

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS
TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S) A TRAVÉS DE LA ATENUACIÓN
NATURAL, BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN UN SUELO
CONTAMINADO**

MARIA ELIZABETH GÓMEZ RIVERA

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS Y ADMINISTRACIÓN
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
SECCIONAL BUCARAMANGA
FLORIDABLANCA**

2012

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS
TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S) A TRAVÉS DE LA ATENUACIÓN
NATURAL, BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN UN SUELO
CONTAMINADO**

MARIA ELIZABETH GÓMEZ RIVERA

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Ambiental

Director

MSc. MARÍA KOPYTKO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERIAS

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL

SECCIONAL BUCARAMANGA

FLORIDABLANCA

2012

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bucaramanga, Julio de 2012

***Dedicado a Dios, a mis padres
y a mis hermanos.***

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por llenarme de salud, vitalidad y paciencia para no rendirme ante las dificultades encontradas a lo largo de mi carrera, por ser mi luz, mi guía y mi fortaleza.

A mi madre por ser el motor de mi existencia, la inspiración y fuente inagotable de esperanza.

A mi padre por ser el mayor ejemplo de amor a la academia y por enseñarme el sentido de la palabra excelencia.

A todos y cada uno de mis hermanos, por sus muestras de afecto, paciencia y porque de una u otra forma han influenciado mi formación.

A la MSc. María Kopytko por sus enseñanzas, orientación y apoyo en todo el proceso de planeación y ejecución de este trabajo.

A Lilia Rodríguez por su apoyo desinteresado e incondicional en la ejecución de este proyecto, porque sin ella no se habría llevado a cabo.

Al personal de laboratorios de la Universidad Pontificia Bolivariana por su servicio y cordialidad, por contribuir en la solución de los inconvenientes que se presentaron.

Al Semillero de Investigación SINSA por su invaluable colaboración en el montaje del proyecto, especialmente a Liz Caicedo.

A Diana García por escucharme y colaborarme en lo que estuvo a su alcance.

A todos los docentes que estuvieron presentes en estos cinco años de estudio, compartiendo sus conocimientos y siendo pieza fundamental durante todo mi ciclo de pregrado. Agradezco infinitamente a todos los que me rodearon y contribuyeron directa o indirectamente en el camino para alcanzar esta meta.

CONTENIDO

1. OBJETIVOS.....	24
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2. MARCO TEÓRICO	25
2.1. GENERALIDADES DEL SUELO	25
2.1.1.1. Horizonte O	26
2.1.1.2. <i>Horizonte A</i>	26
2.1.2. Horizontes Subsuperficiales	27
2.1.2.1. <i>Horizonte E</i>	27
2.1.2.2. <i>Horizonte B</i>	27
2.1.2.3. <i>Horizonte C</i>	28
2.1.2.4. <i>Horizonte R</i>	28
2.2. PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO	28
2.2.1 Textura	28
2.2.2. Estructura	30
2.2.3. Porosidad	32
2.2.4. Permeabilidad	33
2.2.5. Densidad	33
2.3. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO	35
2.3.1. Reacción del suelo (pH)	35
2.3.2. Capacidad de Intercambio Catiónico.....	36
2.3.3. Color.....	36
2.3.5. Fracción inorgánica	38
2.3.6 Fracción orgánica	38
2.4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL SUELO	39

2.4.1 Microbiota: Población bacteriana	40
2.4.1.1. <i>Crecimiento bacteriano</i>	40
2.4.1.2. <i>Bacterias degradadoras de hidrocarburos</i>	42
2.5. HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S)	44
2.5.1 Hidrocarburos y su clasificación estructural.	44
2.6. TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S).....	45
2.6.1. Comportamiento de los HTP's en el ambiente	45
2.6.1.1. <i>Comportamiento de los HTP's en aguas</i>	45
2.6.1.2. Comportamiento de los HTP's en el suelo	46
2.7. MÉTODOS BIOLÓGICOS MÁS COMUNES APLICADOS PARA REMEDIACIÓN DE SUELOS.....	48
2.7.1. Atenuación natural.....	49
2.7.2. Bioestimulación	50
2.7.3. Bioaumentación.....	50
3. METODOLOGÍA	52
3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUELO	52
3.1.1 Temperatura.....	54
3.1.2. Textura	55
3.1.3. Densidad real	55
3.1.4 Densidad aparente	56
3.1.5. Humedad gravimétrica	56
3.1.6 Determinación de pH.....	57
3.1.7. Porosidad	57
3.1.8. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	58
3.1.9 Contenido de materia orgánica	58
3.2 ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO EN LAS MUESTRAS A TRAVÉS LA BIODEGRADACIÓN NATURAL, BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN.....	59
3.2.1 Descripción general.....	59
3.2.2. Descripción de los tratamientos	64

3.2.2.3 Reactor Bioestimulación.....	65
3.2.2.4 Reactor Bioaumentación	66
3.2.3 Muestreo	66
3.2.4 Análisis cuantitativo	68
3.3 COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN EL SUELO BIODEGRADADO POR LA ATENUACIÓN NATURAL, LA BIOESTIMULACIÓN Y LA BIOAUMENTACIÓN.	68
3.3.1. Muestreo	69
3.3.2 Curvas de crecimiento bacteriano	69
3.3.3. Linealización de curvas semilogarítmicas	70
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	71
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DEL SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS.....	71
4.1.1 Determinación de temperatura	71
4.1.2 Determinación de textura	72
4.1.3 Determinación de la Densidad Real	73
4.1.4. Determinación de la Densidad Aparente	74
4.1.5. Determinación de la Humedad Gravimétrica.....	74
4.1.6 Determinación del pH.....	75
4.1.7 Determinación de la Porosidad	76
4.1.8 Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico	77
4.1.9 Contenido de Materia Orgánica.....	78
4.2 ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S)	79
4.2.1 Hidrocarburos no polares	79
4.2.2 Grasas y aceites.....	81
4.2.3. Resultados de los porcentajes de remoción.....	83
4.2.3.1 Remoción de Hidrocarburos no polares.....	84
4.2.3.2 Remoción de Grasas y Aceites	85
4.3. CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO.....	85
4.3.1. Curvas de crecimiento bacteriológico.....	85

4.3.1.1. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Control.....	86
4.3.1.2. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Atenuación Natural	87
4.3.1.3. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Bioestimulación.....	88
4.3.1.4 Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Bioaumentación.....	89
4.3.2. Análisis del crecimiento bacteriológico a partir de la linealización de gráficas semilogarítmicas	91
4.3.2.1. Análisis para muestra Control	91
4.3.2.2. Análisis para muestra Atenuación Natural	92
4.3.2.3 Análisis para muestra Bioestimulación.....	93
4.3.2.4. Análisis para muestra Bioaumentación	94
4.3.3. Determinación del mejor crecimiento bacteriano.....	95
4.4. RELACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO Y LA DEGRADACIÓN DE TPH'S.....	96
4.4.1. Etapa I (entre el muestreo No. 1 y el muestreo No. 2)	96
4.4.2. Etapa II (entre el muestreo No. 2 y el muestreo No.3)	96
4.4.3. Etapa III (entre el muestreo No. 3 y el muestreo No.4)	97
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES.....	101
7. BIBLIOGRAFÍA.....	103
ANEXOS.....	108

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Triángulo de texturas.....	30
Figura 2.	Estructura de suelo Laminar.....	31
Figura 3.	Estructura Prismática.....	31
Figura 4.	Estructura de bloques: Angulares y Subangulares.....	32
Figura 5.	Homogenización de la muestra de suelo contaminada con hidrocarburo.....	53
Figura 6.	Diseño de los reactores.....	61
Figura 7.	Características de los reactores empleados.....	63
Figura 8.	Montaje general de los reactores.....	64
Figura 9.	Entrada del caudal de oxígeno a los reactores.....	66
Figura 10.	Empaques de muestras.....	67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades del suelo afectadas por acidez y basicidad.....	37
Tabla 2. Parámetros evaluados y método empleado en los análisis físico- químicos del suelo.....	55
Tabla 3. Especificaciones del equipo multiparámetro.....	58
Tabla 4. Especificaciones de las bombas de acuario.....	66
Tabla 5. Lectura del hidrómetro tras 40 segundos.....	73
Tabla 6. Lectura del hidrómetro tras 2 horas.....	73
Tabla 7. Resultados generales del análisis de textura del suelo.....	74
Tabla 8. Resultados de la determinación de densidad real.....	74
Tabla 9. Resultados de la determinación de densidad aparente.....	75
Tabla 10. Resultados del análisis de Humedad Gravimétrica.....	76
Tabla 11. Resultados de la determinación de pH.....	76

Tabla 12.	Resultados de la determinación de la porosidad.....	78
Tabla 13.	Resultados de la determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico.....	78
Tabla 14.	Resultados de la determinación de contenido de Materia Orgánica.....	79

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Comportamiento de la degradación de Hidrocarburos No Polares.....	77
Gráfica 2. Comportamiento de la degradación de Grasas y Aceites.....	78
Gráfica 3. Porcentajes de remoción alcanzados en cada uno de los tratamientos.....	80
Gráfica 4. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Control.....	83
Gráfica 5. (A)Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural.....	84
(B) Ampliación de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural entre 0 y 250000 UFC's.....	84
Gráfica 6. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioestimulación.....	85
Gráfica 7. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioaumentación.....	86
Gráfica 8. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra control.....	87
Gráfica 9. (A)Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural.....	88
(B) Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico entre 0 y 350000 UFC's de la muestra Atenuación Natural...	88
Gráfica 10. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioestimulación.....	89
Gráfica 11. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioaumentación.....	90

LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de arena.....	55
Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de arcilla.....	55
Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de limo.....	55
Ecuación 4. Determinación de la Densidad real.....	56
Ecuación 5. Determinación de la Densidad aparente (Da).....	56
Ecuación 6. Determinación de la Humedad gravimétrica (%HG)....	57
Ecuación 7. Cálculo del ΔpH	57
Ecuación 8. Cálculo de la porosidad (%Pt).....	58
Ecuación 9. Determinación de la CIC	58
Ecuación 10. Determinación de la normalidad (N) de la Solución Ferroso.....	58
Ecuación 11. Determinación del porcentaje de Carbono (%C).....	59
Ecuación 12. Determinación del porcentaje de materia orgánica (%MO).....	59
Ecuación 13. Cálculo de porcentajes de remoción.....	68

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Datos de seguimiento a la degradación de Hidrocarburos No Polares.....	108
ANEXO B. Datos de seguimiento a la degradación de Grasas y Aceites.....	109
ANEXO C. Datos de los porcentajes de remoción de Hidrocarburos No Polares y Grasas y Aceites.....	110
ANEXO D. Datos de seguimiento al crecimiento microbiológico.....	111

RESUMEN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) por medio de la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación en un suelo contaminado

AUTOR(ES): María Elizabeth Gómez Rivera

FACULTAD: Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: María Irena Kopytko

RESUMEN

Este proyecto se planteó buscando conocer el tipo de biorremediación más eficaz al remover Hidrocarburos Totales de Petróleo de un suelo contaminado, proveniente de un campo petrolero situado en Puerto Boyacá, Boyacá.

Para ello se compararon tres metodologías: Atenuación natural, Bioestimulación y bioaumentación. Su tratamiento se basó en la conservación de muestras de 1500 gramos y su duplicado, en reactores de vidrio, contando con condiciones de humedad óptimas; allí fueron sometidas a adiciones de agua destilada, oxígeno y un consorcio bacteriano (Ecomaxbact) respectivamente. También se contó con una muestra control, lavada con ácido clorhídrico para evitar el crecimiento microbiano que pudiera promover la degradación de hidrocarburos en el suelo.

El análisis de la degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo se realizó a través de mediciones periódicas (inicial y cada 5 semanas) durante 15 semanas del contenido de Hidrocarburos No Polares y Grasas y Aceites.

Adicionalmente, se realizó un seguimiento al crecimiento bacteriano de cada tratamiento en tres medios de cultivo (Agar Nutritivo, Agar Cetrimide y Agar Medio Basal de Sales suplementado con Fenol o Hidrocarburo), teniendo en cuenta que es el principal factor influyente durante la biorremediación. Para conocer acerca del comportamiento del suelo, se llevó a cabo una caracterización físico- química del mismo.

El cálculo de los porcentajes de remoción de Hidrocarburos No Polares mostró que la atenuación natural tuvo una eficiencia del 86,308%, la bioestimulación del 92,781% y la bioaumentación del 99,179 %. En el caso de grasas y aceites los resultados obtenidos fueron 59,007%, 71,836% y 93,269 % respectivamente.

El crecimiento bacteriano en Agar Nutritivo y Agar Cetrimide tuvo mejor comportamiento en la bioestimulación teniendo en cuenta la regresión lineal aplicada a las curvas de crecimiento, mientras que en Agar Medio Basal de Sales suplementado con Fenol o Hidrocarburo fue la bioaumentación.

PALABRAS CLAVE: Biorremediación, Hidrocarburos Totales de Petróleo, bioaumentación, bioestimulación, contaminación de suelos.

GENERAL SUMMARY OF GRADE'S WORK

TITLE: Comparative study of the biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH's) through natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation in contaminated soil

AUTHOR(S): Maria Elizabeth Gomez Rivera

FACULTY: Environmental Engineering

DIRECTOR: María Irena Kopytko

ABSTRACT

This project presents the most effective bioremediation option to remove Total Petroleum Hydrocarbons in a contaminated soil from Puerto Boyaca, Boyaca. The bioremediation methodologies evaluated were Natural Attenuation, Biostimulation and bioaugmentation. They had a specific treatment with distilled water, oxygen and a bacterial consortium called Ecomaxbact around 15 weeks. Also the study had a control sample, it was sterilized with hydrochloric acid in order to avoid the microbiologic growth.

The degradation was analyzed through periodic measurements of Non Polar Hydrocarbons and Oil and Grease and monitoring about the bacterial growth with three kind of agars: nutritive, cetrimide and MBS-HC. It was though because of the biological activity is the main factor in a bioremediation process.

The results showed 86,308%, 92,781% and 99,179% of removal in Non-Polar Hydrocarbons through Natural Atenuation, Biostimulation and Bioaugmentation respectively, also 59,007%, 71,836% and 93,269% of Oil and Grease removal. The biostimulation had the best bacterial growth in Nutritive Agar and Cetrimide Agar, meantime the bioaugmentation had the best behavior in MBS-HC Agar.

KEY WORDS: Bioremediation, Total Petroleum Hydrocarbons, bioaugmentation, biostimulation, contaminated soils.

INTRODUCCIÓN

La industria petrolera es considerada el motor de la economía mundial ya que brinda la energía necesaria para continuar con la cotidianidad productiva de todo el planeta.

Colombia cuenta con varios campos de explotación y refinación de hidrocarburos que durante los últimos 20 años han afectado la situación de sus ecosistemas debido a la ocurrencia de derrames (accidentales o provocados por grupos al margen de la ley), fugas en su transporte y otros inconvenientes en las etapas de su proceso productivo.

Tanto el aire, como el agua y el suelo han sufrido contaminación por este tipo de compuestos, desencadenando una serie de consecuencias no solo en las zonas afectadas sino también en las poblaciones aledañas que en ocasiones cambian su actividad productiva o su forma de vida forzadas por estas eventualidades.

Al hablar específicamente de la contaminación en suelos por presencia de hidrocarburos, se conoce que las acciones de corrección ante situaciones como las enunciadas anteriormente son de menor trascendencia, ya que en ocasiones brindan una mitigación únicamente a aspectos paisajísticos y dejan de un lado los efectos potenciales en suelos, aguas subterráneas, flora y fauna.

Por esto surge la necesidad de ahondar en el estudio de alternativas de solución a este tipo de acciones impactantes, que se muestren realmente viables al demostrar efectos permanentes con un bajo costo. Es allí cuando se debe recurrir a tratamientos de remediación biológicos, de los que ya se conoce requieren poca inversión monetaria y cuyos efectos perduran y mejoran con el paso del tiempo, llegando incluso a rehabilitar un terreno para ciertas actividades productivas.

Con base en ello, este proyecto quiso analizar si es más relevante la presencia de un aceptor de electrones (oxígeno) o de variedad de microorganismos en la biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburo, o en caso contrario a ello, si las condiciones ambientales pueden lograr una remoción considerable del contaminante sin incurrir en gastos adicionales que muchas veces restringen las acciones mitigadoras, correctoras o recuperadoras implementadas por una empresa de exploración y explotación de hidrocarburos.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio comparativo de la biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP's) por medio de atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en un suelo contaminado

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efectuar los análisis físico-químicos de interés en el suelo empleado en la investigación.
- Analizar la remoción de hidrocarburos totales de petróleo en las muestras tras la biodegradación natural, bioestimulación o bioaumentación.
- Comparar el crecimiento bacteriano en el suelo biodegradado por la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación.

2. MARCO TEÓRICO

La explotación intensiva de petróleo realizada durante décadas en Colombia ha generado graves alteraciones en los ecosistemas y en la salud humana.

Tanto el aire, como el agua y el suelo han sufrido contaminación por transporte, producción y almacenamiento de los hidrocarburos, debido especialmente a los derrames (accidentales o provocados por los grupos al margen de la ley) que han cambiado las características físico-químicas del ambiente, impidiendo su aprovechamiento y por lo tanto afectando la sociedad.

A continuación se revisan conceptos como generalidades del suelo, sus propiedades físicas, sus propiedades químicas, sus características biológicas, la toxicidad de los Hidrocarburos Totales de Petróleo y los métodos biológicos más comunes aplicados para remediación de suelos

2.1. GENERALIDADES DEL SUELO

El suelo se puede definir como un sistema abierto, ubicado en la capa superficial de la corteza terrestre, cuya composición básica es materia orgánica, agua, aire y minerales.¹

Principalmente cumple funciones de soporte a ecosistemas terrestres y protección a cuerpos de aguas superficiales y subterráneas, dado que actúa como filtro en el paso de sustancias tóxicas a los mismos. Además interviene en procesos de

¹ CONSEJERIA DE AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, MEDIO AMBIENTE Y ENERGIA DE ESPAÑA. El Suelo. [Consultada en 31-01-12]; Disponible en http://www.extremambiente.es/index.php?option=com_content&view=article&id=349&Itemid=239

mineralización de compuestos y es pieza indispensable en los ciclos biogeoquímicos.²

La formación del suelo fue influenciada por el clima, la actividad biológica, la topografía, el tiempo y material original (roca), es atribuida a un complejo proceso de fragmentación en el que la acción de fuerzas físicas, químicas y biológicas hacen que las rocas pasen a ser “regolitos”; desde allí, a través de meteorización se da origen al perfil del suelo.

Dicho perfil es conformado por horizontes, que son una serie de capas paralelas a la superficie del terreno. Los principales horizontes encontrados se clasifican como superficiales y subsuperficiales.

2.1.1. Horizontes Superficiales

Esta clase de horizontes se caracterizan por estar ubicados en las capas superiores del perfil del suelo y por poseer gran contenido de materia orgánica

2.1.1.1. Horizonte O

El Horizonte O se identifica con facilidad por poseer la mayor cantidad de materia orgánica (hojas, ramas, musgos, líquenes, etc), también llamada “humus”. Teniendo en cuenta que su composición se debe a la presencia de residuos animales y vegetales, se puede subclasificar como O1 cuando en la zona dichos restos son identificables y O2 cuando el nivel de degradación impide el reconocimiento de los mismos.

2.1.1.2. Horizonte A

El horizonte enunciado se conoce como la capa mineral dado que muestra el material rocoso total o parcialmente desintegrado; está ubicado cerca a la superficie del suelo o sucesivo (de forma descendiente) al horizonte O. Ésta capa se clasifica como A1 y A2. La primera definición (A1) hace referencia a aquella

² COMISION NACIONAL FORESTAL DE MÉXICO. Suelos Forestales. [Consultada en 31-01-12]; Disponible en <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/suelos>

que presenta una mezcla de mineral y humus, mientras la segunda (A2) es conocida como la zona de mayor lixiviación de arcillas de silicato, óxidos de aluminio y óxidos de hierro.

En el Horizonte A es típico encontrar coloración oscura, debido a la mezcla de humus y mineral, que genera una fijación de materia orgánica al suelo, realizada más por la actividad biológica que por translocación.³

2.1.2. Horizontes Subsuperficiales

Los horizontes Subsuperficiales deben su nombre a la ubicación que presentan en el perfil del suelo, pues no se encuentran expuestos en la superficie y su visualización se logra a través de excavaciones o apiques.

2.1.2.1. Horizonte E

El Horizonte E se caracteriza por la gran concentración de partículas de arena y limo, además de poca acumulación de arcillas de silicato, hierro y aluminio. Generalmente se encuentra cerca a la superficie, bajo horizontes O ó A y sobre el horizonte B, sin embargo esta clasificación puede ubicarse en otros niveles del perfil del suelo.

En la mayoría de los casos, este horizonte presenta un color mas claro que el que se encuentra debajo (Horizonte B), aunque puede presentar interferencias debido a la presencia de compuestos como los óxidos de hierro entre otros.

2.1.2.2. Horizonte B

El Horizonte B es la zona en la que se depositan y acumulan los compuestos lixiviados en el horizonte A (arcillas de silicato, óxidos de aluminio y óxidos de hierro), es posible notar procesos de remoción de carbonatos. En este horizonte es evidenciable la desintegración de la mayoría de la roca original.

³ ATLAS, Ronald. BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4 Ed. Madrid: Pearson Educación S.A., 2002. P 360-362

La unión de los horizontes A, E y B compone la región del perfil del suelo conocida como Solum.

2.1.2.3. Horizonte C

El Horizonte C está ubicado bajo el solum, hace referencia a material no consolidado que no cumple con las características de los horizontes descritos anteriormente y que puede presentar fenómenos de meteorización. Éste horizonte básicamente acumula yeso, calcio, carbonato magnésico y otras sales solubles; tras el únicamente se encuentra el regolito y el lecho de roca.

2.1.2.4. Horizonte R

El Horizonte R está compuesto por un lecho de roca, difícilmente penetrable y en el que la presencia de raíces es nula.⁴

2.2. PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO

Las propiedades físicas del suelo determinan principalmente su comportamiento en cuanto a capacidad de retención de líquidos y nutrientes, teniendo en cuenta las partículas que lo componen, su forma de agrupación, entre otros aspectos relevantes.

2.2.1 Textura

La textura es una propiedad que define la proporción aproximada de partículas de cierto tamaño (arena: 2-0,05 mm, limo: 0.05 – 0,002 mm y arcilla: menores a 0,002

⁴ UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPAÑA . Información de libros electrónicos y monografías. Horizontes Principales. [Consultada en 02-02-12]; Disponible en http://edafologia.ugr.es/programas_suelos/practclas/horsol/comun/horprinc.htm

mm) que componen el suelo.⁵ Las arcillas son consideradas los separados más pequeños, seguidos de los limos y por último las arenas.

Dado que la textura es un parámetro muy estable y constante con el paso de los años, ésta permite inferir las características del suelo respecto a su permeabilidad, capacidad de retención de humedad, plasticidad, aireación, condiciones de labranza, capacidad de intercambio catiónico y fertilidad.⁶

Por ello, la bibliografía muestra la importancia de realizar un análisis empleando las “clases texturales”, que básicamente muestran las combinaciones que se pueden presentar de los tres tipos de partículas en el suelo y así, brindar facilidad en la deducción de su comportamiento.

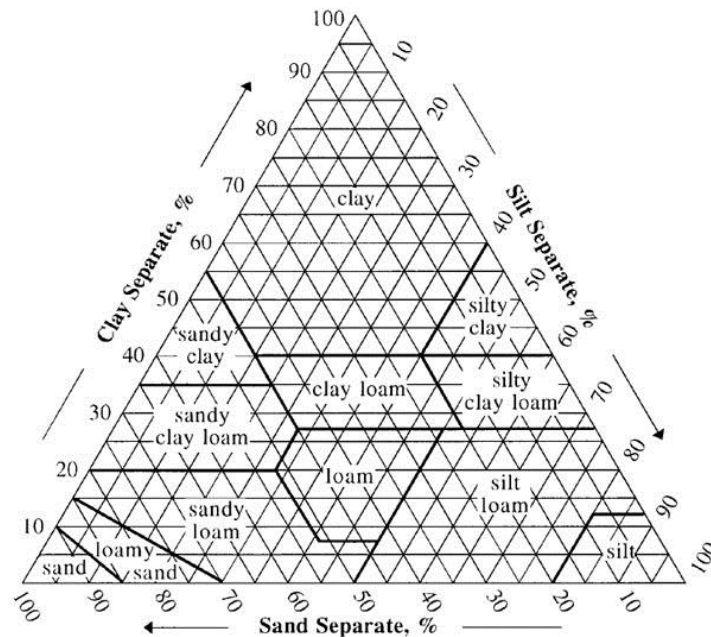
Las clases texturales permiten aproximar los intervalos de composición del suelo óptimos para la agricultura, según Duchaufour la mayoría de cultivos progresan en un terreno cuya textura contenga entre 40 y 45 % de arena, 30 y 35 % de limo y un 25% de arcilla.

En la figura 1 se puede observar como a través de los cálculos del método de Bouyoucus encontrados en la literatura, se determina un porcentaje de arena, limo y arcilla en la composición de un suelo y al señalar e intersectar dichos valores en este triángulo es posible conocer la clase textural de la muestra en estudio.

⁵ HERRERA, Johjan. Propiedades del suelo. [Consultada en 02-02-12]. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos65/propiedades-suelo/propiedades-suelo2.shtml>

⁶ MUSKUS, Angélica. Manual de Laboratorio de Análisis de Suelos; Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, 2001. P 29.

Figura 1. Triángulo de texturas



FUENTE: United States Department of Agriculture, 2012.

2.2.2. Estructura

La estructura hace referencia al modo en que las partículas se han unido para conformar unidades de mayor tamaño, conocidas como “agregados”.

Los agregados de gran desarrollo (son aquellos que conforman la estructura del suelo) presentan mayor resistencia a la humectación-dsecación, esta característica se puede deducir a través de un proceso manual de fragmentación, en el cual se observan los tamaños de las partículas resultantes, la facilidad con la que éstas se separaron y la presencia o ausencia de líneas de fisura. En el caso específico del tamaño, si los diámetros visualizados son mayores a 30 centímetros se puede decir que el horizonte es un macizo, es decir que no posee agregados y por ello su estructura es nula o continua, lo cual indicaría poca resistencia al evento mencionado anteriormente (humectación-dsecación).

Los tipos de estructura se clasifican como laminar (ver Figura 2.), prismática (ver figura 3.) o en bloques (ver Figura 4.). A su vez esta última se subdivide en bloques angulares, bloques subangulares, granular compuesta y granular porosa.⁷

Figura 2. Estructura de suelo Laminar



FUENTE: UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPAÑA . Información de libros electrónicos y monografías, 2012.

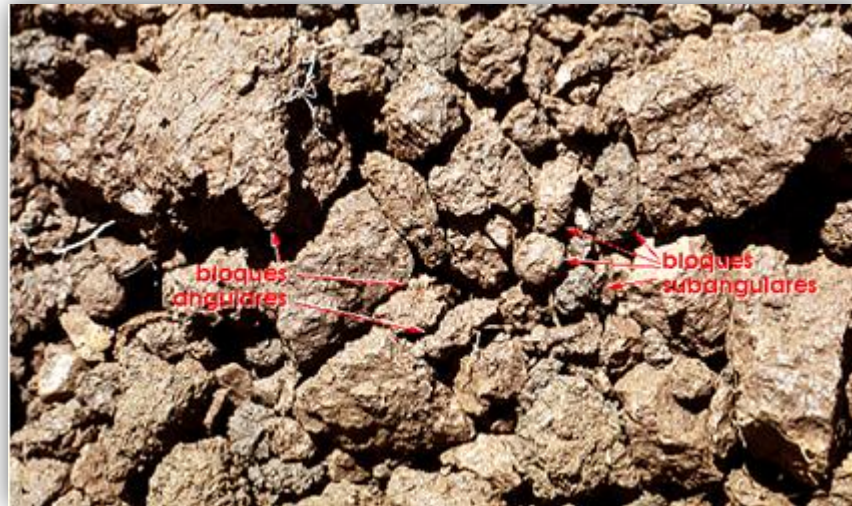
Figura 3. Estructura Prismática



FUENTE: UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPAÑA. Información de libros electrónicos y monografías, 2012

⁷ PORTA, J.; LOPEZ-ACEVEDO, M.; POCH, R. Introducción a la Edafología, uso y protección de suelos. 2 ed. Madrid: Mundi Prensa, 2012.P

Figura 4. Estructura de bloques: Angulares y Subangulares



FUENTE: UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPAÑA . Información de libros electrónicos y monografías, 2012.

2.2.3. Porosidad

La porosidad es un parámetro que muestra la proporción de espacios vacíos en un suelo respecto al peso del mismo. Esta propiedad es fundamental en la deducción de la actividad biológica del mismo, ya que involucra directamente su capacidad para retener agua y gas.

La capacidad de retención está sustentada en la presencia de macroporos y microporos; los primeros como su nombre lo indica son de gran tamaño, identificables a simple vista y abundantes en terrenos arenosos donde el agua no encuentra mayor obstáculo para fluir libremente, por lo cual, en la mayoría de casos estas cavidades contienen aire. Entre tanto, los microporos no son fáciles de visualizar y tienen alta capacidad para retener líquidos y poca presencia de gases, además se encuentran en gran cantidad en los suelos arcillosos.

El cálculo de la porosidad de forma indirecta requiere conocer la densidad real y la densidad aparente del suelo en estudio.

2.2.4. Permeabilidad

La permeabilidad es conocida como la capacidad de un suelo para dejar fluir un líquido, se encuentra estrechamente relacionada con la textura y la estructura del mismo, dado que el tamaño y la cantidad de poros presentes son influyentes en la determinación de la tasa de percolación (comportamiento del agua a través del suelo) y la tasa de infiltración (comportamiento del agua dentro del suelo).

Los suelos arenosos son los más permeables debido al tamaño de sus partículas, mientras que los arcillosos son el caso opuesto.

2.2.5. Densidad

La densidad es la relación entre la masa y el volumen de un cuerpo; sin embargo, en el caso específico de los suelos esta propiedad se divide en dos clases: densidad real y densidad aparente.

La densidad real también conocida como gravedad específica es aquella que se conoce al relacionar el peso seco del suelo con el volumen de agua que contenía el mismo; mientras que el segundo concepto incluye fundamentalmente el espacio poroso, es decir tiene en cuenta el volumen ocupado por la estructura original.⁸

2.2.6. Contenido de agua del suelo

El contenido de agua del suelo es un parámetro que indica la cantidad de agua ya sea en masa o en volumen que está presente en un suelo (humedad).

⁸ MUSKUS, Op. Cit.

Cuando el valor de humedad másica se encuentra entre un 5 y un 40 % se puede deducir que se trata de un suelo inorgánico, mientras que valores superiores evidencian un suelo orgánico.⁹

La capacidad de retención del suelo está interferida por el punto de marchitez la y capacidad de campo.

El punto de marchitez pretende determinar la cantidad mínima de agua necesaria para que una planta se marchite y no recupere un estado turgente pasadas doce horas en condiciones de saturación atmosférica.

La capacidad de campo es “la cantidad de agua retenida en el suelo tras el drenaje de 2 ó 3 días después de una lluvia o un riego abundante”. Aunque éste parámetro da orientación sobre las condiciones de retención de humedad de un suelo, es necesario considerar que la metodología de aproximación cuenta con interferencias como la humedad presente antes del riego intencional y las implicaciones de ésta en la redistribución del líquido durante las pruebas.

Para conocer más acerca de la retención del agua en el suelo se implementa la llamada curva característica de humedad, la cual es construida tras hallar valores experimentales mediante los fenómenos de humectación y desecación, en los que se observa cuidadosamente el sentido en el que ocurre un cambio en el contenido de agua, la velocidad de dicho cambio, la estabilidad de la estructura, tamaño y forma de los poros durante el tiempo, los cambios de volumen del suelo y las condiciones de la interfase agua – aire.

⁹ PORTA, et al. Op. Cit., p. 311-312

2.3. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO

Las principales propiedades químicas son la Reacción del suelo (pH), Capacidad de Intercambio Catiónico, Color, Acidez y Basicidad, Fracción Inorgánica y Fracción Orgánica.

2.3.1. Reacción del suelo (pH)

La reacción del suelo es relevante dado que orienta en el estudio de la movilidad, disolución y precipitación de electrolitos, al mismo tiempo que refleja la actividad biológica de un suelo, condiciona las reacciones redox y su comportamiento.

El parámetro en mención es analizado a través del pH, definido como: “el logaritmo decimal negativo de la actividad de protones en la fase líquida del suelo, de manera que, cuanto menor es el valor de pH, mayor es la acidez o la actividad de los protones”

La medición del pH no restringe su utilidad al reconocimiento del comportamiento de los protones, sino que también permite inferir la presencia o ausencia de compuestos como el carbonato cálcico y el aluminio biodisponible, que son rasgos fundamentales en la actividad biológica del suelo como se señaló anteriormente.¹⁰

Un rango de pH entre 6,0 y 7,5 puede contar con una disponibilidad ideal de nutrientes, mientras que valores inferiores a 5,5 (ácidos) y superiores a 8,0 (alcalinos) son perjudiciales para la mayoría de las plantas, debido a que afectan la población microbiana que interviene en el proceso de fijación del nitrógeno.

La corrección de estas cifras nocivas de potencial de hidrógeno implica tener en cuenta la textura del suelo pues a mayor cantidad de arcillas las acciones correctivas serán más complicadas por las características de retención de agua de dichas partículas.

¹⁰ Ibid., P 259.

2.3.2. Capacidad de Intercambio Catiónico

La superficie de las partículas de suelo (arcillas y humus) se encuentran cargadas negativamente, por ello, la capacidad de intercambio catiónico es la habilidad que poseen estos agregados o separados para retener iones positivos y así evitar fenómenos como el lavado de nutrientes.

Esta propiedad se ve influenciada por la textura (refiriéndose a la presencia de arcillas) y el contenido de materia orgánica de suelo, ya que las características coloidales del humus aumentan la capacidad e intercambio catiónico.

2.3.3. Color

El color es una propiedad cuya importancia no radica en la descripción del comportamiento del suelo, sino en la posibilidad de deducir la composición del mismo y la respuesta de los organismos que en él puedan habitar, especialmente plantas.

La descripción del color se realiza a través de tres parámetros: matiz, brillo y croma, que al asociarse en un punto de confluencia constituyen una caracterización. Este procedimiento es desarrollado empleando la Tabla de Munsell que contiene más de 250 colores y cuyo manejo se basa en la comparación con la muestra a analizar.¹¹

2.3.4. Acidez y basicidad

El diagnóstico de la acidez o basicidad de un suelo está directamente relacionado con su pH en solución acuosa, en ocasiones también se emplean resultados obtenidos tras una suspensión en KCl o en CaCl₂ para “desplazar del complejo de cambio los cationes acidificantes, tales como el aluminio en sus diversas

¹¹ Ibid., P 262

formas”.¹² En la Tabla 1 se resumen las implicaciones en las propiedades físicas y químicas de un suelo ácido o básico.

Tabla 1. Propiedades del suelo afectadas por acidez y basicidad

- Propiedades físicas afectadas: Dispersión – floculación de los coloides: iluvación. Estructura. Porosidad y aireación. Conductividad hidráulica. Régimen de humedad y de temperatura.
- Propiedades químicas afectadas: Meteorización química. Movilización de elementos tóxicos: Al, Mn y metales. Biodisponibilidad. Disponibilidad de nutrientes: Ca, Mg, Mo, P. Descomposición de la materia orgánica. Adsorción de aniones: fosfatos, sulfatos, cloruros. Procesos de hidromorfismo. Neoformación de minerales de arcilla.
- Propiedades biológicas: Relaciones bacterias-hongos Población bacteriana. Nodulación en leguminosas (Evans et al.1988) Humificación.

¹² LOPEZ-ACEVEDO, M; PORTA, J.; ROQUERO, C. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Madrid. Ediciones Mundi prensa, 2003. P 47.

Fijación de nitrógeno.

Movilidad y adsorción de nutrientes.

Fuente: PORTA J. et al, Edafología para la agricultura y el medio ambiente, 2003.

2.3.5. Fracción inorgánica

La fracción inorgánica aduce al 45 % de la composición sólida del suelo (partículas de arena, limo y arcilla) y su característica química se basa en minerales primarios y secundarios.

Los minerales primarios son aquellos cuyo origen fue el resultado de altas temperaturas en rocas ígneas y metamórficas, algunos de ellos son el cuarzo, los feldspatos, las micas y los piroxenos. Mientras que los secundarios son producto de reacciones a bajas temperaturas en rocas sedimentarias o por meteorización de minerales primarios, entre estos se encuentran los compuestos de azufre, carbonatos y diversidad de óxidos.

2.3.6 Fracción orgánica

La presencia de materia orgánica en los suelos se debe principalmente a los procesos de degradación de residuos vegetales y animales, las raíces y los microorganismos.

Aproximadamente el 5 % en peso de un suelo productivo corresponde a dichos compuestos y a pesar de tan poca participación cuantitativa, estos juegan un papel definitivo en la fertilidad de un terreno, además conforman el sustrato de los microorganismos, participan en diversos procesos químicos e influyen en las propiedades físicas del suelo.

La degradación de residuos vegetales por parte de los microorganismos da lugar a un proceso de transformación conocido como la humificación que resulta en la generación del humus y el paso de una fracción del carbono a dióxido de carbono.

El humus es una composición de sustancias poliméricas de gran peso molecular y resistentes a la descomposición, que principalmente se encuentra en la superficie del suelo y es insoluble.¹³

Los indicadores de la calidad de materia orgánica más empleados son la relación C/N (entre el contenido de carbono y contenido de nitrógeno) y la relación de la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de carbono. En el primer caso, este análisis se realiza teniendo en cuenta la definición del parámetro: “tasa a la cual el nitrógeno estará disponible para las plantas” y la facilidad de descomposición en condiciones aerobias, es decir, valores altos de esta relación se atribuyen a materia orgánica fresca y su disminución indica la transformación en humus.¹⁴

2.4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL SUELO

El enfoque dado a las características biológicas del suelo se refiere a los individuos que en este habitan, según su tamaño se pueden clasificar como: microbiota, mesobiota y macrobiota.¹⁵

La microbiota envuelve los organismos de menor tamaño, tales como las algas, protozoarios, hongos, líquenes y bacterias. Entre los aportes principales de este grupo se encuentran los procesos de respiración y de ATP¹⁶, como producto de la degradación de los residuos.

¹³ DOMÉNECH, X. Química del suelo. El impacto de los contaminantes. 3d. Madrid: Ediciones Miraguano S.A, 1997. P. 29-31

¹⁴ LOPEZ-ACEVEDO, et al., Op. Cit., p 166.

¹⁵ MIRANDA, Darío. RESPTREPO, Ricardo. Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales, un atentado contra el futuro.

¹⁶ GE, Gaofei; LI, Zhaojun; FAN, Fenliang; CHU, Guixin; HOU, Zhenan. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. Springer. 2009.

De forma ascendente en el suelo se encuentran los individuos que conforman la mesobiota, estos son los artrópodos, microartrópodos, anélidos y colémbolos.

Por último, en la capa más superficial habitan quienes integran el grupo de la macrobiota, cuya función básica es promover la mezcla del suelo e iniciar los procesos de descomposición de residuos. Entre dichos organismos están las lombrices, mamíferos (topos, armadillos, liebres y ardillas), reptiles (serpientes, tortugas y lagartos) y algunas aves.

2.4.1 Microbiota: Población bacteriana

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas, cuya reproducción es de tipo asexual. Estos individuos se caracterizan por poseer metabolismos heterótrofos por absorción o autótrofos por quimiosíntesis o por fotosíntesis (que definen el tipo de fuente de energía); estructuralmente poseen flagelos (algunas) y pared celular. Según estas descripciones es posible clasificar estos microorganismos.

El espesor de la capa de peptidoglucano contenida en la pared celular, define la clasificación bacteriana como Gram positivas o Gram negativas, dado que en el primer caso las células poseen gran cantidad de dicho copolímero y presentan una tinción púrpura, producto de la retención de yodo que es evidenciable empleando un microscopio óptico. Las bacterias Gram negativas presentan una tinción color rosa puesto que éstas no logran retener la sustancia en mención.

Las bacterias también se pueden clasificar a través de su forma en tres grupos: Bacilos, forma de bastón; espirilos, forma helicoidal o de espiral y cocos, esféricos.¹⁷

2.4.1.1. Crecimiento bacteriano

El crecimiento de las bacterias está determinado por las condiciones del medio, puesto que estos organismos cuentan con limitaciones específicas de pH,

¹⁷ MADER, Sylvia S., Biología. 9 Ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill Companies. 2007, p 371-372.

humedad y disponibilidad de una fuente de carbono para desarrollarse adecuadamente en un hábitat.

La velocidad de reproducción varía según el tipo de bacteria y los aspectos descritos anteriormente, a través de ella se conoce un parámetro llamado “tiempo de generación”, el cual hace referencia al tiempo que una célula requiere para duplicarse.

La estimación de este concepto (tiempo de generación) se puede realizar mediante la elaboración de graficas logarítmicas y su pendiente.

El ciclo de crecimiento de las bacterias comprende cuatro etapas o fases:

- Fase de Latencia: Este lapso es exclusivo para ciertos tipos de inoculaciones bacterianas, las que son aplicadas a un nuevo medio, las que provienen de un cultivo antiguo y son introducidas en el mismo medio de proveniencia o cuando se transfieren de un medio rico a uno pobre. También es necesaria cuando las células se han sometido a radiaciones, calor o sustancias tóxicas.

La etapa de latencia da lugar a que el metabolismo bacteriano asuma las condiciones ofrecidas por el medio para iniciar la síntesis de enzimas.

- Fase exponencial: comprende el momento de mayor aumento poblacional determinado por el tiempo de generación de cada tipo de bacteria, las condiciones ofrecidas por el hábitat y el tipo de célula, pues se conoce que las de mayor velocidad de crecimiento son las procariotas.
- Fase estacionaria: se llega a esta etapa cuando el crecimiento exponencial cesa ya sea debido a la ausencia de un nutriente esencial o a la acumulación de un desecho metabólico cuya concentración llega a impedir la reproducción. Sin embargo, las funciones celulares se desarrollan adecuadamente, llegando incluso a tener un crecimiento muy lento.

- Fase de muerte: esta fase refleja el momento en el que el número de células empieza a disminuir como consecuencia de la muerte que en ocasiones incluye lisis celular; también se describe mediante una curva exponencial sin embargo muestra una disminución más lenta que la reproducción.¹⁸

2.4.1.2. Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Las bacterias cuentan con la habilidad de llevar a cabo la mineralización de químicos orgánicos conduciéndolos finalmente a la formación de CO₂, H₂O y biomasa¹⁹, por ello se conoce su efectividad en la degradación de sustancias perjudiciales para el ambiente (y cualquier sustancia orgánica) dadas las condiciones de un hábitat.

Estos microorganismos tienen unos requisitos de disponibilidad de nutrientes que se deben cumplir para emplearlos en procesos de limpieza de compuestos nocivos encontrados en aguas y suelos, algunas bacterias que actúan en procesos de remediación sin aditivos especiales de ambientes afectados por hidrocarburos (atenuación natural) son las *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achrombacter*, *Anthrobacter* y *Micrococcus*.²⁰

Dados estos requisitos de sustrato (fuente de carbono), es necesario conocer acerca de las características de biodegradación del compuesto problema para establecer las posibilidades de eliminarlo o disminuir su presencia en un ecosistema.

En el caso de los hidrocarburos se cuenta con antecedentes que establecen la toxicidad de los alcanos de cadena corta para gran número de organismos, puesto

¹⁸ BROCK, Thomas; MADIGAN, Michael; Microbiología. 6ed. México: Prentice Hall, 1993. P 151-155

¹⁹ VENKATA, S.; DEVI, M.; CHANDRASEKHAR, K.; JUWANKAR, A.; SARMA, P. Bioremediation of petroleum sludge under anaerobic microenvironment: influence of biostimulation and bioaugmentation. Environmental Engineering and Management Journal, 2011.

²⁰ CORONA, Liliana; ITURBE, Rosario. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. México: Ingeniería, investigación y tecnología, 2005. P. 119-126.

que dichos compuestos pueden generar rupturas en la membrana lipídica bacteriana, aunque su depuración suele ocurrir mediante evaporación.²¹

Los alcanos de cadena larga presentan una resistencia a la biodegradación directamente proporcional a la longitud de su cadena, tanto así que al poseer un peso molecular superior a 500 dejan de ser aptos como sustrato microbiano. De igual forma, la presencia de ramificaciones en las cadenas carbonadas es señal de obstrucción en procesos para su eliminación. Los mejores procesos bacterianos ocurren cuando el material a eliminar es un alcano de cadena intermedia, por acción de especies como las *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Actinobacteria*.²²

Por otra parte, los Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares tienen una degradación más lenta en la cual se conoce que intervienen *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Ralstonia*²³, *Bacillus Subtilis*²⁴ mientras los compuestos Alicíclicos requieren de dos o más cepas bacterianas desarrollándose en cooperación para remediar un ambiente alterado.²⁵

²¹ TYAGI, Meenu; DA FONSECA, M. Manuela; DE CARVALHO, Carla C. C. R; Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Springer Science. 2010

²² Chikere, Chioma B.; Surridge, Karen J.; Cloete, Thomas E.; Okpokwasili, Gideon C; Phylogenetic diversity of dominant bacterial communities during bioremediation of crude oil – Polluted soil. Brasil: Revista Ambiente e Água. 2011. P.61-76.

²³ TYAGI, et al. Op. Cit

²⁴ MUKHERJEE, Ashis; BORDOLOI, Naba; Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. Springer-Verlag. 2010

²⁵ ATLAS, R. BARTHA, R., Op. Cit., p 522-524.

2.5. HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S)

Los hidrocarburos Totales de petróleo son las cantidades medibles de las mezclas de hidrocarburos provenientes del crudo que se encuentran en el ambiente.

El comportamiento de cada uno de ellos puede variar según su composición; la pluralidad de características se evidencia fácilmente, ya que es muy común encontrarlos desde colores muy claros y de apariencia ligera, que suelen evaporarse con facilidad hasta sustancias oscuras y espesas que no evaporan²⁶.

2.5.1 Hidrocarburos y su clasificación estructural.

Los hidrocarburos son compuestos que reciben dicha denominación debido a que sus principales componentes son el hidrógeno y el carbono. Según su estructura se pueden clasificar como alifáticos y aromáticos, estos primeros a su vez se componen de alcanos, alquenos, alquinos y cicloalcanos.²⁷

Los alcanos son hidrocarburos saturados (ocurren únicamente enlaces sencillos) que tienen por principal característica poseer cada átomo de carbono unido a otros cuatro átomos. La denominación “cicloalcanos” hace referencia a compuestos que también cumplen con los parámetros descritos previamente, cuya organización de carbonos ocurre a través de anillos en los cuales se reconoce una situación de tensión si estos cuentan con una particularidad en el ángulo tetrahédrico (que usualmente debe ser de 109.5°). Ésta situación de tensión hace de estos cicloalcanos (ciclopropano y ciclobutano) “inusualmente reactivos”.

Por otra parte los alquenos y alquinos se identifican a través de sus enlaces dobles y triples respectivamente, es decir son insaturados. Paralelo a estos compuestos, se encuentran los cicloalquenos y cicloalquinos, que conservan sus características de tipos de enlace pero contando con una estructura hexagonal con enlaces alternos (anillos bencénicos).

²⁶ U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). Estados Unidos. P 1-2.

²⁷ MORRISON, R.; BOYD, R. Química orgánica. 5ed. Wilmington: Iberoamericana, 1990. P

En cuanto a los hidrocarburos aromáticos, estos se definen como aquellos compuestos que poseen anillos bencénicos o se derivan del mismo. Su estructura presenta enlaces dobles alternos. A este grupo se suman los alquilbencenos cuya estructura es similar y se incluyen sustituyentes alquilo.²⁸

2.6. TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S)

Los efectos tóxicos que se pueden producir debido a la presencia de HTP's pueden variar según el tipo de sustancia liberada (alifáticos o aromáticos), el medio receptor y los organismos que en éste habitan, por ello es necesario conocer a modo general su comportamiento e implicaciones.

2.6.1. Comportamiento de los HTP's en el ambiente

El ingreso de los HTP's a un ecosistema puede generarse a través de múltiples factores bióticos o abióticos. Los factores bióticos se caracterizan por tener una forma de recepción que incluye este tipo de sustancias en la cadena trófica, terminando por bioacumularse y biomagnificarse en su ambiente cotidiano.

Los factores abióticos al actuar como receptores de HTP's sufren una serie de cambios en su composición que suelen iniciar con un impacto paisajístico y terminan con la afectación de todo su ecosistema. Entre estos recursos afectados encontramos comúnmente las fuentes hídricas y los suelos.

2.6.1.1. Comportamiento de los HTP's en aguas

En el comportamiento de los HTP's en agua lo más probable es que la mancha contaminante flote en el lugar del escape, afectando a la población que se alimenta habitualmente bajo su ubicación actual. Inicialmente la capa

²⁸ WHITTEN, k.; DAVIS, R.; PECK,M,; STANLEY,G.; Química . 8 ed.México: Cengage Learning Editores S.A ,2008 .P 971-989

sobrenadante obstruye el intercambio gaseoso normal que ocurre entre la columna de agua y la atmósfera (aunque no en su totalidad) y principalmente restringe el paso de rayos solares a través de la superficie, conllevando a la ausencia de fotosíntesis y con esto ocurre una catastrófica disminución de oxígeno disuelto en agua que finalmente logra llegar a la anoxia del ecosistema.

Es apenas lógico que las afectaciones a flora y fauna vayan intrínsecamente relacionadas, dado que se presenta desde muerte de fitoplancton, plantas macrófitas, macroinvertebrados, hasta peces, aves y anfibios relacionados al cuerpo hidrográfico afectado.²⁹

Por otro lado, el suelo debido a sus propiedades físicas promueve el movimiento de la sustancia nociva a través del mismo, logrando alcanzar incluso las aguas subterráneas.³⁰

2.6.1.2. Comportamiento de los HTP's en el suelo

La presencia de hidrocarburos en el suelo hace que el intercambio gaseoso entre la atmósfera y la materia orgánica en forma de humus se interrumpa, al mismo tiempo que se da inicio a una serie de procesos físico químicos de penetración y evaporación cuyas características dependen de factores como la textura del suelo, el tipo de hidrocarburos derramado, entre otros. Los efectos toxicológicos sobre la fauna recaen principalmente sobre invertebrados de la microbiota y las poblaciones bajo la superficie terrestre, mientras que mamíferos, anfibios e invertebrados asociados a las plantas tienen posibilidad de huir fácilmente.

Por otra parte, las implicaciones en la vegetación por afectación con hidrocarburos comprenden principalmente reducción en los procesos de transpiración, respiración, fotosíntesis, germinación y crecimiento. Es relevante añadir que la vegetación está directamente relacionada e influenciada por las condiciones

²⁹ MIRANDA, D.; RESPTREPO, R., Op. Cit.

³⁰ U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Op. Cit.

alteradas de formación de suelos y de ciclos de nutrientes que tienen ocurrencia tras la inclusión de hidrocarburos en el ecosistema terrestre.³¹

2.6.2. Toxicidad generada por los HTP's en el ser humano

La presencia de HTP's en la cotidianidad es más frecuente de lo pensado, estos compuestos químicos generan vías de exposición en cualquier tipo de actividad del ser humano. Es posible detectarlos en vapores de gasolina liberados por las estaciones de servicio, en productos químicos empleados en el hogar, en algunos pesticidas, entre otros.

Incluso en casos más específicos, las fugas en tanques de almacenamiento subterráneo pueden alcanzar acuíferos, que potencialmente afectarán las fuentes de agua potable y un derrame puede volatilizar sustancias que serán respiradas por pobladores de la zona afectada. A esto se suma que la contaminación por HTP's en suelos es frecuente, por tanto cualquier terreno destinado a la recreación es una vía de exposición.

La HTP's pueden ingresar al cuerpo humano mediante inhalación, ingestión (agua y alimentos) o contacto directo con la piel.

Cuando la ruta de ingreso es oral y/o respiratoria las sustancias químicas entran rápidamente en el torrente sanguíneo y de allí pueden tanto pasar a cualquier órgano como transformarse en compuestos más o menos dañinos.

Si se presenta contacto directo con la piel los compuestos de HTP's son absorbidos lentamente.

Una vez al interior del cuerpo humano, los efectos adversos de estas composiciones químicas varían según la concentración, el tiempo de exposición y el tipo de sustancia.

³¹ MIRANDA, Darío; RESPTREPO, Ricardo. Op. Cit.

En el caso del benceno, el tolueno y el xileno (presentes en la gasolina) se desencadenan alteraciones en el sistema nervioso central o la muerte en caso de exposiciones muy altas. Los efectos del tolueno pueden ir desde mareo, dolor de cabeza y náusea, hasta los señalados anteriormente.

Ciertas fracciones de HTP's afectan principalmente la sangre, los riñones, el bazo, el hígado, el sistema inmunológico y pulmones; además pueden afectar el desarrollo del feto.

Particularmente los compuestos con n-hexano al ser inhalados en ciertas concentraciones pueden causar un desorden nervioso conocido como "Neuropatía periférica".

A nivel cutáneo y ocular se pueden producir irritaciones por contacto directo.

Finalmente la salida de estos compuestos químicos del cuerpo humano ocurre a través de la orina y la exhalación.³²

2.7. MÉTODOS BIOLÓGICOS MÁS COMUNES APLICADOS PARA REMEDIACIÓN DE SUELOS

La depuración biológica de contaminantes o biorremediación es básicamente una alternativa de mitigación o corrección de impactos, mejorando las condiciones del medio que fue afectado, es decir, su principio operativo consiste en brindar los elementos necesarios para que los microorganismos se reproduzcan exponencialmente e incluyan en de su metabolismo el elemento nocivo para el ambiente encontrado en el área afectada.

Cabe resaltar que estos procesos son lentos, por ello se recurre a la adición de sustancias como oxígeno, agua y nutrientes, además de la vigilancia constante de

³² U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Op. Cit. P 2-3

los valores de pH y temperatura como parámetros indispensables en la conservación de la población degradadora.

La degradación biológica se produce gracias a la ocurrencia de reacciones de óxido – reducción, por lo tanto se requiere contar con aceptores de electrones, que comúnmente son el O₂, NO₃, SO₄ y CO₂. Además, este proceso exige una relación de concentraciones O:N:P mínima de 100:5:1(DOMÉNECH, 1995).

Tras contar con estas óptimas condiciones, los organismos pueden dar inicio a un proceso de adaptación, que se reflejará en su reproducción dentro y una aceleración en la degradación de la sustancia nociva.

La velocidad de biodegradación depende de factores como la naturaleza química del contaminante, la adaptación de los microorganismos al suelo, la toxicidad de la sustancia a tratar, el pH, la temperatura, el grado de agitación y la humedad del medio.

Sabiendo que la remediación del suelo depende de tantos parámetros, es posible encontrar varias opciones ajustables a las condiciones propias del terreno a restaurar y que permiten aumentar la eficiencia de la eliminación de un contaminante, en este caso específico se profundizará en tres metodologías: atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación.³³

2.7.1. Atenuación natural

Es un proceso de degradación también conocido como “Biodegradación Intrínseca”, en el cual las concentraciones de un contaminante disminuyen por acción de microorganismos nativos del suelo.³⁴

Además de las características microbianas del suelo, este método es influenciado por “los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización,

³³ DOMÉNECH, Op. Cit., p 171-173

³⁴ ROMANIUK, Romina; BRANDT, Juan Felipe; RIOS, Paola Ruth; GIUFFRÉ, Lidia ;Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. Ciencia del Suelo.2007, p139-149

sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio catiónico, complejación, transformación abiótica)”

Cabe resaltar que la eficiencia de éste y todos los tipos de remediación depende de la disponibilidad adecuada de nutrientes y agua, en tanto estos factores influyen en la velocidad de degradación.

Así mismo, cuando se habla específicamente de atenuación natural de hidrocarburos es probable contar con adiciones de algún tipo de surfactante, entonces se hace indispensable garantizar que su dosis no interfiera en la identificación del hidrocarburo como sustrato para la población microbiana nativa.³⁵

2.7.2. Bioestimulación

La Bioestimulación es una metodología de biorremediación que se basa en la adición de sustratos y/o factores que limiten el crecimiento de los microorganismos nativos, para promover el aumento de su población en función de la concentración de material contaminante encontrado en su medio y así aumentar la remoción del mismo.

Principalmente se debe ejercer un control sobre los valores de pH encontrados en el suelo a tratar, la disponibilidad de agua y oxígeno (o ausencia según las condiciones microbiológicas requeridas: anaerobias o aerobias) y las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo, garantizando que estos nutrientes estén en contacto con el hidrocarburo.³⁶

2.7.3. Bioaugmentación

La Bioaugmentación también es conocida como “siembra”, su principio de acción es adicionar una cepa o un consorcio bacteriano cuyo potencial degradador del contaminante sea conocido.

³⁵ CORONA, L.; ITURBE, R., Op. Cit.

³⁶ SEMINARIO CONTROL DE DERRAMES DE HIDROCARBUROS (1: Mayo de 2012: Universidad Pontificia Bolivariana, Bucaramanga, Colombia). Bioremediation in oil spill response.

Usualmente es empleado en suelo cuya población microbiológica es muy baja o en caso que dichos individuos nativos no cuenten con las capacidades metabólicas para degradar la sustancia nociva en cuestión.³⁷

Es de suma importancia establecer que la elección de la bioaumentación como metodología de biorremediación requiere un estudio previo del “microcosmos” y su capacidad colonizadora y degradadora, por tanto es necesario realizar una serie de análisis de laboratorio afines a la caracterización molecular, que permitan la identificación de los microorganismos presentes para facilitar la elección del consorcio o la cepa a inocular.³⁸

³⁷TYAGI,et al.,Op. Cit.

³⁸ GÓMEZ, Wilmar; GAVIRIA, Jair; CARDONA, Santiago. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina - diesel. Dyna. 2009.P 83-93.

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada durante este estudio se encuentra resumida a continuación y se describe teniendo en cuenta el orden de procedimientos realizados con la muestra, al igual que los objetivos planteados para la ejecución del proyecto.

3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUELO

La muestra de suelo objeto de esta investigación fue extraída de un campo petrolero ubicado en jurisdicción del municipio de Puerto Boyacá, en el departamento de Boyacá, Colombia.

Los parámetros a evaluar se determinaron teniendo en cuenta registros históricos facilitados por la empresa responsable de la contaminación en dicho campo, que no pueden ser publicados debido a políticas de privacidad.

Debido a que el procedimiento planteado para el estudio fue de tipo ex situ y a cuestiones administrativas, no hubo participación en el muestreo, por lo tanto los datos presentados a continuación que refieren metodologías in situ (como temperatura y densidad aparente) fueron suministrados por el personal calificado que estuvo en el lugar.

Para realizar los análisis físico-químicos en el suelo de interés y el montaje experimental se llevó a cabo la homogenización de la muestra contaminada con hidrocarburo al remover material vegetal y pétreo, empleando un tamiz cuyo tamaño de malla fue de 2mm; tal como se ilustra en la Figura 5.

Figura 5. Homogenización de la muestra de suelo contaminada con hidrocarburo



FUENTE: La Autora

En la Tabla 2 se presentan los análisis físico-químicos y los métodos empleados en la caracterización del suelo proveniente de Puerto Boyacá.

Tabla 2. Parámetros evaluados y método empleado en los análisis físico-químicos del suelo

ANÁLISIS	MÉTODO EMPLEADO
Temperatura	Método In Situ
Textura	Método de Bouyoucos
Densidad Real	Relación de volumen de agua desplazado por el suelo, mediante Principio de Arquímedes
Densidad Aparente	Relación de peso total del suelo seco y el volumen del cilindro.
Humedad gravimétrica	Diferencia de pesos en suelo húmedo y seco
Determinación de pH	Medición en solución de KCl y en solución acuosa, empleando el potenciómetro
Porosidad	Relación entre la densidad aparente y la densidad real
Capacidad de Intercambio Catiónico	Método del acetato de amonio
Contenido de Materia Orgánica	Método de combustión húmeda de Walkey y Black

FUENTE: Manual de Laboratorio de Análisis de Suelos, Universidad Pontificia Bolivariana, 2009

3.1.1 Temperatura

La temperatura fue determinada de forma In Situ, empleando un termómetro de mercurio que fue introducido en el terreno muestreado a 4 y 60 centímetros de profundidad

3.1.2. Textura

La textura fue evaluada mediante el Método de Bouyoucos, que tiene como principio la Ley de Stokes para la aproximación de los porcentajes de arena, limo y arcilla.

La determinación de la textura se basa en dos lecturas arrojadas por el hidrómetro, la primera ocurrirá 40 segundos después de finalizar una disturbación en la muestra y la segunda tras 2 horas de reposo de la misma.

Una vez conocidos estos dos valores y tomando la temperatura en cada uno de los casos, se procede a aplicar las ecuaciones enunciadas a continuación para obtener los porcentajes de arena, arcilla y limo que componen la muestra

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de arena

$$\% \text{ Arena} = 100 - \frac{1ra \text{ lectura corregida del hidrómetro tras } 40'' \times 100}{\text{peso de la muestra (gr)}}$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de arcilla

$$\% \text{ Arcilla} = 100 - \frac{2da \text{ lectura corregida del hidrómetro tras } 2 \text{ horas} \times 100}{\text{peso de la muestra (gr)}}$$

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de limo

$$\% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

Al obtener los tres valores porcentuales, estos son ubicados en cada uno de los lados del triángulo textural (según corresponda) y su punto de confluencia determinará la clase textural a la que pertenece el suelo en estudio.

3.1.3. Densidad real

La Densidad Real se basa en la relación establecida entre el volumen de agua desplazada por una cantidad específica de muestra de suelo previamente secada a 105° C, aplicando el principio de Arquímedes.

Dicha determinación se logra mediante el siguiente cálculo:

Ecuación 4. Determinación de la Densidad real

$$D = \frac{m \text{ (gr)}}{v \text{ (ml)}}$$

Donde :

m= masa

v= volumen

D= Densidad (gr/ml)

3.1.4 Densidad aparente

La Densidad Aparente es de tipo in situ, se basa en la extracción de una muestra de suelo sin disturbar empleando un tubo de PVC cuya masa es conocida; tras ello se lleva a un secado durante 24 horas a 105°C para obtener el dato real de peso del suelo. El cálculo empleado en esta determinación está dado por la Ecuación 5.

Ecuación 5. Determinación de la Densidad aparente (Da)

$$Da = \frac{\text{Peso de la muestra tras secado (gr)}}{\text{Volumen del cilindro (cc)}}$$

3.1.5. Humedad gravimétrica

La humedad gravimétrica se establece mediante la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco (tras someter a una temperatura de 105°C) de una muestra de suelo, aplicando la Ecuación 6.

Ecuación 6. Determinación de la Humedad gravimétrica (%HG)

$$\%HG = \frac{(\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso de la muestra seca})}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100$$

3.1.6 Determinación de pH

La metodología empleada se basa en la medición del potencial de hidrógeno del suelo en dos soluciones: acuosa y de KCl, para ello se emplea un potenciómetro.

En esta ocasión se empleó un equipo multiparámetro con las especificaciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones del equipo multiparámetro

MARCA	Hach
MODELO	Hq40d
SERIE	100800045-298

FUENTE: Manual de instrucciones del equipo multiparámetro

La Ecuación 7 permite relacionar los dos valores obtenidos y conocer las características del suelo como intercambiador catiónico.

Ecuación 7. Cálculo del ΔpH

$$\Delta pH = pH \text{ en solución de KCl} - pH \text{ en solución acuosa}$$

3.1.7. Porosidad

La porosidad del suelo es determinada mediante la aplicación de la Ecuación 8 mostrada a continuación, que relaciona los resultados de densidad real y densidad aparente obtenidos previamente.

Ecuación 8. Cálculo de la porosidad (%Pt)

$$\%Pt = \left[1 - \left(\frac{Da}{D} \right) \right] \times 100$$

3.1.8. Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

La CIC es determinada al emplear acetato de amonio para absorber los cationes del suelo en estudio, su cuantificación se realiza a través de la Ecuación 9 señalada a continuación

Ecuación 9. Determinación de la CIC

$$CIC \left(\frac{meq}{100 \text{ gr}} \right) = \frac{[(V - B) \times N_{soda} \times 100]}{\text{Peso de la muestra (gr)}}$$

Donde:

V= Volumen de soda gastado en la titulación de la muestra

B= volumen de soda gastado en la titulación del blanco

N= Normalidad de la soda empleada

3.1.9 Contenido de materia orgánica

Para conocer el contenido de materia orgánica del suelo objeto se empleó el método de combustión húmeda de Walkley y Black. Los cálculos requeridos para su determinación se muestran a en las Ecuaciones 10,11 y 12.

Ecuación 10. Determinación de la normalidad (N) de la Solución Ferrosa

$$N \text{ solución ferrosa} = \frac{\text{Volumen de } K_2Cr_2O_7 \times \text{Normalidad de } K_2Cr_2O_7}{\text{Volumen de solución ferrosa}}$$

Ecuación 11. Determinación del porcentaje de Carbono (%C)

$$\%C = \frac{(B - M) \times 0.003 \times 1.3 \times 100}{\text{peso de la muestra (gr)}}$$

Donde:

B= Volumen de solución ferrosa gastada en la titulación del blanco

M= Volumen de solución ferrosa gastada en la titulación de la muestra

Ecuación 12. Determinación del porcentaje de materia orgánica (%MO)

$$\%MO = \%C \times 1.724$$

3.2 ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO EN LAS MUESTRAS A TRAVÉS LA BIODEGRADACIÓN NATURAL, BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN.

3.2.1 Descripción general

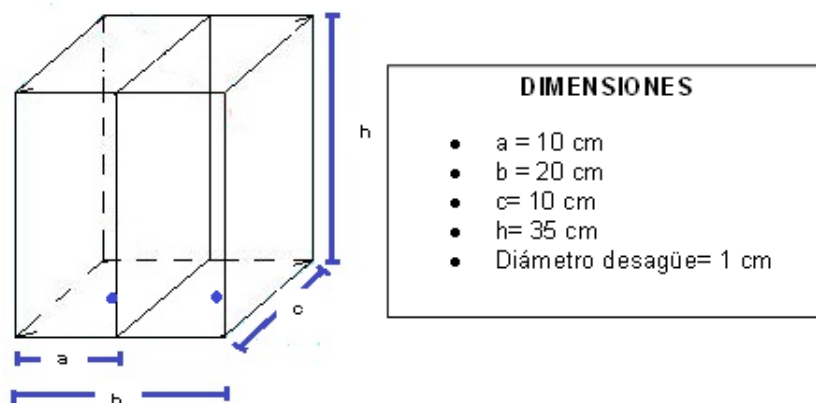
Los HTP's hacen referencia a todos los compuestos originarios del petróleo crudo y esto abarca las sustancias conocidas como aceites minerales, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos extractables y grasas y aceites, por tanto fue necesario optar por análisis de laboratorio que dieran aproximaciones reales de los valores de sustancias derivadas del crudo encontradas en el suelo; se decidió realizar las pruebas conocidas como Hidrocarburos No Polares complementadas por Grasas y Aceites para ejecutar un análisis inductivo del tipo de hidrocarburos eliminados y remanentes en el suelo estudiado.

La segunda prueba mencionada excluye la cuantificación de PAH's y de hidrocarburos de cadena corta debido a que en su procedimiento estos sufren volatilización.

Los experimentos fueron realizados en los reactores cuyo diseño se visualiza en la figura 6. La forma empleada (prismática) se eligió basándose en el proceso de degradación, ya que éste no requería control del comportamiento hidráulico al interior del reactor, debido a que no se considera de flujo continuo. Las dimensiones utilizadas se determinaron teniendo en cuenta antecedentes que hacen referencia a que los mejores resultados obtenidos en biorremediaciones han ocurrido en la capa superficial del suelo, entre los 0 y 20 centímetros de profundidad (KELLER et al, 2008). Por otra parte, el tiempo dispuesto para la remediación obligaba a contar con una muestra que se pudiera mezclar adecuadamente (CACCIATORE Y MCNEIL, 1995).

En estos recipientes se aplicaron los tipos de biorremediación bajo las mismas condiciones iniciales de humedad, pH y temperatura (igual suelo, del mismo campo). Los biorreactores contaban con una simulación de pozo de inspección elaborada usando un tubo de PVC perforado (diámetro: 0,5 pulgadas; altura 15 centímetros), que actuó como instrumento de distribución de todas las soluciones suministradas.

Figura 6. Diseño de los reactores



FUENTE: La Autora

Con el fin de garantizar la presencia de nutrientes en el suelo, se realizó una aplicación del fertilizante conocido como “Triple quince” (durante 3 días en soluciones con concentración de 6 mg/ml), antes de introducir los métodos de biorremediación en cada uno de los reactores.

En la Figura 7 se muestran los tubos de PVC adecuados como pozo de inspección y el recubrimiento en las paredes de los reactores empleando papel craft para evitar el paso de luz y simular condiciones de oscuridad debidas al perfil del suelo, con ello se brindaban a los microorganismos nativos condiciones similares a las encontradas en campo, que facilitaran sus procesos metabólicos y favorecieran la degradación de hidrocarburos.

Una de las características de campo simuladas que tuvo gran importancia fue que los biorreactores estuvieron expuestos al ambiente en la superficie, puesto que se quiso contar con una interacción microbiana entre el suelo y el medio en el que éste se encontraba. De igual forma, la exposición facilitaba la evacuación del Dióxido de Carbono que habitualmente se genera en este tipo de degradaciones biológicas y con ello evitaba la disminución del pH. Además la exposición al

ambiente no promovía la volatilización de compuestos dado que los PAH's sufren evaporación rápidamente tras un derrame y en este caso el evento ocurrió hace mas de 10 años, por tanto los hidrocarburos concentrados en la muestra son un remanente.

Durante las 15 semanas que permanecieron las muestras en tratamiento se garantizaron condiciones de humedad, mediante la adición de 40 mililitros de agua destilada cada 48 horas, de manera tal que se promoviera el adecuado desarrollo microbiológico y a su vez se impidiera la generación de lixiviados para evitar pequeñas pérdidas que disminuyeran los valores de hidrocarburos no polares, grasas y aceites como consecuencia de un arrastre.

Figura 7. Características de los reactores empleados



FUENTE: La Autora

3.2.2. Descripción de los tratamientos

El montaje empleado para el estudio comparativo se basó en cuatro reactores con su respectivo duplicado (que contenían 1500 gramos de muestra por compartimiento; 3000 gramos por reactor).

Cada uno de los tratamientos dados a la muestra se ilustran en la Figura 8 y se describen a continuación. En la imagen se visualizan de izquierda a derecha los reactores correspondientes a Bioestimulación, Atenuación Natural, Bioaumentación y Control.

Figura 8. Montaje general de los reactores



FUENTE: La Autora

3.2.2.1. Reactor Control

El procedimiento correspondiente al control contó con esterilización mediante la adición de una solución de ácido clorhídrico 2M (2 litros por muestra) que fue repetida al cabo de 48 horas y cuyo único “tratamiento” se basó en la adición de agua destilada como se describió anteriormente.

3.2.2.2. Reactor Atenuación Natural

Este reactor contenía el suelo sin ningún tipo de aditivo diferente a los señalados en la descripción general, de igual forma contaba con las condiciones allí enunciadas que también correspondían a las de los otros tres reactores.

3.2.2.3 Reactor Bioestimulación

Adicional a los lineamientos del numeral 3.2.1., este reactor contó con un sistema de aireación mecánica durante la totalidad del ensayo empleando una bomba de acuario cuyas especificaciones se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 4. Especificaciones de las bombas de acuario.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
MARCA	RESUN
MODELO	AC-500
CAUDAL	1,2 Lit/Min
PRESIÓN	>0,010 Mpa

FUENTE: Caja de presentación Air Pump AC-500

En la Figura 9 se muestra la forma en la que se diseñó la entrada del caudal de oxígeno en forma de aire.

Figura 9. Entrada del caudal de oxígeno a los reactores



FUENTE: La Autora

3.2.2.4 Reactor Bioaumentación

El tratamiento correspondiente a bioaumentación contó con las condiciones enunciadas en la descripción general; además de la aireación continua empleando bombas de acuario (ver Tabla 3) estas muestras de suelo fueron adicionadas con un consorcio microbiano llamado ECOMAXBACT, cuyo procedimiento de aplicación es reservado debido a políticas de privacidad del ICP.

3.2.3 Muestreo

El ensayo contó con una duración de 15 semanas, en las cuales se realizaron 4 muestreos partiendo de la identificación de la concentración inicial de la muestra y realizando un seguimiento cada 5 semanas.

Cada una de las tomas de muestra fue realizada en el punto central del reactor, previa agitación al interior del mismo, para disminuir las interferencias por zonas muertas en su interior.

Posteriormente, las muestras eran empacadas en bolsas con cierre hermético (ver Figura 10) y enviadas al Laboratorio de Aguas y Suelos del Instituto Colombiano de Petróleos (ICP).

Figura 10. Empaques de muestras



FUENTE: La Autora

Las muestras fueron sometidas a un primer análisis (grasas y aceites) que comprende una extracción con diclorometano de todos los compuestos correspondientes a hidrocarburos y grasas y aceites (sin garantizar que la presencia de éstas se debe a causas petrolíferas), siguiendo el protocolo de la Norma EPA 9071B.

Tras dicho procedimiento, se adiciona Sílica Gel a la muestra cuyo efecto es dar paso libre a los compuestos no polares a través de una filtración, siguiendo los lineamientos de la Norma EPA1664; finalizando así la cuantificación de Hidrocarburos Totales de Petróleo.

3.2.4 Análisis cuantitativo

El análisis de los resultados obtenidos durante las 15 semanas de tratamiento del suelo contaminado con hidrocarburo a través de cada uno de los métodos, se llevó a cabo mediante la construcción de las curvas de degradación de hidrocarburos no polares y de grasas y aceites (a través de Microsoft Excel 2010), al igual que se calcularon los porcentajes de remoción para cada parámetro, como se muestra en la Ecuación 13.

Ecuación 13. Cálculo de porcentajes de remoción

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(\text{concentración inicial} - \text{concentración final})}{\text{concentración inicial}} \times 100$$

3.3 COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN EL SUELO BIODEGRADADO POR LA ATENUACIÓN NATURAL, LA BIOESTIMULACIÓN Y LA BIOAUMENTACIÓN.

El crecimiento de la población bacteriana existente se conoció aplicando el método PTE 120023, enunciado por Journal Microbiological Methods y conocido como Recuento de microorganismos totales en gota (Unidades Formadoras de Colonia/ mililitro) en tres agares diferentes: Agar Nutritivo, Agar Cetrimide y Agar MBS-HC.

Estos medios de cultivo permitieron inferir o aproximar información acerca del tipo de bacterias que contribuían en la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo.

Al emplear el conteo en agar nutritivo se aproximaron la cantidad de bacterias aerobias totales presentes en suelo, sin especificar algún rol de estas como degradadoras de hidrocarburos. Mientras que en agar cetrimide se restringe el crecimiento a microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* que han sido previamente identificados por su capacidad degradadora. Además, este medio de cultivo es aún más selectivo al promover el desarrollo de la *sp. Pseudomona Aeruginosa*,

Por último, el Agar Medio Basal de Sales suplementado con Fenol o Hidrocarburo (MBS-HC) debe su nombre a su labor en el aislamiento de bacterias degradadoras de dichos compuestos, por tanto como aspecto relevante se conoce que la incubación de las muestras en estudio se debe realizar estrictamente a 35°C.

3.3.1. Muestreo

Se tomaron muestras de suelo cada 5 semanas, procurando contar con condiciones estériles, en tanto el laboratorio en el que se conservaron los reactores los permitió. Las muestras eran extraídas tras una agitación previa del suelo al interior del reactor y se conducían en bolsas con cierre hermético hacia el Laboratorio de Biotecnología del ICP donde eran analizadas como se especificó anteriormente.

3.3.2 Curvas de crecimiento bacteriano

Se graficaron las curvas correspondientes al crecimiento bacteriano promedio para cada uno de los tratamientos en los 3 agares enunciados. Esto se ejecutó empleando Microsoft Excel 2010.

3.3.3. Linealización de curvas semilogarítmicas

Para realizar una comparación del crecimiento bacteriológico en cada uno de los tipos de biorremediación, se recurrió al concepto de la fase exponencial que tiene lugar en “la curva de crecimiento típica para una población bacteriana”, pues en ella se cita que esta etapa muestra la forma en que el número de células se dobla cada cierto período de tiempo.

Partiendo de este concepto y conociendo que la principal característica gráfica de éste crecimiento exponencial es el aumento progresivo de la pendiente, se procedió a realizar una linealización de las curvas semilogarítmicas obtenidas anteriormente, utilizando Microsoft Excel 2010 para deducir cual tratamiento tuvo mejor crecimiento durante las 15 semanas de estudio.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DEL SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS

El análisis físico químico estuvo compuesto por la determinación de temperatura, textura, densidad real, densidad aparente, humedad gravimétrica, pH, porosidad, capacidad de intercambio catiónico y el contenido de materia orgánica.

4.1.1 Determinación de temperatura

La temperatura ambiental registrada en el momento del muestreo fue de 35°C. Por otra parte la evidenciada en la superficie del suelo fue de 36,6°C y la encontrada tras excavar 60 centímetros fue de 29,6°C.

La temperatura ambiente promedio al interior del laboratorio en el que se realizaron los procedimientos fue de 24°C. Al relacionarla con las señaladas anteriormente se encuentra que ésta no promovió las condiciones necesarias para la volatilización de compuestos de hidrocarburos residentes en el suelo, puesto que las sustancias encontradas en la muestra son remanentes de derrames en los que ya hubo evaporación de las sustancias y ahora solo se cuenta con presencia de hidrocarburos persistentes (ATDSR, 1999)

Por otra parte, no hay afectación a la flora bacteriana nativa, dado que conociendo las condiciones tropicales del lugar, se define que se trata de organismos mesófilos cuya temperatura óptima oscila entre los 20 y 45 °C (BROCK y MADIGAN, 1993).

4.1.2 Determinación de textura

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en el primer paso de la prueba de textura a través del método de Bouyoucos, correspondientes a la lectura arrojada por el hidrómetro tras 40 segundos, en la Tabla 6 se registra la segunda lectura (tras 2 horas) mostrada por el instrumento en mención y finalmente en la Tabla 7 se señalan los resultados obtenidos en los cálculos de porcentajes de arena, limo y arcilla, al igual que la clase textural definida empleando el triángulo de texturas.

Tabla 5. Lectura del hidrómetro tras 40 segundos

MUESTRA	LECTURA TRAS 40 SEGUNDOS			PROMEDIO A LOS 40 SEGUNDOS
	HIDRÓMETRO	TEMPERATURA (°C)	HIDRÓMETRO CORREGIDA	
1	6	24	7,64	7,64
2	6	24	7,64	
3	6	24	7,64	

FUENTE: La Autora

Tabla 6. Lectura del hidrómetro tras 2 horas

MUESTRA	LECTURA TRAS 2 HORAS			PROMEDIO TRAS 2 HORAS
	HIDRÓMETRO	TEMPERATURA (°C)	HIDRÓMETRO CORREGIDA	
1	2	23	3,28	3,28
2	2	23	3,28	
3	2	23	3,28	

FUENTE: La Autora

Tabla 7. Resultados generales del análisis de textura del suelo

COMPOSICIÓN DEL SUELO		CLASE TEXTURAL	
%ARENA	84,72	SUELO ARENOSO: TEXTURAS GRUESAS	
%ARCILLA	6,56		
% LIMO	8,72		

FUENTE: La Autora

La clasificación del suelo en estudio como suelo arenoso de texturas gruesas permite inferir que éste cuenta con alta macroporosidad y permeabilidad, al mismo tiempo que presenta poca retención de agua disponible para plantas, bajo almacenamiento de nutrientes y de humedad.

4.1.3 Determinación de la Densidad Real

Los resultados de la densidad real obtenida son presentados en la Tabla 8

Tabla 8. Resultados de la determinación de densidad real

MUESTRA	DENSIDAD REAL (gr/ml)	DENSIDAD REAL PROMEDIO (gr/ml)
1^a	1,67	1,72
1B	1,74	
1C	1,76	

FUENTE: La Autora

El valor promedio obtenido en la determinación de densidad real, es menor que el rango esperado para un suelo arenoso de texturas gruesas (2,6 – 2,75 gr/ml).

Dicho comportamiento puede ser una consecuencia de la contaminación por hidrocarburos encontrada en la muestra, ya que se refleja en el alto contenido de materia orgánica en un suelo y la disminución de su densidad.

4.1.4. Determinación de la Densidad Aparente

Los valores de densidad aparente hallados se encuentran registrados en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la determinación de densidad aparente

MUESTRA	DENSIDAD APARENTE (gr/ml)	DENSIDAD APARENTE PROMEDIO (gr/ml)
1 ^a	1,66	1,54
1B	1,34	
1C	1,62	

FUENTE: La autora

El valor obtenido se ajusta a las expectativas teniendo en cuenta la característica específica de textura arrojada por el método de Bouyoucus (suelo arenoso de texturas gruesas), cuya densidad aparente no debe superar los 1,6 gr/ml (CORTÉS Y MALAGÓN, 1984).

4.1.5. Determinación de la Humedad Gravimétrica

En la Tabla 10, se evidencia el resultado promedio de humedad obtenido tras 24 horas del proceso de secado a 105°C.

Tabla 10. Resultados del análisis de Humedad Gravimétrica

MUESTRA	PESO INICIAL (gr)	PESO FINAL (gr)	Δ PESO (gr)	HUMEDAD (%)
PROMEDIO	45	41,9	3,10	6,89

FUENTE: La Autora

El análisis de estos datos reafirma lo conocido a través de la prueba de textura, ya que al contar con un suelo arenoso, éste posee una baja capacidad de retención de líquidos, muestran un alto índice de percolación y baja energía de retención del agua.

4.1.6 Determinación del pH

En la Tabla 11 se encuentran los resultados de las mediciones de pH realizadas en medio neutro (H₂O) y en medio salino (KCl).

Tabla 11. Resultados de la determinación de pH

PROMEDIO DE pH EN H ₂ O	INTERPRETACIÓN	PROMEDIO DE pH EN KCl	INTERPRETACIÓN	Δ pH
7,12	Neutro	5,85	Moderadamente ácido	-1,27

FUENTE: La Autora

El suelo posee un pH neutro en solución acuosa, lo que indica que cuenta con una disponibilidad de nutrientes adecuada, aunque al recordar las características arenosas del suelo en estudio (halladas anteriormente) se conoce que éste presenta baja retención de compuestos.

La medición realizada en la solución de KCl arrojó una tendencia moderadamente ácida a través de la cual se conoce bibliográficamente que el suelo no contiene acidez intercambiable, ni toxicidad alguna debida a cationes de aluminio, manganeso y ácido carbónico.

El ΔpH obtenido fue de -1,27, su signo negativo indica que su carga es aniónica, por tanto este suelo es un intercambiador catiónico.

4.1.7 Determinación de la Porosidad

Los resultados arrojados en el cálculo de la porosidad (ver Tabla 11) muestran un valor bajo, que era esperado teniendo en cuenta las condiciones de afectación por hidrocarburos encontradas en el sector del cual proviene la muestra, pues estudios previos han señalado que la presencia de ciertas sustancias (combustóleo, diesel y gasolina) disminuyen la porosidad original del suelo (MARTÍNEZ Y LÓPEZ, 2001).

Sin embargo la importancia de esta propiedad en el caso de un suelo clasificado como arenoso anteriormente, radica en que en su mayoría posee macroporos (JARAMILLO, 2002) que contribuyen con la comunicación y favorecen un flujo preferencial de sustancias que de ser contaminantes pueden ser redireccionadas hacia una zona subsuperficial para luego tratar dicho compuesto.

Cabe resaltar que para conocer al detalle el comportamiento de los poros de este suelo sería necesario implementar un estudio de conductividad hidráulica.

Tabla 12. Resultados de la determinación de la porosidad

DENSIDAD APARENTE (gr/ml)	DENSIDAD REAL (gr/ml)	POROSIDAD (%)
1,54	1,72	10,47

FUENTE: La Autora

4.1.8 Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico

El suelo en estudio mostró un déficit de fertilidad, teniendo en cuenta que posee una capacidad de intercambio catiónico menor a 10 meq /gr, es decir baja, siendo este parámetro un indicador de las pocas reservas de calcio, magnesio, potasio y sodio (MUSKUS, 2001).

Éste resultado comparado con los mostrados anteriormente muestra gran coherencia, dado que la textura arenosa justifica la poca retención de nutrientes. Además se conoce que la presencia de hidrocarburos incide en la disminución de esta propiedad y en el aumento de materia orgánica debido al aporte de carbono realizado por dichos compuestos.

Los resultados se encuentran registrados en la Tabla 12

Tabla 13. Resultados de la determinación de CIC

MUESTRA	VOLUMEN GASTADO (ml)	VOLUMEN DE BLANCO (ml)	CIC (meq/gr)
1	9,5	2	1,5
2	11		2,2
3	10		2
4	10,5		2,1
CIC PROMEDIO			1,95

FUENTE: La Autora

4.1.9 Contenido de Materia Orgánica

Los análisis correspondientes al contenido de materia orgánica se encuentran registrados en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados de la determinación del contenido de Materia Orgánica

MUESTRA	N EN SLN FERROSA	%C	%MO
1	0,99	7,66	13,2
2	1,08	8,92	15,37
3	1	7,8	13,45
PROMEDIOS		8,13	14,01

Fuente: La Autora

Estos resultados señalan que según el clima encontrado en la zona (cálido) el suelo contiene un nivel mineral alto (CASTRO, 1998), puesto que al tratarse de un terreno afectado por la presencia de hidrocarburos, se infiere que las partículas de carbono van a ser abundantes sabiendo que es uno de los elementos fundamentales en sustancias petrolíferas.

El contenido de materia orgánica permite relacionar el suelo con gran cantidad de macroporos, que repercuten en una buena aireación y capacidad de drenaje. De esta forma se encuentra coincidencia con el comportamiento típico de las texturas arenosas (identificadas anteriormente).

Los valores de materia orgánica encontrados permiten deducir que se presenta estabilidad en los agregados que conforman el suelo y hace característico el color oscuro que le da cualidades para retener calor y facilitar los procesos de germinación.

Sin embargo, se presentan inconsistencias dado que los datos hallados también orientan hacia un aumento en la capacidad de intercambio catiónico, que en el caso específico de este estudio ya se calificó como baja.

4.2 ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP'S)

El análisis de la remoción de Hidrocarburos Totales de Petróleo se muestra a través de las gráficas que ilustran el comportamiento del proceso de degradación de hidrocarburos no polares y grasas y aceites (respectivamente) en el suelo de interés.

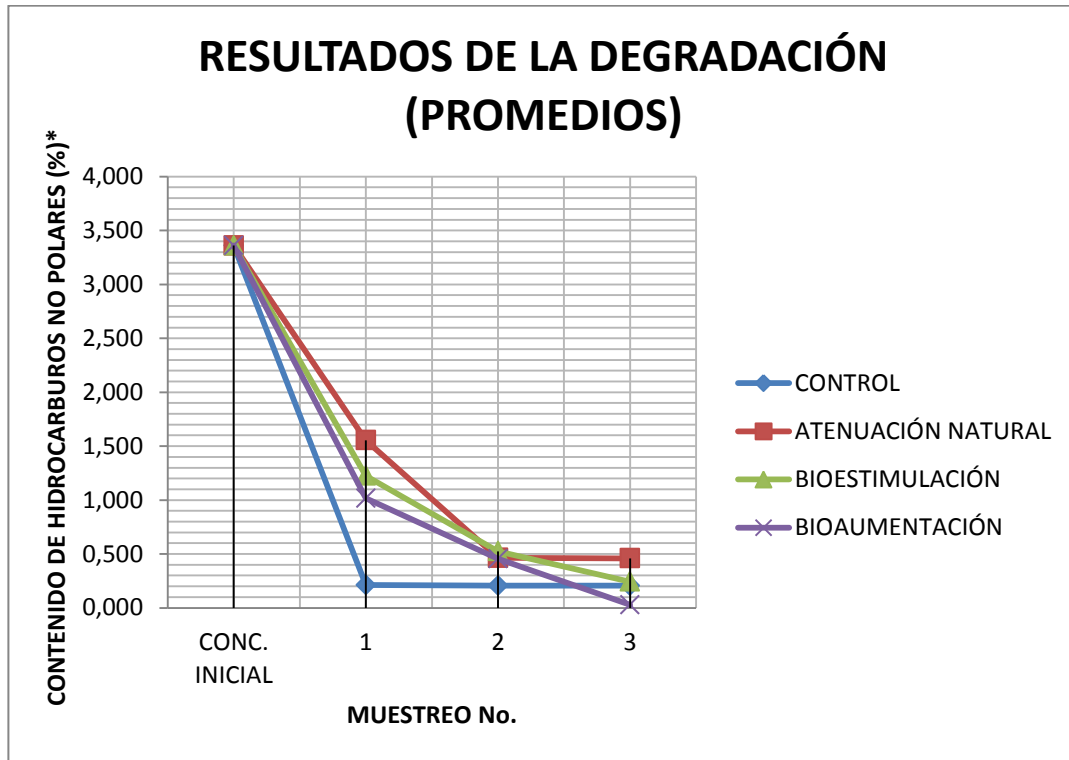
4.2.1 Hidrocarburos no polares

Este ensayo realizó un seguimiento al comportamiento de degradación de los Hidrocarburos no polares como medida indirecta de los Hidrocarburos Totales de Petróleo.

El estudio contó con datos arrojados por 4 muestreos a cada reactor (incluyendo su duplicado), partiendo de la concentración inicial de hidrocarburos no polares hallada en el suelo extraído del campo petrolero, los res tmuestreos posteriores se realizaron periódicamente cada 5 semanas.

Los valores registrados en la Gráfica 1 hacen referencia a los promedios de las mediciones, para facilitar la visualización del comportamiento (para conocer registro general remitirse al Anexo A).

Gráfica 1. Comportamiento de la degradación de Hidrocarburos No Polares



*% peso/peso

FUENTE: La Autora

La Gráfica 1 evidencia claramente que en los tres tipos de biorremediación estudiados ocurrió un proceso de degradación, cuya mayor intensidad tuvo lugar durante el primer mes de tratamiento.

Los resultados correspondientes al reactor control hacen notorio que entre la toma de muestra inicial y el muestreo No. 1 hubo degradación de Hidrocarburos No polares, debido a que la esterilización de la muestra con ácido clorhídrico no se realizó inmediatamente después de la determinación de la concentración inicial. Sin embargo, los resultados ilustrados en la gráfica 1 a partir del muestreo No. 1 revelan que se anula el crecimiento bacteriano, por tanto no se presentan cambios en la concentración de Hidrocarburos no polares en el suelo.

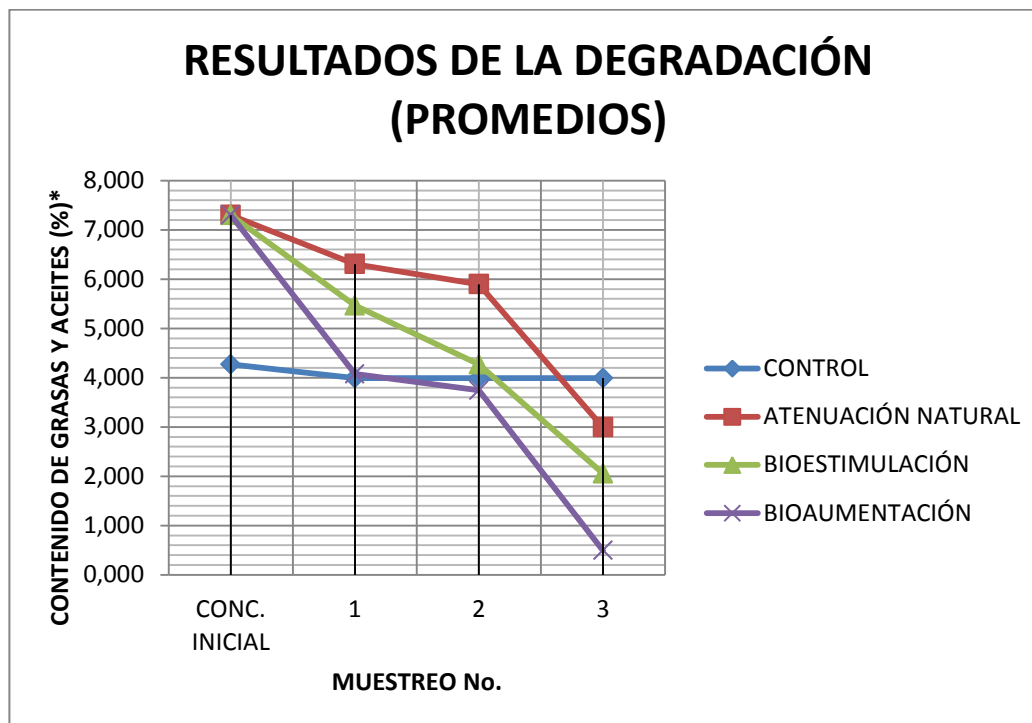
La atenuación natural muestra que a partir del muestreo No. 3 no hay avances significativos en el tratamiento del suelo, debido a la ausencia de oxígeno que pone en desventaja este método de biorremediación frente a los dos restantes.

Finalmente, se observa que la bioaumentación comparada con la bioestimulación presentó mayor eliminación de Hidrocarburos No Polares en el suelo debido a la presencia de microorganismos adaptados para este fin, además se refleja que dichas bacterias logran desenvolverse en el medio sin competir con la microbiota nativa, lo que permite asumir que la fuente de carbono abastece los tipos de poblaciones presentes en este hábitat.

4.2.2 Grasas y aceites

Al igual que en la ilustración de los resultados de hidrocarburos no polares, la Gráfica 2 muestra los valores promedio obtenidos en 4 muestreos (distribuidos al igual que en el caso de los hidrocarburos no polares) durante la degradación de grasas y aceites en los tres tipos de biorremediación estudiados a lo largo de 15 semanas (la totalidad de los datos se encuentran en el Anexo B).

Gráfica 2. Comportamiento de la degradación de Grasas y Aceites



*% peso/peso

FUENTE: La Autora

En este proceso de degradación el comportamiento fue muy similar al registrado por los hidrocarburos no polares; nuevamente la bioaumentación llega a los niveles de concentración más bajos y revela grandes cambios entre el muestreo inicial y el muestreo No. 1, al igual que en el período final del ensayo. Así mismo se visualiza con gran facilidad que todos los tratamientos desencadenaron cambios drásticos en la concentración de grasas y aceites, dado que a mayor concentración de contaminante mayor degradación se presentará, siguiendo la cinética de las reacciones.

En la gráfica 2 también se evidencia como la degradación de grasas y aceites en el reactor control fue mínima tras la adición de ácido clorhídrico, es decir a partir del muestreo No. 1, pues antes de ello se registra disminución en la concentración

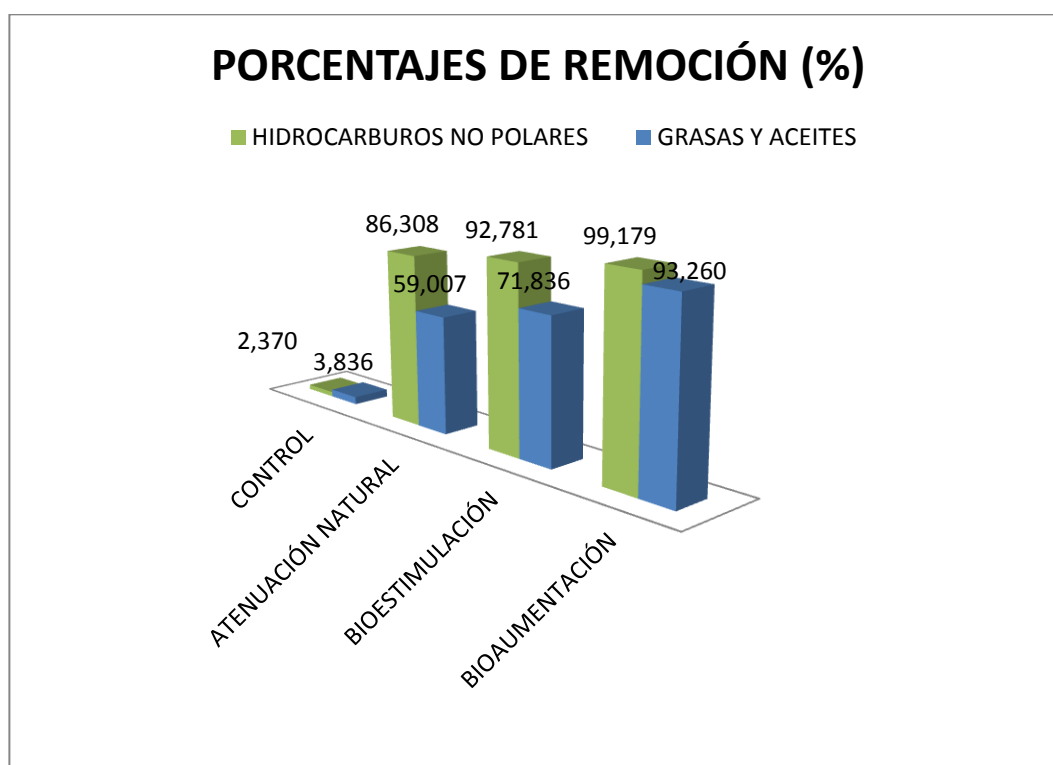
de grasas y aceites debido al retraso en la esterilización de la muestra, tal como se señaló en el numeral anterior.

Por otra parte la atenuación natural se ve claramente afectada por la ausencia de oxígeno al comparar su comportamiento con el de los dos tratamientos restantes que sí contaban con la adición de este aceptor de electrones.

4.2.3. Resultados de los porcentajes de remoción

En la Gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos tras calcular los porcentajes promedio de remoción de hidrocarburos no polares y grasas y aceites (para conocer la totalidad de datos ver Anexo C), alcanzados por cada uno de los tratamientos implementados durante las 15 semanas de estudio.

Gráfica 3. Porcentajes de remoción alcanzados en cada uno de los tratamientos



FUENTE: La Autora

4.2.3.1 Remoción de Hidrocarburos no polares

La comparación de los valores iniciales y finales de concentración de hidrocarburos no polares en la muestra de suelo, mostró que el tipo de biorremediación que removió mayor cantidad de sustancia nociva fue la bioaumentación, seguido de la bioestimulación y finalmente por la atenuación natural; como era de esperarse, el control tuvo un rendimiento menor en el proceso de degradación dado que la acidificación realizada inhibe el crecimiento de gran cantidad de microorganismos (GÓMEZ et al, 2009)

Los resultados obtenidos muestran como la adición de ECOMAXBACT tuvo una excelente adaptación al medio al degradar el 99,179% de los hidrocarburos no polares presentes en el suelo estudiado, se puede decir que era probable alcanzar un porcentaje de remoción alto, dado que la literatura refiere que es más efectiva la degradación al aplicar un consorcio bacteriano que una bacteria específica (MUKHERJEE Y BORDOLOI, 2010)

A esta efectividad es necesario sumar que en el caso específico de este trabajo se contaba con concentraciones muy pequeñas de hidrocarburos no polares (no superaban el 5 % peso en peso) que son las fracciones remanentes más difíciles de remover puesto que ya se han volatilizado gran cantidad de compuestos, por tanto los resultados obtenidos deben ser considerados viables para solucionar problemas de derrames ocurridos hace algún tiempo en un terreno.

De otro lado, existen indicios de cuestionamientos a dicho tratamiento (bioaumentación) debido a que no se cuenta con la certeza de un beneficio prolongado en una labor de limpieza in situ empleando dicho método de biorremediación; sería una buena opción investigativa realizar una simulación in situ (VENOSA, 2012).

Cabe resaltar que el alto porcentaje de remoción se puede deber a que en esta prueba se incluye la presencia de PAH's, que se conoce presentan muy buena

degradación en suelos arenosos (como el estudiado), contando con un suministro adecuado de agua.

4.2.3.2 Remoción de Grasas y Aceites

Los porcentajes de remoción de grasas y aceites arrojados por los tres tipos de biorremediación muestran un comportamiento muy similar al de los hidrocarburos no polares, ya que el caso más efectivo fue la degradación a través de bioaumentación, seguido por la bioestimulación y posteriormente por la atenuación natural; el control presentó un valor menor al 10 %, que era esperado.

La determinación de HTP's a través de grasas y aceites es de tipo indirecta, dado que puede incluir valores relacionados con compuestos cuya presencia no se debe específicamente a una fuente petrolífera, por lo tanto los altos porcentajes de remoción presentan interferencias al no conocer si específicamente se estaban midiendo concentraciones de hidrocarburos.

Sin embargo es de reconocer la efectividad de los tres tratamientos dado que los porcentajes de remoción de grasas y aceites estuvieron por encima del 50 % en todos los casos.

4.3. CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Los resultados promedio (ver totalidad de los datos en Anexo D) y algunas interpretaciones se encuentran registrados según el tipo de biorremediación desarrollado.

4.3.1. Curvas de crecimiento bacteriológico

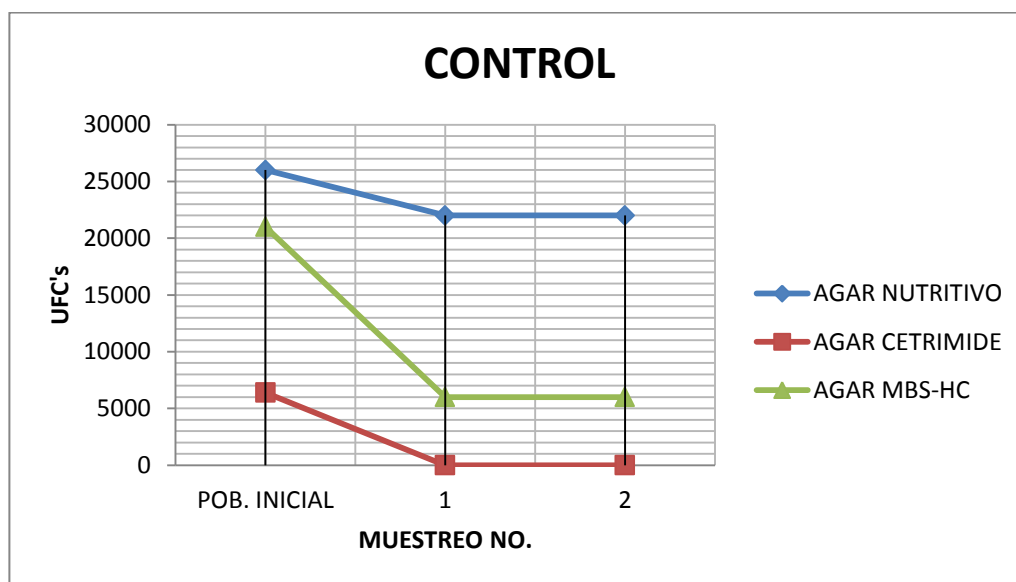
El principal instrumento para el análisis del comportamiento microbiano son las curvas de crecimiento bacteriológico obtenidas tras 4 conteos de UFC's en 3 medios de cultivo para cada uno de los tratamientos de biorremediación:

atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación; además se evidencia el efecto de la acidificación realizada a las muestras control.

4.3.1.1. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Control

El reactor control tuvo un muestreo inicial en el cual se conoció la población bacteriana existente, por tanto el valor inicial de UFC's es igual al de todos los reactores y tras ello se muestra que sobre la marcha del segundo mes inició el descenso de las UFC's como resultado del lavado con HCl 2M aplicado a la muestra. Dicho comportamiento se ve ilustrado en la Gráfica 4

Gráfica 4. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Control



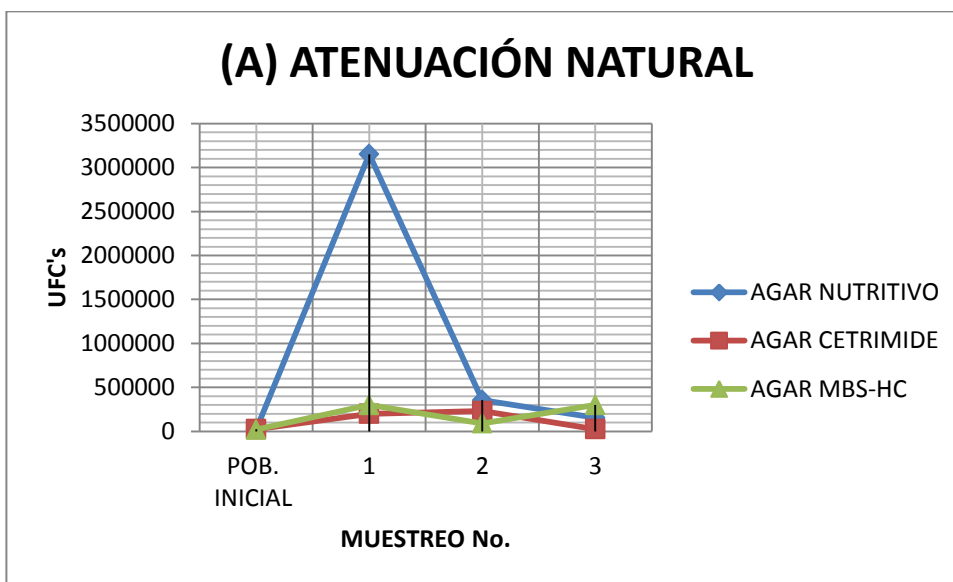
La gráfica 4 muestra que no se presentó aumento de las UFC's tras la acidificación, contrario a ello se vio un descenso de las mismas en los tres agares, incluso en el caso del agar cetrimide se registraron valores menores a 10 UFC's.

4.3.1.2. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Atenuación Natural

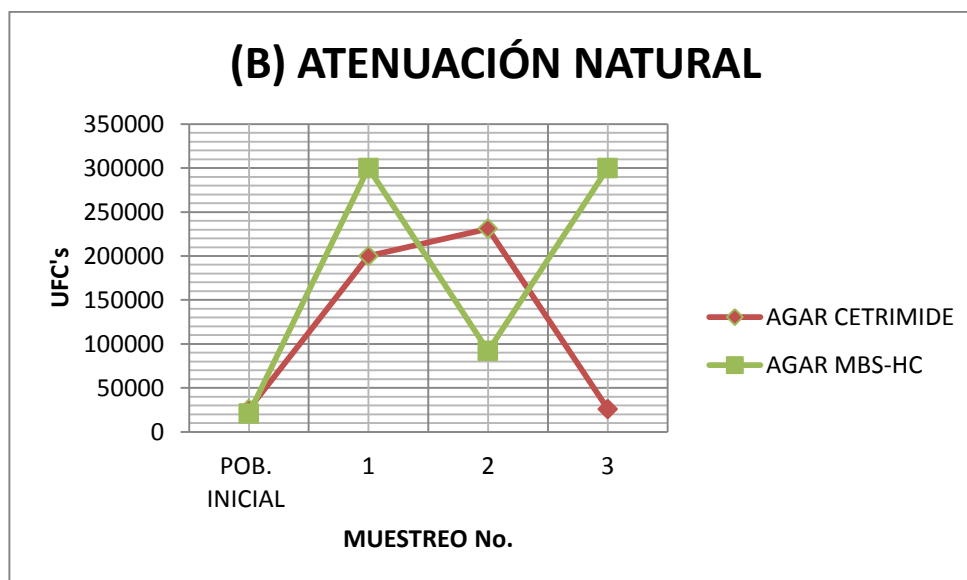
La atenuación natural mostró una tendencia al aumento de UFC's en los agares nutritivo y MBS- HC durante los dos primeros muestreos, sin embargo hacia la tercera muestra analizada se evidenció la baja de estos mismos y contrariamente el valor más alto de UFC's en el agar cetrimide.

No se evidencio una tendencia netamente exponencial para esta biodegradación, pues mayoritariamente hubo fluctuaciones dada la influencia de los microorganismos seleccionados a través de agar cetrimide y agar MBS- HC pues a medida que ocurre su crecimiento se afecta el desarrollo de los encontrados en agar nutritivo, tal como lo registra la Gráfica 5.

Gráfica 5. (A) Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural.



Gráfica 5. (B) Ampliación de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural entre 0 y 250000 UFC's



FUENTE: La Autora

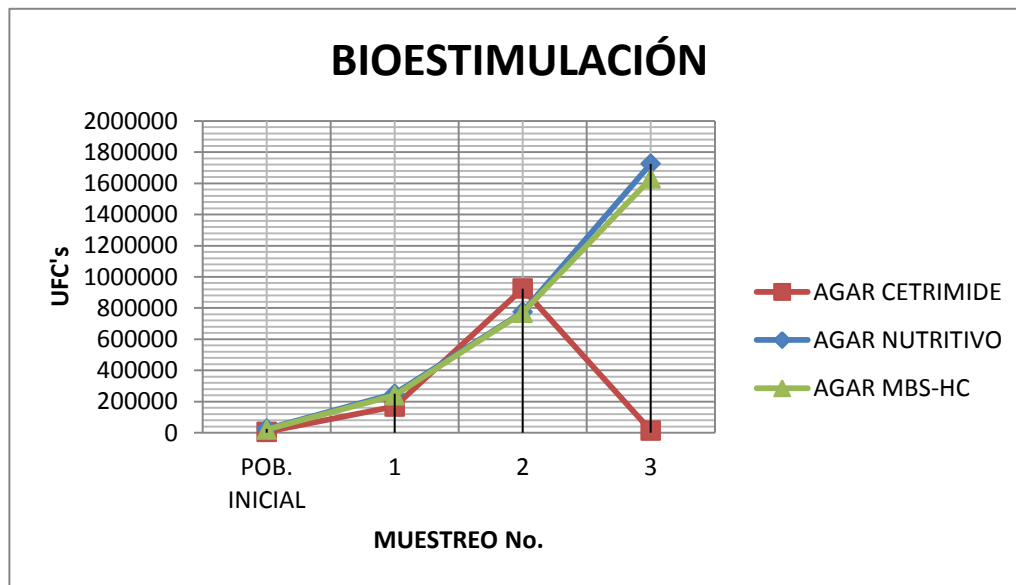
4.3.1.3. Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Bioestimulación

La Gráfica 6 evidencia una curva exponencial para las muestras analizadas en los agares natural y MBS-HC, incluyendo todos los puntos de muestreo, reflejando el comportamiento descrito en la literatura al referirse a la “curva de crecimiento típica para población bacteriana” (BROCK Y MADIGAN, 1993).

Por otra parte, los análisis realizados en agar cetrímide son claros al ilustrar que hasta el tercer muestreo la población estuvo en crecimiento, pero a partir de él se inició el descenso de las UFC's, dado que empieza a agotarse la fuente de carbono, viéndose principalmente afectadas las *spp Pseudomonas* y mostrando que no existe competencia entre las bacterias aerobias (seleccionadas mediante agar nutritivo) y las degradadoras de fenol e hidrocarburos (contabilizadas en agar MBS-HC)

Habría sido útil implementar un análisis intermedio a los dos últimos muestreos para conocer si esta curva habría tenido una fase estacionaria, o si por el contrario algún fenómeno condujo al inicio del descenso de la flora bacteriana.

Gráfica 6. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioestimulación

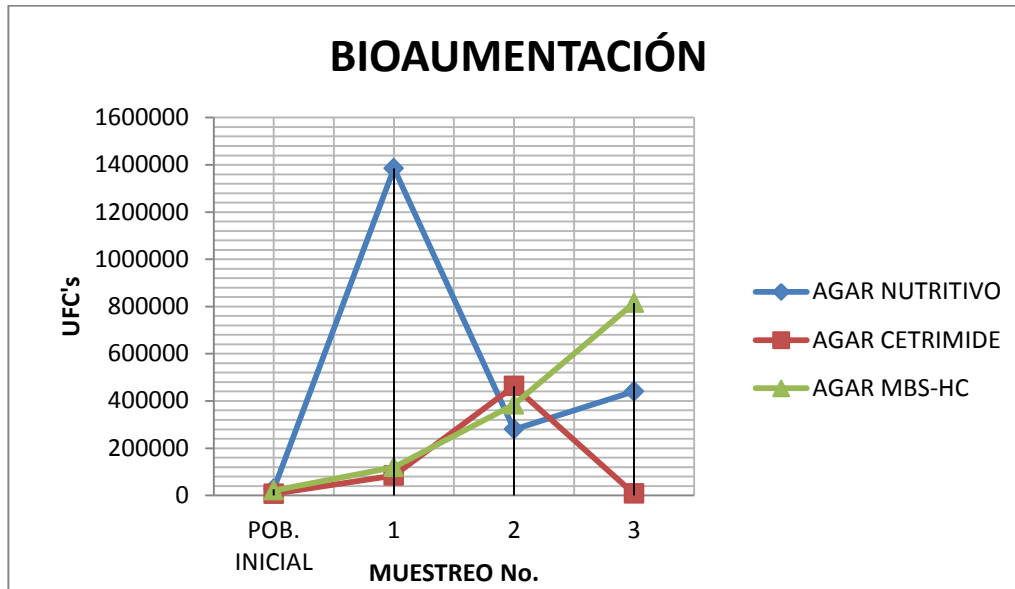


FUENTE: La Autora

4.3.1.4 Curva de crecimiento bacteriológico para muestra Bioaumentación

La Gráfica 7 refleja el comportamiento bacteriano durante las 15 semanas en que el suelo estuvo sometido a un tratamiento de bioaumentación con el consorcio microbiano ECOMAXBACT.

Gráfica 7. Curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioaugmentación



FUENTE: La Autora

En el caso específico de la bioaugmentación, el crecimiento típico bacteriológico (teniendo en cuenta la literatura mencionada) se visualizó a través del agar MBS – HC que tuvo un comportamiento exponencial desde el primer hasta el cuarto muestreo.

Por otra parte, la población analizada mediante el conteo en agar cetrimide sufrió los mismos cambios presentados en la bioestimulación, sugiriendo que entre el tercer y cuarto muestreo ocurrió una fase estacionaria que no fue identificada debido a la ausencia de análisis microbiológicos en esta época.

Los resultados del conteo de UFC's en agar nutritivo no permitió la deducción de un comportamiento específico debido a las fluctuaciones presentadas entre el segundo y cuarto muestreo, por ello sería necesario ampliar el tiempo de estudio para analizar el crecimiento de estas bacterias aerobias.

Sin embargo se deduce que éstas bacterias y las pertenecientes al género *spp Pseudomona* fueron afectadas por las degradadoras de hidrocarburo

(cuantificadas en agar MBS-HC), tanto así que las condiciones de competencia no permitieron la recuperación de las segundas.

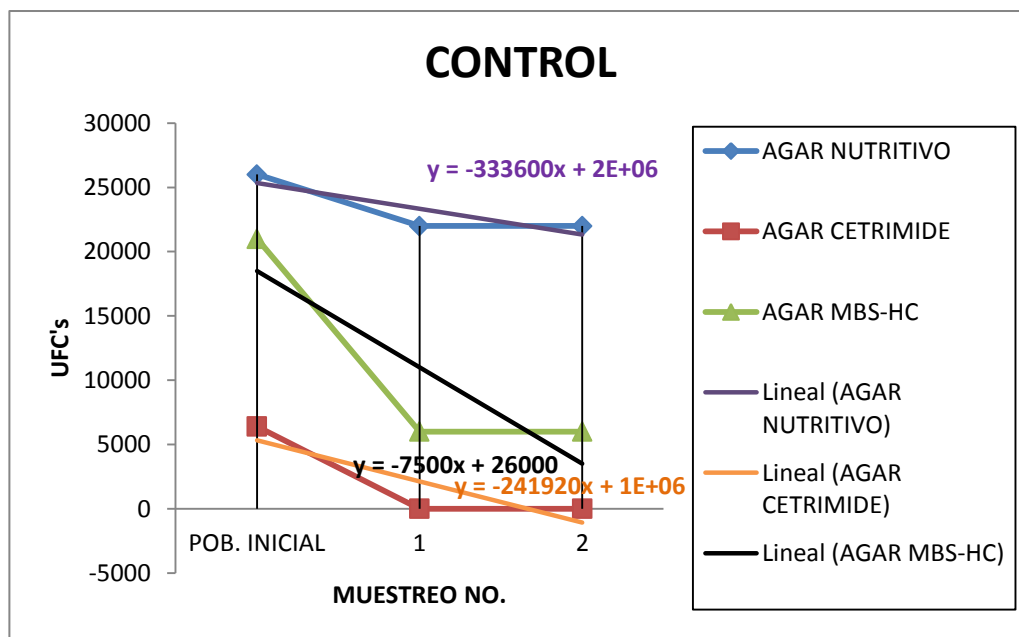
4.3.2. Análisis del crecimiento bacteriológico a partir de la linealización de gráficas semilogarítmicas

Con base en los conceptos de crecimiento exponencial encontrados en la bibliografía, se linealizaron las gráficas que ilustran el crecimiento bacteriológico para conocer su pendiente.

4.3.2.1. Análisis para muestra Control

En la Gráfica 8 se ilustran las pendientes obtenidas para los crecimientos bacterianos en cada uno de los tres agares en los que se cuantificó la población proveniente de la muestra control.

Gráfica 8. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra control



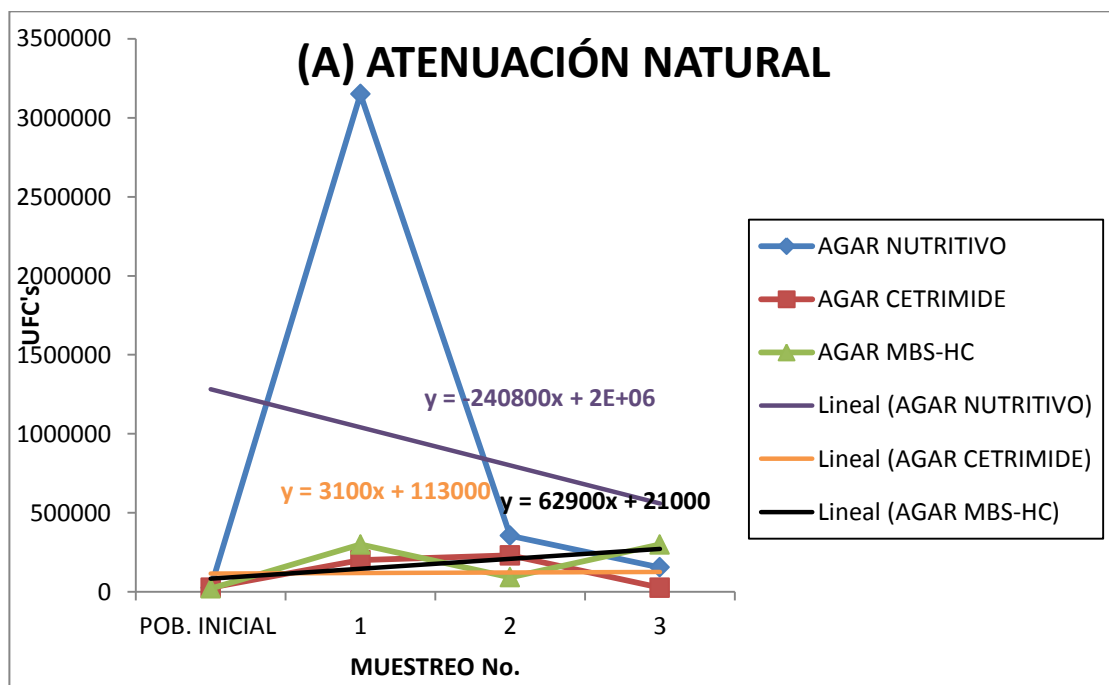
FUENTE: La Autora

En este caso se evidencian pendientes negativas en las tres funciones: agar nutritivo (-333600), agar cetrimide (-241920) y agar MBS- HC (-7500), que indican la declinación de la población bacteriana que ocurrió específicamente por la adición de ácido clorhídrico 2M, tras decidir implementar la muestra control como un ambiente con déficit de microorganismos.

4.3.2.2. Análisis para muestra Atenuación Natural

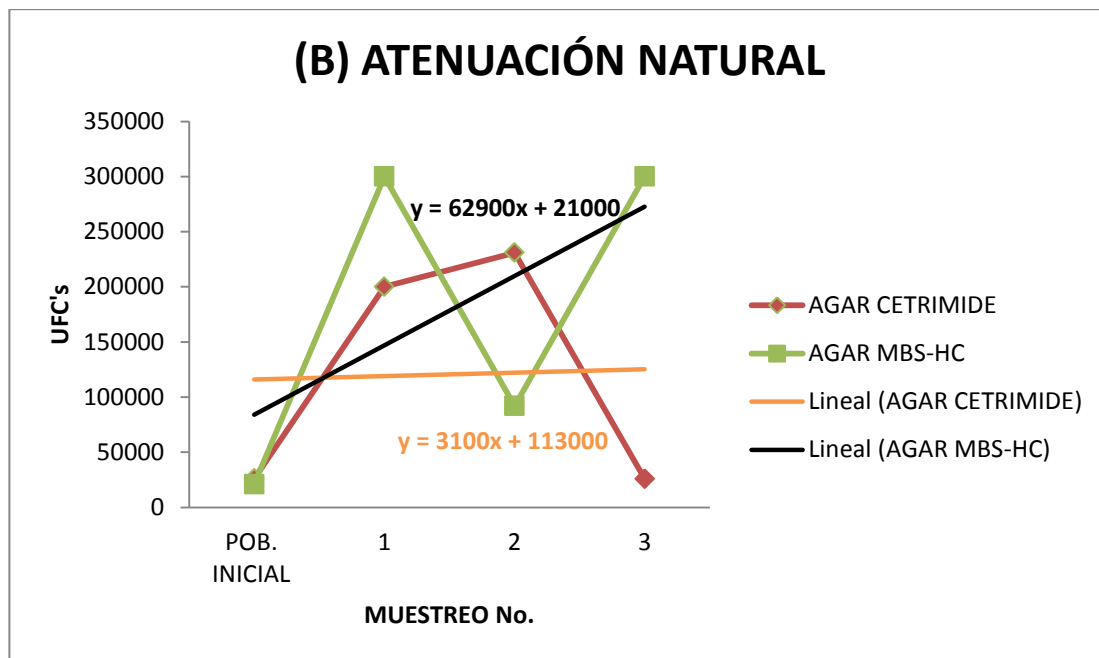
En la Gráfica 9 se obtuvieron pendientes pequeñas (agar cetrimide: 8980; agar MBS-HC: 62900) con respecto a los datos restantes que dan indicios de un crecimiento moderado, además se encontró un valor negativo (-240800) de dicho parámetro que refleja la disminución de microorganismos en agar nutritivo. Para efectos de visualización esta última función fue eliminada de la gráfica.

Gráfica 9. (A) Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Atenuación Natural



FUENTE: La Autora

GRAFICA 9. (B) Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico entre 0 y 350000 UFC's de la muestra Atenuación Natural



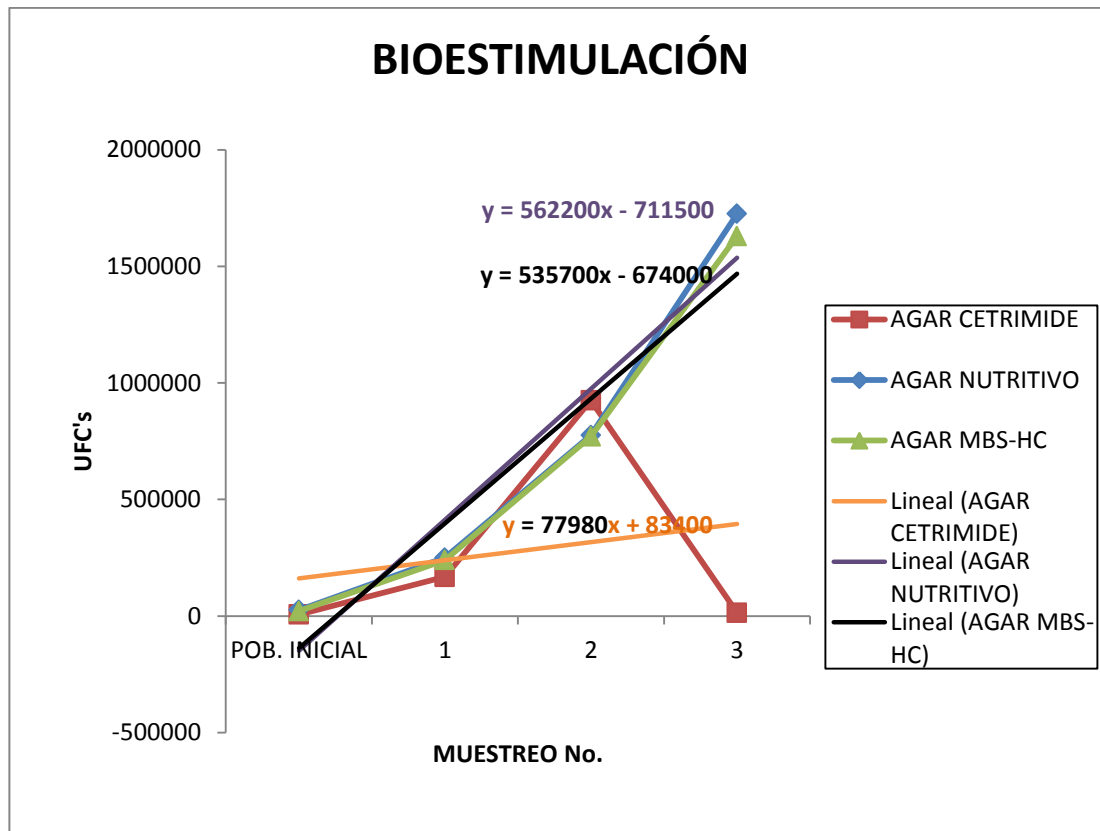
FUENTE: La Autora

4.3.2.3 Análisis para muestra Bioestimulación

La bioestimulación mostro un comportamiento exactamente exponencial en agar nutritivo y en agar MBS-HC que fue reflejado en altos valores de pendiente: 562200 y 535700 respectivamente.

Por otra parte el agar cetrimide a pesar de mostrar crecimiento tuvo una pendiente de menor valor (77980), tal como lo muestra la Gráfica 10.

Gráfica 10. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioestimulación.

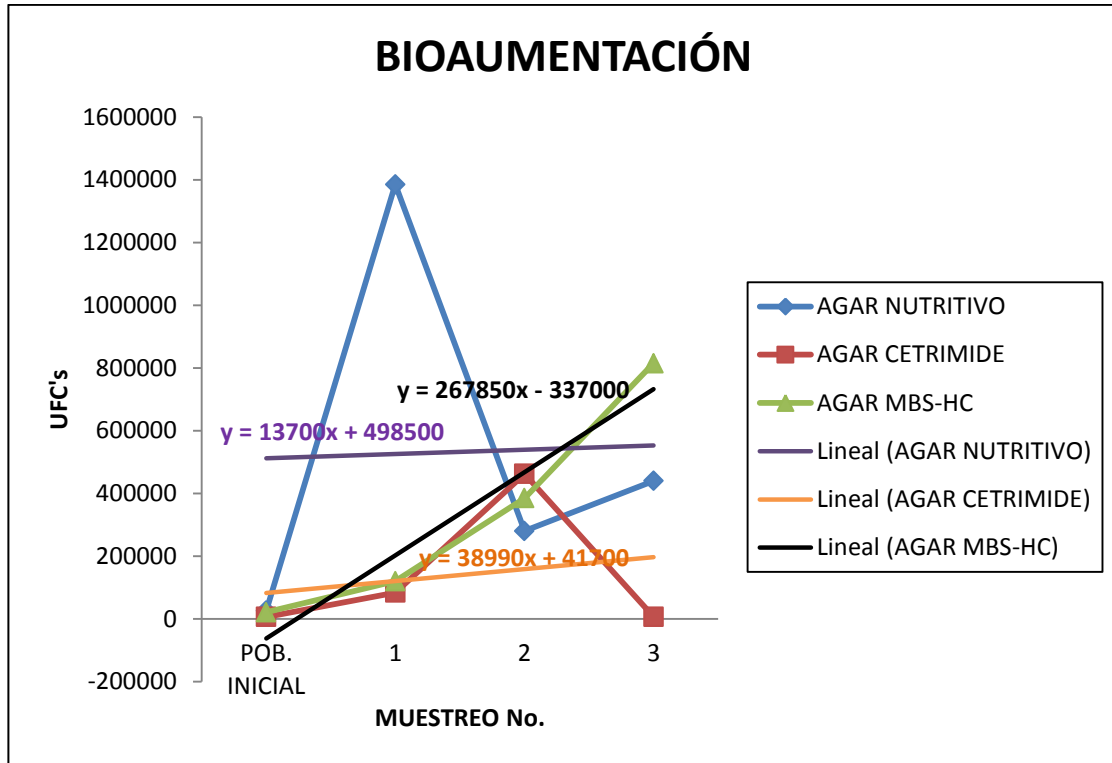


FUENTE: La Autora

4.3.2.4. Análisis para muestra Bioaumentación

Para bioaumentación se hallaron pendientes moderadas en el agar nutritivo (13700) y agar cetrímide (38990), mientras que el agar MBS-HC evidenció un crecimiento exponencial bastante grande, reflejado en una pendiente de 267850. Dichos datos se ilustran a continuación en la Gráfica 11.

Gráfica 11. Linealización de la curva de crecimiento bacteriológico de la muestra Bioaumentación



FUENTE: La Autora

4.3.3. Determinación del mejor crecimiento bacteriano

Con base en los resultados de las pendientes que se enunciaron y graficaron anteriormente, se identificó que el método de biorremediación con mejor crecimiento bacteriano en agar nutritivo y agar cetrímide fue la bioestimulación, mientras que en agar MBS – HC fue la bioaumentación. Dado que cada una de estas graficas fueron exponenciales y registraron las pendientes más altas, cuya interpretación conceptual (como curvas de crecimiento típico) es que tuvieron menores tiempos de generación, término que hace referencia al lapso requerido para que a partir de una célula se formen dos.

Desde este concepto se extrapola a la velocidad de crecimiento, conocida como “el cambio en el número de células o en masa celular por unidad de tiempo” (BROCK Y MADIGAN, 1993). Por tanto se deduce que estos tres casos fueron los de mayor velocidad de crecimiento.

4.4. RELACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO Y LA DEGRADACIÓN DE TPH'S

Al analizar las gráficas de crecimiento microbiológico y de degradación de TPH's (a través de hidrocarburos no polares y grasas y aceites) se quiso establecer algún tipo de relación en cada muestreo, para ello se establecieron etapas señaladas a continuación.

4.4.1. Etapa I (entre el muestreo No. 1 y el muestreo No. 2)

La concentración de hidrocarburos no polares y de grasas y aceites reflejaron una gran disminución al ser tratados a través de bioaumentación, atribuible a las bacterias que se desarrollaron en agar nutritivo puesto que estas mostraron un aumento significativo de su población, mientras que en los agares cetrimide y MBS – HC no hubo un gran desarrollo de UFC's a pesar de evidenciar el inicio de su crecimiento.

Por otra parte, el suelo que reflejó menor disminución de hidrocarburos no polares y grasas y aceites fue el influenciado por atenuación natural, la degradación lograda en esta etapa se debió en su mayoría al desarrollo microbiano propio en agar nutritivo (bacterias aerobias totales).

4.4.2. Etapa II (entre el muestreo No. 2 y el muestreo No.3)

Durante esta etapa el tratamiento que tuvo mayor degradación de hidrocarburos no polares fue la bioaumentación, cuyo rendimiento se debe al crecimiento exponencial en el que se encontraban las poblaciones de bacterias degradadoras de hidrocarburo y fenol y las pertenecientes al género *spp pseudomona*; mientras

que en este mismo periodo no hubo tal eficiencia en la eliminación de grasas y aceites; por el contrario, este tipo de biorremediación reportó la menor disminución en la concentración de dichos elementos , por tanto se puede inferir que los microorganismos nombrados anteriormente no cuentan con un metabolismo que incluya drásticamente las grasas y aceites.

Opuesto a ello se deduce que el oxígeno fue fundamental en la remoción de concentración de grasas y aceites, ya que durante este lapso la bioestimulación mostró mejores resultados que los otros dos tratamientos.

4.4.3. Etapa III (entre el muestreo No. 3 y el muestreo No.4)

En este tramo de observación todos los tipos de biorremediación evidenciaron la disminución del contenido de hidrocarburos no polares, grasas y aceites en cada uno de los suelos.

En la atenuación natural la acción degradadora encuentra justificación en el comportamiento bacteriano correspondiente a los microorganismos que se cuantificaron en agar MBS-HC que reflejó una tendencia al aumento, mientras los dos restantes tuvieron una tendencia a la baja.

En el caso de la bioestimulación, los individuos con mayor acción degradadora fueron aquellos que se desarrollaron en los agares nutritivo y MBS-HC cuyo crecimiento continuó con una curva exponencial. Mientras que las bacterias cuantificadas a través de agar cetrimide (atribuibles a *Pseudomonas*) mostraron la declinación de su población, por tanto se asume que no influyeron mayoritariamente en esta etapa de la biorremediación.

Finalmente, el proceso biodegradador más efectivo (bioaugmentación) basó su rendimiento en la etapa final en la acción de las bacterias aptas para el crecimiento en agar MBS-HC que continuaron su desarrollo exponencial; contrario a ello, el agar cetrimide mostró una disminución drástica que permite asumir que

los microorganismos cuantificados en dicho medio (*spp Pseudomonas*) se encontraba en la etapa de muerte.

5. CONCLUSIONES

- La caracterización físico química realizada al suelo contaminado con hidrocarburos objeto de este estudio arrojó los siguientes resultados, determinación de textura: suelo arenoso de texturas gruesas, determinación de densidad real: 1,72 gr/ml, determinación de densidad aparente: 1,54 gr/ml, determinación de humedad gravimétrica: 6,89%, determinación de pH en solución acuosa: 7,12 unidades de pH, determinación de pH en solución de KCl: 5,85 unidades de pH, determinación de la porosidad: 10,47% , determinación de la capacidad de intercambio catiónico: 1,95 meq/gr, contenido de materia orgánica: 14,01%.
- La afectación por presencia de hidrocarburos en el suelo se evidenció en la densidad real obtenida, al presentar un valor inferior al rango esperado en un suelo arenoso con texturas gruesas (2,6 - 2,75 gr/ml).
- El suelo analizado mostró un alto contenido de materia orgánica, atribuible a la concentración de hidrocarburos.
- La porosidad del suelo analizado permite inferir la presencia abundante de macroporos que contribuyen con la comunicación y favorecen un flujo preferencial de sustancias que puede ser aprovechado en la predicción de la pluma contaminante tras un derrame y el manejo del mismo.
- La textura del suelo (arenosa) facilitó la distribución del oxígeno al interior del reactor, contribuyendo en la degradación de HTP's al promover el crecimiento de bacterias aerobias y los procesos de oxidación química.

- El método de biorremediación más eficiente en la degradación de hidrocarburos no polares y de grasas y aceites fue la bioestimulación, que obtuvo porcentajes de remoción de 99,179 % y 93,260 % respectivamente.
- Los resultados obtenidos de los porcentajes de remoción evidencian que la degradación de grasas y aceites requiere la inclusión de factores como el oxígeno y consorcios microbianos, dado que las características típicas del entorno (atenuación natural) no logran grandes disminuciones en la concentración de dichos compuestos en el suelo.
- Teniendo en cuenta las pendientes de las gráficas semilogarítmicas, se consideran como mejores crecimientos bacteriano: en agar nutritivo y agar cetrimide el correspondiente a muestras tratadas mediante bioestimulación, mientras que en agar MBS-HC el resultado más exitoso se registró en el suelo biorremediado a través de bioaumentación.
- El crecimiento exponencial de las bacterias degradadoras de hidrocarburos (cuantificadas a través de agar MBS-HC) y de *Pseudomonas* (cuantificadas a través de agar cetrimide) se ve influenciado por la presencia de oxígeno en el suelo.
- En condiciones naturales del suelo (atenuación natural), las bacterias degradadoras de hidrocarburo muestran competencia con las bacterias aerobias nativas y las *Pseudomonas*.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis físico químico de un suelo aledaño al punto de muestreo que no presente características evidentes de contaminación, para conocer las afectaciones que se están presentando en las propiedades del mismo por presencia de hidrocarburos.
- Se recomienda realizar el análisis de HTP's a través del método de Cromatografía de gases, para tener mayor exactitud en los datos de concentración de estos en el suelo y para identificar los tipos de compuestos presentes en la muestra.
- Esterilizar la muestra del reactor Control al iniciar el estudio para evitar procesos de degradación.
- Se recomienda realizar un estudio de costo-efectividad en el que se analice si es más rentable la producción de ECOMAXBACT o la aplicación de oxígeno teniendo en cuenta la pequeña diferencia registrada entre los porcentajes de remoción de hidrocarburos no polares y de grasas y aceites a través de bioestimulación y bioaumentación tras este estudio.
- Se recomienda implementar una réplica in situ del estudio comparativo que permita conocer si realmente se alcanzan porcentajes de remoción tan altos como los registrados al término de este trabajo.
- Se recomienda realizar análisis de conteo de UFC's con mayor periodicidad para detallar el proceso de crecimiento bacteriano y sus respectivas fases, de forma que se logre establecer una curva más acertada.

- Se recomienda ampliar el tiempo de estudio de este ensayo para confirmar las fases de recuperación del crecimiento de las poblaciones bacterianas que se visualizaron en la finalización de este trabajo.
- Realizar un estudio microbiológico en el que se detalle el comportamiento de las *Pseudomonas* y sus condiciones óptimas de crecimiento como degradadoras de hidrocarburos, teniendo en cuenta que tras el muestreo No. 3 iniciaron la declinación de su población bacteriana en todos los tratamientos.
- Contar con datos triplicados para cada una de las pruebas con el fin de generar un análisis estadístico de los procesos de biorremediación realizados en este estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- TYAGI, Meenu; DA FONSECA, M. Manuela; DE CARVALHO, Carla C. C. R; Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Springer Science. 2010
- CHIKERE, Chioma B.; SURRIDGE, Karen J.; CLOETE, Thomas E.; OKPOKWASILI, Gideon C; Phylogenetic diversity of dominant bacterial communities during bioremediation of crude oil – Polluted soil. Brasil: Revista Ambiente e Água. 2011. P.61-76.
- MUKHERJEE ,Ashis; BORDOLOI, Naba; Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. Springer-Verlag. 2010
- United States Department of Agriculture (USDA). Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo; 1999. [Consultado en: 02-02-12]. Disponible en: <http://soils.usda.gov/sqi/assessment/files/KitSpanish.pdf>
- KELLER, Jeffrey ; BANKS, M. Katherine; SCHWAB, A. P. Effect of soil depth on phytoremediation efficiency for petroleum contaminants. Estados Unidos: Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2008. P 1-9
- GE, Gaofei ; LI, Zhaojun; FAN, Fenliang; CHU, Guixin; HOU, Zhenan. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. Springer, 2009.

- CACCIATORE, David; MCNEIL Melanie. Principles of soil bioremediation. Estados Unidos: BioCycle, 1995. P 61
- HERRERA, Johjan. Propiedades del suelo. [Consultada en 02-02-12]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos65/propiedades-suelo/propiedades-suelo2.shtml>
- MUSKUS, Angélica. Manual de Laboratorio de Análisis de Suelos; Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, 2001. P 29.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Natural Resources Conservation Service [Consultada en 14-03-12]. Disponible en: <http://soils.usda.gov/technical/aids/investigations/texture/>
- LOPEZ-ACEVEDO, M; PORTA, J.; ROQUERO, C. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Madrid. Ediciones Mundi prensa, 2003. P 47.
- DOMÉNECH,X. Química del suelo. El impacto de los contaminantes. 3d.Madrid:Ediciones Miraguano S.A, 1997.P. 29-31
- MADER, Sylvia S., Biología. 9 Ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill Companies. 2007, p 371-372.
- MIRANDA, Darío. RESPTREPO, Ricardo. Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales, un atentado contra el futuro.

- WEISMAN, W; Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media, Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series; 1.v. 1998. [Consultado en: 03-03-12]. Disponible en: <http://www.qros.co.uk/Total%20Petroleum%20Hydrocarbon%20Criteria%20Working%20Group%20Series%20Volume%201%20Analysis%20of%20Petroleum%20Hydrocarbons%20in%20Environmental%20Media.pdf>
- BROCK. Thomas; MADIGAN, Michael; Microbiología. 6ed. México: Prentice Hall, 1993. P 151-155
- VENKATA, S.; DEVI, M.; CHANDRASEKHAR, K.; JUWANKAR, A.; SARMA, P. Bioremediation of petroleum sludge under anaerobic microenvironment: influence of biostimulation and bioaugmentation. Environmental Engineering and Management Journal, 2011.
- CORONA, Liliana; ITURBE, Rosario. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. México: Ingeniería, investigación y tecnología, 2005. P. 119-126.
- VALLEJO, V. SALGADO, L., ROLDAN, F., Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPH's en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología, 2005. P. 67-73
- FERRERA, Ronald; ROJAS, Norma; POGGI, Héctor; ALARCÓN, Alejandro; CAÑIZARES, Rosa Olivia . Procesos de biorremediación de suelo y aguas contaminados con hidrocarburos de petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2006. P. 179 – 187

- BENAVIDES, Joaquín; QUINTERO Gladys; GUEVARA, Andrea; JAIMES, diana; GUTIÉRREZ, Sandra; MIRANDA, Johanna. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Colombia.Nova,2006.P. 82-90
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). Estados Unidos. P 1-2.
- MORRISON,R.; BOYD,R. Química orgánica. 5ed. Wilmington: Iberoamericana, 1990.
- WHITTEN, k.; DAVIS, R.; PECK,M,; STANLEY,G.; Química . 8 ed. México: Cengage Learning Editores S.A ,2008 .P 971-989
- ROMANIUK, Romina; BRANDT, Juan Felipe; RIOS, Paola Ruth; GIUFFRÉ, Lidia ;Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. Ciencia del Suelo.2007, p139-149
- SEMINARIO CONTROL DE DERRAMES DE HIDROCARBUROS (1: Mayo de 2012: Universidad Pontificia Bolivariana, Bucaramanga, Colombia). Bioremediation in oil spill response
- JARAMILLO, Daniel; Introducción a la ciencia del suelo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín. 2002.
- GÓMEZ, Wilmar; GAVIRIA, Jair; CARDONA, Santiago. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina - diesel. Dyna. 2009.P 83-93.

- CONSEJERIA DE AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, MEDIO AMBIENTE Y ENERGIA DE ESPAÑA. El Suelo. [Consultada en 31-01-12]; Disponible en http://www.extremambiente.es/index.php?option=com_content&view=article&id=349&Itemid=239
- CASTRO, Gustavo; PRASA, Proyectos y Asesorías Ambientales; GOBIERNO DE CHILE, Ministerio de Agricultura; Informe Final: Diseño Monitoreo Frente Derrames de Hidrocarburos; Quillota. 2007.
- COMISION NACIONAL FORESTAL DE MÉXICO. Suelos Forestales. [Consultada en 31-01-12]; Disponible en <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/suelos>
- ATLAS, Ronald. BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4 Ed. Madrid: Pearson Educación S.A., 2002. P 360-362
- UNIVERSIDAD DE GRANADA, ESPAÑA . Información de libros electrónicos y monografías. Horizontes Principales. [Consultada en 02-02-12]; Disponible en http://edafologia.ugr.es/programas_suelos/practclas/horsol/comun/horprinc.htm

ANEXOS

ANEXO A. Datos de seguimiento a la degradación de Hidrocarburos No Polares

MUESTRA	CONTENIDO DE HIDROCARBUROS NO POLARES (%)*			
	MUESTREO	MUESTREO	MUESTREO	MUESTREO
	1	2	3	4
CON1	3,360	0,211	0,206	0,206
CON2	3,360	0,211	0,206	0,206
AN1	3,360	2,070	0,509	0,868
AN2	3,360	1,040	0,419	0,052
BE1	3,360	1,370	0,549	0,085
BE2	3,360	1,080	0,501	0,400
BA1	3,360	1,130	0,497	0,017
BA2	3,360	0,902	0,413	0,038

*(% Peso/peso)

ANEXO B. Datos de seguimiento a la degradación de Grasas y Aceites

MUESTRA	RESULTADOS HIDROCARBUROS GRASAS Y ACEITES			
	(%)*			
	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3	MUESTREO 4
CON1	7,300	4,420	4,210	4,210
CON2	7,300	4,120	3,770	3,770
AN1	7,300	7,180	6,710	5,510
AN2	7,300	5,430	5,080	0,475
BE1	7,300	5,950	4,290	0,612
BE2	7,300	4,980	4,250	3,500
BA1	7,300	4,790	3,670	0,160
BA2	7,300	3,360	3,820	0,824

*(%peso/peso)

ANEXO C. Datos de los porcentajes de remoción de Hidrocarburos No Polares y Grasas y aceites.

MUESTRA	% REMOCIÓN HIDROCARBUROS NO POLARES	% REMOCIÓN GRASAS Y ACEITES
CON1	2,370	2,877*
CON2	2,370	4,795*
AN1	74,167	24,521
AN2	98,449	93,493
BE1	97,467	91,616
BE2	88,095	52,055
BA1	99,497	97,808
BA2	98,860	88,712

*Los porcentajes de remoción de registrados por el reactor Control y su duplicado se calcularon con base en los muestreos No. 2 y 4, dado que en el muestro No. 1 no se había acidificado el suelo.

ANEXO D. Datos de seguimiento al crecimiento microbiológico

CON1			
No.	UFC's		
MUESTREO	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	22.000	<10	9.000
3	22.000	<10	9.000

CON2			
No.	UFC's		
MUESTREO	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	24.000	<10	6.000
3	24.000	<10	6.000

AN1			
No.	UFC 's		
MUESTREO	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	300.000	120.000	280.000
3	110.000	62.000	90.000
4	140.000	25.000	100.000

AN2			
No.	UFC's		
MUESTREO	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	6.000.000	280.000	320.000
3	600.000	400.000	94.000
4	170.000	27.000	500.000

BE1			
No. MUESTREO	UFC's		
	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	200.000	270.000	180.000
3	550.000	1.500.000	1.000.000
4	3.100.000	16.000	2.400.000

BE2			
No.	UFC's		
MUESTREO	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	300.000	66.000	300.000
3	1.000.000	350.000	540.000
4	350.000	12.000	860.000

BA1			
No. MUESTREO	UFC's		
	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	270.000	270.000	210.000
3	260.000	150.000	80.000
4	280.000	14.000	75.000

BA2			
No. MUESTREO	UFC's		
	AGAR NUTRITIVO	AGAR CETRIMIDE	AGAR MBS-HC
1	26.000	6.400	21.000
2	2.500.000	2.000.000	2.100.000
3	300.000	210.000	60.000
4	600.000	20.000	490.000