; Turgay et al., 2010).

4. Metodología

A continuación se ilustra la metodología que se llevó a cabo en el normal desarrollo de la investigación, con la secuencia de pasos, procesos y equipos utilizados además de los análisis estadísticos planteados. Esta propuesta se realizó en el Laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico de la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Figura 1. Esquema de la metodología de trabajo



4.1 Equipos y reactivos

Cromatógrafo Agilent GC, Medidor multiparámetro portátil modelo HQ40d de pH, Cabina de flujo laminar horizontal Isocide modelo SPD-4AS2, Ro-Tap, Horno de secado marca Memmert, Plancha de calentamiento marca Velp Scientifica, Kit DNeasy PowerSoil de QIAGEN, Balanza analítica APX-203 y Autoclave tipo olla marca All American modelo 25-X.

Tripolifosfato de sodio $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ marca Merck, Urea marca PQP de grado comercial, melaza de Tierragro, Hidróxido de Sodio marca Protokimica, Cloruro de bario marca Panreac, Agar nutritivo Difco™, Agar bacteriológico NO. 1 marca Oxoid, Sulfato de Magnesio marca Reactivos RD, Calcio Cloruro Anhidro marca Chemí, Fosfato monopotásico marca Panreac, Fosfato dipotásico marca Panreac, nitrato de amonio, Cloruro férrico marca Químicos JM, Leonardita Black Diamond de Narpes Colombia S.A.S.

4.2 Muestreo de suelo base

Se tomó una muestra compuesta por varios horizontes de forma aleatoria en los predios de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín – Facultad de Agronomía en marzo de 2017, con base en la resolución 062 de 2007 del Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM), realizando un muestreo sistemático, parcial y simple del suelo a profundidades entre 40 centímetros y 2 metros (Fernández Linares et al., 2006; IDEAM, 2007), esto se hizo debido a la imposibilidad de obtener una muestra de suelo del campo petrolero Floreña. Ver anexo 1

4.3 Pretratamiento de suelo base

El suelo base recolectado se conformaba de grandes terrones y con la finalidad de garantizar su homogeneidad al momento de incorporar los fluidos y residuos de perforación base aceite se procedió a triturarlo mecánicamente y posteriormente se tamizó con la ayuda de una Ro-Tap para garantizar un tamaño de partícula de 2 mm. Ver anexo 1

4.4 Obtención de muestra de fluidos y residuos de perforación

Se obtuvieron fluidos de perforación base aceite y de igual manera residuos y cortes de perforación base aceite, provenientes del campo petrolero FLOREÑA ubicado en el Piedemonte llanero del Departamento del Casanare, actualmente a cargo de la empresa EQUION. Ver anexo 2

4.4.1 Microscopia electrónica de barrido

Se realizó una microscopia electrónica de barrido a los fluidos y residuos de perforación, la cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Minas. Se implementó el microscopio Carl Zeiss EVO MA10 SEM acoplado al detector Oxford x-Act, usando el software AZtecEnergy para ser analizadas.

4.5 Incorporación manual de los fluidos y residuos de perforación en el suelo

Con el suelo base homogéneo y tamaño de partícula 2mm se procedió a realizar la contaminación con la incorporación mecánica de los fluidos y residuos de perforación base aceite, luego se realizó un nuevo tamizaje para garantizar el mismo tamaño de partícula. Ver anexo 3

4.6 Obtención de concentración óptima de Tween 80

Para conseguir la concentración óptima de Tween 80 como surfactante en los tratamientos a evaluar, se realizó un experimento previo con cinco (5) concentraciones diferentes (CMC, 25 CMC, 50 CMC, 75 CMC y 100 CMC) mediante la prueba de respirometría que consta en una evaluación de la producción de dióxido de carbono de los microorganismos presentes, la cual está ligada al proceso de biodegradación. Esta tuvo una duración cercana a los 30 días (J. E. Celis, Sandoval, Martínez, & Quezada, 2013; J. Celis, Sandoval, & Zagal, 2009; Ortiz et al., 2013).

Esta prueba de respirometría se realizó por triplicado en recipientes herméticos de 1 litro de capacidad, donde se introdujeron 50 gramos de suelo contaminado, adicionalmente en el interior se ubicó un recipiente con 15 ml de NaOH 1M para absorber el CO₂ producido, esto se dejaba en incubación durante 2 a 3 días y luego se realizaba la lectura del CO₂ producido mediante titulación en un recipiente limpio, allí se adicionaba 1 ml del NaOH 1M incubado con 2 ml de BaCl₂ 1M con la finalidad de hacer precipitar el carbono inorgánico en forma de BaCO₃ insoluble y se adicionaban 2 gotas de fenolftaleína como indicador para finalmente titular con HCl 0.1M. La cantidad de CO₂ proveniente del suelo incubado se calculó con la fórmula de Anderson (1982) dando un estimado de la cantidad de dióxido de carbono por gramo de suelo (Barrios, Robayo, Prieto, & Cardona, 2015; J. E. Celis et al., 2013; J. Celis et al., 2009; Guerrero Ortiz, Quintero, Espinoza, Benedicto, & Sánchez, 2012; Trejos, 2017). Ver anexo 4

4.7 Caracterización física y química del suelo

Se determinaron las principales propiedades físicas y químicas del suelo en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Esta caracterización se llevó a cabo en dos muestras distintas, una con el suelo contaminado inicial sin ninguna alteración y otra con la muestra de suelo del tratamiento más eficiente luego de aplicar y evaluar los sistemas propuestos. A continuación se muestran las propiedades físicas y químicas con su respectiva técnica.

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica del suelo

Prueba experimental	Técnica analítica
Textura	Bouyoucos (Bouyoucos, 1962)
Potencial de hidrógeno	Método de dilución (Jackson, 1964)
Materia orgánica	Método Walkley-Black (Walkley & Black, 1934)
Suma de cationes de cambio	Método del acetato de amonio 1N (USDA, 1996)
Fósforo total	Método Bray II (Bray & Kurtz, 1945)
Contenido nitrato	Sulfato de aluminio
Contenido nitrógeno amoniacal	Método del KCl 1N (Keeney & Nelson, 1982)
Nitrógeno total	Método de Kjeldhal (Jackson, 1964)
Densidad real	Método del picnómetro (Aguilera, 1989)
Humedad	Método del horno (Jackson, 1964)

4.8 Montaje de tratamientos a escala de laboratorio

El experimento se desarrolló en bandejas de aluminio con dimensiones de 28 cm por 28 cm y una altura de 12 cm, en ellas se adicionaron 2 kg de suelo inicial contaminado. Los tratamientos tuvieron una duración de 90 días y se mantuvo la humedad al 20%. Ver anexo 5 con información gráfica del montaje.

En donde:

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

i: Estado inicial

f: Estado final

4.10 Seguimiento del proceso

Con el propósito de evaluar el desarrollo de los tratamientos y la degradación en los mismos, se implementaron 5 metodologías: Medición semanal de potencial de hidrógeno y humedad, Comportamiento de la respirometría, Recuento de microorganismos heterótrofos e hidrocarburoclastas y Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo.

4.10.1 Potencial de hidrógeno

Esta propiedad se realizó empleando el método de dilución, manteniendo una relación 1:10, por lo cual se emplearon 2 gramos de suelo de cada tratamiento y se llevaba a 20 ml de agua destilada. Luego cada solución se agitó en un vortex durante 1 min, para finalmente ser medida por el electrodo de pH del equipo Hach Modelo HQ40d.

4.10.2 Medición de humedad

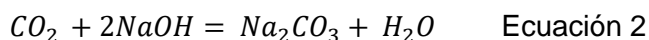
Empleando el método del horno se obtuvo la humedad de los tratamientos, conservando una humedad del 20% durante el transcurso de los mismos. Este se realizó utilizando la Ecuación 1, donde se iniciaba con el peso de un crisol vacío (C_v), luego a este se le adicionaba una muestra de suelo (C_{sh}). Posteriormente se llevaba este crisol junto a la muestra de suelo a un horno durante un período de 24 horas a 105 °C, consiguiendo se retiraba del horno y se ubicaba en un desecador por 5 minutos para finalmente pesar el crisol con la muestra de suelo seco (C_{ss}). A continuación se muestra la ecuación usada:

$$\% \text{ humedad} = \frac{C_{sh} - C_{ss}}{C_{ss} - C_v} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

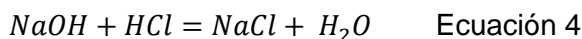
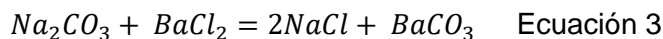
4.10.3 Respirometría

Para tener una estimación válida de la producción de dióxido de carbono en el transcurso de los tratamientos se empleó el protocolo realizado por Celis et al., 2009. Con esta metodología se pueden tener mediciones periódicas de dióxido de carbono desprendido y así evitar problemas de anaerobiosis (Barrios et al., 2015; J. E. Celis et al., 2013; J. Celis et al., 2009; Ortiz et al., 2013).

Para cada bandeja se realizó el procedimiento detallado a continuación, se ubicaba un recipiente con 15 ml de NaOH al 1M para absorber el dióxido de carbono producido (Ver Ecuación 2), el cual era cubierto totalmente con un recipiente mayor con capacidad de 1 litro para evitar fugas de CO₂. Este montaje se dejaba en incubación durante un período de 2 a 3 días y luego era reemplazado por una nueva trampa de NaOH.



Ahora bien, para la obtención de dióxido de carbono por gramo de suelo, se extraía 1ml del NaOH incubado a un nuevo recipiente limpio y seco, se adicionaban 2ml de Cloruro de bario (BaCl₂) al 1M para precipitar el carbono inorgánico (Ver Ecuación 3), y unas gotas de fenolftaleína como indicador de ácido-base. Finalmente se procedía a titular con ácido clorhídrico (HCl) al 0.1M (Ver Ecuación 4).



De forma análoga al procedimiento realizado en la obtención de la concentración óptima de Tween 80, la cantidad de CO₂ proveniente del suelo incubado se calculó con la fórmula de Anderson (1982) dando un estimado de la cantidad de dióxido de carbono por gramo de suelo (Guerrero Ortiz et al., 2012) (Ver Ecuación 5).

$$R = (B - M) * NE \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

R: Miligramos de CO₂

B: Volumen de HCl promedio necesario para titular el NaOH de los blancos (mL)

M: Volumen de HCl necesario para titular el NaOH de la muestra (mL)

N: Normalidad del HCl

E: Peso equivalente del CO₂

4.10.4 Recuento de bacterias

Para confirmar la presencia de microorganismos en el suelo durante el transcurso de los tratamientos se empleó la técnica de conteo directo en placas, teniendo en cuenta el bajo porcentaje a replicar en el laboratorio (Gómez, 2009). Se evaluó el comportamiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas, mediante siembra superficial en agar nutritivo y selectivo respectivamente.

Se preparó una dilución compuesta por 1 g de suelo en 9 mL de agua destilada previamente esterilizada, correspondiente a la dilución 10⁻¹, la cual se agitó durante 90 segundos, a continuación, se tomaron 10 µL de cada muestra y se llevaron a un nuevo

tubo de ensayo con 9,99 mL de agua destilada estéril, dilución 10^{-3} , de igual forma, se agita y se toman nuevamente 10 μ L que son transferidos a un tubo de ensayo con 9,99 mL de agua destilada estéril, obteniendo así la dilución 10^{-5} . De esta dilución se toman 100 μ L de cada muestra y se depositan en la superficie de los medios, para el caso del medio selectivo, se adicionó 100 μ L de hexano diluido como fuente de carbono. Luego de sembrar todas las muestras en sus respectivos medios, se incubaron a 30 °C por un período de 2 días para las heterótrofas y 5 días para las hidrocarburoclastas.

Para el cálculo de las UFC/g suelo se empleó la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{g \text{ suelo}} = \# \text{ de Colonias} * \frac{\text{Volumen dilución}}{\text{Factor dilución}} * \frac{1}{g \text{ suelo}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

UFC: Unidades formadoras de colonia

de Colonias en la caja Petri

Volumen de dilución: Volumen inoculado en la caja (100 μ L)

Factor de dilución: Corresponde a la dilución empleada al tomar la muestra de inoculación (10-5)

4.10.5 Análisis de diversidad bacteriana

Esta fase se llevó a cabo en el Centro Nacional de Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia. Se empleó extracción de ADN de las muestras de suelo que obtuvieron las mejores tasas de degradación, seguida de amplificación del gen 16S completo mediante PCR. El resultante de la PCR fue secuenciado y posteriormente se efectuó un análisis de diversidad bacteriana (Wu, Ye, et al., 2017).

- **Extracción del DNA**

A las muestras de suelo se realizó la extracción usando el kit DNeasy PowerSoil^R Kit de QIAGEN Cat No. 12888-100 (QIAGEN, n.d.), seguido la cuantificación del DNA mediante el método colorimétrico Picogreen (Calderoli, 2016; Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

- **Amplificación gen 16S completo**

El gen ribosomal 16S fue amplificado usando los oligos 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' y 1492R: 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' que amplifican un fragmento de 1500 pares de bases (pb) (Calderoli, 2016; Wu, Ye, et al., 2017).

- **Secuenciamiento**

Para el secuenciamiento profundo del gen ribosomal 16S, región variable V3 y V4, se emplearon los oligos Bakt_341F CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt_805R GACTACHVGGGTATCTAATCC. Este se realizó en la plataforma MiSeq de illumina generando reads pareados de 300 bases cada uno (Wu, Ye, et al., 2017).

- **Análisis de diversidad bacteriana**

Se utilizó la plataforma MOTHUR en su versión 1.39.5, donde se procesaron 20000 reads por muestra, los cuales fueron seleccionados con el programa SEQTK (seqtk simple-s5). El protocolo empleado en MOTHUR eliminó las secuencias con bases ambiguas (Ns), que no mapearan la región variable V3-V4 del gen ribosomal bacteriano 16S, con homopolímeros de más de 7 bases y aquellas que superaran las 465 bases de longitud. La clasificación de las bacterias se hizo con el programa RDP classifier (Wu, Ye, et al., 2017).

4.10.6 Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo

El proceso de extracción y análisis de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) fue realizado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín donde se determinaron con base en una metodología adaptada del Estándar Métodos 5520F y mediante un perfil cromatográfico obtenido por Cromatografía de gases acoplado a masas. Se llevaron a cabo dos mediciones, una inicial al momento de realizar el montaje de las bandejas y otra al finalizar los mismos (90 días) para poder concluir el tratamiento más eficiente, de forma adicional, en el Anexo 7 se puede visualizar como se determinó la formula molecular del HTP inicial.

Para la cuantificación (extracción) de los HTP se utilizaron viales de polipropileno de 50 mL para centrifuga en donde se depositó 1 g de suelo seco al cual se le adicionaron 2.5 g de Na₂SO₄ anhidro marca Panreac^R. Posteriormente se le agregó a cada vial 5 mL d diclorometano marca Chemi, grado analítico y se llevó al vortex 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 15 mL de sobrenadante. Se empleó un rotoevaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40 °C y una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente. Este último se resuspendió en 1 mL de diclorometano en viales de 1.5 mL marca Agilent ámbar provistos de tapas roscadas con tapón de teflón(Arrieta, 2011; Gómez, 2009; Trejos, 2017).

De forma secuencial, en la cualificación (análisis) de los HTP se empleó un cromatógrafo marca Agilent serie 6890N con un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un inyector Agilent 7683. Se utilizó una columna DB-TPH-123-1632 marca Agilent

Technologies de 30 m de longitud, 0.32 mm 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 allí 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 de hidrógeno trabajando a un flujo constante de 2 mL por minuto. La concentración de contaminante en las muestras fue identificada y cuantificada por 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)(Arrieta, 2011; Gómez, 2009; Trejos, 2017). Los anteriores procedimientos se describieron con base en los reportes entregados por el Laboratorio.

4.11 Prueba de toxicidad

Se realizó una prueba de toxicidad directa sobre el organismo *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Domínguez & Pérez Losada, 2010) suministrado por Lombricol S.A., Pereira – Colombia, con base en los lineamientos del protocolo #207 de la Organización para cooperación económica y desarrollo (OECD en inglés) (OECD, 1984, 2006). Este experimento se realizó al finalizar los tratamientos de biorremediación, para establecer el grado de toxicidad de los mismos mediante mortalidad; el test fue llevado a cabo en el tratamiento más eficiente y en dos controles (Ver anexo 8), uno negativo correspondiente a suelo limpio (sin contaminar) y otro positivo, suelo contaminado inicial, para los cuales se montaron 4 repeticiones experimentales.

Cada repetición se aplicó en recipientes de vidrio de 500 mL donde se adicionaron 200 gr de suelo de cada tratamiento con una humedad del 35% para evitar efectos colaterales por deshidratación. Se depositaron 10 lombrices en fase clitelada, en condiciones de ayuno por 24 horas, lavadas y secadas, manteniendo siempre una temperatura de 25 +/- 1 °C. La variable medida fue tasa de mortalidad revisando por periodos de doce horas en cada recipiente durante 24 horas. Con los resultados anteriores se implementó un análisis de varianza para verificar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Scheffé.

5. Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados de los análisis llevados a cabo en la investigación, iniciando con una microscopia electrónica de barrido para verificar presencia de elementos nocivos; de igual manera se analiza la caracterización fisicoquímica del suelo antes y después de los tratamientos, además de la obtención de la concentración óptima de Tween 80, potencial de hidrógeno, producción de CO₂, caracterización microbiológica de los tratamientos para así, estudiar el porcentaje de remoción de hidrocarburos en los mismos. Finalmente se evaluó la toxicidad del tratamiento más eficiente mediante pruebas de toxicidad directa empleando el organismo *Eisenia fetida*.

5.1 Microscopia electrónica de barrido

Se tomó una muestra aleatoria de fluidos y residuos de perforación previa a su incorporación con el suelo base, la cual fue secada en horno por un período de 24 horas. Este análisis se desarrolló en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Minas, para verificar presencia de metales pesados que podrían afectar la actividad biológica, aprovechando la capacidad de estudiar morfología y composición elemental de los materiales (Chaves Villarreal & Puente, 2013). Lo anterior debido a que los fluidos y residuos de perforación tienen asociados metales pesados como mercurio, vanadio, cobre y arsénico entre otros (Kisic et al., 2009).

Para esta prueba se tomaron 3 espectrogramas para cada zona (A, B, C) como se muestra en la figura 2. Sin embargo, al tener presencia de hidrocarburos, se vuelve no conductora y por lo tanto se carga de electrones, razón por la cual se procedió a realizar un recubrimiento de oro. En las 3 zonas estudiadas se pudo hallar alta presencia (proporción igual o mayor al 1,5%) de elementos comunes como: Ca, Na, C, Mg, K, Si; de igual manera se encontró gran cantidad de Bario, con porcentajes desde 4% hasta un 34% en los diferentes espectrogramas, que corresponde a la composición normal de un fluido de perforación (Adekunle et al., 2013; Khan & Islam, 2007), no obstante, este metal blanco-plateado es considerado como una sustancia tóxica con concentraciones perjudiciales al sobrepasar los 2 mg/L. Sin embargo, para efectos de la investigación no presenta un problema serio ya que es un elemento inerte y fue diluido al realizar la incorporación del suelo base (Kisic et al., 2009).

Los resultados establecieron presencia de metales pesados, como es el caso del plomo, que estuvo en porcentajes menores al 1%, de forma análoga, solo en la zona C se detectó Niobio, correspondiente a un metal muy escaso, proveniente de los cortes de estratos profundos y con presencia menor al 1,8%, este metal produce efectos nocivos en concentraciones mayores a 50 mg/m³ (Nordberg, 2001). Con base en los resultados

anteriores, se evidencia que en los fluidos y residuos de perforación que fueron empleados en los tratamientos de biorremediación hay presencia de metales pesados de forma similar a lo reportado por varios autores (Kisic et al., 2009; Kogbara, Ayotamuno, Onuomah, Ehio, & Damka, 2016; Kuyukina et al., 2017).

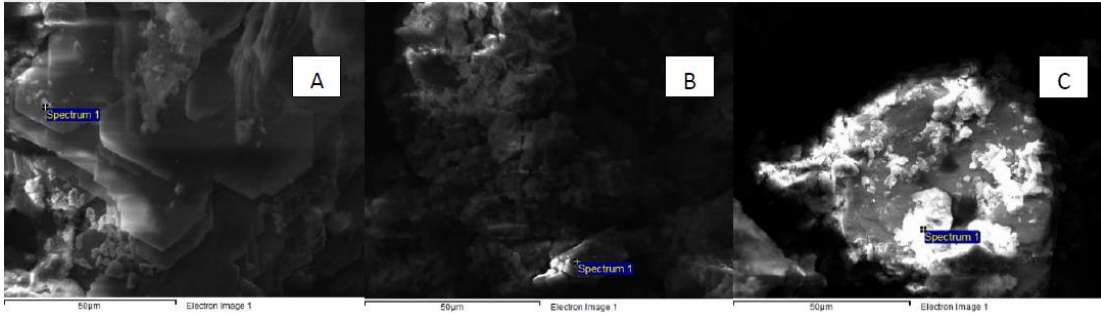


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de tres zonas diferentes (A, B y C)

5.2 Concentración óptima de Tween 80

Con base en los efectos del Tween 80 en matrices hidrofóbicas como es el caso de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación base aceite, se procedió a obtener la concentración óptima del surfactante en cuestión. Esta se consiguió mediante la producción de dióxido de carbono que es usado como una medida de mineralización (respiración basal) para seleccionar la concentración ideal (Riveroll-Larios, Escalante-Espinosa, Fócil-Monterrubio, & Díaz-Ramírez, 2015; U.S. Environmental Protection Agency, 1998).

A continuación en la figura 3 se presenta la producción de CO_2 para cada concentración micelar crítica (CMC) de Tween 80 evaluada en función del tiempo, teniendo en cuenta los experimento realizados por Orantes (Orantes, 2002).

Con la finalidad de obtener la CMC óptima se calculó la pendiente de cada concentración para tener una idea de la cantidad de dióxido de carbono obtenido por día, de forma análoga, se pudo visualizar dos comportamientos diferentes, dando así una producción más eficiente durante los días 0 a 14 y estabilizándose en los días siguientes, lo anterior se puede comprobar de forma numérica al revisar las pendientes de los dos lapsos de tiempo como se muestra en la tabla 7. Por tanto es válido afirmar que se presentan dos mecanismos de reacción, orden 1 y orden cero, debido que las pendientes en el primer lapso de tiempo son casi dos veces a sus equivalentes del segundo tramo, con lo cual se concluye que este experimento presenta una fase estacionaria a los 14 días.

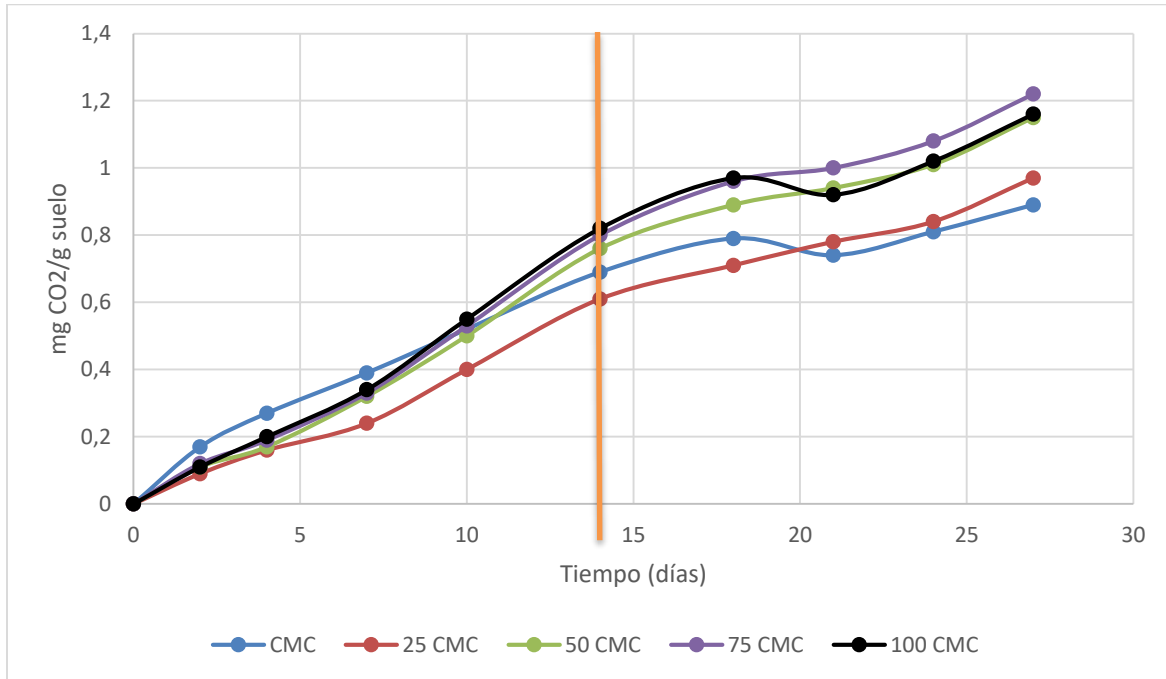


Figura 3. Respirometría para concentración óptima de Tween 80

Tabla 7. Pendientes resultantes por concentración evaluada

Tratamiento	Replicas	Día 0-14	Día 15-27
		$\left(\frac{mgCO_2}{g\ suelo * día}\right)$	$\left(\frac{mgCO_2}{g\ suelo * día}\right)$
CMC	3	0.043	0.012
25 CMC	3	0.043	0.027
50 CMC	3	0.055	0.028
75 CMC	3	0.057	0.029
100 CMC	3	0.059	0.022

Teniendo en cuenta que se espera obtener la mayor producción de CO₂ en los tratamientos a evaluar, se realizó un estudio estadístico mediante un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples para determinar diferencia significativa y concentración óptima, esto con base en los resultados del primer tramo del experimento, ya que sus pendientes fueron significativamente mayores.

Tabla 8. Análisis de Varianza (Día 0-14)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000671576	4	0.000167894	7.24	0.0052
Intra grupos	0.00023174	10	0.000023174		
Total	0.000903316	14			

De acuerdo con los resultados expresados en la tabla 8, el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, por tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones evaluadas. Ahora bien, para establecer que tratamientos son significativamente diferentes de otros se realizó una prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé. (Ver tabla 9)

Tabla 9. Prueba de Scheffé (Día 0-14)

Tratamientos	Casos	Media $\left(\frac{mgCO_2}{g\text{ suelo} * día}\right)$	Grupos Homogéneos
CMC	3	0.0438333	A
25 CMC	3	0.0437333	A
50 CMC	3	0.0552333	AB
75 CMC	3	0.0573	AB
100 CMC	3	0.0591	B

Con base en los resultados de la prueba de Scheffé, se puede inferir que los sistemas de CMC, 25 CMC, 50 CMC y 75 CMC no poseen diferencia significativas entre sí, sin embargo 100 CMC que presenta la mayor media, posee diferencia significativa con CMC y 25 CMC, razón por la cual se puede concluir que en el caso presente (concentraciones hasta 100 CMC), a mayor cantidad de Tween 80 se presentara una mayor producción de CO₂, que significa una mayor biodisponibilidad de los hidrocarburos; aunque se debe tener en cuenta la parte económica ya que para tratamientos a escala de campo se deberá implementar una cantidad innecesaria de surfactante para obtener resultados similares. Por lo tanto la concentración óptima que arroja la presente prueba debe ser superior a la CMC, correspondiente a 25 CMC que equivale a 0.392 mg/L.

De forma análoga, se puede afirmar que para tratar de mantener una cinética de orden 1 como la presentada en el primer tramo (día 0-14) en los tratamientos postulados, se optó por realizar una adición de cosustratos y estimulantes de forma periódica (cada 14 días) durante el transcurso de los mismos.

Es importante recalcar que este experimento fue realizado únicamente añadiendo Tween 80 a diferentes concentraciones y manteniendo una humedad del 20%, por lo tanto sus valores de producción de CO₂ son inferiores en gran medida a los reportados por varios autores al implementar estrategias de optimización adicionales (Barrios et al., 2015; Trejos, 2017).

5.3 Caracterización fisicoquímica del suelo

En la siguiente tabla se dan a conocer los resultados de propiedades físicas y químicas evaluadas en el Laboratorio de Suelos, al inicio y al finalizar los tratamientos de biorremediación a escala de laboratorio; se procedió a evaluar dos tratamientos finales debido a su alto porcentaje de remoción de hidrocarburos, correspondientes a los tratamientos BsT y BL.

Tabla 10. Caracterización fisicoquímica del suelo inicial y al finalizar los tratamientos

Característica	Tipo de suelo			Unidad de medida
	Suelo Contaminado Inicial	Suelo Tratamiento BsT	Suelo Tratamiento BL	
Arena	60	36	38	%
Limo	30	36	30	%
Arcilla	10	28	32	%
Clase	Franco Arenoso	Franco Arcilloso	Franco Arcilloso	---
pH	7.7	8.4	8.5	---
CIC	26	31.1	36.7	---
Contenido de agua	18	21	21	%
Densidad real	2.67	2.63	2.59	g/cm ³
Materia orgánica	7.5	7.9	9.2	%
Fósforo	26	229	160	mg/kg
N-NO ₃	1	27	44	mg/kg
N-NH ₄	13	278	167	mg/kg
Nitrógeno total	0.21	0.39	0.46	%
HTP presente	14000	2333.3	1666.7	ppm

Con base en los resultados, la estructura del suelo presentó cambios, ya que se pasó de una textura Franco Arenosa que se evidencia al ser un suelo compuesto por depósitos aluviales finos (CAM, 2011), a una textura Franco Arcillosa al finalizar los tratamientos. Esto se evidenció al observar su composición de fracción arena, limo y arcilla que resulto influenciada, incrementando en casi el triple la cantidad de arcillas en la muestra estudiada por el laboratorio, lo cual puede deberse a un proceso "erosivo" realizado periódicamente al momento de adicionarle agua a los tratamientos y mantener su humedad en el 20% ya que se realizaba de manera manual, como lo informan los autores Do Prado y Da Veiga mediante un estudio de la FAO, donde afirman que al aumentar la erosión en un suelo, se incrementa la cantidad de arcillas (Do Prado Wildner & Da Veiga, 1992; FAO, 2000). Por

otro lado, los autores Martínez & López (2001) estudiaron el efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo, reportando un incremento en el porcentaje de arenas y disminución de arcillas al aumentar la concentración de hidrocarburos, lo cual encaja con lo ilustrado en la Tabla 10, afirmando que esta propiedad se ve modificada debido a la adsorción del hidrocarburo por las partículas de suelo mediante interacciones electrostáticas del tipo Van der Waals, puentes de hidrógenos y puentes catiónicos que terminan interfiriendo con la lectura del hidrómetro de Bouyoucos (V. Martínez & López, 2001), por lo tanto, no se recomienda emplear esta prueba en la determinación de Textura de suelos con presencia de hidrocarburos.

Ahora bien, al seguir revisando la tabla se puede visualizar un gran incremento en el pH de los dos tratamientos evaluados respecto al suelo contaminado inicial, que puede estar influenciado por el aumento en el contenido de arcilla (Sela, 2017). De igual manera se puede afirmar que es debido a la producción de amonio (volatilización) que se presenta luego de la adición de la fuente de nitrógeno implementada que fue Urea (Chaillan, Chaîneau, Point, Saliot, & Oudot, 2006).

Se observa además que el contenido de agua se mantuvo estable, con lo cual se cumple la medida de humedad contemplada para el normal desarrollo de los tratamientos, no obstante, la clase textural del suelo trabajado presenta una baja retención de agua que sumado a la hidrofobicidad de los hidrocarburos presentes en las partículas del suelo demandan un aumento en la frecuencia de humectación (Alvaro, Arocena, Martínez, & Nudelman, 2017). Por otro lado, al revisar la capacidad de intercambio catiónico (CIC) que se refiere al total de cargas negativas disponibles en el suelo se obtiene unos valores muy elevados atribuidos a la gran presencia de compuestos con calcio, magnesio y sodio como se demuestra en los resultados de la microscopia electrónica de barrido, sin embargo se nota un aumento en los tratamientos BsT y BL, que según la literatura y el estudio presentado por Sadeghian, 2014, está ligado a la variación de pH y a la presencia de arcillas (D. Jaramillo, 2014; Sadeghian, 2016; Zapata, 2014), donde al aumentar estas propiedades conlleva a un aumento de la CIC como se da en el presente caso.

La materia orgánica de los suelos se mantuvieron en un rango alto desde el inicio, debido a su naturaleza aluvial (D. Jaramillo, 2014), pero se nota un aumento significativo cercano al 2% en el tratamiento BL, correspondiente a la adición de compost para aumentar la porosidad y población de microorganismos (Alexander, 1999; Osorio, 2015), lo cual contribuye a la disminución de la densidad real en dicho tratamiento, del mismo modo la presencia de Leonardita también influyó, ya que está compuesta principalmente de ácidos húmicos y fúlvicos (Organiksa & Narpes Colombia, 2016).

A partir de los valores reportados por el laboratorio, la cantidad de nitratos e ion amonio aumentó ostensiblemente, las cuales son formas disponibles para los microorganismos presentes, lo anterior se obtuvo gracias a la adición de Urea como fuente de nitrógeno para equilibrar la relación C:N tan desbalanceada debido a la alta presencia de hidrocarburos. Sin embargo, es importante resaltar que hay mayor presencia del ion amonio en los dos

tratamientos (BsT y BL), muy posiblemente por la carencia de microorganismos del género *Nitrosomas* y *Nitrobacter*, encargados de transformar el amonio en nitrato (Chaillan et al., 2006; Ma et al., 2016; Osorio, 2015; Trejos, 2017; Uphoff et al., 2006). De igual manera, al suplementar Tripolifosfato de sodio como fuente de fósforo para balancear la relación C: N: P y la adición de compostaje que presentaba una cantidad de 358 ppm de fosforo, influyeron en el drástico incremento de este elemento (Ma et al., 2016).

5.3.1 Índice de Shannon

Se realizó para determinar la diversidad microbiana del suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación inicial. Esta medida indica la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (Gao et al., 2014; Pla, 2006; Prada, 2016; Ramadass et al., 2015; S. Wang, Wang, Zhang, Li, & Guo, 2016).

A continuación en la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos por el Laboratorio de microbiología de suelos de la Universidad Nacional de Colombia. Donde se reporta $1.8 \cdot 10^5$ unidades formadoras de colonia y un índice de Shannon de 6.58 ± 0.10 que fue estimado por permutaciones mediante el software Estimates. Con lo anterior se puede afirmar que el suelo inicial posee una considerable diversidad microbiana debido a su alto índice.

Tabla 11. Índice de Shannon de suelo contaminado inicial

Unidades formadoras de colonia	Índice de Shannon
$1.8 \cdot 10^5$	6.58 ± 0.10

5.4 Monitoreo de los tratamientos a escala de laboratorio

A continuación se presenta la parte central de la investigación evaluando los resultados de las propiedades más influyentes en procesos de biorremediación tales como, pH, producción de CO₂, Caracterización microbiología y análisis de la concentración remanente de HTPs en los tratamientos luego de 90 días de estudio.

5.4.1 Variación de pH

La figura 4 ilustra el comportamiento global de los tratamientos de biorremediación propuestos. Es importante resaltar la alta alcalinidad de los suelos contaminados con fluidos y residuos de perforación base aceite como lo reportan algunos autores (Agwu et al., 2013; Chang, Wang, Han, & Wang, 2014). Sin embargo, como lo afirma Tahhan (2009), los valores trabajados durante el desarrollo de la investigación han sido reportados como no inhibitorios para procesos de biodegradación bacteriana de hidrocarburos (Tahhan &

Abu-Ateih, 2009). Al momento de revisarlos se nota un pH de 7.75 correspondiente al suelo contaminado inicial, lo cual concuerda con autores que reportan pH de suelos con fluidos de perforación base aceite similares (Chaîneau et al., 2003; Mansour, Djenane, Nasrallah, Zouad, & Boutrif, 2015; Nweke & Okpokwasili, 2003; Rojas-Avelizapa et al., 2007; Tahhan & Abu-Ateih, 2009).

Ahora bien, el comportamiento del tratamiento A exhibe un patrón casi constante, terminando al día 90 en 8.0 y teniendo un máximo de 8.2. En este tratamiento solo se adicionó agua destilada hasta llegar a una humedad del 20%, para impedir un comportamiento plástico en el suelo y así evitar patrones de anaerobiosis. De igual forma en el tratamiento B donde se agregó compost, se obtuvo un pH casi invariable, con un pico máximo de 8.2 y finalizando en 8.0. Lo anterior se puede deber a la alta alcalinidad del contaminante que pudo haber disminuido la actividad de los microorganismos presentes que son los encargados de la producción de metabolitos ácidos (Nweke & Okpokwasili, 2003).

Por otro lado, el tratamiento C presentó una reducción tangible, disminuyendo a 5.8 en la primera semana, manteniéndose constante y presentando un mínimo de 5.5 al finalizar el tiempo de estudio, lo anterior debido a la adición de ácido clorhídrico al 2M para inhibir el crecimiento y accionar degradativo de las bacterias. Cabe resaltar que los tratamientos restantes presentan adición de nutrientes y otros catalizadores, estos corresponden a Bs, BsT, BsTL y BL, los cuales presentaron un aumento similar, correspondiente a 8.6 en la primera semana y al transcurrir el proceso fueron estabilizándose hasta mantener valores promedio de 8.3. Del mismo modo, arrojaron medidas máximas de 8.4 , 8.5 , 8,6 y 8.6 respectivamente, con base al autor Chaillan et al (2006) puede ser el resultado de volatilización de amoníaco y posterior producción de amonio gracias a la adición de Urea como fuente de nitrógeno; el anterior proceso aumenta exponencialmente en suelos alcalinos (Chaillan et al., 2006). De forma adicional para los tratamientos BsTL y BL que presentaron un pH mayor, puede deberse a la presencia del aditivo Leonardita que tiene un pH alcalino correspondiente a 8.5 (Organiksa & Narpes Colombia, 2016).

En general, los tratamientos no superaron en gran medida el rango óptimo de pH presentado por Surajit & Dash (2014), quienes afirman que debe mantenerse entre 5.5 y 8.5 para un eficiente proceso de biodegradación(Das & Dash, 2014), donde exista incremento de la población bacteriana.

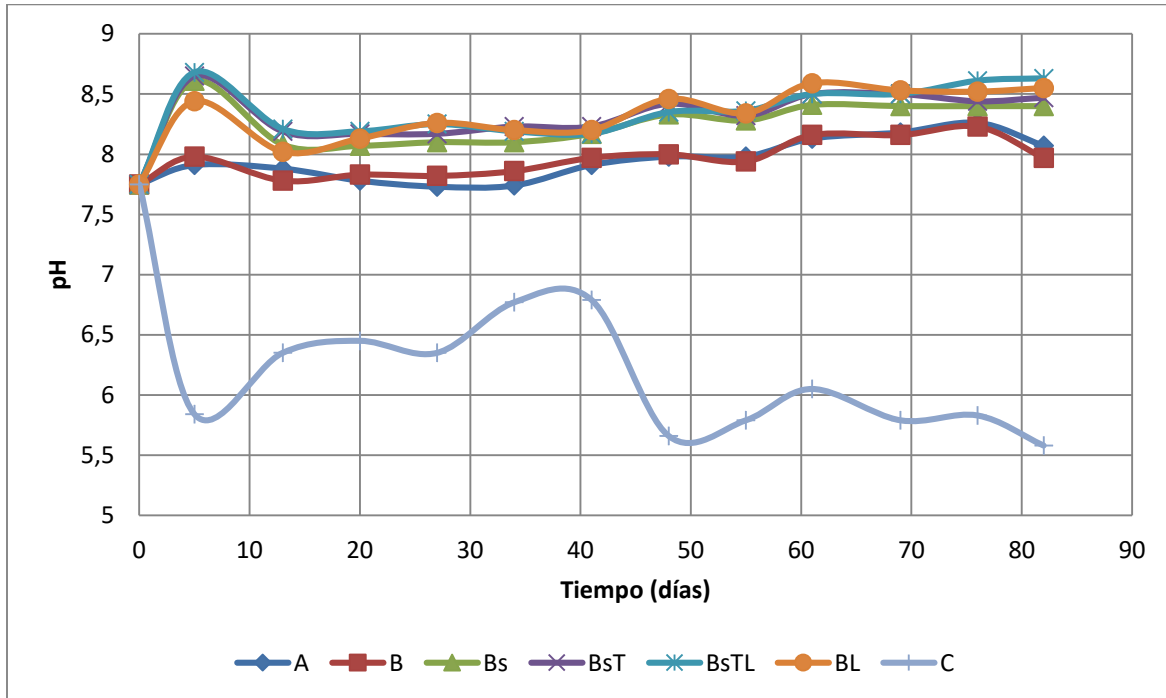


Figura 4. Variación del pH en los tratamientos

5.4.2 Respirometría

Esta prueba fue realizada de manera paralela al normal desarrollo del experimento, tomando medidas periódicas entre 2 y 3 días. De forma análoga a lo realizado anteriormente se procedió a calcular la producción de CO₂ para cada tratamiento propuesto (C, A, B, Bs, BsT, BsTL, BL) en función del tiempo, como se puede visualizar en la figura 5.

Por otro lado, se obtuvo el mejor tratamiento calculando la pendiente de cada uno, con el objetivo de tener conocimiento de la cantidad de dióxido de carbono producido por día. Es importante resaltar que se siguieron las recomendaciones dadas cuando se obtuvo la concentración óptima de Tween 80, las cuales fueron, una concentración de Tween 80 de 25 CMC correspondiente a 392.2 mg/L y de forma adicional al presentarse dos cinéticas, se optó por realizar un adición periódica cada 14 días de estimulantes (Leonardita, Limoneno, Tween 80 y melaza) según cada tratamiento, mediante el agua implementada para mantener la humedad del suelo, todo lo anterior, con la finalidad de conservar un alto desempeño de la actividad microbiana mediante estímulos reiterados.

Sin embargo, al revisar los datos de la figura 5 se puede visualizar dos comportamientos diferentes, dando así una producción más pronunciada durante los días 0 a 30 y estabilizándose en el resto del experimento (días 31 a 90). Esto se puede verificar

numéricamente al revisar las pendientes de los dos lapsos de tiempo como se muestra en la tabla 12. Con base en lo anterior y de forma análoga al primer experimento realizado, es válido afirmar que se presentan dos mecanismos de reacción, orden 1 y orden 0, ya que las pendientes en el primer tramo son casi el doble a sus equivalentes del segundo lapso de tiempo, por lo tanto es válido afirmar que este experimento muestra una fase estacionaria a los 30 días.

Tabla 12. Pendientes resultantes por tratamiento propuesto

Tratamiento	Replicas	Día 0-30	Día 31-90
		$\left(\frac{mgCO_2}{g\text{ suelo} * día}\right)$	$\left(\frac{mgCO_2}{g\text{ suelo} * día}\right)$
C	3	0.0190	0.0133
A	3	0.0153	0.0187
B	3	0.0289	0.0264
Bs	3	0.0511	0.0261
BsT	3	0.0631	0.0290
BsTL	3	0.0549	0.0279
BL	3	0.0647	0.0326

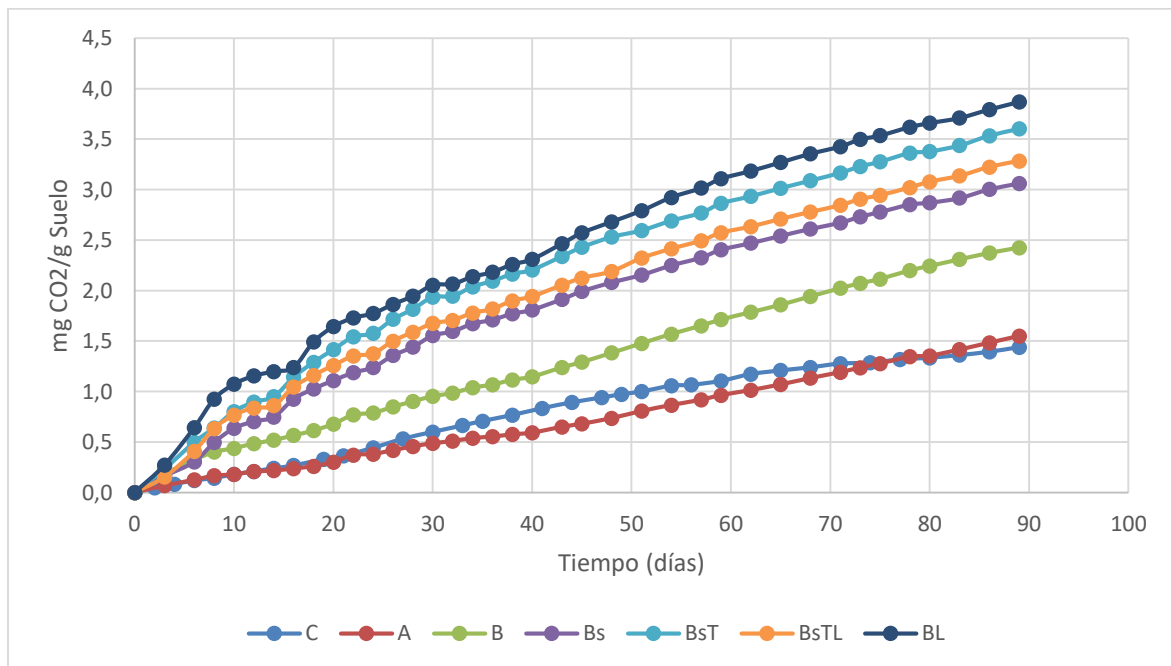


Figura 5. Respirometría de los tratamientos propuestos

Ahora bien, como se requiere determinar el tratamiento con mayor producción de CO₂, se realizó un estudio estadístico para los dos lapsos de tiempo (pendientes) por separado,

mediante un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples para determinar la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos y así comprobarlo de forma numérica.

Tabla 13. Análisis de Varianza (Día 0-30)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00785019	6	0.00130836	209.00	0.0000
Intra grupos	0.00008764	14	0.00000626		
Total	0.00793783	20			

Tabla 14. Análisis de Varianza (Día 31-90)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000780652	6	0.000130109	90.44	0.0000
Intra grupos	0.00002014	14	0.00000143857		
Total	0.000800792	20			

Luego de revisar los resultados expresados en las tablas 13 y 14, se nota que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados en ambos lapsos de tiempo y por ende es un fuerte indicio que los diferentes estímulos (Tween 80, Limoneno, Leonardita, Melaza) aplicados, influyen en la producción de CO₂. Por lo anterior, se realizó una prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé para establecer que tratamientos son significativamente diferentes de otros, como se puede ver a continuación en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Prueba de Scheffé (Día 0-30)

Tratamientos	Casos	Media $\left(\frac{mgCO_2}{g\text{ suelo} * día}\right)$	Grupos Homogéneos
C	3	0.0190333	A
A	3	0.0153333	A
B	3	0.0289333	B
Bs	3	0.0511	C
BsT	3	0.0631333	DE
BsTL	3	0.0548667	CD
BL	3	0.0646667	E

Tabla 16. Prueba de Scheffé (Día 31-90)

Tratamientos	Casos	Media $\left(\frac{mgCO_2}{g\text{ suelo} * \text{ día}}\right)$	Grupos Homogéneos
C	3	0.0133333	A
A	3	0.0187	B
B	3	0.0264	C
Bs	3	0.0261	C
BsT	3	0.0289667	CD
BsTL	3	0.0279	C
BL	3	0.0325667	D

Para el primer lapso de tiempo, correspondiente a los días 0-30, se puede ver que existen 3 tratamientos con alta producción de dióxido de carbono, los cuales son BsTL, BsT y BL, sin embargo estos dos últimos presentan diferencia significativa respecto a los demás, de forma análoga sucede en los días 31 a 90, donde se presenta una diferencia significativa de los tratamientos BsT y BL respecto a los demás, razón por la cual se puede afirmar que la adición del surfactante Tween 80, colabora en la biodisponibilidad del contaminante y por ende se da un aumento notable en la producción de CO₂.

La aplicación de estimulantes a los tratamientos, tiene gran relación con la producción de CO₂, aumentando esta última conforme se incrementa el número de aditivos implementados, como lo afirma (Kuyukina et al., 2017). No obstante, en la mayoría de los casos se va a presentar una fase estacionaria, por la cual, se ve afectada la mineralización en los tratamientos (Riveroll-Larios et al., 2015).

Ahora bien, los resultados reportados por Tahhan et al (2011) donde obtuvieron un máximo de aprox. 7mg/g suelo a los 200 días de tratamiento, implementando dos consorcios microbianos a diferente tiempo en un suelo contaminado con fluidos de perforación, son similares a los presentados en las tablas 15 y 16 (Tahhan, Ammari, Goussous, & Al-Shdaifat, 2011). Sin embargo, estos son inferiores a los reportados por autores que trabajaron suelos contaminados con crudo y/o hidrocarburos (Barrios et al., 2015; Trejos, 2017), debido en gran medida a los aditivos desconocidos de los fluidos de perforación que pueden inhibir la actividad microbiana.

Al momento de analizar los dos lapsos de tiempo, se puede afirmar que los de mayor producción de CO₂ son BsT y BL, los cuales no presentan diferencia significativa entre ellos, pero en cambio su composición difiere en gran medida, siendo BL el de mayor número de estimulantes (Leonardita, Nutrientes, Melaza, Tween 80, Compost y Limoneno). Por lo tanto, se puede afirmar que el tratamiento más eficiente para mineralizar es BsT, ya que se obtienen resultados similares en rendimiento pero una reducción económica sustancial del tratamiento.

5.4.3 Concentración remanente de HTP

A continuación en la tabla 17 se presentan las concentraciones residuales de HTP para cada uno de los tratamientos evaluados a los 90 días.

Tabla 17. Concentración de HTP en los tratamientos propuestos

TRATAMIENTO	Replicas	Concentración remanente de HTP (ppm)
C	3	3333.3
A	3	10000
B	3	3333.3
Bs	3	4666.7
BsT	3	2333.3
BsTL	3	4333.3
BL	3	1666.7

Es importante resaltar, que la concentración inicial fue de 14000 ppm, por lo tanto, al momento de determinar el porcentaje de degradación final de cada tratamiento, se tuvo en cuenta dicho valor, tal como se describe en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Degradación} = \left(\frac{HTP_i - HTP_f}{HTP_i} * 100 \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Con base en la ecuación 8, se obtuvieron los porcentajes de degradación de cada tratamiento luego de los 90 días de estudio, como se representa en la figura 6. Al revisarla se puede constatar que el tratamiento con menor porcentaje de degradación fue atenuación natural presentando un 28.6%, que tiene similitud con el trabajo realizado por Martínez & Rodríguez (2013) donde al realizar un tratamiento de biodegradación de HTP de un suelo con antecedentes de perforación de pozos, su tratamiento control, al cual solo se le adiciono agua, presentó el menor porcentaje de degradación (Á. Martínez & Rodríguez, 2013). Por su parte, el tratamiento control obtuvo un porcentaje de degradación importante, correspondiente al 76.2%, sin embargo esto fue debido a la adición al día 0 y al día 42 de HCL a una concentración 2M, para inhibir el crecimiento de bacterias (Dike, Okoro, Nwakwasi, & Agbo, 2013; Jang, Hwang, & Choi, 2007; Trejos, 2017).

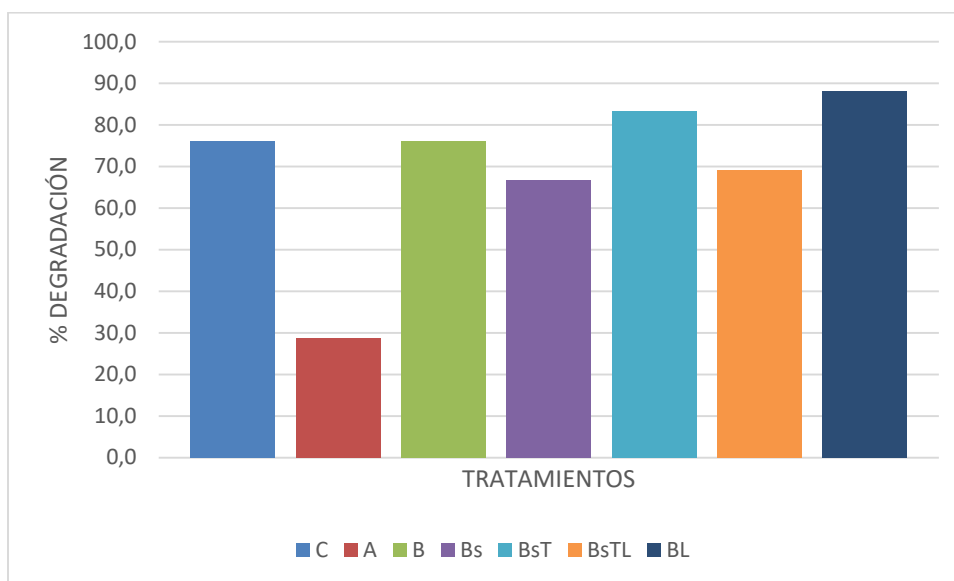


Figura 6. Porcentajes de degradación en los tratamientos propuestos

Ahora bien, los resultados presentados en la figura 6 demuestran una gran similitud en los porcentajes de degradación de los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación, los cuales presentan altos rangos de degradación, desde 66.7% hasta 88.1%. Razón por la cual se hizo necesario establecer si existía diferencia estadísticamente significativa entre ellos y así determinar el tratamiento más eficiente, lo anterior, se realizó mediante una ANOVA y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Scheffé.

Tabla 18. Análisis de varianza de porcentajes de degradación

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6928.83	6	1154.81	31.69	0.0000
Intra grupos	510.129	14	36.4378		
Total	7438.96	20			

Con base en los resultados del análisis de varianza de los porcentajes de degradación, se presenta, que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, por ende, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados, con lo cual, se puede afirmar que la aplicación de los nutrientes y estimulantes producen un efecto en el porcentaje de degradación de HTP en los distintos tratamientos propuestos.

Tabla 19. Prueba de Scheffé de porcentajes de degradación

Tratamientos	Casos	Media (%)	Grupos Homogéneos
C	3	76.19	BC
A	3	28.57	A
B	3	76.19	BC
Bs	3	66.67	B
BsT	3	83.33	BC
BsTL	3	69.05	BC
BL	3	88.09	C

En los resultados arrojados se demuestra que no hay diferencia significativa al aplicar los tratamientos C (Control), B (Bioaumentación), Bs (Bioestimulación + Tween80) y BsTL (Bioestimulación + Tween80 + Leonardita), lo que indica una similitud entre adicionar compostaje para aumentar la población bacteriana y mejorar la relación C:N:P con nutrientes y estimulantes. Por otro lado, el tratamiento control no puede ser tenido en cuenta debido al proceso químico con el HCl.

Asquith et al (2012) realizaron un estudio comparativo de un suelo impactado por hidrocarburos y propusieron varios tratamientos de los cuales bioaumentación obtuvo un 69% de remoción mientras que bioestimulación obtuvo 49% (Asquith, Geary, Nolan, & Evans, 2012), igualmente, los autores Wu et al (2017) demostraron en un suelo con hidrocarburos que el tratamiento bioaumentación tuvo la más alta degradación (Wu, Li, et al., 2017), lo cuales son comparables a los resultados obtenidos, donde bioaumentación con compostaje obtuvo un mayor porcentaje de degradación respecto a bioestimulación, que puede ser debido a la presencia de microorganismos preparados en degradar moléculas complejas. De forma análoga, Kogbara et al (2016) concluyeron que una mayor densidad bacteriana no implica mayor degradación y además que la bioaumentación es una forma sostenible de tratar los residuos y cortes de perforación (Kogbara, Ayotamuno, et al., 2016).

Por otro lado, los tratamientos que poseen Tween 80 obtuvieron los mayores porcentajes de degradación con lo cual se puede afirmar que influye en la degradación de los HTP al realizar un proceso de desorción de los mismos y hacerlos biodisponibles como lo reportan varios autores (K. Y. Cheng & Wong, 2006; M. Cheng et al., 2017). Sin embargo, el tratamiento BL que consta de una bioaumentación + bioestimulación y se compone de Limoneno, Tween 80, Leonardita, compostaje y nutrientes, aumentó el porcentaje de degradación de HTP, lo cual concuerda con autores como Safdari et al (2018) y Ma et al (2016) que reportaron menores concentraciones finales de HTP en los tratamientos de bioaumentación + bioestimulación (Ma et al., 2016; Safdari et al., 2018). Esto evidencia un efecto sinérgico, principalmente entre el Tween 80 y el Limoneno como lo manifiesta (Riojas et al., 2011).

De lo anterior se puede concluir que el tratamiento más eficiente es BL, obteniendo la mayor degradación de HTP de los microcosmos propuestos, no obstante, al momento de llevar la iniciativa a una escala mayor, se podría implementar el tratamiento BsT, que presentó un resultado similar con una reducción importante de insumos y por tanto de costos económicos.

5.4.4 Caracterización microbiológica de los tratamientos

- **Crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas**

A continuación en la figura 7 se puede observar el comportamiento general de las bacterias heterótrofas en los tratamientos, donde se presenta de forma variada 3 fases de crecimiento bacteriano: una primera fase de adaptación seguida de una fase exponencial y por último una fase estacionaria (Barer, 2015). Igualmente, se puede notar un comportamiento variable marcado por la adición de los co-sustratos cada 14 días, donde se aumenta la densidad bacteriana luego de la misma, como lo planteó (Trejos, 2017).

Para el tratamiento C, se observa una baja población, debido a la presencia de HCl, sin embargo el día 30 y 35 presentó un gran incremento, con lo cual se decidió realizar un segundo pulso de HCl para disminuir la cantidad de bacterias heterótrofas. Por su parte, atenuación natural, muestra dos comportamientos marcados, un crecimiento exponencial hasta el día 49 donde obtuvo un máximo y luego inició la fase estacionaria.

De igual manera los tratamientos B, Bs y BsT mostraron comportamientos similares, teniendo una fase de adaptación hasta el día 15, seguido de la fase exponencial donde se obtuvieron los mayores valores, correspondientes a $1.8 \cdot 10^8$ UFC/g, $4.9 \cdot 10^8$ UFC/g y $2 \cdot 10^8$ UFC/g respectivamente y luego entraron a una fase estacionaria hasta el día 90. De lo anterior se puede afirmar que la presencia de bacterias no es una medida directa de actividad en el suelo (Rojas-Avelizapa et al., 2007), de forma análoga, Kogbara et al (2016) concluye que una mayor densidad bacteriana no significa mayor degradación (Kogbara, Ayotamuno, et al., 2016), ya que el tratamiento Bs obtuvo el más alto número de bacterias pero arrojó un valor bajo de degradación de HTP.

Ahora bien, los tratamientos BsTL y BL tuvieron semejanza ya que su periodo de adaptación se presentó hasta el día 30, para luego mostrar un gran crecimiento que finalizó el día 56 donde entraron en la fase estacionaria. Con estos valores, se puede ratificar que al aumentar la parte orgánica de un suelo y/o suplementar con nutrientes se beneficia y aumenta la población bacteriana (Rojas-Avelizapa et al., 2007).

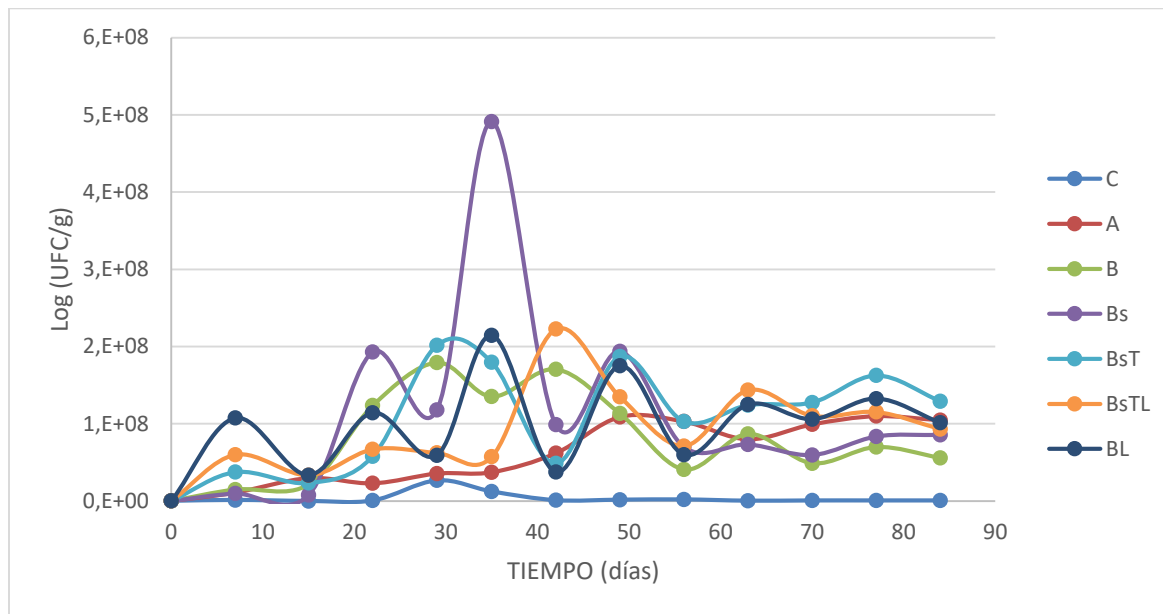


Figura 7. Crecimiento de bacterias heterótrofas durante el desarrollo de los tratamientos

En el caso de las bacterias hidrocarburoclastas, ilustradas en la figura 8, se nota un comportamiento distinto ya que el crecimiento de las mismas es más lento y menor, comparado con las bacterias heterótrofas, influido en su mayoría por el medio selectivo implementado. No obstante, presenta el mismo comportamiento variable debido a la adición periódica de estimulantes. Igualmente para el tratamiento control, se muestra un realce en su población de bacterias hidrocarburoclastas durante los días 30 y 35.

De forma general, se puede afirmar que los demás tratamientos exhiben un comportamiento de adaptación comprendido del día 0 a 15 y posteriormente entran en una fase de crecimiento exponencial hasta finalizar la investigación. Resaltando que la mayor cantidad de hidrocarburoclastas se dio en los tratamientos BsTL y BsT.

Es importante destacar que durante la mayor parte del experimento los tratamientos exhibieron un pH alto, sin embargo, esto no afectó el normal desarrollo y crecimiento de poblaciones heterótrofas e hidrocarburoclastas. Por otro lado, se aprecia una relación entre respirometría y el crecimiento de bacterias en el día 15, donde la mayoría de tratamientos presentan una disminución marcada de producción de CO₂ e igualmente una reducción en las poblaciones heterótrofas e hidrocarburoclastas, que se pueden revisar en las figuras 5, 7 y 8.

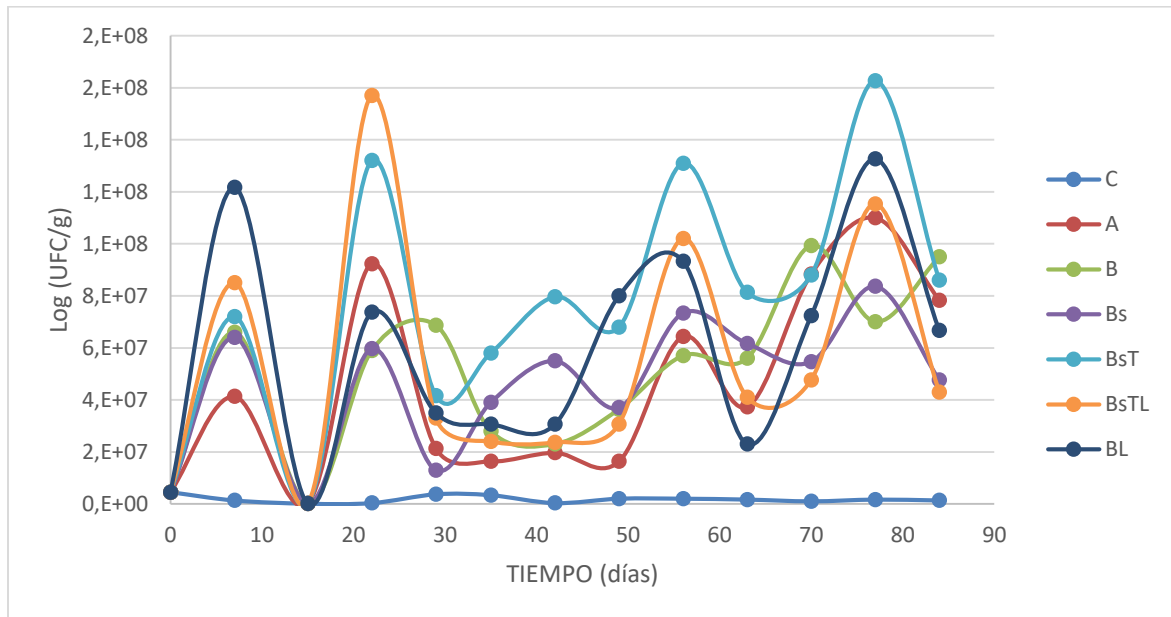


Figura 8. Crecimiento de bacterias hidrocarburoclastas durante el desarrollo de los tratamientos

- **Análisis de diversidad bacteriana**

Con la finalidad de evaluar la diversidad microbiana durante la aplicación de los tratamientos más eficientes, se analizaron muestras de suelo, correspondientes a dos tratamientos con las mejores tasas de degradación, que fueron BsT y BL, además de una muestra de suelo inicial contaminado, las cuales obtuvieron concentraciones de DNA de 18.4, 8.4 y 27.3 ng/uL respectivamente.

Tras la extracción de ADN de las muestras, su amplificación y secuenciación exitosa, se realizó un análisis de diversidad microbiana, el cual se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 20. Resultados generales de los análisis de diversidad alfa.

Label	Grupo	Nseqs	Cobertura	Sobs	Índice de Shannon
0.03	BL	54066	0.928217	5932	4.76
0.03	BsT	54673	0.939806	5032	5.13
0.03	Suelo inicial contaminado (SIC)	56722	0.920049	7765	6.88

De la tabla anterior se pueden ver ciertos índices de calidad del experimento y de forma adicional algunos índices ecológico-microbianos. Por lo tanto se afirma que los resultados están agrupados al 97% de coincidencia (similitud), donde obtuvieron finalmente más de 54000 secuencias por tratamiento.

De los tratamientos BsT, BL y SIC se lograron 5032, 5932 y 7765 OTUS (Unidad taxonómica operacional) respectivamente, con lo cual se ve una reducción del 36% del

tratamiento BsT y 24% del tratamiento BL respecto a las especies teóricas encontradas en la muestra del suelo inicial contaminado. Esto se puede comprobar de forma análoga con los índices de diversidad de Shannon expresados, donde se ve una fuerte disminución en los tratamientos BsT y BL respecto a SIC, razón por la cual se puede establecer que la adición de nutrientes, surfactante y demás tuvieron un efecto importante en la redistribución de la población bacteriana llegando a influir en sus relaciones antagónicas y sinérgicas.

Tabla 21. Resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de Phylum.

Taxon	Total	BL	BsT	SIC
<i>Actinobacteria</i>	81716	36017	32216	13483
<i>Proteobacteria</i>	32261	7534	10090	14637
<i>Verrucomicrobia</i>	11219	2482	3376	5361
<i>Acidobacteria</i>	10110	1702	2012	6396
<i>Bacteria_unclassified</i>	8453	1614	1770	5069
<i>Firmicutes</i>	8130	2023	2708	3399
<i>Planctomycetes</i>	5502	959	637	3906
<i>Chloroflexi</i>	2687	606	879	1202
<i>Bacteroidetes</i>	2311	464	285	1562
<i>candidate_division_WPS-1</i>	976	179	298	499
<i>Nitrospirae</i>	642	140	204	298
<i>Gemmatimonadetes</i>	404	62	75	267
<i>Candidatus_Saccharibacteria</i>	309	152	26	131
<i>Latescibacteria</i>	289	21	15	253
<i>Chlamydiae</i>	242	59	49	134
<i>Armatimonadetes</i>	108	14	20	74
<i>Thaumarchaeota</i>	21	6	5	10
<i>BRC1</i>	19	0	4	15
<i>Parcubacteria</i>	18	8	1	9
<i>Microgenomates</i>	8	2	2	4
<i>Euryarchaeota</i>	7	6	0	1

Con base en la tabla 21, se observa que la división más abundante en los suelos corresponde a *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, como lo reporta Shah & Subramaniam (2018) donde hacen una revisión bibliográfica general de la microbiota de los suelos (Shah & Subramaniam, 2018), además estos resultados coinciden con lo reportado por Wu et al, (2017) donde obtuvieron a *Actinobacter* como el filo dominante seguido de *Proteobacteria* (Baoune et al., 2018; Wu, Ye, et al., 2017). De igual manera se visualiza una disminución

pronunciada en todas las divisiones a excepción de Actinobacteria, lo cual respalda la acción influyente de los estimulantes empleados en los tratamientos BsT y BL.

Ahora bien, al revisar los resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de género como se muestra en el Anexo 9, se observa un aumento en la población de bacterias del género *Nocardioides* que son ampliamente catalogadas como potentes degradadores de hidrocarburos, como concluye Vazquez et al, (2017) donde encontraron comunidades de bacterias relacionadas a *Nocardioides* únicamente en muestras contaminadas con hidrocarburos (Vázquez et al., 2017; Wu, Ye, et al., 2017). De igual manera, el género *Streptomyces* es tolerante a los hidrocarburos, como lo reporta Baoune et al (2018), que obtuvo hasta un 98% de degradación (Baoune et al., 2018), así mismo, Kumari et al (2018) empleó este género para promover la producción de biosurfactantes que mejoren la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Kumari, Kumar, & Manickam, 2018).

Otro género que mostró estimulación al aplicar los tratamientos fue *Dietzia*, que según Chen et al (2017) presenta alta capacidad degradativa de alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos, llegando a una degradación mayor al 80 % (Chen, Li, Sun, Min, & Hu, 2017), por su lado Wang et al (2011) reafirma lo anterior, concluyendo que este género es capaz de crecer en alcanos C6 a C40 y en compuestos aromáticos (X.-B. Wang et al., 2011).

Entre los géneros con aumento en su población luego de aplicar los tratamientos propuestos están, *Advenella*, *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter*. Estos últimos tres ampliamente reportados como tolerantes a los hidrocarburos, como lo demuestran los trabajos realizados por (Kumari et al., 2018; Roy et al., 2014; Sarkar et al., 2017; Wu, Ye, et al., 2017).

5.5 Prueba de Toxicidad

La prueba se llevó a cabo en 2 tratamientos, correspondientes a BsT y BL, los cuales obtuvieron los mayores porcentajes de degradación, de forma adicional se evaluaron 2 suelos control, suelo inicial contaminado (SIC) y suelo base sin presencia de fluidos y residuos de perforación base aceite (SI), para los cuales se realizaron 4 réplicas de cada uno. A continuación se presentan algunas propiedades que muestran variabilidad.

Tabla 22. Propiedades que presentan variaciones en los suelos evaluados

Tratamiento	Arcillas (%)	Humedad (%)	pH	HTP (ppm)
SI	10	35	6.2	0
SIC	10	35	7.7	14000
BsT	28	35	8.4	2333.3
BL	32	35	8.5	1666.7

Para la prueba se evaluó tasa de mortalidad a diferentes lapsos de tiempo (0 horas, 12 horas y 24 horas), que se ilustrarán con la tabla 23.

Tabla 23. Resultados de los conteos de lombrices

Tratamiento	0 horas	12 horas	24 horas
SI	0	0	0
SIC	0	4	23
BsT	0	4	23
BL	0	3	19

Al contrastar la información dada por la tabla 22 y 23, se puede ver una influencia en la mortalidad del tratamiento SIC debido a la gran cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo (14000 ppm), que tendría efecto en el metabolismo de las lombrices como es reportado por varios autores (Lladó et al., 2012; Roy et al., 2014; Salanitro et al., 1997), lo cual avala el comportamiento sin variaciones del tratamiento SI, que no presentó tasa de mortalidad alguna, gracias a la ausencia de los fluidos y residuos de perforación base aceite.

Por otro lado, los tratamientos BsT y BL que presentaron una alta biodegradación, reportaron de igual forma una tasa de mortalidad similar a SIC que indica un deterioro en su metabolismo. Algunas propiedades con variación como pH y humedad fueron similares en todos, del mismo modo Xu et al, (2013) reporta que existe una preferencia de las lombrices hacia suelos de textura más fina ya que son mejores para retener humedad que los suelos arenosos, con lo cual sería viable afirmar una independencia respecto a estas propiedades fisicoquímicas de los tratamientos evaluados.

De igual manera se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples para determinar si existe diferencia significativa entre los suelos descritos.

Tabla 24. Análisis de varianza (24 horas)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	90.6875	3	30.2292	14.96	0.0002
Intra grupos	24.25	12	2.02083		
Total	114.938	15			

Los resultados anteriores muestran que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados, con lo cual se puede afirmar que la toxicidad de las muestras analizadas varía.

Tabla 25. Prueba de Scheffé (24 horas)

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SI	4	0	A
SIC	4	4.75	B
BsT	4	5.75	B
BL	4	5.75	B

De la tabla 25 se visualiza la prueba de Scheffé, donde muestra diferencia significativa entre el suelo inicial base (SI) y las demás muestras, de igual manera se evidencia que los tratamientos BsT, BL y el suelo inicial contaminado no presentan diferencia significativa entre sí, razón por la cual indica que aunque la presencia de HTP disminuyeron más del 80% en los tratamientos BsT y BL, el suelo presenta una toxicidad similar a la muestra SIC que puede estar influida en gran medida por los aditivos químicos desconocidos del fluido y residuos de perforación base aceite (Durgut, Rye, Reed, Smit, & Ditlevsen, 2015; Kogbara, Ogar, Okparanma, & Ayotamuno, 2016).

Lo anterior es debido a que los suelos SIC, BsT y BL contienen fluidos y residuos de perforación base aceite, que entre sus componentes poseen aditivos químicos para estabilizar emulsiones, ajustadores de pH, agentes de peso, viscosificantes, biocidas y demás, que pueden ser sales inorgánicas, sólidos inertes, compuestos metálicos, solventes, entre otros (Adekunle et al., 2013; Hu, Li, & Zeng, 2013; Khan & Islam, 2007; Mac-acquaye & Aidoo, 2016). Sin embargo, la lista anterior de aditivos es implementada y resguardada por cada empresa de servicios petroleros, por lo tanto, no fue conocida al momento de realizar la presente investigación.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Al revisar los altos porcentajes de degradación de hidrocarburos alcanzados mediante la aplicación de los diferentes tratamientos propuestos como bioaumentación, bioestimulación y la unión de estos dos, se evidencia una gran eficiencia de los procesos biológicos en compañía de estimulantes orgánicos e inorgánicos, llegando a porcentajes de degradación mayores al 85% en un tiempo de 90 días.

La caracterización de propiedades físicas y químicas del suelo contaminado al inicio y final de los experimentos aportan información sobre el cambio de las mismas y sus causas. Sus resultados muestran un aumento en las concentraciones de nitrógeno y fósforo gracias a la implementación del método de McCarty que al balancear la relación C:N:P promueve la biodegradación bacteriana, la cual no tuvo afectación debido a las condiciones de pH que se dieron en el desarrollo de los tratamientos, de forma análoga se muestra un fuerte incremento en la fracción de arcillas y disminución en el contenido de arenas, en gran medida debido a la disminución de HTP que tuvo incidencia en el método Bouyoucos empleado, razón por la cual, se recomienda no ser empleado en suelos con presencia de hidrocarburos sin aplicar solvente a la muestra a estudiar.

Por su parte, el tratamiento BL, presentó una fuerte alza en su contenido de materia orgánica, gracias a la adición periódica de Leonardita que se compone de ácidos húmicos y fúlvicos, de forma adicional debido al compost, que fue empleado como una fuente de materia orgánica para mejorar las condiciones de la comunidad bacteriana y además aumentar su población, ya que tenía $1.8 \cdot 10^8$ UFC/gr suelo.

La microscopia electrónica de barrido permitió establecer presencia de metales pesados en las muestras de fluido y residuos de perforación, como lo han reportado diferentes autores. Sin embargo, no fue una variable adicional al complejo conjunto de factores influyentes en un proceso de biorremediación, razón por la cual la investigación se enfocó principalmente en la degradación de HTP.

El monitoreo de la tasa de degradación se llevó a cabo teniendo en cuenta la verificación de algunos factores influyentes, como el potencial de hidrógeno, el cual tuvo un comportamiento creciente hasta llegar a valores cercanos a 8.3, respirometría, comportamiento del crecimiento bacteriano, análisis de diversidad bacteriana y cuantificación de HTP residuales.

Por medio de la respirometría se pudo obtener una cinética de producción de dióxido de carbono, la cual presentaba un comportamiento dual, teniendo una disminución al día 30.

Para evitar este comportamiento, se realizó previamente, una respirometría inicial en la cual se concluyó implementar una concentración de 25 CMC para el Tween 80 y además realizar adiciones periódicas de surfactante, limoneno, melaza y leonardita cada 14 días para mantener una producción de CO₂ óptima. Lo anterior se notó al presentarse en los tratamientos propuestos una producción de carbono por encima de estudios similares, sin embargo, indica posiblemente un aumento en el suministro de los estimulantes empleados luego del día 30 para mantener el comportamiento inicial.

Ahora bien, el comportamiento de las bacterias, tanto heterótrofas como hidrocarburoclastas, se pudo evidenciar un incremento notable luego de la adición periódica de los estimulantes anteriormente mencionados, de igual forma, se visualiza un aumento paulatino respecto al inicio de los tratamientos que es consecuente con la creciente producción de dióxido de carbono presentada en la respirometría.

Mediante la obtención del índice de Shannon se pudo comprobar una reducción hasta del 35% en la diversidad bacteriana, mostrando una gran población de bacterias de la división *Actinobacteria* seguido de *Proteobacteria*, las cuales son características de la microbiota del suelo. Consecuentemente, al obtener los resultados de abundancia a nivel de género se observa un aumento en los tratamientos BsT y BL de bacterias de los géneros *Norcardioides*, *Streptomyces*, *Dietzia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter*, que son ampliamente reportadas como tolerantes a los hidrocarburos, por lo tanto se puede afirmar que la comunidad bacteriana de los tratamientos más eficientes, que fueron BL y BsT, se adaptó al ambiente contaminado con HTP, modificando en parte sus interacciones antagónicas y sinérgicas.

Luego del tiempo propuesto para los tratamientos se realizó la cuantificación de los HTP residuales, donde el tratamiento de Atenuación Natural obtuvo el menor porcentaje de degradación, correspondiente a 28.6%, así mismo, se comprobó que la adición de ácido Clorhídrico influye en la disminución notoria de hidrocarburos, dando un porcentaje de degradación superior al 75% como consecuencia de un proceso de oxidación de los hidrocarburos. Para los demás tratamientos, B, Bs, BsT, BsTL y BL se presentaron porcentajes de 76%, 66%, 83%, 69% y 88% respectivamente, que indican un efecto positivo gracias al aumento de bacterias, presencia de surfactante, limoneno, leonardita y melaza, ya que los microorganismos tienen la necesidad que el contaminante se encuentre biodisponible y además de la presencia de un sustrato secundario como la melaza los cuales ayudan a promover la degradación biológica de los hidrocarburos.

Teniendo en cuenta que la concentración inicial de HTP fue de 14000 ppm y se obtuvieron remociones mayores al 65%, que corresponden a valores finales menores a 5000 ppm de HTP, los tratamientos B, Bs, BsT, BsTL y BL cumplen con los límites máximos de hidrocarburos en suelos de bajo y mediano impacto como están estipulados en la resolución 1170 de 1999 del Departamento Administrativo de Medio Ambiente (DAMA).

Al momento de evaluar la toxicidad no se evidenció reducción alguna, con lo cual se afirma una relación con los aditivos presentes en la matriz contaminante, ya que se trabajó con suelos contaminados con fluidos y residuos de perforación, que corresponden a una mezcla compleja de diferentes compuestos y aditivos los cuales usualmente no son de conocimiento público y hacen parte de cada empresa.

Finalmente, los tratamientos BsT y BL con porcentajes de degradación correspondientes a 83% y 88% respectivamente fueron lo de mayor eficiencia, sin embargo sus resultados fueron muy similares con lo cual se puede afirmar que para tratamientos a un escala mayor podría optarse por el tratamiento BsT ya que posee una menor cantidad de estimulantes que conlleva a una reducción económica al momento de su implementación.

6.2 Recomendaciones

Se puede implementar una investigación relacionada, variando concentraciones de Leonardita y además de D-limoneno para obtener una concentración óptima aumentando la degradación de hidrocarburos de forma aerobia.

Con la finalidad de evitar pérdidas parciales de nitrógeno por volatilización se puede realizar la estimulación de nutrientes (N y P) por pulsos semanales o periodos cortos.

De igual manera, se puede implementar otra fuente de nitrógeno con el objetivo de evitar en las pruebas de respirometría la contabilización de CO₂ debido al proceso de volatilización.

Para mejorar la información resultante de las pruebas de toxicidad se podría implementar pruebas periódicas durante el transcurso de los tratamientos y así ver su relación con la degradación de los hidrocarburos.

Es necesario al momento de trabajar con fluidos y residuos de perforación tratar de indagar sobre la presencia y cuantificación de los aditivos usados por las empresas operadoras, de no ser posible, se deberían llevar a cabo pruebas de detección más potentes como Espectrofotometría de absorción atómica.

Teniendo en cuenta el literal anterior, evaluar los protocolos BsT y BL a una escala mayor, en suelos con presencia de fluidos y residuos de perforación base aceite, para corroborar su eficiencia.

A. Anexo 1: Muestreo y pretratamiento de suelo base

El sitio de muestreo se encuentra ubicado en la ciudad de Medellín que está situada en el centro del Valle de Aburrá en el departamento de Antioquia, con una altitud de 1475 m.s.n.m y una temperatura promedio de 24 °C.

Específicamente el muestreo se realizó en los predios de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, Facultad de Agronomía, ubicado en latitud: 6°26'28.73"N y longitud: 75°57'77.10"N, que corresponden a suelos compuestos de una capa superficial de depósitos aluviales finos contiguos a un estrato aluvial grueso granular apoyado sobre rocas metamórficas (anfíbolitas en su mayoría) correspondientes al Neis de La Iguaná(CAM, 2011).

Con base en lo estipulado por el IDEAM se realizó un muestreo aleatorio iniciando con un descapote del material vegetal, seguido de la toma de muestra a una profundidad mayor a los 40 centímetros, donde se tomaron cerca de 55 kilogramos de material. A continuación de muestran imágenes del proceso.



Figura 9. Registro fotográfico proceso de muestreo de suelo base

De manera análoga, se procedió con el pretratamiento del suelo base ya que se conformaba en su mayoría de grandes terrones, iniciando con un corto secado mediante radiación solar seguido de una molienda mecánica del mismo y finalmente se tamizó con la ayuda de una Ro-Tap para obtener un tamaño de partícula de 2 mm, como se puede evidenciar a continuación:



A) Suelo base inicial



B) Proceso de molienda mecánica



C) Suelo base molido



D) Suelo base molido y tamizado

Figura 10. Pretratamiento del suelo base

B. Anexo 2: Muestras de Fluidos y residuos de perforación

A continuación se dan a conocer imágenes del contaminante correspondiente a fluidos y residuos de perforación base aceite, que provenían del campo petrolero FLOREÑA a cargo de la empresa EQUION, estos fueron transportados cumpliendo los requisitos de seguridad de las empresas de transporte.



Figura 11. Muestra de Fluidos y residuos de perforación

C. Anexo 3: Contaminación del suelo base

Luego de obtener el suelo base homogéneo con tamaño de partícula 2mm se procedió a realizar la incorporación manual de los fluidos y residuos de perforación para obtener así el suelo contaminado artificialmente para llevar a cabo la presente investigación.



Figura 12. Incorporación manual de los fluidos de perforación



Figura 13. Incorporación manual de los residuos y cortes de perforación



Figura 14. Suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación.

D. Anexo 4: Concentración óptima de Tween 80



Figura 15. Montaje prueba de concentración óptima de Tween 80



Figura 16. Prueba de respirometría para concentración óptima de Tween 80

E. Anexo 5: Montaje de tratamientos a escala de laboratorio





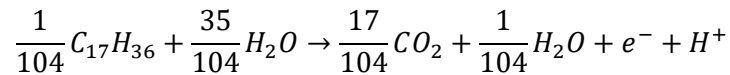
Figura 17. Montaje de los tratamientos

F. Anexo 6: Cálculo de McCarty

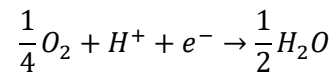
Cálculo dosificación de nutrientes

Con base en la formula tentativa del hidrocarburo ($C_{17}H_{36}$) que se ilustrará en el Anexo 7, se procedió a desarrollar el método de McCarty. Los datos de la concentración de nitrógeno y fósforo fueron obtenidos mediante la caracterización fisicoquímica del suelo inicial.

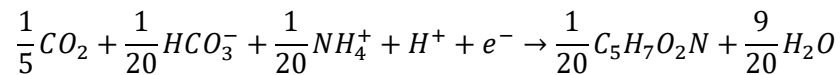
- Semireacción donador de electrones (R_d)



- Semireacción aceptor de electrones (R_a)



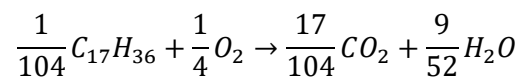
- Semireacción de síntesis (R_c)



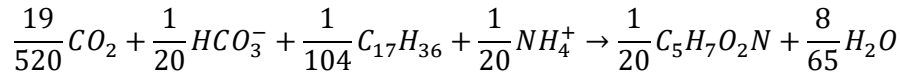
La reacción de energía es: $R_e = R_a - R_d$

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

Se obtiene para R_e :



Se obtiene para R_s :



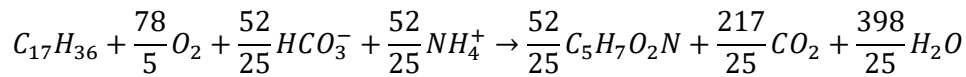
Teniendo $f_s = 0.4$ como la fracción de carbono destinada para el proceso de síntesis y a $f_e = 0.6$ como la fracción de carbono para los procesos energéticos.

$$f_e + f_s = 1$$

La reacción global del proceso se determina mediante la siguiente ecuación:

$$R = f_e R_e + f_s R_s$$

Donde R es:



Para la obtención de las relaciones molares (C:N:P) se tiene en cuenta el peso molecular del donador de electrones es 240 g/mol, nitrógeno 14 g/mol y oxígeno 32 g/mol.

$$1: \frac{52}{25} * \frac{14}{240} : \frac{1}{6} \left(\frac{52}{25} * \frac{14}{240} \right)$$

Luego la relación C:N:P es:

$$1:0.12:0.02$$

Con lo cual finalmente se obtiene que para 100 gramos del hidrocarburo $C_{17}H_{36}$ se necesitan 12 gramos de Nitrógeno y 2 gramos de Fósforo, dando una relación aproximada de C:N:P de 100:12:2.

- Concentración de D-limoneno & Tween 80 → 25 CMC

$$392.25 \frac{mg \text{ T80}}{L \text{ sln}}$$

- Concentración de Leonardita → 3% p/p
- Cantidad de Melaza → 3.67 gr

G. Anexo 7: Determinación fórmula molecular del hidrocarburo y ruta degradativa

• DETERMINACIÓN FÓRMULA MOLECULAR DEL HIDROCARBURO

Luego de la incorporación del suelo base y los fluidos y residuos de perforación base aceite, se realizó una extracción Soxhlet y luego una Cromatografía de gases acoplado a masas con lo cual se identificaron los hidrocarburos presentes. Ahora bien, con la metodología implementada por Silva, Delerue & Matos (2005) y Agudelo (2010) se procedió a tomar los hidrocarburos con probabilidad de coincidencia mayor al 90% que correspondieron a compuestos alifáticos con número de carbonos menores a 26 (Agudelo, 2010; Silva, Delerue-Matos, & Fiúza, 2005).

Tabla 26. Determinación del hidrocarburo representativo

Nombre del Compuesto Químico	CAS	Gramos aportados por cada átomo de acuerdo a su peso atómico		Fracción másica total basada en la concentración	Contribución al peso atómico total	
		C	H		C	H
Dodecano	112403	144	26	12,98	18,70	3,38
Tridecano	629505	156	28	11,28	17,60	3,16
Pentadecano	629629	180	32	11,31	20,36	3,62
Ciclopentadecano	295487	180	30	3,97	7,15	1,19

Hexadecano	544763	192	34	6,70	12,87	2,28
Pentadecano,2,6,10-Trimetil	3892000	216	38	5,06	10,93	1,92
Heptadecano	629787	204	36	5,81	11,86	2,09
Pentadecano,2,6,10,14-Tetrametil	1921706	228	40	3,96	9,03	1,58
Octadecano	593453	216	38	5,73	12,38	2,18
Hexadecano,2,6,10,14-Tetrametil	638368	240	42	4,02	9,66	1,69
Nonadecano	629925	228	40	8,44	19,24	3,37
Eicosano	112958	240	42	6,14	14,75	2,58
Heneicosano	629947	252	44	3,92	9,88	1,73
Docosano	629970	264	46	3,35	8,84	1,54
Nonadecano	629925	228	40	2,73	6,22	1,09
Tetracosano	646311	288	50	2,03	5,85	1,02
Pentacosano	629992	300	52	1,53	4,58	0,79
Hexacosano	630013	312	54	1,02	3,19	0,55
				100	203,08	35,77
					16,92	

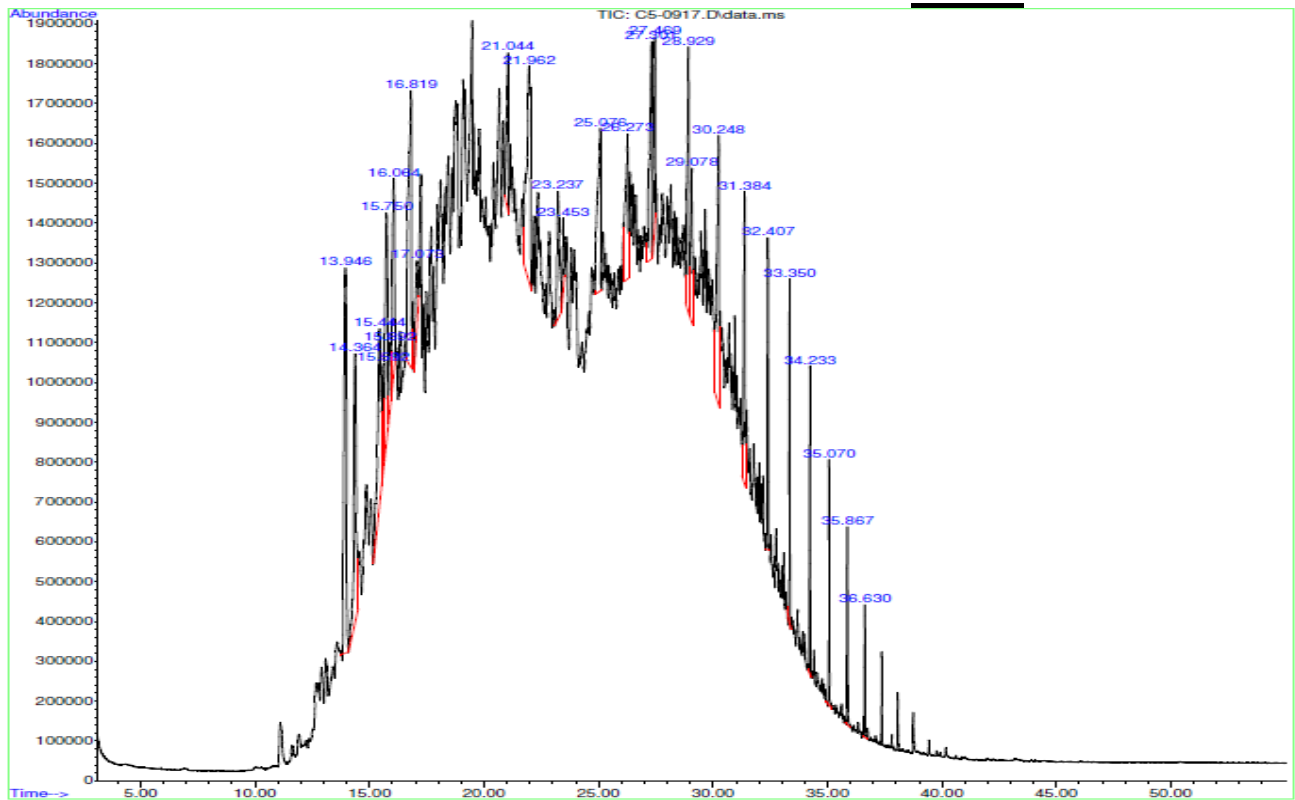
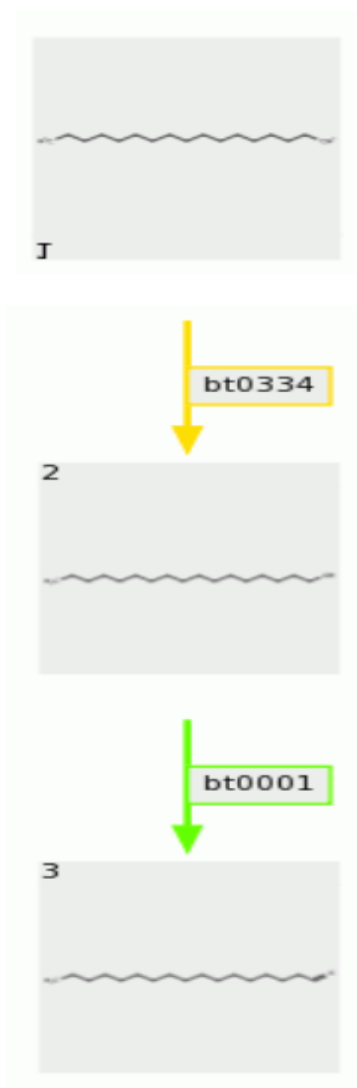


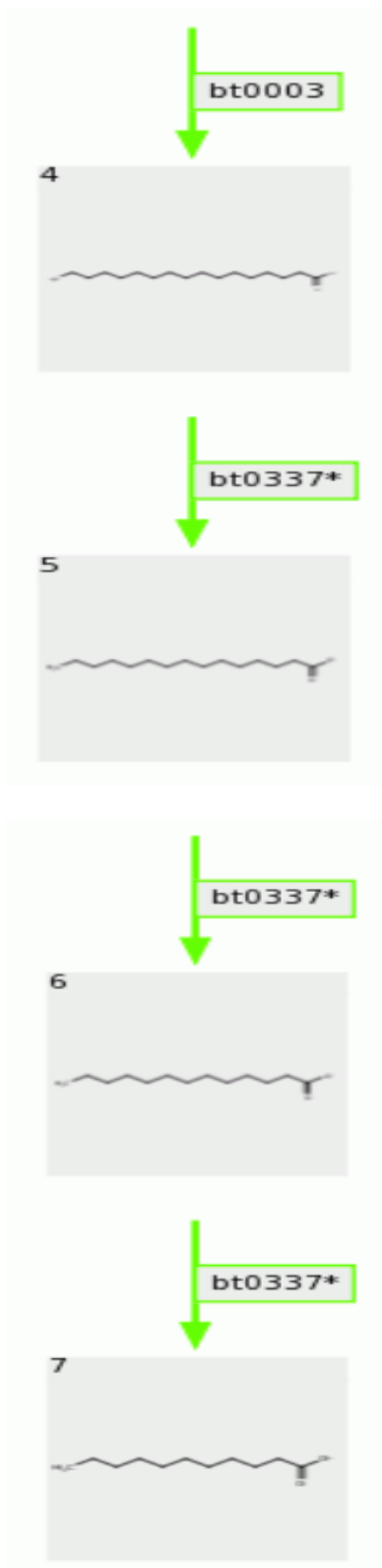
Figura 18. Espectro cromatográfico de gases-masas del suelo contaminado inicial

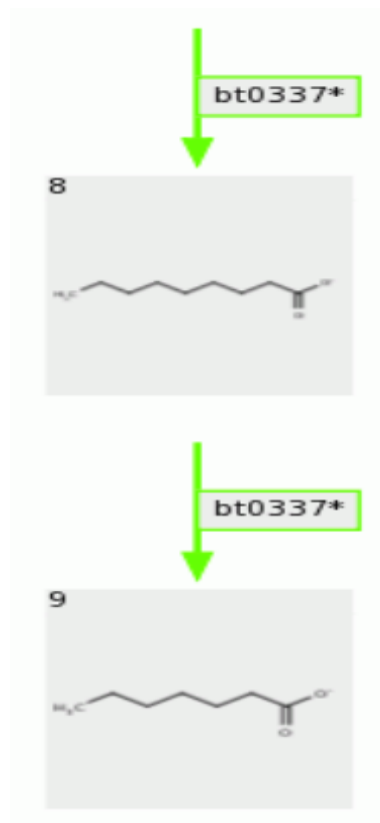
De esta manera la formula molecular tentativa para el hidrocarburo representativo es:
C₁₇H₃₆.

- **RUTA DEGRADATIVA DEL HIDROCARBURO**

A continuación se muestra la ruta degradativa obtenida de la base de datos de biocatálisis y biodegradación de la Universidad de Minnesota (Minnesota University, n.d.).







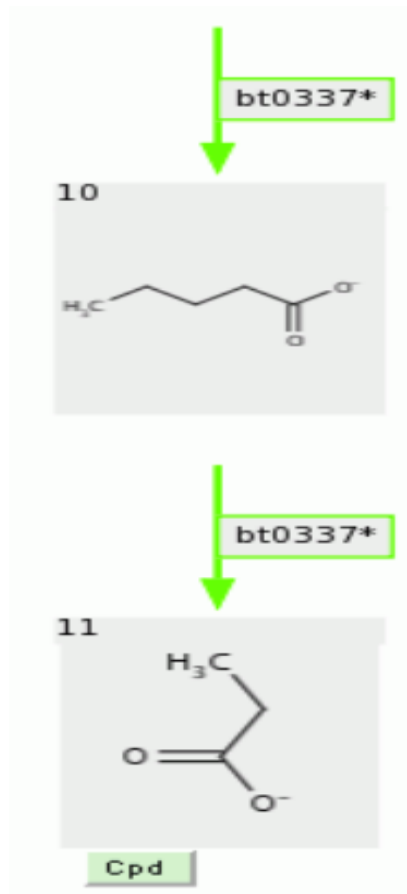


Figura 19. Ruta degradativa del hidrocarburo

H. Anexo 8: Montaje y desarrollo prueba de toxicidad



Figura 20. Montaje de los tratamientos a evaluar



Figura 21. Prueba de mortalidad

I. Anexo 9: Resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de género

Tabla 27. Resultados generales de los análisis de clasificación y abundancia a nivel de género.

taxlevel	rankID	taxon	total	BL	Bs	SI
6	0.2.2.1.3.23.7	Nocardioides	26525	18728	7439	358
6	0.2.2.1.3.30.3	Streptomyces	13474	5699	6786	989
6	0.2.25.2.1.1.1	Spartobacteria_unclassified	8732	2141	2963	3628
6	0.2.5.1.1.1.1	Bacteria_unclassified	8453	1614	1770	5069
6	0.2.22.1.4.11.1	Rhizobiales_unclassified	7628	1245	1497	4886
6	0.2.2.1.6.1.1	Gaiella	4956	674	916	3366
6	0.2.2.1.3.11.1	Dietzia	4782	1123	3659	0
6	0.2.22.2.2.1.2	Advenella	4083	2025	2058	0
6	0.2.21.3.1.1.7	Planctomycetaceae_unclassified	3825	718	435	2672
6	0.2.2.1.3.2.1	Actinomycetales_unclassified	3788	1394	1600	794
6	0.2.13.1.1.2.3	Bacillus	3503	729	1377	1397
6	0.2.2.1.3.22.1	Gordonia	3249	588	2658	3
6	0.2.1.15.1.1.1	Gp6_unclassified	2735	570	601	1564
6	0.2.2.1.2.1.1	Actinobacteria_unclassified	2302	370	424	1508
6	0.2.2.1.3.4.2	Brevibacterium	2285	899	1386	0
6	0.2.2.1.3.30.4	Streptomycetaceae_unclassified	2188	227	255	1706
6	0.2.25.3.2.1.1	Subdivision3_unclassified	1943	193	292	1458
6	0.2.22.2.1.1.1	Betaproteobacteria_unclassified	1922	360	397	1165
6	0.2.22.5.9.2.3	Pseudomonas	1888	78	1794	16
6	0.2.13.1.1.6.1	Bacillales_unclassified	1771	441	527	803
6	0.2.2.1.3.18.1	Arthrobacter	1767	853	876	38
6	0.2.22.3.7.6.1	Myxococcales_unclassified	1622	273	306	1043
6	0.2.22.3.3.1.1	Deltaproteobacteria_unclassified	1482	203	293	986
6	0.2.22.5.5.1.1	Gammaproteobacteria_unclassified	1444	366	280	798
6	0.2.1.5.1.1.1	Gp16_unclassified	1411	251	160	1000
6	0.2.2.2.1.1.1	Actinobacteria_unclassified	1396	276	248	872
6	0.2.1.13.4.1.1	Gp4_unclassified	1344	177	244	923
6	0.2.2.1.3.23.6	Nocardioideaceae_unclassified	1280	811	329	140
6	0.2.13.1.1.2.2	Bacillaceae_1_unclassified	1179	250	371	558

6	0.2.22.2.2.1.4	Bordetella	1129	237	892	0
6	0.2.26.1.1.1.1	candidate_division_WPS- 1_unclassified	976	179	298	499
6	0.2.2.1.3.10.1	Brachy bacterium	960	486	474	0
6	0.2.2.1.3.19.13	Micromonosporaceae_unclassified	892	138	189	565
6	0.2.1.1.4.1.1	Gp1_unclassified	843	111	201	531
6	0.2.22.1.6.3.7	Rhodospirillaceae_unclassified	797	149	283	365
6	0.2.2.1.3.25.2	Isoptericola	778	283	493	2
6	0.2.2.1.1.2.1	Acidimicrobiales_unclassified	775	136	141	498
6	0.2.22.1.4.12.4	Rhodobiaceae_unclassified	754	121	248	385
6	0.2.6.5.1.1.2	Chitinophagaceae_unclassified	742	116	97	529
6	0.2.2.1.3.27.9	Pseudonocardia	665	369	212	84
6	0.2.1.16.1.1.1	Gp7_unclassified	663	113	166	384
6	0.2.22.1.6.4.1	Rhodospirillales_unclassified	656	165	125	366
6	0.2.19.1.1.1.1	Nitrospira	642	140	204	298
6	0.2.2.1.3.14.1	Intrasporangiaceae_unclassified	624	246	337	41
6	0.2.1.12.3.1.1	Gp3_unclassified	610	107	98	405
6	0.2.1.12.1.1.1	Acidobacteria_Gp3_unclassified	599	90	136	373
6	0.2.2.1.3.18.4	Micrococcaceae_unclassified	581	187	391	3
6	0.2.9.1.1.1.1	Anaerolineaceae_unclassified	562	193	69	300
6	0.2.22.1.2.1.1	Alphaproteobacteria_unclassified	557	180	99	278
6	0.2.22.1.6.2.1	Reyranella_unclassified	553	103	136	314
6	0.2.22.1.4.3.4	Bradyrhizobium	550	73	91	386
6	0.2.22.7.1.1.1	Proteobacteria_unclassified	508	92	116	300
6	0.2.9.5.1.1.1	Ktedonobacter	500	83	198	219
6	0.2.2.1.3.22.5	Rhodococcus	491	204	283	4
6	0.2.9.3.1.1.1	Chloroflexi_unclassified	484	116	95	273
6	0.2.9.6.1.1.3	Sphaerobacteraceae_unclassified	466	78	348	40
6	0.2.2.1.3.23.2	Aeromicrobium	455	109	331	15
6	0.2.2.1.3.20.2	Mycobacterium	445	109	135	201
6	0.2.14.1.1.1.1	Gemmatimonas	404	62	75	267
6	0.2.1.6.1.1.1	Gp17_unclassified	393	60	74	259
6	0.2.1.8.1.1.1	Gp2_unclassified	379	53	136	190
6	0.2.22.3.7.3.1	Kofleria	377	40	60	277
6	0.2.21.3.1.1.5	Pirellula	364	33	16	315
6	0.2.2.1.3.17.8	Microbacterium	361	181	171	9
6	0.2.2.1.3.23.4	Marmoricola	352	109	61	182
6	0.2.21.3.1.1.12	Zavarzinella	332	30	24	278

Bibliografía

- 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>
- Adekunle, I. M., Igbuku, A. O., Oguns, O., & Shekwolo, P. D. (2013). Emerging Trend in Natural Resource Utilization for Bioremediation of Oil — Based Drilling Wastes in Nigeria. *Biodegradation-Engineering and Technology*, ISBN, 389–432.
- Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH). (2014). *Informe de Gestión 2013*. Bogotá, Colombia.
- Agnello, A. C., Huguenot, D., van Hullebusch, E. D., & Esposito, G. (2015). Phytotoxicity of Citric Acid and Tween® 80 for Potential Use as Soil Amendments in Enhanced Phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 17(7), 669–677. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.964837>
- Agudelo, E. (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*. Universidad Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aguilera, N. (1989). *Tratado de Edafología de México*. (Facultad de Ciencias, Ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Agwu, O. A., Ilori, M. O., & Nwachukwu, S. U. (2013). Utilization of Drilling Fluid Base Oil Hydrocarbons by Microorganisms Isolated from Diesel-Polluted Soil. *Soil and Sediment Contamination*, 22(7), 817–828. <https://doi.org/10.1080/15320383.2013.768205>
- AIHE. (2017). *El petróleo en cifras 2016*. Quito, Ecuador. Retrieved from https://issuu.com/aihecuador/docs/folleto_petroleo_en_cifras_2016
- Alavi, N., Mesdaghinia, A. R., Naddafi, K., Mohebbi, G., Daraei, H., Maleki, A., & Alaei, L. (2014). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in a Soil Polluted Sample by Oil-Based Drilling Cuttings. *Soil and Sediment Contamination*, 23(5), 586–597. <https://doi.org/10.1080/15320383.2014.847900>
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Alvarez, A., & Polti, M. A. (2014). *Bioremediation in Latin America*. (A. Alvarez & M. A. Polti, Eds.). London, England. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5>

- Alvarez, P., & Illman, W. (2006). *Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models*. (J. Schnoor & A. Zehnder, Eds.). John Wiley & Sons, INC.
- Alvaro, C. E. S., Arocena, L. A., Martínez, M. Á., & Nudelman, N. E. S. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 247–257. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.06>
- Arrieta, O. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental*. 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(5), 637–650.
- Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science and Technology*, 45(16), 6709–6715. <https://doi.org/10.1021/es2013227>
- Ayyaswami, A., & Vishwanathan, S. (2010). State of the Art of Remediation for Petroleum Industries. *SPE Middle East Health, Safety, Security, and Environment Conference and Exhibition. Manama, Bahrain.*, 1–5. <https://doi.org/10.2118/136529-ms>
- 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(5), 457–473. <https://doi.org/10.1177/0734242X11419892>
- Baoune, H., Ould, A., Hadj-Khelil, E., Pucci, G., Sineli, P., Loucif, L., & Polti, M. A. (2018). Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013>
- Barer, M. (2015). Chapter 10 - Bacterial growth, culturability and viability. In E. Science (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 181–199). Academic Press.
- Barrios, L., Robayo, J., Prieto, S., & Cardona, S. (2015). Biorremediación de Suelos Contaminados con Aceites Usados de Motor. *Revista CINTEX*, 20(1), 69–96.
- Berg, W., Gruden, D., & Hutzinger, O. (2010). *The handbook of environmental chemistry*:

Biodegradation of Azo Dyes. (D. Barcelo & A. Kostianoy, Eds.).

https://doi.org/10.1007/b_10457

Bouyoucos, G. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54(5), 464–465.

<https://doi.org/http://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>

Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorous in soils. *Soil Science*, 59, 39–45.

Caenn, R., Darley, H. C. H., & Gray, G. R. (2011a). *Chapter 12 - Drilling and Drilling Fluids Waste Management. Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383858-2.00012-3>

Caenn, R., Darley, H. C. H., & Gray, G. R. (2011b). *Chapter 2 - The Development of Drilling Fluids Technology. Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383858-2.00002-0>

Calderoli, P. (2016). *Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos*. Universidad Nacional de la Plata.

CAM. (2011). *Descripción de Zonas Homogeneas. Microzonificación Sísmica del Área Urbana de Medellín*. Medellín, Colombia.

Cámara Colombiana de Bienes & Servicios Petroleros. (2015). Perforacion de pozos y factor de exito comercial en colombia. Retrieved October 24, 2016, from <http://campetrol.org/perforacion-de-pozos-y-factor-de-exito-comercial-en-colombia/>

Castebianco Casallas, I. F., & Niño Avendaño, J. (2011). *Manejo Y Tratamiento Actual De Residuos Aceitosos En La Industria Petrolera Colombiana*. Universidad Industrial de Santander. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.001>

Castillo, F., Roldán, M., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., & Martínez, M. (2005). *Biotecnología ambiental*. (R. Irazábal, Ed.). Madrid: Editorial Tébar Flores.

Celis, J. E., Sandoval, M., Martinez, B., & Quezada, C. (2013). Effect of organic and mineral amendments upon soil respiration and microbial biomass in a saline-sodic soil. *Ciencia E Investigacion Agraria*, 40(3), 571–580.

Celis, J., Sandoval, M., & Zagal, E. (2009). Actividad respiratoria de microorganismos en un suelo patagónico enmendado con lodos salmonícolas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(3), 275–279. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2009000300013>

- Chaillan, F., Chaîneau, C. H., Point, V., Saliot, A., & Oudot, J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution*, *144*(1), 255–265.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.016>
- Chaîneau, C.-H., Vidalie, J.-F., Hamzah, U. S., Suripno, Asmaradewi, G., & Najib, M. (2003). Bioremediation of Oil-Based Drill Cuttings under Tropical Conditions. *SPE 13th Middle East Oil Show & Conference, Bahrain*, *13*, 1009–1015. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-18844476038&partnerID=40&md5=366aa0c5957230685f8f9473049fd449>
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., & Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, *63*(2), 417–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>
- Chang, Y., Wang, X., Han, Y., & Wang, M. (2014). Chapter 134 - The removal of crude oil in waste drilling muds by a constructed microbial consortium. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology*, *251*(Icab 2012).
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-37925-3>
- Chaves Villarreal, C., & Puente, A. (2013). *Evaluación de las técnicas SEM y EDS para la investigación nanotecnológica de catalizadores para la producción de biocombustibles*. Cartago, Costa Rica.
- Chen, W., Li, J., Sun, X., Min, J., & Hu, X. (2017). High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *118*, 110–118.
<https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.01.029>
- Cheng, K. Y., & Wong, J. W. C. (2006). Effect of synthetic surfactants on the solubilization and distribution of PAHs in water/soil-water systems. *Environmental Technology*, *27*(8), 835–844. <https://doi.org/10.1080/09593332708618695>
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Yang, C., Lai, C., Zhang, C., & Liu, Y. (2017). Tween 80 surfactant-enhanced bioremediation: toward a solution to the soil contamination by hydrophobic organic compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–14.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1311296>
- COLFECAR. (2014). Colombia: ¿País petrolero o con petróleo? Retrieved June 24, 2017, from http://www.colfecar.org.co/ESTUDIOS ECONOMICOS PDF/Informes Especiales/2014/9. SEPTIEMBRE 2014_INFORME_COLOMBIA PAIS

PETROLERO O CON PETROLEO.pdf

- Cristaldi, A., Conti, G. O., Jho, E. H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C., & Ferrante, M. (2017). Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology and Innovation*, 8, 309–326.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.08.002>
- Cristancho, D. M., & Hoyos, J. M. (2008). *Procedimientos metodológicos para la caracterización de fluidos de campos maduros. Aplicación a los fluidos del Campo Colorado*. Universidad Industrial de Santander.
- D.A.M.A. Resolución 1170 de 1997 (1997). Bogotá, Colombia.
- Das, S., & Dash, H. R. (2014). *Chapter 1 - Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas*. (S. Das, Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7>
- Declercq, I., Cappuyns, V., & Duclos, Y. (2012). Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe-A critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.040>
- Dellagnezze, B. M., Vasconcelos de Sousa, G. ., Lopes Martins, L., Ferreira Domingos, D., Limache, E., Pantaroto de Vasconcellos, S., ... Maia de Oliveira, V. (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*, 89(1–2), 191–200.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>
- Dike, B., Okoro, B., Nwakwasi, N., & Agbo, K. (2013). Remediation of Used Motor Engine Oil Contaminated Soil: A Soil Washing Treatment Approach. *Journal of Civil & Environmental Engineering*, 3(1), 3–5. <https://doi.org/10.4172/2165-784X.1000129>
- Do Prado Wildner, L., & Da Veiga, M. (1992). Tema 2: Erosión y pérdida de fertilidad del Suelo. In *Erosión de suelos en América Latina*. América Latina: Food and Agriculture Organization. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/t2351s/T2351S06.htm>
- Domínguez, J., & Pérez Losada, M. (2010). Eisenia fetida (Savigny, 1826) y Eisenia andrei Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoologica Mexicana*, (n. s.) 2, 321–331pp. Retrieved from [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:EISENIA+FETIDA+\(SAVIGNY,+1826\)+Y+EISENIA+ANDREI+BOUCH?,+1972+SON+DOS+ESPECIES+DIFERENTES+DE+LOMBRICES+DE+TIERRA#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:EISENIA+FETIDA+(SAVIGNY,+1826)+Y+EISENIA+ANDREI+BOUCH?,+1972+SON+DOS+ESPECIES+DIFERENTES+DE+LOMBRICES+DE+TIERRA#0)

- Dudášová, H., Lukáčová, L., Murínová, S., & Dercová, K. (2012). Effects of plant terpenes on biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 69, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.003>
- Durgut, İ., Rye, H., Reed, M., Smit, M. G. D., & Ditlevsen, M. K. (2015). Dynamic modeling of environmental risk associated with drilling discharges to marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1–2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.019>
- Ecopetrol. (2013). *Reporte integrado de gestion sostenible Ecopetrol 2012. Global Reporting Interactive*. Bogotá, Colombia. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/relacion-inversionistas/informacion-financiera/informe-anual>
- Ecopetrol. (2014). *Reporte integrado de gestion sostenible Ecopetrol 2013. Global Reporting Interactive*. Bogotá, Colombia.
- Ecopetrol. (2015). *Reporte integrado de gestion sostenible Ecopetrol 2014. Global Reporting Interactive*. Bogotá, Colombia. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/relacion-inversionistas/informacion-financiera/informe-anual>
- Ecopetrol. (2016). *Reporte integrado de gestion sostenible Ecopetrol 2015. Ecopetrol*. Bogotá, Colombia. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/relacion-inversionistas/informacion-financiera/informe-anual>
- Ecopetrol. (2017). *Reporte integrado de gestión sostenible Ecopetrol 2016*. Bogotá, Colombia. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/relacion-inversionistas/informacion-financiera/informe-anual>
- Ekwuabu, C. B., Chikere, C. B., & Akaranta, O. (2016). Effect of Different Nutrient Amendments on Eco-Restoration of a Crude Oil Polluted Soil. *SPE African Health, Safety, Security, Environment and Social Responsibility Conference and Exhibition. Accra, Ghana.*, 1–17.
- FAO. (2000). *Soluciones para la compactación del suelo. Food and Agriculture Organization*. Roma, Italia.
- Fava, F., Berselli, S., Conte, P., Piccolo, A., & Marchetti, L. (2004). Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Biotechnology and*

- Bioengineering*, 88(2), 214–223. <https://doi.org/10.1002/bit.20225>
- Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., ... Arce Ortega, J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). España.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Filippson, A. F., Bard, J., & Karlsson, S. (1998). *Limonene*. World Health Organization. Geneva. Retrieved from <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad05.pdf>
- Gao, Y. C., Guo, S. H., Wang, J. N., Li, D., Wang, H., & Zeng, D. H. (2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*, 117(1), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.070>
- García-Sánchez, M., Košnář, Z., Mercl, F., Aranda, E., & Tlustoš, P. (2018). A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(September 2017), 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.012>
- García, C. (2008). *Biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos, empleando ácidos húmicos y lombrices (Eisenia andrei)*. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional.
- García, C., Ferrera, R., Poggi, H., Meléndez, M., & Barrera, J. (2007). Restauración de un suelo contaminado con hidrocarburos intemperizados, mediante ácidos húmicos. *XII Congreso Nacional de Biotecnología Y Bioingeniería*, 1.
- Geehan, T., Gilmour, A., & Guo, Q. (2007). The Cutting Edge in Drilling-Waste Management. *Oilfield Review*, 54–67.
- Gómez, W. (2009). *Evaluación de la atenuación natural estimulada en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina - Diesel a escala de laboratorio*.

- Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation – Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.165>
- Guerrero Ortiz, P., Quintero, R., Espinoza, V., Benedicto, G., & Sánchez, M. (2012). Respiración de CO₂ como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de Lupinus. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 355–362. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/573/57325814007.pdf>
- Gutiérrez, M. (2008). *Geomorfología*. (M. Romo, Ed.). Madrid, España: Pearson Educación.
- Hamza, L. H., Adly, T. A., & Afifi, S. (2008). Bioremediation - The journey from hazardous to green. *SPE International Conference on Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production. Nice, France., 2*, 769–778. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-52349098789&partnerID=40&md5=5af9eca753e79db689d13ce2eef28e74>
- Hatzikioseyan, A. (2010). *Principles of bioremediation processes*. (G. Plaza, Ed.), *Trends in Bioremediation and Phytoremediation* (Vol. 661). Kerala, India. <https://doi.org/10.17226/2131>
- Heipieper, H. (2007). *Bioremediation of Soils contaminated with aromatic compounds*. (H. Heipieper, Ed.). Springer.
- Hernández, J. (2010). *Análisis de los fluidos de perforación en la industria petrolera*. Universidad Veracruzana.
- Hu, G., Li, J., & Zeng, G. (2013). *Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review*. *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 261). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>
- IDEAM. (2007). *Resolucion 062 de 2007. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*. Bogotá, Colombia.
- Iturbe, R. (2010). *¿Qué es la biorremediación?* (J. Tonda & N. Chávez, Eds.), *Universidad Nacional Autónoma de México* (1a Edición, Vol. 53). D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jackson, M. (1964). *Análisis químico del suelo*. Barcelon, España.: Omega.

- Jang, M., Hwang, J. S., & Choi, S. II. (2007). Sequential soil washing techniques using hydrochloric acid and sodium hydroxide for remediating arsenic-contaminated soils in abandoned iron-ore mines. *Chemosphere*, 66(1), 8–17.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.056>
- Jaramillo, D. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. (Facultad de Ciencias, Ed.). Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jaramillo, D. (2014). *El Suelo: Origen, Propiedades, Espacialidad* (Segunda). Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Jednak, T., Avdalović, J., Miletić, S., Slavković-Beškoski, L., Stanković, D., Milić, J., ... Vrvic, M. M. (2017). Transformation and synthesis of humic substances during bioremediation of petroleum hydrocarbons. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 122, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.009>
- Ke, L., Bao, W., Chen, L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2009). Effects of humic acid on solubility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media and mangrove sediment slurries. *Chemosphere*, 76(8), 1102–1108.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.022>
- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1982). *Nitrogen - Inorganic forms*. (A. Page, R. Miller, & D. Keeney, Eds.) (Methods of). Madison, WI.: American Society of Agronomy.
- Khan, M. I., & Islam, M. R. (2007). *The Petroleum Engineering Handbook* (Second). Houston, Texas: Gulf Publishing Company.
- Kisic, I., Mesic, S., Basic, F., Brkic, V., Mesic, M., Durn, G., ... Bertovic, L. (2009). The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma*, 149(3–4), 209–216.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.11.041>
- Kogbara, R. B., Ayotamuno, J. M., Onuomah, I., Ehio, V., & Damka, T. G. D. (2016). Stabilisation/solidification and bioaugmentation treatment of petroleum drill cuttings. *Applied Geochemistry*, 71, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.05.010>
- Kogbara, R. B., Ogar, I., Okparanma, R. N., & Ayotamuno, J. M. (2016). Treatment of petroleum drill cuttings using bioaugmentation and biostimulation supplemented with phytoremediation. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 51(9), 714–721.

- <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1170437>
- Koul, S., & Fulekar, M. H. (2013). Petrochemical Industrial Waste: Bioremediation Techniques - An Overview. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 2(7), 211–257.
- Kumari, S., Kumar, R., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource Technology*, 1–26. Retrieved from https://ac-els-cdn-com.ezproxy.unal.edu.co/S0960852418300890/1-s2.0-S0960852418300890-main.pdf?_tid=9d09a6fc-15a7-11e8-8295-00000aacb35d&acdnat=1519067207_242371ac19add8f6f6f9ebcebdd58a3f
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Serebrennikova, M. K., Krivoruchko, A. V., Korshunova, I. O., Peshkur, T. A., & Cunningham, C. J. (2017). Oilfield wastewater biotreatment in a fluidized-bed bioreactor using co-immobilized *Rhodococcus* cultures. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 1252–1260.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.01.043>
- Lai, C. C., Huang, Y. C., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 609–614.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.017>
- Lamichhane, K. M., Babcock, R. W., Turnbull, S. J., & Schenck, S. (2012). Molasses enhanced phyto and bioremediation treatability study of explosives contaminated Hawaiian soils. *Journal of Hazardous Materials*, 243, 334–339.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.043>
- Li, L. J., Hong, P., Jiang, Z. D., Yang, Y. F., Du, X. P., Sun, H., ... Chen, F. (2018). Water accelerated transformation of d-limonene induced by ultraviolet irradiation and air exposure. *Food Chemistry*, 239, 434–441.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.075>
- Lipczynska-Kochany, E., & Kochany, J. (2008). Humic substances in bioremediation of industrial wastewater - Mitigation of inhibition of activated sludge caused by phenol and formaldehyde. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(6), 619–626.
<https://doi.org/10.1080/10934520801893675>
- Lladó, S., Solanas, A. M., de Lapuente, J., Borràs, M., & Viñas, M. (2012). A diversified

- approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435–436, 262–269.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.032>
- Ma, J., Yang, Y., Dai, X., Chen, Y., Deng, H., Zhou, H., ... Yan, G. (2016). Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. *Chemosphere*, 150, 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.123>
- Mac-acquaye, V., & Aidoo, A. (2016). Solutions for Management of Oil on Drilled Cuttings in the New Deepwater Oil Province of Ghana. *SPE African Health, Safety, Security, Environment and Social Responsibility Conference and Exhibition. Accra, Ghana.*, 1–12.
- Manacorda, A. M., & Cuadros, D. (2005). Técnicas de Remediación Biológicas. *Ambiental, Microbiología*, 1–21.
- Mansour, D., Djenane, D., Nasrallah, N., Zouad, H., & Boutrif, A. (2015). BIODEGRADATION OF HYDROCARBONS : CLEAN PROMISING DEPOLLUTION TECHNOLOGY FOR A SUSTAINABLE MANAGEMENT OF ENVIRONMENT IN OIL & GAS INDUSTRY. *12th Offshore Mediterranean Conference and Exhibition. Ravenna, Italy*, 1–9.
- Martienssen, M., & Schirmer, M. (2007). Use of surfactants to improve the biological degradation of petroleum hydrocarbons in a field site study. *Environmental Technology*, 28(5), 573–582. <https://doi.org/10.1080/09593332808618816>
- Martínez, Á., & Rodríguez, R. (2013). In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 595–605.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>
- Martínez, V., & López, F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana*, 19(1), 9–17.
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica*. (S. Cervantes, Ed.) (7a edición). D.F., México: Cengage Learning, INC.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375.

- <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Minnesota University. (n.d.). EAWAG-BBD: Pathway Prediction Results. Retrieved December 23, 2018, from http://eawag-bbd.ethz.ch/tree_graphs/images/2018.02.23-10.35.07-88/1.html?1519421722334
- Mkpaoro, M., Okpokwasili, G., & Joel, O. (2015). A Review of Drill-Cuttings Treatment and Disposal Methods in Nigeria- The Gaps and Way Forward Methods of Drill-Cuttings Treatment. *International Conference and Exhibition. Lagos, Nigeria*, 1–9.
- Mulas, R. (2008). *Fundamentos De Biorremediación: Tratamiento y recuperación de suelos contaminados*.
- Nikolopoulou, M., & Kalogerakis, N. (2008). Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56(11), 1855–1861. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.07.021>
- Nordberg, G. (2001). Capítulo 63 - Metales: propiedades químicas y toxicidad. In *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (pp. 1–76). Madrid, España.
- Nweke, C. O., & Okpokwasili, G. C. (2003). Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil Staphylococcus species. *African Journal of Biotechnology*, 2(9), 293–295.
- OECD. (1984). *OECD 207 -Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guideline for Testing of Chemicals* (Vol. 207). Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
- OECD. (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application* (Vol. 18). Paris, France. [https://doi.org/ENV/JM/MONO\(2007\)10](https://doi.org/ENV/JM/MONO(2007)10)
- Olajire, A. A. (2014). The Petroleum Industry and Environmental Challenges. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5(4), 1–19. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000186>
- Orantes, J. (2002). *Aplicación de surfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos* (Universida). D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Organiksa, & Narpes Colombia. (2016). *Ficha técnica Black Diamond (NARPES Colombia)*. Bogotá, Colombia.
- Organización Internacional del Trabajo. (2012). Hidrocarburos aromaticos. In J. Mager, D. Osinsky, & P. Markkanen (Eds.), *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Madrid, España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España.
- Ortiz, E., Herrero, C., Turrión, M., Juez, L., Tejedor, C., & Bravo, F. (2013). *Evaluación del carbono respirado por los suelos en eucaliptales de Cantabria*. Álava, España.

- Osei-Twumasi, O., Fei-Baffoe, B., Darkwah, L., Nkrumah, K., Adomako, F., Boateng, D., ... Ennin, K. (2016). Pilot Plant Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Drill Mud - Case Study in Ghana. *SPE African Health, Safety, Security, Environment and Social Responsibility Conference and Exhibition. Accra, Ghana.*, 1–8.
- Osorio, N. (2015). *Manejo de Nutrientes en Suelos del Trópico*. Medellín, Colombia: L. Vieco S.A.
- Park, S., Kim, K. S., Kim, J. T., Kang, D., & Sung, K. (2011). Effects of humic acid on phytodegradation of petroleum hydrocarbons in soil simultaneously contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences*, 23(12), 2034–2041. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60670-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60670-5)
- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A., & Massacci, A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
- PEMEX. (2013). *Anuario Estadístico de PEMEX. Petróleos Mexicanos*. México Distrito Federal. Retrieved from [http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario Estadístico Archivos/anuario-estadistico-2013_131014.pdf](http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico-2013_131014.pdf)
- Petrová, Š., Rezek, J., Soudek, P., & Vaněk, T. (2017). Preliminary study of phytoremediation of brownfield soil contaminated by PAHs. *Science of the Total Environment*, 599–600, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.163>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el Índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583–590. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008
- Poma, K. L. (2004). *Evaluación De La Calidad Del Diesel 2 Basado En Sus Propiedades Cetánicas*. Universidad Nacional de Ingeniería de Perú.
- 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 Sede Medellín.
- QIAGEN. (n.d.). DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit - QIAGEN Online Shop. Retrieved December 19, 2017, from <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-powerlyzer-powersoil-kit/#orderinginformation>

- Qin, G., Gong, D., & Fan, M. Y. (2013). Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.004>
- Ramadass, K., Smith, E., Palanisami, T., Mathieson, G., Srivastava, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2015). Evaluation of constraints in bioremediation of weathered hydrocarbon-contaminated arid soils through microcosm biopile study. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(11), 3597–3612. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0793-2>
- Restrepo, C. M. S. (1999). Perforación Rotatoria: Fundamentos y Diseños. *Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Minas*.
- Rincón, M. (2004). *Estudio De La Biorremediacion Como Una Alternativa En La Mitigacion De La Contaminación Ambiental*. Universidad Industrial de Santander. Universidad Industrial de Santander. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Riojas, H., Gortáres, P., Mondaca, I., & Balderas, J. (2011). Aplicación de Tween 80 y D – Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos. *Ide@s CONCYTEG*, 6(71), 571–584.
- Rittman, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: Principles and Applications*. McGraw - Hill Series. Medellín: McGraw - Hill Series. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00088-4)
- Riveroll-Larios, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., & Díaz-Ramírez, I. J. (2015). Biological Activity Assessment in Mexican Tropical Soils with Different Hydrocarbon Contamination Histories. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(10), 353. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2621-1>
- Rodríguez, J. (2003). La biorremediacion frente al vertido de Exxon Valdez. *Industria Y Minería*, 351, 24–27. Retrieved from http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/biorremediacion_exxon_valdes.pdf
- 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(9), 1595–1600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.011>
- 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 and Biodegradation*, 94, 79–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.024>
- Sadeghian, S. (2016). La acidez del suelo, una limitante común para la producción de café. *Cenicafé*, 1–12. <https://doi.org/0120-0178>
- Safdari, M. S., Kariminia, H. R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., ... Fletcher, T. H. (2018). Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 1–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.044>
- Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Rice Jackson, L. M., ... Wisniewski, H. L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 31(6), 1769–1776. <https://doi.org/10.1021/es960793i>
- Sanchez, F. (2012). *Transporte de contaminantes*. (Departamento de Geología, Ed.). Salamanca, España: Universidad de Salamanca. Retrieved from <http://hidrologia.usal.es>
- Sannino, F., Spaccini, R., Savy, D., & Piccolo, A. (2013). Remediation of highly contaminated soils from an industrial site by employing a combined treatment with exogeneous humic substances and oxidative biomimetic catalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.077>
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, 242, 15–27.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.010>
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. NOM-138-SEMARNAT Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación, Diario Oficial De La Federación § (2005). México Distrito Federal. Retrieved from <http://www.bdlaw.com/assets/htmldocuments/Mexico-NOM-138.pdf>
- Sela, G. (2017). La Capacidad de Intercambio Catiónico. Retrieved October 31, 2018,

- from <http://www.smart-fertilizer.com/es/articles/Cation-Exchange-Capacity>
- Shah, V., & Subramaniam, S. (2018). *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: A representative model organism for studying the impact of pollutants on soil microbiota. *Science of the Total Environment*, 624, 963–967. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.185>
- Sheppard, P. J., Simons, K. L., Adetutu, E. M., Kadali, K. K., Juhasz, A. L., Manefield, M., ... Ball, A. S. (2014). The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 84(1–2), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.044>
- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). *Chapter 8 - Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. (S. Das, Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Sierra, M. (2000). *Lecturas sobre lodos de perforación. Sección 2: Pruebas Fundamentales en Lodos de Perforación*. (Universida). Medellín: Ecográficas Ltda.
- Silva, A., Delerue-Matos, C., & Fiúza, A. (2005). Use of solvent extraction to remediate soils contaminated with hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 124(1–3), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.022>
- Sistema de Información de Petróleo y Gas Colombiano. (2016). Total evolución perforación de pozos. Retrieved October 24, 2016, from http://www.upme.gov.co/generadorconsultas/Consulta_Series.aspx?idModulo=3&tipoSerie=88
- Soil Survey Staff. (2010). *Keys to Soil Taxonomy* (11th editi). Washington, USA: Soil Survey Staff.
- Szoboszlay, S., Solymosi, J., & Kriszt, B. (2002). The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. *Academic and Applied Research in Military and Public Management Science*, 1(1), 103–116.
- Tahhan, R. A., & Abu-Ateih, R. Y. (2009). Biodegradation of petroleum industry oily-sludge using Jordanian oil refinery contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(8), 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.001>
- Tahhan, R. A., Ammari, T. G., Goussous, S. J., & Al-Shdaifat, H. I. (2011). Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1),

130–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.007>

- Talley, J. W. (2005). Chapter 3: Roadblocks to the implementation of biotreatment strategies. In J. Talley (Ed.), *Bioremediation of Recalcitrant Compounds* (Vol. 829, pp. 33–50). USA: CRC Press. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48562.x>
- Tarbutck, E., & Lutgens, F. (2010). *Ciencias de la Tierra*. (M. Romo, Ed.). Madrid, España: Pearson Educación.
- Tejeda-Agredano, M. C., Mayer, P., & Ortega-Calvo, J. J. (2014). The effect of humic acids on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons depends on the exposure regime. *Environmental Pollution*, *184*, 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.031>
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Trejos, M. C. (2017). *Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- 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*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- U.S. Environmental Protection Agency. (1998). *FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BIOREMEDIATION (An Aid to the Development of Bioremediation Proposals)*. Environmental Response Division.
- Uphoff, N., Ball, A., Fernandes, E., Herren, H., Husson, O., Laing, M., ... Thies, J. (2006). *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. (A. McLaren, J. Skujins, E. Paul, J. Ladd, J. Bollag, & G. Stotzky, Eds.). Taylor & Francis Group.
- Upne, U. D. P. M. E. (2005). *La cadena del Petróleo en Colombia. La cadena del petróleo*. Bogotá, Colombia. Retrieved from http://www1.upme.gov.co/sites/default/files/news/3086/files/cadena_del_petroleo_2013.pdf
- US EPA. (2017). EPA History: Exxon Valdez Oil Spill. Retrieved from

- <https://www.epa.gov/history/epa-history-exxon-valdez-oil-spill>
- USDA. (1996). *Soil survey laboratory methods manual. Soil survey investigations report #42*. Washington DC, USA.
- Vázquez, S., Monien, P., Pepino Minetti, R., Jurgens, J., Curtosi, A., Villalba, J., ... Helmke, E. (2017). Bacterial communities and chemical parameters in soils and coastal sediments in response to diesel spills at Carlini Station, Antarctica. *Science of the Total Environment*, 605, 26–37. Retrieved from https://ac-els-cdn-com.ezproxy.unal.edu.co/S0048969717315334/1-s2.0-S0048969717315334-main.pdf?_tid=b3f13c60-15a0-11e8-ab84-00000aab0f6b&acdnat=1519064239_f28c78ca991602b2b2a3fa16a5ff56fd
- Vega, J., Delgado, K., Sibaja, M., Alvarado Aguilar, P. A., & Barrientos, S. (2008). Empleo de melaza de caña de azúcar para la obtención y caracterización de poliuretanos potencialmente biodegradables. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(94), 408–421.
- 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*, 37(1), 29–38.
- Wang, S., Wang, X., Zhang, C., Li, F., & Guo, G. (2016). Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 106, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.014>
- Wang, X.-B., Chi, C.-Q., Nie, Y., Tang, Y.-Q., Tan, Y., Wu, G., & Wu, X.-L. (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel Dietzia strain. *Bioresource Technology*, 102(17), 7755–7761. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.06.009>
- Wang, X., Sun, L., Wang, H., Wu, H., Chen, S., & Zheng, X. (2017). Surfactant-enhanced bioremediation of DDTs and PAHs in contaminated farmland soil. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1337235>
- WANG, Z.-Y., GAO, D.-M., LI, F.-M., ZHAO, J., XIN, Y.-Z., SIMKINS, S., & XING, B.-S. (2008). Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta. *Pedosphere*, 18(6), 707–716. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60066-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60066-1)

- World Bank. (1998). *Petroleum Refining Pollution Prevention and Abatement Handbook*. World Bank Group.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *107*, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
- Wu, M., Li, W., Dick, W. A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., & Chen, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, *169*, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>
- Wu, M., Ye, X., Chen, K., Li, W., Yuan, J., & Jiang, X. (2017). Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environmental Pollution*, *223*, 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.079>
- Xia, W., Du, Z., Cui, Q., Dong, H., Wang, F., He, P., & Tang, Y. C. (2014). Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, *276*, 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.062>
- Yan, P., Lu, M., Guan, Y., Zhang, W., & Zhang, Z. (2011). Remediation of oil-based drill cuttings through a biosurfactant-based washing followed by a biodegradation treatment. *Bioresource Technology*, *102*(22), 10252–10259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.074>
- Yang, S. C., Lei, M., & Chen, T. Bin. (2014). Effect of Surfactant Tween 80 on the Anaerobic Degradation and Desorption of HCHs and DDX in Aged Soil under Saturated Condition with Low Liquid/Solid Ratio. *Soil and Sediment Contamination*, *23*(7), 715–724. <https://doi.org/10.1080/15320383.2014.866933>
- YANG, S. Z., JIN, H. J., WEI, Z., HE, R. X., JI, Y. J., LI, X. M., & YU, S. P. (2009). Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere*, *19*(3), 371–381. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(09\)60128-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60128-4)
- Yang, Z. X., Zhou, Y. B., Xiang, X. Z., Zhu, Z. B., Pen, L., Luo, Y. W., & Lu, J. (2013). Biodegradation of waste water-based drilling fluid from an offshore drilling operation. *Petroleum Science and Technology*, *31*(10), 1001–1007.

<https://doi.org/10.1080/10916466.2011.626007>

Zapata, R. (2014). *Los procesos químicos del Suelo* (Universida). Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Zuñiga, O., Osorio, J., Cuero, R., & Peña, J. (2011). Evaluación de Tecnologías para la Recuperación de Suelos Degradados por Salinidad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 64(1), 5769–5779.