COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE DIÉSEL EN SUELOS SOMETIDOS A PROCESOS DE BIOAUMENTACIÓN, BIOESTIMULACIÓN Y ATENUACIÓN NATURAL

CESAR ANDRES VALDERRAMA CHAVEZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL

SANTIAGO DE CALI

2019

COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE DIÉSEL EN SUELOS SOMETIDOS A PROCESOS DE BIOAUMENTACIÓN, BIOESTIMULACIÓN Y ATENUACIÓN NATURAL

CESAR ANDRES VALDERRAMA CHAVEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR POR EL TITULO DE INGENIERO SANITARIO Y AMBIENTAL

DIRECTORA:
LUZ EDITH BARBA HO
Química, M.Sc.
Profesora Titular – Universidad del Valle

CO-DIRECTORA:
NEYLA BENÍTEZ CAMPO
Bióloga, Ph.D.
Profesora Titular – Universidad del Valle

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL

SANTIAGO DE CALI

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN:

_____

_____

_____

_____

_____

Quim. LUZ EDITH BARBA HO. M.Sc.
Directora De Trabajo De Grado

Biól. NEYLA BENÍTEZ CAMPO Ph.D.
Codirectora De Trabajo De Grado

_____
Evaluador

_____
Evaluador

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha otorgado a lo largo de mi vida y por llegar a donde estoy.

A mi directora, Luz Edith Barba Ho por su orientación, seguimiento y supervisión continúa de este estudio, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este.

A mi Codirectora, Neyla Benítez Campo por su orientación, seguimiento y supervisión continúa de este estudio, pero sobre todo por su valiosa amabilidad y cooperación incondicional.

Al profesor José Hipólito Isaza Martínez, por su colaboración en los análisis químicos de cromatografía de gas acoplada a espectrofotometría de masas.

A la estudiante de Biología, Ximena González por su colaboración en los análisis biológicos y apoyo continúo.

A mis hermanas (Katherine Valderrama-Leidy Valderrama), por su apoyo moral.

A mis amigos y compañeros de la carrera que ayudaron y contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

En especial a mi madre, Yineth Chavez quien sin haber tenido todas las oportunidades y recursos en su momento para completar sus estudios, supo reconocer siempre que la educación y consecuente búsqueda del conocimiento es el más grande logro que se pueda conquistar.

A todos ustedes, muchas gracias

RESUMEN

Ante la contaminación desmedida de los suelos con hidrocarburos y específicamente con diésel, se llevó a cabo un estudio a escala de laboratorio durante un periodo de 100 días, donde se usó un diseño estadístico completamente al azar de un factor y 5 niveles, para evaluar el desarrollo de 5 tratamientos (Control Químico (C), Atenuación Natural (AT), Bioaumentación (BA), Bioestimulación (BS) y Control Microbiano (CM)). Los tratamientos se realizaron por triplicado en recipientes de plástico, los cuales contenían 2kg de suelo arcilloso con una concentración de 20,000ppm de diésel.

El análisis inicial del suelo estableció las características más importantes de la matriz donde tendría lugar el proceso de eliminación del combustible adicionado; revelando el valor de parámetros de interés para realizar el biotratamiento de los hidrocarburos, tales como: textura, pH, materia orgánica, conductividad eléctrica, densidad de la población microbial y su disposición de nutrientes (fósforo y nitrógeno).

Para evaluar el resultado de los tratamientos se midió el contenido de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) cinco (5) días después de contaminar el suelo y al finalizar el experimento. Además, se realizó el seguimiento semanal del pH, la temperatura y la humedad y mensual de Carbono orgánico y Actividad microbiana.

Los tratamientos estudiados revelaron la reducción de la concentración de los HTP en un 41,42% para el tratamiento por Atenuación Natural, 46,49% para el tratamiento por Bioaumentación y del 48,18% para el tratamiento por Bioestimulación. Este último mostró el mejor resultado para la reducción de hidrocarburos con diferencia significativa con el tratamiento de Atenuación Natural, pero sin tener una diferencia muy marcada con el proceso por Bioaumentación.

Palabras Claves: Biorremediación, Suelo, Hidrocarburos, Biodegradación, Microorganismos.

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN 9

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 10

3 JUSTIFICACIÓN 11

4 ANTECEDENTES 12

5 OBJETIVOS 16

5.1 Objetivo General 16

5.2 Objetivos Específicos 16

6 MARCO TEORICO 16

6.1 Hidrocarburos 16

6.1.1 Diésel 17

6.2 Contaminación del suelo 17

6.2.1 Contaminación del suelo por Diésel 18

6.3 Biorremediación del Suelo 18

6.3.1 Atenuación Natural 19

6.3.2 Bioestimulación 20

6.3.3 Bioaumentación 20

7 METODOLOGIA 21

7.1 Caracterización Fisicoquímica y Biológica del Suelo Antes y Después de los Tratamientos 21

7.1.1 Selección del Suelo 21

7.1.2 Pretratamiento de las Muestras de Suelo 21

7.1.3 Pruebas Fisicoquímicas y Biológicas del Suelo 21

7.2 Ensayos de Remoción de Diésel por Atenuación Natural, Bioestimulación y Bioaumentación 22

7.2.1 Ensayos Experimentales 22

7.2.2 Aporte de Nutrientes al Suelo 24

7.2.3 Selección de la cepa bacteriana para el tratamiento de bioaumentación y control microbiano. 26

7.3 Técnica de Extracción del Hidrocarburo del Suelo 27

7.3.1 Selección del Solvente para la Extracción del Diésel en el Suelo 27

7.3.2 Extracción del Diésel en el Suelo 27

7.3.3 Análisis de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) del Diésel 29

7.4 Análisis de Datos 29

8 RESULTADOS 30

8.1 Caracterización del Suelo 30

8.2 Variables De Control Semanal (Propiedades Físico-Químicas) 33

8.2.1 pH 33

8.2.2 Temperatura 34

8.2.3 Humedad 35

8.3 Actividad microbiana - Carbono orgánico 36

8.4 Recuento De Microorganismos En Cada Tratamiento 37

8.5 Remoción De Diesel En Los Tratamientos Evaluados 38

9 DISCUSIÓN 40

10 CONCLUSIONES 44

11 RECOMENDACIONES 45

12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 46

13 Anexos 60

13.1 Anexo I. Archivo fotográfico 60

13.2 Anexo II Determinación de Densidad aparente y real 62

13.3 Anexo III. Resultados Por CG/MS Para Cada Tratamientos Al Inicio Y Final Del Estudio 62

13.4 Anexo IV. Conversión A Unidades De mg/kg De Suelo Seco 66

13.5 Anexo V. Comparación de los espectro de CG/MS de la concentración inicial y final de cada tratamiento 67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Aplicación de Biorremediación en desastres a nivel mundial 13*

Tabla 2. *Resultados de estudios realizados con técnicas de biorremediación en hidrocarburos de petróleo 15*

Tabla 3. *Parámetros para la caracterización del suelo 21*

Tabla 4. *Condiciones experimentales 22*

Tabla 5. *Rangos óptimos para las variables 24*

Tabla 6. *Diseño estadístico 29*

Tabla 7. *Características Fisicoquímicas del suelo antes y después de los tratamientos 31*

Tabla 8. *Resultados del análisis de varianza 39*

Tabla 9. *Determinación de la densidad real 62*

Tabla 10. *Determinación de la densidad aparente 62*

Tabla 11. *Resultados por CG/MS de las concentraciones iniciales de HTP en cada uno de los tratamientos de biorremediación 62*

Tabla 12. *Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento Control (C) 63*

Tabla 13. *Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Atenuación Natural (AT) 63*

Tabla 14. *Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Bioestimulación (BS) 64*

Tabla 15. *Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Bioaumentación (BA) 65*

Tabla 16. *Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Control Microbiano (CM) 65*

Tabla 17*. Concentración final de HTP en mg/kg de suelo seco de todos los tratamientos de Biorremediación en unidades de mg/kg de suelo seco 66*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Esquema de los tratamientos con sus respectivas réplicas* *23*
Figura 2. *Cromatografía obtenida por CG/MS para la extracción de compuestos de hidrocarburo de un suelo contaminado con diésel* *27*
Figura 3*. Instrumentación para lavado del suelo y extracción del diésel* *28*
Figura 4. *Secuencias de acciones para la extracción del diésel en el suelo* *28*
Figura 5. *Promedio de la variación del pH para cada tratamiento* *34*
Figura 6. *Promedio de la variación de la temperatura para cada tratamiento* *34*
Figura 7. *Promedio de la variación de la humedad para cada tratamiento* *35*
Figura 8. *Carbono orgánico de cada tratamiento reportado cada mes durante el tiempo del experimento* *36*
Figura 9. *Actividad microbiana de cada tratamiento reportada cada mes durante el tiempo del experimento* *36*
Figura 10. *Resultados del recuento en placa de cada tratamiento. CQ: Control Químico, AT: Atenuación Natural, BS: Bioestimulación, BA: Bioaumentación y CM: Control Microbiano* *37*
Figura 11. *Espectrómetro de CG/MS para la concentración inicial promedio de HTP de todos los tratamientos* *38*
Figura 12. *Porcentaje de degradación de HTP que obtuvo cada tratamiento* *39*
Figura 13. *Resultado de CG/MS donde visualiza la concentración de HTP al inicio (Rosado) y la concentración final (Verde) de los tratamientos CQ, AT, BS, BA y CM en el mismo orden de aparición* *70*

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1*. Preparación y contaminación del suelo* *60*
Fotografía 2. *Localización de mesocosmos* *61*
Fotografía 3. *Instrumentación para la extracción del hidrocarburo del suelo* *61*

1 INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo ha sido una actividad económica significativa en Colombia (Morales et al., 2013), representando para el bienio 2017-2018 más de 9 billones de pesos en regalías presupuestadas (SICODIS, 2018). Sin embargo, es por su alta actividad en el país que ha llegado a ser una fuente de contaminación importante, pues hechos como el contrabando de hidrocarburos, fugas en tanques subterráneos, afloramientos naturales a través de las fisuras de la corteza terrestre, pérdidas accidentales en puntos de distribución, refinerías ilegales o los más de 2.500 atentados realizados por grupos armados a las estructuras de Ecopetrol, derramando cerca de 4´119.667 barriles de hidrocarburo (Ecopetrol S.A, 2015), son algunos de los acontecimientos que han generado impactos en la dinámica de los ecosistemas y en el suelo en particular, ocasionando cambios en sus características físicas, químicas y biológicas, es por esta razón que los hidrocarburos son catalogados como contaminantes ambientales prioritarios por la Agencia De Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Organización Mundial de Salud (OMS) y la Comunidad Europea (CE) (Menzie et al., 1992; Safdari et al., 2018, Hernández, 2018;).

Las principales consecuencias ambientales que se presentan en los suelos bajo una contaminación por hidrocarburos son: cambios en la dinámica poblacional de la fauna, reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal en el lugar del derrame y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos (Cevallos and García, 2018; Pérez, 2018; Dehghani et al., 2013). Sin olvidar sus impactos económicos, sociales y de salud pública en las zonas más cercanas al lugar afectado (Ñustez, 2012).

Para remediar estos daños se han creado diferentes tecnologías, no todas exitosas, como es el caso de los dispersantes químicos, del cual se descubrió que causaba un mayor impacto ecológico que el mismo derrame, por su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación (Vallejo, 2015; Pérez et al., 2008; Medina-Bellver et al., 2005 ; Siddiqui and Adams, 2002), caso contrario de los métodos biológicos, que han demostrado a través del tiempo ser eficientes y adecuados (Johnsen et al., 2005; Varjani, 2017), debido a que causan menor impacto en el sitio del problema.

Entre los métodos biológicos podemos encontrar la biorremediación, la cual es capaz de eliminar compuestos tóxicos del ambiente con el uso de los microorganismos (Macchi, 2018; Rajalingham, 2015). Estos poseen sistemas enzimáticos capaces de fraccionar las moléculas de hidrocarburo haciéndolas menos tóxicas para luego asimilarlas e incorporarlas a sus procesos metabólicos (Seo et al., 2009).

Entre las estrategias de biorremediación se destaca la Atenuación Natural, Bioestimulación y Bioaumentación. La Atenuación Natural es el tratamiento capaz de reducir la concentración del contaminante de forma natural gracias a la acción de las poblaciones nativas de microorganismos del suelo (Gómez et al., 2008), La Bioestimulación, es la introducción de nutrientes y sustancias químicas que estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos del suelo para mejorar el proceso biológico de remediación (Hernández, 2018; Wu et al., 2016; Bento et al., 2003) y por último la Bioaumentación, que es la técnica que permite usar bacterias previamente aisladas en

lugares contaminados para la biodegradación de un compuesto orgánico persistente, como es el caso de los hidrocarburos y en particular el de diésel (Ruiz et al., 2006; de Lorenzo et al., 2013).

Poder remover la contaminación de diesel del suelo, es de crucial importancia, pues además de ser uno de los combustibles más utilizados en la actualidad, presenta en su estructura compuestos poliaromáticos que se consideran potencialmente carcinogénicos para una amplia variedad de organismos entre los que se encuentran los mamíferos superiores. Situación alarmante ante su vertimiento desmedido en el suelo (EPA, 2010).

Teniendo en cuenta los daños que sufre el suelo bajo un derrame de diésel y el potencial de la biorremediación, se realizó este estudio con el propósito de comparar las diferentes técnicas de biorremediación, identificando la estrategia más eficiente para biodegradar hidrocarburos, utilizando en la Bioaumentación un inóculo bacteriano aislado previamente en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) de la Universidad de Valle denominado *Acinetobacter* sp.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La explotación petrolera nace desde 1750 (EIA, 2012), incrementando su uso en el mundo en casi 800 veces y alrededor de 12 veces solo en el siglo XX (Hall et al., 2003). Desde ese entonces ha facilitado el desarrollo de las actividades humanas, al igual que afectado severamente el entorno donde se desarrolla la extracción y el transporte de este recurso, lo que le concede a los hidrocarburos un papel protagónico en la problemática ambiental referente al suelo (Cardona et al., 2015; Contreras and Carreño, 2018).

Este aumento de la actividad petrolera en conjunto con los diferentes eventos de derrames de hidrocarburos en el suelo, ha llevado este recurso a afectaciones físicas y químicas, disminuyendo su fertilidad y la población microbiana presente, poniendo en riesgo la salud pública, pues el hidrocarburo tiene la capacidad de penetrar y entrar en contacto con las masas de agua subterránea (Bermeo, 2018; Rodríguez, 2013), produciendo afectaciones de tipo social y económico (Castro, 2006), debido a que el suelo es un componente fundamental de la biosfera, productor de alimentos, lo cual lo hace la base central de la agricultura. Por consiguiente el bienestar del suelo representa la diferencia entre la supervivencia o no de los seres vivos que habitan en él (Doran et al., 2000).

Como ejemplo de las consecuencias de los derrames, uno de los más recientes y representativos fue el del pozo Lizama 158 de Ecopetrol, en donde 550 barriles de crudo fueron derramados, afectando directamente a 9 personas, 49 cuerpos de agua, 25 km del Río Sogamoso, provocándole la muerte a 2,460 animales y a pesar que no impactó zonas agrícolas, perjudicó suelos aledaños al rio, deteriorando cerca de 6,000 árboles y desplazando a 60 familias. Se calcula que tardará alrededor de 20 años la reparación del daño ambiental (Vanguardia, 2018).

Los impactos que conllevan un derrame, en su mayoría se vuelven irreversibles, teniendo en cuenta que las técnicas de recuperación son aplicadas tiempo después de que los hidrocarburos ya han penetrado lo suficiente en los ecosistemas o simplemente, no se

realiza ninguna acción, dejando que la naturaleza se autodepure por si misma (Arrieta, 2011), como lo reflejado en el derrame ocurrido en Tumaco en el 2015, en donde la gestión del gobierno ha sido precaria, a pesar de haber dejado afectados a más de 160,000 habitantes, empeorando su situación económica (Tejada et al., 2016) y disminuyendo sus posibilidades de una vida digna y sana en todos los aspectos (FAO, 2012), la nación no responde, dejando ver una vez más el accionar sosegado que aplica para solucionar este tipo de tragedias.

En cuanto a los derrames con diésel, tenemos que a pesar que su uso es consideradamente alto, existe poca investigación referente al desarrollo de métodos para tratar una posible contaminación de diésel en un suelo, razón por la cual motiva a plantear la biorremediación como una buena alternativa ante la presencia de este combustible en un suelo.

Todo esto se ha venido presentando a pesar de la implementación de políticas ambientales, comenzando el 16 de diciembre de 2005, hace más de una década, donde se aprobó por el Consejo Nacional Ambiental, la Política Ambiental para la Gestión Integral de los Residuos o Desechos Peligrosos. El 30 de diciembre de 2005 entró en vigencia el Decreto 4741: “Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral”. Implementando también el protocolo internacional de Louisiana 29 B, el cual regula el tema de la biorremediación (Toro et al., 2015), respaldado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible que ha establecido que los hidrocarburos son compuestos tóxicos para el ambiente (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007).

Presentado todo lo que acarrea un desafortunado derrame de hidrocarburo en los suelos y sumado a que el tratamiento biológico solo es implementado en el 22% de los casos de descontaminación pese a sus ventajas (IDEAM, 2017) , se ha querido realizar y presentar este estudio, el cual es una alternativa viable para dar solución a la contaminación de los suelos con ayuda de microorganismos nativos o plenamente identificados.

3 JUSTIFICACIÓN

Los numerosos derrames de hidrocarburos, son eventos que repercuten adversamente en los suelos y desconocer el problema que estos conllevan sería restarle importancia a tal recurso en el desarrollo de cualquier país. Sabemos que a la par de la evolución del hombre, ha incrementado la contaminación de los recursos naturales y a pesar de los avances tecnológicos, estos no han tenido presente, en su gran mayoría, minimizar la carga contaminante que se deposita en la superficie (Burbano, 2017).

Se conoce que el suelo tiene un rol fundamental en la degradación química, gracias a que se ha utilizado durante mucho tiempo como depósito de residuos, no obstante ha sido tanta la carga contaminante suministrada que ha entrado a una degradación de forma espiral que a su paso afecta a otros componentes del ecosistema y, en lo social, genera pobreza a las comunidades que resultan involucradas. Pese a esto y a que afecta directamente a mas de 1,500 millones de personas en el mundo, la valoración social respecto al suelo es escasa y se debe quizás a que no es un bien que se consuma

directamente y porque se considera, erróneamente, que es renovable a escala humana (Zúñiga, 2017; Zinch, 2014; Burbano, 2017).

Es en este punto donde la implementación de métodos de remediación de los suelos se hace crucial, volviendo importante el desarrollo de este estudio. A pesar que ha venido siendo tema de investigación desde finales del siglo XIX, aplicando tecnologías de carácter físico, químico y biológico, disciplinas como la biorremediación son catalogadas como innovadoras (Varjani, 2017). La Biorremediación es un tratamiento que aprovecha la capacidad de los microorganismos para degradar compuestos químicos orgánicos en sustancias inocuas para el ambiente, estos toman los compuestos orgánicos como fuente de alimento debido a que contienen carbono, o también los co-metabolizan convirtiéndolos en H_2O, CO_2 (aerobio) o en CH_4 (anaerobio), producto de sus procesos bioquímicos (Ramírez-Elías et al., 2014; Macchi, 2018; Varjani, 2017).

Esta investigación aporta información sobre el método de bioaumentación inoculando una cepa microbiana con capacidad degradativa de hidrocarburos que se encuentra en la colección de microorganismos del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, que fue inoculada en un suelo contaminado con hidrocarburos y comparada con dos técnicas de biorremediación conocidas como Atenuación Natural y Bioestimulación. Se enfoca sólo en las tecnologías de carácter biológico, dado que presentan ventajas potenciales sobre las tecnologías convencionales, como menor costo, son menos intrusivas en el sitio contaminado, más amigables con el ambiente en términos de sus productos finales y requieren de un mínimo o ningún tratamiento posterior (Hernández, 2018; Kuppusamy et al., 2017; EPA, 2004).

Los resultados de esta investigación contribuyen a la toma de decisiones a corto plazo que sumado con el desarrollo sustentable detendrá el deterioro ambiental, lo cual es primordial en estos momentos, teniendo en cuenta que más de 49 millones de Km^2 de tierra firme, lo equivalente al 33% de la superficie de la tierra, se encuentra contaminada por diferentes agentes, entre esos los derrames de compuestos químicos (FAO, 2015). Si no hay ningún apoyo hacia estas pequeñas iniciativas de remediación de los suelos, todos los daños ocasionados por el hombre hacia la naturaleza, podrían conducir a un nivel tan alto de contaminación, que haría imposible su recuperación (López Santos, 2016).

Preservar el suelo no sólo debe ser prioridad del sector agrícola, sino de toda la sociedad. “Un suelo sano es vital para el ser humano y un mal manejo de este recurso conlleva a efectos adversos a través de lo que comemos, bebemos, respiramos y tocamos”, es por ello que todo aporte dirigido a presentar, estudiar, comparar o implementar medidas de remediación se vuelve relevante (Siebe and Cram, 2015).

4 ANTECEDENTES

La problemática ambiental ocasionada por los derrames de hidrocarburos en suelos, los cuales han vertido más de 64 mil millones de barriles a nivel mundial (Tejada et al., 2016), lo que equivale a la cantidad que se extrae en todo el mundo en tres años, han ocasionado daños a gran escala, es por esta razón que se han ido desarrollando una serie de técnicas, entre ellas la biorremediación, de la cual se tienen registros desde tiempo ancestrales por los romanos, comunidad que las aplicaba con gran lucidez en el

tratamiento de sus aguas residuales, donde hacían uso de microorganismos para la degradación de contaminantes en el agua (Rincón, 2004).

En el año 1895 se iniciaron los primeros estudios, hechos por Miyoshi, el cual estudió la capacidad degradadora de los hongos sobre los Hidrocarburos de petróleo (HP) (Zegarra, 2000), claro está que esto también fue motivado por la aparición de la primera perforación de un pozo petrolero, realizada en Titusville (Pennsylvania) en 1859 (Vizuete, 2011), si bien algunos yacimientos petrolíferos fueron explotados desde la antigüedad, podemos considerar que el verdadero punto de partida de la industria del crudo fue este y por ende el de la contaminación ambiental por hidrocarburos.

A mitad del siglo XX se conocieron los primeros estudios sobre la habilidad de los microorganismos para biodegradar contaminantes utilizándolos como única fuente de energía y de carbono, estimulados con nutrientes esenciales (Zobell, 1946; Davis et al., 1956).

Un aporte importante para la biorremediación fue el de George M. Robinson en 1960, definida como *"La eliminación de contaminantes presentes en el suelo mediante procesos biológicos llevados a cabo por microorganismos"* , en donde detalla el comportamientos de los microorganismos ante los contaminantes y como lo hacen parte de su alimentación, dejando a su paso un suelo libre de contaminantes (Castaño, 2018; USDA, 1972). Es en este momento en donde las diferentes tragedias relacionadas con derrames de hidrocarburos se prestan como oportunidades reales para aplicar los métodos de biorremediación estudiados hasta el momento. En la Tabla 1 se presenta la información relacionada con los eventos ocurridos y la técnica utilizada.

Tabla 1. Aplicación de Biorremediación en desastres a nivel mundial

LUGAR	AÑO	CAUSA	CANTIDAD (Barriles)	TÉCNICA UTILIZADA	% DE REMOCIÓN
Pensilvania	1975	Derrame en pozo petrolero	3,200	Bioestimulación	34%
Francia	1978	El buque Amoco Cádiz encalló en la costa británica de francia	1.6 millones	Control Biológico y bioestimulación	45%
Trinidad & Tobago	1979	Colisión entre los buques Atlantic Empress y el Aegean Captain	2.2 millones	Bioestimulación	N.R
Alaska	1989	El Exxon Valdez encallo en una reserva natural	240,000	Bioestimulación	50%
Golfo de México	2010	Explosión de plataforma petrolera	4 millones	Biorremediación	N.R.

Fuente: Jamison and Raymond, 1975; Chasse,1978; Pérez et al., 2004; Bermúdez and Corredor, 2010; García and Aguirre, 2014.
N.R.: No Reportado.

Paralelamente se desarrollaron los métodos de ingeniería que permitieron mejorar los rendimientos de la otra gran familia de técnicas ("*ex situ*") como fueron el landfarming, compostaje, biopilas y otras (Herrero, 2004; Delgadillo et al., 2016). Las cuales son tecnologías que se pueden desarrollar bajo condiciones controladas, aportando en gran medida a la ciencia.

Para los 90´s el uso de microorganismos para la descontaminación de suelos con presencia de petróleo, era catalogado como la manera más económica, innovadora, adaptable y eficiente para esta tarea (Bartha, 1986; Atlas, 1991). Además en la misma fecha se implementaron las técnicas de burbujeo de oxígeno, la cual hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático, ampliando así las fronteras de acción de este tipo de remediación de hidrocarburos (Cardona et al., 2014).

A comienzos del siglo XXI las investigaciones para mejorar las técnicas de biorremediación no se hicieron esperar, en donde se descubrió que los surfactantes y/o biosurfactantes aumentan las eficiencias, sin embargo se advierte que estos se deben utilizar con precaución, pues implican riesgos (Chen et al., 2000; Cameotra et al., 2003; Kosaric, 2001). También se identificó que la adición de compostaje enriquece los suelos con poblaciones microbianas biodegradadoras y con un alto porcentaje de materia orgánica biodegradable, provocando un aumento de la capacidad biorremediadora intrínseca de cada suelo contaminado.

En el caso de Colombia, la gran cantidad de incidentes de derrames, se han presentado por diversas circunstancias entre las que cabe destacar: voluntaria, accidental o por atentados de grupos al margen de la ley. Esto ha generado una serie de estudios, con la intención de caracterizar cada uno de los tipos de suelos presentes en las diferentes regiones de Colombia, con el propósito de recomendar que técnica de biorremediación es la más acertada según la ubicación del derrame (Delgado et al., 2009).

En la Tabla 2 se detallan algunos estudios donde se llevo a cabo biorremediación a suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

En la tabla 2 podemos encontrar varios estudio que se han realizado para remediar suelos contaminados con diesel obteniendo resultados en su mayoría por encima del 60%, como es el caso de Namkoong (2002), Bento (2005), Alisi (2009), Liu (2010) y Taccari (2011), claro esta, que estos fueron desarrollados en suelos en su mayoría arenosos, la cual es una textura propicia para el crecimiento de microorganismos en donde se ejecutan con mucha facilidad las técnicas de biorremediación (Acuña et al., 2009).

En cuanto al uso de la bacteria denominada *Acinetobacter* sp, investigaciones tales como Mishra et al. (2001), Grisales (2017) y Varjani (2017) demostraron la gran efectividad que tiene este microorganismo para el consumo de algunos compuestos del hidrocarburo, llegando hacer utilizados en técnicas de bioaumentación en los estudios desarrolladas por Wu et al (2013) y Wu et al (2016) con porcentajes de degradación de hidrocarburos de entre 35 y 50%.

Se tiene presente el hecho que la comprensión de la dinámica y comportamiento de las comunidades microbianas es fundamental para el desarrollo de la biorremediación y se reconoce que los avances presentados hasta el momento no han alcanzado este nivel de discernimiento, teniendo en cuenta que cada situación tiene sus particularidades (Rahman et al., 2003; Widder et al., 2016).

Tabla 2. Resultados de estudios realizados con técnicas de biorremediación en hidrocarburos de petróleo

Autor	Año	Técnica Utilizada	% de Remoción	Tiempo de Acción	Textura del Suelo	Autor	Año	Técnica Utilizada	% de Remoción	Tiempo de Acción	Textura del Suelo
Namkoong et al.	2002	Bioestimulación	64%-98%	3 meses	franco-arenoso	Wang X.	2012	Bioestimulación	49.62%	7 meses y 9 días	Lodos
Gogoi et al.	2002	Combinación de bioventing, bioestimulación y bioaumentación	> 75%	12 meses	Arenoso	Gong X.	2012	Bioestimulación	88.9%	4 meses	Arenoso
Mills M.	2004	Bioestimulación	90%-95%	4 meses y 18 días	Humedal	Li X.	2012	Bioestimulación	32.9%	2 meses	N.R.
Sarkar D.	2004	Bioestimulación y atenuación natural	Bioestimulación 96%	1 mes y 18%	Arcilloso	Mao J.	2012	Bioaumentación	35%	2 meses	N.R.
Bento F.	2005	Atenuación Natural, bioestimulación bioaumentación	Bioaumentación 72-75%	2 meses y 12 días	arenoso	Lladó et al.	2013	Bioestimulación y Bioaumentación	71%-73%	6 meses	Arcilloso
Ayotmuno M.	2007	Bioaumentación	84.5%	1 mes y 6 días	lodo	Ruiz et al.	2013	Atenuación natural y Bioaumentación	40.3%	3 meses	Franco Arcilloso arenoso
Pao et al.	2008	Bioestimulación y Bioaumentación	(60% - 80%)	5 meses	Franco Arenoso	Jeong et al.	2014	Atenuación natural y Bioestimulación	45% - 75%	30 días	franco arcilloso
Byss et al.	2008	Biorremediación	(20% - 80%)	5 meses	N.R.	Colla et al.	2014	Bioestimulación y Bioaumentación	35.7%-32.2%	32 dias	Franco arenoso
Alisi C.	2009	Bioaumentación	> 75%	1 mes y 6 días	Arenoso	Fan et al.	2014	Combinación de bioaumentación y bioestimulación con levadura	42%-82%	6 meses	Franco arcilloso
Teng Y.	2009	Bioaumentación	23.4%	28 días	Franco limoso	Adams	2015	Combinación de bioaumentación y bioestimulación	70% - 90%	1 - 4 meses	N.R.
Liu et al.	2009	Bioestimulación y Bioaumentación	70%	4 meses	Lodo	Wang et al.	2016	Combinación de bioaumentación y bioestimulación	83%	6 meses	limoso
Liu C.	2010	Combinación de bioaumentación y bioventing	87%	1 mes	N.R.	Benyahia et al.	2016	Bioestimulación, Bioaumentación y atenuación natural	23% - 77%	5 meses y 15 dias	Franco Arenoso
Xu Y.	2010	Combinación y comparación de bioestimulación y bioaumentación	Combinación de técnicas 61%	2 meses y 12 días	Franco Arcilloso	Haghollahi et al.	2016	Bioaumentación	23.5% - 70%	9 meses	Arcilloso-Arenoso-Limoso
Chang W.	2010	"Landfarming"	55%	2 meses	Arenoso	Wu et al.	2016	Bioestimulación y Bioaumentación	34% - 60%	3 meses	N.R.
Liu P.	2011	Comparación y Combinación de bioaumentación y bioestimulación	> 80%	4 meses y 18 días	Franco Arenoso	Trejos	2017	Bioestimulación y atenuación natural	>50%	2 meses y 20 dias	Franco Arenosa
Tahhan R.	2011	Bioaumentación	> 30%	6 meses y 18 días	Franco	Delgado	2017	Bioestimulación, Bioaumentación y atenuación natural	53.8 % - 76.9%	3 meses	Franco Arenosa
Karamalidis A.	2011	Combinación de bioaumentación y bioestimulación	79%	6 meses y 9 días	Arenoso	Martínez	2018	Bioestimulación, Bioaumentación y atenuación natural	28% - 88%	3 meses	Franco Arenosa
Taccari M.	2011	Combinación de bioaumentación y bioestimulación	96%	4 meses	Franco	Peréz	2018	Bioestimulación y Bioaumentación	99.25%	2 meses y 10 dias	Arenoso Arcilloso
Beskoski V.	2011	Combinación de bioaumentación y bioestimulación	94%	5 meses	Arcilla Arenosa	Siles et al.	2018	Bioestimulación y atenuación natural	46.5% - 74.7%	4 meses	N.R

Fuente: Adaptado de Plata (2012)
N.R.: No Reportado

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Comparar la eficiencia de remoción de diésel en suelos sometidos a procesos de Bioaumentación, Bioestimulación y Atenuación Natural.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo en estudio, antes y después de los tratamiento.
- Evaluar la capacidad de remoción de hidrocarburos totales de petróleo presentes en el diésel al adicionar una cepa bacteriana de *Acinetobacter* sp.
- Determinar el método de biorremediación más eficiente para la degradación de hidrocarburos totales de petróleo presentes en un suelo contaminado con diésel.

6 MARCO TEORICO

6.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos químicos formados por átomos de carbono e hidrógeno y presentan una estructura a manera de armazón donde se ligan los átomos de hidrógeno; según la estructura de los enlaces entre los átomos de carbono, se clasifican en:

- Hidrocarburos alifáticos o de cadena abierta: estos a su vez se dividen en:
  - Hidrocarburos saturados (alcanos o parafinas), que no tienen enlaces dobles, triples, ni aromáticos.
  - Hidrocarburos insaturados, que tienen uno o más enlaces dobles (alquenos u olefinas) o triples (alquinos o acetilénicos) entre sus átomos de carbono.

- Hidrocarburos cíclicos, que a su vez se subdividen en:
  - Hidrocarburos nafténicos, que tienen cadenas cerradas de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono saturados o no saturados
  - Hidrocarburos aromáticos, no saturados, que poseen al menos un anillo aromático además de otros tipos de enlaces que puedan tener (Marín, 2004).

En los hidrocarburos existen conjuntos de compuestos que presentan altas tasas de biodegradabilidad y otros con dificultad para realizar esta acción, pues tienen variaciones en cuanto a la longitud de sus cadenas, ramificaciones, presencia de anillos, combinaciones con otras moléculas, estado físico y toxicidad, entre otras, siendo más fácilmente biodegradables aquellos de estructuras moleculares más simples (Cardona and Montero, 2014). Claro está que al inicio todos necesitan de condiciones aerobias para romper las primeras cadenas de hidrocarburo (Eweis et al., 1999; Meckenstock, et al., 2016).

En cuanto a los hidrocarburos altamente resistentes a la degradación están los hidrocarburos cíclicos, pues se componen de grupos moleculares fisicoquímicamente diferentes, estructurados con dos o más anillos de benceno fusionados entre sí, donde un par de átomos de carbono se comparte (Kuppusamy et al., 2016). Son contaminantes orgánicos hidrofóbicos altamente persistentes en el suelo y en los sedimentos (Cébron et al., 2008),

En casos donde sea necesario medir la presencia de cada hidrocarburo en una muestra y dado que existe un gran número de estos que se involucran generalmente, se hace uso de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), que se utiliza para describir a un grupo de sustancias químicas, derivadas del petróleo crudo, haciendo útil medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburos que se encuentran en una muestra de suelo contaminada que sirve como indicador general del tipo de contaminación (Ortiz et al., 2005).

6.1.1 Diésel

Es la fracción petróleo que es destilado después del queroseno, utilizado principalmente como combustible en motores diesel y en calefacción. Tiene una densidad de 850 kg/m-3 (0,850 g/cm-3), un punto de ebullición entre 200 y 360 °C (Petenello and Feldman, 2012)

El diesel esta compuesto esencialmente por n-alcanos (65-85)% de cadenas lineales y ramificadas (parafinas), cicloalcanos, hidrocarburos policíclicos, aromáticos, azufre, entre otros (Bernal, 2015).

6.2 Contaminación del suelo

Se definen los suelos como sistemas dinámicos y complejos, compuestos por varias capas verticales llamadas horizontes, las cuales resultan de diferente factores, entre los que se encuentran el clima, la topografía, los materiales a partir de los cuales se forma y la diversidad de los seres vivos que lo pueblan (Cortinas C., 2002).

Se determina que un suelo está contaminado cuando su capacidad para depurarse por sí mismo es tan baja que comienza a representar un peligro para los ecosistemas y para la salud pública, pues se eleva su nivel de toxicidad. Esta contaminación produce que el suelo cambie sus propiedades físicas, químicas o biológicas (Carrillo et al., 2017).

Al indicar que un suelo está contaminado se está advirtiendo de la presencia de uno o varios compuestos o elementos en una concentración tal que genera efectos desfavorables en los organismos, causando cambios ecológicos. La contaminación del suelo es un fenómeno de origen fundamentalmente antrópico que se produce como consecuencia de la eliminación incontrolada de sustancias químicas al ambiente durante los procesos productivos desarrollados por el hombre (Rodríguez, 2013).

Las sustancias más frecuentemente involucradas en la contaminación del suelo por fugas o derrames de materiales o residuos peligrosos en su mayoría son los hidrocarburos, representando un alto grado de contaminación ambiental (Santos, 2007).

6.2.1 Contaminación del suelo por Diésel

A la par del desarrollo mundial de los últimos tiempos, se ha incrementado de igual forma la presencia de contaminantes sólidos y líquidos, así también como los gases contaminantes a la atmósfera. A este grave problema de contexto ambiental, aproximadamente el 54% corresponde a derivados del petróleo, entre esos el diésel. Así que, debido a esto, el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos es esencial para mantener la calidad del ambiente (Rosales, 2008).

En primer medida los compuestos de hidrocarburo del diésel son considerados tóxicos y cancerígenos, culpables de alterar células, tejidos u órganos en los seres vivos, con la capacidad de penetrar en los suelos e iniciar procesos físico-químicos, que son dados gracias a que impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, pues son compuestos hidrofóbicos (Varjani, 2017). Estos procesos pueden ser más o menos lentos dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida (Pellini, 2006). Todos estos factores deben ser identificados ante un derrame, debido a que una pequeña cantidad en un área susceptible puede ocasionar un daño mayor que una gran cantidad en una costa rocosa desolada (Canals, 2005).

Debido al alto consumo del diésel, al momento de ser transportado este, ocurren accidentalmente números derrames al suelo que generan desequilibro inmediato en sus nutrientes esenciales, tales como carbono, nitrógeno, fósforo y potasio, puesto que se presenta una adición descontrolada de carbono perdiendo fertilidad el suelo, afectando también el pH (potencial de hidrógeno).

Una contaminación por hidrocarburos en un suelo provoca una moderada o alta salinidad, la cual puede destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, llevando a que muchos microorganismos indispensables para el mantenimiento de la funcionalidad del suelo, mueran, afectando la autoremediación de este, puesto que la actividad de los microorganismos es de vital importancia para que se lleve a cabo la degradación de los hidrocarburos presentes en el mismo (Rodríguez , 2013).

6.3 Biorremediación del Suelo

En la degradación de algunos contaminantes del suelo 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 la contaminación (Arroyo et al., 2002;Cabanillas and Pissani, 2015).

La biorremediación es la técnica donde se utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Galindo & Llontop, 2015). Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación. La ventaja aquí es que estos no producen ninguna sustancia tóxica, mucho menos algún

tipo de reacción secundaria en el medio ambiente en el que van a ser aplicados (Van Deuren et al., 1997; Maldonado and Narváez, 2003; Sajna et al., 2015).

Se debe tener en cuenta que antes de empezar un proyecto de biorremediación es recomendable realizar un estudio de factibilidad para caracterizar las propiedades específicas del sitio, evitando así inconvenientes que atrasen o en el peor de los casos que impidan la realización del proyecto (Martínez and Casallas, 2018). El estudio comprende dos partes:1) la caracterización de las propiedades físico-químicas del suelo a tratar y del contaminante, y 2) la determinación del potencial de los microorganismos del sitio para descomponer los hidrocarburos. (Schroeder et al., 1999).

La caracterización físico-química es de gran importancia para la biorremediación, porque basados en ella se emplean mejoras en las condiciones del ambiente para favorecer la actividad microbiana, como son el pH, la conductividad, textura, carbono orgánico, nutrimentos inorgánicos (como N, P, K, Ca, Mg), tipo y concentración de hidrocarburo, así como la toxicidad del material (Boopathy, 2000; Varjani et al., 2016).

La biorremediación se presenta en varias técnicas, una de ella es la denominada Atenuación Natural, que es cuando el mismo suelo haciendo uso de su autodepuración, remueve todo contaminante con la ayuda de los microorganismos nativos (Narváez, 2005). La bioestimulación es otra técnica, que se caracteriza por estimular el crecimiento y elevar las tasas de biodegradación de los microorganismos nativos con la adición de nutrientes y oxigeno (Narváez, 2005). Por ultimo esta la bioaumentación, en donde se inoculan en el suelo contaminado microorganismos propicios para remover el contaminante (Prince, 2002).

El mejoramiento de las distintas técnicas de biorremediación requiere de estudios profundos de los factores que gobiernan la diversidad, dinámica y versatilidad catabólica de la comunidad microbiana del sitio contaminado (Macchi, 2018).

6.3.1 Atenuación Natural

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 and Paschal, 2008).

La atenuación natural, aunque no está considerada como una técnica de descontaminación propiamente dicha, está englobada dentro de las técnicas de remediación "*In Situ*". Su característica principal es la utilización de los procesos fisicoquímicos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio. Estos procesos se conocen como procesos de biotransformación natural (Delgado et al., 2009).

Los procesos de biotransformación natural son aquellos que van a reducir la concentración de los contaminantes y entre los que se encuentran la dilución, dispersión, volatilización, adsorción, biodegradación y aquellas reacciones químicas que se producen en el suelo y que contribuyen de alguna forma a la disminución de la contaminación. Esta

técnica se aplica en aquellos casos en los que exista contaminación producida por hidrocarburos de tipo halogenado o no halogenado.

6.3.2 Bioestimulación

La Bioestimulación es la estimulación de los microorganismos nativos del suelo, que se lleva a cabo con la adición de nutrientes, agua, oxigeno, aceptores de electrones, entre otros elementos que permitan el buen desarrollo de los microorganismos para activar y acelerar la degradación del contaminante (Manacorda and Cuadros, 2005; Borrasen y Rike, 2007).

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 (Taccari et al., 2012).

6.3.3 Bioaumentación

Esta técnica de biorremediación se presenta cuando se adicionan cepas de microorganismos externos (diferentes a los nativos), al suelo contaminado, los cuales ya se identificaron como microorganismos con una alta capacidad para degradar el contaminante (Herrero, 2016).

Una de las ventajas de esta técnica es que 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 et al., 2010).

Para mejorar la bioaumentación se ha estudiado la forma de aclimatar o incluso modificar genéticamente en el medio los microorganismos, para elevar su potencial de biodegradabilidad, proporcionando porcentajes de remoción de contaminantes mucho más altas (Atlas et al., 1999).

Una clara desventaja de inocular microorganismos capaces de degradar contaminantes orgánicos en cultivos, es que pueden abandonar su función cuando se aplican en ambientes naturales, pues pueden ser susceptibles a toxinas o depredadores en el ambiente (Márquez et al., 2001).

Una de los microorganismos que han sido identificados como degradadores de hidrocarburos y utilizados en la bioaumentación es la bacteria denominada *Acinetobacter* sp. Esta se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y es fácilmente aislada de muestras de suelo, su papel en la degradación de compuestos orgánicos en los ambientes en los cuales son encontradas es importante ya que pueden usar algunos compuestos de los hidrocarburos como fuente de carbono.

7 METODOLOGIA

7.1 Caracterización Fisicoquímica y Biológica del Suelo Antes y Después de los Tratamientos.

El estudio del suelo se inició con su selección, que se realizó bajo una serie de requisitos, seguido por un pretratamiento, que fue efectuado para garantizar las condiciones a cada tratamiento y por último se realizaron las pruebas Fisicoquímicas y biológicas para determinar sus características.

7.1.1 Selección del Suelo

El suelo utilizado en el estudio fue colectado al interior de la sede Meléndez de la Universidad del Valle. En el cual se garantizó que estuviera libre de contaminación con hidrocarburos. La muestra fue extraída de un área aproximada de 20 m^2 a una profundidad comprendida entre 10 y 30 cm una cantidad de aproximada de 30 kg (Atlas and Bartha, 2002).

7.1.2 Pretratamiento de las Muestras de Suelo

El suelo para todos los tratamientos se secó y posteriormente fue tamizado a tamaños de partícula entre 2 y 2.36mm (tamices Pinzuar), garantizando así un proceso aerobio y una distribución más homogénea del hidrocarburo en el suelo. Después de tamizado se esterilizaron 12kg de suelo para el Tratamiento Control Químico (*CQ)* y Control Microbiano (*CM*), en una autoclave operando a una temperatura de 121ºC y una presión de 1.5 Kg/cm^2 durante 30 minutos y en dos oportunidades (Peñaloza et al., 2013).

7.1.3 Pruebas Fisicoquímicas y Biológicas del Suelo

Se llevaron a cabo pruebas físicas, químicas y biológicas para caracterizar el suelo. Estas pruebas se realizaron al inicio y final del experimento, con el interés de dimensionar los cambios y transformaciones que sufrió el suelo ante la contaminación con Diésel y posterior biorremediación. Las pruebas se listan en la Tabla 3 y se evaluaron de acuerdo con Jaramillo (2002):

Tabla 3. Parámetros para la caracterización del suelo

PARAMETRO	MÉTODO	TÉNICA ANALÍTICA
Físico-Químicos		
Densidad Real	Picnómetro	Domínguez & Aguilera, 1989
Densidad Aparente	Parafina	Domínguez & Aguilera, 1989
Cantidad de Agua	Gravimétrico	Jackson, 1964
Textura	Bouyoucos	Bouyoucos, 1962
Porosidad	Fracción Sólida	Método por diferencia porcentual
pH	Potenciómetro	Jackson, 1964
Conductividad Eléctrica	Extracto de Saturación	Jackson, 1964
Carbono Orgánico	Walkley - Black o Calcinación	Walkley & Black, 1934

Nitrógeno	Semimicro-Kjeldahl	Jackson, 1964
Fósforo	Bray y Kurtz II	Bray & Kurtz, 1945
Biológicas		
Actividad Microbiana	CAB	Guitián y Carballas, 1976
Recuento de microorganismos	Recuento en placa	American Society of agronomy, 1982
Contaminante		
Hidrocarburos	Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-MS)	Trejos, 2017

7.2 Ensayos de Remoción de Diésel por Atenuación Natural, Bioestimulación y Bioaumentación

El suelo fue contaminado con 20,000 mg de diésel/kg de suelo seco total, cantidad que es recomendada para la buena aplicación de procesos de biorremediación, debido a que es inferior a 50,000 ppm (mg/kg de suelo seco total) (López et al., 2006; Delgado et al., 2009; Ortiz et al., 2005). Este suelo luego fue sometido a biorremediación por las siguientes tres (3) técnicas:

- Atenuación Natural (*AT*),
- Bioestimulación (*BS*) y
- Bioaumentación (*BA*).

Además, se construyeron 2 tratamientos más, uno denominado Control Químico (CQ) y el otro, Control Microbiano (CM), para un total de 5 tratamientos.

7.2.1 Ensayos Experimentales

Se realizó el siguiente montaje experimental según la Tabla 4 (Gómez et al., 2009) :

Tabla 4. Condiciones experimentales

Aspecto	Determinación
Lugar	Estación de experimentación de Biología (Univalle)
Concentración de Hidrocarburo	20,000 mg de Diesel/kg de suelo seco total
Unidad Experimental	Recipiente plástico
Número de Tratamientos	5 Tratamientos
Réplicas	3 por cada tratamiento
Cantidad de suelo por replica	2 kg de suelo
Variables de Control semanal	pH - Humedad - Temperatura
Variables de Control mensual	Carbono Orgánico - Actividad Microbiana
Variables de Respuesta	Hidrocarburos Totales de Petróleo
Duración del experimento	100 días

Los tratamientos se construyeron de la siguiente manera:

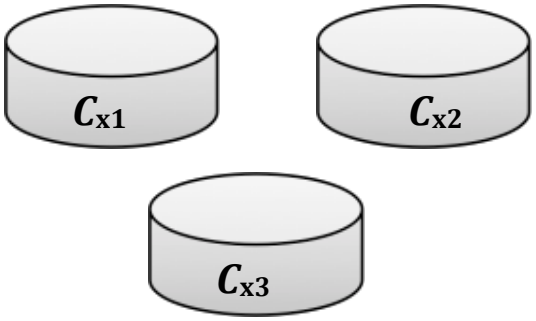
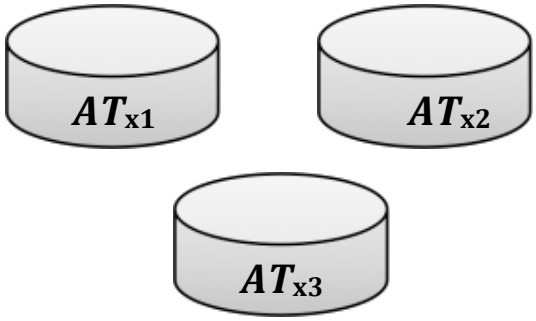
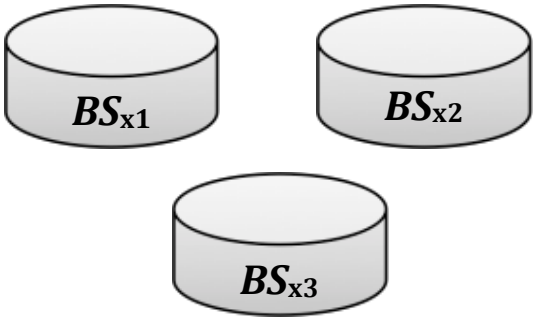
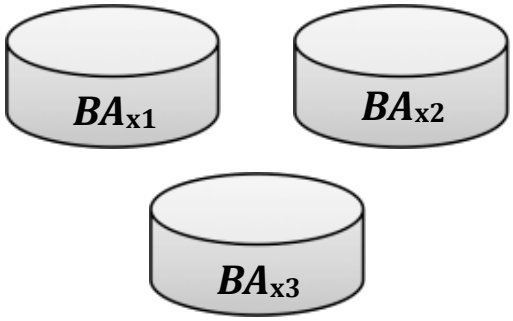
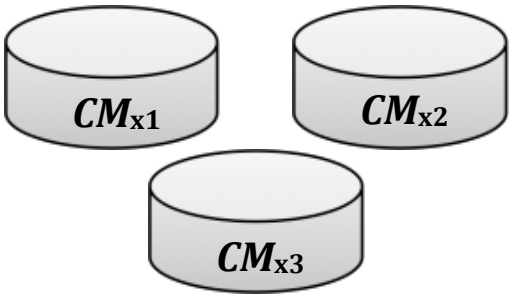
Tratamiento (*CQ*) CONTROL QUÍMICO : 2kg de suelo estéril + HCl + Diésel	**Tratamiento (*AT*) ATENUACIÓN NATURAL:** 2kg de suelo + Diésel
	
Tratamiento (*BS*) BIOESTIMULACIÓN: 2kg de suelo + Nutrientes + Diésel	**Tratamiento (*BA*) BIOAUMENTACIÓN:** 2kg de suelo + *Acinetobacter* sp. + Nutrientes + Diésel
	
Tratamiento (*CM*) CONTROL MICROBIANO: 2kg de suelo estéril + *Acinetobacter* sp. + Nutrientes + Diésel	
	

Figura 1. Esquema de los tratamientos con sus respectivas réplicas

Se le agregó al tratamiento Control Químico 100 ml de HCl a una concentración 2M, se suministro esta dosis en 7 oportunidades durante las primeras 7 semanas, con la intención de disminuir el pH del suelo (Gómez et al., 2009) y de esta forma inhibir el crecimiento bacteriano. Para el tratamiento de Atenuación Natural no se ejerció ninguna intervención, dejando que el suelo activara sus propiedades remediadoras de forma natural.

En los tratamientos de Bioestimulación, Bioaumentación y Control Microbiano se les adicionaron los nutrientes según las cantidades calculadas en el apartado 7.2.2, además de realizar una oxigenación para el suelo de manera manual, la cual consistió en mezclar y voltear el suelo periódicamente cada 3 días.

Al tratamiento de Bioaumentación se le inoculo una cepa bacteriana denominada *Acinetobacter* sp., a una concentración de Densidad Óptica (D.O.) $_{600nm}$ = 0.9 , al igual que se hizo en el tratamiento de Control Microbiano, solo que en este se realizó bajo un suelo que había sido previamente esterilizado, con la intención de garantizar la presencia única de la bacteria inoculada. Cabe aclarar, que esta condición solo pudo garantizarse al inicio.

Se adicionó 150 ml de agua a todos los tratamientos semanalmente, con la intención de mantener el suelo en un rango óptimo de humedad. Esto se logro realizando la prueba del método gravimétrico, en donde se cálculo el contenido de agua a capacidad de campo (CC) y basados en este, se procuró mantener la humedad en el intervalo que se indica en la tabla 5, dado que se ubica en el rango de humedades recomendadas por Acuña et al (2012), Moliterni (2016), Butenschoen et al. (2011) y Refugio et al. (2011) para procesos de biodegradación.

Como medida de seguridad para un buen desarrollo de cada uno de los tratamientos se trabajaron los siguientes rangos en las variables de control. El pH, la temperatura y la humedad, fueron medidos en cada uno de los tratamientos en el Laboratorio de Química Ambiental de la Escuela Eidenar de la Universidad del Valle.

Tabla 5. Rangos óptimos para las variables

Propiedad	Rango optimo
Temperatura (°C)	20° - 40°
pH (unidades)	6 – 8
Humedad	20% - 70% de la capacidad de campo
Nutrientes C:N:P	100:12:2 - 100:2:0.2

Fuente: Tomado de Prada (2016)

7.2.2 Aporte de Nutrientes al Suelo

La dosificación de nutrientes en los tratamientos de bioestimulación (Tratamiento *BS, BA* y *CM*), fue calculada mediante relaciones estequiométricas establecidas por el método de McCarty (Rittmann & McCarty, 2001). Este método realiza un balance de masas determinando la cantidad de nutrientes y aceptores de electrones que necesitan los

microorganismos, obteniendo una estimación de la cantidad de productos finales en el diseño de sistemas de tratamiento biológico. Para obtener la reacción global es necesario conocer la reacción de energía y síntesis celular de los microorganismos. Estas se logran con las siguientes ecuaciones:

Reacción de Energía *Re = Ra – Rd*
Reacción de Síntesis *Rs = Rc – Rd*

Donde:
Ra es la semi-reacción del aceptor de electrones,
Rd es la semi-reacción del donador de electrones,
Rc es la semi-reacción de síntesis.

Conociendo la fórmula del diésel ($C_{12}H_{26}$) y las cantidades de nitrógeno y fósforo con las que contaba inicialmente el suelo, se aplicó este método para calcular las cantidades de nutrientes que requería el suelo, con el fin de desarrollar los tratamientos que demandaron Bioestimulación.

Semi-reacción donadora de electrones:

$$\frac{1}{z}(C_aH_bO_cN_d) + \frac{2a-c}{z}H_2O \rightarrow \frac{a}{z}CO_2 + \frac{d}{z}NH_3 + H^+ + e^-$$

Donde: $z = 4a + b - 2c - 3d$

Semi-reacción del donador de electrones (***Rd***)

$$\frac{1}{74}C_{12}H_{26} + \frac{12}{37}H_2O \rightarrow \frac{6}{37}CO_2 + H^+ + e^-$$

Semi-reacción del aceptor de electrones (***Ra***), por ser aerobia.

$$\frac{1}{4}O_2 + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{2}H_2O$$

Semi-reacción de síntesis (***Rc***)

$$\frac{1}{4}CO_2 + \frac{1}{20}NH_3 + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{20}C_5H_7O_2N + \frac{2}{5}H_2O$$

Reacción de energía (***Re = Ra – Rd***)

$$\frac{1}{74}C_{12}H_{26} + \frac{1}{4}O_2 \rightarrow \frac{13}{74}H_2O + \frac{6}{37}CO_2$$

Reacción de síntesis (***Rs = Rc – Rd***)

$$\frac{1}{74}C_{12}H_{26} + \frac{13}{148}CO_2 + \frac{1}{20}NH_3 + \frac{1}{20}HCO_3 \rightarrow \frac{14}{185}H_2O + \frac{1}{20}C_5H_7O_2N$$

Teniendo $\boldsymbol{Fs} = 0.4$ como la fracción de carbono destinada para el proceso de síntesis y a $\boldsymbol{Fe} = 0.6$ como la fracción de carbono para los procesos energéticos.

$$\boldsymbol{Fs} + \boldsymbol{Fe} = 1$$

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

$$\boldsymbol{R} = \boldsymbol{FsRs} + \boldsymbol{FeRe}$$

$$\boldsymbol{R} = C_{12}H_{26} + 11.1\ O_2 + 1.48\ NH_4 + 1.48\ HCO_3 \rightarrow 4.6\ CO_2 + 10.04\ H_2O + 1.48\ C_5H_7O_2N$$

Para la obtención de las relaciones molares (C:N:P) se tiene en cuenta el peso molecular del donador de electrones, que en este caso ese le diésel, con 170 g/mol y nitrógeno 14 g/mol.

$$1: 1.48 * \frac{14}{170} : \frac{1}{6}\left(1.48\frac{14}{170}\right)$$

Luego la relación C:N:P es:

$$1: 0.12: 0.02$$

Finalmente se obtiene que para 100 gramos del hidrocarburo $C_{12}H_{26}$ se necesitan 12 gramos de Nitrógeno y 2 gramos de Fósforo, dando una relación aproximada de C:N:P de 100:12:2. La fuente de nitrógeno utilizada fue urea (CH_4N_2O) y la fuente de fósforo el fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), su aplicación se llevó a cabo en 7 pulsos iguales semanalmente en el agua empleada para controlar la humedad. Se determinó el suministro semanal con la intención de disminuir el riesgo de inhibición del proceso degradativo como consecuencia de la acumulación de amonio y cambios del pH en el medio al momento de adicionar los nutrientes (Barrios et al., 2015).

7.2.3 Selección de la cepa bacteriana para el tratamiento de bioaumentación y control microbiano.

La cepa bacteriana introducida para realizar la bioaumentación en el tratamiento BA y CM, fue una bacteria aislada a partir de una muestra de suelo contaminado con petróleo que realizó Grisales (2017), identificando la resistencia, supervivencia y capacidad para biodegradar hidrocarburos de la cepa denominada *Acinetobacter* sp, demostrando que este microorganismo es promisorio para la biodegradación de hidrocarburos del petróleo y candidato para contribuir a la rehabilitación ecológica de áreas afectadas por derrames de hidrocarburos, razón por la cual fue seleccionada para este estudio. Esta investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle.

7.3 Técnica de Extracción del Hidrocarburo del Suelo

7.3.1 Selección del Solvente para la Extracción del Diésel en el Suelo

La selección del solvente con mayor capacidad para la extracción del hidrocarburo en esta clase de suelo, se realizó comparando tres tipos distintos de estos:

- Acetato de etilo (EtOAc)
- Acetona (Me_2CO)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)

Se ejecutó una prueba de extracción experimental con cada uno de los solventes, que consistió en contaminar 100 g del mismo suelo y misma concentración de diésel (20,000 mg/kg de suelo seco) que se utilizó en esta investigación, para luego ser analizadas en un cromatógrafo y su lectura comparada con una muestra de diésel puro.

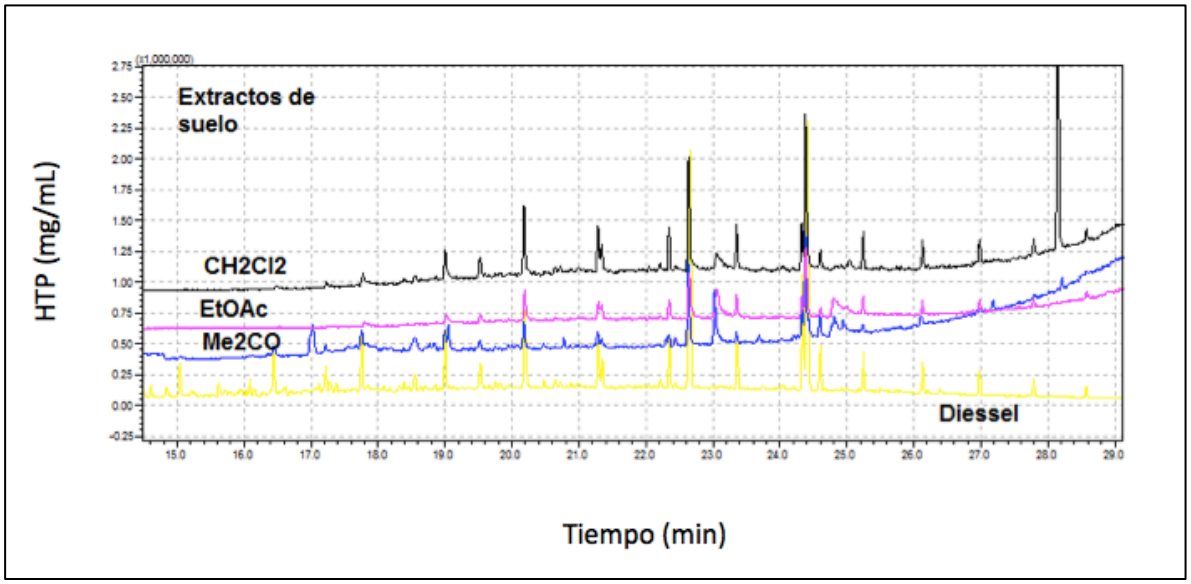


Figura 2. Cromatografía obtenida por CG/MS para la extracción de compuestos de hidrocarburo de un suelo contaminado con diésel

La figura 2 destaca el Diclorometano (CH_2Cl_2) como el solvente que mayor concentración de diésel extrajo, por esta razón se eligió para realizar la recuperación del hidrocarburo en esta investigación.

7.3.2 Extracción del Diésel en el Suelo

La extracción del diésel contenido en el suelo se realizó por medio de un lavado, en donde se utilizaron jeringas de 10ml, sin pistón de hule al final del émbolo, evitando así desprendimiento de sustancias provenientes de esta parte de las jeringas que pudieran afectar los resultados.

En el pivote de la jeringa se introdujo algodón esterilizado con la intención de evitar el paso de las partículas del suelo, permitiendo solo el cruce del solvente con los hidrocarburos extraídos.

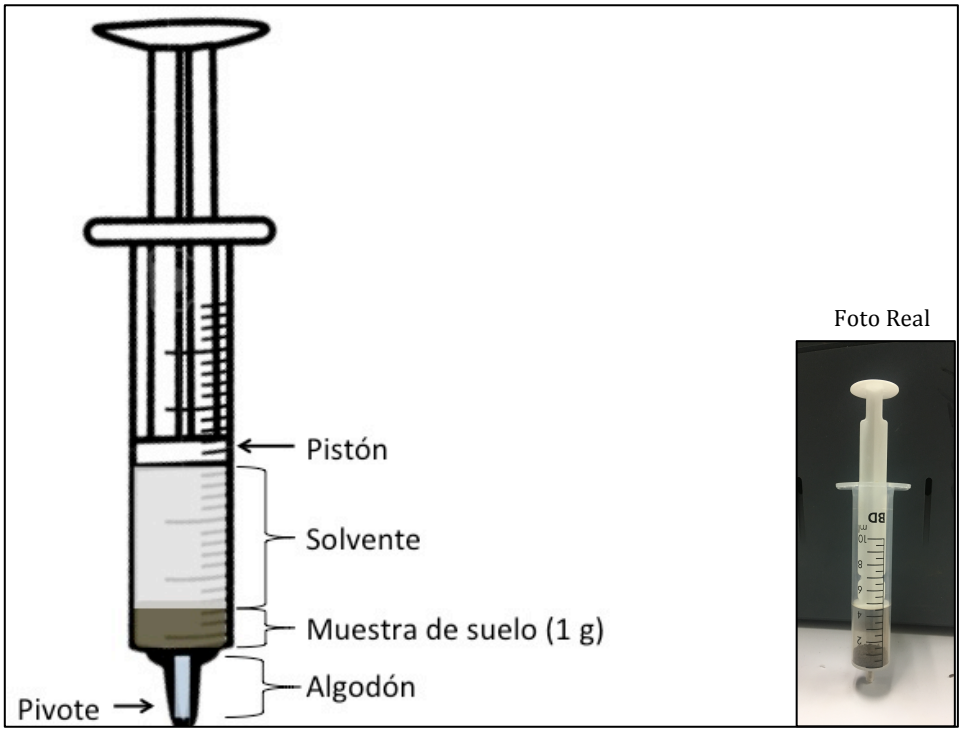


Figura 3. Instrumentación para lavado del suelo y extracción del diésel

En la Figura 3 se muestra el equipo utilizado para la extracción. La secuencia de acciones que se llevaron a cabo fueron:

1. Se agregó 1 gramo de suelo al interior de la jeringa
2. Se adicionaron 5 ml de solvente al interior de la jeringa y se dejó escurrir en un tubo de ensayo de 100 ml (secuencia 1)
3. El paso 2 se repitió dos veces más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen de 15ml de sobrenadante en el tubo de ensayo y se dejó evaporar durante 24 horas (secuencia 2)
4. Se resuspendió el contenido de los tubos de ensayo en 1.5ml del solvente seleccionado en viales de 1.5ml marca Agilent de ámbar provistos de tapas roscadas con tapón de teflón (secuencia 3)

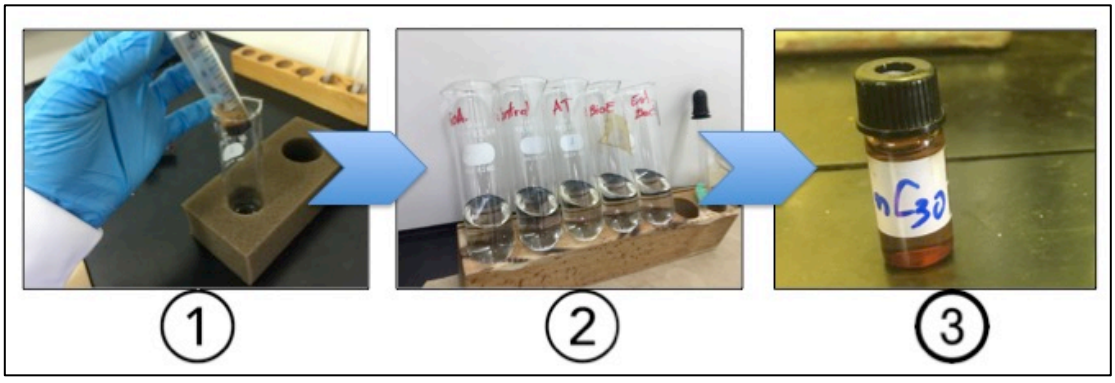


Figura 4. Secuencias de acciones para la extracción del diésel en el suelo

Los viales fueron almacenados a una temperatura de -19ºC hasta finalizar el montaje, teniendo en cuenta que se llevaron a cabo dos mediciones, una al iniciar y otra al finalizar el montaje de los mismos (100 días), todo esto para ser analizadas bajo las mismas condiciones en el equipo de cromatografía.

7.3.3 Análisis de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) del Diésel

El análisis de la concentración de diésel la cual se denomino como HTP, se llevó a cabo empleando cromatografía de gas acoplada a espectrofotometría de masas (CG/MS), en el laboratorio de Análisis Industrial de la Universidad del Valle. El equipo utilizado fue un cromatógrafo GCMS-QP2010 Ultra, marca SHIMADZU.

Se configuró el equipo para iniciar con una temperatura de 40ºC y alcanzar una temperatura de 320ºC, la temperatura del inyector y del detector fueron 230ºC Y 280ºC, respectivamente. La concentración de contaminante en las muestras fue identificada y cuantificada con un estándar de hidrocarburo C_{30} resuspendido en hexano.

7.4 Análisis de Datos

Para el análisis estadístico de los datos se inicio con pruebas de normalidad y homogeneidad para la varianza (D'Agostino-Pearson omnibus, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov), seguidas por un modelo completamente al azar de un factor (la concentración remanente de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo) y 5 niveles correspondientes a cada tratamiento (Atenuación Natural (AT), Bioestimulación (BS), Bioaumentación (BA), Control Químico (CQ) y Control Microbiano (CM)), llevando a determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de las pendientes con un nivel de significancia <0.05, apoyado por test de comparación múltiples (LSD-Tukey) para identificar el tratamiento que presenta mayor degradación, permitiendo comparar las medias después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias por el ANOVA. Todo esto se realizó en el programa estadístico *Prism* versión 8.0 .

Tabla 6. Diseño estadístico

Numero de experimentos	Nivel de tratamiento				
	C	***AT***	***BS***	***BA***	***CM***
$[HTP]_i$	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1
$[HTP]_f$	Xf1, Xf2, Xf3	Xf1, Xf2, Xf3	Xf1, Xf2, Xf3	Xf1, Xf2, Xf3	Xf1, Xf2, Xf3

En donde:

X: es la variable de respuesta (la concentración remanente de HTP en el suelo).
f: estado final
i: estado inicial
1, 2 y 3: se refiere al número de réplica por tratamiento.

Para expresar los datos en unidades de mg/kg de suelo seco (s.s.) se utilizó la ecuación 1 y los datos procesados se encuentran en el Anexo IV.

$$HTP(mg/kg\ s.s.) = C * \frac{V}{FC1} * \frac{FC2}{P*FH} \qquad (1)$$

En donde:

C: hidrocarburos totales expresados en mg/l.
V: volumen donde esta resuspendida la muestra (ml) = 1.5 ml
P: cantidad de suelo empleado para la extracción (g) = 1g
FH: factor de corrección de la humedad del suelo (1-(%humedad/100)).
FC1*:* factor de corrección para obtener los HTP contenidos en el disolvente = 1000
FC2: factor de corrección para convertir los HTP a mg/kg s.s. = 1000

El porcentaje de degradación se realizó teniendo en cuenta el promedio de los HTP presentes inicialmente en cada tratamiento (Anexo III), utilizando la ecuación 2.

$$\%\, Degradación = \frac{HTP_i - HTP_f}{HTP_i} * 100 \qquad (2)$$

En donde:

HTP_i : Hidrocarburos Totales de Petróleo de diésel al inicio
HTP_f : Hidrocarburos Totales de Petróleo de diésel al final

8 RESULTADOS

8.1 Caracterización del Suelo

El suelo fue caracterizado con el propósito de conocer su estado inicial antes de aplicar las técnicas de biorremediación y después de estas. En la tabla 7 se presentan los resultados de la caracterización físico-química del suelo antes y después de la aplicación de los diferentes tratamientos de biorremediación.

Inicialmente se contaba con la presencia de un suelo sin contaminar que tenía una clase textural Arcillosa, pH ligeramente ácido (6.5 unidades), contenido alto de materia orgánica (3.82%) (ICA, 1992), conductividad eléctrica (CE) baja (0.22 dS/m) y un contenido de Carbono orgánico alto (2.22%) como se muestra en la tabla 6.

La densidad real (2.32 g/cm^3) y aparente (1.26 g/cm^3) solo se determinaron al inicio y su cálculo está en el Anexo I. Se tiene que para suelos con textura arcillosa la densidad real promedio es de 2.837 g/cm^3, para el suelo estudiado tenemos que la densidad es menor, pero esto puede deberse a su buen contenido de materia orgánica (Felmer et al, 2010; Salamanca et al., 2006).

La densidad aparente reportada es también característica común de este tipo de suelos, pues se conoce que para suelos arcillosos regularmente esta alrededor 1.25 g/cm^3, valor muy cercano al obtenido en la prueba de la parafina que se llevó a cabo. Teniendo en cuenta que la densidad aparente es un valor que varía con la textura (Felmer et al., 2010).

Con la relación porcentual de las densidades se calculó la porosidad del suelo en un valor de 45.44%, la cual es la parte que en su estado natural está ocupado por aire y/o agua en

el suelo. Es un valor que hace alusión a una porosidad media, con probabilidad a repercutir en propiedades físicas desfavorables para la biorremediación, debido a una menor aireación del suelo, menor capacidad de infiltración de agua y dificultad para la penetración de las raíces, convirtiéndose en suelos compactados (Flores et al., 2010).

Tabla 7. Características Fisicoquímicas del suelo antes y después de los tratamientos

Parámetro	Suelo antes del tratamiento	Suelo después del tratamiento				
		Tratamiento *CQ*	Tratamiento *C M*	Tratamiento *AT*	Tratamiento *BS*	Tratamiento *BA*
Arena (%)	25	65	30	32	42	38
Arcilla (%)	59	10	54	50	41	47
Limo (%)	16	15	16	18	17	15
Textura	Arcilloso	Franco Arenoso	Arcilloso	Arcilloso	Arcilloso	Arcilloso
pH	6.5	1.9	7.7	6.4	7.1	7.3
C.E. (dS/m)	0.22	35	0.5	0.2	2.31	2.81
Materia orgánica (%)	3.82	4.99	5.44	5.29	3.91	4.49
Carbono Orgánico (%)	2.22	2.89	3.16	3.07	2.27	2.61
Fósforo (mg/kg)	10	10	24	9	22	27
Amonio (mg/kg)	10	10	800	7	750	720
Nitratos (mg/kg)	23	20	24	17	25	27
Nitrógeno Total (%)	0,13	0,22	0,25	0,23	0,21	0,2
Actividad Microbiana (KgC - CO_2/ha - día)	5.41	0.1	27.56	8.42	18.8	17.96

C.E.: Conductividad eléctrica

Pese a lo anterior se contó con un suelo con características mayormente favorables para la biorremediación, por las siguientes razones:

- Según Hernández et al (2006), a pesar de las desventajas del suelo arcilloso, en este se pueden presentar microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos en cantidades acordes para realizar buenos procesos de biorremediación de estos compuestos (Jacques et al, 2008), pues se conoce que las partículas de arcilla, tienen una mayor superficie específica y en consecuencia un mayor contacto entre el microorganismo y el hidrocarburo, lo que mejora la biodegradación del hidrocarburo (García et al., 2012).

- El pH reportado no repercutiría de forma negativa en las técnicas de limpieza como la biorremediación, la cual requiere un rango de pH de 5,5 a 8,5 unidades (Martínez et al, 2001; Das & Dash, 2014).

- El contenido de materia orgánica (3.82%) es conveniente para este estudio, ya que actúa como mejorador de las características físicas y almacena energía para

la vida microbiana del suelo, aspecto esencial a la hora de aplicar biorremediación (Trinidad et la, 2016).

- En cuanto al Carbono orgánico (C.O.), fue 2.3%. Se dice que cerca del 56.7% de los suelos en Colombia se encuentran entre 1 a 2.5% de C.O. y que en climas cálidos se considera un valor alto y beneficioso por encima del 2% (Vásquez, 2014) a comparación de climas fríos, pues según un estudio realizado por Valenzuela et al. (2018), en los cálidos el suelo tiene mayor capacidad de descomponer, mineralizar y humificar materia orgánica, por lo tanto el C.O. será menor. Este parámetro se estima como un factor que aportará al buen desarrollo de la técnica de biorremediación.

- La concentración de sales solubles (0.22 ds/m) en la solución del sustrato se mide mediante la Conductividad Eléctrica (CE). El dato reportado indica que el suelo puede ser biorremediado con éxito, ya que se considera una baja concentración de sales por debajo de 1 dS/m (Barbaro, 2014).

Con base en los datos al final de los tratamientos reportados en la tabla 7, tenemos que la textura del suelo para todos los tratamientos presentaron cambios en las cantidades de arenas y arcillas, sin embargo se mantuvieron en la clasificación de suelo arcilloso, a excepción del tratamiento CQ que reportó cambio en su textura. Esto también ocurrió en un estudio realizado por Martínez y López (2001), que después de caracterizar un suelo como arcilloso por el método de Bouyoucos, ocurrió que la cantidad de arenas aumentó y disminuyo la de arcillas al agregarles hidrocarburo, el mismo fenómeno registró Zárate (2004) bajo condiciones de suelo similares. Al final de estos estudios se concluyó que las partículas del suelo se ven modificadas debido a que adsorben el hidrocarburo mediante interacciones electrostáticas del tipo Van der Waals, puentes de hidrógenos y puentes catiónicos que terminan interfiriendo con la lectura del hidrómetro de Bouyoucos, en consecuencia, se sugiere no emplear este método en la determinación de la textura de suelo contaminados con hidrocarburos (Martínez, 2018).

Se evidencia un incremento del pH en los tratamientos de *BS*, *BA y CM*, lo cual se debe muy seguramente al proceso de hidrólisis de la urea que fue agregada semanalmente a estos tratamientos y que contribuye al aumento del pH (Ñustez 2012, González et al., 2015) o al metabolismo microbiano estimulado por la adición del diésel. Trejos (2017) reportó al final de sus tratamientos de biorremediación mediciones de pH entre 6.5 y 7.4 unidades, rango en el que se ubican los resultados de esta investigación.

El tratamiento control Químico presentó variaciones de pH, reportando al final un pH ácido debido a la solución de HCl 2M que se le adicionó con la intención de crear un ambiente de toxicidad para los microorganismos que pudieran involucrarse en la degradación del diésel (Navarro, 2018). El tratamiento de Atenuación Natural (*AT*) no registró cambio significativo en su pH y esto obedece a que no recibió estímulo externo, dejando actuar a los microorganismos nativos.

La conductividad eléctrica se mantuvo constante en el tratamiento de Atenuación natural (AT), pero aumentó en los tratamientos de Bioestimulación (BS), Bioaumentación (BA) y Control Microbiana (CM), siendo los valores del tratamiento Control Químico los más altos, debido posiblemente a la adición de HCl, el cual es un ácido fuerte (Prada, 2016).

La materia orgánica incrementó en todos los tratamientos, pasando de un nivel medio a nivel alto en algunos de ellos, cambio que se presenta dado que los hidrocarburos por su naturaleza hidrofóbica se adhieren a la materia orgánica del suelo, provocando un aumento de su valor (Delgado, 2017). Este valor final hace referencia de manera indirecta a los hidrocarburos remanentes del suelo (Trejos 2017).

Los valores de amonio aumentaron notablemente en los tratamientos que se les aplicó bioestimulación, ayudando a regular el desequilibro que provocó el contaminante en los nutrientes balanceando la relación C:N. Lo contrario pasó en el tratamiento de atenuación natural, que no recibió ningún estímulo, provocando la disminución de la cantidad de amonio por presunta presencia de microorganismos nativos que pudieron acceder a este. En cambio en el tratamiento Control Químico no presentó variación alguna.

En cuanto al fósforo, se observa un aumento en los tratamientos de Bioestimulación (*BS*), Bioaumentación(*BA*) y Control Microbiano (*CM*). Este aumento se explica ya que se agregó una fuente de fósforo (Fosfato de potasio dibásico) y porque los hidrocarburos en el suelo causan un incremento del fósforo disponible (Ortínez, 2003). Esto favorece la biorremediación del suelo, dado que este nutriente es el encargado de sintetizar moléculas que brindan energía a las células (Prada, 2016).

8.2 Variables De Control Semanal (Propiedades Físico-Químicas)

Para el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo un control semanal del pH, temperatura y humedad, que se consideran propiedades físico-químicas fundamentales en los suelos

8.2.1 pH

Según la FAO (2018), el pH es una de las propiedades del suelo más importante, pues guarda relación con el ciclo microorganismo-nutrientes-suelo, y por tal motivo un pH óptimo es crucial para que las mismas se lleven a cabo y puedan presentar el normal desarrollo de las actividades internas del suelo. Por lo cual, se recomienda mantenerlo entre 5,5 y 8,5 unidades para una mejor eficiencia en la biorremediación (Das & Dash, 2014).

En la figura 5 se ilustra como el tratamiento de Atenuación Natural se mantuvo bajo oscilaciones breves del pH. Para los tratamientos que se les adicionó nutrientes, como fue el caso de Bioestimulación (BS) y Bioaumentación (BA), se observó una elevación del pH hasta la semana 5, teniendo un descenso hasta la semana 9 y volviendo a tener uno de sus mayores picos en la semana 11, alcanzando pH por encima de 7.5 unidades. Este comportamiento obedece a que no se le adiciono urea en la semana 6 a estos tratamientos, provocando un descenso transitorio, pues se le señala a la urea de provocar el aumento del pH en los suelos, al ocurrir la volatilización del amoniaco y posterior producción de amonio (Chaillan et al, 2006). En cambio en el tratamiento de Control Microbiano (CM) el cual tampoco se le suministro nutrientes en la semana 6, sucedió lo contrario, reportando un aumento progresivo del pH de la semana 5 a la 9.

En el tratamiento Control Químico, desde el inicio descendió el pH hasta 1.4 y se mantuvo durante todo el experimento en condiciones fuertemente ácidas comportándose de acuerdo a lo esperado por la adición de HCl 2M.

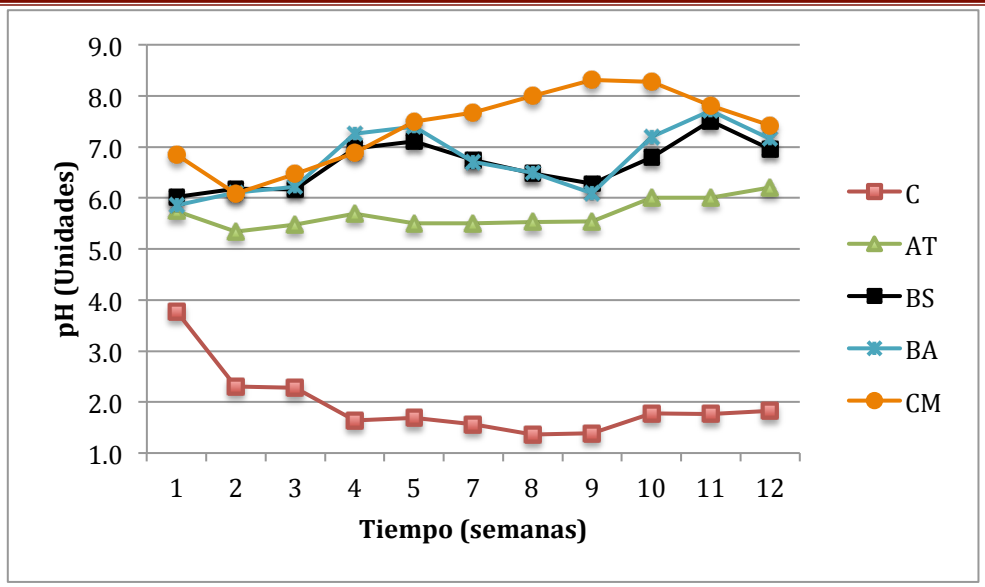


Figura 5. Promedio de la variación del pH para cada tratamiento

8.2.2 Temperatura

Entre los factores abióticos limitantes para el buen desarrollo de un tratamiento de biorremediación, se encuentra la temperatura como factor crucial (Siles and Margesin, 2018). Esta influye directamente en el proceso de biorremediación de hidrocarburos mejorando su actividad metabólica y la velocidad de crecimiento bacteriano (Pérez, 2018). Se conoce que las bacterias presentes en el suelo son mesófilas (Trejos, 2017), por esta razón se recomienda manejar una temperatura de entre 20 a 40°C (Martínez and Casallas, 2018)

En la figura 6 se muestra como la temperatura de cada uno de los tratamientos, osciló en el rango recomendado (20-40ºC), beneficiando así, según lo anterior, la actividad microbiana reportada en la figura 8.

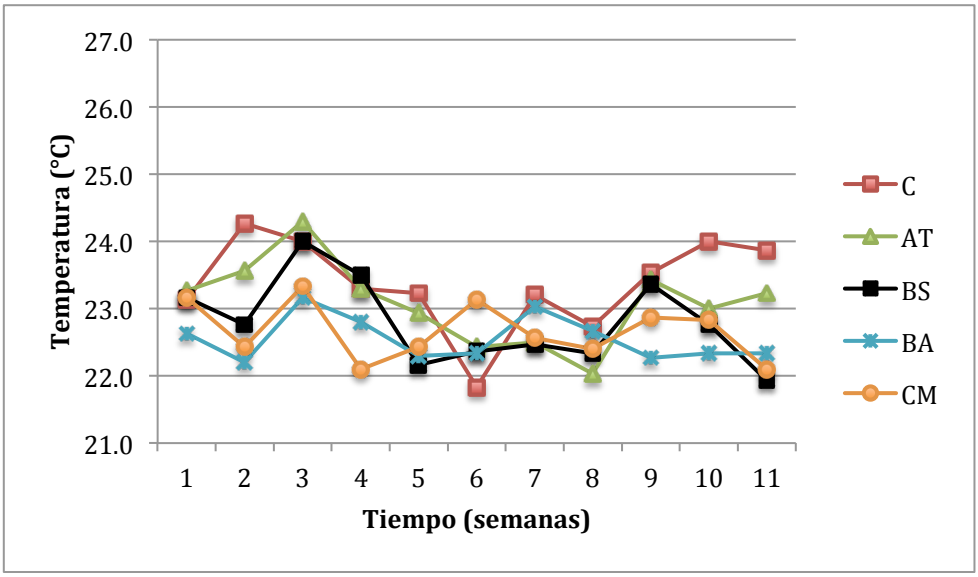


Figura 6. Promedio de la variación de la temperatura para cada tratamiento

Según Ñustez (2012), cuando se supera los 45ºC se produce una reducción del metabolismo bacteriano, causado por la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias y cuando se encuentra en bajas temperaturas donde la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce disminuyendo así la solubilidad del O_2 en agua, afectando a la biodegradación.

8.2.3 Humedad

A lo largo de este estudio se realizó riego semanal, con el propósito de mantener un rango óptimo de humedad en el suelo, pues es un factor importante en el crecimiento microbiano, debido a que estos requieren de un medio acuoso para llevar a cabo su metabolismo (Trejos, 2017). La humedad tiene considerables repercusiones en la solubilidad, el pH y la aireación del suelo. Por consiguiente es una variable que puede limitar de forma severa la biodegradación (Ramos and Zúñiga, 2008; Roldán e Iturbe, 2005)

En la figura 7, se nota como todos los tratamientos, a excepción del tratamiento de Atenuación Natural (AT), presentaron fluctuaciones importantes desde el inicio y sólo se estabilizaron al final del estudio. Sin embargo estas oscilaciones se mantuvieron en un intervalo de 20-40% de humedad, rango recomendado para la degradación de los componentes de los hidrocarburos. Estudios más precisos sobre la humedad del suelo con relación a la biodegradación en suelos arcillosos han señalado humedades alrededor del 20% (Acuña et al., 2012; Moliterni, 2016).

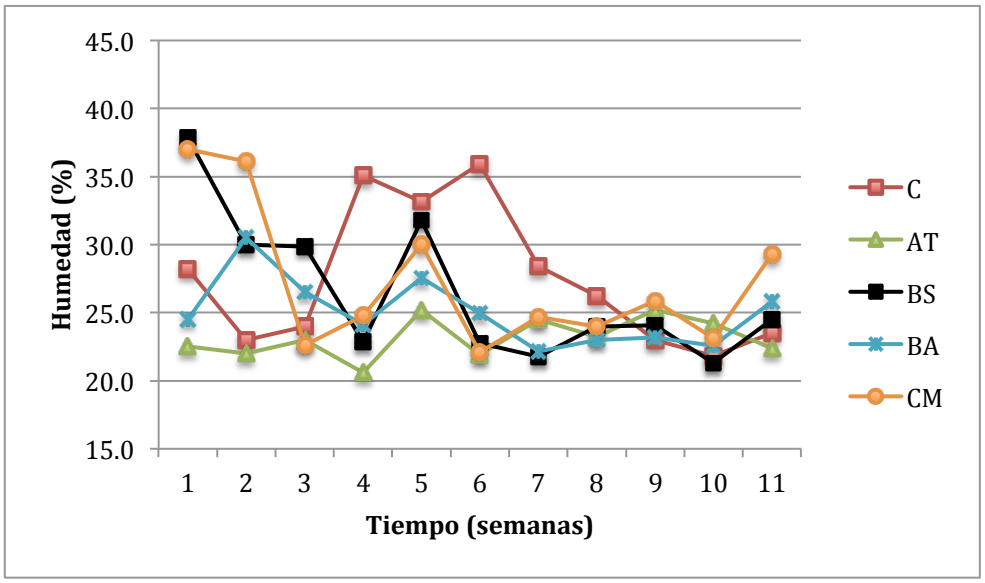


Figura 7. Promedio de la variación de la humedad para cada tratamiento

8.3 Actividad microbiana - Carbono orgánico

Se llevaron a cabo mediciones de dos variables de control mensual, una de ellas fue la actividad microbiana, la cual define la cantidad de CO_2 que se produce en determinada cantidad de muestra de suelo, producto de la activación de los microorganismos. Esta estimación es una medida indirecta de la mineralización del carbono orgánico que posee el suelo, que se monitoreó con la misma periodicidad, para ratificar lo registrado por la variable de actividad microbiana (Jaramillo, 2002). Su comportamiento se reporta en las Figuras 8 y 9.

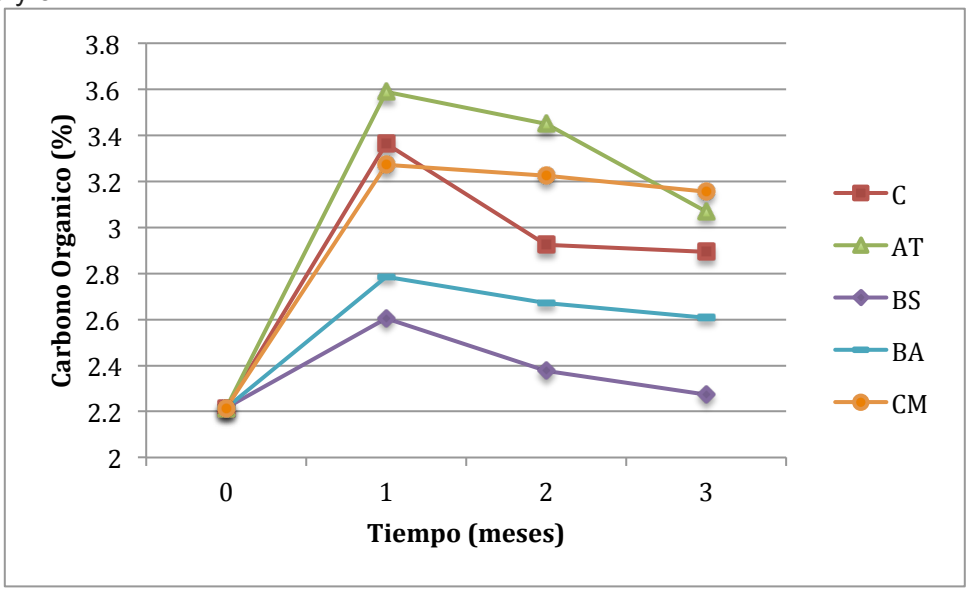


Figura 8. Carbono orgánico de cada tratamiento reportado cada mes durante el tiempo del experimento

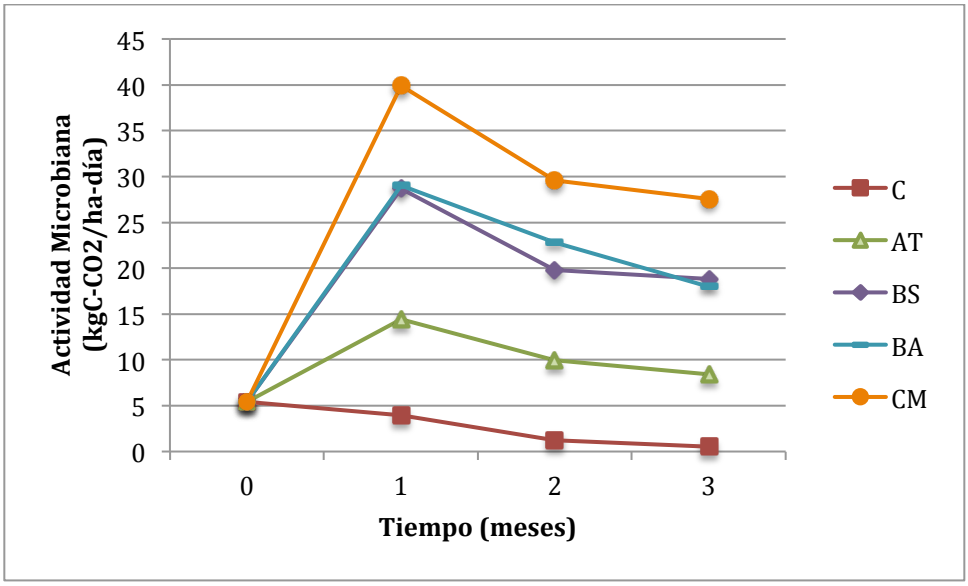


Figura 9. Actividad microbiana de cada tratamiento reportada cada mes durante el tiempo del experimento

En la figura 8 se evidencia el aumento del carbono orgánico (CO) en las primeras 4 semanas en todos los tratamientos . Este aumento fue causado por la adición de diésel, el cual tiene la capacidad de incrementar el carbono orgánico en el suelo de manera proporcional a su concentración (Martínez and López, 2001; García and Ballesteros, 2005). Pasado el tiempo el CO fue disminuyendo en todos los tratamientos, observándose que el tratamiento de Bioestimulación alcanzó valores muy similares a los iniciales. Los tratamientos de Control Microbiano y Atenuación natural fueron los que reportaron menos disminución en este parámetro, indicando una menor reducción de carbonos en el suelo en comparación con los otros tratamientos.

En cuanto a la actividad microbiana observada en la figura 9, tenemos que obedece al mismo comportamiento que reportó el CO, presentando un aumento en el primer mes para todos los tratamientos, excepto para el tratamiento Control Químico. Este comportamiento en suelos contaminados con diésel es frecuente, Margesin et al (2003) y Mair et al (2013) dedujeron que la contaminación con este hidrocarburo tiene un efecto estimulante en el suelo para los microorganismos y más aún cuando el contenido de materia orgánica es bueno (de Souza Pohren et al., 2016). Se observa como los tratamiento de BS y BA presentaron el mismo comportamiento.

Los valores más altos de actividad microbiana los registro el tratamiento de Control Microbiano, seguido de los tratamientos de Bioestimulación y Bioaumentación con valores similares. El tratamiento de Atenuación natural tuvo una actividad microbiana moderadamente baja que fue disminuyendo al pasar el tiempo y para el tratamiento Control Químico se reporta una disminución de este parámetro, causado por la adición de HCl que provocó una acidificación del suelo, inhibiendo el crecimiento microbiano.

8.4 Recuento De Microorganismos En Cada Tratamiento

En la figura 10 se presentan los resultados del recuento total de bacterias realizado al inicio y final de estudio.

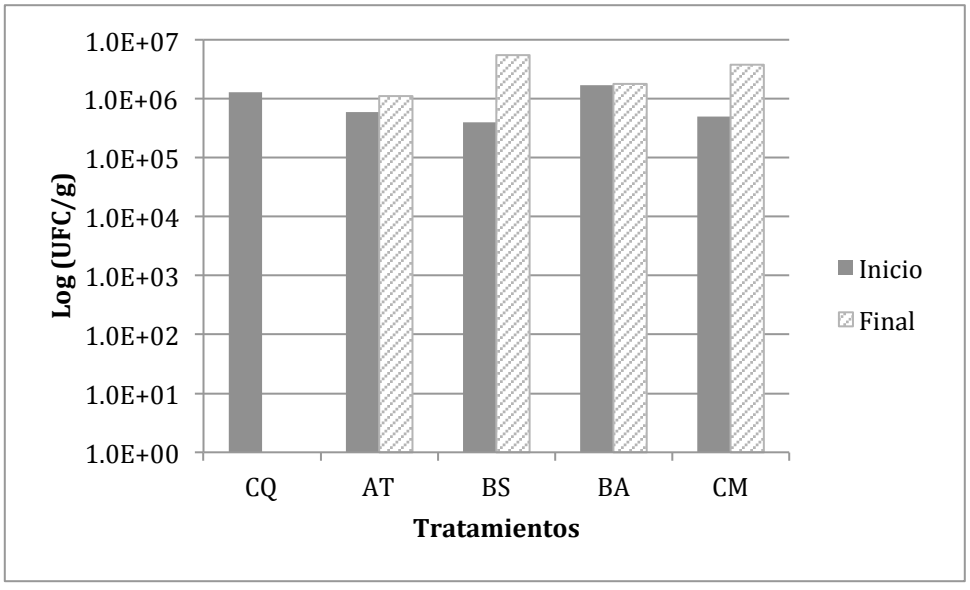


Figura 10. Resultados del recuento en placa de cada tratamiento. CQ: Control Químico, AT: Atenuación Natural, BS: Bioestimulación, BA: Bioaumentación y CM: Control Microbiano

Se observa en el tratamiento Control Químico la ausencia de microorganismos al finalizar el estudio, causado por la adición de HCl. En los otros tratamientos se presento un aumento de la cantidad de microorganismos, siendo el más representativo el reportado por el tratamiento de Bioestimulación (BS), seguido por el de Control Microbiano (CM). El incremento en el tratamiento de Bioaumentación (BA) fue mínimo, manteniéndose casi igual que al inicio.

8.5 Remoción De Diesel En Los Tratamientos Evaluados

Después de ser contaminado el suelo con diésel se realizaron las pruebas de CG/MS a cada tratamiento pasados 5 días, para calcular la concentración inicial (Anexo III). El promedio fue de 5,893.52 ± 54.74 mg de diésel/kg s.s.. Cabe aclarar que fue solo la cantidad que pudo ser detectada y comparada con el estándar. En la figura 11 se presenta el espectro de la concentración inicial de HTP en el estudio.

Se identificaron y cuantificaron un total de 18 compuestos de hidrocarburo lineales con estructuras de carbono en un rango de C_{11} a C_{29}, siendo los alcanos lineales (C_{11}-C_{16}) los que se degradan más fácilmente (Pérez, 2018) a comparación de los alcanos de cadena más larga (C_{25} – C_{40}) que son menos susceptibles (Khan et al, 2018).

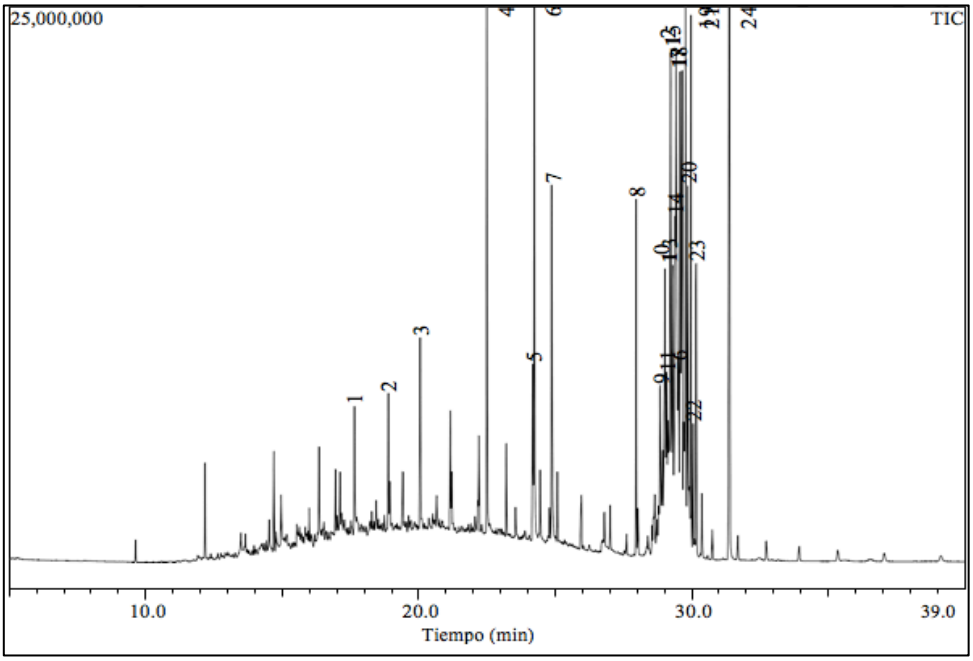


Figura 11. Espectrómetro de CG/MS para la concentración inicial promedio de HTP de todos los tratamientos

Al finalizar el estudio se volvió a realizar cada una de las pruebas de concentración de HTP en el suelo para cada replica de cada tratamiento (Anexo III), en el Anexo V se encuentra la comparación de los espectros de CG/MS iniciales y finales. Los porcentajes de degradación de hidrocarburos que reportó cada tratamiento se observan en la figura 12.

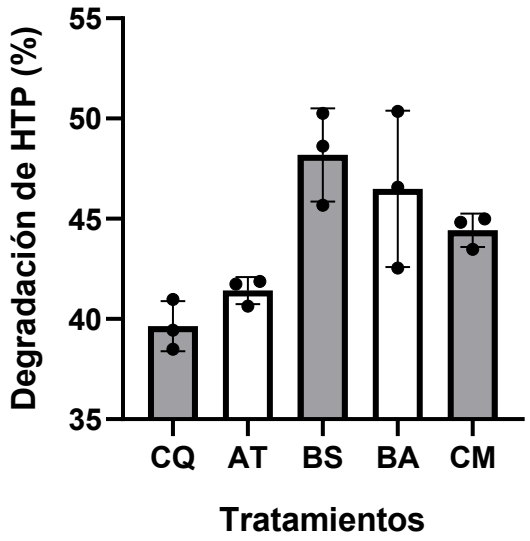


Figura 12. Porcentaje de degradación de HTP que obtuvo cada tratamiento

Según los porcentajes de degradación calculados con la ecuación 2, se tiene que el tratamiento que presento mayor degradación de diésel en el suelo fue el de Bioestimulación y el de menos degradación el tratamiento Control Químico.

Para conocer la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos se llevo a cabo el análisis estadístico. En la tabla 8 se presentan los resultados del análisis de varianza.

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment	516056	4	129014	F (4, 10) = 7.958	P=0.0038
Residual	162125	10	16213		
Total	678181	14			

Según la tabla 8, existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que P es <0.05. El tratamiento CQ (Control Químico) fue el que mayor concentración de HTP reportó al final con 3,557.18 ±73,80 mg/kg s.s., seguido por el tratamiento de AT (Atenuación Natural) con 3,452.25 ±39.74 mg/kg s.s., mientras que los tratamientos de BA (Bioaumentación) y CM (Control Microbiano) finalizaron con concentraciones muy cercanas de 3,153.49 ±230.00 mg/kg s.s. y 3,275.24 ±49.11 mg/kg s.s., respectivamente. Finalmente, el tratamiento de BS (Bioestimulación) fue el que menor concentración reportó con 3,053.77 ±136.84 mg/kg s.s. . Sin embargo, según los test de comparaciones múltiples, no existe diferencia significativa entre BS y BA.

Es de resaltar los resultados obtenidos con el tratamiento CQ, que a pesar de someterse a condiciones ambientales adversas, reportó disminución en la concentración de HTP, sin diferencia significativa con el tratamiento de AT.

9 DISCUSIÓN

Para contribuir a la selección del método de biorremediación más eficiente para la degradación de hidrocarburos en los suelos, en este estudio se realizó diferentes tratamientos de biorremediación *ex situ*, que se llevaron a cabo a escala de laboratorio, donde se evidenció el rendimiento del método de Bioestimulación, Bioaumentación y Atenuación natural, técnicas que han sido motivo de investigación con buenos resultados (Gómez et al., 2009; Wu et al., 2016; de la Cueva et al., 2016; Trejos, 2017; Wu et al., 2017; Guarino et al., 2017; Safdari et al., 2018).

Con base en la caracterización inicial que se le realizó al suelo, se reveló que era un suelo de clase textural Arcilloso, comportándose de forma compacta y fina en ausencia de humedad y en exceso de esta, de forma pantanosa y plástica, que a pesar de ser catalogada como la textura que poco aporta a la Biorremediación en comparación con los suelos arenosos (Haghollahi et al., 2016), algunos autores han demostrado que aún bajo la existencia de sus desventajas, la superficie específica con la que cuentan sus partículas, aumentan el contacto microorganismo-crudo, beneficiando el proceso de biodegradación (García et al., 2012). Sumado a esto, parámetros tales como el pH, la materia orgánica, conductividad eléctrica, la temperatura del suelo, la capacidad de retención de agua y la buena relación de nutrientes, lo denotaron como un buen candidato para aplicar las técnicas de biorremediación.

Al final de la aplicación de los tratamientos y conforme a los resultados conseguidos, se revela la fuerte relación que existe entre las propiedades físico-químicas y microbiológicas que tiene el suelo a la hora de construir tratamientos de biorremediación. El volteo que se le practico a los tratamientos, permitió una buena oxigenación, el pH cercano a la neutralidad que reportaron la mayoría de los tratamientos, benefició el desarrollo de la microfauna y la adición de nutrientes que recibieron los tratamientos de Bioestimulación, Bioaumentación y Control Microbiano para balancear la relación C:N:P, estimuló la actividad microbiana, según lo reportado por la prueba de actividad microbiana (figura 9). Todo esto promovió la degradación de los hidrocarburos (Acuña et al., 2012; Hernández, 2018; Wu et al., 2016; Bento et al., 2003).

Cabe aclarar que también se presentaron algunas propiedades que al final reportaron resultados que no beneficiaron el buen desarrollo de los tratamientos, como fue el caso de la C.E., que en el tratamiento Control Químico alcanzó valores muy altos (35 dS/m), consecuencia de la adición de HCl, el cual es un electrolito fuerte. Los tratamientos de Bioestimulación y Bioaumentación también reportaron un aumento en esta propiedad, que fue dada a la adicción de los nutrientes, clasificándolo como un suelo ligeramente salino, el cual no es adecuado ya que la acumulación de sales solubles puede afectar la biodisponibilidad del contaminante e inhibir la capacidad de biodegradación de la microflora autóctona (Prada, 2016). Las oscilaciones de la humedad que se presentaron al inicio, tampoco resultan ser lo más apropiado para las técnicas de biorremediación.

En cuanto al aumento que sufrió la materia orgánica en todos los tratamientos al final, se debe aclarar, que pese ha ser un componente que mejora las propiedades físicas y químicas del suelo (Trinidad et al, 2016), este incremento no es favorable, pues se trata de materia petrogénica (por hidrocarburos) y no de materia biogénica (por la

descomposición de vegetales y animales), lo que causa presencia de hidrocarburos aromáticos polinucleares que representan un riesgo ecotóxico.

Para la determinación del tratamiento más eficiente no solo nos apoyamos en la variable de respuesta, sino también en las variables de control mensual, que fueron actividad microbiana y carbono orgánico, que según un estudio de Trindade et al., (2005) realizado a suelos degradados y recientemente contaminados, observaron que el carbono orgánico correspondía al 89% de los HTP(%) del suelo degradado. Además de identificar la misma susceptibilidad a la biodegradación que tiene la actividad microbiana y los HTP, indicando que son variables adecuadas para ser empleadas en el monitoreo de un tratamiento de biorremediación(Alisi et al., 2009).

Relacionando los resultados de la actividad microbiana y el carbono orgánico, tenemos que los tratamientos que recibieron Bioestimulación y Bioaumentación, obtuvieron las actividades microbianas mas altas, cercanas a la ideal (USDA, 1999), lo que sugiere la adaptación de los microorganismos del suelo a la contaminación y a la utilización microbiana de los hidrocarburos como una fuente de carbono adicional, pues también fueron los tratamientos que más consumo de carbono orgánico reportaron (Mishra et al., 2001; Alisi et al., 2009). Este mismo comportamiento fue registrado por varios estudios recientes, donde los microorganismos parecieron tolerar y utilizar la nueva fuente de carbono, resultando en una elevada tasa de emisión de CO_2 y terminando con una actividad microbiana que disminuyo con el tiempo como consecuencia del agotamiento de las sustancias carbonadas, identificándolos como los dos tratamientos de mayor degradación de HTP (de Souza Pohren et al., 2016; Torri et al., 2018; Wu et al., 2017).

En cuanto al tratamiento de atenuación natural (*AT*) que no recibió ningún estimulo, tenemos una activación microbiana que alcanzó su pico máximo hasta una categoría moderadamente baja (USDA, 1999) que tiende a disminuir al pasar las semanas, reflejando el alto porcentaje de carbono orgánico con el que culmina, convirtiéndose en el tratamiento que menos mineralización realizó. Un resultado semejante lo reportaron Gómez et al., (2009) igualmente con un suelo de textura arcillosa, en donde el tratamiento por Atenuación Natural no solo culminó con el porcentaje de carbono orgánico mas alto, sino también fue el que menos reducción de HTP reportó.

Para el tratamiento de Control Microbiano (*CM*), que fue un suelo esterilizado y luego inoculado con una cepa de *Acinetobacter* sp, se obtuvieron porcentajes de carbono orgánico, al terminar el estudio, por encima de los otros tratamientos, pese a ser el tratamiento que al final presentó los valores más altos de actividad microbiana en el suelo. Esto señala la importancia de tener poblaciones en el suelo conformadas por diferentes tipos de bacterias y no individuales, pues pese a que se presentó una actividad biológica representativa en este tratamiento, se conoce que la *Acinetobacter* sp., solo puede metabolizar un número limitado de hidrocarburos, mientras que una población mixta tiene la capacidad de degradar compuestos hidrocarbonados complejos y variables, asimilándolos como una fuente de carbono (Viñas, 2005; Zafra et al., 2017; Khan et al., 2018). Esto fue verificado por Wanapaisan et al., (2018), quienes mostraron que un consorcio conformado por diferentes cepas bacterianas puede llegar a tener una tasa de biodegradación tres veces mayor que una especie individual ante un escenario de descontaminación. En general, cuanto mayor es la población microbiana degradante de hidrocarburos, mayor es la degradación de este (Krutz et al., 2005 , Wu et al., 2013)

Cabe aclarar de lo anterior, que la eficiencia de biodegradación basada en la generación de CO_2 y de pruebas de carbono orgánico son frecuentemente más bajas y menos especificas que una basada en la determinación cromatográfica. Esta última no solo toma las transformaciones por mineralización, sino también la formación de compuestos polares intermedios (Trindade et al., 2005), razón por la cual se tomó como variable de respuesta la Cromatografía de Gas Acoplada a Espectrofotometría de Masas (CG/MS) para identificar el tratamiento de biorremediación de suelos más eficiente en la remoción de HTP del diésel.

La variable de respuesta demostró una disminución para el tratamiento de Atenuación Natural de 41,42% de HTP, cercano a lo demostrado en el estudio realizado por Guarino et al (2017), reflejando su mayor disminución en los compuestos de C_{11} a C_{16}. Se reconoce que entre los factores que contribuyeron a estos resultados se encuentran los abióticos, reportándose en algunos estudios que la fracción volátil del Diesel puede estar alrededor del 5% (Serrano et al., 2006) o en algunos casos alcanzar el 10% (Pérez et al., 2015).

En cuanto al tratamiento Control Químico, el cual no contaba con las condiciones propicias para el buen desarrollo y crecimiento de microorganismos, obtuvo una disminución en la concentración de HTP, que según la prueba de recuento en placa, en esta disminución no intervino ningún microorganismo, razón por la cual se le atribuye a la adición de HCl. Este compuesto químico pudo provocar transformaciones químicas que consumieron el diésel o simplemente, los hidrocarburos fueron adsorbidos por el suelo. A pesar de esta reducción de HTP, el tratamiento Control Químico no fue el que mayor disminución reportó en este estudio, como si sucedió en los estudios realizados por Gómez et al. (2009), Trejos (2017) y Arrieta et al. (2012) en donde también se presentó este fenómeno.

El tratamiento de Bioaumentación (BA) a pesar de ser inoculado con una cepa de *Acinetobacter* sp, su población microbiana no tuvo aumento importante al final del estudio, situación que pudo deberse a diferentes factores como el estrés causado por inoculación, el tamaño del inoculo en relación a la biomasa del suelo, la competencia con la microbiota natural del suelo, la predación, la disponibilidad de agua, la accesibilidad a los nutrientes, entre otras, que impidieron que la bacteria prosperara en el suelo. Sin embargo alcanzó una reducción de HTP del 46.49%, resultado por encima de lo registrado por Wu et al. (2016) que también realizaron la inoculación de una cepa de *Acinetobacter*, obteniendo un 34% de degradación de HTP en aproximadamente 10 semanas. Este tratamiento logró un valor adicional del 5.07% por encima del tratamiento de AT, llegando a ser significativamente diferentes.

En cuanto al tratamiento de Control Microbiano (CM), el cual se desarrolló bajo las mismas condiciones que el de Bioaumentación, excepto por que se esterilizó antes de dar inicio al experimento, reportó una disminución de HTP del 44.43% similar al de Bioaumentación, en donde su población microbiana tuvo un aumento importante, fenómeno que se le atribuye a que la bacteria se inoculo en un suelo sin mayor presencia de microorganismos, permitiéndole acceder fácilmente a los nutrientes.

En los tratamientos de CM y BA en donde se inoculó la bacteria *Acinetobacter* sp, se puede observar claramente que se obtuvo una mayor reducción en los compuestos de C_{25}

a C_{29} en comparación a los demás, los cuales son compuestos de fácil degradación para esta bacteria, sugiriendo la posible participación de este microorganismo en estos tratamientos (Abbasian et al., 2015). Es de resaltar que son compuestos pertenecientes al grupo de alcanos de difícil degradación.

El tratamiento de Bioestimulación fue el que presentó mayor eficiencia, con un porcentaje de eliminación de HTP del 48.18%, el mismo resultado demostrado por Wu et al. (2017) (48%) bajo la adición de fuentes de nutrientes y porcentaje de humedad similares a este estudio. Este resultado se le atribuye mayormente a los microorganismos nativos del suelo, que al estimularse con nutrientes se les garantizo las mejores condiciones ambientales, que los ayudo a incrementar su población logrando una diferencia significativa con los resultados de Atenuación Natural, mayor a la que se alcanzó entre BA vs AT, mejorando la degradación de los hidrocarburos en 6.76%.

Los resultados reportados por CG/MS, las pruebas de actividad microbiana, carbono orgánico y recuento de microorganismos, demostraron ser parámetros coincidentes ante la disminución de hidrocarburos en el suelo, razón por la cual prueban ser indicadores relevantes para la evaluación de tratamientos de Biorremediación.

Estos resultados son semejantes a varios estudios previos que indicaron que la Bioestimulación es más eficiente que la Bioaumentación en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Wu et al, 2013; Abed et al., 2014; Wu et al., 2016; Alisi 2009, Macchi, 2018). Sin olvidar que se ha comprobado que la Bioaumentación con una sola especie microbiana no tiene la capacidad de metabolizar más de dos clases de compuestos del hidrocarburo, presunta razón por la cual se presentó menor eficiencia en la degradación de HTP para el tratamiento con BA (Wu et al., 2016; Ghazali et al., 2004). Estos dos tratamientos no reportaron una diferencia substancial al igual que en el estudio de Ñustez (2012).

10 CONCLUSIONES

La caracterización del suelo al inicio del experimento permitió evidenciar los parámetros físico-químicos y microbiológicos que beneficiaron el desarrollo de los tratamientos y ajustar otros para garantizar el buen desarrollo de las técnicas de biorremediación. Esta caracterización permitió conocer que el suelo tenía textura arcillosa y condiciones fisicoquímicas que no afectaron la biorremediación del diésel

Según lo reflejado en los tratamientos de Bioaumentación y Control Microbiano, la cepa bacteriana de *Acinetobacter* sp. si tuvo participación en la remoción de los hidrocarburos totales de petróleo del diésel, revelado en las pruebas de cromatografía, donde se observa la disminución de los compuestos comúnmente degradados por esta bacteria.

Los resultados de la concentración de HTP revelaron que el tratamiento con mayor eficiencia para descontaminar suelos con presencia de diésel fue Bioestimulación (48.18%), seguido muy de cerca por el de Bioaumentación (46.49%) sin diferencia significativa y por último el de Atenuación Natural (41.42%), obteniéndose diferencias significativas con los tratamientos de Bioestimulación y Bioaumentación.

11 RECOMENDACIONES

Realizar un estudio respecto a la volatilización que tiene el hidrocarburo, en este caso el diésel, para conocer la proporciones reales de las diferentes formas como se puede disminuir los HTP en el suelo, para un resultado más puntual del proceso de biorremediación.

Evaluar el comportamiento de la cepa de Acinetobacter sp. en consorcio con otros microorganismos, como estrategia de mejoramiento del tratamiento de bioaumentación para la remoción de este tipo de hidrocarburos en suelos contaminados.

Monitorear con mayor frecuencia las variables de actividad microbiana, carbono orgánico y cuantificación de los HTP, para conocer el comportamiento real con mayor detención, reportando posibles oscilaciones o cambios bruscos.

Llevar a cabo este experimento a escala piloto para comparar con los resultados encontrados en este estudio y así poder replicarlo a escala real.

Realizar la inoculación de la bacteria, en el caso de la Bioaumentación, no solo al inicio del tratamiento, sino en repetidas ocasiones, para garantizar la presencia y adaptación del microorganismo en el suelo.

Ejecutar una prueba de toxicidad al finalizar el estudio, pues la degradación de la HTP puede producir metabolitos intermedios, que pueden ser tóxicos para los organismos y plantas asociados.

Monitorear en tiempo real la variable de humedad del suelo, para evitar oscilaciones que puedan perjudicar las técnicas de biorremediación.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., y Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. Bioquímica aplicada y biotecnología , 176 (3), 670-699.

Abed, R. M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A., & Al-Hinai, M. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. International Biodeterioration & Biodegradation, 89, 58-66.

Acuña, A. J., Pucci, G. N., Herrera, G., & Pucci, O. H. (2009). Efecto de la textura de los suelos de la Patagonia sobre el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Ingeniería Sanitaria y Ambiental

Acuña. A. J. Tonín. N. L. Díaz. V. Pucci. G. N. & Pucci. O. H. (2012). Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. Ing invest y tecnol, 13(1),105–112.

Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA). (2010). Anexo A. Guía de contaminantes y tecnologías. Disponible en http://www.epa.gov/ superfund/action/spanish/pdfs/esp_roadmap_sec7.pdf

Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América EPA. (2004). "Literature Review on the use of Commercial Bioremediation Agents for Cleanuo of Oil-Contaminated Estuarine Environments.," U.S Environmental Protection Agency, National RiskManagement Research Laboratory, Cincinnati, OH 45268.

Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., & Sprocati, A. R. (2009). Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. Science of the Total Environment, 407(8), 3024-3032.

American Society of agronomy. (1982). Methods of Analysis part, 2 (2da ed.). USA.

Arrieta, O. (2011). Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental. Titulo de Maestría en Medio Ambiente y Desarrollo. Universidad Nacional de Colombia.

Arrieta, O. M., Rivera Rivera, A. P., Arias Marin, L., Rojano, B. A., Ruiz, O., & Cardona Gallo, S. A. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. Gestión y Ambiente, 15(1).

Arroyo, M., Quesada, J., Quesada, R., and Geocisa, J. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y Aguas contaminadas por hidrocarburos. MMWR URL disponible [En línea] En: http://aguas. igme. es/igme/publica/pdflib15/028. pdf,[Consulta: 03 de mayo de 2017].

Atlas R. (1991). Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of oil spills. Journal

Atlas, R., and Bartha, R. (2002). Los microorganismos en sus hábitat naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. Ecología microbiana y microbiología ambiental, 329-380.

Atlas, R., Unterman, R., DEMAIN, A., & DAVIES, J. (1999). Industrial microbiology and biotechnology. Industrial microbiology and biotechnology.

Barrios, L. F., Robayo, J., Prieto, S., & Cardona, S. A. (2015). Biorremediación de suelos contaminados con aceites usados de motor. Revista Cintex, 20(1), 69-96.

Bartha R. (1986). Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microbial Ecology 12, 155-172

Bento, F. M., Camargo, F. A., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource technology, 96(9), 1049-1055.

Bento, F., Camargo, F., Okeke, B., and Frankenberger-Júnior, W. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 65-68.

Bermeo , Y. (2018). Biodegradación De Residuos Procedentes De Una Línea De Producción De Laminados Empleando Trichoderma sp (Bachelor's thesis). Universidad Politécnica De Salesiana.

Bermúdez, S., and Corredor, P. (2010). Formulación del plan de contingencia por derrame de hidrocarburos en Tumaco-Nariño.

Bernal, A.(2015). Remediación De Un Suelo Contaminado Con Diesel Mediante La Técnica De Lavado Ex Situ Empleando Surfactantes A Diferentes Temperaturas. Escuela Superior De Ingeniería Química E Industrias Extractivas. Instituto Politécnico Nacional. México.

Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource technology, 74(1), 63-67.

Borrasen M. and Rike A. (2007). Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. Cold Regions Scienceand Technology. 481,129-138

Bouyoucos, G. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agronomy Journal, 54(5), 464–465. https://doi.org/http://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x

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

Burbano, H. (2017). La calidad y salud del suelo influyen sobre la naturaleza y la sociedad. Tendencias, 18(1), 118-126. Encontrad en: http://www.scielo.org.co/pdf/tend/v18n1/v18n1a07.pdf

Butenschoen, O., Scheu, S., & Eisenhauer, N. (2011). Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. Soil Biology and Biochemistry, 43(9), 1902-1907.

Cabanillas, J., y Pissani, V. (2015). Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo . (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

Cameotra, S. S., & Bollag, J. M. (2003). Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 33(2), 111-126.

Canals, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos “caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica". Facultad de Biología, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Barcelona, Tesis para optar al título de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona.

Cardona, P. H. P., & Montero, G. D. C. M. (2014). Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia.

Cardona, S., Silva, I., Peñuela, G., and Pérez, S. (2015). Evaluación De Biocombustibles E Hidrocarburos Del Petróleo (Gasolina Y Diesel) En Un Suelo: Proceso De Transporte Y Biorremediación. Revista EIA, E21-E46. doi:10.14508/reia.2014.11.E2.21-46.

Carrillo, R., Ruiz, A., and González, M. (2017). ASPECTOS LEGALES DE SUELOS CONTAMINADOS CON ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EN MÉXICO Y LA PERTINENCIA DE LA FITORREMEDIACIÓN. Agroproductividad, 10(4), 68-72.

Castaño, J.(2018). Evaluación técnico-financiera del proceso de fitorremediación con plantas gramíneas para mitigar derrames de crudo en el departamento del Meta, Colombia (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Castro, J. (2006). Short delay in timing of emergence determines establishment success in Pinus sylvestris across microhabitats. Annals of botany, 98(6), 1233-1240.

Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDα) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. J. Microbiol. Methods 73, 148–159.

Cevallos, T., and García , J. (2018). Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Aspergillus niger, Pleurotus ostreatus y Pseudomonas aeruginosa. Universidad Politécnica Salesiana. Quito.

Chaillan, F., Chaîneau, C. H., Point, V., Saliot, A., & Oudot, J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. Environmental Pollution, 144(1), 255–265. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.016

Chasse, C. (1978). The ecological impact on and near shores by the Amoco Cadiz oil spill. Marine Pollution Bulletin, 9(11), 298-301. Chemistry Technology and Biotechnology 52, 149-156.

Chen, P., Pickard, M. A., & Gray, M. R. (2000). Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. Biodegradation, 11(5), 341-347.

Contreras, H., & Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería, 1(1), 27-33.

Cortinas. C. (2002). Contaminación por residuos: Prevención y remediación. Manual 2. Serie Manuales para regular los residuos con sentido común. 1ª Edición. Talleres Gráficos de la Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. 306 p.p.

Das, S. and Dash, H., (2014). Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas. Libro: Microbial Biodegradation and Bioremediation, Elsevier, Pages 1-21,

Davis, J. B., Chase, H. H., and Raymond, R. L. (1956). Mycobacterium paraffinicum n. sp., a bacterium isolated from soil. Applied microbiology, 4(6), 310.

de la Cueva, S. C., Rodríguez, C. H., Cruz, N. O. S., Contreras, J. A. R., & Miranda, J. L. (2016). Changes in bacterial populations during bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. Water, Air, & Soil Pollution, 227(3), 91.

de Lorenzo, V., Pieper, D., & Ramos, J. L. (2013). From the test tube to the environment–and back. Environmental microbiology, 15(1), 6-11.

de Souza Pohren, R., de Oliveira Leite, D. A. N., de Angelis, D. D. F., & Vargas, V. M. F. (2016). Performance of simulated bioremediation in real samples of soils contaminated with PAHs. Water, Air, & Soil Pollution, 227(9), 330.

Dehghani M, Taatizadeh SB, Samaei MR (2013) Biodegradation of n-hexadecane in acinetobacter radioresistens liquid culture. Health Scope 2:162–167

Delgadillo. J., Ronald Ferrera. R., Hernández, H. (2016). Compostaje En Biopilas Para La Limpieza De Suelos Contaminados Con Hidrocarburos Del Petróleo. Agroproductividad, 9(8), Vol. 9, Núm. 8, p: 24-30.

Delgado Vallejo, A. D. (2017). Gestión de un proceso de biorremediación bacteriana de suelo contaminado con crudo en condiciones anaeróbica (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín).

Delgado, K. T., & Montoya, T. Z. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Facultad de Mina. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Trabajo de grado para optar el título de Ingeniería Química. pp. 55-60.

Dominguez, R., & Aguilera, H. (1989). Metodología de análisis físico-químicos de suelos. In F. de Ciencias.UNAM (Ed.), Metodología de análisis físico-químicos de suelos. México.

Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Applied soil ecology, 15(1), 3-11.

Ecopetrol S.A. (2015). Cuando los Ríos se Vuelven Negros. e+ Ecopetrol. Unidad de Comunicaciones Corporativas de Ecopetrol S.A. (Nº8). Recuperado de http://www.ecopetrol.com.co/especiales/revista-emas08/cifras.html

Energy Information Administration (US) (EIA). (2012). Annual Energy Review 2011. Government Printing Office.

Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P., and Schroeder, E. D. (1999). Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisicoquímicos

Felmer, S., Morales, R., Coz, E., and Fuentes, F. (2010) Propiedades Físico-Hídricas del Suelo en el Cultivo del Maíz Grano. Capitulo II.

Flores, L., and Alcalá, J. (2010). Manual de procedimientos analíticos. Universidad Nacional Autónoma De México. Instituto de Geología. Departamento de Edafología. Laboratorio de Física de Suelos.

Galindo, C., and Llontop, D. (2015). Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

García, J., & Ballesteros, M. (2005). Evaluación De Parámetros De Calidad Para La Determinación De Carbono Orgánico En Suelos. Revista Colombiana de Química, 34 (2), 201-209.

García, M., Infante, C., & López, L. (2012). BIODEGRADACIÓN DE UN CRUDO MEDIANO EN SUELOS DE DIFERENTE TEXTURA CON Y SIN AGENTE ESTRUCTURANTE. Bioagro, 24(2), 93-102.

García, N. , and Aguirre, M., (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. p. 641-652.

Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 54(1), 61-67.

Gideon, O., and 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

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.

Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-suelo contaminado con una mezcla de gasolina. Dyna, 76(160), 83-93.

GONZÁLEZ, H., SADEGHIAN, S., MEDINA, R., & CASTRO, A. (2015). Alternativas para disminuir la volatilización de nitrógeno producida por la fertilización con urea.

Grisales, M. (2017). Biodegradación De Hidrocarburos Por Cepas Bacterianas Aisladas De Suelo Contaminado Con Petróleo En Tumaco, Nariño. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioagumentation–Assistited Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. Chemosphere, 170, 10-16.

Haghollahi, A., Fazaelipoor, M. H., & Schaffie, M. (2016). The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. Journal of environmental management, 180, 197-201

Hall, C., Tharakan, P., Hallock, J. Claveland, C., Jefferson, M. (2003). Hydrocarbons and the evolution of human culturesdfghjklñ, 426, pp. 318-322

Hernández, V. (2018). Desarrollo de una metodología mediante acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo para la remediación de un suelo costero contaminado con hidrocarburos intemperizados.Doctorado En Ciencia Y Tecnología En La Especialización De Ingeniería Ambiental.Guanajuato.Mexico (30-40).

Herrero, M. (2016). Comparativa de métodos de descontaminación de suelos afectados por hidrocarburos. Aplicación a la obra del AVE de Málaga (Doctoral dissertation, ETSI_Energia).

IDEAM. (2017). Informe Nacional de Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia, 2016. Bogotá, D.C., 2016. 128 páginas.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1992). Fertilización en diversos cultivos. Quinta Aproximación. 64p.

Jackson, M. (1964). Análisis Químico de suelos. (Omega, Ed.).

Jacques R., Okeke B., Bento F., Teixeira A., Peralba M., Camargo F. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technol. 99: 2637-2643.

Jamison, V. W., R. L. Raymond and J.O. Hundson, Jr. (1975). Biodegration of High-Octane Gasoline in Groundwater, Dev Ind. Microbiol. 16:305-312 tomado de LEVIN.

Morris, Gealt, Michael, Biotratamiento de residuos toxicos y peligrosos, ediciones McGraw-Hill, España.

Jaramillo Jaramillo, D. F. (2002). Introducción a la ciencia del suelo.

Johnsen, A., Wick, L., and Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental pollution, 133(1), 71-84.

Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil-a review. Chemosphere.

Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol. 39, 295-304.

Krutz, L. J., Beyrouty, C. A., Gentry, T. J., Wolf, D. C., & Reynolds, C. M. (2005). Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. Biology and fertility of soils, 41(5), 359-364.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y.B., Naidu, R., (2016). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium Cupriavidus sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. Chemosphere 162, 31–39.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y.B., Naidu, R., Megharaj, M., (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. Chemosphere 168, 944–968.

Liu, C. W., & Liu, H. S. (2011). Rhodococcus erythropolis strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. Process Biochemistry, 46(1), 202-209.

López Santos, A. (2016). Neutralizar la degradación de las tierras, una aspiración global. ¿Es posible lograrlo en México? Terra Latinoamericana 34: 239-249.

López, J., Quintero, G., Vizcaíno, A. , Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova, 4(5). pp. 83-85.

Macchi, M. (2018). Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH para su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias biológicas. Trabajo de tesis Doctoral. Argentina. En línea. Recuperado de: http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15742

Mair, J., Schinner, F., and Margesin, R. (2013). A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: effects of temperature and biostimulation. Cold Regions Science and Technology, 96, 122-128.

Maldonado, A., and Narváez, A. (2005). Ecuador ni es, ni será ya país amazónico: inventario de impactos petroleros, 1: recorrido por familias campesinas e indígenas afectadas por pozos y estaciones, octubre 2001. Acción Ecológica. pp. 15-23.

Manacorda, A., and Cuadros, D. (2005). Técnicas de remediación biológica. URL disponible [En línea] disponible en: http://essa. uncoma. edu. ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/tecnicas_de_remediacion_biologicas. pdf.[Consulta: 04 de mayo de 2017].

Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Applied and environmental microbiology, 69(6), 3085-3092.

Marín, A., (2004). Biorremediación, mediante técnicas biológicas, de hidrocarburos contenidos en lodos de refinería. Experiencias en clima semiárido. Tesis doctoral. Departamento de química agrícola, geología y edafología. Centro de edafología y biología aplicada del segura (CEBAS-CSIC). Universidad de Murcia.

Márquez, F. J., Hernández, V., and Lamela, M. T. (2001). Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water, Air, & Soil Pollution, 128(3), 313-320.

Martínez Rivera, A. (2018) Biorremediación bacteriana de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

Martínez, J. and Casallas, M. (2018). Contaminación y remediación de suelos en Colombia: aplicación a la minería de oro. Recuperado de: http://hdl.handle.net/10882/9123.

Martínez, V. E., & López, M. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. Terra latinoamericana, 19(1).

Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, P. C., Weyrauch, P., ... & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 26(1-3), 92-118.

Medina-Bellver, J., Marín, P., Delgado, A., Rodríguez‐Sánchez, A., Reyes, E., Ramos, J., and Marques, S. (2005). Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. Environmental microbiology, 7(6), 773-779.

Menzie, A., Potocki, B. y Santodonato, J. (1992). Exposure to Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons in the Environment. Environmental Science & Technology 26: 1278-1284

Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, (2007). Gestión integral de residuos o desechos peligrosos. Bases conceptuales. Recuperado de : http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias_qu%C3%ADmicas_y_residuos_peligrosos/gestion_integral_respel_bases_conceptuales.pdf

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., & Lal, B. (2001). Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Applied and environmental microbiology, 67(4), 1675-1681.

Moliterni, E. (2016). Biorremediación acelerada de suelos contaminados con hidrocarburos tipo diésel. Departamento De Ingeniería Química. Faculta De Ciencias Y Tecnologías Químicas. Universidad De Castilla La Mancha. Ciudad Real.

Morales, A., Muñoz, C., and Quintero, L. (2013). Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. Gestión y Ambiente, 16(2), 83-94.

Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, J. S., & Choi, J. Y. (2002). Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environmental pollution, 119(1), 23-31.

Narváez, S. (2005). Selección de bacterias aisladas de sedimentos del caribe colombiano con capacidad degradadora de hidrocarburos. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 86 páginas.

Navarro Páez, D. (2018). Estudio de los procesos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados con pesticidas.. Colombia: Recuperado de: http://hdl.handle.net/10596/21053

Ñustez, D. (2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible (tesis de maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales. Pereira, Colombia.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). Recuperado de [http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-delsuelo/propiedades-fisicas/es/]

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), (2015). Los Suelos están en Peligro, pero la Degradación puede Revertirse. URL disponible [En línea] En: http://www.fao.org/news/story/es/item/357165/icode/ .[Consulta: 5 de julio de 2017].

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), (2012). Hacia el futuro que queremos. Erradicación del hambre y transición a sistemas agrícolas y alimentarios sostenibles. Roma, FAO. 32 p.

Ortínez, B., Lema, I. I., & Gavilán A. G. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. Gaceta ecológica, Instituto Nacional de Ecología. (69), 83-92.

Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., ... & Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. pp. 32-34.

Peñaloza, G., Rincón, D., & Restrepo, L. (2013). Evaluación de la esterilización húmeda y la esterilización por microondas de dos tipos de suelos. Revista científica, 1(17), 87-93.

Pellini, L. (2006). Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos. Escuela superior de Salud y Ambiente, Universidad Nacional de Comahue.

Pérez , R., Camacho, M., Gómez, J., Ábalos, A., Viñas, M., and Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 39(1).

Pérez-Hidalgo, T., and José, T. (2004). La biorremediación frente al vertido del Prestige. Escuela de Minas de Madrid: publicación tecnológica y docente de la Escuela de Minas de Madrid, 1, 72-76.

Pérez, M. (2018). Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando pseudomonas fluorescens. Ingeniería En Biotecnología De Los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana. Quito.

Pérez, S., & Silva, I., & Peñuela Mesa, G., & Cardona Gallo, S. (2015). EVALUACIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES E HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO (GASOLINA Y DIESEL) EN UN SUELO: PROCESO DE TRANSPORTE Y BIORREMEDIACIÓN. Revista EIA, 12 (2), 21-46.

Petenello, M. C., & Feldman, S. R. (2012). Evaluación de la tolerancia a suelos contaminados con aceite diesel en especies vegetales con potencial biorremediador. Acta Biológica Colombiana, 17(3), 589-598.

Plata, L. (2012). Evaluación teórica de la remoción y tiempo de acción de tres técnicas de biorremediación, para tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga. Escuela de ingeniera. Facultad de ingeniería ambiental. Junio. Bucaramanga.

Prada, M. A. (2016). Un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con 1, 1, 1-tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) mediante un reactor de lecho estático. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

Prince, R. (2002). Bioremediation: an overview of how microbiological processes can be applied to the cleanup of organic and inorganic environmental pollutants. Pag: 693-712. in: Bitton, G. Encyclopedia of environmental microbiology. John Wiley & Sons. New York. United States of America.

Rahman K., Thahira J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. y Banat I. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresour. Technol. 90, 159-168.

Rajalingham, K. (2015). Use of microorganisms to subvert oil spills and their implications for animal and human health. Biotecnologia Aplicada, 32(3), 3101-3106.

Ramírez-Elías M., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Almaraz J., RamírezValverde G., De-Bashan L., Esparza-García F., García-Barradas O. (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. Applied Soil Ecology 82: 1-10.

Ramos, E., and Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel del laboratorio. Ecología Aplicada, 7, 123–130.

Refugio, P., Vázquez, R., Mx, R. (2011). Biorremediación de suelos con residuos agroindustriales

Rincón, M. (2004). Estudio de la biorremediación como una alternativa en la mitigación de la contaminación ambiental. Universidad Industrital de Santander.

Rittman, B. E., and McCarty, P. L. (2001). Environmental biotechnology: Principles and Applications. McGraw - Hill Series. Medellín: McGraw - Hill Series.

Rodríguez Alhama, I. (2013). Reciclado en suelos de lodos de refinería: nuevas aproximaciones para la biodegradación de hidrocarburos mediante el manejo de enmiendas orgánicas. Departamento De Química Agrícola, Geología Y Edafología. Proyecto de investigación. Universidad de Murcia. pp. 40-80

Roldán M. A. e Iturbe Arguelles R. (2005). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. Instituto de Ingeniería, UNAM. Cd. Universitaria.

Rosales, L. (2008). Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de la pudrición blanca Pleurotus ostreatus (setas) en Durango. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CIIDIR Durango-IPN). Durango, México. Págs, 107.

Safdari, M. S., Kariminia, H. R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., ... & Fletcher, T. H. (2018). Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. Journal of hazardous materials, 342, 270-278.

Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., & Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from Pseudozyma sp. NII 08165 or its culture broth. Bioresource technology, 191, 133-139.

Salamanca, A., and Sadeghian, S. (2006). La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelos de la zona cafetera colombiana.

Santos, J. (2007). Caracterización de Suelos Contaminados con Hidrocarburos en una Empresa Minera y Desarrollo de un Método Biológico para su Remediación. Tesis de Maestría Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. 190 páginas. México, D.F.

Schroeder, R. H. A., Rodríguez, V. I. D., & Hernández, L. G. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. Terra, 17(2), 159-174.

Seo, J., Keum, Y., & Li, Q. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. International journal of environmental research and public health, 6(1), 278-309.

Serrano A., Gallego M. y González J. (2006). Assessment of natural attenuation of volatile aromatic hydrocarbons in agricultural soil contaminated with diesel fuel. Environmental Pollution. 144, 203-209.

Siddiqui, S., and Adams, W. (2002). The fate of diesel hydrocarbons in soils and their effect on the germination of perennial ryegrass. Environmental toxicology, 17(1), 49-62.

SIEBE, C., and CRAM, S. (2015). Suelo y salud: un tema poco atendido que nos incumbe a todos. CONABIO. Biodiversitas 122: 1-5.

Siles, J. A., and Margesin, R. (2018). Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. Applied microbiology and biotechnology, 102(10), 4409-4421.

Sistema De Información Y Consulta Distribuciones Recursos Territoriales (SICODIS). (2018). Boletín SICODIS Nº 2: SGR. [en línea], disponible en:https://www.dnp.gov.co/programas/inversiones-y-finanzas-publicas/Paginas/Sistema-General-de-Regal%C3%ADas---SGR.aspx, [Consulta: 4 de Noviembre de 2018].

Ta-Chen, L., Po-Tsen, P., Sheng-Shung, C. (2010). Ex situ bioremediation of oilcontaminated soil. Journal of Hazardous Materials 176, 27–34. Taiwan.

Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., and Ciani, M. (2012). Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. International Biodeterioration & Biodegradation, 66(1), 39-46.

Tejada, I., and Fernando, L. (2016). Efectos del terrorismo en los oleoductos de Colombia (2000-2015) (Bachelor's thesis, Universidad Militar Nueva Granada).

Toro, M. A. T., & Quirama, J. F. R. (2015). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA), 3(2), 37-48. pp. 40-48

Torri, S., Cabrera, M., & Alberti, C. (2018). Respiración Potencial Durante La Bioestimulación De Un Suelo Contaminado Con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Revista internacional de contaminación ambiental, 34(1), 127-136. https://dx.doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.11

Trejos, M. C. (2017). Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín).

Trindade, P. V. O., Sobral, L. G., Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., & Soriano, A. U. (2005). Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. Chemosphere, 58(4), 515-522.

United States Department of Agriculture (USDA). (1972). Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil samples. US Government Printing Office.

United States Department of Agriculture USDA, (1999). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo.

Valenzuela, I. G., & Visconti, E. F. (2018). Influencia del clima, uso del suelo y profundidad sobre el contenido de carbono orgánico en dos pisos altitudinales andinos del departamento Norte de Santander, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 12(1), 233-243.

Vallejo, J. (2015). Estabilización De Suelos Contaminados Con Hidrocarburos Mediante El Uso De Materias Silíceo. Universidad Internacional SEK, 16-17.

Van Deuren, J., Ledbetter, J., and Wang, Z. (1997). Remediation technologies screening matrix and reference guide. LGS Turner & Associates, Limited. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. [En línea] disponible en : http://www.epa.gov/tio/remed.htm. ,[Consulta: 04 de mayo de 2017].

Vanguardia (2018). Las Cifras De La Emergencia Ambiental Por Derrame De Crudo En Santander. Vanguardia.com. Bogotá. Recuperado de: http://www.vanguardia.com/economia/local/428656-las-cifras-de-la-emergencia-ambiental-por-derrame-de-crudo-en-santander

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology, 223, 277-286. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037

Varjani, S. J., and Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514. Bioresource technology, 222, 195-201.

Vásquez, J. (2014). Contenido, formas y mecanismos de estabilidad del carbono orgánico en suelos del departamento del Magdalena (Colombia), bajo diferentes tipos de usos del suelo.

Viñas Canals, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universitat de Barcelona.

Vizuete García, R. A. (2011). Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo (Bachelor's thesis).

Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science, 37(1), 29–38.

Wanapaisan, P., Laothamteep, N., Vejarano, F., Chakraborty, J., Shintani, M., Muangchinda, C., ... & Pinyakong, O. (2018). Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. Journal of hazardous materials, 342, 561-570

Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., ... & Kettle, H. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. The ISME journal, 10(11), 2557.

Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., & Dick, W. A. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. Environmental pollution, 178, 152-158.

Wu, M., Dick, W., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... & Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation, 107, 158-164.

Wu, M., Li, W., Dick, W. A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., & Chen, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. Chemosphere, 169, 124-130.

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. Chemosphere, 172, 120-126.

Zárate, Y. (2014). Evaluación del impacto de la contaminación con diésel en las propiedades mecánicas de un suelo arcilloso (Doctoral dissertation).

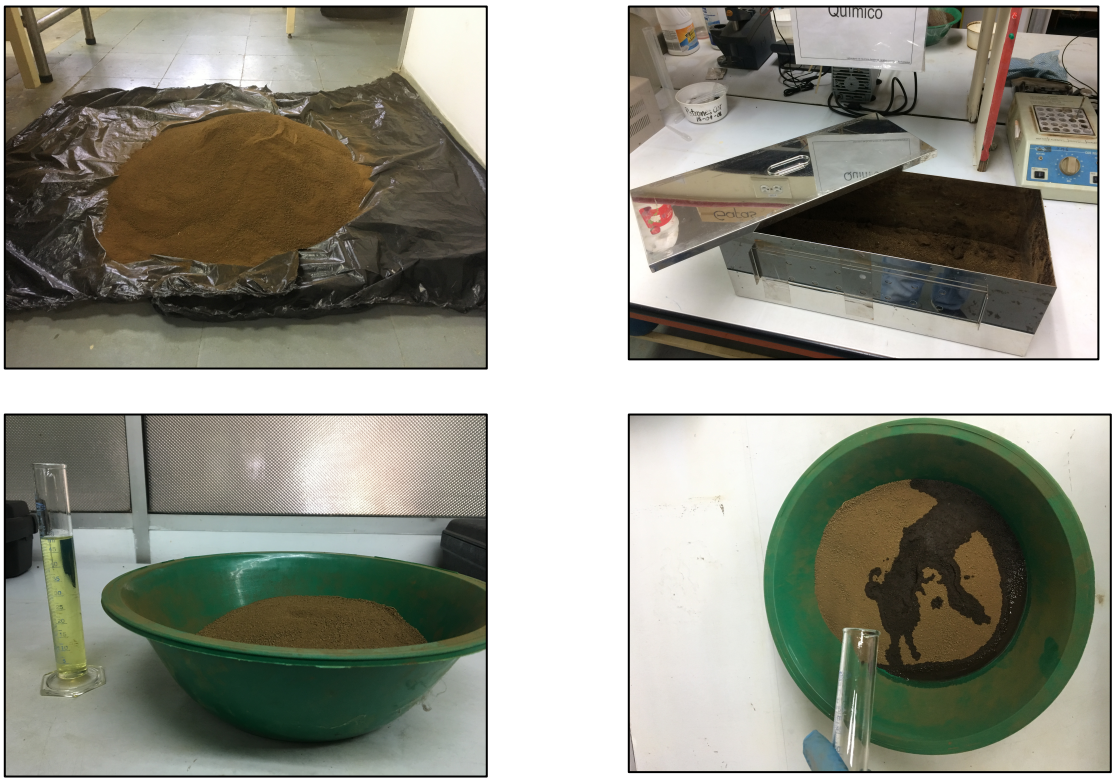
Zegarra H. (2000) Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis de Maestría Ingeniería Ambiental. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería de la UNAM. 146 páginas. México, D.F.

Zobell, C. E. (1946). Studies on redox potential of marine sediments. AAPG Bulletin, 30(4), 477-513.

Zúñiga, F. (2017). Suelo: un recurso no renovable fundamental para la seguridad alimentaria. Doctorado en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Tomado de: http://noticias.uach.cl/principal.php?pag=noticia-externo&cod=112162

13 Anexos

13.1 Anexo I. Archivo fotográfico



Fotografía 1. Preparación y contaminación del suelo

Localización de los mesocosmos

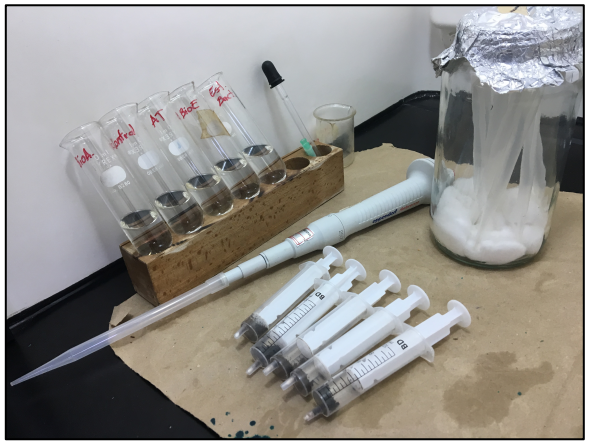
Durante el periodo del estudio los mesocosmos de cada tratamiento se ubicaron en un invernadero ubicado en la Estación de Experimentación de la Universidad del Valle

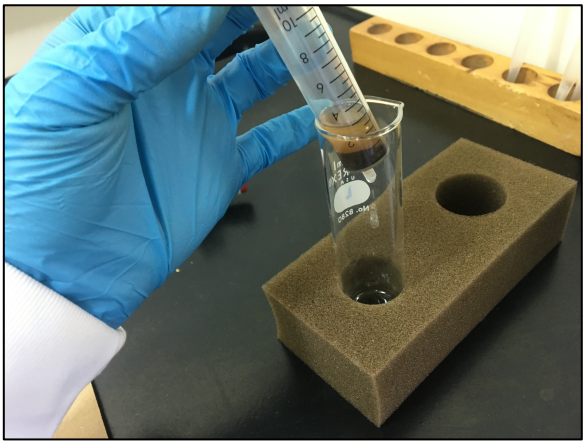


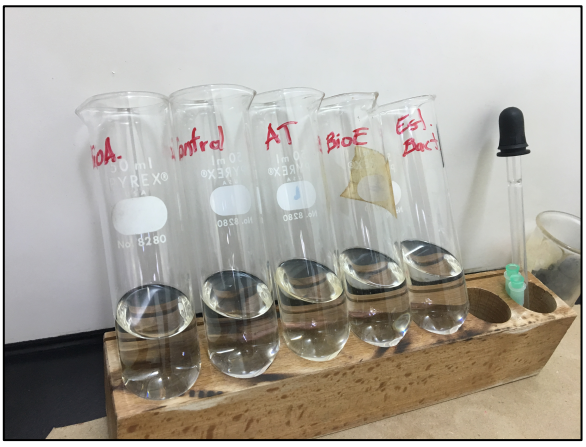


Fotografía 2. Localización de mesocosmos

Extracción de Hidrocarburos presentes en el suelo







Fotografía 3. Instrumentación para la extracción del hidrocarburo del suelo

13.2 Anexo II Determinación de Densidad aparente y real

Tabla 9. Determinación de la densidad real

Muestra	Picnómetro seco (g)	Picnómetro + agua (g)	Peso de suelo seco(g)	Picnómetro+agua +suelo (g)	Pw1	Pw2	Pw	Densidad Real (g/cm^3)
1	32,843	83,38	2	84,445	50,53	49,60	0,93	2,139
2	36,775	86,69	2	87,817	49,91	49,04	0,87	2,291
3	34,657	85,267	2	86,477	50,61	49,82	0,79	2,532
				Densidad real promedio (g/cm^3)				**2,321**

Tabla 10. Determinación de la densidad aparente

Prueba	Peso del suelo (g)	Peso del suelo + Parafina (g)	Volumen desplazado (ml)	Densidad aparente (g/cm^3)
1	3,3	4,5	4,2	1,149
2	3,1	4,5	3,8	1,383
		Densidad aparente promedio (g/cm^3)		**1,266**

13.3 Anexo III. Resultados Por CG/MS Para Cada Tratamientos Al Inicio Y Final Del Estudio

Tabla 11. Resultados por CG/MS de las concentraciones iniciales de HTP en cada uno de los tratamientos de biorremediación

ID#	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Concentración (mg/l)				
			C	AT	BS	BA	CM
1	C10	-	0	0	0	0	0
2	C11	11.92	110	111	112	112	111
3	C12	13.58	112	117	115	117	114
4	C13	14.98	109	115	112	114	111
5	C14	16.39	108	117	111	114	109
6	C15	17.71	106	96	93	93	93
7	C16	18.94	91	92	91	90	90
8	C17	20.09	92	83	82	82	82
9	C18	21.22	92	96	94	95	92
10	C19	22.30	85	86	85	85	85
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	68	74	69	72	68
12	C20	23.28	95	85	97	85	85
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	95	100	97	99	96
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	93	98	95	97	94
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	103	106	104	106	103
16	C22	25.14	96	88	98	88	97

17	C23	26.04	87	87	87	87	87
18	C24	26.83	102	108	105	105	104
19	C25	27.63	94	100	98	97	95
20	C26	28.56	105	106	105	106	105
21	C27	29.24	414	465	401	443	410
22	C28	29.99	470	498	468	501	473
23	C29	30.61	17	22	18	20	18
24	C30	31.40	175	175	175	175	175
		HTP (mg/l)	2,920	3,025	2,910	2,983	2,897

En las siguientes tablas se reportan los resultados finales obtenidos por CG/MS de cada uno.

Tabla 12. Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento Control (C)

ID#	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Concentración Final (mg/l)		
			C-1	C-2	C-3
1	C10	-	0	0	0
2	C11	11.92	0	0	0
3	C12	13.58	83	83	83
4	C13	14.98	79	79	78
5	C14	16.39	79	79	78
6	C15	17.71	73	73	74
7	C16	18.94	76	76	74
8	C17	20.09	69	69	69
9	C18	21.22	71	71	70
10	C19	22.30	65	65	65
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	49	49	47
12	C20	23.28	72	72	71
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	71	71	70
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	70	70	69
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	77	77	76
16	C22	25.14	73	73	72
17	C23	26.04	67	67	67
18	C24	26.83	78	78	77
19	C25	27.63	73	73	72
20	C26	28.56	77	77	77
21	C27	29.24	157	157	150
22	C28	29.99	214	214	206
23	C29	30.61	17	17	14
24	C30	31.40	134	134	134
		HTP (mg/l)	1,824	1,824	1,792

Tabla 13. Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Atenuación Natural (AT)

ID#	Compuestos	Tiempo de	Concentración Final

		Retención (min)	(mg/l)		
			AT-1	AT-2	AT-3
1	C10	-	0	0	0
2	C11	11.92	0	0	0
3	C12	13.58	83	83	83
4	C13	14.98	78	78	78
5	C14	16.39	78	78	79
6	C15	17.71	73	73	73
7	C16	18.94	70	69	70
8	C17	20.09	71	71	63
9	C18	21.22	73	73	73
10	C19	22.30	66	66	66
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	43	43	43
12	C20	23.28	72	73	65
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	67	67	67
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	66	66	66
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	73	73	74
16	C22	25.14	68	68	68
17	C23	26.04	67	67	67
18	C24	26.83	80	79	80
19	C25	27.63	75	74	75
20	C26	28.56	77	77	77
21	C27	29.24	151	149	156
22	C28	29.99	207	203	210
23	C29	30.61	20	20	20
24	C30	31.40	134	134	134
		HTP (mg/l)	1,790	1,781	1,786

Tabla 14. Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Bioestimulación (BS)

ID#	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Concentración Final (mg/l)		
			BS-1	BS-2	BS-3
1	C10	-	0	0	0
2	C11	11.92	0	0	0
3	C12	13.58	0	0	0
4	C13	14.98	0	0	0
5	C14	16.39	76	76	76
6	C15	17.71	72	72	74
7	C16	18.94	69	70	71
8	C17	20.09	64	65	66
9	C18	21.22	68	69	70
10	C19	22.30	66	67	65
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	0	43	43
12	C20	23.28	66	67	68
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	67	68	69
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	0	66	66
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	0	0	73
16	C22	25.14	69	70	71
17	C23	26.04	67	68	67

18	C24	26.83	73	74	75
19	C25	27.63	69	70	71
20	C26	28.56	77	77	77
21	C27	29.24	156	150	150
22	C28	29.99	207	206	203
23	C29	30.61	14	13	14
24	C30	31.40	134	134	134
		HTP (mg/l)	1,413	1,524	1,601

Tabla 15. Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Bioaumentación (BA)

ID#	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Concentración Final (mg/l)		
			BA-1	BA-2	BA-3
1	C10	-	0	0	0
2	C11	11.92	0	0	0
3	C12	13.58	0	0	0
4	C13	14.98	0	0	0
5	C14	16.39	76	76	76
6	C15	17.71	73	74	74
7	C16	18.94	70	72	72
8	C17	20.09	65	67	68
9	C18	21.22	69	71	70
10	C19	22.30	68	65	66
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	43	0	43
12	C20	23.28	68	65	65
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	68	70	66
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	66	66	66
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	73	0	0
16	C22	25.14	70	72	72
17	C23	26.04	69	67	67
18	C24	26.83	75	76	77
19	C25	27.63	70	72	72
20	C26	28.56	77	77	77
21	C27	29.24	148	146	151
22	C28	29.99	201	198	205
23	C29	30.61	14	15	18
24	C30	31.40	134	134	134
		HTP (mg/l)	1,594	1,483	1,538

Tabla 16. Resultados obtenidos por CG/MS para la concentración final de HTP del tratamiento de Control Microbiano (CM)

ID#	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Concentración Final (mg/l)		
			CM-1	CM-2	CM-3
1	C10	-	0	0	0
2	C11	11.92	0	0	0
3	C12	13.58	0	0	0

4	C13	14.98	0	0	0
5	C14	16.39	76	77	75
6	C15	17.71	72	72	72
7	C16	18.94	69	69	69
8	C17	20.09	65	68	63
9	C18	21.22	70	72	70
10	C19	22.30	65	66	65
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	22.44	43	43	43
12	C20	23.28	66	66	66
13	Hexadecadien-1-ol	24.24	67	66	67
14	Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24.23	0	66	0
15	Octadecanoic acid, methyl ester	24.58	73	73	73
16	C22	25.14	69	71	68
17	C23	26.04	67	67	67
18	C24	26.83	73	76	73
19	C25	27.63	69	71	69
20	C26	28.56	77	77	77
21	C27	29.24	154	148	149
22	C28	29.99	203	201	198
23	C29	30.61	14	15	14
24	C30	31.40	134	134	134
		HTP (mg/l)	1,523	1,595	1,512

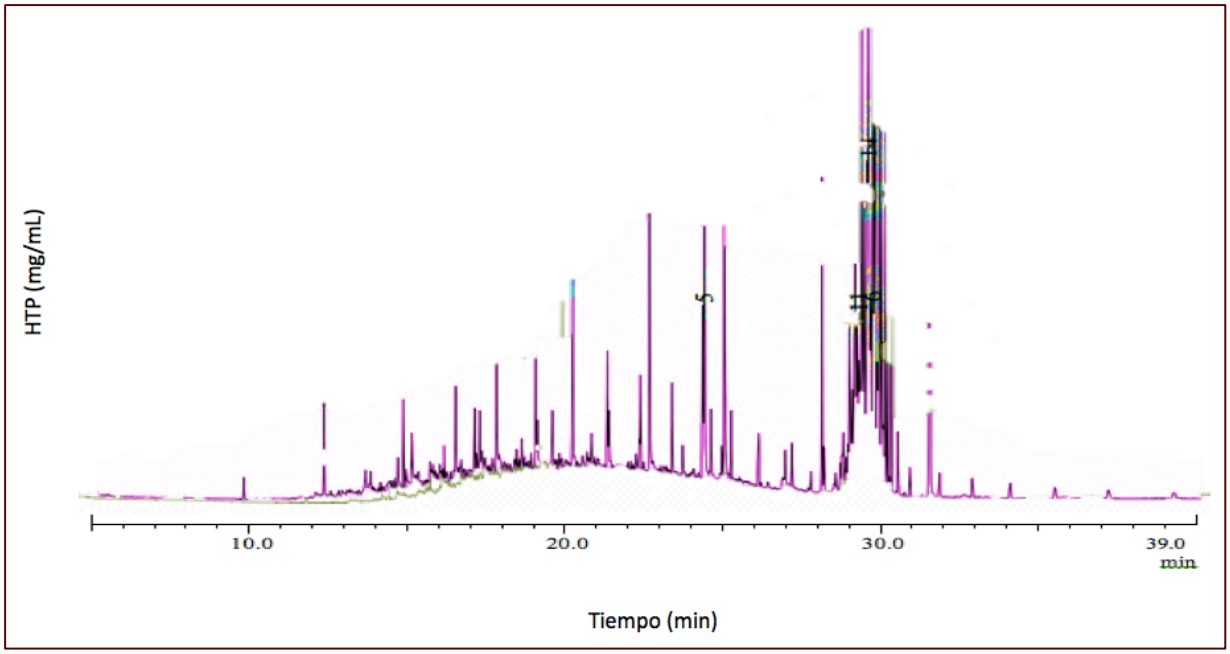
13.4 Anexo IV. Conversión A Unidades De mg/kg De Suelo Seco

Tabla 17. Concentración final de HTP en mg/kg de suelo seco de todos los tratamientos de Biorremediación en unidades de mg/kg de suelo seco

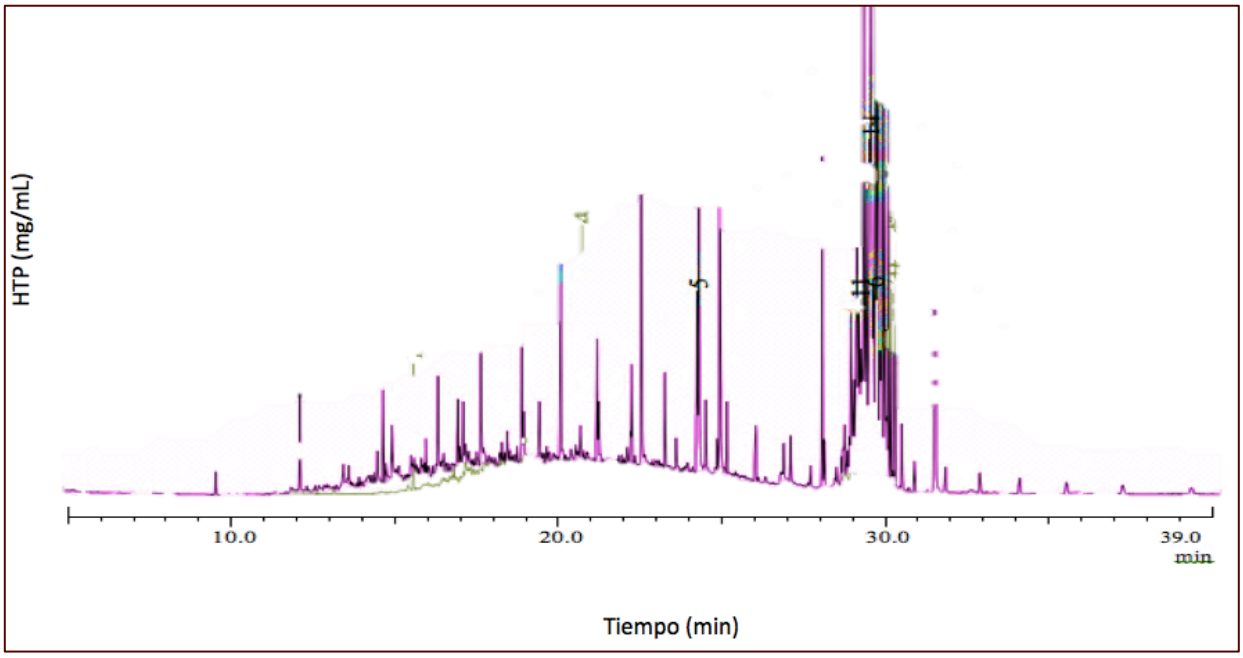
Concentración Final HTP (mg/kg)			
Tratamiento	**C (mg/l)**	**Hum (%)**	**C (mg/kg)**
C-1	1,824	21.36	3,478.35
C-2	1,824	24.53	3,624.63
C-3	1,792	24.69	3,568.57
AT-1	1,790	21.80	3,433.05
AT-2	1,781	23.61	3,497.94
AT-3	1,786	21.80	3,425.76
BS-1	1,413	27.71	2,931.89
BS-2	1,524	24.50	3,027.62
BS-3	1,601	25.00	3,201.80
BA-1	1,594	29.37	3,385.91
BA-2	1,483	24.00	2,925.99
BA-3	1,538	26.74	3,148.56
CM-1	1,523	29.53	3,242.19
CM-2	1,595	26.42	3,251.87
CM-3	1,512	31.93	3,331.67

13.5 Anexo V. Comparación de los espectro de CG/MS de la concentración inicial y final de cada tratamiento.

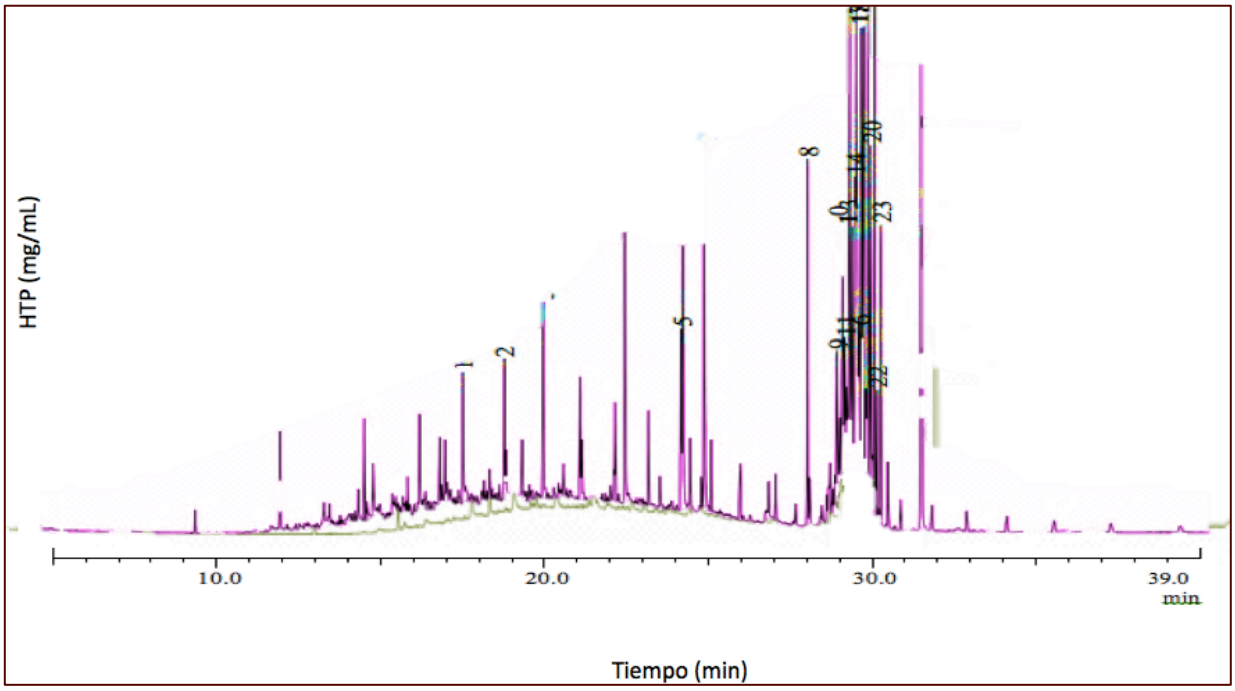
Control Químico (CQ)



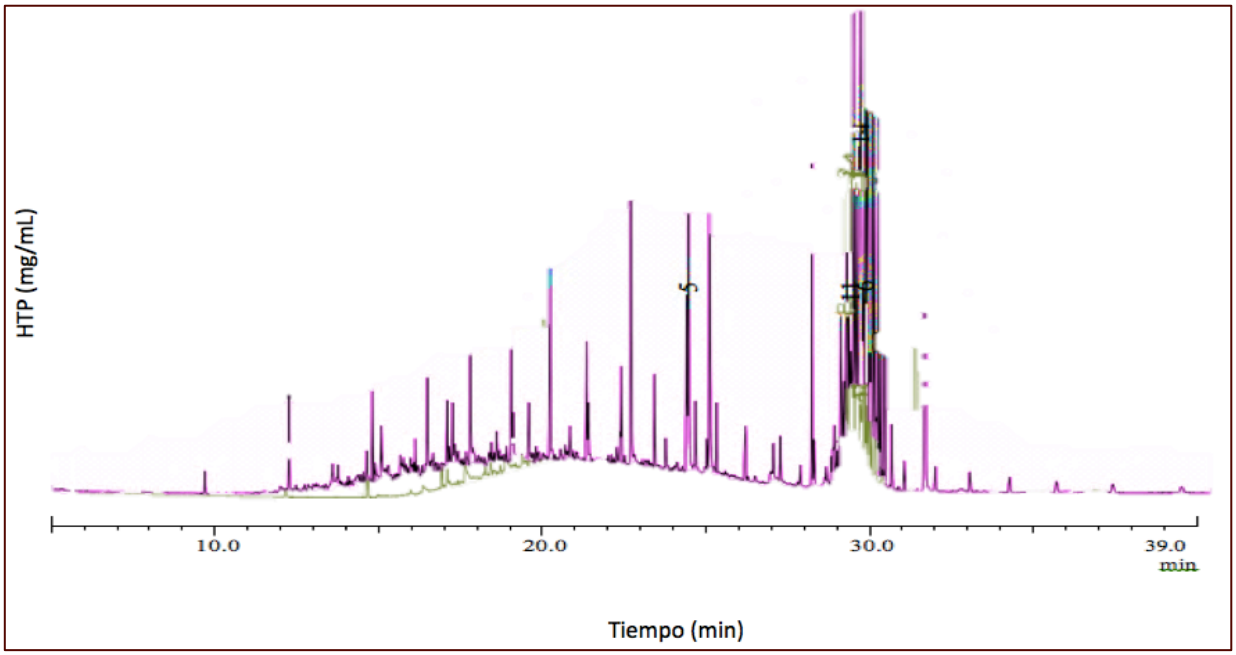
Atenuación Natural (AT)



Bioestimulación (BS)



Bioaumentación (BA)



Control Microbiano (CM)

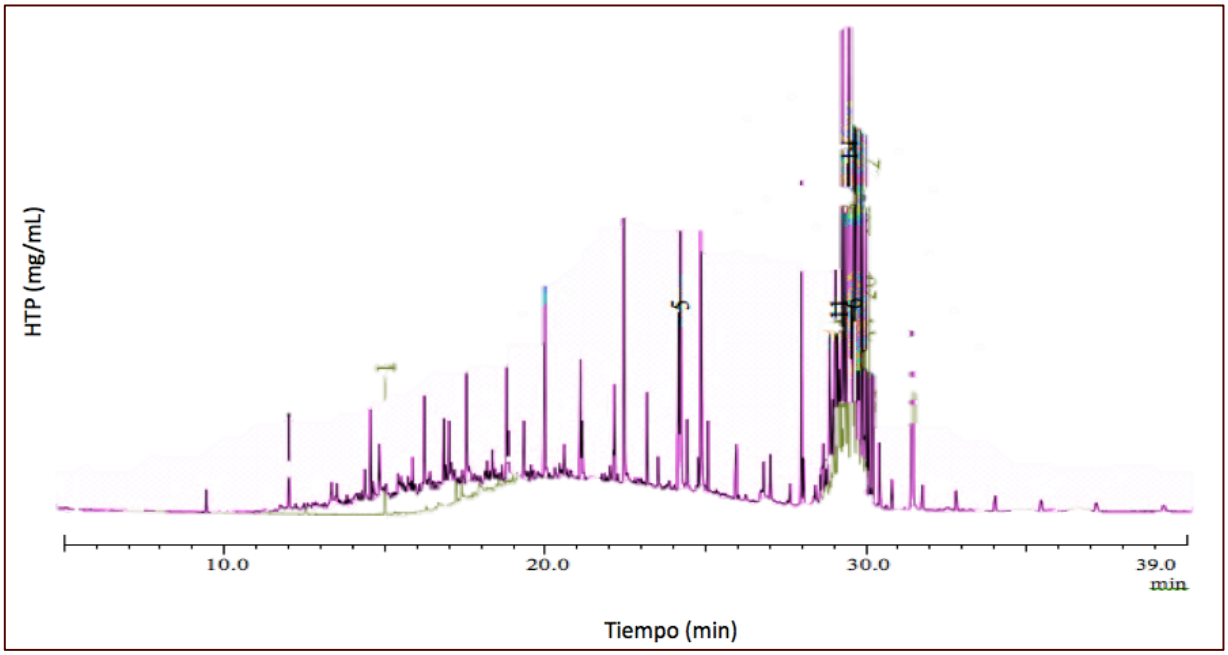


Figura 13. Resultado de CG/MS donde visualiza la concentración de HTP al inicio (Rosado) y la concentración final (Verde) de los tratamientos CQ, AT, BS, BA y CM en el mismo orden de aparición