

**BIORREMEDIACIÓN PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS  
TOTALES PRESENTES EN LOS SEDIMENTOS DE UNA ESTACIÓN DE  
SERVICIO DE COMBUSTIBLE**

**DIANA CRISTINA ÑUSTEZ CUARTAS**  
**Ingeniera Ambiental**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**  
**PEREIRA**  
**MAYO 2012**

**BIORREMEDIACIÓN PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS  
TOTALES PRESENTES EN LOS SEDIMENTOS DE UNA ESTACIÓN DE  
SERVICIO DE COMBUSTIBLE**

**DIANA CRISTINA ÑUSTEZ CUARTAS**  
**C.C. 24585489**  
**Maestría en Ecotecnología**

**Proyecto de Grado presentado como  
requisito para optar al título de  
Magíster en Ecotecnología**

**Director**  
**Dr. DIEGO PAREDES CUERVO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**  
**PEREIRA**  
**MAYO 2012**

**CONTENIDO**

<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>4</b>
<b>4 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>6 HIPÓTESIS.....</b>	<b>8</b>
<b>7 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
7.1 LA IMPORTANCIA DEL PETRÓLEO EN LA SOCIEDAD.....	8
7.2 IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS HIDROCARBUROS.....	10
7.3 ACTIVIDADES DE LAS ESTACIONES DE SERVICIO.....	11
7.4 CONTAMINACIÓN GENERADA EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO.....	13
7.4.1 Emisiones Atmosféricas.....	13
7.4.2 Residuos Líquidos.....	13
7.4.3 Residuos Sólidos.....	14
7.5 TASAS DE GENERACIÓN DE LODOS Y/O RESIDUOS EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO.....	15
7.6 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.....	18
7.6.1 Biorremediación <i>In situ</i> .....	20
7.6.2 Biorremediación <i>Ex Situ</i> .....	21
7.7 DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS.....	22
7.8 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIORREMEDIACIÓN.....	24
7.8.1 Temperatura.....	24
7.8.2 pH.....	25
7.8.3 Humedad.....	26
7.8.4 Nutrientes.....	26
7.8.5 Aceptor de electrones.....	27
7.8.6 Microorganismos.....	28
7.9 EXPERIENCIAS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.....	29
<b>8 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
8.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
8.1.1 Factores.....	34
8.1.2 Niveles.....	35
8.1.3 Tratamientos.....	35
8.1.4 Variables de Respuesta.....	35
8.1.5 Variables de Control.....	35
8.1.6 Diseño Estadístico.....	35
8.2 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN.....	37
8.2.1 Montaje de los Mesocosmos.....	38
8.3 SEGUIMIENTO DE LOS MESOCOSMOS.....	44
8.4 DETERMINACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN.....	47
<b>9 RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>48</b>

9.1	<i>CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LOS SEDIMENTOS</i> .....	48
9.2	<i>TEMPERATURA</i> .....	50
9.3	<i>pH</i> .....	51
9.4	<i>HUMEDAD</i> .....	53
9.5	<i>PRESENCIA DE MICROORGANISMOS</i> .....	55
9.6	<i>COMPORTAMIENTO DE NUTRIENTES</i> .....	61
9.6.1	Nitrógeno.....	61
9.6.2	Fósforo.....	63
9.6.3	Potasio.....	65
9.6.4	Materia Orgánica.....	67
9.7	<i>BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS</i> .....	69
9.7.1	Tasas de Degradación.....	69
9.7.2	Concentraciones de HTP en los Mesocosmos.....	70
9.8	<i>CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN</i> .....	77
9.9	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i> .....	80
9.9.1	Pruebas de normalidad.....	80
9.9.2	Pruebas no paramétricas.....	82
9.9.3	Análisis ANOVA no paramétrico.....	84
9.10	<i>CARACTERÍSTICAS FINALES DE LOS SEDIMENTOS</i> .....	85
<b>10</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	<b>87</b>
<b>11</b>	<b><i>RECOMENDACIONES</i></b> .....	<b>88</b>
<b>12</b>	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	<b>90</b>
<b>13</b>	<b><i>ANEXOS</i></b> .....	<b>96</b>

**LISTADO DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Cantidad de lodos y arenas contaminados con hidrocarburos producidas en las EDS de Risaralda. -----	16
<b>Tabla 2.</b> Rangos Óptimos para procesos de biorremediación -----	39
<b>Tabla 3.</b> Gramos de Urea aplicada -----	41
<b>Tabla 4.</b> Volumen, densidad y peso, tratado en los mesocosmos-----	42
<b>Tabla 5.</b> Cantidad de agua aplicada y volteos manuales a los mesocosmos.-----	44
<b>Tabla 6.</b> Análisis de características físicas: -----	46
<b>Tabla 7.</b> Análisis a los parámetros químicos, contenido de nutrientes: -----	46
<b>Tabla 8.</b> Parámetros iniciales de los mesocosmos -----	48
<b>Tabla 9.</b> Relación de C:N:P:K-----	49
<b>Tabla 10.</b> Datos Degradación de Hidrocarburos (HTP). -----	70
<b>Tabla 11.</b> Constantes de velocidad de reacción química de los mesocosmos. -----	80
<b>Tabla 12.</b> Datos estadísticos, concentración HTP (mg/kgss).-----	81
<b>Tabla 13.</b> Prueba de Normalidad, datos de concentración de hidrocarburos. -----	81
<b>Tabla 14.</b> Rangos Prueba de Mann-Whitney para la bioestimulación y bioaumentación--	82
<b>Tabla 15.</b> Estadísticos de contraste para las estrategias de bioestimulación y bioaumentación (a) -----	83
<b>Tabla 16.</b> Frecuencias de la Prueba de Kolmogorov-Smirnov -----	83
<b>Tabla 17.</b> Estadísticos de contraste para las estrategias bioestimulación y bioaumentación (a) -----	83
<b>Tabla 18.</b> Datos comparación de las medias entre los niveles de la investigación. -----	85
<b>Tabla 19.</b> Prueba estadística de Kruskal Wallis para los niveles (a). -----	85
<b>Tabla 20.</b> Parámetros finales de los mesocosmos-----	86
<b>Tabla 21.</b> Cálculos adición de la Urea. -----	96
<b>Tabla 22.</b> Datos Densidad y Peso mesocosmos.-----	96
<b>Tabla 23.</b> % Capacidad de campo, del sedimento y de la mezcla de este con el suelo. ----	97
<b>Tabla 24.</b> Concentración de HTP mg/kgss -----	97
<b>Tabla 25.</b> Unidades de pH en los mesocosmos.-----	98
<b>Tabla 26.</b> Temperatura (°C), en los mesocosmos.-----	99
<b>Tabla 27.</b> % de Humedad, en los mesocosmos. -----	100
<b>Tabla 28.</b> Microorganismos (U.F.C/g), en los mesocosmos. -----	101
<b>Tabla 29.</b> % de Nitrogeno, en los mesocosmos. -----	101
<b>Tabla 30.</b> % de Materia Orgánica, en los mesocosmos.-----	101
<b>Tabla 31.</b> Fósforo (p.p.m), en los mesocosmos. -----	102
<b>Tabla 32.</b> Potasio (meq/100g de suelo), en los mesocosmos. -----	102
<b>Tabla 33.</b> Proyección Sedimento Contaminado-----	103
<b>Tabla 34.</b> Proyección Sedimento Contaminado más Nutriente (Urea) -----	104
<b>Tabla 35.</b> Proyección Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados -----	105
<b>Tabla 36.</b> Proyección Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados más Nutriente (Urea)-----	106

## LISTADO DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Comportamiento Temperatura, 24 datos y barras de error=1DS .....	50
<b>Gráfica 2.</b> Promedio Comportamiento Temperatura, para las estrategias Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS .....	51
<b>Gráfica 3.</b> Comportamiento pH, 24 datos y barras de error=1DS.....	52
<b>Gráfica 4.</b> Promedio Comportamiento pH, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS.....	53
<b>Gráfica 5.</b> Comportamiento Porcentaje de Humedad, mesocosmos bioestimulación, 24 datos y barras de error=1DS. ....	54
<b>Gráfica 6.</b> Comportamiento Porcentaje de Humedad, mesocosmos bioaumentación, 24 datos y barras de error=1 DS. ....	54
<b>Gráfica 7.</b> Promedio Comportamiento Porcentaje de Humedad, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS. ....	55
<b>Gráfica 8.</b> Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 1 sed y 3 sed: Sedimento contaminado (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	56
<b>Gráfica 9.</b> Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 2 SN y 4 SN: Sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	57
<b>Gráfica 10.</b> Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 5 SSM y 7 SSM:60% Sedimento contaminado más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.....	58
<b>Gráfica 11.</b> Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 6 SSMN y 8 SSMN: 60% Sedimento contaminado, más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.....	59
<b>Gráfica 12.</b> Promedio Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.....	60
<b>Gráfica 13.</b> Comportamiento Nitrógeno, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	61
<b>Gráfica 14.</b> Comportamiento Nitrógeno, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSMN sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	62
<b>Gráfica 15.</b> Promedio Comportamiento Nitrógeno, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS. ....	63
<b>Gráfica 16.</b> Comportamiento Fósforo, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	63
<b>Gráfica 17.</b> Comportamiento Fósforo, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	64

<b>Gráfica 18.</b> Promedio Comportamiento Fósforo, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.....	65
<b>Gráfica 19.</b> Comportamiento Potasio, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	65
<b>Gráfica 20.</b> Comportamiento Potasio, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM: sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	66
<b>Gráfica 21.</b> Promedio Comportamiento Potasio, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.....	67
<b>Gráfica 22.</b> Comportamiento Materia Orgánica, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS. ....	67
<b>Gráfica 23.</b> Comportamiento Materia Orgánica, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM: sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.....	68
<b>Gráfica 24.</b> Promedio Comportamiento Materia Orgánica, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.....	69
<b>Gráfica 25.</b> Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 1 Sed y 3 Sed: Sedimento contaminado (Bioestimulación), 13 datos y barras de error=1DS. ....	71
<b>Gráfica 26.</b> Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 2 SN y 4 SN Sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 13 datos y barras de error=1DS. ....	72
<b>Gráfica 27.</b> Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmo 5 SSM y 7 SSM: 60% Sedimento contaminado más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados (Bioaumentación), 13 datos y barras de error=1Ds. ....	73
<b>Gráfica 28.</b> Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 6 SSMN y 8 SSMN: 60% Sedimento contaminado, más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 13 datos y barras de error=1DS. ....	74
<b>Gráfica 29.</b> Promedio Comportamiento Degradación de Hidrocarburo, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 13 datos y barras de error=1DS.....	76
<b>Gráfica 30.</b> Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento contaminado (Bioestimulación).....	78
<b>Gráfica 31.</b> Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento contaminado más Urea (Bioestimulación). ....	78
<b>Gráfica 32.</b> Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento con suelo con microorganismos adaptados (Bioaumentación). ....	79
<b>Gráfica 33.</b> Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento con suelo con microorganismos adaptados más Urea (Bioaumentación).....	79

## 1 RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de la Bioaumentación y Bioestimulación de sedimentos contaminados con hidrocarburos de la Estación de Servicio de Combustible INTEGRAL de Dosquebradas - Risaralda - Colombia, estos sedimentos son producto del mantenimiento de las unidades de tratamiento de aguas residuales industriales, como son: la trampa de grasa, canales perimetrales de la zona de distribución y/o venta del combustible, canales perimetrales de la zona de llenado de tanques de almacenamiento de combustible y desarenador del lavado de vehículos en la Estación de Servicio. Para el desarrollo de esta investigación, en la técnica de bioaumentación se adicionaron a los sedimentos de la Estación de Servicio, microorganismos adaptados a hidrocarburos, los cuales fueron incorporados con un suelo que fue contaminado anteriormente por un derrame de combustible, para la técnica de bioestimulación, a los sedimentos contaminados, se les adicionó un nutriente (Urea), se les agregaba agua y se realizaba un volteo manual, beneficiando el desarrollo y crecimiento de los microorganismos degradadores. Para esta investigación se utilizaron ocho (8) mesocosmos, compuestos por canastas de polietileno de alta densidad (57x37x15 cm), estos estaban conformados, primero, solo los sedimentos contaminados de la Estación de Servicio, segundo se tomaron sedimentos contaminados y se les adicionó urea como nutriente, tercero se tomaron 40% de suelos con microorganismos adaptados, más 60% de sedimentos contaminados y cuarto se tomó nuevamente 40% de suelos con microorganismos adaptados, más 60% de sedimentos contaminados y se le adicionó urea como nutriente, a cada mesocosmo se les realizó una réplica.

Para su seguimiento y control, se realizaron mediciones a lo largo de los experimentos, de temperatura, pH, y porcentaje de humedad una vez por semana, hidrocarburos totales de petróleo dos veces al mes, porcentaje de nitrógeno, porcentaje de materia orgánica, Fósforo, Potasio y microorganismos degradadores de hidrocarburos, una vez al mes. La duración total fue de veintitrés (23) semanas.

Los mesocosmos presentaron tasas de degradación entre el 87,32 mg de Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)/kg de suelo seco y 105,41 mg de HTP/kg de suelo seco, con porcentajes de reducción de contenido de hidrocarburo entre 79,7% y 95,1%. Las dos estrategias de biorremediación, la bioestimulación y bioaumentación, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tablas 17 -19).



## ABSTRACT

The present investigation evaluated the impact of Bioaugmentation and Biostimulation of contaminated sediment with hydrocarbons from the Fuel Service Station INTEGRAL Dosquebradas - Risaralda - Colombia, these sediments are the result of the maintaining in treatment units of industrial wastewater, as: the grease trap, perimeter channels of distribution area and/or fuel sale machines, the perimeter channels of storage tanks and vehicle washing, sand trap at the service station. For the development of this research, in the bioaugmentation technique the sediments were added with microorganisms adapted to hydrocarbon of the Service Station, these were incorporated with soil that was contaminated earlier by an oil spill; for biostimulation technique the contaminated sediments were added with Urea fertilizer ( $\text{CON}_2\text{H}_4$ ) and water by a manual disposition, benefiting the development and growth of degraders. This tests used eight (8) mesocosmos, compounds high density polyethylene baskets of 57x37x15 cm, the experimental mesocosmo were formed, first, contaminated sediments from the service station only, second mesocosmo, contains contaminated sediments and were added urea a nutrient, third mesocosmo contains 40% of adapted soil microorganisms, and 60% of contaminated sediments; and the fourth mesocosmo was taken with 40% of adapted soil microorganisms and 60% of contaminated sediments also added urea a nutrient, for all these units were create a replica, resulting in eight (8) mesocosmos in total.

For monitoring and control were measured throughout the experiments once a week temperature, pH, and moisture percentage, twice a month total petroleum hydrocarbons, and once a month nitrogen percentage, organic matter percentage, phosphorus, potassium and hydrocarbon degraders. The entire duration of the tests were twenty (23) weeks.

The mesocosmos showed degradation rates between 87.32 mg TPH (Total hydrocarbon oil)/kg of dry soil and 105.41 mg TPH/kg of dry soil, with the reduction in content hydrocarbon percentage between 79.7% and 95.1%. The two strategies for bioremediation, biostimulation and bioaumentación, no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) (Tables 17 -19).

## 2 INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales más importantes de la actualidad es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados. En el caso de los suelos, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal en el lugar del derramé, cambios en la dinámica poblacional de la fauna, de la biota microbiana y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos (Pardo, J., *et al.*, 2004). Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado.

En Colombia las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos son las actividades de explotación, transporte y almacenamiento de combustibles (Pardo, J., *et al.*, 2004).

La biorremediación surge de la necesidad de disminuir el impacto ambiental negativo de los derrames de hidrocarburos en los diferentes ambientes (agua y suelos) usando microorganismos, plantas o enzimas, de manera estratégica con el fin de restaurar la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema (Pardo, J., *et al.*, 2004).

Entre las estrategias de biorremediación se encuentran la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación se define como la adición de nutrientes, principalmente fuentes de nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano, al igual que la estimulación por medio de adición de agua, oxígeno y otros elementos que mejoren el desarrollo de los microorganismos (Pardo, J., *et al.*, 2004). La bioaumentación se entiende como la adición de microorganismos endógenos o exógenos en un lugar específico, en este caso los degradadores de hidrocarburos, para aumentar rangos de reducción orgánica o proporcionar la habilidad de degradar el contaminante. La utilización o presencia en el medio contaminado de estos microorganismos es esencial ya que poseen sistemas enzimáticos capaces de fraccionar las moléculas de hidrocarburo haciéndolas menos tóxicas y así poder asimilarlas e incorporarlas a sus procesos metabólicos, “transformándolas” en dióxido de carbono y agua, en procesos

aerobios, para procesos anaerobios las transformaciones pueden llegar hacer de biomasa,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{CH}_4$ , entre otros (Boyer, R., 2000).

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. La estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrógeno. Los hidrocarburos son los compuestos básicos de la química orgánica. Las cadenas de átomos de carbono pueden ser lineales o ramificadas y abiertas o cerradas. Los hidrocarburos se pueden diferenciar en dos tipos que son alifáticos y aromáticos. Los alifáticos, a su vez se pueden clasificar en alcanos, alquenos y alquinos según los tipos de enlace que unen entre sí los átomos de carbono (Vallejo, V., *et al.*, 2005). Dado que la sociedad moderna usa gran cantidad de productos basados en hidrocarburos, como la gasolina, el queroseno y el diesel, la contaminación del ambiente es un riesgo latente. Una de las actividades de riesgo es la venta de combustible en las Estaciones de servicio, debido a que en estas instalaciones regularmente se presentan pequeños derrames en las zonas de distribución, que son contenidos con arena, estos, al igual que los sedimentos generados en el mantenimiento de sus unidades de rejillas perimetrales de las zonas de almacenamiento, distribución, trampas de grasas conectadas a estas rejillas y los desarenadores de lavado de autos (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007), son elementos considerados RESPEL por su contenido de hidrocarburos (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005), por lo tanto se ve la necesidad de presentar una estrategia viable para disminuir el contenido de hidrocarburos, neutralizando el riesgo de contaminaciones mayores. En esta investigación se evaluó el proceso de degradación de hidrocarburos presentes en los sedimentos resultantes del mantenimiento en la estación de servicio de combustible INTEGRAL (Dosquebradas - Risaralda - Colombia), por medio de las estrategias bioestimulación y bioaumentación.

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las actividades principales de las Estaciones de Servicio es la venta de combustibles líquidos, entre los que se encuentran la gasolina y el diesel, principalmente; otros servicios alternos son el lavado, lubricación y engrase, de automotores así como cambio de aceite y de filtros de los mismos, también pueden incluir montallantas y/o servicios de minimercado, restaurante y en algunos casos

hospedaje. El departamento de Risaralda cuenta en la actualidad con alrededor de 70 Estaciones de Servicio, la mayoría de las cuales están ubicadas dentro de la zona urbana (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007). Del total de Estaciones de Servicio identificadas, alrededor del 20% tienen más de 20 años en funcionamiento y por lo tanto, los equipos entre los cuales se encuentran tanques de almacenamiento y surtidores ya han superado su vida útil. Como consecuencia, se han encontrado equipos en deterioro, así como la ausencia de accesorios para control de derrames como cajas contenedoras y cierres automáticos de válvulas de suministro, entre otras (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007). Lo anterior se debe a que la normatividad que reglamenta a las Estaciones de Servicios en aspectos técnicos y ambientales (decreto 1521 de 1998) son posteriores al establecimiento de la gran mayoría de las Estaciones de Servicio.

Los derrames menores de combustible ocurren regularmente durante las actividades de operación de las Estaciones de Servicio, más aún cuando los equipos no cumplen con los requerimientos técnicos para la prevención de los mismos. Las pérdidas en tanques y tuberías debido a fugas, derrames accidentales, han causado problemas ambientales en el suelo superficial y en el subsuelo. Una vez que los combustibles penetran el suelo, afectan las características físicas y químicas, dañando su productividad y la población microbiana presente, además de amenazar la salud pública, como una consecuencia de su migración y contacto con los mantos freático, aguas superficiales y subterráneas (Corporación Autónoma Regional de Risaralda, 2005), que en su mayoría son la fuente de abastecimiento de agua en el departamento, para el desarrollo de actividades agropecuarias, domésticas e industriales. Por otra parte, los combustibles también pueden afectar la estructura, fertilidad y productividad de los suelos (Corporación Autónoma Regional de Risaralda, 2005).

Además las actividades de las estaciones de servicio generan residuos sólidos y líquidos contaminados con hidrocarburos, estos compuestos formados principalmente por carbono e hidrógeno con contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno o trazas de metales, dependiendo del lugar de donde provengan (Benavides, L., y Quintero, G., 2006) y debido a la alta toxicidad y genotoxicidad, fueron clasificados como contaminantes primarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por sus siglas en

ingles: Environmental Protection Agency. EPA, 2001). Asimismo las actividades de mantenimiento dentro de las estaciones de servicio, generan sedimentos contaminados con hidrocarburos, que son depositados en lechos de secado, canecas y en otros casos, en terrenos baldíos cercanos a la estación de servicio, estos elementos se convierten en un riesgo latente para la comunidad y los recursos naturales aledaños, si no se plantean buenas prácticas de remediación y tratamiento de los recursos contaminados.

#### **4 JUSTIFICACIÓN**

En Colombia, los residuos sólidos y líquidos contaminados con aceites e hidrocarburos son considerados como residuos peligrosos según el anexo I y II numeral nueve (9) del convenio de Basilea, aprobado por la Ley 253 de 1996 (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005). En esta categoría entran de igual manera los sedimentos contaminados con hidrocarburos, producto del mantenimiento de las estructuras, de las estaciones de servicio, entre los procesos de remediación de hidrocarburos, la biorremediación activa está emergiendo como una tecnología prometedora, ya que se ha definido como "el acto de utilizar procesos naturales inducidos a ambientes contaminados para producir una aceleración de los procesos de degradación", logrando mejores tasas de remediación en menor tiempo. Esta tecnología se basa en la premisa de que un gran porcentaje de los componentes del hidrocarburo son biodegradables en la naturaleza, además de presentar varias ventajas potenciales sobre las tecnologías convencionales, como menor costo, son menos intrusivos en el sitio contaminado, más respetuosas del medio ambiente en términos de sus productos finales y requieren de un mínimo o ningún tratamiento posterior (EPA, 2004)

La investigación consideró la tecnología de biorremediación con las estrategias de bioestimulación y bioaumentación, que se pueden llevar a cabo dentro de las instalaciones de la estación de servicio, contribuyendo a si a la disminución de los impactos negativos a los recursos naturales, dados por esta actividad, además de aportar un referente científico-práctico de estas estrategias, que pueden ser consideradas parte de las actividades dentro del plan de contingencia, que estas instalaciones deben presentar a las autoridades ambientales, según Decreto 3930 de 2010, según el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial-

Colombia. Con base a esta investigación se pueden plantear estrategias similares para la remediación de los sitios contaminados anteriormente, tanto por actividades de estaciones de servicio de combustible, como talleres mecánicos, diagnósticocentros, lavaderos de autos, entre otros, con similares condiciones, traduciéndose así en empresas que llevan a cabo iniciativas de soluciones ambientales, que promueven el desarrollo y difusión de tecnologías amigables y como consecuencia empresas más competitivas y con mayor responsabilidad social.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la efectividad de la biorremediación en la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos generados en una estación de servicio de combustible

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el efecto de la bioaumentación (adición de microorganismos adaptados a hidrocarburos) y la bioestimulación (adición de fertilizante como fuente de nutrientes, la estimulación con la adición de agua y volteo manual como fuente de oxígeno) en la biodegradación de hidrocarburos en sedimentos generados por una estación de servicio de combustible.
- Establecer las tasas de degradación de hidrocarburos totales, en los diferentes mesocosmos de biorremediación de sedimentos a implementar.
- Definir la estrategia de biorremediación aplicable acorde a las condiciones *in situ* de los sedimentos generados por la estación de servicio de combustible.

## 6 HIPÓTESIS

Es posible que la degradación de hidrocarburos presentes en los sedimentos contaminados de la estación de servicio, se vea afectada negativamente por la falta de nutrientes o por baja población microbiana degradadora.

La aplicación de nutrientes, la estimulación adicionando agua y realizando un volteo manual como fuente de oxígeno, favorece el crecimiento microbiano y esto ayuda a asimilar todos los compuestos presentes en el suelo degradando así los hidrocarburos en menor tiempo (Yaohui, X., y Mang, L., 2010).

La introducción de población microbiana adaptada a los hidrocarburos en suelos contaminados, beneficia la degradación de hidrocarburos totales (Ruberto, L., *et al*, 2003).

### **Pregunta de investigación**

¿Cuál estrategia de biorremediación (bioestimulación y/o bioaumentación), genera mayor efecto en la degradación de hidrocarburos de sedimentos provenientes de la estación de servicio de combustible?

## 7 MARCO TEÓRICO

### 7.1 LA IMPORTANCIA DEL PETRÓLEO EN LA SOCIEDAD

El petróleo es un recurso natural no renovable, es el resultado de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta temperatura y presión, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de los ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, el benceno, tolueno

y xileno (BTEX) y los hidrocarburos policíclicos (PAHs) tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno (Vargas, P., *et al.*, 2004).

El petróleo y sus derivados, han sido una fuente de energía y materia prima, que el hombre ha aprovechado en su beneficio, para el transporte aéreo, acuático y terrestre, se utiliza en las industrias químicas, farmacéuticas, manufactura de plásticos y materiales diversos, incluyendo sus primeros usos: de impermeabilización, iluminación, como generador de electricidad, este corresponde al energético más importante en la historia de la humanidad, alimenta un porcentaje muy alto del consumo de energía del mundo, entre el 32% de Europa y Asia, hasta el 53% de Oriente Medio, en Sudamérica y América Central el 44%, África el 41% y Norteamérica el 40% (Vasallo, J., y Herrera, D., 2002).

La historia del petróleo como elemento vital y factor estratégico de desarrollo es relativamente reciente, de menos de 200 años. Se comercializó por primera vez bajo el nombre de "aceite de roca", en el año 1850, Samuel Kier, un boticario de Pittsburg, Pennsylvania de EE.UU., a partir de entonces se puede decir que comenzó el desarrollo de la industria del petróleo y el verdadero aprovechamiento de un recurso que indudablemente ha contribuido a la formación del mundo actual (Vasallo, J., y Herrera, D., 2002).

El petróleo contiene tal diversidad de componentes que difícilmente se encuentran dos tipos idénticos. Existen parámetros internacionales, como los del Instituto Americano del Petróleo (API) que diferencian sus calidades y por tanto su valor. Así, entre más grados API tenga un petróleo, mejor es su calidad.

Los petróleos de mejor calidad son aquellos que se clasifican como "livianos", "suaves" y/o "dulces". Los llamados "livianos" son aquellos que tienen más de 26° API. Los "intermedios" se sitúan entre 20° y 25° API, y los "pesados" por debajo de 20° API.

El sector petrolero en Colombia ha tenido una importancia creciente en la economía del país en los últimos años. Este sector es estratégico para la economía por su alta participación en el producto interno bruto, porque genera un porcentaje muy alto de las exportaciones totales y porque es también una fuente muy



importante de recursos fiscales para el gobierno nacional y para los gobiernos seccionales (Vargas, P., *et al.*, 2004).

## 7.2 IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS HIDROCARBUROS

En la actividad petrolera, las disposiciones y el manejo habitual de hidrocarburos y combustibles, en algunos casos conlleva a la contaminación del ambiente, cuando tanques, oleoductos y diversas instalaciones sufren daños. Los líquidos migran hacia el suelo, subsuelo (zona vadosa) y hacia el agua subterránea (zona saturada – acuífero) o superficialmente hacia un bajo topográfico o curso de agua, y sus componentes volátiles a la atmósfera. No solo las contaminaciones se producen por roturas de los sistemas de almacenaje o de transporte, sino que el mal manejo del producto puede provocar impactos negativos en la ecología regional (Vasallo, J., y Herrera, D., 2002).

El petróleo en el suelo, que pasa a considerarse como un contaminante, se convierte en un riesgo para la salud humana y el ecosistema. En algunos casos, la contaminación no solo provoca problemas de toxicidad, sino que además puede ocasionar grandes riesgos de explosiones y/o incendios.

La industria petrolera en su conjunto ha tenido un gran impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo que se manejan y que no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos básicos, ni del seguimiento a la infraestructura petrolera, esta se integrada por:

- Pozos de explotación.
- Baterías de separación.
- Complejos procesadores de gas.
- Centrales de almacenamiento y bombeo.
- Redes de ductos y piletas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos procedentes de la perforación y mantenimiento de los pozos.
- Transporte y distribución en general.
- Estaciones de servicio de combustible.

Estas instalaciones poseen riesgos inherentes de fugas de petróleo, diesel y gasolina por roturas de los ductos, por filtración de aguas aceitosas, por daños en las estructuras de almacenamiento y transporte, por malas prácticas, entre otras, lo cual genera un riesgo a nivel de la contaminación ambiental e impactos negativos a los ecosistemas (Vasallo, J., y Herrera, D., 2002).

### *7.3 ACTIVIDADES DE LAS ESTACIONES DE SERVICIO*

De acuerdo con el decreto 1521 de 1998, expedido por el Ministerio de Minas y Energía, las estaciones de servicio son: “establecimientos destinados al almacenamiento y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo y gas licuado del petróleo (GLP), para vehículos automotores a través de equipos fijos (surtidores) que llenan directamente los tanques de combustible”. Además, puede incluir facilidades para uno o varios de los siguientes servicios: lubricación, lavado general y/o motor, cambio y reparación de llantas, alineación y balanceo, servicio de diagnóstico, trabajos menores de mantenimiento automotor, venta de llantas, neumáticos, lubricantes, baterías, accesorios y demás servicios afines. En las estaciones de servicio también podrán operar minimercados, tiendas de comidas rápidas, cajeros automáticos, tiendas de video y otros servicios afines a estos, siempre y cuando se obtengan de las autoridades competentes las autorizaciones correspondientes y se cumplan todas las normas de seguridad para cada uno de los servicios ofrecidos. Estas actividades comerciales no deberán interferir con el objeto principal para el cual se autorizó la operación de la estación de servicio, vale decir, el almacenamiento, manejo, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo y/o gaseosos (Ministerio del Medio Ambiente, 1999).

Las etapas principales en el desarrollo de una estación de servicio son: planeación, construcción e instalación, operación y eventualmente cierre o abandono. Tanto en sus actividades básicas como almacenamiento, distribución de combustibles y sus actividades complementarias, las estaciones de servicio tienen una interacción considerable con el medio ambiente.

La etapa de planeación es muy importante, pues en ella se prevén las posibles interacciones de las estaciones de servicio con el medio ambiente, en la etapa de

construcción el impacto real es similar al de cualquier otra construcción civil de igual tamaño.

En la etapa de operación, los efectos potenciales sobre el medio ambiente pueden verse ampliamente reducidos gracias a las tecnologías utilizadas, a las tareas de monitoreo que se realicen y al cuidado en la prestación del servicio; si a esto se suma las medidas preventivas implementadas en la etapas de planeación y de construcción, el impacto al medio ambiente se ve reducido a los efectos que puedan tener las actividades secundarias de la estación de servicio o a casos aislados y fortuitos (Ministerio del Medio Ambiente, 1999).

La etapa de cierre y abandono de estaciones, interactúa con el medio ambiente en la medida en que exista contaminación por combustible en la zona, como consecuencia de no realizar operaciones de mantenimiento. De no existir este tipo de condiciones y si el cierre incluye el retiro del tanque, de acuerdo con la legislación o criterio técnico, la influencia sobre el medio ambiente puede equipararse a la de la etapa de construcción e instalación.

Según el Ministerio del Medio Ambiente (1999), entre los impactos significativos, adversos o benéficos, dentro de las diferentes etapas de una estación de servicio se encuentran:

- Contaminación potencial de aguas superficiales y subterráneas.
- Contaminación de suelos.
- Alteración del paisaje o entorno natural.
- Afectación sobre infraestructura y población adyacente derivado de eventuales riesgos generados por incendios o explosiones.
- Afectación sobre el espacio público, especialmente en las etapas de construcción, cierre y desmantelamiento.
- Generación de empleo.
- Aumento del PIB local y regional.
- Concentración de sistemas de distribución.

## 7.4 CONTAMINACIÓN GENERADA EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO

Las actividades de operación de las estaciones de servicio de combustibles, generan tanto emisiones evaporativas (compuestos orgánicos volátiles - COV), como residuos líquidos y residuos sólidos.

### 7.4.1 Emisiones Atmosféricas

La mayor fuente de emisiones evaporativas ocurre en el llenado de los tanques de almacenamiento en la estación de servicio, las emisiones se generan cuando los vapores de gasolina son desplazados a la atmósfera por la gasolina que está siendo descargada en los tanques de almacenamiento, la cantidad de emisiones depende de varios factores: el método de llenado, la tasa de llenado, la configuración del tanque, la temperatura, la presión de vapor y la composición de la gasolina. Otra fuente de emisión es la respiración de los tanques subterráneos, estas ocurren diariamente y son atribuibles a cambios en la presión barométrica. Finalmente se producen emisiones por derrames de combustibles y posterior secado evaporativo debido a reboses, derrame de mangueras o circunstancias operativas. Las mayores emisiones evaporativas en las estaciones de servicio son producidas por la gasolina. El petróleo diesel y kerosene, por tener presiones de vapor muy bajas, no evaporan considerablemente (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 1999).

### 7.4.2 Residuos Líquidos

Los residuos líquidos en las estaciones de servicio, se generan en las siguientes operaciones:

- Lavado de pisos.
- Derrames y pérdidas de gasolina, solventes, aceites y grasas.
- Manutención de vehículos.
- Aguas lluvia.
- Lavado automático de automóviles y/o lavado manual de carrocería, chasis y motores.

Los residuos líquidos contienen principalmente sólidos suspendidos (lodo y/o sedimentos), aceites y grasas, solventes halogenados y restos de combustibles. En

los casos donde las estaciones de servicio cuentan con lavado de vehículos, contienen además desengrasantes, detergentes y ceras especiales.

Los demás residuos líquidos que se generan en las estaciones de servicio, son las aguas residuales domésticas, provenientes de los baños, duchas y demás unidades construidas con que cuenta las estaciones de servicio (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 1999).

### 7.4.3 Residuos Sólidos

De acuerdo a la normativa vigente, se define como residuos sólidos tanto a los sólidos, como a los semi-sólidos, líquidos y gaseosos que están confinados; y se catalogan de peligrosos cuando presentan algunas de las siguientes características: toxicidad, inflamabilidad, reactividad o corrosividad.

Los residuos sólidos generados son:

- Aceites y lodos (sedimentos) provenientes de la limpieza de los tanques de almacenamiento, de los equipos de transporte dentro de las EDS, de las unidades conductoras y de tratamiento de aguas residuales industriales, como las rejillas perimetrales, canales, trampas de grasas, decantadores, arenas utilizadas en contención de derrames entre otras.
- Aceite usado proveniente de la mantención de motores y filtros.
- Emulsiones de aceite como consecuencia de la limpieza de pisos, etc.
- Solventes usados.
- Textiles contaminados: materiales de absorción (para derrames) y paños de limpieza.
- Envases, plásticos y metálicos, contaminados con aceites, solventes, grasas, etc.
- Baterías agotadas.
- Neumáticos usados.
- Repuestos de vehículos.
- Misceláneos (eventualmente cambios esporádicos de radiadores, refrigerantes, etc.).

Otros residuos sólidos que se generan, son los residuos domiciliarios, provenientes de oficinas, de los minimercados y centros de expendio de alimentos (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 1999).

#### *7.5 TASAS DE GENERACIÓN DE LODOS Y/O RESIDUOS EN LAS ESTACIONES DE SERVICIO*

Los lodos, arenas y/o sedimentos contaminados con diferentes fracciones de hidrocarburo provenientes de las Estaciones de Servicio (E.D.S.), durante muchos años han sido dispuestos de manera inapropiada en lotes baldíos, junto con los residuos ordinarios y en las fuentes de agua sin un control estricto. En la actualidad, dada la aparición del decreto 1713 de 2002 del Ministerio de Desarrollo Económico de la República de Colombia y los intensos controles que se han iniciado, se exige que estas dispongan estos residuos de manera apropiada teniendo en cuenta su naturaleza como residuos peligrosos y su entrega a un movilizador debidamente registrado ante la autoridad ambiental (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007).

No obstante, en el departamento de Risaralda sólo se cuenta con un movilizador autorizado, el cual, debe disponer dichos residuos en una celda de seguridad ubicada en el municipio de Mosquera en Cundinamarca, a 360 Km aproximadamente de la capital del departamento, por lo que los costos para los generadores son muy altos (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007).

Durante el año 2008 fueron analizadas cuarenta y ocho (48) estaciones de servicio (EDS), correspondientes al 68,5% del total de EDS existente en el departamento de Risaralda (aproximadamente 70). La cantidad de residuos generados en cada EDS depende de su tamaño y de los servicios que preste, si la EDS presta el servicio de lavado, lubricación y posee sistema de tratamiento o trampa de grasas para cada servicio, generará una cantidad mayor de lodos, arenas y/o sedimentos contaminados, que si prestara sólo el servicio de distribución de combustible o si tuviera un sistema de tratamiento conjunto para el servicio de lavado y zona de suministro (Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007).

En la tabla 1 se muestran las cantidades de lodos y arenas producidos en las EDS de Risaralda que fueron analizadas.

**Tabla 1.** Cantidad de lodos y arenas contaminados con hidrocarburos producidas en las EDS de Risaralda.

<b>Municipio</b>	<b>EDS</b>	<b>Lodos (Kg/mes)</b>	<b>Arenas (Kg/mes)</b>
Apia	El Crucero	42.3	8
Guática	Guática	N.G	8
Marsella	Marsella	317	18
Pueblo Rico	La Esperanza	N.G	8
	Panamericana	N.G	8
Belén de Umbría	Cootransbel	365	16
	El Carmen	N.G	12
	El Recreo	N.G	8
La Celia	El jardín	N.G	8
Mistrató	Mistrató	96	8
Santuario	Tatamá	43.6	8
Dosquebradas	Card Ltda	385	20
	La tractomula	386.4	16
	Risaralda/La carlota	453	20
	Viaducto	380	8
	Metropolitana	235	25
	Otún	247	20
La Virginia	Codi	360	8
	La Virginia	43.6	8
	JRC	551	18
	La Antioqueña	330	16
Santa Rosa	Araucarias	240	8
	Modelo	95	8
	San Eugenio	41	8
Pereira	Campestre La Manuela	288	10
	Coochoferes Av del Rio	188	20
	Coochoferes La 28	98	4
	De Pereira	138	20
	Aeropuerto	1152	16
	La Pista	164	8
	San Fernando	2800	8
	Terminal	592	20

<b>Municipio</b>	<b>EDS</b>	<b>Lodos (Kg/mes)</b>	<b>Arenas (Kg/mes)</b>
	Ciudad Victoria	237	16
	Corales	200	25
	Don Ernesto	130	10
	Matecaña	300	15
	Los Pizamos	216	15
	Santa Elena	386.4	8
	Urbanos Pereira	N.G	10
	Cuba	N.G	10
	El Camionero y su automóvil	404	16
	Fonda Central	294	10
	Parque Olaya	236	20
	Servimotor	168	15
	<b>TOTAL</b>	<b>12602.3</b>	<b>569</b>

Fuente: Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira, 2007.

Con estos resultados, se observa que para las estaciones de servicio evaluadas en Risaralda se generan un poco mas de 12602,3 kg/mes de lodos y 569 kg/mes de arenas contaminadas con hidrocarburos, los cuales, en la mayoría de los casos son dispuestos de manera indiscriminada junto con los residuos ordinarios o en lotes baldíos cercanos a la EDS.

Por otro lado, en el año 2000 en dieciséis (16) EDS y talleres automotores de los municipios de Pereira y Dosquebradas se realizaron 51 perforaciones exploratorias para analizar el grado de contaminación de los suelos por hidrocarburos. En este estudio se encontró que la contaminación de suelos por hidrocarburos en las EDS es leve en términos generales pues el 70% de los dieciséis sitios donde se realizaron perforaciones presentan contaminación leve (<100 mg/kg), el 13% presenta contaminación leve a moderada (100<500 mg/kg), el 12% presentan contaminación moderada (500<1000 mg/kg), el 4% presenta una contaminación de moreda a alta (1000<5000 mg/kg) y Solamente el 1% presentan contaminación alta (>5000 mg/kg). Así mismo, el estudio concluye que no existe una relación directa entre la antigüedad de la estación, la profundidad y el grado de contaminación (Gallego, O., 2000).



Finalmente, no existen registros exactos del número y las dimensiones de la contaminación de aguas superficiales y subterráneas en las EDS estudiadas. De las cuarenta y ocho (48) EDS analizadas tan solo veinticuatro (24) tienen instalados pozos de observación y/o monitoreo alrededor de los tanques de almacenamiento que permitan detectar una fuga que pueda estar afectando los mantos freáticos. Sin embargo, en la mayoría de los casos el número de pozos es insuficiente o solo existen pozos de observación siendo necesaria la instalación de pozos de monitoreo. De igual manera, al inspeccionar los pozos existentes se detectó la presencia de combustibles en siete (7) EDS, las cuales, deben entregar un reporte de caracterización de dicha agua a la autoridad ambiental. Sin embargo, no se conoce el contaminante presente, sus concentraciones y la antigüedad de la contaminación (Gallego, O., 2000).

#### 7.6 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Las estrategias para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pueden ser físicas-químicas-biológicas (Gan, S., *et al*, 2009), entre las más comunes se encuentran:

Físico-química: Extracción con disolventes (lavado con agua y disolventes orgánicos, agentes tensioactivos, ciclodextrinas, aceite vegetal), extracción con fluidos supercríticos, la extracción con fluido subcrítico.

Químico: Oxidación química con diversos oxidantes (por ejemplo, el reactivo de Fenton, el ozono, peróxido-ácido,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Persulfato de sodio), la degradación fotocatalítica y la remediación electrocinética.

Físicos-Térmicos: La incineración, desorción térmica, el suelo térmicamente mejorado con la extracción de vapor.

Biológico: La biorremediación *in situ* como la biolabranza y el compostaje, tratamiento aeróbico, anaeróbico y la fitorremediación.

Las estrategias Físico-químicas, se pueden implementar fácilmente ya que el proceso se lleva a cabo a presión ambiente y temperaturas bajas, Las ciclodextrinas y los aceites vegetales proporcionan alternativas no tóxicas, biodegradables y respetuosos con el medio ambiente a los convencionales disolventes. En comparación con el lavado convencional del suelo, las extracciones de fluido supercrítico y subcrítico son opciones "más verdes", pero éstas generen el uso de equipos de alta presión, y no obstante, la extracción con disolventes es sólo un

proceso de separación que transfiere los hidrocarburos, por lo tanto se requiere de un el tratamiento secundario y/o adicional de los extractos. La oxidación química es capaz de degradar hidrocarburos, sin embargo, existe la preocupación de que se puedan formar subproductos tóxicos durante el tratamiento. Tanto la degradación fotocatalítica y la remediación electrocinética, han sido aplicados recientemente para el tratamiento de suelos contaminados, pero el éxito en campo, debido a las extensiones requerirá una mayor optimización y estudios de factibilidad económica de estas estrategias. Las estrategias térmicas, por otro lado, pueden destruir eficazmente el hidrocarburo, pero implican altos costos debido a las altas temperaturas que se requieren y a la necesidad de un tratamiento de los gases producidos. La biorremediación y fitorremediación, por su parte, requieren un proceso de larga duración en comparación con todas las demás estrategias, las principales ventajas de estos procesos biológicos son el alto potencial de las estrategias *in situ* y que no se requiere de más tratamientos adicionales ya que los subproductos que se forman generalmente son dióxido de carbono, agua y biomasa (Gan, S., *et al*, 2009).

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, se ha convertido en un tema importante en la investigación ambiental, muchas de las estrategias de biorremediación se han desarrollado y mejorado para tratar los suelos contaminados, estas consisten en la aceleración de los procesos naturales de biodegradación (Xu, Y., y Lu, M., 2010), mediante bacterias u otros microorganismos que alteran y convierten moléculas orgánicas en otras sustancias, como CO<sub>2</sub>, agua y metano. La biorremediación por lo general, consiste en la aplicación de fertilizantes nitrogenados y/o de fósforo, en ajustar el pH, mantener el contenido de agua necesaria, oxigenar y se acompaña a menudo con la adición de bacterias. Además, cuando los contaminantes tienen mala solubilidad del agua, la adición de emulsionantes y agentes de superficie activa (surfactantes) aumenta la velocidad de biodegradación mediante el aumento de la biodisponibilidad del contaminante (Calvo, C., *et al*, 2009). La fitorremediación, es una estrategia que se define como el uso de las plantas y sus raíces, asociadas con las bacterias para eliminar, transformar, o asimilar los productos contaminantes ubicados en el suelo, en sedimentos, agua subterránea, aguas superficiales, e incluso la atmósfera, al mismo tiempo, la fitorremediación tiene un enfoque de tratamiento de profundidad, que según las características del sitio contaminado, las siembra de

plantas puede ser la única intervención a bajo precio y eficiente (Peng, S., *et al*, 2009).

La Biorremediación de suelos se puede dividir en estrategias *in situ* y *ex situ*, en la biorremediación *in situ* se refiere al tratamiento biológico de suelos contaminados sin excavar antes del tratamiento y *ex situ* a tratar el suelo contaminada en un lugar dispuesto para esto, las estrategias *in situ* presentan mayores ventajas sobre las *ex situ*, por su menor costo en traslado y la poca generación de residuos en el proceso (Xu, Y., and Lu, M., 2010). Las estrategias, más empleadas en biorremediación son:

#### 7.6.1 Biorremediación *In situ*:

La Biolabranza: Al suelo contaminado se le mezcla con agentes de volumen y se la realiza una la labranza periódica para favorecer la aireación. Dentro de las ventajas se puede decir que es un proceso considerado de bajo nivel tecnológico que no requiere exigentes consideraciones de ingeniería, y a la vez permite una fácil manipulación y control de las variables de diseño y operación. Entre sus desventajas está que requiere grandes extensiones de área, otro inconveniente es que si los hidrocarburos contaminantes son livianos, estos pueden volatilizarse, lo cual generaría problemas en el aire y cuando la contaminación es profunda los costos de excavación y movimiento de tierras pueden ser muy altos, esta estrategia puede aplicarse *ex situ* de igual manera (Duran, M., y Contreras, N., 2006).

La Bioaireación: Consiste en proporcionar oxígeno al subsuelo estimulando la degradación por medio de microorganismos nativos, se ha convertido en una de las estrategias *in situ* más costo-efectivas disponibles para hacer frente a derrames de hidrocarburos de petróleo, ya que el aire se suministra mediante un sistema de inyección, en cuanto a costos no requiere maquinaria pesada ni excavaciones grandes, ni áreas adicionales para llevar a cabo el tratamiento, Sin embargo, la aplicación de esta estrategia tiene obstáculos considerables debido a la biodisponibilidad de los diferentes contaminantes y esto influye en la velocidad de degradación, en particular los contaminantes de baja solubilidad en el agua, pueden bajar el contenido de humedad en el suelo, si el suelo a tratar es demasiado húmedo puede presentar dificultad para lograr que el aire penetre a través de la zona contaminada (García, J., *et al*, 2010).

La Bioestimulación: se define como la estimulación de los microorganismos nativos, para activar y acelerar la degradación de contaminantes, se puede llevar a cabo con la adición de agua, oxígeno, nutrientes, aceptor de electrones, entre otros parámetros que permitan el buen desarrollo de los microorganismos, dentro de los nutrientes se encuentran principalmente el nitrógeno y fósforo, el nitrógeno proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas, y la fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación, estos fertilizantes pueden ser de uso agrícola o de origen orgánico como estiércol, también se puede llevar a cabo una estimulación con adición de agua y oxígeno, si el área contaminada ya cuenta con buena presencia de nutrientes (Taccaria, M., *et al*, 2012).

La Bioaugmentación: consiste en la adición de cepas microbianas externas (diferentes a las nativas), al suelo contaminado, estos microorganismos están adaptados o incluso modificados genéticamente y cuentan con la capacidad de degradar el contaminante. Esta estrategia no requiere área adicional, ni maquinaria pesada, como desventaja esta la inoculación a gran escala, el que entran a competir con los microorganismos nativos y pueden tener limitaciones con las condiciones climáticas del sitio a tratar. Con un buen estudio de las condiciones del área a inocular, esta estrategia puede aumentar las tasas de remoción del contaminante mediante el aumento de la población bacteriana (Ta-Chen, L., *et al*, 2010).

### **7.6.2 Biorremediación Ex Situ**

El Compostaje: es un proceso biológico controlado, esta estrategia de compostaje se diferencian de los sistemas convencionales de compostaje, ya que son sistemas cerrados, como las incubadoras de gran tamaño, ofreciendo la oportunidad de asegurar el uso de altas temperaturas (> 70 ° C) con el fin de cumplir con requisitos regulatorios para el control de patógenos, esta estrategia debe ser más controlada por los operadores y permite seleccionar los parámetros adecuados de operación por ejemplo, temperatura, contenido de humedad (CH), las proporciones de mezcla (agentes de volumen, paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas) para promover tanto la actividad microbiana y la degradación del contaminantes. La

aplicación de compostaje como una estrategia de biorremediación tiene dos objetivos: (1) maximizar la eliminación del contaminante y (2) para producir un compuesto maduro que podría ser utilizado en la restauración de la tierra para uso industrial. Los sistemas de compostaje incluyen tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Ladislao, B., *et al*, 2007)).

Las biopilas se conforman con el suelo contaminado en ambientes cerrados para aumentar la temperatura, con agentes de volumen, con microorganismos del suelo contaminado, en donde la actividad microbiana principalmente aeróbica, estimulada a través del agua y la adición de nutrientes y junto con aireación degrada los contaminantes, se construyen típicamente sobre una base impermeable para reducir la potencial migración de lixiviados, estas funcionan eficazmente en climas templados, pero también puede ser utilizado en climas más fríos si se les introduce aire caliente a través del proceso de aireación, para esta técnica se debe considerar el tipo de contaminante, porque puede presentar liberación de gases y requiere mucho espacio (Coulon, F., *et al*, 2010).

Los Biorreactores: esta estrategia es utilizada para suelos que se caracterizan por un alto contenido de arcilla y materia orgánica, acoplado a baja conductividad hidráulica y la baja permeabilidad, se caracteriza por ser de contacto líquido-sólido, el suelo es depositado en tanques cerrados, donde se le adicionan nutrientes, agua, oxígeno y cultivos microbianos adecuados, se mezclan para que se lleve a cabo la degradación, en comparación con otras estrategias de biorremediación este proporciona el mayor contacto entre los contaminantes, los microorganismos, el oxígeno, el agua y los nutrientes, lo cual, lo hace una tecnología más efectiva. Como desventaja esta estrategia es más costosa y requiere un tratamiento adicional del agua resultante al realizar la separación del líquido y el suelo, no es viable para contaminantes volátiles (González, I., *et al*, 2006).

## 7.7 DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS

En la degradación ocurren procesos fisicoquímicos entre la interacción natural del contaminante con el ambiente que incluyen la dispersión, dilución, absorción, volatilización, estabilización química o la biodegradación del contaminante (Biorremediación). En la mayoría de los casos, la biorremediación es la mejor alternativa para el tratamiento de esta contaminación (Arroyo, M., *et al.*, 2001).

En los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio, se les conoce como atenuación natural. La atenuación natural transforma el contaminante en formas menos tóxicas, por procesos físicos (evaporación, dispersión, dilución), químicos (oxidación/reducción) y biológicos (degradación), que reduce la movilidad, la masa y la concentración del contaminante (Gideon, O., y Paschal, O. 2008). Entre los factores que influyen en la eficacia y viabilidad de la degradación se destacan (Arroyo, M., *et al.*, 2001):

- Condiciones geológicas y geoquímicas favorables.
- Confirmación de la existencia de los tipos y número de poblaciones de microorganismos que puedan biodegradar los contaminantes.
- Producción y conservación en el medio de subproductos de carácter persistente o más tóxicos que los iniciales, durante y después.
- La no existencia de producto libre en flotación sobre el nivel freático.
- Condiciones óptimas de concentración de oxígeno disuelto.
- Presencia de compuestos utilizados como aceptores de electrones en condiciones anaerobias como nitrógeno, fósforo, sulfatos entre otros.
- Existencia de un coeficiente de retardo favorable para que se produzcan los fenómenos de sorción con suficiente eficacia.
- Que se produzca una dilución suficiente para que la concentración se vea disminuida.

Una característica común de los hidrocarburos es que son biodegradables de forma aerobia y anaerobia. Sin embargo, la tasa de biodegradación aerobia depende de la complejidad de la molécula contaminante y de la disponibilidad de aceptores de electrones. Los hidrocarburos grandes muy ramificados, o que contienen muchos anillos aromáticos son difíciles de degradar. Uno de los aspectos de su escasa biodegradabilidad es su baja solubilidad en agua. El otro es que la compleja estructura hace difícil que los organismos encuentren el lugar para realizar el ataque enzimático inicial. El paso inicial en la degradación de hidrocarburos por bacterias, es generalmente, la introducción de oxígeno en la molécula, que requiere una inversión de energía y oxígeno elemental. El hidrocarburo se oxida mediante dos electrones. La ventaja para los microorganismos es que los productos de las reacciones de oxigenación están más disponibles. Específicamente los productos

son fácilmente atacados en posteriores reacciones de deshidrogenación e hidroxilación y son más solubles en agua (Arroyo, M., *et al.*, 2001).

En la actualidad son muchos los hidrocarburos aromáticos que se sabe son biodegradables en ausencia de oxígeno, se han aislado organismos que efectúan la biodegradación de muchos hidrocarburos aromáticos y se han descubierto trayectorias bioquímicas por medio de las que el oxígeno procedente del agua o de hidrocarburos carboxílicos se introduce en el anillo aromático. En general, las reacciones anaerobias son bastante lentas comparadas con sus contrapartidas aerobias, pero se producen y tienen importancia en el caso de los hidrocarburos aromáticos. Está surgiendo la evidencia de que los hidrocarburos alifáticos también pueden degradarse en ausencia de oxígeno (Arroyo, M., *et al.*, 2001).

## 7.8 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIORREMEDIACIÓN.

Uno de los principales problemas de la biodegradación, es que en presencia de altas concentraciones del contaminante en el suelo, pueden existir efectos de toxicidad sobre la población microbiana. Otro, es la insuficiencia de nutrientes en el suelo; sin embargo, la presencia de cantidades mínimas de nitrógeno y fósforo permiten la biodegradación, aunque en tiempos más largos. Los factores ambientales que influyen en la biodegradación son: temperatura, pH, humedad, nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfato) y presencia de microorganismos (Roldán, A., y Iturbe, R., 2002).

### 7.8.1 Temperatura

Es uno de los factores ambientales más importantes, esta tiene una gran influencia en la biodegradación por su efecto sobre la naturaleza física y química del petróleo y sus derivados (Pardo, J., *et al.*, 2004). A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce y disminuye la solubilidad del O<sub>2</sub> en agua, afectando así la biodegradación. Las tasas de degradación generalmente aumentan cuando la temperatura incrementa (Ríos, R., 2005).

La temperatura también afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos

de temperatura bastante reducidos, entre 18 y 30°C (condiciones mesófilas), Cuando supera los 40°C se produce una disminución de la actividad microbiana, una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas o puede decrecer la biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias. Cuando la temperatura esta a 0°C se detiene substancialmente la biodegradación (Gómez, S., *et al.*, 2008), también se ha dado la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos, a 5°C en suelos árticos, a 60°C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Torres, K. y Zuluaga, T., 2009). Los cambios climáticos y de estaciones, seleccionan de manera natural a las poblaciones de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, los cuales se adaptan a las temperaturas ambientales (Ríos, R., 2005).

### 7.8.2 pH

El pH es un factor químico importante que influye en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, ya que determina el grado de adsorción de iones por las partículas del suelo, afectando así su solubilidad, movilidad, disponibilidad y sus formas (Volke, T., y Velasco, J., 2002).

Las formas catiónicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$ ) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $(\text{PO}_4)_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) son más solubles a pH alcalino. Por lo tanto, si es necesario alcalinizar un suelo se utiliza arena de caliza e iones  $\text{Ca}_2^+$  y  $\text{Mg}_2^+$ , mientras que para acidificar un suelo se utiliza  $\text{FeSO}_4$ . En otros estudios se ha reportando que la acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando compuestos del azufre (Gómez, S., *et al.*, 2008).

El pH afecta las poblaciones microbianas, por la biodisponibilidad de fuetes de carbono y energía. A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. Generalmente los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, lo cual limita el crecimiento y la actividad de los microorganismos. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6 - 8 unidades de pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4-7.8, evitando al máximo las fluctuaciones. El pH también tiene efecto en la disponibilidad de



nutrientes, debido a que afecta la solubilidad y estado de los compuestos. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH de 6.5, mientras que el plomo se encuentra menos soluble a pH de 7 a 8. En general para minimizar el transporte de metales se recomienda un pH mayor a 6 (Ríos, R., 2005).

### 7.8.3 Humedad

La humedad es un factor importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma bacteriano, este proceso es necesario para su crecimiento y desarrollo. Es conveniente mantener una humedad del orden del 20 - 75 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación (Gómez, S., *et al.*, 2008). Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo y una poca o nula humedad priva el intercambio de gases y da como resultado zonas anaeróbicas. Por lo anterior, la humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación (Torres, K. y Zuluaga, T., 2009).

### 7.8.4 Nutrientes

Los nutrientes son uno de los factores más relevantes por ser sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos, por lo que estos constituyentes se deben encontrar disponibles para su asimilación y síntesis, la disponibilidad de estos aumentan la eficiencia y el buen desarrollo de la biorremediación (Gómez, S., *et al.*, 2008).

Los nutrientes se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes de mayor importancia metabólica se encuentran; el carbono (C) en este caso los hidrocarburos como contaminantes proporcionan la energía necesaria para la fabricación de compuestos celulares y productos metabólicos (dióxido de carbono, agua, enzimas); el Nitrógeno (N), forma parte principal de las biomoléculas de las células, es un elemento necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. En ocasiones la utilización de estos nutrientes es rápida, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades, siendo un factor limitante para la degradación, por lo cual se puede incorporar fertilizantes de uso agrícola

como urea o sulfato de amonio y de origen orgánico como estiércol, para acelerar el proceso de biorremediación (Gómez, S., *et al.*, 2008). El fósforo (P) que interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de las células y es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación, puede ser adicionado al suelo como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. El Potasio (K) requerido por una gran cantidad de enzimas para catalizar diferentes reacciones. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de macronutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encuentran en el rango normal se pueden adicionar al suelo. Si la concentración de nutrientes inorgánicos como N y P es baja, se produce una relación C/N y C/P muy altas, lo que no es favorable el crecimiento microbiano, la relación C:N:P debe estar dentro de un rango normal de 100:10:2 a 100:2:0,4, que beneficia los procesos de metabolismo microbiano en el suelo y contribuyen al proceso de degradación del contaminante. La fuente de micronutrientes, oligoelementos o elementos minoritarios constituye un conjunto variado de elementos entre los que se encuentra el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), azufre (S), cobalto (Co), manganeso (Mn), magnesio (Mg) y calcio (Ca), normalmente no se incorporan en el proceso de biorremediación, puesto que el suelo provee estos elementos en cantidades suficientes (Vallejo, V., *et al.*, 2005, Gómez, S., *et al.*, 2008).

Una característica común en suelos contaminados con hidrocarburos, es que presente altas concentraciones de carbono, sin las cantidades suficientes de nitrógeno y fósforo en el suelo, se pueden limitar los procesos de crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos degradadores, disminuyendo las tasas de biodegradación. La adición de fuentes de N y P inorgánicas, suplen las necesidades fisiológicas de los microorganismos, dando como resultado el incrementando de las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Vallejo, V., *et al.*, 2005).

#### **7.8.5 Aceptor de electrones**

Los aceptores de electrones aumentan la actividad de las poblaciones microbiana nativas o inoculadas (Hamdi, H., *et al.*, 2007). En la biorremediación es fundamental el proceso metabólico de transferencia de electrones. La energía necesaria para el crecimiento microbiano se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan la

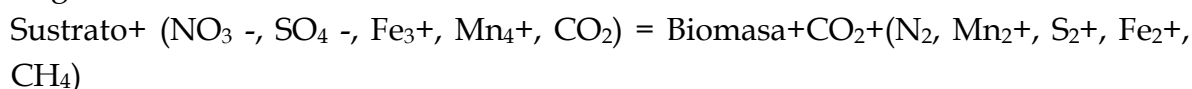
transferencia de los electrones. Los aceptores más utilizados por los microorganismos, son el oxígeno y los nitratos. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, los microorganismos convierten en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular, por enzimas oxigenasas. Sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono, se produce en condiciones reductoras o anaerobias (Gómez, S., *et al.*, 2008).

El proceso de biorremediación aerobia y anaerobia puede esquematizarse de la siguiente manera:

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



El oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos u otros aceptores de electrones alternativos, logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación en forma anaerobia (Gómez, S., *et al.*, 2008).

### 7.8.6 Microorganismos

La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxiden los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como

el crudo. La degradación de hidrocarburos se lleva acabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Ríos, R., 2005).

Los reportes del porcentaje de bacterias y hongos presentes en suelos, varían de forma importante de entre 0.13% y 50% para bacterias, y de 6% a 82% para hongos, con respecto a la comunidad heterótrofa total del suelo. La proporción de hongos y bacterias dependerá de las condiciones del sitio. El número de microorganismos heterótrofos totales en suelo, considerado como típica se encuentra en una cuenta total de  $10^7$  a  $10^9$  UFC/g de suelo; para degradadoras potenciales en suelos no contaminados entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g; y entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g en suelos contaminados (Ríos, R., 2005).

En ecosistemas en donde las poblaciones microbiológicas degradadoras no son significativas, se han utilizado la bioaumentación con el propósito de incrementar la tasa de biodegradación de los contaminantes. Se prefiere la bioaumentación empleando microorganismos nativos, ya que otros microorganismos pueden presentan problemas de adaptación. Recientemente se ha considerado el uso de microorganismos genéticamente manipulados para la biorremediación de sitios contaminados (Ríos, R., 2005).

#### 7.9 EXPERIENCIAS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.

Las primeras estrategias de biorremediación que se aplicaron fueron similares a la "biolabranza", lógicamente fueron utilizadas por compañías petroleras, fundamentalmente para la remediación de vertidos de gasolina, estas aparecen en los años 70, en los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos de degradación, durante los años 90, el desarrollo de estrategias de "burbujeo de oxígeno" hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería

que mejoraron los rendimientos de las estrategias más populares para suelos contaminados ("biolabranza", "compostaje") (Torres, K. y Zuluaga, T., 2009).

En la biorremediación se usan microorganismos tales como bacterias, protozoos y hongos para degradar contaminantes en compuestos menos o no tóxicos (United States Environmental Protection Agency, 2001). Los microorganismos usan el carbón del contaminante como fuente de energía, degradando de esta forma el contaminante, Saval, S., y Lesser, J. (2000), documentaron una experiencia de caracterización y remediación de un suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos sobre la superficie de un terreno en el que existieron fugas de combustibles con anterioridad, este fue sometido a tratamiento de biorremediación por medio de reactores a nivel piloto agregando microorganismos y algunos nutrientes. El estudio concluyó que la concentración de diesel se redujo de 20000 a menos de 300 mg/l y el contenido de gasolina no fue detectable.

En el 2002, Schmidt, W., evaluó la biorremediación como una solución ecológicamente compatible y encontró que en comparación con las tecnologías disponibles, la biorremediación, aún de larga duración (mayor a 90 días) y de extensa labor, alcanza costos de limpieza por tonelada de suelo tratado considerablemente más bajos que cualquier otra tecnología disponible en el mercado.

Mehrasbi, M., *et al.* (2003), estudiaron la adición de nutrientes para la biodegradación de hidrocarburos presentes en el suelo durante un período de 5 meses y los análisis mostraron la descontaminación biológica para gasolina, queroseno y una mezcla sintética de gasolina, queroseno y aceite de caldera los porcentajes de de fueron del 60%, 36% y 55%, respectivamente, Ayotamuno, M., y Okparanma, N. (2007), demostraron que con labores regulares de adición de agua y mezclado, se pueden alcanzar reducciones de hidrocarburos totales en lodos contaminados con hidrocarburos, que varían entre 40.7% y 53.2% en dos semanas de tratamiento y entre 63.7% y 84.5% después de 6 semanas de tratamiento.

A nivel mundial las investigaciones de suelos contaminados con hidrocarburos han aumentado e implementado diferentes estrategias de biorremediación, en china, Xu, Y. y Lu, M., en el 2010, emplearon la bioestimulación con fertilizantes inorgánicos y bioaumentación con bacterias nativas para el tratamiento de suelo

contaminado con aceite de crudo por 12 semanas, el suelo fue recogido en la provincia de Liaoning. China, se utilizó un bioportador de microorganismos preparado y manejado en el laboratorio que consistía en cascara de mani en polvo por sus propiedades porosas, granulares y de fácil acceso económico, las bacterias fueron cultivadas desde una muestra de suelo contaminado con aceite de crudo y puestas en el bioportador, para luego ser puestas en el sistema de tratamiento, el fertilizante aplicado fue  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , cada unidad se mezcló a fondo cada dos días para permitir una buena aireación, las bandejas se incubaron en un invernadero a 25-30°C, y el porcentaje de humedad se mantenía entre un 18% a 20% con la adición de agua, este estudio demostró que la bioaumentación con especies nativas y el bioportador era la manera más eficaz para eliminar el petróleo con remociones del 26 al 61%.

Una revisión en Portugal por Tyagi, M., y Fonseca, M. en el 2010, discutió sobre la efectividad y las limitaciones de los procesos de bioaumentación y la bioestimulación, bajo condiciones controladas (laboratorio) y de estudios de casos reales en el campo, deducen que las estrategias tienen buenos resultados en condiciones controladas, hay diferencias en la aplicación en campo ya que se deben considerar las condiciones ambientales y parámetros asociados al suelo, como el contenido de nutrientes y su disponibilidad, la población microbiana, la temperatura, pH y entre otras, antes de su implementación, pero la combinación de las dos estrategias aplicados en condiciones de campo han generado buenos resultados en la reducción de contaminantes. Estas estrategias también se han considerado para climas muy fríos, en Finlandia por Kauppi, S., *et al*, en el año 2011, se plantearon como primer objetivo el de determinar si la manipulación de los niveles de nutrientes del suelo y la porosidad, tienen un efecto significativo en la biorremediación en condiciones boreales, el segundo objetivo fue comprobar si la bioaumentación con un consorcio de enriquecimiento o de una cepa aislada degradadora, podría acelerar la degradación del aceite de hidrocarburo y/o influir en la población microbiana en el suelo tratado, llegando a la conclusión de que la bioestimulación mediante la optimización de nitrógeno y oxígeno mejora de manera significativa la biorremediación de aceite de petróleo en el suelo contaminado, mientras que la bioaumentación no tuvo ningún efecto adicional.

En Barcelona - España, Sayara, T., *et al.*, en el 2011, señaló la influencia de la bioestimulación y bioaumentación, en el compostaje de suelos contaminados con

hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), en la bioestimulación se uso compost de una fracción orgánica seleccionada de los residuos sólidos municipales (FORM) y comida de conejo como sustratos orgánicos, la bioaumentación con los hongos de pudrición blanca *Trametes-versicolor*, el proceso duro treinta (30) días de incubación, se evaluó a través de diferentes análisis, incluyendo: índice de respiración dinámica (DRI), el consumo de oxígeno acumulado durante 5 días (AT5), la actividad enzimática y biomasa de hongos, después de los análisis se demostró que el hongo *Trametes-versicolor* no mejora significativamente la degradación de los PAHs, sin embargo, la bioestimulación fue capaz de mejorar la degradación de PAHs en un 89% del total PAHs en el período de compostaje (30 días) en comparación con el 29,5% del total PAHs, que logró los microorganismos nativos del suelo sin sustrato (control, no modificado) y de hecho, los resultados mostraron que el compost estable a partir de la FORM tiene un mayor potencial para mejorar la degradación de los HAP en comparación con los sustratos estables, tales como comida para conejos.

En Italia, Taccaria, M., *et al*, en el año 2012, examinó la evolución de la comunidad bacteriana durante la remoción de suelo contaminado con diesel, utilizando biorreactores a escala de laboratorio, la evaluación de la influencia de la adición individual o conjunta, de un compost, un agente tensioactivo (b-ciclodextrina) y un consorcio bacteriano, esto por 120 días, durante la etapa inicial del proceso, en la bioestimulación y la bioaumentación alcanzaron mayor diversidad de especies (evaluados por análisis Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante DGGE) y un aumento del contenido de biomasa, después se presentó una caída transitoria causada por el contaminante, al final del proceso se encontró diversa comunidad bacteriana y alto contenido de biomasa, la densidad y la actividad de la microflora fueron similares en biorreactores con o sin b-ciclodextrina, pero bajo las condiciones ensayadas, una reducción en la eliminación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se observó en el biorreactor que contenía b-ciclodextrina, el uso combinado de compost maduro y de un consorcio microbiano seleccionado, es la estrategia más útil para la eliminación HTP, logrando una degradación del 96% de HTP al final del proceso de biorremediación.

En Colombia los procesos de biodegradación han sido enfocados principalmente al tratamiento de suelos. El Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes ha desarrollado diferentes estudios encaminados al

aislamiento y bioaumentación de bacterias nativas degradadoras de crudo en suelos impactados por derrames del oleoducto Caño Limón Coveñas. En otros estudios se han tratado suelos a través de biolabranza y adición de nutrientes, obteniendo porcentajes de degradación de hidrocarburos totales del petróleo entre el 35%-61% (Castro, L., *et al.*, 2004; Vallejo, V., *et al.*, 2005).

En el 2004, Vargas, P., *et al.*, resaltaron la importancia de la selección de microorganismos nativos aislados del lugar contaminado para con estos llevar a cabo el proceso de biorremediación, debido a que estos, se encuentran mejor adaptados al contaminante, a diferencia de otros microorganismos foráneos, que aunque con una gran actividad biorremediadora, pueden no funcionar bajo las condiciones ambientales del lugar.

En el 2010, Roldan, F., *et al.*, evaluó, la biodegradación y la lixiviación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) durante la atenuación natural (AN) en los procesos de los lodos aceitosos utilizados en el mantenimiento de caminos no pavimentados, este estudio fue realizado por un camino situado en Arauca (Colombia) y al mismo tiempo en el laboratorio donde las condiciones de lluvia se han simulado mediante el uso de columnas. En el estudio *in situ*, se evaluaron tres profundidades (5, 50 y 80 cm). La degradación de HTP se evaluó mediante el control de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas *in situ* y en las columnas durante 538 y 119 días, respectivamente. Los niveles de pH observados durante el estudio fueron relativamente constantes, oscilando entre los valores óptimos para la biodegradación ( $6,2 \pm 0,9$ ). El contenido de agua *in situ* fue baja (<14%) y las concentraciones observadas de nitrógeno (amoníaco y nitrato) fueron <30 y <10 mg/kg<sub>dw</sub>, respectivamente, lo que indica que ningún balance de masa se mantuvo, ambos factores limitaron las posibles de biodegradación intrínseca. Durante el estudio *in situ* un 95% de degradación de HTP se observó a 5 cm de profundidad, mientras que no era evidente la degradación de 50 y 80 cm de profundidad. En los experimentos de las columnas, la concentración de HTP en el lixiviado fue menor a 1 mg/l, lo que indicó que el proceso de lixiviación no jugó un papel clave en este estudio.

García, E., *et al.*, en el año 2011, evaluó el proceso de bioestimulación por nutrientes utilizando fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) N:P:K 28:12:7 y sales inorgánicas simples (SIS)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en suelos contaminados con



hidrocarburos utilizando respirometría. El suelo fue contaminado con lodos aceitosos a una concentración 40.000 mgHTP/kg<sub>ps</sub> en condiciones de laboratorio. Para cuantificar el consumo de oxígeno se utilizaron dos respirómetros de medición manométrica HACH® 2173b y OXITOP® PF600 durante ensayos de 13 días (n=3). Se evaluaron dos estrategias (FIC y SIS) y tres controles (abiótico, sustrato de referencia y sin nutrientes). Se analizaron parámetros físico-químicos (pH, nutrientes y HTP) y microbiológicos (heterótrofos y degradadores) al inicio y al final de cada ensayo. SIS y el control sin nutrientes presentaron las mayores tasas de respiración, en el equipo HACH se obtuvieron valores de 802,28 y 850,72 mgO<sub>2</sub>/kg<sub>ps</sub>/d, respectivamente, y en OXITOP fueron de 936,65 y 502,05 mgO<sub>2</sub>/kg<sub>ps</sub>/d, respectivamente, indicando que los nutrientes de SIS estimularon el metabolismo microbiano. Por otro lado, FIC presentó los recuentos y tasas de respiración más bajas (188,18 y 139,87 mgO<sub>2</sub>/kg<sub>ps</sub>/d, en HACH y OXITOP, respectivamente), esto pudo estar relacionado a un efecto inhibitorio generado por la acumulación de amoníaco, limitando el crecimiento de la población degradadora.

En general, las experiencias en procesos de remediación biológica cuentan con abundante literatura científica, pero muy pocos hacen referencia al tratamiento "*in situ*" para la problemática de los sedimentos contaminados provenientes de las estaciones de servicio de combustible, con estrategias de Biorremediación.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

Dentro del proceso de investigación y análisis de la bioaugmentación y bioestimulación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible, se realizaron las siguientes actividades:

### 8.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 8.1.1 Factores

Para esta investigación se consideró un factor o variable importante a ser controlado durante el experimento:

1. Biorremediación.

### 8.1.2 Niveles

Se consideraron cuatro (4) niveles:

Para la bioestimulación:

1. SN: Se adicionó nutriente (Urea).
2. Sed: Se adicionó H<sub>2</sub>O y se volteaba manualmente (Oxígeno) como control biótico.

Para la bioaumentación:

3. SSM: Se adicionaron Microorganismos, Se adicionó H<sub>2</sub>O y se volteaba manualmente (Oxígeno) como control biótico.
4. SSMN: Se adicionó Nutriente (Urea) más Microorganismos

### 8.1.3 Tratamientos

El número de tratamientos está dado por el producto de los factores y sus niveles, para esta investigación, el resultado fue: un factor por cuatro (4) niveles es igual a cuatro (4) tratamientos, a los cuales se realizó una réplica con fines estadísticos. (Figura 1).

### 8.1.4 Variables de Respuesta

Para la investigación se tuvo en cuenta una variable de respuesta:

1. Hidrocarburos totales.

### 8.1.5 Variables de Control

Para la investigación se tuvo en cuenta tres (3) variables de control:

1. Presencia de Microorganismos.
2. Características químicas (contenido de nutrientes).
3. Características Físicas (Temperatura, pH, Humedad).

### 8.1.6 Diseño Estadístico

El diseño estadístico de la presente investigación corresponde a un modelo matemático factorial con asignación completamente al azar, la variable de respuesta más importante a analizar es hidrocarburos totales, entre los niveles de la investigación.

$$Y_{ijklm} = \mu + B_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

Y: la variable de respuesta HCT, ij: Bioestimulación, kl: Bioaumentación, m: del error.

$\mu$ : promedio total del experimento

$B_{ijkl}$ : Biorremediación con sus niveles

$\varepsilon_m$ : Error experimental

Las hipótesis matemáticas que se manejan según el modelo matemático son:

A)  $H_0: \mu B_i = \mu B_j = \mu B_k = \mu B_l$  vs  $H_a: \mu B_i \neq \mu B_j \neq \mu B_k \neq \mu B_l$

Para  $H_0$ : no hay diferencias significativas en las medias de los niveles versus  $H_a$ : que existen diferencias significativas entre algunos o todas las medias de los niveles.

B)  $H_0: B_i = B_j = B_k = B_l$  vs  $H_a: B_i \neq B_j \neq B_k \neq B_l$

Para  $H_0$ : no hay diferencias significativas entre los niveles de la técnica de Biorremediación, para la degradación de hidrocarburos, versus  $H_a$ : que existen diferencias significativas entre los niveles de la técnica de Biorremediación, para la degradación de hidrocarburos.

Para el análisis del comportamiento en el tiempo los datos de las diferentes variables de interés se utilizó el programa de Microsoft Office Excel 2007, para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 17 "Software Estadístico para las Ciencias Sociales", primero se realizó un análisis de normalidad para comparar la probabilidad de que la variable de concentración de hidrocarburos totales, sigue una distribución homogénea, después del resultado de esta prueba los datos de la variable no presentaron un comportamiento normal, se realizaron transformaciones de datos como elevar al cuadrado, sacar raíz cuadrada y logaritmo natural, de las tres solo el logaritmo natural de esta variable presentó normalidad, pero al ser una de tres, se optó por realizar el análisis con pruebas no paramétricas para datos no normales y para muestras independientes, estas para definir si hay o no diferencias significativas entre las estrategias, también se realizó un análisis ANOVA no Paramétrico para los cuatro niveles de esta investigación, para definir si presentan diferencias estadísticas significativas entre ellos.

## 8.2 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN

Para esta actividad se ubicaron los mesocosmos en las instalaciones del Laboratorio de Procesos Unitarios, de la Facultad de Ciencias Ambientales, de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) y se contaron con (8) mesocosmos (Figura 1), que se distribuyeron de la siguiente manera:

**Bioestimulación: Sed:** Sedimento contaminado: 100% de sedimentos contaminados provenientes de la estación de servicio.

**SN:** Sedimento más Nutriente: 100% de sedimentos contaminados con hidrocarburos de la estación de servicio, más nutriente (Urea).

**Bioaumentación: SSM:** Sedimento más Suelo con Microorganismos: 60% sedimentos contaminado con hidrocarburos de la estación de servicio, 40% de suelos con microorganismos adaptados.

**SSMN:** Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente: 60% sedimentos contaminados con hidrocarburos de la estación de servicio, 40% de suelos con microorganismos adaptados, más nutriente (Urea).

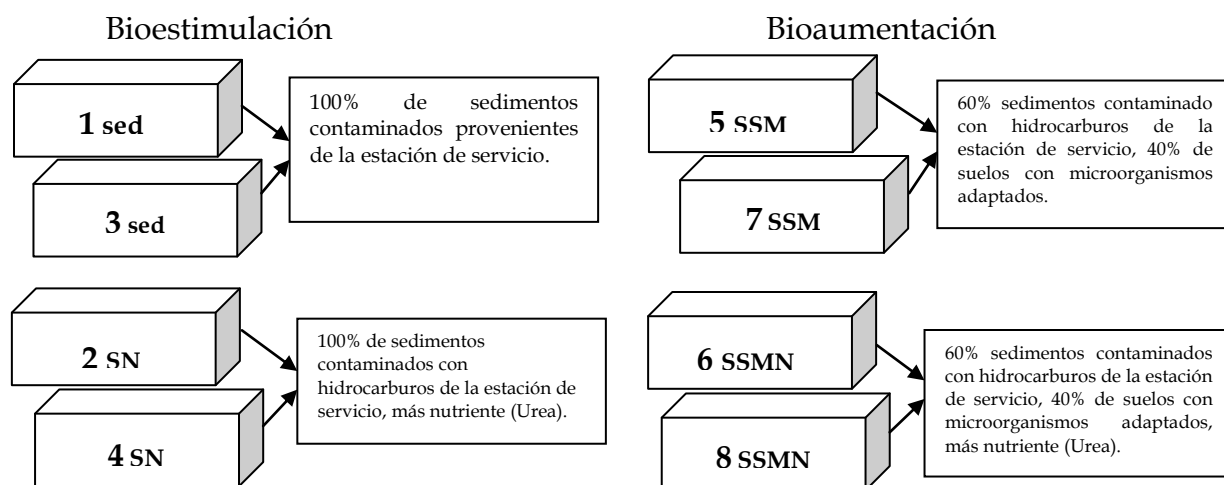


Figura 1. Esquema de los ocho (8) mesocosmos.

### 8.2.1 Montaje de los Mesocosmos

Los Materiales fueron:

- Sedimentos contaminados de la estación de servicio.
- Suelo con microorganismos adaptados a la presencia de hidrocarburos.
- Nutriente (Urea).
- 8 canastas de polietileno de alta densidad (57x37x15 cm), este material fue escogido por su baja permeabilidad y mínima absorción de HCs (Vallejo, V., *et al.* 2005).
- Palas de jardinería para mezclar el sedimentos.

Para el montaje de los mesocosmos se consideraron las instalaciones de la estación de servicio INTEGRÁ (Dosquebradas-Risaralda-Colombia), en el lecho de secado los sedimentos están confinados y después de un tiempo (2 semanas) sin humedad, ni volteo, se deshidrata y toma una apariencia de una arena negra o gris oscura, (Figura 2), se realizaron dos muestreos: el primero el 16/07/2010, presentando, pH: 9,05 unidades, humedad: 10%, hidrocarburos totales 21523,5 mg/kg de suelo seco, el segundo muestreo se realizo tres (3) meses después, al sedimento no se le agrego agua ni se volteo, no se le hizo nada, se dejo en el lecho de secado aparte de los nuevos sedimentos que llegaban del mantenimiento de la estación de servicio, se muestreo el 02/10/2010, presentando, pH: 8,9 unidades, humedad: 2%, hidrocarburos totales 16040,25 mg/kg de suelo seco, es este tiempo se redujo 5483,25 mg/kg de suelo seco del hidrocarburo, un 25%, cuando en un término de 80 días con alguna estrategia de biorremediación, se plantea una reducción del 80% (Ayotamuno, M., y Okparanma, N., 2007), considerando estos primeros muestreos, los bajos niveles de degradación y la posibilidad de que los sedimentos contaminados de la estación de servicio en el lecho de secado, presente problemas de disponibilidad de agua para los microorganismos, afectando gravemente el proceso de biorremediación (Gómez, S., *et al.* 2008), se planteo que en el manejo de los mesocosmos y en la implementación de las estrategias, se maneje el sedimento con agua y volteo manual, como punto de partida, dando un aporte real a la necesidad de reducir la concentración de hidrocarburos totales presentes en estos sedimentos.

También se consideraron los rangos óptimos de los factores que influyen en la degradación de hidrocarburos totales (Tabla 2).

**Tabla 2.** Rangos Óptimos para procesos de biorremediación

PROPIEDAD	RANGO	REFERENCIA
Temperatura (°C)	18° - 30°	Gómez, S., <i>et al</i> , 2008
pH (unidades)	6 - 8	Ríos, R., 2005
Humedad (% capacidad de campo)	20% - 75%	Gómez, S., <i>et al</i> , 2008
Nutrientes C:N:P	100:10:2 - 100:2:0,4	Gómez, S., <i>et al</i> , 2008.
Microorganismos degradadores (UFC)	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup>	Ríos, R., 2005

Fuente: elaboración de este estudio.



**Figura 2.** Materiales de los Mesocosmos.

Los sedimentos contaminados utilizados provenían de la trampa de grasas de la estación de servicio de la empresa de transporte masivo INTEGRAL en el Municipio de Dosquebradas-Risaralda-Colombia, esta recoge las aguas residuales del área de distribución de combustible y del área de lavado de los buses, estos sedimentos son recopilados en un lecho de secado al cual no le hacen ningún tipo de tratamiento, cada semana se realiza el mantenimiento de la trampa de grasas y los sedimentos son dispersos a un lado de anteriores, hasta que se sequen y son entregados a una empresa inmovilizadora de RESPEL.



**Figura 3.** Sedimentos de la Estación de servicio Integra.

El suelo con microorganismos adaptados a la presencia de hidrocarburos, fue tomado de una contaminación anterior por un derrame de ACPM (hidrocarburos), del poliducto Medellín - Cartago, ocurrido en el Km 226+350, predio Chapinero, entrada 14 vía Cerritos - Cartago, el 20 de Mayo del 2009, se derramaron 1.100 barriles en un área aproximada de 20 m<sup>2</sup>, en este derrame se contaminó la quebrada Las Pilas situada en la entrada a la Hacienda Sotará, 2 Km abajo del derrame, de las orillas de esta quebrada se tomaron las muestras de suelo para los mesocosmos, este suelo se homogenizó y se le realizaron pruebas de laboratorio, para determinar la presencia de microorganismo, se tomaron ocho puntos, manejando un rango de bacterias hidrocarbocíclicas de  $1 \times 10^6$  y  $1.9 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo seco, Saval, S., y Lesser, J., 2000, en documentaron experiencias *in situ* en la superficie de un terreno donde existieron fugas con anterioridad, para aprovechar la población de bacterias en él y en el 2004, Vargas, P., *et al.*, resaltaron la importancia de aprovechar los microorganismos nativos del suelo contaminados, aislándolos y con ellos llevar a cabo procesos de remediación.



Figura 4. Suelo de las orillas del la Quebrada las Pilas.

En la aplicación del nutriente, se precedió a tomar unas muestras iniciales de los mesocosmos, para saber el contenido de nutrientes presentes y con estos datos se realizaron los cálculos para encontrar la dosis a aplicar a los cuatro (4) mesocosmos que contarían con la adición de este nutriente, según los análisis iniciales del laboratorio y los cálculos realizados (ANEXO A), para llegar a un nivel de nitrógeno óptimos para favorecer el crecimiento microbiano, este rango se encuentra entre 0,127% y 0,22% de Nitrógeno (Ríos, R., 2005), el cual compensara la relación de C/N, por la contaminación del hidrocarburo y le permitirá a los microorganismos contar con nutrientes suficientes para llevar a cabo los procesos de Biorremediación (Vallejo, V., *et al.*, 2005). La urea ha sido utilizada para alcanzar concentraciones de nitrógeno óptimas en cuanto a la relación de C/N (Gan, S., *et al.*, 2009; Kauppi, S., *et al.*, 2011), en la Tabla 3, se observan las cantidades de urea aplicada en gramos, estos fueron diluidos en agua destilada con un agitador y una plancha agitadora, se dejó reposar hasta temperatura ambiente y se adiciono a los mesocosmos, esta adición se realizo solo al inicio de la investigación.

Tabla 3. Gramos de Urea aplicada

MESOCOSOS	ESTRATEGIA	%N1*	UREA (g)	% N2*
2 Sedimento + nutriente	Bioestimulación (Urea, H <sub>2</sub> O y Aire)	0,09	223,8	0,12
4 Sedimento + nutriente (Replica)		0,07	207,21	0,13
6 Sed + suelo Microo + nutriente	Bioaumentación (Microorganismos)	0,07	141,33	0,18
8 Sed + suelo Microo + nutriente (Replica)		0,06	175,40	0,1

Fuente: Elaboración de este estudio.

\*%N1: porcentaje de Nitrógeno inicial.

\*%N2: porcentaje de Nitrógeno final.





**Figura 5.** Nutriente aplicado a los Mesocosmos.

Finalmente se contó con el montaje de los mesocosmos que se utilizaron en la investigación, se manejaron volúmenes de sedimentos de 21,09 litros a tratar en los mesocosmos, se tomaron muestras de cada mesocosmo y se les halló la densidad, para determinar el peso de cada uno de ellos, estos datos son presentados en la Tabla 4 (ANEXO B).

**Tabla 4.** Volumen, densidad y peso, tratado en los mesocosmos

MESOCOSOS	VOLUMEN SEDIMENTO	VOLUMEN SUELO	DENSIDAD MESOCOSMO (g/ml)	PESO (Kg)
1 Sedimento	21,09 litros	0	1,9	40,2
2 Sedimento + nutriente			1,8	38,1
3 Sedimento (Replica)			1,6	33,5
4 Sedimento + nutriente (Replica)			1,8	38,1
5 Sed + suelo Microorganismos	12,65 litros	8,43 litros	2,0	42,4
6 Sed + suelo Microo + nutriente			1,9	40,6
7 Sed + suelo Microorganismos (Replica)			2,0	42,8
8 Sed + suelo Microo + nutriente (Replica)			1,9	40,3

Fuente: Elaboración de este estudio.



**Figura 6.** Mesocosmos.

A los mesocosmos se les adicionó agua, tres veces por semana, con el fin de mantener la humedad necesaria para el proceso de degradación que llevan a cabo los microorganismos, ya que estos, pueden acceder más fácilmente al contaminante en estado acuoso; para ello se realizó una prueba de capacidad de campo siguiendo la metodología propuesta por Ochoa, E., en el año 1999, (ANEXO C), con el fin de establecer la cantidad necesaria de agua, que permitiera mantener en los mesocosmos, un porcentaje de humedad entre el 20% y 30% (Figura 7 y 8). El sedimento presentó un porcentaje de capacidad de campo de 25,57% y la mezcla del sedimento y el suelo con microorganismos adaptados fue del 22,18%, estas capacidades de campo corresponde a suelos con texturas franco limosas (Ochoa, E., 1999), a estos mesocosmos también se les realizó un volteo manual tres veces por semana para incrementar el contenido de oxígeno.



**Figura 7.** Prueba de capacidad de Campo.

**Tabla 5.** Cantidad de agua aplicada y volteos manuales a los mesocosmos.

DIAS A LA SEMANA	ACTIVIDAD	CANTIDAD DE AGUA
Lunes	A todos los mesocosmos se les adición agua y volteo manual	600 ml
Miércoles		600 ml
Viernes		1000 ml

Fuente: elaboración de este estudio

**Figura 8.** Volteo manual y aplicación de agua.

En cada evento de muestreo, se utilizaron guantes de látex desechables, palas de jardinería, las cuales de un mesocosmos a otro se enjuagaban previamente con agua y una esponja, para evitar contaminación cruzada, se realizaba el volteo manual y se tomaba sedimento de puntos aleatorios dentro de cada mesocosmo con la pala aproximadamente 20g hasta alcanzar unos 100 a 160g, muestra compuesta, para los diferentes análisis de laboratorio.

### 8.3 SEGUIMIENTO DE LOS MESOCOSMOS

Los análisis realizados en esta investigación:

Temperatura: termómetro de esfera o termómetro de sondeo. (Zagal, E., y Sadzawka, A., 2007).

pH: mezcla de suelo y agua, luego se utiliza un electrodo y/o pHmetro (Zagal, E., y Sadzawka, A., 2007). Se toman 30 ml de suelos en pasta Saturada, se le agregan 60 ml de agua destilada se agita durante una hora y se hace lectura. Directamente sobre la suspensión.

Humedad: método gravimétrico. (Zagal, E., y Sadzawka, A., 2007).

$$\%h = \frac{P_i - P'}{P'}$$

%h= porcentaje de Humedad

P<sub>i</sub>= Peso inicial (g)

P' = peso seco en estufa a 110°C por 24 horas (g)

Bacterias Hidrocarbocíclicas: Se uso el método de recuento en placa profunda por triplicado, ya que al inicio de la investigación se comparo esta técnica con un ensayos con tubos, presentando mejores resultados el recuento en placa, esta es una técnica tradicional que cuantifica el numero de microorganismos presentes en el suelo, inicialmente de una muestra de suelo fragmentada manualmente para disgregar los gránulos más grandes, se pesaron 10 g de suelo y se diluyeron en 90 ml de agua estéril, esta mezcla se agitó durante 15 min y a partir de esta dilución ( $10^{-1}$ ) se prepararon diluciones seriadas, se utilizo diesel comercial previamente esterilizado, para recrear una atmósfera saturada de hidrocarburo en las cajas, se utilizaron discos de papel craft estériles, impregnados con diesel y ubicados en la tapa de la caja de petri, las bacterias fueron cultivadas en agar nutritivo e incubadas a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 h (Yanine, H., 2010), los resultados de las bacterias degradadoras de hidrocarburos fueron en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/gss), estas pruebas fueron realizadas por Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos, de la vicerrectora de Investigaciones, de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Hidrocarburos totales: se realizó mediante extracción por reflujo soxhlet, empleando hexano como disolvente, este método de extracción asegura el contacto de la matriz de la muestra con el disolvente, para la óptima extracción de los compuestos el suelo se seco se pulverizo en partículas pequeñas, para asegurar un mejor contacto, se evaporó el solvente la final de la prueba y el extracto se cuantifico gravimétricamente (EPA 3540C., 1996).

Las pruebas de % Nitrógeno, % de materia Orgánica, fosforo y potasio, fueron enviadas al laboratorio de Análisis de Suelos, Facultad de Tecnología, Programa de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira (Tabla 7).

Para este fin se realizaron los siguientes análisis desde el inicio de los montajes experimentales, a través del tiempo de la investigación (6 meses):

**Tabla 6.** Análisis de características físicas:

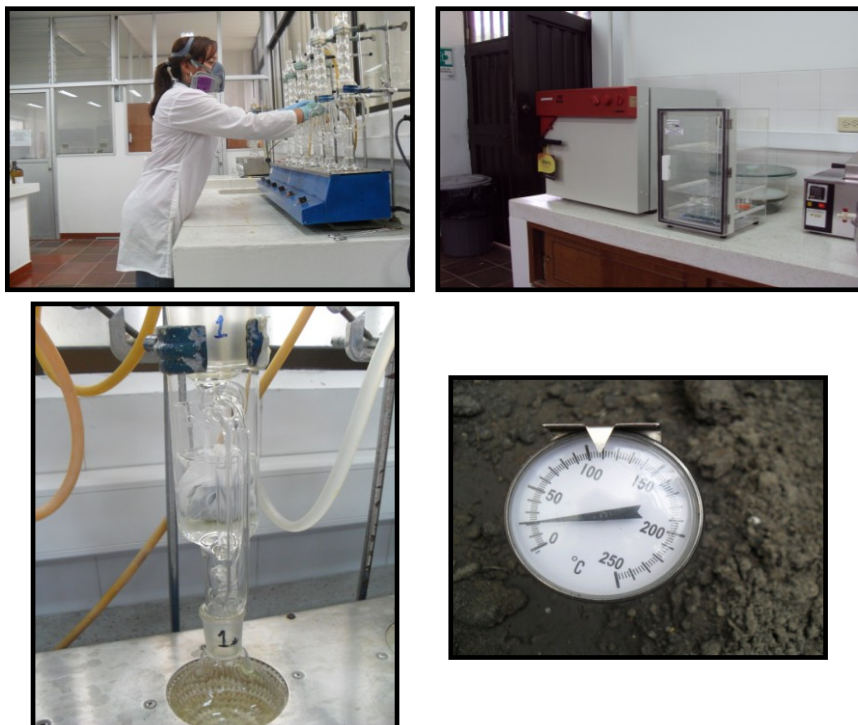
ANÁLISIS	MÉTODO	FRECUENCIA	LABORATORIO
Temperatura	Termómetro	Estas características se midieron una vez a la semana	Mediciones directas en los mesocosmos
pH	pHmetro (1 suelo:2 agua)		Laboratorio de Procesos, Facultad de Ciencias Ambientales UTP
Humedad	Método Gravimétrico		

Fuente: elaboración de este estudio

**Tabla 7.** Análisis a los parámetros químicos, contenido de nutrientes:

ANÁLISIS	MÉTODO	FRECUENCIA	LABORATORIO
% Nitrógeno	Semimicro-Kjeldahl	Una vez al mes	Laboratorio de Análisis de Suelos, Facultad de Tecnología, Programa de Tecnología Química, UTP
% Materia Orgánica (Carbono Orgánico total)	Walkley-Black		
Fósforo (p.p.m)	Bray y Kurtz II		
Potasio (meq/100g suelo)	Acetato de Amonio Absorción Atómica		
Bacterias Hidrocarbocíclicos	Recuento en Placa profunda por triplicado		
Hidrocarburos totales	Extracción por Soxhlet Método gravimétrico	Cada 15 días	Laboratorio de Procesos, Facultad de Ciencias Ambientales, UTP

Fuente: elaboración de este estudio.



**Figura 9.** Análisis de Laboratorio.

#### 8.4 DETERMINACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN

Para este fin se realizó un análisis de los parámetros medidos en la investigación y el comportamiento de las estrategias de Bioaumentación y Bioestimulación, deduciendo así cuál de las dos estrategias, degrada mayor cantidad de hidrocarburos en el tiempo, evaluando la condiciones más favorables, definiendo cual estrategia es más apropiada para tratar los sedimento contaminados con hidrocarburos de la estaciones de servicio de combustible y así poder recomendar una de las estrategias, para el manejo de datos en esta investigación, se utilizó Microsoft Office Excel 2007 y el programa SSPS 17 para el análisis Estadístico.

## 9 RESULTADOS Y DISCUSION

### 9.1 CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LOS SEDIMENTOS

Las características físicas, químicas y biológicas iniciales de los sedimentos de los mesocosmos, utilizados en esta investigación se presentan en la Tabla 8. La mezcla del sedimento, con el suelo con microorganismos adaptados, presentaron una concentración de hidrocarburos totales de 17.636,68 mg HTP/kg suelo seco y los sedimento de la EDS Integra, presentaron una concentración de hidrocarburos de 18.238,68 mg HTP/kg suelo seco.

**Tabla 8.** Parámetros iniciales de los mesocosmos

PARÁMETROS	1 Sed	2 SN	3 Sed replica	4 SN replica	5 SSM	6 SSMN	7 SSM Replic a	8 SSMN Replic a
Temperatura (°C)	19	20	19	20	20	19	20	19
pH (unidades)	7,55	7,53	7,22	7,39	7,46	7,8	7,4	7,15
% humedad	23,7	24,7	25,0	23,1	23,9	20,3	20,9	24,9
Microorganismos hidrocarbocíclicos (U.F.C/g)	6,7E+ 06	1,60E+ 07	1,00E+ 06	5,80E+ 06	1,10E+ 07	1,70E+ 07	1,90E+ 07	5,60E+ 06
HTP mg/kgss	18238,68				17636,51			
% Nitrógeno	0,07	0,09	0,04	0,07	0,07	0,07	0,08	0,06
% Materia Orgánica	2,2	3,6	3,1	3,2	3,5	2,3	3,8	2,6
Fósforo (p.p.m)	12	10	24	12	14	31	34	28
Potasio (meq/100g Suelo)	0,29	0,31	0,3	0,25	0,39	0,38	0,4	0,38
Textura	FRANCO LIMOSO (Ochoa, E., 1999)							

Fuente: elaboración de este estudio.

Bioestimulación: Sed: Sedimento contaminado.

SN: Sedimento más Nutriente.

Bioaumentación: SSM: Sedimento más Suelo con Microorganismos.

SSMN: Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente.

De acuerdo con estos parámetros los sedimentos de cada mesocosmos, presentan buenas características, la temperatura se encuentra dentro del rango optimo 18 y

30°C, que permite la actividad enzimática y intercambio celular (Gómez, S., *et al.*, 2008), el pH se encontró entre 7,15 y 7,8 unidades, este intervalo es adecuado para el crecimiento de bacterias, rango óptimo entre 6,0 y 8,0 unidades (Ríos, R., 2005), la humedad se encuentra entre el orden del 20% - 75% de la capacidad de campo, que es importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula (Gómez, S., *et al.*, 2008).

El resultado de la población inicial de bacterias hidrocarbocíclicas, presentaron valores típicos de suelos contaminados con microorganismos adaptados, según Atlas, R., y Unterman, R., 1999, las poblaciones de bacterias degradadoras en suelos no contaminados varía de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  y para los contaminado de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  U.F.C/g. El conteo de bacterias hidrocarbocíclicas observadas en los mesocosmos están entre  $1 \times 10^6$  a  $1,9 \times 10^7$  U.F.C/g correspondientes a poblaciones altas, que se podrían considerar como adaptadas, típicas de suelos con presencia de hidrocarburos. De acuerdo con las recomendaciones reportadas en la literatura estos niveles corresponden a suelos con un alto potencial de biodegradación (Ríos, R., 2005).

En cuanto a los nutrientes, todavía no se cuenta con información precisa o con clasificaciones generalizadas de rangos óptimos para cada parámetro, que se relacione con un buen resultado de degradación de hidrocarburos, en cambio se habla de las relaciones de C:P:N necesarias con que debe contar el suelo, para su biorremediación, esta relación debe estar en un rango normal de 100:2:0,4 a 100:10:2, que beneficia los procesos de metabolismo microbiano (Vallejo, V., *et al.*, 2005, Gómez, S., *et al.*, 2008), para esta investigación se realizó un análisis de laboratorio antes y después de la adición del nutriente con el fin de hallar esta relación en el suelo de estudio.

**Tabla 9.** Relación de C:N:P:K

Nominación	Inicio C:N:P:K	después de la aplicación de Urea C:N:P:K
Sedimento Contaminado	100:1:0,03:0,3	100:8:0,2:0,3
Sed + suelo Microorganismos	100:3:0,13:0,6	100:10:0,4:0,6

Fuente: Elaboración de este estudio.

De acuerdo con estos datos, los mesocosmos se encuentran entre el rango descrito como adecuado para llevar a cabo procesos de degradación, con estas

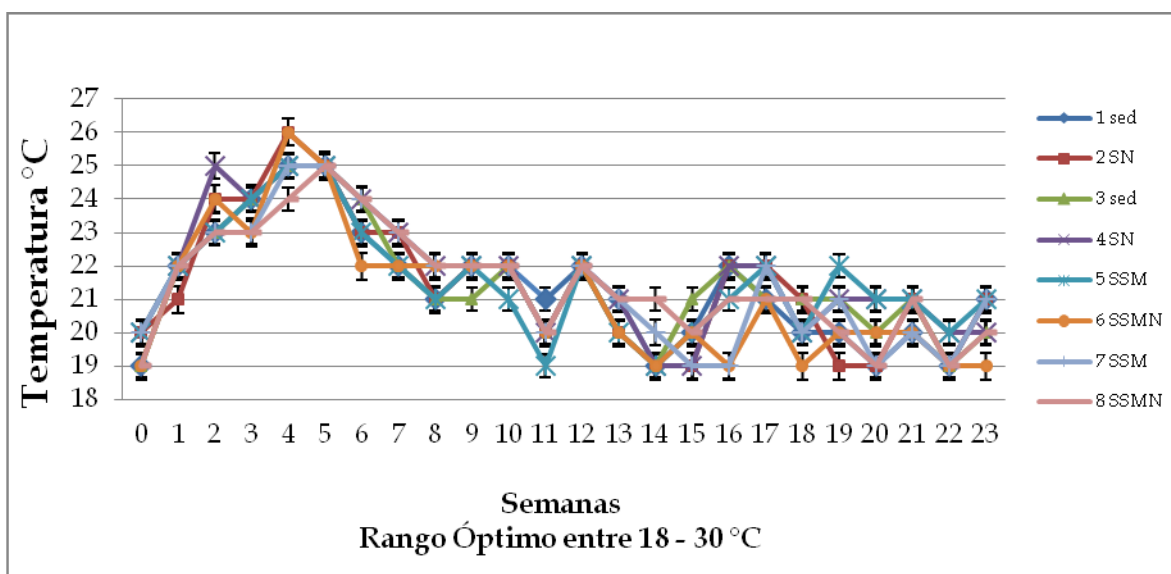


características se inicio el proceso de bioaumentación y bioestimulación en esta investigación.

## 9.2 TEMPERATURA

El metabolismo de los microorganismos, la actividad enzimática y celular dependen de la temperatura, así mismo esta influye en los cambios estructurales y químicos del petróleo.

A bajas temperaturas, la viscosidad de los compuestos de hidrocarburo incrementan y sus componentes tóxicos de bajo peso se reducen, retrasando el proceso de biodegradación, el rango optimo es de 18 a 30°C. (Gómez, S., *et al.*, 2008; Atlas, R., 1996., Levin, M., y Gealt, M., 1997)



**Gráfica 1.** Comportamiento Temperatura, 24 datos y barras de error=1DS

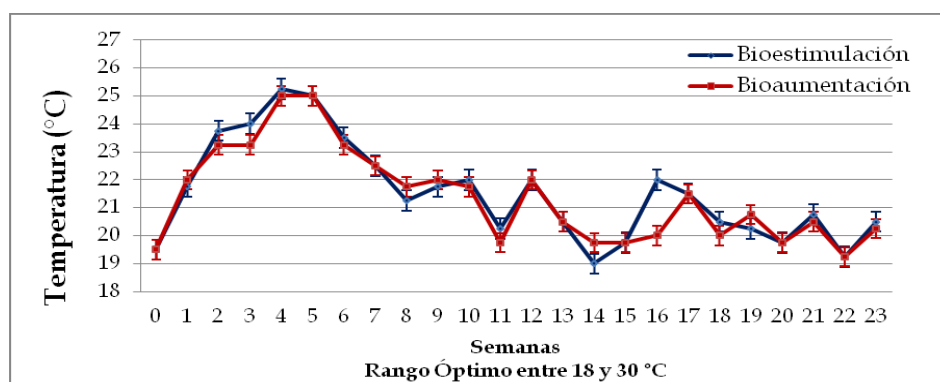
Sed: Sedimento contaminado.

SN: Sedimento más Nutriente.

SSM: Sedimento más Suelo con Microorganismos.

SSMN: Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente.

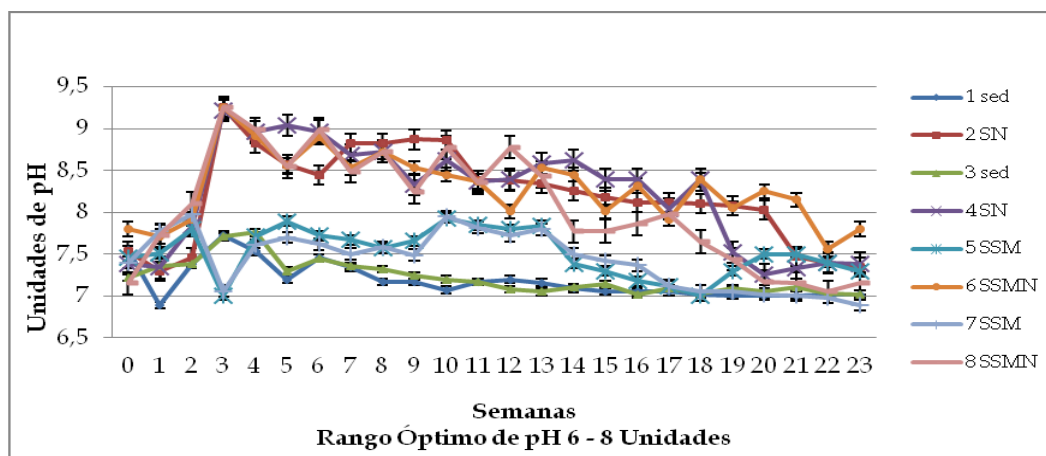
La temperatura presentó para todos los mesocosmos un aumento entre las primeras cinco semanas, alcanzando temperaturas de 26°C para los mesocosmos 2SN: Sedimento contaminado más Urea y 6 SSMN Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados mas Urea, para los demás mesocosmos fue de 25°C, este comportamiento se atribuye a la actividad microbiana dentro de los mesocosmos, luego descendió y se estabilizo en la semana once, en un rango entre 19°C y 22°C, las temperaturas promedio de los ocho mesocosmos fueron de 21°C en el tiempo de la investigación (ANEXO D).



**Gráfica 2.** Promedio Comportamiento Temperatura, para las estrategias Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS

### 9.3 pH

Este parámetro es importante para la actividad enzimática y para el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el rango óptimo está entre 6 - 8 unidades, para los procesos de biorremediación, Valores de pH inferiores a 6 unidades (ácidos) inhiben el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos, lo mismo pasa con valores mayores de 8 unidades (alcalinos) (Ritter, W., y Scarborough, 1995., Mehrasbi, M., *et al.*, 2003., Vallejo, V., *et al.*, 2005).



**Gráfica 3.** Comportamiento pH, 24 datos y barras de error=1DS

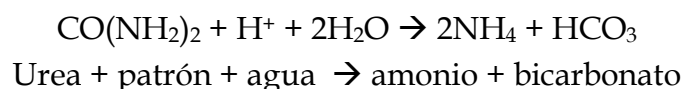
Sed: Sedimento contaminado.

SN: Sedimento más Nutriente.

SSM: Sedimento más Suelo con Microorganismos.

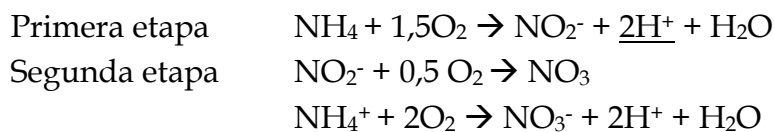
SSMN: Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente.

Se observa que dentro de las tres primeras semanas se aumento en casi dos unidades el pH para los mesocosmos a los cuales se les adicionó nutriente en los mesocosmos 2 SN y 4 SN: Sedimento contaminado más Urea, los mesocosmos 6SSMN y 8 SSMN: Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados mas Urea, esto puede atribuirse a que suelos con pH mayores a 6,3 unidades, cuando se les agrega Urea, sufren procesos de hidrólisis:

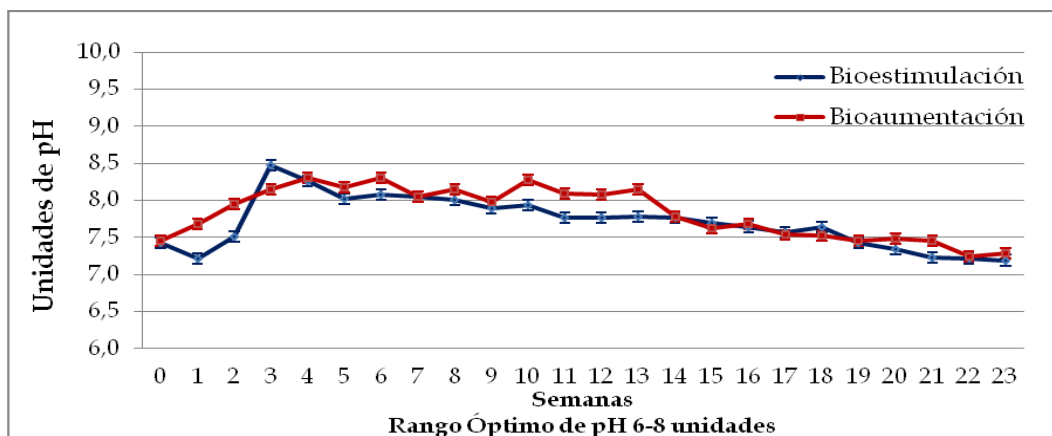


La Hidrólisis genera un incremento significativo del pH, ya que consume protones, a lo largo de la investigación a los mesocosmos que se adicionó la Urea manejaron notablemente unos valores por encima, con respecto a las que no se les adicionó (1Sed y 3sed: Sedimento, 5 SSM y 7 SSM: Sedimento más suelo con microorganismos adaptados). Los mesocosmos que contaban con nutriente manejaron valores de pH entre 9,26 y 7,05 Unidades, con promedios de 8,2 unidades, para los demás mesocosmos, los rangos fueron entre 7,98 y 6,89 unidades de pH, con promedios de 7,3 unidades, esto puede ser causado por la adición de Urea como nutriente y este puede llegar a alcalinizar el sedimento de los mesocosmos (Vallejo, V. *et al.*, 2005), con el paso de las semanas se presentó una

reducción de este valor para estos mesocosmos entre el 7,05 y 7,5 unidades de pH, esta reducción se debe a la fijación y asimilación del nitrógeno, las bacterias oxidan el amonio y lo convierten en nitritos y nitratos, esta oxidación reduce el pH con el tiempo (Rodríguez, L., 2008) (ANEXO D), el proceso de oxidación es:



La presencia de hidrocarburos en suelo, durante largos periodos, puede producir la variación del pH original del suelo, esto posiblemente por la producción de  $\text{CO}_2$  (Mehrasbi, M., *et al.*, 2003).



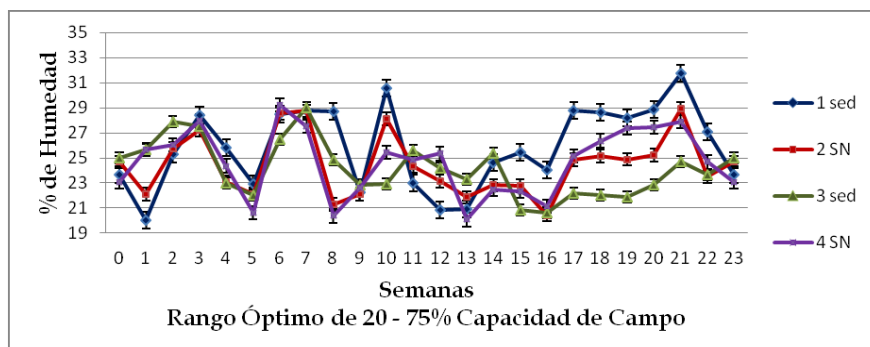
**Gráfica 4.** Promedio Comportamiento pH, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS

#### 9.4 HUMEDAD

Los microorganismos toman los nutrientes necesarios para su crecimiento de la fase líquida, el agua es un medio de transporte a través del cual los componentes orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células a menor humedad en el suelo se pueden generar zonas secas con baja actividad microbiana, a mayor humedad se puede inhibir el intercambio de gases y da como resultado zonas anaerobias (Si-Zhong, Y., *et al.*, 2009, Ruberto, L., *et al.*, 2003).

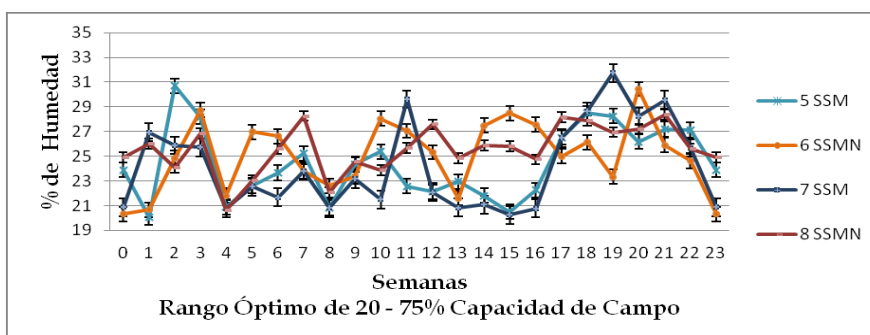
El contenido óptimo de humedad se mide en relación a la capacidad de campo del suelo, la cual se refiere al agua que queda en el suelo después de drenar libremente entre este, esta capacidad de campo varía según la textura del suelo (Si-Zhong, Y., *et al*, 2009).

La capacidad de campo del sedimento se calculo con diferencias de pesos y de cantidades conocidas de agua aplicadas al sedimento y a la mezcla del sedimento con el suelo con microorganismos adaptados, dando los siguientes resultados, el porcentaje de capacidad de campo para el sedimento fue 25,57% y el porcentaje de capacidad de campo para la mezcla del sedimento con el suelo es de 22,18% (ANEXO C), estos porcentajes se han tratado de mantener en el tiempo de la investigación, con la aplicación del agua necesaria para cada mesocosmos.



**Gráfica 5.** Comportamiento Porcentaje de Humedad, mesocosmos bioestimulación, 24 datos y barras de error=1DS.

Sed: Sedimento contaminado; SN: Sedimento más Nutriente.

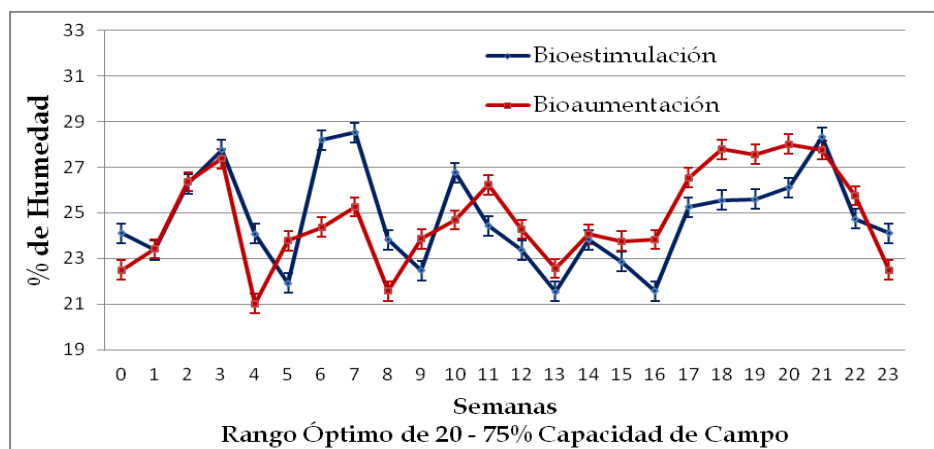


**Gráfica 6.** Comportamiento Porcentaje de Humedad, mesocosmos bioaumentación, 24 datos y barras de error=1 DS.

SSM: Sedimento más Suelo con Microorganismos.

SSMN: Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente.

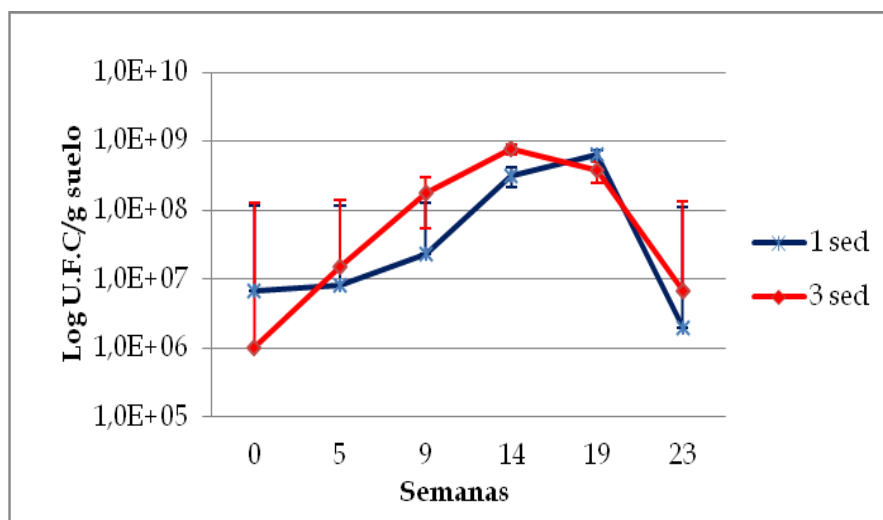
A lo largo de la investigación se realizó riego a los mesocosmos, tratando de mantener el porcentaje de humedad en el rango óptimo para mejorar la toma de nutrientes para el crecimiento microbiano, los mesocosmos mantuvieron una humedad entre al 20 y 31,7%, Sin embargo, como puede observarse en las gráficas 5 y 6 la actividad de agua se mantuvo constante en este rango, durante todo el proceso, se presentaron fluctuaciones de este parámetros en los mesocosmos, esto atribuible a las condiciones climáticas de la zona.



**Gráfica 7.** Promedio Comportamiento Porcentaje de Humedad, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 24 datos y barras de error=1DS.

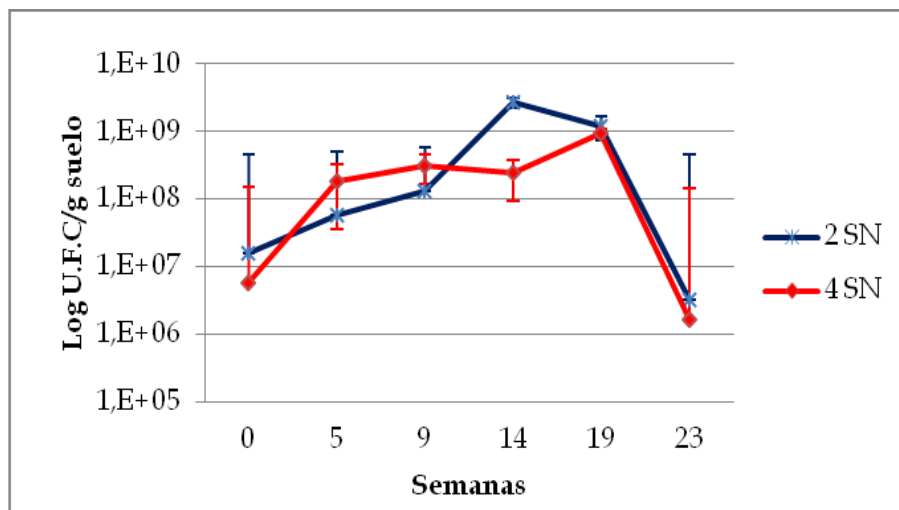
### 9.5 PRESENCIA DE MICROORGANISMOS

Se realizaron análisis microbiológicos cada mes para la presencia de Bacterias Hidrocarbocíclicas, con el método de recuento en placa profunda por triplicado, dando los siguientes resultados para cada mesocosmos. Las bacterias tienen un crecimiento muy rápido y una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminado, lo que incrementa la probabilidad de éxito en la biodegradación del hidrocarburo (Velasco, N., 2004).



**Gráfica 8.** Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 1 sed y 3 sed: Sedimento contaminado (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

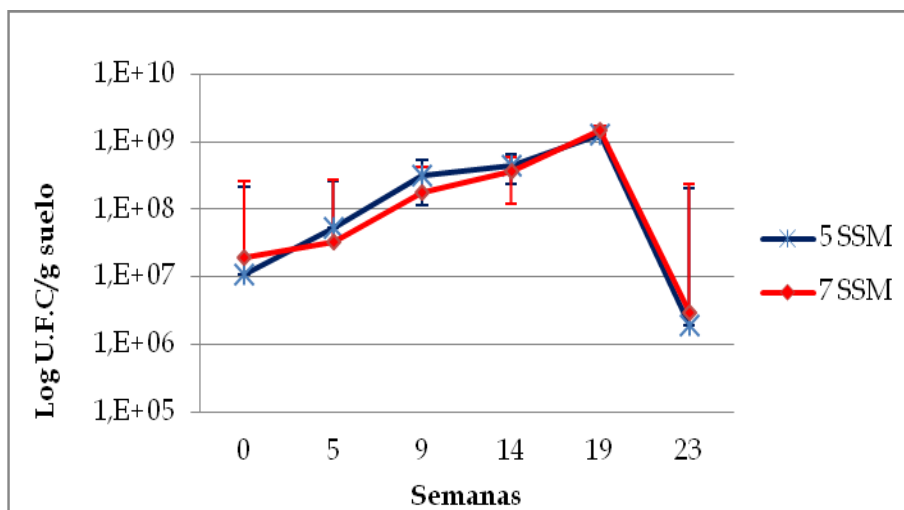
El comportamiento de los microorganismos hidrocarbocíclicos para estos mesocosmos mostro un crecimiento favorable gran parte del tiempo de la investigación, el mesocosmo 1 Sed: sedimento contaminado, inicio con una población del  $6,7 \times 10^6$  U.F.C./g, llegando a un máximo de  $3,8 \times 10^8$  U.F.C./g en la semana diecinueve, el mesocosmo 3 Sed: sedimento contaminado, inicio con una población de bacterias de  $1,0 \times 10^6$  U.F.C./g, llegando a en la semana catorce a  $7,8 \times 10^8$  U.F.C./g, los dos mesocosmos manejaron promedios de  $1,67 \times 10^8$  U.F.C./g y  $2,27 \times 10^8$  U.F.C./g, respectivamente, mostrando entre sí tendencias muy similares en cuanto al recuento de bacterias hidrocarbocíclicas, esto indica que el sedimento contaba con una buena población bacteria para llevar a cabo el proceso de degradación. (ANEXO D).



**Gráfica 9.** Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 2 SN y 4 SN: Sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

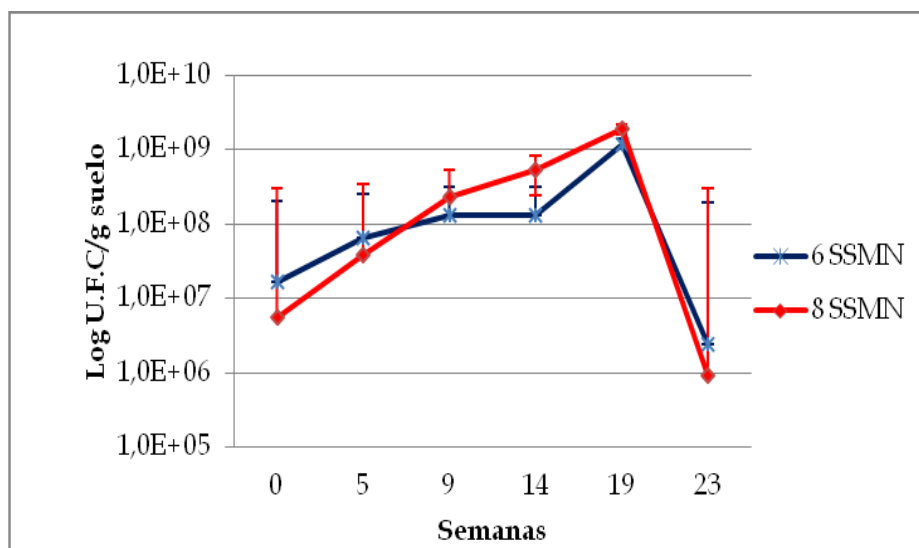
Para estos mesocosmos el comportamiento de los microorganismos mostro un crecimiento en su población en la mayor parte del tiempo de la investigación, el mesocosmo 2 SN: Sedimento contaminado más Urea, inicio con una población del  $1,6 \times 10^7$  U.F.C/g, llegando a un máximo de  $2,7 \times 10^9$  U.F.C/g en la semana catorce, el mesocosmo 4 SN: Sedimento contaminado más Urea, inicio con una población de bacterias de  $5,8 \times 10^6$  U.F.C/g, llegando a en la semana diecinueve a un máximo de  $9,6 \times 10^8$  U.F.C/g, los dos mesocosmos manejaron promedios de  $6,85 \times 10^8$  U.F.C/g y  $2,83 \times 10^8$  U.F.C/g, respectivamente, mostrando proyecciones similares en cuanto a las poblaciones de estas bacterias, comparando los datos con los del sedimento solo en la quinta semana, se evidencia que el aplicar el nutriente hizo que se desarrollaran mas bacterias creando una buena población para la degradación del hidrocarburo. (ANEXO D).





**Gráfica 10.** Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 5 SSM y 7 SSM:60% Sedimento contaminado más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

En estos mesocosmos, el comportamiento de la población de las bacterias hidrocarbocíclicas mostro un crecimiento constante en su población en la mayor parte del tiempo de la investigación, el mesocosmo 5 SSM: Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados, inicio con una población del  $1,1 \times 10^7$  U.F.C/g, llegando a un máximo de  $1,3 \times 10^9$  U.F.C/g en la semana diecinueve, el mesocosmos 7 SSM: Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados, inicio con una población de bacterias de  $1,9 \times 10^7$  U.F.C/g, llegando a la semana diecinueve a un máximo de  $1,5 \times 10^9$  U.F.C/g, los dos mesocosmos manejaron promedios de  $3,54 \times 10^8$  U.F.C/g y  $3,49 \times 10^8$  U.F.C/g, respectivamente. Estos mesocosmos mostraron proyecciones muy similares en cuanto a las poblaciones de bacterias a través del tiempo, comparando este comportamiento con los datos de los anteriores mesocosmos, se evidencia que estos iniciaron con una mayor población de bacterias lo que indica que el suelo contenía bacterias ya adaptadas a hidrocarburos, que no fueron afectadas por esta mezcla. (ANEXO D).



**Gráfica 11.** Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, mesocosmos 6 SSMN y 8 SSMN: 60% Sedimento contaminado, más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

Para estos mesocosmos, el comportamiento de la población de las bacterias hidrocarbocíclicas mostro un crecimiento constante en su población en la mayor parte del tiempo de la investigación, el mesocosmos 6 SSMN: Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados más Urea, inicio con una población del  $1,7 \times 10^7$  U.F.C/g, llegando a un máximo de  $1,2 \times 10^9$  U.F.C/g en la semana diecinueve, el mesocosmos 8 SSMN: Sedimento contaminado más suelo con microorganismos adaptados más Urea, inicio con una población de bacterias de  $5,6 \times 10^6$  U.F.C/g, llegando a en la semana diecinueve a un máximo de  $1,9 \times 10^9$  U.F.C/g, los dos mesocosmos manejaron promedios de  $2,57 \times 10^8$  U.F.C/g y  $4,52 \times 10^8$  U.F.C/g, respectivamente. Estos presentaron comportamientos muy similares en cuanto al desarrollo de las poblaciones de bacterias a través del tiempo, este comportamiento indica un buen desarrollo de las bacterias para el proceso de degradación. (ANEXO D).

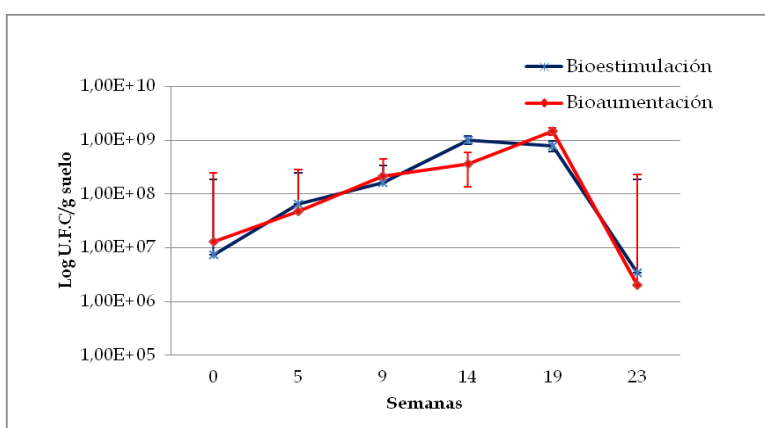
Todos los mesocosmos, mostraron una gran presencia de bacterias hidrocarbocíclicas, que son responsables de la degradación de los hidrocarburos, las poblaciones presentes permiten confirmar que el sedimento por si solo cuenta con una población propia adaptada a condiciones de pH, temperatura y alto contenido de hidrocarburos, que favoreciéndola con aireación frecuente y la

adición de agua, esta población se puede mantener y estimular favoreciendo la degradación de los compuestos de hidrocarburos.

Se puede evidenciar poblaciones bacterianas un poco más altas en los mesocosmos, a los cuales se les adicionó nutriente, esto puede ser atribuido al buen manejo de la relación C:N:P:K que permitió su desarrollo y crecimiento a comparación de los demás mesocosmos, aunque en todos el comportamiento de estas poblaciones fue bueno.

Con respecto a las poblaciones de microorganismos, los mesocosmos que contenían sedimento contaminado y se les realizó la bioestimulación, contra los mesocosmo que se les mezcló sedimento contaminado con suelo con microorganismos adaptados, en el proceso de bioaumentación, se evidencio un desarrollo muy similar a través del tiempo de estas poblaciones de bacterias hidrocarbocíclicas.

Los mesocosmos presentaron mayores poblaciones en la semana diecinueve, esto puede llevar a deducir que para las características que se manejaron en la zona de estudio, con los sedimentos resultantes de las actividades de la estación de servicio de combustible, con una buena estimulación de la población nativa y sin la técnica de bioaumentación, será suficiente para llevar a cabo un buen proceso de degradación de hidrocarburos (Viñas, M., *et al.*, 2002).

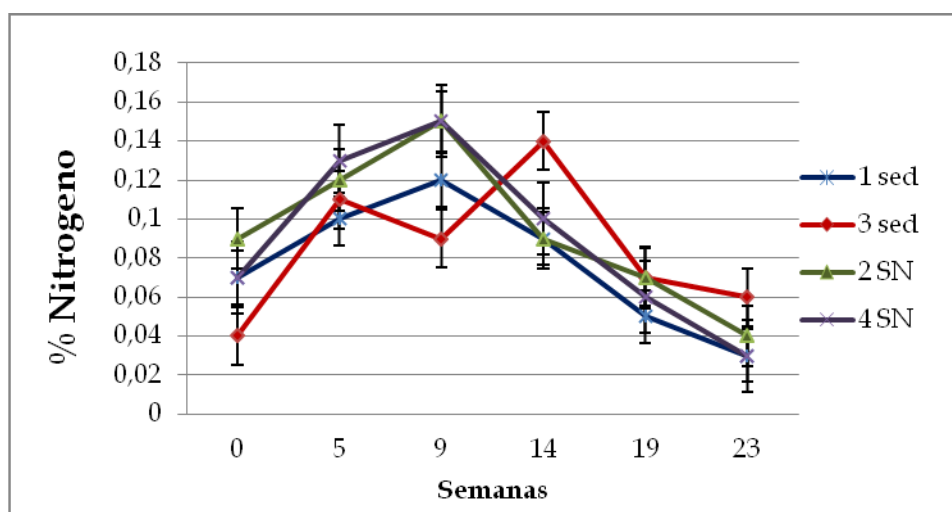


**Gráfica 12.** Promedio Comportamiento recuento de Bacterias Hidrocarbocíclicas, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.

9.6 COMPORTAMIENTO DE NUTRIENTES

9.6.1 Nitrógeno

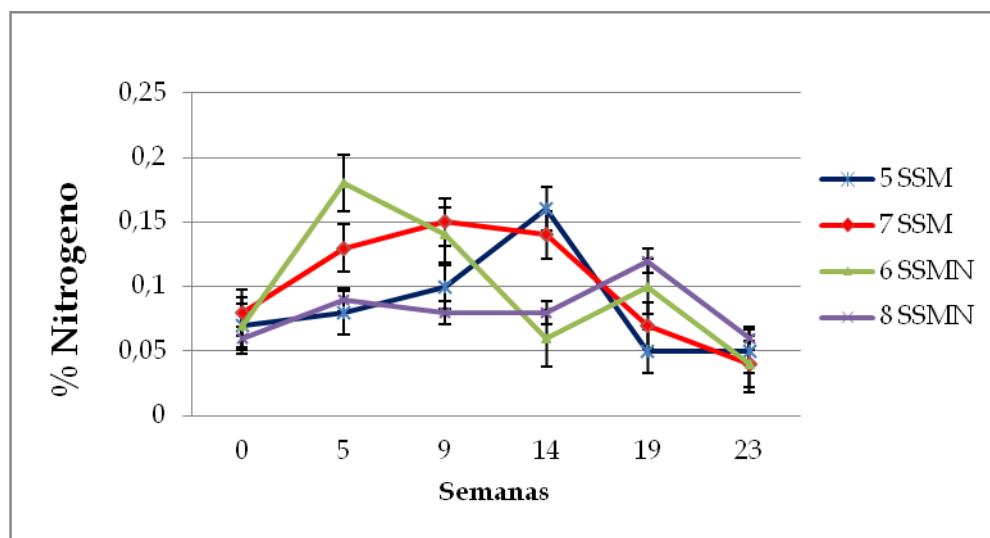
El Nitrógeno (N), elemento necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleídos y otros constituyentes celulares (Gómez, S., *et al.* 2008).



**Gráfica 13.** Comportamiento Nitrógeno, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

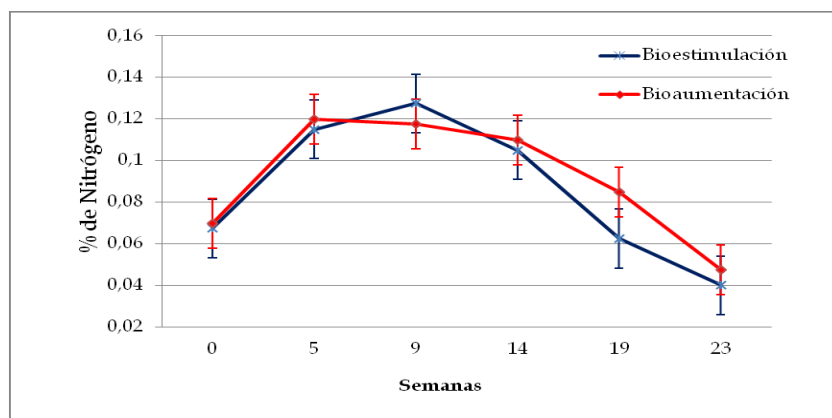
En los mesocosmos de sedimento contaminado de la estación de servicio, comparando con los mesocosmos a los cuales se les adicionó nutriente (Urea), se encontró un comportamiento similar a través del tiempo de la investigación, los valores más altos de nitrógeno se encontraron en los mesocosmos a los cuales se les adicionó el nutriente (urea), el mesocosmos 2 Sed: Sedimento mas Urea y 4 Sed: Sedimento mas Urea replica, con un valor del 0,15%, en la semana nueve, la concentración de nitrógeno aumento significativamente en las primeras catorce semanas, este incremento puede ser debido a un proceso de nitrificación, llevado a cabo por los microorganismos a partir del nitrógeno presente en cada mesocosmos (Vallejo, V., *et al.*, 2005), durante este periodo se presentaron las mayores

reducciones en la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (ANEXO D).



**Gráfica 14.** Comportamiento Nitrógeno, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSMN sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

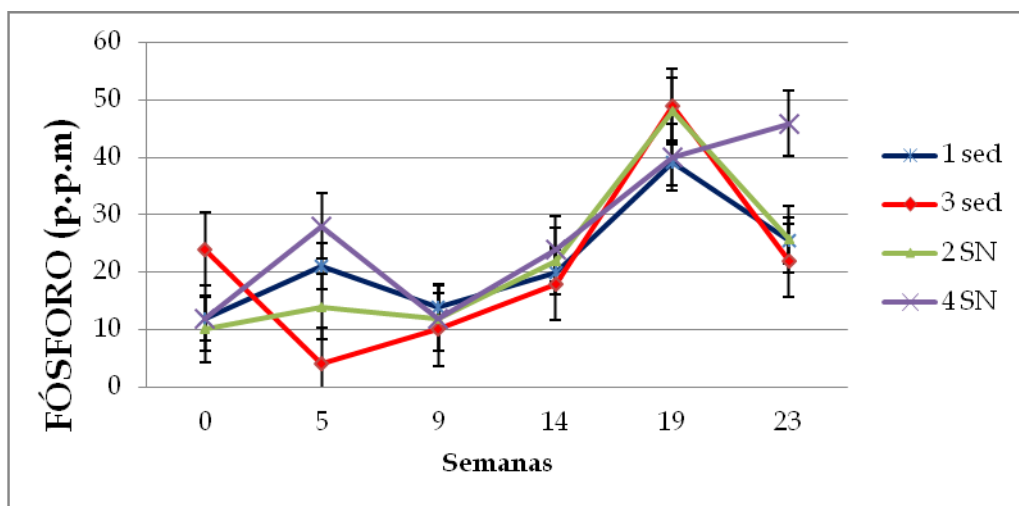
Para estos mesocosmos, en los cuales se encontraba la mezcla del sedimento contaminado con suelo con microorganismos adaptados y la aplicación de nutriente, se evidencian comportamientos diferentes en el contenido de nitrógeno, esto puede estar atribuido al metabolismo de las bacterias, a la inmovilización de biomasa e inmovilización de coloides del suelo y a la incorporación de la biomasa microbiana (Si-Zhong, Y., *et al*, 2009), se presentaron reducciones en su concentración para todos los mesocosmos al final de los monitoreos, las concentraciones más altas se dieron en la semana cinco para el mesocosmos 8 SSMN: Sedimento más suelo con microorganismos adaptados más Urea replica con un valor de 0,18 % y para la semana catorce para el mesocosmos 5 SSMN: Sedimento más suelo con microorganismos adaptados con 0,16% (ANEXO D).



**Gráfica 15.** Promedio Comportamiento Nitrógeno, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.

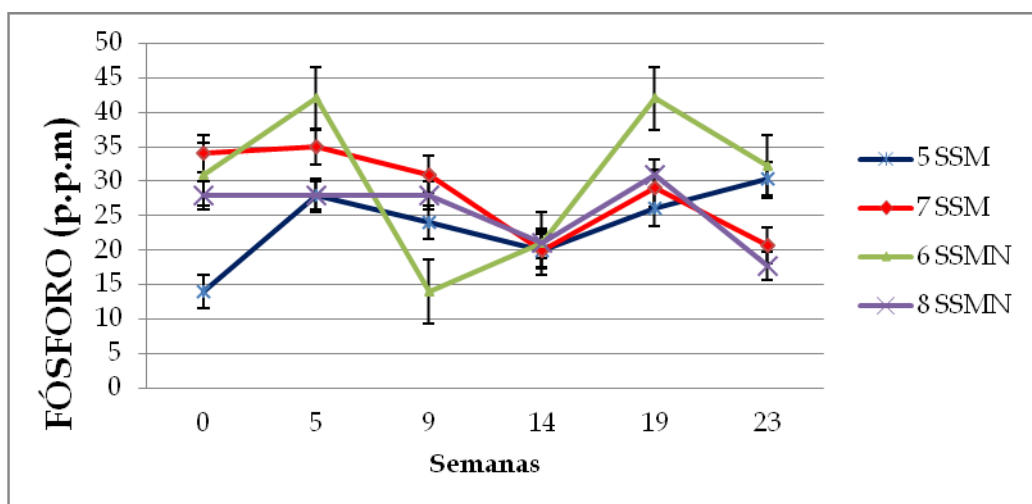
### 9.6.2 Fósforo

El fósforo (P) interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de las células y es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación (Gómez, S., *et al*, 2008).



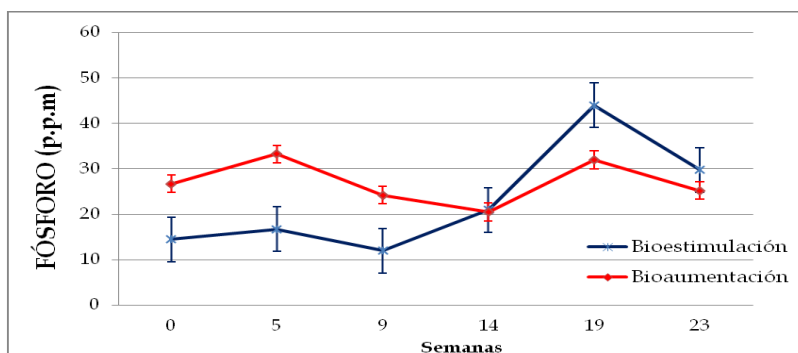
**Gráfica 16.** Comportamiento Fósforo, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

Para estos mesocosmos se presentaron las mayores concentraciones de Fósforo, en el mesocosmos 2SN: Sedimento más urea y el 3 SN: sedimento replica, con valores de 48 p.p.m y 49 p.p.m respectivamente en la semana diecinueve el comportamiento a través del tiempo para los diferentes mesocosmos fue similar, el incremento del fósforo en los mesocosmos puede ser debido a una liberación de fosfatos en los procesos de metabolismo microbiano y del decaimiento de la población microbiana (Si-Zhong, Y., *et al*, 2009). (ANEXO D).



**Gráfica 17.** Comportamiento Fósforo, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

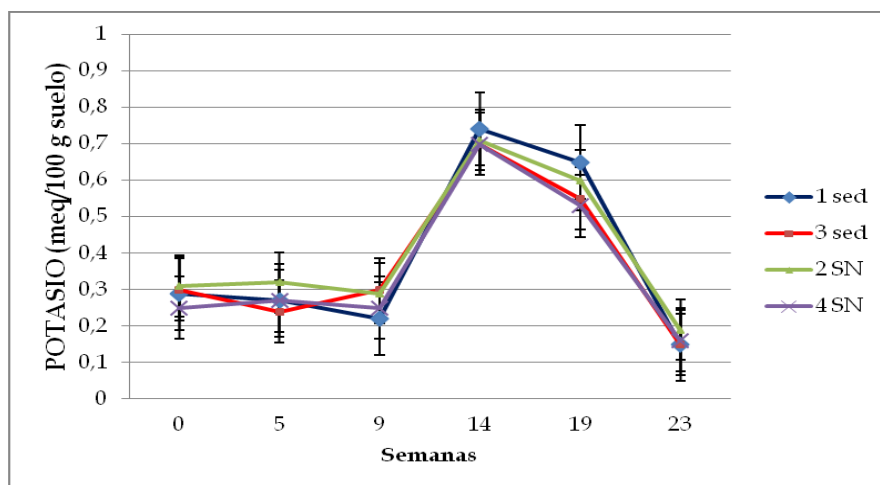
El comportamiento del Fósforo para estos mesocosmos, que contaban con la mezcla del sedimento con el suelo con microorganismos adaptados fue diferente con los otros mesocosmos (1Sed, 2SN, 3Sed y 4SN), ya que en estos se presentó una reducción significativa en la semana catorce, esto pudo deberse a la incorporación del fósforo dentro de las células microbianas, el incremento después de esta semana se atribuye a la liberación de fosfatos en los procesos del metabolismo microbiano y del decaimiento de la población microbiana (Gideon, O., y Paschal, O. 2008), las concentraciones más altas se presentaron en los mesocosmos 6 SSMN y 8 SSMN: Sedimento más suelo con microorganismos adaptados más Urea con valores de 42 p.p.m y 31 p.p.m, respectivamente en la semana diecinueve (ANEXO D).



**Gráfica 18.** Promedio Comportamiento Fósforo, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.

### 9.6.3 Potasio

El Potasio (K) es requerido por una gran cantidad de microorganismo para catalizar diferentes reacciones bacterianas, interviene en procesos químicos dentro de las células y contribuye a mantener el agua en las células (Ríos, R., 2005).

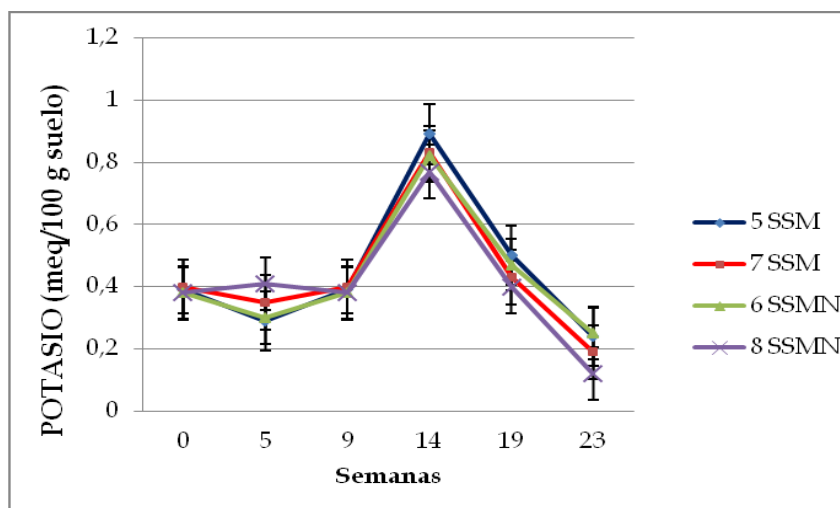


**Gráfica 19.** Comportamiento Potasio, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

Para todos los mesocosmos se presentaron comportamientos muy similares en la concentración de potasio a través del tiempo, en la semana catorce (14) se presentaron los picos más altos para todos los mesocosmos, llegando a valores de

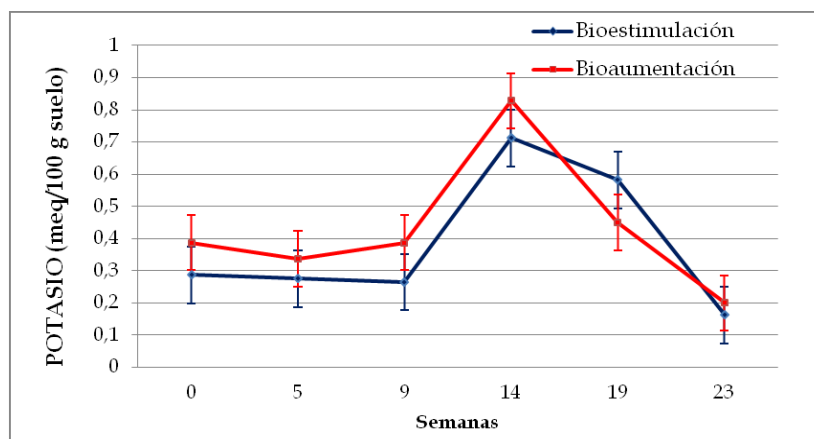


0,74 meq/100g para el mesocosmo 1 Sed: sedimento contaminado (ANEXO D). El potasio es movilizado por los microorganismos según la textura, condiciones de humedad del suelo y según sus necesidades (Ríos, R., 2005).



**Gráfica 20.** Comportamiento Potasio, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM: sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

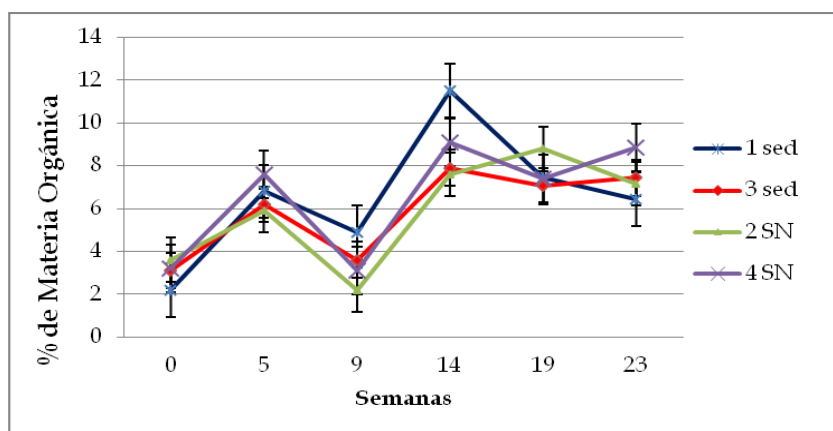
En los mesocosmos que contenían sedimento mas la adición de suelo con microorganismos adaptados más Urea, se presentó un comportamiento muy similar en la concentración de potasio a través del tiempo, el mesocosmo 5 SSM: sedimento más suelo con microorganismos adaptados, presentó el valor máximo de 0,89 meq/100g, este comportamiento en la concentración de potasio, fue muy similar a las otros mesocosmos 1Sed, 2SN, 3 Sed y 4 SN (ANEXO D), este puede ser debido a que este elemento es liberado de las partículas del suelo y/o del sedimento, a las necesidades de los microorganismos, como se puede observan en los mesocosmos en la semana 14 y 19, para las estrategias de bioaumentación y bioestimulación con referente a la población de microorganismos se presentaron los valores más altos, en este tiempo, esta población de microorganismos provocaban la mayor cantidad de proceso metabólicos, liberando y asimilando los compuestos dentro de los mesocosmos (Ríos, R., 2005).



**Gráfica 21.** Promedio Comportamiento Potasio, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.

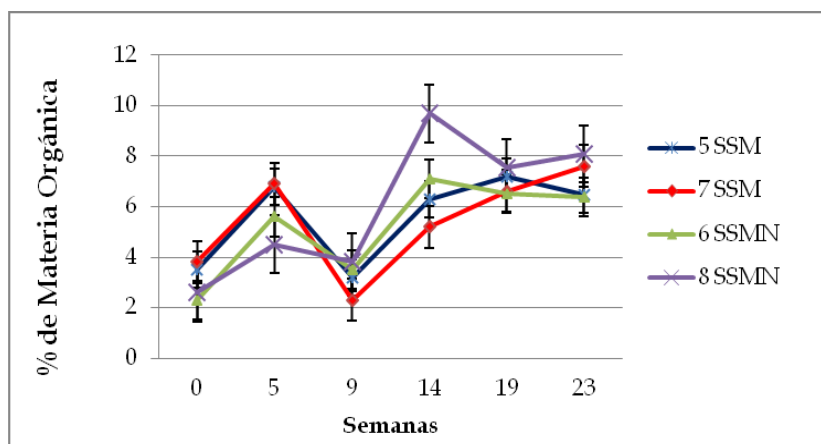
#### 9.6.4 Materia Orgánica

En la composición de la Materia Orgánica se encuentra un complejo número de macromoléculas en estado coloidal constituido por proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, minerales, etc., en constante estado de degradación y síntesis. (García, E., *et al*, 2011)



**Gráfica 22.** Comportamiento Materia Orgánica, en los mesocosmos 1 sed, 3 sed: sedimento contaminado y 2 SN, 4 SN: sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 6 datos y barras de error=1DS.

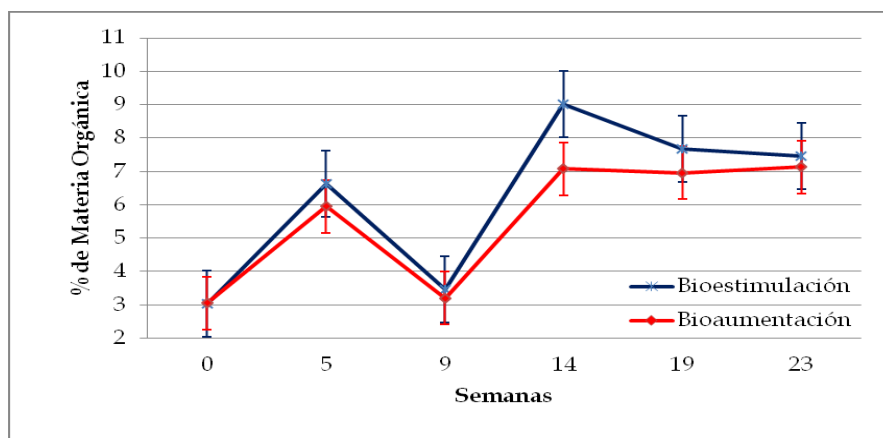
Dentro de los mesocosmos donde se encontraba el sedimento contaminado de la estación de servicio y a los mesocosmos que se les adicionó Urea, se presentó un aumento en la materia orgánica al final de la investigación, este comportamiento se puede relacionar con la descomposición y transformación de los nutrientes presentes en los mesocosmos como Carbono, Nitrógeno, Fósforo y Potasio entre otros (García, E., *et al*, 2011), los valores más altos fueron evidenciados en los mesocosmos 1Sed: sedimento contaminado y 4 SN: sedimento contaminado más Urea replica, con valores de 11,5 % y 9,1% respectivamente en la semana catorce, donde se presentaron mayores poblaciones de microorganismos y mayor disponibilidad de fosforo y potasio, asumiendo que esto posibilita la generación de reacciones químicas dentro de los mesocosmos (ANEXO D).



**Gráfica 23.** Comportamiento Materia Orgánica, en los mesocosmos 5 SSM, 7 SSM: sedimento más suelo con microorganismos adaptados y 6 SSMN, 8 SSMN sedimento más suelo con microorganismos adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 6 datos y barras de error=1DS.

Para los mesocosmos con la mezcla del sedimento, con suelo con microorganismos adaptados y a los que se les adicionó Urea, presentaron comportamientos similar en el contenido de materia orgánica a través del tiempo de la investigación, este comportamiento está relacionado al proceso biológico de descomposición del carbono, parte de este es asimilado dentro del tejido microbiano, en la biomasa del suelo y es convertido en humus, en consecuencia el contenido de materia orgánica puede aumentar o mantenerse estable dentro del suelo y/o sedimento. (García, E., *et al*, 2011), los mesocosmos que presentaron valores más altos de materia orgánica, fueron la 6 SSMN y 8 SSMN: sedimento más suelo con microorganismos

adaptados más Urea, con valores de 7,1% y 9,7% respectivamente en la semana catorce y diecinueve, coincidiendo con el tiempo donde se presentó mayor población microbiana, mayor disponibilidad de fósforo y potasio, la reducción de carbono y nitrógeno, dando lugar a los procesos metabólicos (ANEXO D).



**Gráfica 24.** Promedio Comportamiento Materia Orgánica, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 6 datos y barras de error=1DS.

## 9.7 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

El seguimiento de la degradación de hidrocarburos en los mesocosmos se realizó con análisis quincenales de concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) con el método Extracción por Soxhlet y determinación gravimétrica.

### 9.7.1 Tasas de Degradación

En la Tabla 10, se relacionan los datos de las concentraciones iniciales, finales (HTP), la reducción de hidrocarburo en el tiempo del seguimiento de la investigación, el porcentaje de remoción y la tasa de degradación diaria, de cada uno de los mesocosmos utilizados.

**Tabla 10.** Datos Degradación de Hidrocarburos (HTP).

Mesocosmos	Concentración inicial (mg/Kgss)	Concentración Final (mg/Kgss)	Reducción en 161 días (23 semanas)	% de Reducción	Tasa Degradación (mg/kgss*d)
<b>1 sed</b>	18238,68	2156,88	16081,80	88,2	99,89
<b>2 SN</b>	18238,68	1287,10	16951,58	92,9	105,29
<b>3 sed replica</b>	18238,68	2678,99	15559,69	85,3	96,64
<b>4 SN replica</b>	18238,68	1267,05	16971,63	93,1	105,41
<b>5 SSM</b>	17636,51	2563,87	15072,65	85,5	93,62
<b>6 SSMN</b>	17636,51	836,01	16800,50	95,3	104,35
<b>7 SSM replica</b>	17636,51	3577,42	14059,09	79,7	87,32
<b>8 SSMN replica</b>	17636,51	1162,99	16473,52	93,4	102,32

Fuente: Elaboración de este estudio.

Kgss: Kilogramos de suelo seco.

Bioestimulación: Sed: Sedimento contaminado.

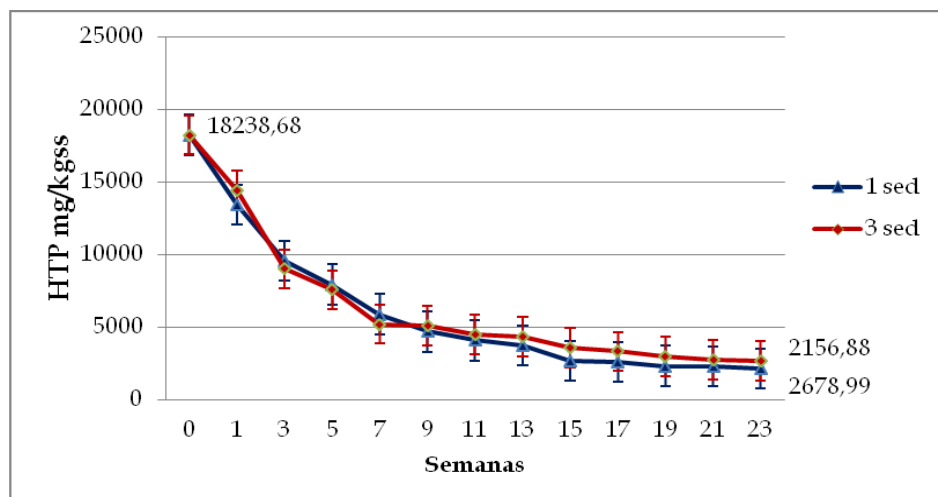
SN: Sedimento más Nutriente.

Bioaumentación: SSM: Sedimento más Suelo con Microorganismos.

SSMN: Sedimento más Suelo con Microorganismos más Nutriente.

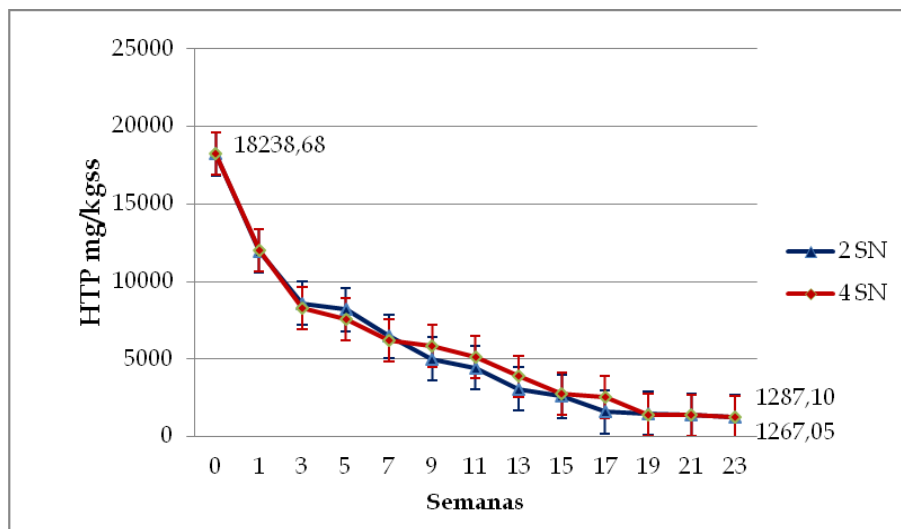
### 9.7.2 Concentraciones de HTP en los Mesocosmos

A continuación se presentan las gráficas de comportamiento de la concentración de HTP en el tiempo de la investigación.



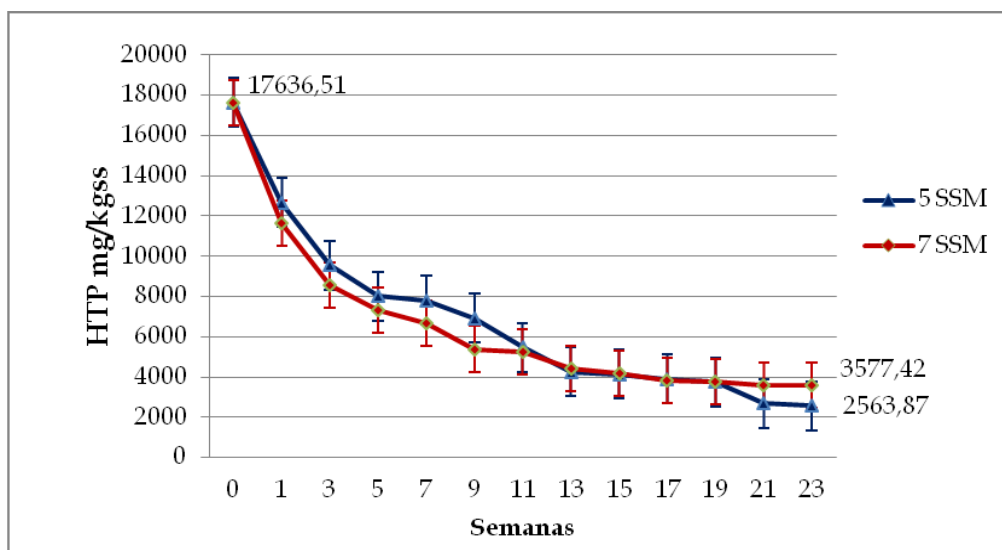
**Gráfica 25.** Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 1 Sed y 3 Sed: Sedimento contaminado (Bioestimulación), 13 datos y barras de error=1DS.

Estos mesocosmo contenían el 100% de sedimento de la estación de servicio, se volteaba tres veces a la semana y se le agregaba agua, proceso que se denomina bioestimulación, iniciaron con unas concentraciones del 18238,68 mg/kgss, presentando las mayores reducciones entre la semana trece y quince, después de este tiempo se presentó un proceso de degradación más lento, los dos mesocosmos manejaron comportamientos muy similares a lo largo del tiempo de la investigación. Presentaron tasas de degradación diarias de 99,89 mg/kgss y 96,64 mg/kgss\*d, porcentajes de remoción del 88,2% y del 85,3%, respectivamente. (ANEXO D)



**Gráfica 26.** Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 2 SN y 4 SN Sedimento contaminado más nutriente (Urea) (Bioestimulación), 13 datos y barras de error=1DS.

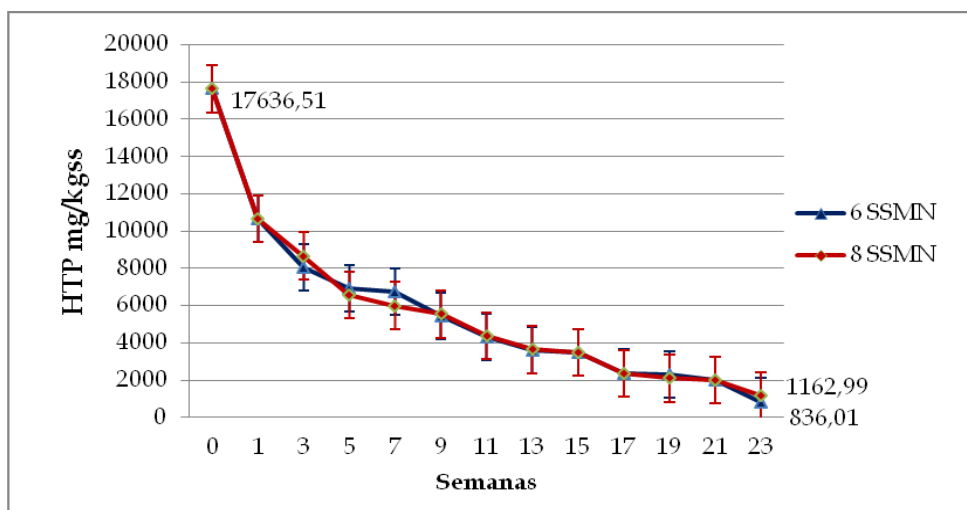
Estos mesocosmos contenían el 100% de sedimento de la estación de servicio más la adición de nutriente (Urea), se volteaba tres veces a la semana y se le agregaba agua, proceso que se denomina bioestimulación, al inicio de la investigación presentaron una concentración de 18238,68 mg/kgss, hasta la semana diecisiete se presentó una baja en la concentración de HTP constante, las semanas siguientes no redujo mucho su concentración, estos mesocosmos presentaron tasas de degradación diarias de 105,29 mg/kgss\*d y 105,41 mg/kgss\*d, los porcentajes de remoción fueron del 92,9% y del 93,1%, respectivamente, en comparación con las tasas de degradación de los mesocosmos con el 100% de sedimentos, estas están un poco por encima, gracias al nutriente (ANEXO D).



**Gráfica 27.** Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmo 5 SSM y 7 SSM: 60% Sedimento contaminado más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados (Bioaumentación), 13 datos y barras de error=1Ds.

Estos mesocosmos contenían el 60% de sedimento contaminado, el 40% de suelo con contenido de microorganismos adaptados a la presencia del hidrocarburo, proceso que se denomina bioaumentación, el proceso inicio con una concentración de HTP de 17636,51 mg/kgss, los mesocosmos presentaron una reducción en la concentración de hidrocarburo más alta hasta la semana trece, luego disminuyó su degradación, presentaron tasas de degradación diarias de 93,62 mg/kgss\*d y 87,32 mg/kgss\*d, porcentajes de remoción del 85,5% y del 79,7%, respectivamente (ANEXO D).





**Gráfica 28.** Comportamiento Degradación de Hidrocarburo mesocosmos 6 SSMN y 8 SSMN: 60% Sedimento contaminado, más 40% Suelos con Microorganismos Adaptados más nutriente (Urea) (Bioaumentación), 13 datos y barras de error=1DS.

Estos mesocosmos contenían el 60% de sedimento contaminado, el 40% de suelo con contenido de microorganismos adaptados a la presencia del hidrocarburo, se le adicionó nutriente (Urea), proceso que se denomina bioaumentación, este ensayo empezó con una concentración inicial de HTP de 17636,51 mg/kgss, presentó una reducción alta de la concentración de hidrocarburo hasta la semana trece, el resto del tiempo de la investigación esta reducción fue más baja, presentaron tasas de degradación diarias de 104,35 mg/kgss\*d y 102,32 mg/kgss\*d, el porcentaje de remoción fue del 95,3% y 93,4%, respectivamente para los mesocosmos, al comparar estos mesocosmos con los mesocosmos 5 SSM y 7 SSM, podemos evidenciar que la adición de nutriente ayudo a que las tasas de degradación diarias fueran más altas, al igual que el porcentaje de degradación de HTP. (ANEXO D)

Para todos los mesocosmos se presentó una mayor reducción de hidrocarburo en las primeras trece y diecisiete semanas, tiempo en el cual se presentaron temperaturas más altas dentro de los mesocosmos, esto puede deberse a un incremento en la actividad microbiana en este tiempo, después de estas semanas bajo la reducción de hidrocarburo en el tiempo, en todos los mesocosmos.

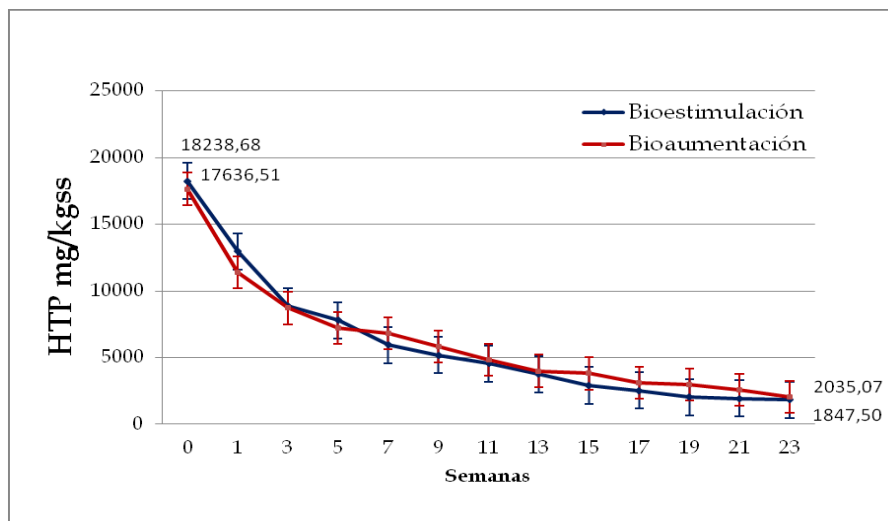
Los rangos de temperatura más apropiados para la degradación de hidrocarburos en suelos son de 18 a 30°C, a la que se intensifica la actividad enzimática de los microorganismos ayudando en los procesos de degradación (Pardo, J. *et al.*, 2004), los mesocosmos manejaron temperaturas más bajas a este rango, lo cual pudo afectar el proceso de degradación y la actividad enzimática dentro de los mesocosmos.

Todos los mesocosmos de bioestimulación, presentaron valores de tendencia de degradación similares en las gráficas 25 y 26, una degradación rápida hasta la semana trece y diecisiete, de ahí en adelante se nota una baja reacción en el proceso de biodegradación, situación similar para los procesos de bioaumentación, en las gráficas 27 y 28. Tal y como se ha descrito en otros estudios, la cinética de degradación de contaminantes orgánicos en suelos, habitualmente muestra una fase inicial de biodegradación rápida seguido de un periodo con pequeños o inexistentes cambios de las concentraciones residuales. Esta cinética es conocida como el fenómeno del “palo de hockey” (Alexander, M., 2000), esta dinámica puede estar causada por una disminución de los nutrientes, por la disminución de la población microbiana, por la baja biodisponibilidad de componentes orgánicos, por las condiciones fisicoquímicas desfavorables y un aumento de la recalcitrancia de los contaminantes residuales (Karamalidis, A., *et al.*, 2010, Taccaria, M., *et al.*, 2012, Alexander, M., 2000).

Con referente a las tasas de degradación en diferentes estudios de similares condiciones se han manejado porcentajes de reducción que se encuentran entre 26% y 61% en procesos de 12 a 80 días (Xu, Y. y Lu, M., 2010, Ta-Chen, L., *et al.*, 2010), pero a más de 100 días el porcentaje puede ser de 60% a 70% (Karamalidis, A., *et al.*, 2010, Taccaria, M., *et al.*, 2012), en esta investigación se obtuvieron porcentajes de degradación para el proceso de bioestimulación del 85,3% al 93,1% que corresponde a tasas diarias de degradación de 96,64 mg/Kgss\*d y 105,41 mg/Kgss\*d, para el proceso de bioaumentación se obtuvieron porcentajes del 79,7% al 95,1%, que corresponden a tasas diarias de degradación de 87,32 mg/Kgss\*d y 104,18 mg/Kgss\*d. datos que no están lejos de lo citado en otras investigaciones. Según estos valores los procesos de bioestimulación y bioaumentación presentaron buenos resultados, con respecto a las tasas de degradación diarias, para sedimentos de la estación de servicio de combustible, según otras investigaciones la adición de fuentes de nitrógeno y fósforo origina

cambios de la población microbiana y aumenta de la degradación del hidrocarburo (Xu, Y. y Lu, M., 2010). Así mismo favorece el crecimiento de especies dominantes (Ta-Chen, L., *et al*, 2010).

Se pueden evidenciar unas tasas de degradación un poco más altas en los mesocosmos que se les adicionó nutriente, por lo que se puede decir que la fertilización y el manejo de las condiciones ambientales del suelo, en la biorremediación, ha sido exitosa. La biodegradación de hidrocarburos se puede favorecer eficientemente con la adición adecuada de nutrientes y el manejo de condiciones ambientales, como el contenido de humedad, temperatura pH, nivel de aireación y otras condiciones de experimentación que favorece el establecimiento de poblaciones con mayor actividad (Odukuma, L., y Dickson, A., 2003).



**Gráfica 29.** Promedio Comportamiento Degradación de Hidrocarburo, para las estrategias de Bioestimulación y Bioaumentación, 13 datos y barras de error=1DS.

## 9.8 CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN

Para este análisis de velocidad de reacción química de la degradación de hidrocarburos, se determinaron las constantes cinéticas de velocidad de reacción ( $k^{-1}$ ), de acuerdo con el modelo matemático de Monod-Herbert, al definir estas constantes se podrá proyectar el comportamiento en el tiempo de la concentración de hidrocarburos en los mesocosmos, esta investigación presentó un comportamiento de degradación gradual y continua en el tiempo, con curvas hiperbólicas, comportamiento al cual se le llama reacción de primer orden o de orden uno (Cardona, S., 2002).

Ecuación de Primer orden y/o orden uno:

$$\ln A = -kt + A_0$$

Donde:

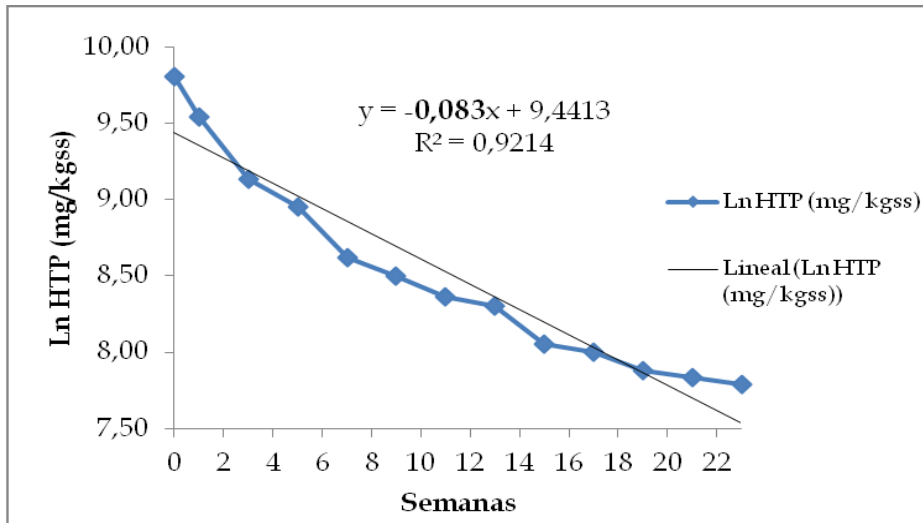
A: concentración de HTP (mg/Kg suelo seco)

k: constante (tiempo<sup>-1</sup>)

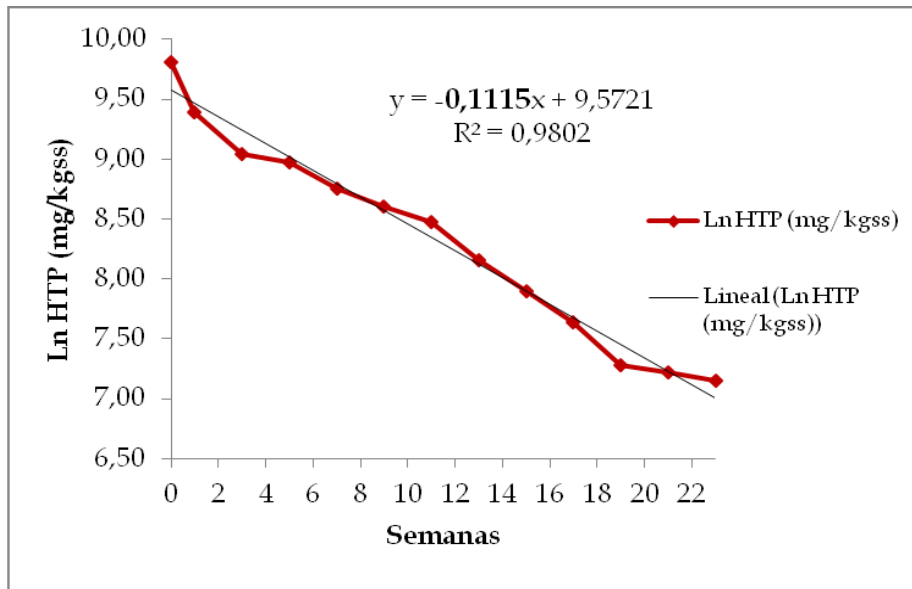
t: tiempo

A<sub>0</sub>: concentración inicial de HTP (mg/Kg suelo seco)

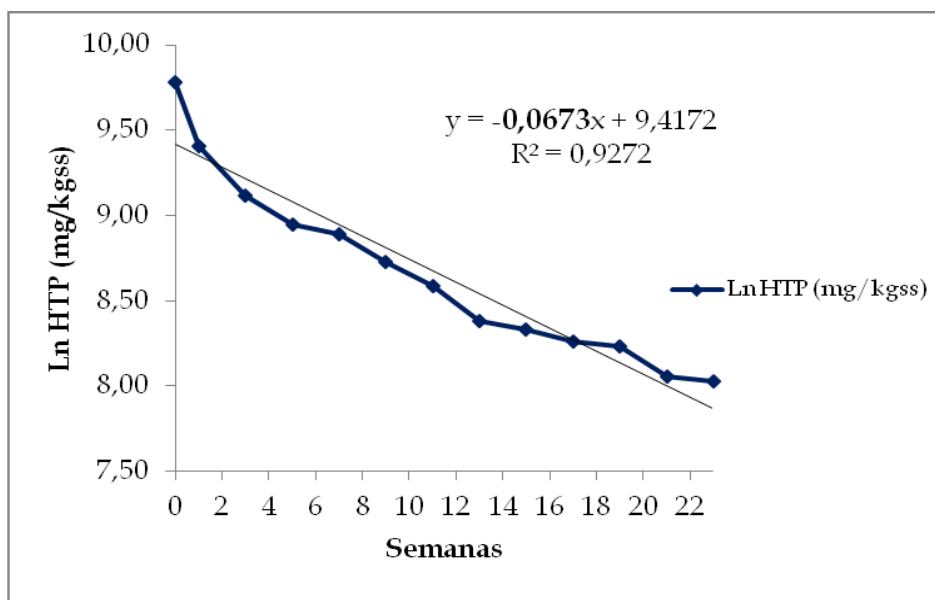
Para calcular la constante de velocidad de reacción ( $k^{-1}$ ), se gráfica el ln de los datos de concentración de hidrocarburos totales de petróleo HTP (mg/kg suelo seco) en el tiempo de la investigación, se trazo una línea de tendencia, presentando el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y de la ecuación del grafico se saco el dato de la constante ( $k^{-1}$ ) (Anexo E).



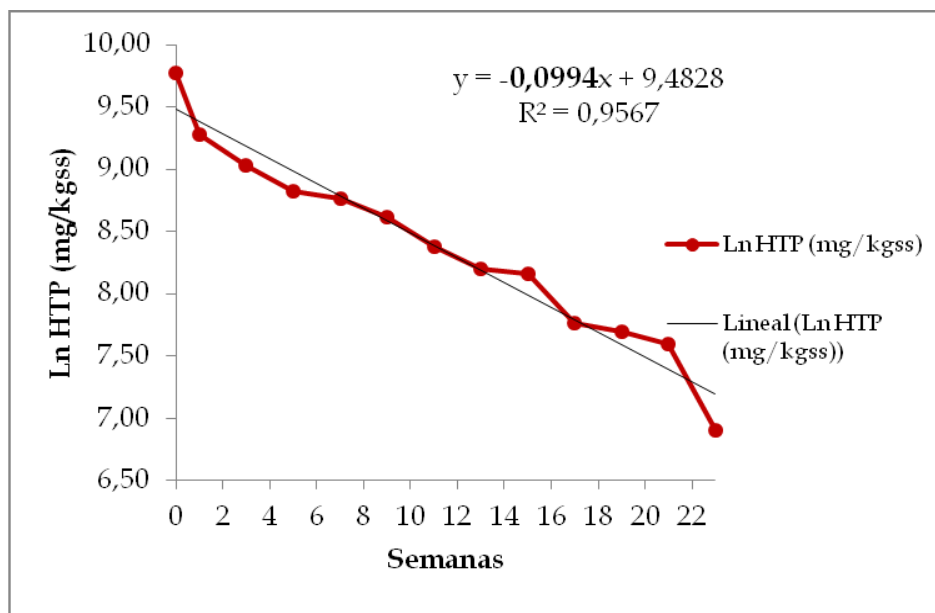
Gráfica 30. Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento contaminado (Bioestimulación).



Gráfica 31. Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento contaminado más Urea (Bioestimulación).



Gráfica 32. Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento con suelo con microorganismos adaptados (Bioaumentación).



Gráfica 33. Constante de degradación de hidrocarburo en el sedimento con suelo con microorganismos adaptados más Urea (Bioaumentación).

**Tabla 11.** Constantes de velocidad de reacción química de los mesocosmos.

ESTRATEGIAS	NIVELES	$k^{-1}$	$R^2$	<b>PROYECCIÓN</b> $A = E^{-kT} + A_0$
<b>Bioestimulación</b>	Sedimento	0,0830	0,9214	
	Sedimento mas Urea	0,1115	0,9802	
<b>Bioaumentación</b>	Sedimento Suelo con microorganismos	0,0673	0,9272	
	Sedimento Suelo con microorganismos más Urea	0,0994	0,9567	

Fuente: elaboración de este estudio.

Comparando los resultados se puede deducir que la constante de velocidad de reacción ( $k^{-1}$ ) de orden uno de la técnica de bioestimulación del sedimento mas la aplicación del nutriente (Urea) fue un poco más alta y que el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es más cercano a uno, por lo cual se puede determinar que los datos de estos mesocosmos, presentaron una porción de variabilidad baja. Si se compara este comportamiento de cinética de reacción con las tasas de degradación (Tabla 10), se presentan una relación estrecha entre el comportamiento de las tasas de degradación y la constante de velocidad de reacción, para los diferentes mesocosmos.

## 9.9 ANALIS ESTADÍSTICO

### 9.9.1 Pruebas de normalidad

Esta prueba se trata de comprobar si la distribución de probabilidad subyacente a las variables de interés siguen una distribución normal (Risk, M., 2003).

**Tabla 12.** Datos estadísticos, concentración HTP (mg/kgss).

ESTRATEGIA		ESTADÍSTICA	ERROR ESTÁNDAR
Hidrocarburos	Media	<u>6044.9381</u>	664.00979
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	<b>4711.8828</b> <b>7377.9934</b>
	Mediana	4464.6450	
	Varianza	2.293E7	
	Desviación Típica	4788.24271	
	Mínimo	1267.05	
	Máximo	18238.68	
	Rango	16971.63	
	Amplitud Intercuartil	5508.86	
	Asimetría	1.396	.330
	Curtosis	1.196	.650
	Media	<u>6228.2135</u>	594.11234
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	<b>5035.4832</b> <b>7420.9438</b>
	Mediana	4852.5650	
	Varianza	1.835E7	
	Desviación Estándar	4284.20503	
	Mínimo	836.00	
	Máximo	17636.51	
	Rango	16800.51	
	Amplitud Intercuartil	4376.10	
Asimetría	1.459	.330	
Curtosis	1.746	.650	

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

**Tabla 13.** Prueba de Normalidad, datos de concentración de hidrocarburos.

ESTRATEGIAS		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Hidrocarburos	Bioestimulación	.185	52	.000	.823	52	.000
	Bioaumentación	.162	52	.002	.840	52	.000

a. corrección de significación de Lilliefors.

Fuente: programa estadístico SPSS 17.



Al realizar una descripción estadística de los datos de concentración de hidrocarburos totales para los mesocosmos de bioestimulación y bioaumentación, se encontró diferencias entre las medias, entre los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza, y al realizar la prueba de normalidad se halló diferencias significativas entre los dos, lo que indica que los datos de concentración de hidrocarburos a través del tiempo de la investigación, no siguen o no presentan una distribución normal, para seguir con el análisis se realizaron transformaciones de datos como elevar al cuadrado, sacar raíz cuadrada y logaritmo natural, de las tres solo el logaritmo natural de esta variable presentó normalidad, pero al ser una de tres, se optó por realizar el análisis estadístico con pruebas no paramétricas y corroborar así diferencias significativas entre las estrategias (Risk, M., 2003).

### 9.9.2 Pruebas no paramétricas

#### Prueba de Mann-Whitney

Esta es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es de hecho, la versión no paramétrica de la habitual prueba t de Student, esta se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras bajo parámetro ordinales (Risk, M., 2003).

El planteamiento de partida es:

1. Las observaciones de ambos grupos son independientes
2. Las observaciones son variables bajo parámetros ordinales o continuas.
3. Bajo la hipótesis nula, las distribuciones de partida de ambas distribuciones es la misma
4. Bajo la hipótesis alternativa, los valores de una de las muestras tienden a exceder a los de la otra:  $P(X > Y) + 0.5 P(X = Y) > 0.5$ .

**Tabla 14.** Rangos Prueba de Mann-Whitney para la bioestimulación y bioaumentación

	ESTATEGIAS	N	Rango promedio	Suma de rangos
<b>HIDROCARBURO</b>	Bioestimulación	52	50,50	2626,00
	Bioaumentación	52	54,50	2834,00
	Total	104		

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

**Tabla 15.** Estadísticos de contraste para las estrategias de bioestimulación y bioaumentación (a)

	<b>HIDROCARBURO</b>
U de Mann-Whitney	1248,000
W de Wilcoxon	2626,000
Z	-,676
<b>Sig. asintót. (bilateral)</b>	<b>,499</b>

a Variable de agrupación: estrategias.

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

### **Prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras**

Es una prueba no paramétrica, que refiere a la concordancia entre dos distribuciones acumulativas observadas, se contrasta la hipótesis de si las dos muestras independientes provienen de distribuciones continuas idénticas, y es sensible a las diferencias de población en lo referente a la localización, dispersión, o disimetría (Risk, M., 2003).

**Tabla 16.** Frecuencias de la Prueba de Kolmogorov-Smirnov

	<b>ESTRATEGIAS</b>	N
<b>HIDROCARBURO</b>	Bioestimulación	52
	Bioaumentación	52
	Total	104

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

**Tabla 17.** Estadísticos de contraste para las estrategias bioestimulación y bioaumentación (a)

		<b>HIDROCARBURO</b>
Diferencias Más extremas	Absoluta	,192
	Positiva	,192
	Negativa	-,077
Z de Kolmogorov-Smirnov		,981
<b>Sig. asintót. (bilateral)</b>		<b>,291</b>

a Variable de agrupación: estrategias

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

Con los resultados de las Pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov, se puede concluir que no se presentan diferencias significativas entre las distribuciones de los datos de concentración de hidrocarburo totales de las dos estrategias, con lo cual se descartan las hipótesis alternativa ( $H_a$ ) del diseño estadístico y se aprueba la hipótesis nula ( $H_0$ ) donde se plantea que no hay diferencias significativas y/o estadísticas entre las dos estrategias de biorremediación para tratar los sedimentos contaminados con hidrocarburos de la estación de servicio de combustible. Con estos resultados podemos recomendar a las demás estaciones de servicio de combustible a utilizar la técnica de bioestimulación, que la hace más sencilla en su operación, ya que no requiere inversión en la adición de microorganismos adaptados al hidrocarburo, y que con la aplicación de fertilizantes comunes, si lo requiere el sedimento luego de un análisis de laboratorio, agua y volteo, se pueden obtener buenos resultados en el tratamiento de estos residuos.

### **9.9.3 Análisis ANOVA no paramétrico**

Este análisis de varianza se realiza para verificar si hay diferencias significativas entre las medias de los datos de concentración de hidrocarburos de los cuatro niveles de la investigación, como los datos no presentan una distribución normal, se realiza por la prueba de Kruskal Wallis la versión no paramétrica.

#### **Prueba de Kruskal Wallis**

Es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos, mayores a tres muestras proviene de la misma población.

**Tabla 18.** Datos comparación de las medias entre los niveles de la investigación.

Niveles		N	Media del rango
Bioestimulación	Sedimento	26	52.73
	Sedimento + Nutriente	26	48.27
Bioaumentación	Sedimento + Microorganismos	26	60.46
	Sedimento + Microorganismos + Nutriente	26	48.54
Total		104	

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

**Tabla 19.** Prueba estadística de Kruskal Wallis para los niveles (a).

	Hidrocarburos
Chi-Square	2.773
Gl	3
<b>Sig. asintót.</b>	<b>.428</b>

a. Agrupación de variables: Niveles.

Fuente: programa estadístico SPSS 17.

En las tablas 18 y 19, se presentan los resúmenes de los resultados la prueba estadística de Kruskal Wallis, para los niveles de esta investigación, los resultados indican que al comparar las medias de los datos de los mesocosmos, no se presentaron diferencias significativas para un nivel de significancia de 0,05, entre ellos con respecto al comportamiento de la concentración de hidrocarburos (mg/kgss) a través del tiempo de la investigación.

### 9.10 CARACTERÍSTICAS FINALES DE LOS SEDIMENTOS

Las características físicas, químicas y biológicas, finales de los mesocosmos, después de 23 semanas de investigación (161 días), se presentan en la Tabla 19. Los sedimentos, la mezcla del sedimento con suelo con microorganismos adaptados y la adición del nutriente, presentaron un rango de tasas de degradación entre 87,32 mg/kgss y 105,41 mg/kgss.

**Tabla 20.** Parámetros finales de los mesocosmos

PARÁMETROS	1 Sed	2 SN	3 Sed replica	4 SN replica	5 SSM	6 SSMN	7 SSM replica	8 SSMN replica
Temperatura (°C)	21	21	20	20	21	19	21	20
pH (unidades)	7,02	7,35	7,02	7,39	7,3	7,8	6,89	7,15
% humedad	23,7	24,7	25,0	23,1	23,9	20,3	20,9	24,9
Microorganismos hidrocarbocíclicos (U.F.C/g)	2,00E+ 06	3,20E+ 06	6,80E+ 06	1,60E+ 06	1,90E+ 06	2,40E+ 06	2,90E+ 06	9,40E+ 05
% Nitrógeno	0,03	0,04	0,06	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06
% Materia Orgánica	6,44	7,16	7,43	8,84	6,45	6,38	7,61	8,09
Fósforo (p.p.m)	25,5	25,7	22	45,86	30,39	32,14	20,68	17,76
Potasio (meq/100g Suelo)	0,15	0,19	0,15	0,16	0,24	0,25	0,19	0,12
HTP mg/kgss	2156,8	1287,1	2678,9	1267,0	2563,8	836,01	3577,4	1162,9
Relación C:N:P:K	100:0,4 :0,04:0,09	100:0,5 :0,03:0,1	100:0,8 :0,03:0,07	100:0,3 :0,05:0,07	100:0,7 :0,04:0,1	100:0,6 :0,05:0,1	100:0,5 :0,02:0,09	100:0,7 :0,02:0,05
Textura	FRANCO LIMOSO (Ochoa, E., 1999)							

Fuente: elaboración de este estudio.

## 10 CONCLUSIONES

- Las estrategias de bioestimulación y bioaumentación, para el tratamiento de sedimentos generados en la estación de servicio de combustible, presentaron reducciones promedio de hidrocarburos totales de petróleo de 16391,18 mg/Kg de suelo seco y 15601,44 mg/Kg de suelo seco respectivamente, en un tiempo de 23 semanas (6 meses), al ver los resultados de la investigación podemos decir que las mayores reducciones de hidrocarburo ocurrieron hasta la semana 15 (4 meses), a este tiempo las estrategias presentaron reducciones de 15326,96 mg/Kgss para la técnica de bioestimulación y 13815,60 mg/Kgss para la técnica de bioaumentación, valores que cubren un gran porcentaje de los valores totales degradados, lo que indica que el tratamiento puede plantearse en menores tiempos.
- Para esta investigación se encontró que no existen diferencias significativas entre la estrategia de bioaumentación y la estrategia de bioestimulación, para el tratamiento de los sedimentos contaminados con hidrocarburos, producidos por la estación de servicio, ambas estrategias lograron efectos positivos en la reducción de hidrocarburos totales de petróleo.
- En las primeras siete semanas se observan altas reducciones en las concentraciones de hidrocarburos en los mesocosmos, tiempo en el cual se evidencia también un incremento en la temperatura de los mesocosmos, esto debido al aumento en el proceso metabólico de los microorganismos y su actividad enzimática, llegando a beneficiar la degradación del contaminante, los mesocosmos presentaron al final de la investigación tasas de degradación entre el 87,32 mg/kgss\*d al 105,41 mg/kgss\*d, con porcentajes de reducción de contenido de hidrocarburo del 79,7% al 95,1%, los mesocosmos que presentaron valores un poco más altos en las tasas de degradación fueron los mesocosmos a las cuales se les aplicó urea como nutriente (bioestimulación), esto sin diferencias significativas.
- Con los resultados de esta investigación, se sustenta que la presencia de microorganismos nativos, la adición de agua y los volteos manuales, para los sedimentos contaminados producto de las actividades de la estación de servicio de INTEGRAL (Dosquebradas – Risaralda - Colombia), tienen efectos

positivos en la reducción de las concentraciones de hidrocarburos totales, no se requiere la compra de nutrientes para tratar estos sedimentos, sin descartar que se debe hacer un análisis del laboratorio al sedimento para decidir el aplicar o no los nutrientes, ya que se puede favorecer la degradación del hidrocarburo dentro de estos.

- Para tal caso con sedimentos contaminados de la estación de servicio no se obtienen mejores resultados al introducir poblaciones microbianas adaptadas al hidrocarburo, ya que con la población nativa, se puede llevar a cabo un buen proceso de biorremediación utilizando la estrategia de bioestimulación.

## 11 RECOMENDACIONES

- Es importante considerar en el diseño experimental y en el seguimiento de los mesocosmos, la implementación de un control abiótico, para poder definir el alcance de los procesos bióticos y abióticos, en la remoción de hidrocarburos totales de petróleo dentro de los mesocosmos.
- Realizar una adición de nutrientes más amplia en el tiempo, a los mesocosmos, según el seguimiento de las concentraciones de nutrientes a lo largo del tiempo de la investigación, para manejar condiciones óptimas de estos parámetros en el suelo.
- Los hidrocarburos totales de petróleo son compuestos químicos muy contaminantes que deben ser evaluados en diferentes ambientes, con el fin de buscar alternativas de tratamiento que permitan mejorar sus condiciones antes de su disposición final. Estas problemáticas se vienen estudiando a nivel de laboratorio, sin embargo, se deben plantear investigaciones a escala real.
- Es importante considerar en primer lugar la cantidad de población microbiana nativa en el suelo o sedimento, para decidir si se requiere la adición de población microbiana adaptada al contaminante.

- Implementar otras técnicas de detección de Hidrocarburos para los sedimentos generados en EDS.
- Utilizar diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de diferentes microorganismos presentes en estos sedimentos que degradan los hidrocarburos.
- Se recomienda considerar en las variables de seguimiento introducir pruebas de textura para los mesocosmos.
- Para futuras investigaciones se deben realizar análisis de correlaciones o multivariados, para afirmar que los comportamientos de las propiedades microbiológicas se deben a un parámetro en particular, bien sea temperatura, pH, humedad, entre otros.



## 12 BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Env. Sci. Technol.* 34:4259-4265.
2. Arroyo, M., Quesada, E., Quesada R., Geocisa, J. 2001. Aplicación de Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos. Div. Protección Ambiental de Suelos. España.
3. Atlas, R. 1996. Bioestimulación para la biorrecuperación microbiana. En: Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. España, Mc Graw Hill. Pp 15 - 21.
4. Atlas, R., y Unterman, R. 1999. Bioremediation. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd Ed (pp 666-681). ASM Press. Washington D.C.
5. Ayotamuno, M., y Okparanma, N. 2007. Bio-Remediation of a Sludge Containing Hydrocarbons. *Applied Energy* Vol. 84(9): 936-946. Nigeria.
6. Benavides, L. y Quintero, G. 2006. Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Petróleo. *Publicación Científica Nova* 4: 4.
7. Boyer, R. 2000. *Conceptos de Bioquímica*. International Thomson Editores. México.
8. Calvo, C., Manzanera, M., Castro, S., González, J. 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment* 407, 3634-3640 Granada, España.
9. Cardona, S. 2002. Obtención del Coeficiente de Carbono Orgánico Para Diesel a través de Isotermas de Adsorción. *Revista Dyna*, Nro. 153, pp 159-165. Medellín - Colombia.
10. Castro, L., Perdomo, M., y Benavides, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. *NOVA*, 2(2): 39-49.
11. Comisión Nacional del Medio Ambiente. 1999. *Guía para el Control y Prevención de la Contaminación Industrial Estaciones de Servicio*. Región Metropolitana. Santiago. Chile.
12. Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira. 2007. *Mejoramiento de la Gestión Ambiental de las Estaciones de Servicio de Risaralda*. Pereira: 20.

13. Corporación Autónoma Regional de Risaralda. 2005. Por la cual se Adopta el Protocolo para la Construcción de Pozos de Monitoreo de Actividades Potencialmente Peligrosas. Resolución No. 377: 2.
14. Coulon, F., Whelan, M., Paton, G., Semple, K., Villa, R., Pollard, S. 2010. Multimedia fate of petroleum hydrocarbons in the soil: Oil matrix of constructed biopiles. *Chemosphere* 81, 1454–1462. UK.
15. Duran, M. y Contreras, N. 2006. Alternativa de Tratamiento para Tierras Fuller Contaminadas con Aceite Dieléctrico. *Scientia et Technica* Año XII, No 32. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
16. EPA 3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3).
17. EPA. 2004. Literature Review on the use of Commercial Bioremediation Agents for Cleanup of Oil-Contaminated Estuarine Environments. U.S. Environmental Protection Agency. National Risk Management Research Laboratory. Cincinnati, OH 45268.
18. Gallego, O., 2000. Estudio de perforación exploratoria para determinar el grado de contaminación de suelos por hidrocarburos en las estaciones de servicio de Pereira y Dosquebradas. Proyecto UTP-GTZ. Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira.
19. Gan, S., E. Lau, E., Ng, H. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 172, 532–549. Malasia.
20. García, E., Roldán, F., Garzón, L. 2011. Evaluación de la Bioestimulación (Nutrientes) en Suelos Contaminados con Hidrocarburos Utilizando Respirimetría. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 16 N.º1, 195- 208.
21. García, J., Escolano, O., García, S., Babín, M., and Fernández, D. 2010. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 183 (2010) 806–813. Madrid. España.
22. Gideon, O., y Paschal, O. 2008. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. *Bioresource Technology* 99, 4761–4767. Nigeria.
23. Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., y Mantilla, P. 2008. Factores Bióticos y Abióticos que Condicionan la Biorremediación por *Pseudomonas* en Suelos Contaminados por

- Hidrocarburos. Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá. Colombia.
24. González, I., Leal, E., Cerrato, E., García, F., Seijas, N., Varaldo, H., 2006. Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Process Biochemistry* 41, 1951-1960. Mexico.
  25. Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1926-1935. Japan.
  26. Karamalidis, A., Evangelou, A., Karabika, E., Koukkou, A., Drinas, C., Voudrias, E. 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource Technology* 101, 6545-6552. Greece.
  27. Kauppi, S., Sinkkonen, A., Romantschuk, M. 2011. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 359-368. Finlandia.
  28. Ladislao, B., Beck, A., Spanova, K., Real, J., Russell, N. 2007. The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *Journal of Hazardous Materials* 144, 340-347. London.
  29. Levin, M. y Gealt, M. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Tercera Edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid. España. Pp 643 - 651.
  30. Mehrasbi, M., Haghghi, B., Shariat, M., Naseri, S., Naddafi, K. 2003. "Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil." *Iranian Journal of Public Health* Vol. 32: N°3, pp28-32. Iran.
  31. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. 2005. Política Ambiental para la Gestión Integral de los Residuos o Desechos Peligrosos. Dirección de Desarrollo Sostenible: 122.
  32. Ministerio del Medio Ambiente. 1999. Guía de Manejo Ambiental para Estaciones de Servicio de Combustible. Versión N°1. Santafé de Bogotá, D.C.
  33. Ministerio del Medio Ambiente. 2010. Decreto 3930 Por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 9ª de 1979, así como el Capítulo II del Título VI -Parte III- Libro II del Decreto-ley 2811 de 1974 en cuanto a usos del

- agua y residuos líquidos y se dictan otras disposiciones. Santafé de Bogotá, D.C.
34. Ochoa, E. 1999. Guía de Teoría y de Práctica. Manual Producción de Sustratos Para Viveros. Instituto Universitario de Tecnología Agro Industrial. San Cristóbal.
  35. Odukuma, L. y Dickson, A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global J. Environ. Sci.* 2(1):2003-2940.
  36. Pardo, J., Perdomo, M., Benavides, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad De La Salle. Universidad de La Salle. Bogotá D.C., Colombia.
  37. Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., Zhang, Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1490-1496. China.
  38. Ríos, R. 2005. Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al Tiempo. México D.F.
  39. Risk, M. 2003. Cartas sobre Estadística de la Revista Argentina de Bioingeniería. Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.
  40. Ritter, W., y Scarborough, 1995. A review of bioremediation of contaminated soil and groundwater. *Journal Environmental Science Health.* 30(2):333-347
  41. Rodríguez, L. 2008. Evaluación de Dos Sustratos en la Técnica de Landfarming Para el Tratamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador.
  42. Roldán, A., y Iturbe, R. 2002. Saneamiento de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Mediante Biopilas. Instituto de Ingeniería, UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria. México D.F.
  43. Roldan, F., Maldonado, C., Guevara, C., Cubillos, A. 2010. Natural Attenuation of Oily Sludge Used for the Maintenance of an Unpaved Road in Arauca. *Bioremediation Journal.* Colombia.
  44. Ruberto, L., Vazquez, S., y Mac Cormack, W. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the

- bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52 (115–125). Buenos Aires. Argentina.
45. Saval, S., y Lesser, J. 2000. Una Experiencia de Caracterización y Remediación de un Suelo Arcilloso Contaminado con Hidrocarburos. Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Morelia, México., Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.
46. Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez, A. 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 859-865 Barcelona, Spain.
47. Schmidt, W. 2002. Suelos Contaminados con Hidrocarburos: La Biorremediación como una Solución Ecológicamente Compatible.
48. Si-Zhong, Y., Hui-Jun, J., Zhi, W., Rui-Xia, H., Yan-Jun, J., Xiu-Mei, L., and Shao, Y. 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. Published by Elsevier Limited and Science Press. *Pedosphere* 19 (3): 371–381. China.
49. Standard Methods. 2005. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health association. American water association. Water environmental federation. 21<sup>th</sup> ed. Washintong D.C.
50. Taccaria, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., Ciani, M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 66, 39-46 Ancona, Italia
51. Ta-Chen, L., Po-Tsen, P., Sheng-Shung, C. 2010. *Ex situ* bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 176, 27–34. Taiwan.
52. Torres, K., y Zuluaga, T. 2009. Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos. Proyecto de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
53. Tyagi, M., y Fonseca, M. 2010. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Springer Science, Biodegradation. Portugal.
54. United States Environmental Protection Agency. 2001. A Citizen's Guide to Bioremediation. S. W. a. E. Response: 2.

55. Vallejo, V., Salgado, L., y Roldán, F. 2005. Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de TPHs en Suelos Contaminados con Petróleo. *Rev. Col. Biotec.*, 2 (2): 67-78.
56. Vargas, P., Cuéllar, R., y Dussán, J. 2004. Biorremediación de Residuos del Petróleo. *Ecopetrol. Hipótesis. Apuntes Científicos Uniandinos No. 4.* Colombia.
57. Vasallo, J., y Herrera, D. 2002. Seminario de hidrocarburos. Escuela Superior de Salud y Ambiente. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén. Argentina.
58. Velasco, N. 2004. Efecto de Pretratamientos Fisicoquímicos en la Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en un Suelo Intemperizado, por Composteo. Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F.
59. Viñas, M., Grifoll, J., Sabate, A., y Solanas, M. 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Ind. Microbol. Biotechnol.* 28:252-260.
60. Volke, T., y Velasco, J. 2002. Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados. Instituto Nacional de Ecología. INE-SEMARNAT. México. D.F.
61. Xu, Y. y Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials* 183, 395–401. China.
62. Yanine, H. 2010. Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja. Proyecto de grado de Maestría Ciencias Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia.
63. Yaohui, X., y Mang, L. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials. Science Direct* 183 (395-401). China.
64. Zagal, E., y Sadzawka, A., 2007. Protocolo de Métodos de Análisis para Suelos y Lodos. Universidad de Concepción Facultad de de Agronomía. Elaborado con la participación de la Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo por encargo del Servicio Agrícola y Ganadero. Chile.

### 13 ANEXOS

A. Calculo del la adición del nutriente.

**Tabla 21.** Cálculos adición de la Urea.

UE	Datos Iniciales				El requerimiento				g N	g Urea
	% MO - C	% N	P	K	% N		(g/1kgss)	peo UE (kg)		
2	3,6	0,09	10	0,31	0,36	0,27	2,7	38,13	102,95	223,80
4	3,2	0,07	12	0,25	0,32	0,25	2,5	38,13	95,32	207,21
6	2,3	0,07	31	0,38	0,23	0,16	1,6	40,63	65,01	141,33
8	2,6	0,06	28	0,38	0,26	0,2	2	40,34	80,68	175,40
<b>Total Urea</b>										<b>747,74</b>

Fuente: elaboración de este estudio.

B. Datos de densidad y peso, prueba de laboratorio.

**Tabla 22.** Datos Densidad y Peso mesocosmos.

UE	peso (g)	vol (ml)	Densid (g/ml)	Vol UE cm <sup>3</sup>	peso UE (g)	peso UE (g)	peso UE (Kg)
1	8,1132	4	2,0283	21090	42776,85	40207,26	40,2
1	8,0308	4,5	1,7846	21090	37637,68		
2	8,0394	4	2,0099	21090	42387,74	38128,29	38,1
2	8,0296	5	1,6059	21090	33868,85		
3	7,806	5	1,5612	21090	32925,71	33527,19	33,5
3	8,0912	5	1,6182	21090	34128,68		
4	8,0406	4	2,0102	21090	42394,06	38127,24	38,1
4	8,0276	5	1,6055	21090	33860,42		
5	8,207	4	2,0518	21090	43271,41	42356,10	42,4
5	7,8598	4	1,9650	21090	41440,80		
6	8,0906	4	2,0227	21090	42657,69	40631,35	40,6
6	8,2372	4,5	1,8305	21090	38605,01		
7	8,2237	4	2,0559	21090	43359,46	42819,29	42,8
7	8,0188	4	2,0047	21090	42279,12		
8	8,8026	4,5	1,9561	21090	41254,85	40342,12	40,3
8	8,4131	4,5	1,8696	21090	39429,40		

Fuente: elaboración de este estudio.

C. Capacidad de campo

**Tabla 23.** % Capacidad de campo, del sedimento y de la mezcla de este con el suelo.

CC=[(Psh-Pss)/Pss]*100		1 día	2 día	1 día	2 día		
Mx	P suelo	P suelo + recipiente	12-ago-10	13-ago	% CC	% CC	48 horas
SED	50,1152	55,2619	68,7766	68,4115	24,5	23,8	25,57
	50,0088	54,5483	77,2176	71,4758			
	25,2306	28,3117	36,6731	36,0522	29,5	27,3	
SSM	50,0555	54,7426	67,7315	67,3452	23,7	23,0	22,18
	50,1007	54,7698	68,3285	67,9152	24,8	24,0	
	38,5353	43,7282	52,8192	52,2573	20,8	19,5	

Fuente: elaboración de este estudio.

D. Datos de laboratorio

**Tabla 24.** Concentración de HTP mg/kgss

Semanas	HC	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	22/03/2011	18238,68	18238,68	18238,68	18238,68	17636,51	17636,51	17636,51	17636,51
1	29/03/2011	13426,20	11955,12	14456,92	12030,61	12669,75	10653,01	11643,09	10645,40
3	12/04/2011	9564,91	8579,56	9021,34	8303,81	9567,46	8063,73	8589,09	8672,08
5	26/04/2011	7940,07	8189,66	7567,05	7545,65	8005,95	6934,34	7345,70	6585,10
7	10/05/2011	5887,35	6465,91	5207,54	6202,83	7818,85	6750,96	6654,54	6003,39
9	24/05/2011	4699,50	5013,48	5110,80	5866,69	6922,48	5450,97	5394,92	5533,50
11	07/06/2011	4092,58	4443,25	4486,05	5152,32	5466,48	4298,99	5261,94	4356,98
13	21/06/2011	3740,21	3083,16	4345,10	3876,10	4262,38	3600,03	4443,19	3643,38
15	05/07/2011	2689,87	2598,10	3578,88	2782,05	4143,99	3498,65	4164,28	3476,70
17	19/07/2011	2598,23	1591,71	3342,99	2569,06	3897,57	2376,57	3825,19	2339,37
19	02/08/2011	2329,10	1478,10	2973,51	1408,98	3765,98	2286,99	3773,56	2100,86
21	16/08/2011	2297,77	1367,88	2765,21	1367,33	2698,74	1998,78	3600,18	1995,99
23	30/08/2011	2156,88	1287,10	2678,99	1267,05	2563,87	836,01	3577,42	1162,99

Fuente: elaboración de este estudio.



**Tabla 25.** Unidades de pH en los mesocosmos.

Semanas	pH	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	22/03/2011	7,55	7,53	7,22	7,39	7,46	7,8	7,4	7,15
1	29/03/2011	6,89	7,29	7,36	7,34	7,51	7,71	7,78	7,73
2	05/04/2011	7,38	7,46	7,38	7,84	7,80	7,92	7,98	8,11
3	12/04/2011	7,73	9,26	7,71	9,22	7,01	9,26	7,06	9,25
4	19/04/2011	7,53	8,83	7,76	8,96	7,71	8,91	7,61	8,99
5	26/04/2011	7,20	8,57	7,30	9,04	7,89	8,56	7,70	8,55
6	03/05/2011	7,46	8,45	7,45	8,97	7,72	8,90	7,62	8,99
7	10/05/2011	7,34	8,82	7,36	8,68	7,67	8,53	7,50	8,49
8	17/05/2011	7,17	8,83	7,32	8,72	7,57	8,72	7,58	8,73
9	24/05/2011	7,17	8,87	7,24	8,33	7,66	8,53	7,49	8,24
10	31/05/2011	7,07	8,86	7,20	8,62	7,93	8,45	7,95	8,77
11	07/06/2011	7,17	8,38	7,17	8,37	7,85	8,37	7,82	8,36
12	14/06/2011	7,20	8,38	7,08	8,39	7,80	8,01	7,72	8,78
13	21/06/2011	7,16	8,34	7,05	8,58	7,84	8,53	7,80	8,43
14	28/06/2011	7,09	8,26	7,10	8,62	7,39	8,45	7,50	7,77
15	05/07/2011	7,06	8,18	7,14	8,39	7,30	8,01	7,42	7,78
16	12/07/2011	7,05	8,12	7,02	8,40	7,18	8,32	7,37	7,86
17	19/07/2011	7,05	8,12	7,09	8,04	7,12	7,92	7,12	7,98
18	26/07/2011	7,02	8,10	7,03	8,39	7,00	8,39	7,06	7,65
19	02/08/2011	7,01	8,08	7,09	7,52	7,30	8,05	7,05	7,44
20	09/08/2011	7,01	8,03	7,05	7,26	7,5	8,25	7,02	7,17
21	16/08/2011	7,01	7,47	7,1	7,33	7,5	8,15	7,01	7,15
22	23/08/2011	7,02	7,4	7,03	7,4	7,4	7,56	6,98	7,05
23	30/08/2011	7,02	7,35	7,02	7,39	7,3	7,8	6,89	7,15
	<b>promedio</b>	7,2	8,2	7,2	8,2	7,5	8,3	7,4	8,1
	<b>Max</b>	7,73	9,26	7,76	9,22	7,93	9,26	7,98	9,25
	<b>Min</b>	6,89	7,29	7,02	7,26	7	7,56	6,89	7,05

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 26.** Temperatura (°C), en los mesocosmos.

Semanas	T°	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	22/03/2011	19	20	19	20	20	19	20	19
1	29/03/2011	22	21	22	22	22	22	22	22
2	05/04/2011	23	24	23	25	23	24	23	23
3	12/04/2011	24	24	24	24	24	23	23	23
4	19/04/2011	25	26	25	25	25	26	25	24
5	26/04/2011	25	25	25	25	25	25	25	25
6	03/05/2011	23	23	24	24	23	22	24	24
7	10/05/2011	22	23	22	23	22	22	23	23
8	17/05/2011	21	21	21	22	21	22	22	22
9	24/05/2011	22	22	21	22	22	22	22	22
10	31/05/2011	22	22	22	22	21	22	22	22
11	07/06/2011	21	20	20	20	19	20	20	20
12	14/06/2011	22	22	22	22	22	22	22	22
13	21/06/2011	21	20	20	21	20	20	21	21
14	28/06/2011	19	19	19	19	19	19	20	21
15	05/07/2011	20	19	21	19	20	20	19	20
16	12/07/2011	22	22	22	22	21	19	19	21
17	19/07/2011	21	22	21	22	22	21	22	21
18	26/07/2011	20	21	21	20	20	19	20	21
19	02/08/2011	20	19	21	21	22	20	21	20
20	09/08/2011	19	19	20	21	21	20	19	19
21	16/08/2011	20	21	21	21	21	20	20	21
22	23/08/2011	19	19	19	20	20	19	19	19
23	30/08/2011	21	21	20	20	21	19	21	20
	<b>promedio</b>	21,4	21,5	21,5	21,8	21,5	21,1	21,4	21,5
	<b>Max</b>	25	26	25	25	25	26	25	25
	<b>Min</b>	19	19	19	19	19	19	19	19

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 27.** % de Humedad, en los mesocosmos.

Semanas	Humedad	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	22/03/2011	23,7	24,7	25,0	23,1	23,9	20,3	20,9	24,9
1	29/03/2011	20,0	22,1	25,7	25,7	20,1	20,7	26,9	26,0
2	05/04/2011	25,3	25,8	27,9	26,1	30,7	24,9	25,9	24,0
3	12/04/2011	28,4	27,2	27,5	27,9	28,2	28,7	25,7	26,8
4	19/04/2011	25,9	23,1	23,0	24,4	20,9	21,8	20,8	20,6
5	26/04/2011	22,9	22,1	22,0	20,6	22,6	27,0	22,5	23,0
6	03/05/2011	28,5	28,5	26,5	29,2	23,7	26,6	21,7	25,6
7	10/05/2011	28,8	28,8	29,0	27,5	25,2	23,8	23,8	28,3
8	17/05/2011	28,7	21,3	24,9	20,4	20,8	22,6	20,8	22,1
9	24/05/2011	22,3	22,1	22,8	22,6	24,3	23,4	23,2	24,6
10	31/05/2011	30,5	28,1	22,9	25,5	25,4	28,1	21,5	23,9
11	07/06/2011	23,0	24,3	25,6	24,8	22,6	27,1	29,6	25,7
12	14/06/2011	20,8	23,1	24,2	25,3	22,1	25,3	22,1	27,6
13	21/06/2011	20,9	21,9	23,3	20,1	23,0	21,6	20,8	24,8
14	28/06/2011	24,7	22,8	25,4	22,5	21,8	27,5	21,1	25,9
15	05/07/2011	25,5	22,8	20,9	22,3	20,5	28,5	20,2	25,8
16	12/07/2011	24,1	20,4	20,7	21,1	22,3	27,5	20,8	24,7
17	19/07/2011	28,8	24,9	22,2	25,2	26,5	25,0	26,5	28,2
18	26/07/2011	28,6	25,2	22,1	26,4	28,5	26,1	28,6	27,9
19	02/08/2011	28,2	24,9	21,9	27,4	28,2	23,3	31,7	26,9
20	09/08/2011	28,9	25,2	22,9	27,4	26,2	30,4	28,2	27,2
21	16/08/2011	31,7	28,9	24,7	27,9	27,2	25,9	29,6	28,4
22	23/08/2011	27,1	23,5	23,7	24,7	27,1	24,6	25,7	25,6
23	30/08/2011	23,7	24,7	25,0	23,1	23,9	20,3	20,9	24,9
	<b>promedio</b>	25,9	24,4	24,1	24,6	24,4	25,0	24,1	25,6
	<b>Max</b>	31,7	28,9	29,0	29,2	30,7	30,4	31,7	28,4
	<b>Min</b>	20,0	20,4	20,7	20,1	20,1	20,3	20,2	20,6

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 28.** Microorganismos (U.F.C/g), en los mesocosmos.

Semanas	microo	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	25/03/2011	6,7E+06	1,60E+07	1,00E+06	5,80E+06	1,10E+07	1,70E+07	1,90E+07	5,60E+06
5	29/04/2011	8,30E+06	5,80E+07	1,50E+07	1,80E+08	5,40E+07	6,50E+07	3,30E+07	3,80E+07
9	27/05/2011	2,30E+07	1,30E+08	1,80E+08	3,10E+08	3,20E+08	1,30E+08	1,80E+08	2,30E+08
14	28/06/2011	3,20E+08	2,70E+09	7,80E+08	2,40E+08	4,40E+08	1,30E+08	3,60E+08	5,40E+08
19	01/08/2011	6,40E+08	1,20E+09	3,80E+08	9,60E+08	1,30E+09	1,20E+09	1,50E+09	1,90E+09
23	01/09/2011	2,00E+06	3,20E+06	6,80E+06	1,60E+06	1,90E+06	2,40E+06	2,90E+06	9,40E+05
	<b>promedio</b>	1,67E+08	6,85E+08	2,27E+08	2,83E+08	3,54E+08	2,57E+08	3,49E+08	4,52E+08
	<b>Max</b>	6,40E+08	2,70E+09	7,80E+08	9,60E+08	1,30E+09	1,20E+09	1,50E+09	1,90E+09
	<b>Min</b>	2,00E+06	3,20E+06	1,00E+06	1,60E+06	1,90E+06	2,40E+06	2,90E+06	9,40E+05

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 29.** % de Nitrógeno, en los mesocosmos.

Semanas	% nitrógeno	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	25/03/2011	0,07	0,09	0,04	0,07	0,07	0,07	0,08	0,06
5	29/04/2011	0,1	0,12	0,11	0,13	0,08	0,18	0,13	0,09
9	27/05/2011	0,12	0,15	0,09	0,15	0,1	0,14	0,15	0,08
14	28/06/2011	0,09	0,09	0,14	0,1	0,16	0,06	0,14	0,08
19	01/08/2011	0,05	0,07	0,07	0,06	0,05	0,1	0,07	0,12
23	01/09/2011	0,03	0,04	0,06	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06
	<b>promedio</b>	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,08
	<b>Max</b>	0,12	0,15	0,14	0,15	0,16	0,18	0,15	0,12
	<b>Min</b>	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 30.** % de Materia Orgánica, en los mesocosmos.

Semanas	% MO	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	25/03/2011	2,2	3,6	3,1	3,2	3,5	2,3	3,8	2,6
5	29/04/2011	6,8	5,9	6,2	7,6	6,8	5,6	6,9	4,5
9	27/05/2011	4,9	2,2	3,6	3,1	3,2	3,5	2,3	3,8
14	28/06/2011	11,5	7,6	7,9	9,1	6,3	7,1	5,2	9,7
19	01/08/2011	7,47	8,79	7,06	7,4	7,18	6,51	6,62	7,54
23	01/09/2011	6,44	7,16	7,43	8,84	6,45	6,38	7,61	8,09
	<b>promedio</b>	6,55	5,88	5,88	6,54	5,57	5,23	5,41	6,04
	<b>Max</b>	11,50	8,79	7,90	9,10	7,18	7,10	7,61	9,70
	<b>Min</b>	2,20	2,20	3,10	3,10	3,20	2,30	2,30	2,60

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 31.** Fósforo (p.p.m), en los mesocosmos.

Semanas	fosforo	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	25/03/2011	12	10	24	12	14	31	34	28
5	29/04/2011	21	14	4	28	28	42	35	28
9	27/05/2011	14	12	10	12	24	14	31	28
14	28/06/2011	20	22	18	24	20	21	20	21
19	01/08/2011	39	48	49	40	26	42	29	31
23	01/09/2011	25,5	25,7	22	45,86	30,39	32,14	20,68	17,76
	<b>promedio</b>	19,92	21,95	21,17	26,98	21,90	28,36	26,78	23,96
	<b>Max</b>	39,00	48,00	49,00	45,86	30,39	42,00	35,00	31,00
	<b>Min</b>	8,00	10,00	4,00	12,00	9,00	9,00	11,00	11,00

Fuente: elaboración de este estudio.

**Tabla 32.** Potasio (meq/100g de suelo), en los mesocosmos.

Semanas	Potasio	1 sed	2 SN	3 sed	4 SN	5 SSM	6 SSMN	7 SSM	8 SSMN
0	25/03/2011	0,29	0,31	0,3	0,25	0,39	0,38	0,4	0,38
5	29/04/2011	0,27	0,32	0,24	0,27	0,29	0,3	0,35	0,41
9	27/05/2011	0,22	0,29	0,3	0,25	0,39	0,38	0,4	0,38
14	28/06/2011	0,74	0,71	0,7	0,7	0,89	0,82	0,83	0,77
19	01/08/2011	0,65	0,6	0,55	0,53	0,5	0,47	0,43	0,4
23	01/09/2011	0,15	0,19	0,15	0,16	0,24	0,25	0,19	0,12
	<b>promedio</b>	0,39	0,40	0,37	0,36	0,45	0,43	0,43	0,41
	<b>Max</b>	0,74	0,71	0,70	0,70	0,89	0,82	0,83	0,77
	<b>Min</b>	0,15	0,19	0,15	0,16	0,24	0,25	0,19	0,12

Fuente: elaboración de este estudio.

E. Cálculo constante de degradación

Tabla 33. Proyección Sedimento Contaminado

Sedimento Contaminado	Tiempo (semanas)	HTP mg/kgss	Ln HTP (mg/kgss)	Proyección $A=e^{-kt+A_0}$
	0	18239	9,81	-
	1	13942	9,54	-
	3	9293	9,14	-
	5	7754	8,96	-
	7	5547	8,62	-
	9	4905	8,50	-
	11	4289	8,36	-
	13	4043	8,30	-
	15	3134	8,05	-
	17	2971	8,00	-
	19	2651	7,88	-
	21	2531	7,84	-
	23	2418	7,79	-
	25	-	-	1582
	27	-	-	1340
	29	-	-	1135
	31	-	-	961
	33	-	-	814
	35	-	-	690
	37	-	-	584
	39	-	-	495
	41	-	-	419
	43	-	-	355
45	-	-	301	
47	-	-	255	
49	-	-	216	
51	-	-	183	

Fuente: elaboración de este estudio.

Tabla 34. Proyección Sedimento Contaminado más Nutriente (Urea)

Sedimento Contaminado más Nutriente (Urea)	Tiempo (semanas)	HTP mg/kgss	Ln HTP (mg/kgss)	Proyección $A=e^{-kt+A_0}$
	0	18239	9,81	-
	1	11993	9,39	-
	3	8442	9,04	-
	5	7868	8,97	-
	7	6334	8,75	-
	9	5440	8,60	-
	11	4798	8,48	-
	13	3480	8,15	-
	15	2690	7,90	-
	17	2080	7,64	-
	19	1444	7,27	-
	21	1368	7,22	-
	23	1277	7,15	-
	25	-	-	884
	27	-	-	707
	29	-	-	566
	31	-	-	453
	33	-	-	362
	35	-	-	290
	37	-	-	232
	39	-	-	186
	41	-	-	149
	43	-	-	119
	45	-	-	95
	47	-	-	76
49	-	-	61	
51	-	-	49	

Fuente: elaboración de este estudio.

Tabla 35. Proyección Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados

Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados	Tiempo (semanas)	HTP mg/kgss	Ln HTP (mg/kgss)	Proyección $A=e^{-kt+A_0}$
	0	17637	9,78	-
	1	12156	9,41	-
	3	9078	9,11	-
	5	7676	8,95	-
	7	7237	8,89	-
	9	6159	8,73	-
	11	5364	8,59	-
	13	4353	8,38	-
	15	4154	8,33	-
	17	3861	8,26	-
	19	3770	8,23	-
	21	3149	8,05	-
	23	3071	8,03	-
	25	-	-	2286
	27	-	-	1998
	29	-	-	1747
	31	-	-	1527
	33	-	-	1334
	35	-	-	1166
	37	-	-	1020
	39	-	-	891
	41	-	-	779
	43	-	-	681
45	-	-	595	
47	-	-	520	
49	-	-	455	
51	-	-	397	

Fuente: elaboración de este estudio.



**Tabla 36.** Proyección Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados más Nutriente (Urea)

Sedimento más Suelo con Microorganismos Adaptados más Nutriente (Urea)	Tiempo (semanas)	HTP mg/kgss	Ln HTP (mg/kgss)	Proyección $A=e^{-kt+A_0}$
	0	17637	9,78	-
	1	10649	9,27	-
	3	8368	9,03	-
	5	6760	8,82	-
	7	6377	8,76	-
	9	5492	8,61	-
	11	4328	8,37	-
	13	3622	8,19	-
	15	3488	8,16	-
	17	2358	7,77	-
	19	2194	7,69	-
	21	1997	7,60	-
	23	999	6,91	-
	25	-	-	1094
	27	-	-	897
	29	-	-	735
	31	-	-	603
	33	-	-	494
	35	-	-	405
	37	-	-	332
	39	-	-	272
	41	-	-	223
	43	-	-	183
45	-	-	150	
47	-	-	123	
49	-	-	101	
51	-	-	83	

Fuente: elaboración de este estudio.