

**BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBURO EN LA ANTIGUA ÁREA DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO
(ATB) DE LA GERENCIA REFINERÍA BARRANCABERMEJA**

DEBBIE ANDRÉS CADENA AGUDELO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
2013**

**BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBURO EN LA ANTIGUA ÁREA DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO
(ATB) DE LA GERENCIA REFINERÍA BARRANCABERMEJA**

DEBBIE ANDRÉS CADENA AGUDELO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magister
en Química Ambiental**

Director:

**RODRIGO GONZALO TORRES SAEZ
PhD. Bioquímica**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013**

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	18
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MARCO REFERENCIAL	23
4.1 ANTECEDENTES.....	23
4.2 MARCO HISTÓRICO.....	29
4.2.1 Área de tratamiento biológico (ATB)	31
4.3 MARCO TEÓRICO	35
4.3.1 Biotecnología Ambiental	35
4.3.2 Biodegradación de Hidrocarburos.....	39
4.3.3 Microorganismos Competentes.....	50
4.3.4 Sistemas Bentónicos Estratificados	52
4.3.5 Bioproductos y Fertilizantes	55
4.4 MARCO LEGAL	55
5. DISEÑO METODOLOGICO.....	59
5.1 UBICACIÓN.....	59
5.1.1 Área objeto de estudio	60
5.2 METODOLOGÍA	61
5.2.1 Desarrollo Experimental.....	62
5.2.2 Análisis estadístico	87
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96

6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO CONTAMINADO	96
6.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBURO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN	97
6.2.1 Ensayo de tratabilidad	99
6.2.2 Prueba piloto en campo	100
6.3 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	105
6.4 ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DEL pH DEL SUELO DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.	109
6.5 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LA HUMEDAD DURANTE EL PROCESO.....	112
7. CONCLUSIONES	117
8. RECOMENDACIONES.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	121
ANEXOS	137

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cálculo de área y volumen de suelo del ATB que debe ser retirado.	34
Tabla 2. Géneros de microorganismos con potencialidades de degradar hidrocarburos.....	51
Tabla 3. Protocolo Louisiana 29-B	57
Tabla 4. Coordenadas ATB	60
Tabla 5. Parámetros y técnicas de seguimiento y control del proceso de Biorremediación.....	79
Tabla 6. Comportamiento del porcentaje de hidrocarburos al cabo de 10 semanas	88
Tabla 7. Variable Dependiente: Porcentaje de hidrocarburos (%HC).....	88
Tabla 8. Porcentaje de hidrocarburos en cada tratamiento	89
Tabla 9. Comportamiento del contenido de microorganismos al cabo de 10 semanas	90
Tabla 10. Variable Dependiente: Microorganismos.....	90
Tabla 11. Prueba de TUKEY para comparar el promedio del contenido de microorganismos en cada tratamiento.	91
Tabla 12. Comportamiento del contenido de PH al cabo de 10 semanas	92
Tabla 13. Variable Dependiente: PH.....	92
Tabla 14. Comportamiento del porcentaje de Humedad, al cabo de 10 semanas.	93
Tabla 15. Variable Dependiente: % Humedad	94
Tabla 16. Prueba de TUKEY para comparar el porcentaje de humedad en cada tratamiento.....	94
Tabla 17. Características del suelo contaminado objeto de estudio	97
Tabla 18. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados en prueba a escala laboratorio, con equipo de campo (Kit Retorta).....	99

Tabla 19. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados en prueba a escala piloto, con equipo de campo (Kit Retorta)	102
Tabla 20. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados durante prueba a escala piloto, en laboratorio certificado	104
Tabla 21. Resultados de recuentos microbiológicos durante el ensayo de tratabilidad, determinados en laboratorio de campo.....	106
Tabla 22. Resultados de recuentos microbiológicos durante prueba a escala piloto, determinados en laboratorio de campo	108
Tabla 23. Resultados del comportamiento del potencial de hidrógeno durante la prueba a escala laboratorio.....	110
Tabla 24. Resultados del comportamiento del potencial de hidrógeno durante la prueba a escala piloto	111
Tabla 25. Resultados del contenido de la humedad durante la prueba a escala laboratorio	113
Tabla 26. Resultados del comportamiento de la Humedad durante la prueba a escala piloto.....	115

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo del suelo en el área del ATB	32
Figura 2. Panorámica del Área de Tratamiento Biológica.	33
Figura 3. Ubicación puntos calientes en el área del ATB.	34
Figura 4. Panorámica de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja.	59
Figura 5. Área de tratamiento biológico (ATB)	61
Figura 6. Limpieza mecánica del área y toma de muestras	64
Figura 7. Preparativo de la cámara de la retorta para su uso.....	66
Figura 8. Adición de la muestra en el receptáculo	67
Figura 9. Ubicación de la cámara y el condensador a la camisa de calentamiento	68
Figura 10. Ubicación del receptáculo para líquido en la camisa de calentamiento	68
Figura 11. Funcionamiento de la retorta.	69
Figura 12. Lectura del resultado de la retorta.....	69
Figura 13. Preparación de la muestra para la prueba de pH.....	72
Figura 14. Lectura del resultado del pHmetro	72
Figura 15. Esquema de técnica de siembra en placa.....	74
Figura 16. Técnica de siembra en gota.....	75
Figura 17. Recipiente con Consorcio microbiano	78
Figura 18. Montaje de la prueba a escala de laboratorio	80
Figura 19. Elementos empleados en la prueba a escala de laboratorio	80
Figura 20. Montaje de la prueba piloto en campo	81
Figura 21. Prueba piloto de biorremediación	82
Figura 22. Preparación de muestras durante seguimiento del proceso en campo.....	83

Figura 23. Aplicación de agua para control de humedad en ensayo de laboratorio	84
Figura 24. Aplicación de consorcio microbiano durante la prueba piloto en campo.....	85
Figura 25. Evaluación de microbiológica del proceso de biorremediación	86
Figura 26. Nombrar y colocar en la lista de figuras	89
Figura 27. Comportamiento del contenido de microorganismos, al cabo de 10 semanas	91
Figura 28. Comportamiento del contenido de PH, al cabo de 10 semanas	93
Figura 29. Comportamiento del porcentaje de humedad, al cabo de 10 semanas	95

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos a escala de laboratorio	100
Gráfica 2. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos durante prueba a escala piloto. Análisis con equipo de campo. (masa de tierra: 675 kg)	103
Gráfica 3. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos durante prueba a escala piloto. Análisis con equipo de laboratorio. (masa de tierra: 675 kg)	105
Gráfica 4. Evolución de la microbiota durante la biodegradación de hidrocarburos a escala laboratorio.	107
Gráfica 5. Evolución de la microbiota durante la biodegradación de hidrocarburos a escala piloto	109
Gráfica 6. Variación del pH del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos en la prueba a escala laboratorio	110
Gráfica 7. Comportamiento potencial de hidrogeno durante la prueba a escala piloto	112
Gráfica 8. Variación de la humedad del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos a escala de laboratorio.	114
Gráfica 9. Variación de la humedad del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos a escala piloto	116

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Ficha técnica Oil-free	137
ANEXO B. Resultados laboratorio certificado	142
ANEXO C. Abono Liquido T 7.....	157

RESUMEN

TITULO: BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBURO EN LA ANTIGUA ÁREA DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO (ATB) DE LA GERENCIA REFINERÍA BARRANCABERMEJA*

AUTOR: DEBBIE ANDRÉS CADENA AGUDELO**

PALABRAS CLAVES: Biorremediación microbiana, bioestimulación, bioaumentación, ensayo de tratabilidad, prueba piloto en campo

DESCRIPCIÓN

La contaminación de suelos con hidrocarburos es uno de los problemas generados por los procesos de extracción y procesamiento de petróleo. Este trabajo propone la aplicación de la tecnología de biorremediación de suelos mediante el uso de procesos de biodegradación microbiana que permitan la remoción de hidrocarburos presente en el suelo contaminado del pasivo ambiental de la antigua Área de Tratamiento Biológico de la Gerencia Refinería Barrancabermeja.

El trabajo incluye una metodología propia en la aplicación de un sistema de biorremediación microbiana, desarrollada mediante las siguientes líneas de acción estrategia: primero, la determinación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo contaminado; segundo, aplicación de técnicas de bioestimulación y bioaumentación de la población de microorganismos presentes; tercero, desarrollo de actividades de seguimiento y control mediante la realización de análisis periódicos en campo y en laboratorio y cuarto, determinación de la eficiencia del proceso de biorremediación microbiana.

La alta eficiencia alcanzada en la remoción de los hidrocarburos contenidos en el suelo contaminado durante la implementación del proceso de biorremediación microbiana fue validado por medio del desarrollo riguroso del diseño experimental aplicado, el cual incluyó una primera fase de trabajo en laboratorio mediante un ensayo de tratabilidad y una segunda fase correspondiente a la traslación del ensayo a una prueba piloto en campo.

El desarrollo de este proyecto permitió establecer una alternativa viable técnica, económica y ambientalmente aceptable para el manejo del pasivo ambiental objeto de estudio, mismo que redundara en la posibilidad real de cumplimiento con la legislación ambiental vigente por parte de la Refinería de Barrancabermeja.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, PhD. Bioquímica

SUMMARY

TITLE: MICROBIAL BIOREMEDIATION ON HYDROCARBON CONTAMINATED SOIL IN FORMER BIOLOGICAL TREATMENT AREA (ATB) IN BARRANCABERMEJA REFINERY*.

AUTHOR: DEBBIE ANDRÉS CADENA AGUDELO**

KEYWORDS: microbial bioremediation, bioestimulation, bioaugmentation, treatability test, pilot test in the field

DESCRIPTION

Soil pollution with oil is one of the issues generated by the processes of extraction and processing of oil. This paper proposes the application of technology for bioremediation of soils using microbiological processes that allow the removal of hydrocarbons in soil contaminated environmental liabilities of the former Biological Treatment Area in Barrancabermeja refinery.

The work includes methodology for the application of microbiological bioremediation system, developed through the following action lines: first, the determination of the physicochemical and microbiological contaminated soil, and second, applying techniques of bioestimulation and bioaugmentation population of microorganisms, third, development of monitoring and control through regular tests in field and laboratory and fourth, determining efficiency on microbiological bioremediation process.

The high efficiency achieved in the removal of hydrocarbons in contaminated soil during the implementation of microbiological bioremediation process was validated by developing rigorous experimental design, which included a first phase of work in the laboratory using a treatability test and a second phase corresponding to the translation of a pilot test in the field.

The development of this project enabled a viable solution technically, economically and environmentally acceptable to the management of environmental liabilities under study, it will result in the real possibility of compliance with environmental regulation by the Barrancabermeja refinery.

* Draft Grade

** Faculty Science. School of Chemistry. Director: Rodrigo Sáez Gonzalo Torres, PhD. biochemistry

GLOSARIO

AEROBIO: Uso de un compuesto oxidante en la respiración microbiana (Ej. Oxígeno) para realizar el proceso de biodegradación.

ANAEROBIO: Uso de un compuesto reductor en la respiración microbiana (Ej. Sulfatos, dióxido de carbono etc.,) para realizar el proceso de biodegradación.

API: American Petroleum Institute

BIODEGRADACIÓN: Proceso biológico basado en el metabolismo de los microorganismos en el que se reducen las concentraciones de los componentes de una sustancia o compuesto orgánico.

BIORREMEDIACIÓN: Proceso biológico controlado, para el tratamiento de suelos, materiales y aguas contaminadas con sustancias tóxicas, que utiliza microorganismos como bacterias, levaduras u hongos para descomponer estas sustancias a otras menos tóxicas o inocuas.

CAMPO PETROLERO: Área de producción de petróleo con instalaciones de transporte, construcción, mantenimiento, alojamiento y administración; equipos de separación de petróleo, gas y agua, transporte de petróleo crudo y gas natural, instalaciones de abastecimiento de agua entre otras.

CONTAMINACIÓN CRUZADA: Transferencia de un contaminante de un medio a otro agua-aire, suelo-agua, suelo-aire etc.

EX-SITU: Significa retirado de su lugar original, e implica que hay excavación y traslado del material contaminado a tratar.

IN-SITU: Significa en su lugar de origen, e implica que no hay excavación ni traslado del material contaminado a tratar.

LANDFARMING: Forma de tratamiento de un suelo, lodo o cualquier otro material contaminado, el cual está basado en prácticas agrícolas, como por ejemplo, el volteo de terreno con tractor.

RECALCITRANTE: Término usado para los compuestos contaminantes que presentan resistencia o que son muy resistentes a la biodegradación y que sólo podrán ser degradados bajo condiciones no-biológicas.

RETORTA: Equipo de separación y medición de los volúmenes de agua, aceite y sólidos contenidos en una muestra de fluidos de perforación.

SUELO: Estrato superior de la corteza terrestre formado por minerales, materia orgánica, aire y agua.

TPH: Significa “hidrocarburos totales del petróleo”, y es usado como parámetro de medida de los compuestos del petróleo en una muestra de suelo o agua.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento por biorremediación microbiana es un proceso biológico utilizado ampliamente a nivel mundial en la descontaminación de suelos y materiales contaminados con hidrocarburos del petróleo, dentro del cual juega un papel preponderante el análisis previo de las implicaciones técnicas y ambientales que permiten asegurar la eficiencia del proceso en el marco de la sostenibilidad ambiental.

Este trabajo incorpora la aplicación de la tecnología de biorremediación microbiana en el pasivo ambiental existente en la antigua área de tratamiento biológico “ATB” de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja que presenta suelos contaminados con contenidos de hidrocarburo hasta del 30% (30000 mg/kg) producto de que a lo largo de su operación, recibió todos los lodos aceitosos que en el funcionamiento normal de la refinería generaban las actividades de limpiezas de tanques y estructuras, limpiezas de áreas impregnadas con crudo por derrames de petróleo ocurridos en emergencias y disposición de los lodos aceitosos generados en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales (PTAR).

La metodología del presente trabajo incluye la implementación de un procedimiento experimental realizado mediante dos (2) fases de ejecución de la aplicación de la tecnología de biorremediación microbiana del suelo contaminado presente en el área objeto de estudio, correspondiente a un ensayo inicial de tratabilidad en laboratorio y una traslación de los resultados alcanzados en el ensayo a una prueba piloto en campo, utilizando como base para la degradación del hidrocarburo el microorganismo *Pseudomona sp*, teniendo en cuenta la amplia documentación que demuestra la presencia de este microorganismo en la zona de estudio mediante diversas investigaciones realizadas por Ecopetrol, empresas de la región y validadas en el marco de este trabajo.

En las actividades de laboratorio y de campo, se desarrollaron técnicas de bioaumentación y bioestimulación de la población microbiana existente en el suelo contaminado, mediante la aplicación de un consorcio microbiano producido a partir de los microorganismos nativos presentes en el área de estudio (*Pseudomonas sp*), adición de nutrientes y suministro de aireación por medio de volteos periódicos. De igual forma, se realizó un seguimiento y control sistemático de los parámetros de interés que permitió condiciones óptimas para la biodegradación del hidrocarburo contenido en el suelo y la evaluación del proceso de biorremediación implementado.

Finalmente, este proyecto se convierte en una herramienta viable técnica, económica y ambientalmente aceptable para el manejo y tratamiento de los suelos contaminados con hidrocarburos existentes en el pasivo ambiental de la antigua área de tratamiento biológico (ATB) de la Refinería de Barrancabermeja, en razón a que los resultados alcanzados lograron demostrar una reducción significativa de la concentración de hidrocarburos contenidos en el suelo contaminado (hasta del 73%) en tan solo diez (10) semanas de duración del proceso de biodegradación implementado.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La Gerencia Refinería de Barrancabermeja presenta en el interior de sus instalaciones un pasivo ambiental (antigua área de tratamiento biológico (ATB)) correspondiente al área en la cual se desarrollaban las actividades de tratamiento biológico de los lodos aceitosos generados por la operación normal de la Refinería. Este pasivo ambiental está actualmente representado por un área de once (11) hectáreas, con un volumen de aproximadamente 400.000 m³ (metros cúbicos) de suelo contaminado con concentraciones de hidrocarburo que oscilan entre 3% y 30% (3000 mg/kg y 30000 mg/kg).

La existencia del pasivo ambiental en la antigua área de tratamiento biológico ATB, ocasiona riesgos adicionales a la salud de los trabajadores expuestos a los venteos en áreas de plantas industriales aledañas y una mayor toxicidad en los recursos suelo y aguas subterráneas, principalmente por procesos fisicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración de hidrocarburos generados en el sitio de disposición de los suelos contaminados.

De igual forma, el área que ocupa este pasivo ambiental representa para la Gerencia Refinería de Barrancabermeja un área potencial a utilizar para implementar en un futuro los procesos de modernización que demandan las nuevas tecnologías de refinación y petroquímica. Por esta razón, se requiere su descontaminación y habilitación para ser utilizada para los objetivos de ampliación de la refinería.

2. JUSTIFICACIÓN

Las diferentes actividades humanas han introducido al ambiente gran cantidad de residuos orgánicos provenientes de las actividades industriales. Sin embargo, y durante el último tiempo, se han venido desarrollando nuevas alternativas de tratamiento de estos residuos que permitan remediar y/o mitigar la contaminación ambiental. Entre estas tecnologías, la biorremediación se ha venido consolidando como una solución para disminuir la contaminación ocasionada por los hidrocarburos de petróleo, sus derivados y metales pesados; con diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema que se desea solucionar.

Al interior de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja (GRB) existe un pasivo ambiental denominado “antigua área de tratamiento biológico (ATB)” el cual presenta impactos ambientales acumulados No Resueltos. Con este trabajo de investigación aplicada, enmarcada en el campo de la biotecnología ambiental, se busca estudiar el uso de la tecnología de biorremediación microbiana como una alternativa de mitigación y/o reducción de este tipo de contaminantes.

Por último, es importante anotar que la implementación de la alternativa propuesta en este trabajo de aplicación, permitiría desarrollar un proceso de descontaminación sin la generación de impactos ambientales residuales y con un menor de costo de inversión.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la tecnología de Biorremediación Microbiana para la remoción de hidrocarburos totales en el suelo del pasivo ambiental antigua área de tratamiento biológico (ATB) de la Gerencia Refinería Barrancabermeja

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las características fisicoquímicas (pH, humedad, contenido de hidrocarburos totales) y microbiológicas (microorganismos presentes) del suelo contaminado con hidrocarburo.
- Implementar técnicas de bioaumentación (pool de *Pseudomonas sp*) y bioestimulación (adición de nutrientes) en el suelo contaminado.
- Realizar seguimiento y control al proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos.
- Determinar la eficiencia (tasa de biodegradación) del proceso de biorremediación microbiana en el suelo contaminado con hidrocarburos.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 ANTECEDENTES

Silva-Castro GA, 2013 estudiaron la biorremediación de suelos contaminados con diésel utilizando bioestimulación como post-tratamiento después de la oxidación con reactivos de tipo Fenton, estos estudios se llevaron a cabo en una planta piloto que contenía 1 m³ de suelo arenoso contaminado con 20.000 mg/kg de diésel, colocado al aire libre a una temperatura comprendida entre 5 y 10 ° C. Los resultados mostraron que los fertilizantes NPK como post-tratamiento estimulan las bacterias cultivables degradantes y mejora la actividad deshidrogenasa.

Sutton NB, 2012 usaron la tecnología de Biodegradación para tratar suelos contaminados con diésel en matrices de suelo diferentes (capa de relleno, turba, arcilla y arena), identificando el impacto de las condiciones ambientales y la biodisponibilidad de la capacidad de remediación microbiana.

Couto MN, 2012. Evaluaron la atenuación natural, fitorremediación y tecnologías híbridas en la remediación del suelo en una antigua refinería vs un área con una reciente contaminación por hidrocarburos de petróleo, encontrándose que después de 31 meses de experimentos, MNA fue eficaz en la eliminación de la mayor parte de la reciente contaminación APS (50% de la contaminación inicial total) a 5-20 cm de profundidad.

Coulon F, 2012 Estudio del efecto de la formulación de fertilizantes y bioaumentación sobre biodegradación y la lixiviación de los crudos y productos refinados en los suelos, los estudios demostraron que la aplicación de técnicas de bioestimulación proporcionan beneficios para superar la limitación de nutrientes en

los suelos en procesos de biorremediación, incrementando las tasas de biodegradación de hidrocarburos (por un factor de 1,4 a 2,9) y el porcentaje de masa de hidrocarburos degradados (> 30% después de 12 semanas y 80% después de 37 semanas), en comparación con los suelos no enmendadas.

Lladó S, 2012. Un enfoque diversificado para evaluar las estrategias de bioestimulación y bioaumentación de suelo contaminado con petróleo pesado, mediante una aproximación diversificada que comprende el seguimiento químico, microbiológico y la evaluación de la ecotoxicidad de los suelos contaminados por aceite mineral pesado, con el fin de mejorar nuestra comprensión de la biodegradabilidad de los contaminantes microbianos, la dinámica de la comunidad y los efectos ecotoxicológicos de diferentes estrategias de biorremediación

Feng ZZ, 2012. Degradación microbiana de Fomesafen por un recién aislado de cepa *Pseudomonas* AP-1 y la vía de degradación bioquímica, mediante el cual se determinó la capacidad de la cepa de *Pseudomonas* recién aislado zeshuii AP-1 para utilizar Fomesafen como única fuente de carbono en un cultivo puro para su crecimiento. Hasta 88,7% de 50 mg/l de Fomesafen fue degradado por esta bacteria en medio mineral dentro de 3 días

Shagas-Spinelli AC, 2012. Estudio de la biorremediación de un suelo arcilloso tropical contaminado con aceite diésel, donde se determinó que la eficiencia del tratamiento para eliminación de PAHs diferían de las eficiencias para la eliminación de compuestos de HAP individuales. En el caso de PAHs totales, los valores de remoción obtenidos al final del período experimental durante 129 días eran 87%, 89% y 87% para BS, LF, y BSBA, respectivamente.

Singh B, 2012. Biodegradación de un derrame de petróleo en una refinería utilizando consorcios de nuevas cepas bacterianas, mediante la cual se determinó que en el tiempo cero (justo antes de la iniciación de la biorremediación), la

concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo (a 25 cm horizonte) de la trama A, B, C y D fue de 30,90%, 18,80%, 25,90% y 29,90%, respectivamente, después de 360 días de tratamiento con consorcios microbianos se redujo a 0,97%, 1,0%, 1,0%, y 1,1% respectivamente. Considerando que sólo el 5% de degradación se observó en la parcela de control después de 365 días (sin aplicación de consorcio microbiano).

Chikere CB, 2011. Seguimiento de la remediación de hidrocarburos microbiana en el suelo, se determinó que la biorremediación de contaminantes de hidrocarburos es ventajosa debido a la relación costo-efectividad de la tecnología y la ubicuidad de los microorganismos que degradan hidrocarburos en el suelo.

Lopólito M. y Col. 2005. Llevaron a cabo experimentos de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes sustratos como el petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno, y como nutriente un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la inoculación previa acelera el proceso de degradación.

Morgan M. y Col. 2005. Aplicaron biorremediación en 20 m² de suelo contaminado con petróleo, durante 369 días, en este suelo se adicionaron nutrientes inorgánicos, aireación y humedad, obteniéndose valores < a 1% de concentración de hidrocarburos recomendada por normas internacionales.

Abalos A. y Col. 2004. Estudiaron los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación.

Bracho M. y Col. 2004. Llevaron a cabo un estudio respecto a la degradación bacteriana sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno. Las bacterias degradadoras aisladas a partir del suelo estudiado fueron: *Pseudomonas*

(54.05%), *Bacillus* (24.30%), *Staphylococcus* (16.20 %) y *Micrococcus* (5.4 %); además determinaron que el 100% de cepas, degradaron el naftaleno y antraceno, el 78.5% fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y 50% los cuatro hidrocarburos.

Pardo J. y Col. 2004. Midieron la efectividad de la biolabranza (landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%.

Volke T. y Col. 2003. Realizaron un trabajo en biodegradación de hidrocarburos de petróleo y determinaron que los pretratamientos electroquímico y mediante adición de surfactantes, adicionales al composteo, produjeron una degradación del 48% y 46% respectivamente.

Zucchi M. y Col. 2003. Evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%

Escalante R. 2002. Desarrolló un estudio sobre la biodegradación del crudo de petróleo en 3 terrarios durante 90 días, se aislaron 129 cepas bacterianas de las que presentaron una mejor actividad biodegradativa las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. y *Serratia rubidae*, las mismas que conformaron el consorcio utilizado en ese experimento. En el primer terrario, donde se inoculó el consorcio exógeno sin fertilizantes, se logró una biodegradación del 92.5%, en el segundo terrario, que estuvo conformado por bacterias nativas, el porcentaje de biodegradación logrado fue del 60% y finalmente, en el tercer terrario que correspondía al control abiótico, la biodegradación fue del 55%.

Margesin R., Schinner F. 2001. Investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. Para examinar la eficiencia de la atenuación natural y bioestimulación, utilizaron un mesocosmos tanto con suelos fertilizados y no fertilizados con NPK. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.

Mishra S. y Col. 2001. Analizaron el potencial de la biorremediación de un consorcio bacteriano en suelos pertenecientes a una refinería, dividieron el terreno de estudio en 4 bloques A, B, C y D de los que A, B y C fueron tratados con consorcio y D fue control no tratado. En los bloques donde se aplicó el consorcio bacteriano y nutrientes se observó un porcentaje de biodegradación de 90.2%, mientras que en el bloque D, un 16.8%, el experimento se desarrolló durante un período de 120 días.

Nwachukwu S. 2001. Inoculó *Pseudomonas putida* en suelos contaminados con petróleo, adicionando nutrientes inorgánicos en algunos. La mayor efectividad de degradación se obtuvo a las 9 semanas, esto se corroboró por el crecimiento de *Lepidium sp.*, usado como evidencia de biorrecuperación; el porcentaje de germinación de éste, fue de 27,5% en suelos no fertilizados y de 98,8% en suelos fertilizados.

Parales R. el año 2000. Evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que *Pseudomonas putida*, degrada de manera eficaz los hidrocarburos.

Belloso C. 1999. Evalúa el porcentaje de biodegradación durante el proceso "landfarming" (biolabranza), usando microorganismos exógenos y microorganismos nativos sin aplicación de fertilizantes, el estudio tuvo una duración de 3 meses. La eficiencia de la degradación fue del 84% (en el terrario N°

1, con microorganismos exógenos) y del 49% (en el terrario N° 2, con microorganismos nativos).

Deyta A. y Saval S. 1999. Analizan la degradación de benceno, tolueno y xileno (BTX) en suelos de dos sitios contaminados con gasolina y concluyeron que las diferencias de velocidades y porcentaje de degradación de un sitio a otro se debían a la combinación de factores como la humedad, adición de nutrientes y bacterias aclimatadas; asimismo la eficiencia dependió del tipo de suelo.

Machin J. y Col. 1999. Observaron el efecto de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos de suelo contaminado, en reactores de fase semisólida, encontrando que mediante la adición de un fertilizante, se obtenía un elevado porcentaje de degradación. El suelo tratado presentaba altos niveles de contaminación por hidrocarburos; de esta manera la bioestimulación en fase sólida puede considerarse como alternativa para la biorremediación del suelo.

Morales D. y Col. 1999. Aislaron y seleccionaron consorcios microbianos con capacidad para degradar hidrocarburos de dos fuentes: una contaminada con hidrocarburos (IMP) y otra no contaminada (composta residual). La degradación de hidrocarburos fue de 25,48% para el consorcio IMP y de 22,37%, para el consorcio de la composta.

Ortiz A. y Col. 1999. Seleccionaron un material texturizante orgánico (bagazo de caña y composta) el mismo que presentaba las mejores características como soporte en los biorreactores tipo columna por incremento de porosidad, resistencia de agua, resistencia del diclorometano y alta recuperación de hidrocarburos; asimismo determinan un porcentaje de biodegradación de 9.35 % para el consorcio IMP, 14,77 % para el consorcio IMP+ composta y un 25% para IMP+ bagazo de caña.

Aislabie J. y Col. 1998. Estudiaron el potencial de la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo en suelos de la Antártida, demostrando que el nitrógeno incrementa significativamente la mineralización de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo crudo.

Belloso C. y Carrario J. 1998. Compararon la actividad hidrocarburofítica de diferentes cepas bacterianas en suelos "landfarming" contenidos en terrarios, con aplicación de 2 concentraciones de fertilizantes NPK en las proporciones de C/N: 20:1, y NPK: 20:2:1 en el primer caso (Z1) y proporciones de C/N: 100:1, y NPK: 20:20:1 en el segundo caso (Z2), observándose el porcentaje más alto de reducción de hidrocarburos (45%) en los primeros 30 días en el terrario con el fertilizante Z2. La cepa W2 resultó ser la de mayor capacidad hidrocarburofítica.

Merino F. 1998. Llevó a cabo un estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo, indicando que los microorganismos con mayor capacidad emulsificante y degradativa, fueron las cepas: *Pseudomonas aeruginosa* KT1-1 y *Serratia rubidaea* BT5-4.

4.2 MARCO HISTÓRICO

En los años sesenta, la idea de que la biodegradación del petróleo vertido en un accidente se podía mejorar con la adición de nitrógeno y fósforo inorgánico ya había aparecido en los círculos científicos. Uno de sus principales impulsores en los años 70 fue Ronald Atlas, que tiempo después trabajó en la limpieza de las costas de Alaska tras el vertido del Exxon Valdez.¹

¹ RODRÍGUEZ GALLEGO, José Luis. Universidad de Oviedo. Disponible en www.ingenierosdeminas.org/docu/documentos/biorremediacionexxonvaldes.pdf. p.24. Fecha de consulta: 13 de Febrero de 2013.

En efecto, esta tecnología comenzó definitivamente a llamar la atención en los años setenta, reducida a experimentos de laboratorio o a pequeñas demostraciones en el campo. A partir de entonces, el número de fracasos comenzó a disminuir y a finales de los ochenta, la comunidad científica empezó a considerar la tecnología de biorremediación como una alternativa para remediar los efectos de los vertidos de petróleo.²

En Colombia, el año de 1974 mediante el código nacional de recursos naturales, se orientó las miradas hacia la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos y compuestos orgánicos, en donde se incluyeron procesos fisicoquímicos de separación y reacciones que en su momento se presentaban como una solución inmediata al problema ambiental. Durante las décadas de los 80s las entidades ambientales centraron sus esfuerzos en la divulgación de las leyes para el manejo ambiental, preservación de la atmosfera, el recurso hídrico y la preservación de ecosistemas naturales con el fin de disminuir las actividades causantes del deterioro ambiental (decreto 1594 de 1984, usos del agua y residuos líquidos).

Posteriormente, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 18 años por una permanente actividad de atentados terroristas contra los oleoductos e instalaciones petroleras. Entre los años 1986 y 1998 las incursiones violentas de los grupos al margen de la ley ocasionaron el derramamiento de cerca de dos millones de barriles de petróleo, 7.6 veces más que el petróleo que se derramó en el desastre del buque Exxon Valdés; sobre ciénagas, pantanos, ríos, quebradas y suelos en su mayoría con vocación agrícola, pecuaria y pesquera.³

² Ibíd

³ Ibíd

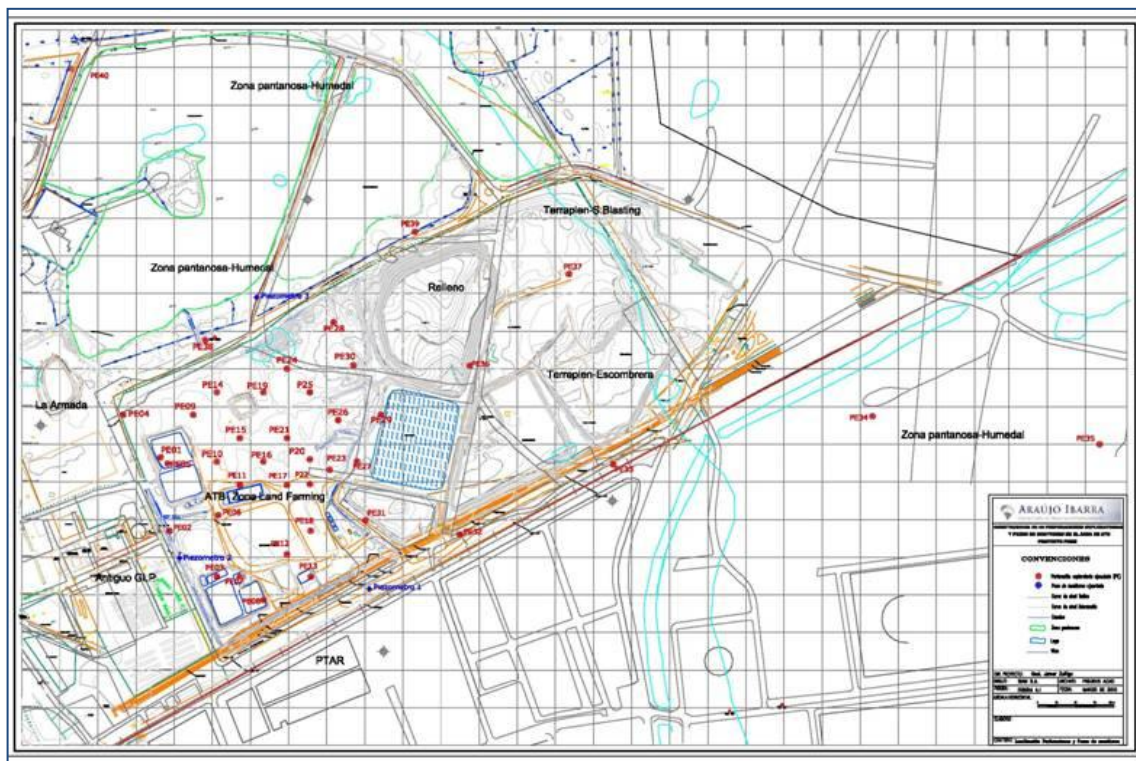
Lo anterior conlleva a pensar en la biorremediación como una alternativa para contrarrestar los daños ocasionados en el suelo por los constantes derrames de crudo; gran parte de las aplicaciones de la biorremediación han sido experimentales y los trabajos desarrollados se han dedicado a comprobar la aplicabilidad de un método de biorrecuperación a unas determinadas condiciones de emplazamientos y a determinados contaminantes⁴.

4.2.1 Área de tratamiento biológico (ATB). La necesidad del área ATB, para la Modernización de la Refinería, obligó a Ecopetrol S.A. a realizar un estudio de contaminación con la intervención del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), mediante el cual se adelantó una caracterización del suelo presente en el ATB, para identificar los potenciales niveles de contaminación presente en el sitio y tomar como referencia la Lista Holanda para su control y eventual remediación.

Lo anterior se desarrolló por medio de labores de monitoreo en 40 puntos del área ATB a saber: (Ver figura 1 Ubicación de los puntos de monitoreo de suelo área ATB).

⁴ Ibíd

Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo del suelo en el área del ATB



Fuente: Araujo Ibarra & Asociados S.A., ajustados por SIAM S.A. en campo, 2010.

Los resultados mostraron que los valores promedios encontrados en campo que era de 10.94 % (10940 mg/kg) eran superiores a los descritos en la regulación existente sobre contaminantes del MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial), que expresa que los Hidrocarburos Totales deben ser inferiores 330 mg/kg como GRO (rango de gasolina orgánica) y 990 mg/kg como DRO/ERO (Rango de Diesel orgánico/Rango de orgánicos extendidos). (Ecopetrol, Plan de Manejo Ambiental PMRB, 2010).

De igual forma, se identificaron zonas de alto contenido de hidrocarburos. En este sentido, Ecopetrol S.A. ha venido proponiendo una estrategia para llevar el contenido de hidrocarburos (medidos como grasas y aceites) en los suelos del área del ATB (en un área estimada de 11 Ha), hasta un uno por ciento (1%)

promedio en toda esta zona en profundidades superiores a dos metros. (Ecopetrol, Plan de Manejo Ambiental PMRB, 2010)

Figura 2. Panorámica del Área de Tratamiento Biológico.



Fuente: Ecopetrol S.A. - 2010

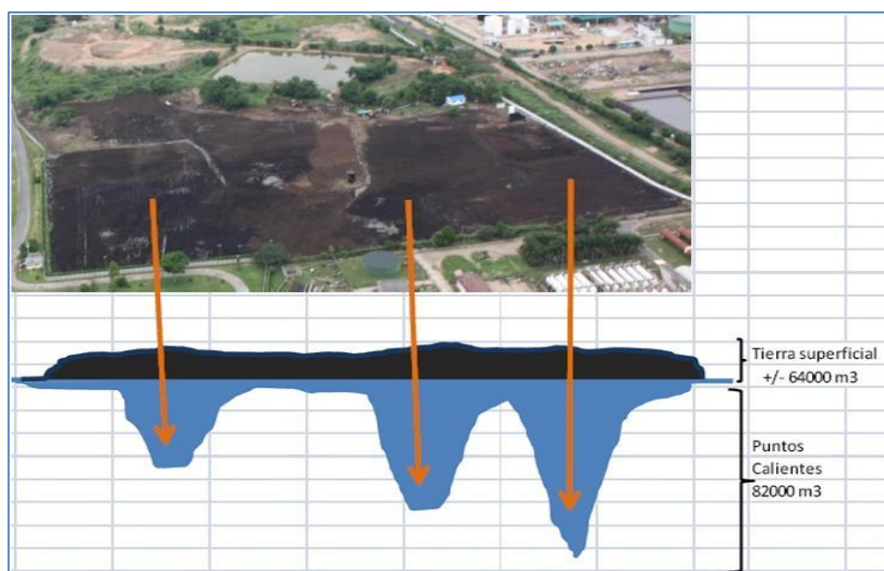
De las zonas con altas concentraciones de hidrocarburos encontradas, se han identificado tres puntos calientes, los cuales se plantean retirar y tratar en un área aledaña dentro de los predios de la Refinería. La totalidad del material contaminado deberá ser retirado del área del ATB como se evidencia en la figura que relaciona el volumen de material estimado de los puntos calientes y el volumen de suelo contaminado de tierra superficial. (Ver tabla 1 y figura 3)

Tabla 1. Cálculo de área y volumen de suelo del ATB que debe ser retirado.

Caracterización del área del ATB por el ICP			
Profundidad	Área	Volumen	Hidrocarburo
Metros	m ²	m ³	%
0 – 1	12.538		
1 - 2	10.082	2.823	10,30
2- 3	17.400	4.872	17,80
3 – 4	22.164	6.206	22,70
4 – 5	1.651	462	1,70
5 – 6	6.851	1.918	7,00
6 – 7	10.276	2.877	10,50
7 – 8	6.945	1.945	7,10
8 – 10	12.177	3.410	12,50
Total > 1% HC	97.462	24.513	
Total	100.084		

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo – ICP – Caracterización del área del ATB, 2010.

Figura 3. Ubicación puntos calientes en el área del ATB.



Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo – ICP – Caracterización del área del ATB, 2010.

4.3 MARCO TEÓRICO

4.3.1 Biotecnología Ambiental. La biotecnología ambiental surge entre los siglos XIX y XX para el tratamiento de aguas residuales urbanas. En la segunda mitad del siglo XX, se extendió a la remediación de suelos, la purificación de gases, el saneamiento de aguas superficiales y subterráneas, la purificación de aguas residuales industriales, las técnicas de deposición de residuales en vertederos sanitarios y compostaje de residuos biorgánicos⁵.

La biotecnología ambiental emplea los procesos biológicos modernos en la protección y restauración de la calidad del ambiente. Esta surgió como una solución a muchos de los problemas de contaminación actual. Se puede evaluar el estado de los ecosistemas, transformar los contaminantes en sustancias no tóxicas, generar materiales biodegradables a partir de recursos renovables y desarrollar procesos de manufactura y manejo de desechos ambientalmente seguros⁶. Esta disciplina científica-aplicada abarca cualquier aplicación destinada a reducir la contaminación, con la utilización de microorganismos para la generación de combustibles y de plantas modificadas genéticamente para la absorción de sustancias tóxicas.

Cada vez son más las compañías industriales que están desarrollando procesos biotecnológicos en el área de prevención, con el fin de reducir el impacto ambiental como respuesta a la tendencia internacional al desarrollo de una sociedad sostenible. Esta es una opción para producir nuevos productos con menor impacto ambiental.

⁵ HARTMAN, L. (1999). Historical development of wastewater treatment processes. In: J Winter, editor. *Biotechnology-Environmental processes I*. Weinheim: Wiley-VCH.

⁶ ZILSTRAA, GJ, KUKOR, JJ. (2005). What is environmental biotechnology? *Curr Opin Biotech*; 16(3): 243-5.

Actualmente, la principal aplicación de la biotecnología ambiental es la biorremediación, considerada como una tecnología emergente. El término inglés *bioremediation*, que en español se traduce como biorrestauración, se refiere a los tratamientos con sistemas biológicos para la restauración o limpieza de suelos, aguas subterráneas y aire contaminado con xenobióticos. Técnicamente el anglicismo biorremediación es aceptado y el más utilizado. Puede definirse entonces como biorremediación: una tecnología de biorrestauración de ambientes naturales previamente contaminados con xenobióticos por eliminación, atenuación o transformación de estos compuestos^{7,8}, con el empleo de la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas)^{8,9} y algunas plantas, oxígeno y nutrientes, para acelerar los procesos de biodegradación natural. La transformación puede ser parcial, por obtención de un compuesto menos tóxico que el parental, mientras que la mineralización o transformación total es la degradación hasta dióxido de carbono y agua (procesos aerobios), agua y metano (condiciones anaerobias). Es importante destacar que la biorremediación es efectiva sólo si el contaminante es biodegradable⁸.

En 1974 se registró la primera patente de agente biológico de remediación: una cepa de *Pseudomonas putida* degradadora de petróleo¹⁰. En 1991, se habían reportado aproximadamente 70 géneros microbianos degradadores de compuestos del petróleo, y en las dos décadas sucesivas ese número casi se ha duplicado. Estos microorganismos pertenecen al menos a 11 divisiones procariotas diferentes¹¹.

⁷ MAIER, R. (2002). Microorganisms and organic pollutants. In: Maier R, Pepper IL and CP Gerba, editors. Environmental Microbiology. San Diego, CA: Academic Press. P 363-400.

⁸ PRASAD, KS, KUMAR, NS, SHARMA, S. (2010). Bioremediation: Developments, current practices and perspectives. Genet Eng Biotechnol J.; 1-20.

⁹ STRONG, PJ, BURGESS, JE. (2008). Treatment methods for wine-related ad distillery wastewaters: a review. Bioremediat J.; 12: 70-87.

¹⁰ PRESCOTT, LM; HARLEY, JP; KLEIN, DA. (2002). Microbiology. Fundamentals of applied microbiology: 1012-4.

¹¹ GLAZER, AN; NIKAIDO H. (2007). Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. 8: 510-28.

La biodescontaminación debe ser factible de aplicar en condiciones de campo, respetuosa con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse; y competitiva desde el punto de vista económico. En estos últimos aspectos, los microorganismos asociados frecuentemente a los espacios contaminados, reúnen características ecológicas y metabólicas muy valiosas, ya que son degradadores naturales de compuestos xenobióticos. Su capacidad de desarrollarse sobre sustratos de bajo costo¹² y que sus inóculos se puedan producir masivamente mediante técnicas convencionales de uso industrial habitual, los hace candidatos singulares para su utilización en procesos de biorremediación.

La gran diversidad estructural de contaminantes ambientales que son degradados por microorganismos (fundamentalmente bacterias y hongos), los convierte en potencialmente usables para la biorremediación. Contaminantes recalcitrantes como los bifenilos policlorados, componentes de los destilados de la refinación del crudo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las resinas y los asfaltenos¹³, se mineralizan a dióxido de carbono por varias especies de hongos del tipo ligninolíticos y bacterias, incluyendo mezclas complejas de estas sustancias.

Teniendo en cuenta el movimiento o no de la matriz contaminada, las técnicas de biorremediación pueden dividirse en dos: *in situ* y *ex situ*¹⁴. En las primeras, los suelos y las aguas contaminadas son tratados en el propio lugar de la contaminación sin transformación. En las segundas, implica la excavación o traslado de los suelos contaminados; y en el caso de las aguas, significa el bombeo-tratamiento-recarga o traslado a reactores.

¹² RODRÍGUEZ, S; FERNÁNDEZ, M; BERMÚDEZ, RC; MORRIS, H. (2003). Tratamiento de influentes industriales coloreados con *Pleurotus* sp. *Rev Iberoamer Micol.* 20(4): 164-8.

¹³ FIELD, JS; JONG, E; FEIJOO-COSTA DE BONT, Jam. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11: 44 -9.

¹⁴ DUA, M; SINGH, A; SETHUNATHAN, N; JOHRI, AK. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbial Biotechnol.* 59 (2-3): 143-52.

La selección de la técnica depende de tres principios básicos: la bioquímica, que es la posibilidad de que el contaminante sea transformado biológicamente; la biodisponibilidad, que es la accesibilidad del microorganismo al contaminante; y la bioactividad, que es la oportunidad de optimizar la actividad biológica¹⁵.

Las técnicas de la biorremediación se clasifican fundamentalmente en tres tipos: la bioestimulación, que es la adición de nutrientes para potenciar la actividad metabólica de la microbiota degradadora autóctona; la bioaumentación, que es la adición de microorganismos degradadores exógenos cuando la proporción de la microbiota degradadora autóctona es muy reducida⁹; y la bioaumentación con microorganismos modificados genéticamente, tecnología prácticamente exclusiva de países desarrollados. La obtención de productos mediante técnicas de ADN recombinante para potenciar vías degradativas específicas para fines de biorremediación es cara, aunque muy eficiente.

Como todo proceso tecnológico, la biorremediación tiene ventajas y desventajas. Una ventaja importante es su bajo costo en relación con otros tratamientos. Es difícil hacer una comparación de costos, porque es necesario conocer las características de cada sitio en particular, pero en términos generales se puede decir que la biorremediación es por lo menos diez veces más económica que la incineración, y tres veces más económica que algunas tecnologías fisicoquímicas de inmovilización. Ello está dado por varios factores, como un menor gasto de energía, bajo costo de los nutrientes y la operación bajo condiciones ambientales, que hace que su uso sea muy práctico para los países en vías de desarrollo¹⁵. Por otra parte, es una tecnología limpia, ya que los contaminantes pueden ser transformados hasta compuestos inocuos como el dióxido de carbono.

Las desventajas de la biorremediación consisten principalmente en que no se puede aplicar en el campo cuando hay compuestos radioactivos, cuando los compuestos orgánicos contaminantes son altamente halogenados, cuando existen

metales pesados que inhiben la actividad microbiana o cuando las condiciones microambientales son desfavorables. Debido a que cada microorganismo tiene sus características, la tolerancia que presentan ante cada situación es muy particular. También pueden ocurrir fenómenos de inhibición de la actividad microbiana a concentraciones muy altas de contaminantes orgánicos¹⁶.

4.3.2 Biodegradación de Hidrocarburos. La biodegradación del petróleo es un proceso natural¹⁵¹⁶¹⁷ que demora meses o años según las condiciones¹⁸, la complejidad molecular de sus componentes y la acumulación. La biodegradación de contaminantes depende de factores abióticos o fisicoquímicos que agrupan a los que se relacionan con el contaminante (estructura química, concentración y biodisponibilidad) y las condiciones medioambientales (disponibilidad de oxígeno y nutrientes, pH, temperaturas, presión, salinidad, presencia de metales pesados); mientras que los bióticos dependen de los microorganismos (población microbiana: concentración e interacciones).

4.3.2.1 Procesos Físico-químicos: Cuando el petróleo crudo y sus productos de destilación se arrojan al ambiente, inmediatamente suceden cambios físicos y químicos. Los procesos abiológicos que ocurren a la intemperie son la evaporación, la disolución, la dispersión, la oxidación fotoquímica, la emulsificación de agua-petróleo, la adsorción de partículas suspendidas, el hundimiento y la sedimentación. Estos procesos suceden simultáneamente y causan cambios importantes en la composición química y las propiedades físicas del contaminante original, que puede afectar la tasa o la efectividad de la biodegradación. El proceso de intemperie más importante durante las primeras 48

¹⁵ SANTIESTEBAN, A. Qué es el petróleo.

¹⁶ ATLAS, RM; BARTHA, R. Stimulated. (1973). Biodegradation of oil slick using oleophilic fertilizers. Environ Sci Technol. 7: 538-41.

¹⁷ BLACKBURN, JW; HAFKER, WR. (1993). The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. Trends Biotechnol. 11: 328-33.

¹⁸ ATLAS RM. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbial Rev. 45: 180-209.

horas de un derrame generalmente es la evaporación, mediante la cual los compuestos de bajo y mediano peso con puntos de ebullición más bajos se volatilizan y van a la atmósfera: una a dos terceras partes de la masa del derrame se pierde en ese periodo. A medida que transcurre el tiempo disminuye la tasa de evaporación. La evaporación es controlada por la composición del petróleo, el área superficial y las propiedades físicas, la velocidad del viento, la temperatura del aire y del agua, el estado del cuerpo de agua y la intensidad de la radiación solar. El material remanente es más rico en metales (principalmente níquel y vanadio), ceras y asfaltenos, más que el petróleo original. Con la evaporación, el peso específico y la viscosidad del petróleo original también aumentan. La disolución del petróleo en la columna de agua es mucho menos importante que la evaporación, desde la perspectiva de la pérdida de masa del petróleo derramado, pues es improbable la disolución de parte del combustible. Sin embargo, esta última cobra importancia porque algunas fracciones solubles en agua (compuestos aromáticos ligeros) son tóxicos para varios organismos presentes (incluyendo los microorganismos degradadores), y su impacto sobre el ambiente marino es más significativo que las consideraciones de balance masivas que podrían implicar¹⁹.

4.3.2.2 Características del hidrocarburo contaminante: Las características del contaminante es uno de los factores que definen el tipo de tratamiento que se requiere para la descontaminación. Los hidrocarburos están constituidos por compuestos hidrofóbicos, poco solubles en agua. A medida que aumenta el número de átomos de carbono en la estructura y la conjugación en los compuestos aromáticos, disminuye la solubilidad. Los hidrocarburos sustituidos por grupos polares (alcoholes, ácidos, etc.) son más solubles²⁰. La solubilidad del hidrocarburo afecta su biodisponibilidad. Esta puede estar limitada además si el contaminante tiene alguna barrera física o química que impide el paso de la

¹⁹ OTREMBA, Z; TOCZEK, H. (2002). Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and aquatorial factors. Polish J Environ Stud. 11(5): 555-9.

²⁰ PROSKURIAKOZ, VA; DRABKIN, AE. (1984). Química del petróleo y del gas. Moscú: Mir.

molécula al interior celular para ser metabolizada²¹. La viscosidad también dificulta la interacción contaminante-nutriente-bacteria-aceptores de electrones²². La presencia de componentes tóxicos o inhibidores del crecimiento microbiano también afecta la interacción del contaminante, y la volatilidad no impide la biodegradación.

4.3.2.3 Fuente de Carbono: Existe una especificidad biodegradadora por parte de los microorganismos para los diferentes componentes del petróleo. Si el 'sitio de ataque o acción' de la enzima degradadora se encuentra bloqueado (isoprenoides o moléculas sustituidas con grupos voluminosos COOH, CH₃), no tendrá lugar la reacción, disminuyendo así la actividad biodegradativa²³. En general, los hidrocarburos saturados suelen ser más susceptibles a la degradación que los aromáticos^{24,25,26} y estos que resinas y asfaltenos^{26,28}. Los *n*-alcanos son los más propensos a la oxidación^{27,27}. Le siguen en la serie los isoalcanos, aunque los muy ramificados y los que contienen carbonos cuaternarios son poco biodegradados. Las oleofinas son menos utilizadas como fuente de carbono que sus correspondientes alcanos y le siguen los hidrocarburos aromáticos, mientras que los de bajo peso molecular pueden ser metabolizados cuando están presentes

²¹ NÁPOLES, J; ÁVALOS, A. (2008). Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos (Internet). Monografías de la Universidad de Oriente, (cited 13 Jun 2010). Available from: <http://monografías.uo.edu.cu/index.php/monografías/article/view/4/6>. Fecha de consulta: 10 de Enero de 2013.

²² GRUIZ, K; KRISTON, E. (1995). *In situ* bioremediation of hydrocarbon in soil. J Soil Contam. 4: 163-73.

²³ ERCOLI, G; GÁLVEZ, J. Paola P; CANTERO, J; VIDELA, S; MEDAURA, M. et al. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

²⁴ SONG, HG; WANG, X; BARTHA, R; (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spill. Appl Environ Microbiol. 56: 652-6.

²⁵ WHYTE, LG; BOURBONNIÉRE, L. GREER, CW. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. Appl Environ Microbiol. 63: 3719-23.

²⁶ LEÓN, N; INFANTE, C; ARIAS, M; MÁRQUEZ, M; GORRIN, A. (1998). Biodegradability of Venezuela crude oils. SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production, 7-10, Caracas, Venezuela.

²⁷ IN, Joseph; CAPO, MS. BELLOTA, M. (1994). Ramos Y, Ramos I, Fuentes M. Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la plataforma cubana. Ciencias Biológicas. 27: 137-48.

en bajas concentraciones. Los cicloalcanos son altamente tóxicos, por lo que se emplean como sustratos excepcionales²⁹. Las parafinas son componentes fácilmente degradables. Los isómeros, hidrocarburos cíclicos y de larga cadena carbonada tienen una lenta biodegradación por lo que necesitan una microbiota específica. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos también pueden ser usados como fuente de carbono por diferentes especies de microorganismos^{27,28}.

Una alta concentración del hidrocarburo contaminante puede inhibir la actividad microbiana por toxicidad de la fuente de carbono^{23,29,30}. Se han reportado procesos biológicos en ensayos de campo a concentraciones de contaminantes de hasta 30%, por encima de este valor la degradación es muy baja aunque no nula²⁵. La composición de los compuestos xenobióticos se transforma en el tiempo por acción de agentes ambientales, la actividad microbiana y los procesos físico-químicos; como consecuencia de esto, el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar, disminuyendo la velocidad de degradación con el envejecimiento del contaminante^{23,32-3132}.

4.3.2.4 Disponibilidad de Nutrientes para el Crecimiento de los Microorganismos: Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos se suelen producir elevados cocientes carbono/nitrógeno y/o carbono/fósforo, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano.

²⁸ GRIFOLL, M; SELIFONOV, SA; GATLIN, CV; CHAPMAN, PJ. (1995). Actions of a versatile fluorine degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 61: 3711-23.

²⁹ SABATER, J; VIÑAS, M; VÁSQUEZ, A; SOLANAS, AM; GANDARILLAS, C; VÁSQUEZ, V; (2001). et al. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos. Revista técnica.* 59: 78-82.

³⁰ NÁPOLES, J. (2005). Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidad de Oriente, Cuba.

³¹ YOUNG, L; CERNIGLIA, C. (1995). *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.* 1 st ed. New York: John Wiley & Sons. P. 629.

³² FONSECA, F. Bioil: (1995). Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar. Tesis en opción al título de Máster. Universidad de la Habana, Cuba.

La fuente de nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas. Los microorganismos la obtienen en forma natural como amonios, nitratos, nitritos, compuestos orgánicos que contienen nitrógeno molecular, además de estar presentes en la materia orgánica como grupos aminos³³. Prácticamente todos los microorganismos emplean el amonio como fuente nitrógeno porque entra directamente al metabolismo³⁴; aun así las formas reducidas (amónicas) son preferibles en términos energéticos. Además, se sabe que el oxígeno de las formas oxidadas (nítricas) sí contribuye a las necesidades implicadas en la degradación de compuestos xenobióticos aunque formas oxidadas no puedan sustituir al oxígeno molecular en la respiración. Existe además (en el campo de la producción de proteína unicelular a partir de hidrocarburos) una amplia documentación que demuestra la importancia fundamental del aporte de oxígeno en la degradación de estos compuestos, muy reducidos y creadores de un ambiente hidrofóbico refractario a la transferencia de este gas.

Estas consideraciones sugieren, pese a la frecuencia de los suplementos amónicos en los ensayos de biorremediación, la conveniencia de las fuentes oxidadas de nitrógeno. Incluso en la opción de potenciar la microbiota natural, tendría menos interés favorecer especies consumidoras preferentes de formas reducidas de nitrógeno, con más dificultades previsibles para prosperar en un ambiente con importantes restricciones a la transferencia de oxígeno³⁵.

³³ NÚÑEZ, R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Cuba.

³⁴ MOAT, AG; FOSTER, JW. (1995). Microbial Physiology. 3rd. ed New York: John Wiley.

³⁵ MURADA, MA; MIRÓN, J; GONZÁLEZ, MP. (1996). Tratamiento microbiológico de la contaminación por petróleo en ambientes marinos. Estudio de su posible optimización. En: Seguimiento de la contaminación producida por el accidente del buque Aegean Sea. Centro de Publicaciones, Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. P. 168-85.

La fuente de fósforo actúa en la formación de los compuestos enzimáticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación. Las fuentes de fósforo más utilizadas en cultivos de bacterias son K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 o mezclas de éstos³⁶.

Se considera que por lo general la adición de nitrógeno y fósforo, tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación del contaminante. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo están en función de la concentración de carbono, con una relación: C:N:P 100:10:1^{31,37}.

Bridé y Bos³⁸ describieron que la concentración de fósforo puede ser más decisiva que la de nitrógeno, lo que no implica que las necesidades de fósforo excedan en términos absolutos a las de nitrógeno. Aunque se asume a veces que parte de las necesidades de nitrógeno pueden cubrirse con los compuestos nitrogenados de los crudos petroleros, se sabe que un amplio grupo de microorganismos accede lentamente a muchas fuentes orgánicas de nitrógeno, y no parece que las presentes en los crudos petroleros constituyan casos favorables³⁷. Otras veces se asumen las necesidades en función de evaluaciones en sustratos naturales, donde el nutriente limitante puede ser precisamente el fósforo. Las conclusiones procedentes de este tipo de enfoque, aun siendo fieles a las condiciones de trabajo de laboratorio, pueden no resultar categóricas.

³⁶ M., Robert; MERCADÉ, E; C., Andrés; ESPUNY, MJ; MANRESA, MA; GUINEA, J. (1991). Optimización de la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Grasas aceites. 42: 1-7.

³⁷ JUNTEAU, P; BISAILLON, JG; LÉPINE, F; RATHEAU, V; BEAUDET, R; VILLEMUR, R. (2003). Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. Biodegradation. 14: 31-40.

³⁸ BRIDIE, A; BOS, J. (1971). Biological degradation of mineral oil in sea water. J Inst Petrol. 57: 270-7.

4.3.2.5 pH: La mineralización de hidrocarburos se ve favorecida a pH próximos a la neutralidad. Existe un pH óptimo para el desarrollo de cada especie microbiana, el cual normalmente se encuentra también cercano a la neutralidad³⁹. La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción/absorción del contaminante e iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácidos, mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino^(23,25). Para la mayoría de las bacterias este valor se mueve entre 6 y 8, para las levaduras entre 4 y 6, y para hongos filamentosos entre 3 y 7.

4.3.2.6 Temperatura: La temperatura es un factor importante en la actividad degradativa si tenemos en cuenta que cada microorganismo tiene un rango de temperatura que garantiza su actividad metabólica. A bajas temperaturas se detiene la actividad microbiana porque se para el transporte de nutrientes y sustancias de desecho a través de la membrana⁴⁰, con un umbral para la degradación significativa de 0 °C⁴¹. Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos^{42,43,44,45}. Aun cuando por encima de los 40 °C ocurre una

³⁹ HUNKELER, D; HÖHENER, P; ZEYER, J. (2002). Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *J Contam Hydrol.* 59(3-4): 231-45.

⁴⁰ WHYTE, LG; HAWARI, J; ZHOU, E; BOUNBONIÉRE, L; INNIS, WE; GREER, CW. (1998). Biodegradation of variable-chain length alkanes at low temperatures by psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl Environ Microbiol.* 64(7): 2578-84.

⁴¹ SIRON, R; PELLETIER, E; BROCHU, C. (1995). Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold sea water. *Arch Environ Contamin Toxicol.* 28: 406-16.

⁴² MACCORMACK, WP; FRAILE, ER. (1997). Characterization of a hydrocarbon degrading psychrophilic Antarctic Bacterium. *Antarct Sci.* 9: 150-5.

⁴³ MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; (1999). Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J. Chem Technol Biotechnol.* 74: 381-9.

⁴⁴ BORDENAVE, S; GONI-URRIZA, MS; CAUMETTE, P; DURÁN, R. (2007). Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 73: 6089-97.

⁴⁵ KIM, JS; CROWLEY, D. (2007). Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. *Appl Environ Microbiol.* 73: 4579-91.

disminución de la actividad microbiana por desnaturalización de las enzimas⁴⁶, en las zonas litorales de regiones semiáridas se han encontrado microorganismos termófilos, que poseen un determinado potencial para la transformación de hidrocarburos⁴⁷. Las temperaturas también afectan la viscosidad y solubilidad de los hidrocarburos e intervienen en la volatilización de los compuestos de bajo peso molecular. Comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 y 45 °C (rango de temperatura de crecimiento de los microorganismos mesófilos⁴⁸; sin embargo, se ha llegado al consenso de que la temperatura óptima en los procesos biodegradativos está en el rango de 30-40 °C. Claro está que existen factores ambientales desfavorables para mantener este rango, teniendo en cuenta las fluctuaciones entre el día y la noche y las estaciones anuales, por lo que existen métodos que permiten controlar estas fluctuaciones⁴⁹. Esto significa que la biorremediación es más eficaz en los meses de primavera y verano. En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación en lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas⁵⁰.

4.3.2.7 Aceptores de Electrones. Disponibilidad de Oxígeno: Las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria constituyen el principio bioquímico de la biorremediación⁵¹. Los aceptores de electrones generalmente utilizados por los microorganismos son oxígeno (biodegradación aerobia), nitrato, hierro (III), sulfato y dióxido de carbono (biodegradación anaerobia).

⁴⁶ SEMPLE, KT; REID, BJ; FERMOR, TR. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ Pollut.* 112: 269-83.

⁴⁷ CHEN, CI; TAYLOR, RT. (1997). Batch and fedbatch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47: 726-33.

⁴⁸ FEITKENHAUER, H; MÜLLER, R; MÄRKLE, H. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation.* 14: 367-72.

⁴⁹ POLLARD, SJT; HENEDAY, SE; FEDORAK, PM. (1994). Bioremediation of petroleum-and creosote-contaminated soils; a review of constraints. *Waste Manage Res.* 12: 173-94.

⁵⁰ SCHULTZ, H. Using. (1996). Bioremediation to help clean-up the Exxon Valdez oil spill. Dec 2 (cited 2009 Apr 14). Available from: gwyn.tux.org/pub/tux/hschultz/paper.doc.

⁵¹ HÄGGBLÖM, M; VALO, R. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: Young L, Cerniglia C, editors. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York: John Wiley & Sons, P. 389-434.

En la degradación aerobia lo más común es la oxidación a través de oxigenasas o intermediarios que incorporan fácilmente al ciclo de Krebs, tal es el caso de catecol, el protocatecuato y el gentisato (anillos aromáticos) y ácidos grasos en el caso de las cadenas lineales. El proceso de degradación anaerobia ocurre en tres etapas: activación del sustrato (carboxilaciones, hidroxilaciones anaerobias o formación de tio-ésteres del correspondiente ácido aromático con el acetil-CoA); ataque enzimático (mediante reductasas) de los intermediarios activados, y conversión de los compuestos no cíclicos (como resultado de la ruptura del anillo) en metabolitos centrales²³.

La eficiencia de los procesos de biodegradación aeróbicos depende del grado de solubilidad del oxígeno. Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias y hongos implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, que requieren oxígeno molecular. Estequiométricamente, deben requerirse aproximadamente 3 libras de oxígeno para convertir una libra de hidrocarburo a dióxido de carbono y agua, por lo que las primeras aproximaciones de requerimientos de oxígeno están típicamente basadas en la relación 3:1. Normalmente, no existen condiciones limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos. Sin embargo, con la profundidad, el sistema se vuelve anóxico. La disponibilidad de oxígeno generalmente es un factor limitante en la degradación de los hidrocarburos del petróleo^{52,53}, ya que el funcionamiento de los microorganismos es menos eficiente bajo condiciones anaeróbicas^{55,54}. Tradicionalmente se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y que, por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, investigaciones posteriores han puesto de

⁵² DAVIS, JB. (1967). *Petroleum Microbiology*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. P. 34-536.

⁵³ SARUBBI, AJ. Biorremediación. Aspectos de importancia (cited 2004 Nov 23). Available from: <http://www.aidisar.org/index.html>. Fecha de consulta: 9 de Enero de 2013.

⁵⁴ OLIZYM. Productos de biotecnología de última generación para la biorremediación acelerada de los derivados del petróleo. 2004 Sep (cited 2010 Sep 7), Available from: <http://ecobiotec.com/Spainintro.html>. Fecha de consulta: 8 de Enero de 2013.

manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación^{55,56}.

4.3.2.8 Presión: Contaminantes con densidades mayores a la del agua de mar pueden hundirse hasta llegar al fondo marino, donde la presión hidrostática es elevada. La combinación de presión elevada y baja temperatura en el océano profundo provoca una baja actividad microbiana. Por ejemplo, la tasa de biodegradación de un consorcio aislado del fondo marino era unas diez veces inferior bajo condiciones de océano profundo que a presión ambiental³.

4.3.2.9 Metales Pesados: Altas concentraciones de metales pesados pueden inhabilitar completamente una población microbiana al inhibir parte de la actividad metabólica y de la división celular, provocando desnaturalización de proteínas y alteraciones en la membrana celular. Los microorganismos también pueden desarrollar resistencia o tolerancia a elevados niveles de metales⁹. Los metales pesados son difícilmente removibles de los ambientes contaminados, ya que por lo general no pueden ser degradados biológicamente. El zinc, cobre, níquel y cromo son metales esenciales o micronutrientes beneficiosos para microorganismos, plantas y animales⁶⁰, mientras que otros como el cadmio, mercurio y plomo no tienen funciones fisiológicas y/o biológicas conocidas⁵⁷.

4.3.2.10 Población Microbiana: Interacciones y Concentración: El factor determinante en el proceso de biodegradación es la población microbiana, que debe estar adaptada a utilizar el compuesto contaminante y poseer las enzimas

⁵⁵ VAN HAMME, JD; SINGH A, Ward OP. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4): 503-49.

⁵⁶ HARAYAMA, S; KASAI, Y; HARA, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol.* 15(3): 205-14.

⁵⁷ GADD, GM. (1992). Metals and microorganism: a problem of definition. *FEMS Microbiol Lett.* 100: 197-204.

necesarias para catalizar las reacciones de degradación^{23,34,58}. Al estar el petróleo constituido por numerosos compuestos químicos, ningún microorganismo puede degradar por sí solo todos sus constituyentes, sino que necesita agruparse con otros formando poblaciones mixtas o consorcios microbianos. Los consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático del consorcio es más completa y por tanto es más probable la degradación de las mezclas complejas de hidrocarburos presentes en un área dañada^{32,62}. Además, se establece una compleja interacción entre las especies microbianas: Algunas atacan a un compuesto y otras culminan su degradación, por lo que generalmente se consideran más eficientes que los cultivos puros^{24,29}. Los consumidores primarios inician el proceso degradativo y los consumidores secundarios se encargan de degradar completamente los productos generados por éstos. También pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante co-metabolismo y produciendo intercambio de material genético^{23,5960}. La adaptación de una comunidad microbiana a un contaminante determinado puede ocurrir por tres mecanismos: inducción o represión de niveles de enzimas específicas, cambios genéticos que deriven en nuevas potencialidades metabólicas y/o enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar un compuesto de interés²³.

Dependiendo de la concentración de los microorganismos y del tipo de hidrocarburo contaminante, así como de la velocidad de degradación propia por el microorganismo, se estiman las concentraciones óptimas del microorganismo para alcanzar la mayor velocidad de degradación posible²⁴.

⁵⁸ VIÑAS, M; SABATÉ, J; ESPUNY, MJ; SOLANAS, AM. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 71: 7008-18.

⁵⁹ M., Alexander. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. 2nd ed. New York: Academic Press.

⁶⁰ LAGREGA, MD; BUCKINGHAM, PL; EVANS, JC; (2001). *Environmental Resources Management group. Hazardous waste management*. 2nd ed Boston: McGraw – Hill; P. 7-23.

4.3.3 Microorganismos Competentes. Un extenso rango de microorganismos utiliza diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sin embargo, se localizan en bajas concentraciones en áreas no contaminadas y su población aumenta en ambientes sometidos a impactos crónicos del contaminante⁶¹. De todos los organismos vivos que se utilizan en las tecnologías de biorremediación, las bacterias heterótrofas aerobias conforman el grupo mejor estudiado. Los microorganismos anaerobios por su parte son menos flexibles a adaptarse a la disponibilidad de sustratos y son menos tolerantes a la presencia de metales pesados, por lo que su papel en la biodegradación se encuentra limitado⁵¹. Las bacterias constituyen un grupo microbiano de gran importancia debido a la extensa variedad de géneros y especies, y a la versatilidad metabólica que poseen.

Un gran número de bacterias metabolizan compuestos xenobióticos como fuente de carbono en cultivos puros⁶².

Desde los estudios pioneros de ZoBell⁶³ en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos^{20,57,64,65}. Muchas de estas bacterias, tales como *Alcalinivorax*, o *Planococcus*, usan un número limitado de fuentes de carbono, preferentemente utilizan hidrocarburos de petróleo, y podrían considerarse como especialistas^{66, 67, 68, 69, 70}. No obstante, también se han aislado bacterias que no

⁶¹ MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER J., Brock. (2004). Biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid: Prentice Hall Iberia (Madrid). P. 986.

⁶² ABALOS, A; VIÑAS, M; SABATÉ, J; MANRESA, MA; SOLANAS, AM. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation. 15(4): 249-60.

⁶³ ZOBELL, CE. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol Rev. 10:1-49.

⁶⁴ LEAHY, JG, COLWELL, RR. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev. 54(3): 305-15.

⁶⁵ WATANABE, K. (2001). Microorganism relevant to bioremediation. Curr Opin Biotechnol. 12(3): 237-41.

⁶⁶ DYKSTERHOUSE, SE; GRAY, JP; HERWIG, RP; LARA, JC; STALEY, JT. (1995). *Cyclocasticus pugetii* gen. nov., sp. Nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. Int J Syst Bacteriol. 45(1): 116-23.

presentan está marcada especialización, como *Marinobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* o *Geobacillus*^{71,72,73,74}.

La tabla 2 lista microorganismos descritos como degradadores de diferentes compuestos de hidrocarburos del petróleo.

Tabla 2. Géneros de microorganismos con potencialidades de degradar hidrocarburos.

Grupo	Género	
Bacterias		<i>Lucila sp.</i>
	<i>Acinotobacter sp.</i>	<i>Marinobacter sp.</i>
	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Metylophaga sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Microscilla sp.</i>
	<i>Aquaspirillum sp.</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
	<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Neissera sp.</i>
	<i>Azospirillum sp.</i>	<i>Nocardia sp.</i>
	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Novospingobium sp.</i>
	<i>Beggiatoa sp.</i>	<i>Oleiphilus sp.</i>
	<i>Cycloclasticus sp.</i>	<i>Planococcus sp.</i>
	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Porpyrobactes</i>
	<i>Desulfotalea sp.</i>	<i>Pseudonomas sp.</i>
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	<i>Rhodoplanes sp.</i>

⁶⁷ ENGELHARDT, MA; DALY SWANNELL, RP; HEAD, IM. (2001). Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. Nov. J Appl Microbiol. 90(2): 237-47.

⁶⁸ GOLYSHIN, PN; CHERNIKOVA, TN; ABRAHAM, WR; LÜNSDORF, H; TIMMIS, KN; YAKIMOV, MM. (2002). *Oleiphilaceae* fam. Nov. to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. Nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52(Pt 3): 901-11.

⁶⁹ YAKIMOV, MM; GIULIANO, L; GENTILE, G; CRISAFI, E; CHERNIKOVA, TN; ABRAHAM, WR; et al. (2003). *Oleispira antarctica* gen. Nov., sp. Nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. Int J Syst Evol Microbiol. 53(Pt 3): 779-85.

⁷⁰ YAKIMOV, MM; GOLYSHIN, PN; LANG, S; MOORE, ER; ABRAHAM, WR; LÜNSDORF, H; et al. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. Nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. Int J Syst Bacteriol. 48 Pt 2: 339-48.

⁷¹ GAUTHIER, MJ; LAFAY, B; CHRISTEN, R; FERNANDEZ, L; ACQUAVIVA, M; BONIN, P; et al. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. Int J Syst Bacteriol. 42(4): 568-76.

⁷² GILEWICZ, M; NI`MATUZHROH, NADALIG, T, BUDZINSKI, H; DIUMENQ, P; MICHOTÉY, V. et al. (1997). Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methyphenanthrene. Appl Microbiol Biotechnol. 48(4): 528-33.

⁷³ MAUGERI, TL; GUGLIANDOLO, C; CACCAMO, D; STACKEBRANDT, E. (2002). Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. Syst Appl Microbiol. 25(3): 450-5.

⁷⁴ ZHUANG, WQ; TAY, JH; MASZENAN, AM; TAY, ST. (2003). Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. Water Sci Technol. 47(1): 303-8.

Grupo	Género	
	<i>Erythrobacter sp.</i>	<i>Rubrivivax sp.</i>
	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>
	<i>Geobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
	<i>Geobacter sp.</i>	<i>Sulfitobacter sp.</i>
	<i>Halochromatium sp.</i>	<i>Thiolcalovibrio</i>
	<i>Halomonas sp.</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>
Hongos	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Phanaerocheate sp.</i>
	<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Plerotus sp.</i>
	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
	<i>Fusarium sp.</i>	
Levaduras	<i>Candida sp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
Algas	<i>Chlamydomonas sp.</i>	<i>Dunaliella sp.</i>
	<i>Chorella sp.</i>	

Fuente: Centro de investigación del Petróleo CEINPET, la Habana, Cuba, 2011.

Se ha enfatizado en la importancia de emplear para la biorremediación de ecosistemas marinos a poblaciones microbianas autóctonas de las zonas contaminadas, puesto que presentan una mayor resistencia al lavado de las superficies que producen los ciclos de mareas⁵⁷.

La literatura disponible sobre bacterias ha sido documentada desde 1946, y excede a la literatura disponible para hongos⁷⁵. Esto parece sugerir que la asimilación directa de hidrocarburos es poco frecuente en hongos. No obstante, diversos trabajos han demostrado que los hongos son capaces de utilizar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía^{79,76}.

4.3.4 Sistemas Bentónicos Estratificados: Los tapetes microbianos son ecosistemas naturales donde microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos se agrupan en unos pocos milímetros de espesor. En ellos pueden establecerse complejas comunidades microbianas que se estratifican en profundidad, dependiendo de los abruptos gradientes de luz, oxígeno, sulfuro de

⁷⁵ VIGUERAS, JG. (2007). Estudio de la respuesta fisiológica de hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos de diferentes frados de hidrofobicidad. Tesis para la obtención del grado de Master en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

⁷⁶ PRENAFETA – BOLDÚ, FX; SUMMERBELL, R; SYBREN DE HOOG, G. (2006). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev. 30(1): 109-30.

hidrógeno y potencial REDOX que se generan, y de su propia fisiología; de manera que a nivel macroscópico, pueden observarse una serie de laminaciones de diferentes colores en función de la composición taxonómica que presentan^{77,78,79}. Las capas superficiales consisten principalmente en poblaciones fototróficas oxigénicas de cianobacterias y algas eucariotas. En dichas laminaciones las bacterias heterotróficas consumen materia orgánica y oxígeno, y por debajo de ellas se sitúan las capas anaeróbicas dominadas por bacterias anaeróbicas fototróficas y heterotróficas si las condiciones son adecuadas.

Este tipo de comunidades, debido a su estructura física, son capaces de soportar perturbaciones tales como un episodio de contaminación ocasionado por un derrame de petróleo. Tanto es así que numerosos estudios han puesto de manifiesto que los tapetes microbianos no solo se desarrollan en ambientes marinos no contaminados; sino que también se encuentran en lugares sujetos a una contaminación crónica. La idea de utilizar los tapetes microbianos para la biorrecuperación de las zonas litorales contaminadas surgió a raíz de diversas observaciones realizadas durante la guerra del Golfo en 1991. Dichos ecosistemas rápidamente cubrieron extensas áreas severamente contaminadas con petróleo y en pocos meses se observó la degradación de hidrocarburos, tanto aeróbica como anaeróbicamente. Diferentes investigaciones aportan evidencias sobre la degradación de hidrocarburos por cianobacterias⁸⁰. Además, se ha visto que tapetes microbianos localizados en zonas litorales contaminadas tienen la capacidad de degradar petróleo, aunque no se han identificado las poblaciones

⁷⁷ COHEN, Y; ROSENBERG, E, editors. (1989). Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities. Washington DC: American Society for Microbiology.

⁷⁸ COHEN, Y; CASTENHOLZ, RW; HALVORSON, HO; editors. (1984). Microbial mats. Stromatolites. New York: Alan R Liss Inc.

⁷⁹ STAL, LJ; CAUMETTE, P; editors. (1994). Microbial mats: structure, development and environmental significance (NATO ASI Series/Ecological Sciences). Berlín: Springer-Verlag.

⁸⁰ RAGHUKUMAR, C; VIPPARTY, V; DAVID, JJ; CHANDRAMOHAN, D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 57(3): 433-6.

responsables de la metabolización de los compuestos^{81, 82}. No hay duda de que las cianobacterias tienen un papel crucial en los tapetes, ya que son los responsables del establecimiento de los gradientes de oxígeno y de la síntesis de materia orgánica que utilizan las bacterias heterotróficas. A pesar de ello, no está claro si son las cianobacterias o las bacterias heterotróficas las responsables directas de la biodegradación de los componentes del petróleo. Diversas investigaciones postulan que las cianobacterias tienen la capacidad de oxidar hidrocarburos. Al-Hasan y cols.⁸³, mostraron que cultivos no axénicos de *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corium* aislados a partir de sedimentos contaminados del Golfo de Arabia eran capaces de degradar n-alcanos. Estudios en *Oscillatoria sp.* y *Agmenellum quadruplicatum* demostraron su capacidad de oxidar naftaleno^{84, 85}. Además, hay otros trabajos que muestran la capacidad de muchas otras cepas de degradar diversos componentes del petróleo^{86, 87, 88}. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios realizados con cianobacterias no se precisa si los cultivos utilizados son axénicos. En este sentido, se han realizado diversas investigaciones donde las bacterias heterotróficas asociadas a las cianobacterias son las responsables de la biodegradación. Estos autores postulan que las cianobacterias por sí mismas no serían las responsables directas de la

⁸¹ ABED, RM; SAFI, NM; KÖSTER, J; DE BEER, D; EL-NAHHAL, Y; RULLKÖTTER, J; et al. (1998). Microbial diversity of near alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60(2): 329-34.

⁸² GRÖTZSCHEL, S. KÖSTER, J; ABED, RM; DE BEER, D. (2002). Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation.* 13(4): 273-83.

⁸³ AL-HASAN, RH; AL-BADER, DA; SORKHOH, NA; RADWAN, SS. (1998). Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Mar Biol.* 130: 521-7.

⁸⁴ CERNIGLIA, CE; GIBSON, DT; VAN BAALEN, C. (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 88(1):50-8.

⁸⁵ CERNIGLIA, CE; GIBSON, DT; VAN BAALEN, C. (1980). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J Gen Microbiol.* 116: 495-500.

⁸⁶ YAN, GA; JIANG, JW; WU, G; YAN, X. (1998). Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60(2): 329-34.

⁸⁷ RADWAN, SS; AL-HASSAN, RH. (2000). Oil pollution and cyanobacteria. In: Whitton BA, Potts M, editors. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. P. 307-19.

⁸⁸ MANSY, AE; EL-BESTAWY, E. (2002). Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. *World J Microbiol Biotechnol.* 18: 125-31.

degradación de los componentes del petróleo, pero pudieran jugar un papel esencial indirecto soportando el crecimiento y la actividad de los verdaderos degradadores⁸⁹.

4.3.5 Bioproductos y Fertilizantes: Con el propósito de ser empleados en procesos de biorremediación de ecosistemas se han formulado diversos bioproductos y fertilizantes de origen y composición variados. Los fertilizantes, cuyas fórmulas contienen nutrientes (nitrógenos y fósforo esencialmente) son empleados como bioestimuladores de la microbiota autóctona; el empleo de estos se recomienda luego de confirmar que la población microbiana autóctona posee toda la batería enzimática para degradar al hidrocarburo. La composición de los bioproductos se basa en microorganismos y nutrientes, y se emplean en ecosistemas donde la población endógena no tiene la posibilidad de degradar todos los hidrocarburos, considerándose un biorrefuerzo. Estos productos rara vez no cuentan con nutrientes, dada la necesidad de potenciar el crecimiento tanto de la población endógena como exógena que se introduce; otros poseen en su formulación un surfactante producido por un microorganismo, necesario para la disminución de la tensión interfacial agua-petróleo y por ende aumentar la biodisponibilidad del contaminante. Estos productos tienen funciones bioaumentadoras y/o bioestimuladoras. La aplicación de estos productos no constituye una contaminación adicional, pues los microorganismos los consumen por completo (incluyendo la fuente de carbono contaminante) y posteriormente mueren.

4.4 MARCO LEGAL

Actualmente en nuestro país la reglamentación y estandarización de métodos y procedimientos específicos para el tratamiento y disposición de residuos

⁸⁹ ABED, RMM; KÖSTER, J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *Int Biodeterior Biodegr.* 55:29-37.

contaminados con hidrocarburos son incipientes. Sin embargo, la ejecución de las prácticas de biorremediación, en materia de protección ambiental, está sujeta a las disposiciones legales vigentes.

➤ **Constitución Política de Colombia.** El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. En la Constitución Nacional se presentan 17 artículos específicos, relacionados con la protección, conservación, control y mejoramiento de los recursos naturales: 49, 67, 79, 80, 81, 82, 88, 95, 277, 313, 317, 330, 331, 334; de forma específica sobre el uso del suelo se menciona en los siguientes artículos: 360, 361 y 366, a los cuales se refiere la Corte Constitucional.

➤ **Ley 99 de 1993.** Ley ambiental nacional, por la cual se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reordena el Sector Público encargado de la gestión, conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental (SINA) y se dictan otras disposiciones.

Entre sus disposiciones prohíbe descargar, sin autorización, los residuos, basuras y desperdicios y, en general, de desechos que deterioren los suelos o causen daño o molestia a individuos o núcleos humanos. De igual forma menciona que para la disposición o procesamiento final de las basuras se utilizarán, preferiblemente, los medios que permitan:

- Evitar el deterioro del ambiente y de la salud humana
- Reutilizar sus componentes
- Producir nuevos bienes
- Restaurar o mejorar los suelos.

➤ **Ley 23 de 1973.** Por la cual se conceden facultades extraordinarias al Presidente de la República para expedir el Código de Recursos Naturales, protección al medio ambiente y se dictan otras disposiciones.

Entre los aspectos relacionados con los recursos naturales considerados en esta ley, se tiene:

Prevención y control de la contaminación del medio ambiente, mejoramiento, conservación y restauración de los recursos naturales renovables.

➤ **Decreto 321 de 1999.** Por el cual se adopta el Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas.

➤ **Decreto 2811 de 1974.** Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente, en sus artículos relacionados específicamente con el recurso suelo.

➤ **Protocolo Louisiana 29B.** Por el cual se presentan los niveles de metales y TPH aceptados para estabilización de lodos y suelos contaminados

Tabla 3. Protocolo Louisiana 29-B

PARÁMETROS	VALOR
pH	6.0 – 9.0
Conductividad eléctrica	< 4.0 ohm/cm
Relación de absorción de sodio	< 12.0
Porcentaje de sodio intercambiable	< 15.0%
Grasas y aceites	≤ 1.0%
Arsénico	10.0 mg/Kg
Bario	20000 mg/Kg
Cadmio	10.0 mg/Kg
Plomo	500.0 mg/Kg
Mercurio	500.0 mg/Kg

PARÁMETROS	VALOR
Selenio	10.0 mg/Kg
Plata	200.0 mg/Kg
Zinc	500.0 mg/Kg

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 UBICACIÓN

La Ciudad de Barrancabermeja está localizada en el departamento de Santander del Sur, con coordenadas geográficas 7° 3' 48" de latitud Norte y 73° 51' 50" de longitud Oeste de Greenwich, distanciada de su capital Bucaramanga a 125 Km.

Sus límites son: Norte, Municipio de Puerto Wilches, Sur, Municipio de Puerto Parra, Simacota y San Vicente del Chucuri, Occidente, Municipio de San Vicente y Oriente, el Rio Magdalena.

Su altura sobre el nivel del Mar es de 75.94 m con un brillo solar promedio mensual de 178 horas, evaporación promedio mensual 141 mm, humedad relativa 80 %, precipitación promedio mensual de 272.25 mm, lluvias de 16.8 mm al mes y con una temperatura promedio de 28°C.

Figura 4. Panorámica de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja.



Fuente: Planeación Municipal Barrancabermeja 2010

5.1.1 Área objeto de estudio. El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja, en la antigua área de tratamiento biológico (ATB), con una extensión de once (11) hectáreas y emplazada entre las coordenadas geográficas relacionadas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Coordenadas ATB

COORDENADAS ATB		
PUNTO	NORTE	OESTE
1	7° 4' 50"	73° 53' 12"
2	7° 4' 53"	73° 53' 7"
3	7° 4' 43"	73° 53' 2"
4	7° 4' 40"	73° 53' 08"

Fuente: Autor del proyecto

Las condiciones medioambientales en las que se desarrolló el proyecto fueron las propicias de la zona. Con una temperatura ambiental de 28° C, en las horas de la mañana, que en las horas de la tarde puede llegar a los 35° C y una humedad relativa de 80%.

De igual forma el área de tratamiento biológico (ATB) presenta los siguientes límites:

Norte: Puesto fluvial avanzado No 31 de la Armada Nacional

Sur: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Industriales

Este: Escombrera y Relleno Sanitario

Oeste: Antigua estación de GLP

Figura 5. Área de tratamiento biológico (ATB)



Fuente: Autor del proyecto

5.2 METODOLOGÍA

Este trabajo describe los diversos procesos y elementos utilizados para desarrollar una biorremediación microbiana estimulada a un suelo contaminado con hidrocarburo y las actividades de seguimiento y control desarrolladas para verificar la eficiencia del proceso.

Los resultados obtenidos durante el proceso de biorremediación fueron interpretados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el software SPSS, por medio del cual se estableció la variable independiente: Tiempo medido en semanas; variables dependientes: Porcentaje de Hidrocarburo, pH y variable controlada durante el proceso: Humedad. Así mismo se utilizó la técnica de regresión para obtener un modelo de biorremediación con respecto al tiempo.

Por lo tanto, la respuesta del proceso de biodegradación indicará si la eficiencia del proceso en cada una de las muestras presenta el mismo comportamiento durante las 10 semanas del tratamiento sin presentar una variación significativa o sí por el contrario al menos en algunas de las muestras en estudio la eficiencia es diferente. La respuesta de la prueba piloto, servirá para evaluar la factibilidad técnica de llevar a cabo la biorremediación a campo.

Es importante resaltar que el suelo utilizado para esta investigación es el existente en el Área de Tratamiento Biológico (ATB), que a lo largo de su existencia recibió todos los lodos aceitosos que en la operación normal de la Refinería generaron limpiezas de tanques, estructuras, limpiezas de suelos impregnados con crudo por emergencias sucedidas y los lodos aceitosos generados en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales. Por ende, el suelo objeto de estudio es resultado de la mezcla de lodos remanentes mezclados con tierra limpia durante las actividades de biorremediación llevadas a cabo anteriormente en esta área.

5.2.1 Desarrollo Experimental

5.2.1.1 Muestreo del suelo: Teniendo en cuenta que el área presenta tres (3) zonas con puntos calientes o de mayor concentración de hidrocarburo (% de Hidrocarburo), se procedió a tomar como referencia para el presente estudio, el suelo que presenta esta consideración, en razón a que esta circunstancia representa el escenario más crítico para el proceso de biorremediación.

Para lo anterior, se extrajo un (1) m³ de suelo de cada uno de los puntos calientes a profundidades de 1, 2 y 3 metros, mediante la utilización de una retrollanta que posibilitó la excavación hasta dichas profundidades. El material extraído y seleccionado de cada una de las profundidades fue acopiado a un costado de

cada uno de los puntos de excavación y posteriormente mezclados para obtener una muestra compuesta.

Una vez homogeneizado el material extraído de cada uno de los puntos calientes, se procedió con la ayuda de una góndola halada por una camioneta al traslado hasta un área de acopio en tres (3) montones bien diferenciados y protegidos de la intemperie.

Con el fin de evitar alterar las concentraciones de hidrocarburo presentes en cada uno de los puntos calientes durante la actividad de toma de muestras de suelo, fue necesario realizar la extracción en forma secuencial y ascendente con relación a la concentración de hidrocarburo, iniciando primero por el punto caliente que presumiblemente presentaba menor concentración de hidrocarburo y continuando con el siguiente punto en ese orden hasta abarcar la toma de muestra de suelo en los tres puntos calientes. Para lo anterior se hizo necesario limpiar lo mejor posible el balde de la retrollanta, antes de pasar de un punto a otro.

De igual forma, durante el proceso de extracción de suelo fue necesario extraer piedras de gran tamaño, palos o cualquier otro material diferente a suelo, así como las coordenadas del área, profundidad de toma de la muestra y condiciones climatológicas durante la toma y la noche anterior.

Figura 6. Limpieza mecánica del área y toma de muestras



Fuente: Autor del proyecto

5.2.1.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del suelo contaminado

con Hidrocarburo: La caracterización del suelo presente en el área objeto de estudio permitió determinar las características fisicoquímicas y microbiológicas para la implementación del proceso de biorremediación. Esta caracterización fue realizada a una muestra compuesta obtenida de la mezcla homogénea de pequeñas cantidades de suelo extraído del material acopiado en cada uno de los montones de material de estudio, correspondientes a los puntos calientes existentes en el área del ATB, formando una muestra compuesta. La muestra compuesta de suelo contaminado fue analizada en un laboratorio certificado (laboratorio de servicios industriales UIS) tomando como referencia el protocolo de Louisiana 29B. El método empleado en laboratorio para la determinación de hidrocarburos totales fue el de Extracción Soxhlet/Gravimétrico y en campo se determinó por medio de equipo Kit Retorta.

Durante la toma de la muestra se tuvo especial cuidado con las herramientas y elementos usados para la captura de la muestra, para lo cual se utilizaron guantes de nitrilo, los cuales fueron cambiados para la toma de la muestra de cada sitio, y así evitar contaminación cruzada. Así mismo se tuvo especial cuidado con el sellado de las bolsas, para lo cual se selló la boca de las bolsas usando la cinta transparente. Finalmente, las muestras fueron rotuladas con el nombre del punto donde fueron tomadas, la hora y tipo de muestra. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de servicios industriales UIS, en una cava de icopor, debidamente refrigerados con hielo.

5.2.1.3 Variables evaluadas durante el proceso de biorremediación microbiana

Hidrocarburos totales del petróleo. Se valoró la concentración o masa de componentes de hidrocarburos del petróleo presentes en las muestras de suelo tomadas; requeridas a fin de evaluar la evolución del proceso de biorremediación.

(Seguimiento de la remediación microbiana de hidrocarburos en el suelo, Chikere CB, 2011)

- **Procedimiento de Campo. Equipo Kit Retorta.** Este equipo de campo provee un medio para la separación y medición de los volúmenes de agua, aceite y sólidos contenidos en una muestra de fluidos de perforación. Se calienta un volumen conocido de muestra, hasta vaporización de los componentes líquidos, los cuales son luego condensados y colectados en una probeta graduada. Los volúmenes líquidos se determinan de la lectura de las fases oleosa y acuosa en la probeta graduada, lo cual permite determinar la concentración de hidrocarburos en campo.

Pasos

- ❖ Se empaca un rollo de lana de acero (brillo fino) dentro de la cámara, hasta antes de la rosca interna de la cámara. Se usó sólo la cantidad suficiente de lana de acero para prevenir una ebullición sobre los sólidos dentro del receptáculo de líquido. (Ver Figura 7)

Figura 7. Preparativo de la cámara de la retorta para su uso



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Usando la espátula, lentamente se llena el receptáculo de la retorta con la muestra. Se golpea ligeramente los costados del receptáculo de la muestra para expeler cualquier aire presente, y se coloca la tapa sobre el receptáculo. Se rota la tapa para obtener un apropiado calce. Se limpia el exceso de suelo y cualquier sólido que se halla acumulado en el orificio de la tapa. (Ver Figura 8).

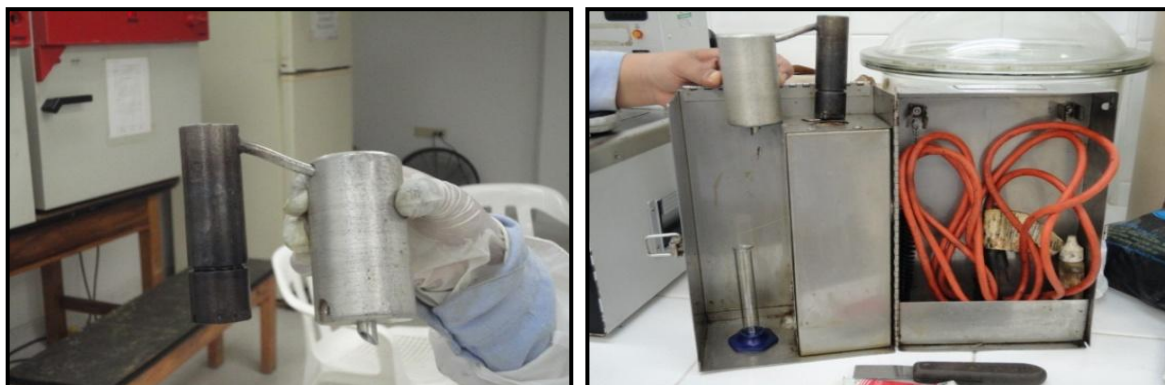
Figura 8. Adición de la muestra en el receptáculo



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Se lubrica la rosca completa del recipiente de muestra, con una ligera capa de Never-Seez® (crema lubricante). Esto prevendrá la pérdida de vapores a través de la rosca y también facilitará el desarmado del equipo al final del ensayo. (Ver Figura 7).
- ❖ Se ajusta manualmente el receptáculo de retorta en la cámara y se conecta el ensamble al condensador. Se debe tener cuidado de no sobreajustar y dañar las roscas en el condensador.
- ❖ Se coloca la cámara dentro de la camisa de calentamiento y se cierra la tapa de aislación (Ver Figura 8).

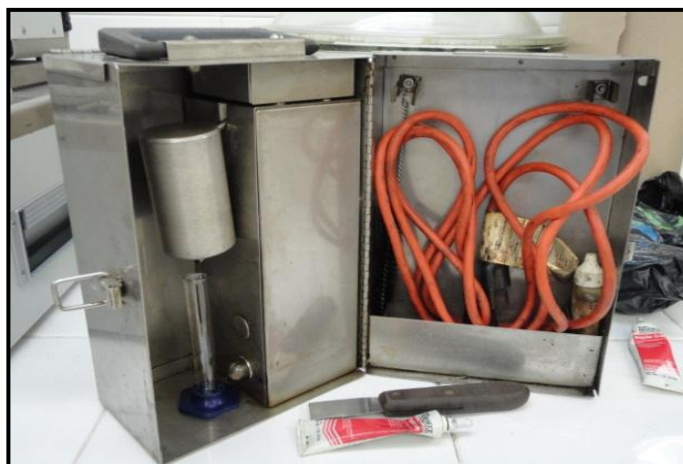
Figura 9. Ubicación de la cámara y el condensador a la camisa de calentamiento



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Se ubica el receptáculo para líquido, limpio y seco, debajo del tubo de descarga del condensador. La longitud de este receptáculo podría requerir que este se encuentre en ángulo con respecto a la retorta o soportado de los lados del borde de la mesa de trabajo (Ver Figura 9).

Figura 10. Ubicación del receptáculo para líquido en la camisa de calentamiento



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Se conecta la retorta y se observa que el líquido que sale del condensador. Continúe calentando por 10 minutos más allá del tiempo transcurrido, luego de que no se ha recolectado más condensado. (Ver Figura 11)

Figura 11. Funcionamiento de la retorta.



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Se retira el recolector de líquidos y se deja hasta que se enfríe. Luego se lee y se registran los volúmenes (o porcentaje volumétrico de líquido total de aceite y agua) una vez este ha sido enfriado a temperatura ambiente. (Ver Figura 12)

Figura 12. Lectura del resultado de la retorta



Fuente: Autor del proyecto

- ❖ Por último, se desconecta la retorta y se permite que se enfríe, previo a su limpieza. No se usa agua fría para tratar de enfriar rápidamente la cámara.

- **Procedimiento de Laboratorio. Extracción Soxhlet/Gravimetrico**

Este método consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el suelo, mediante la acción de un solvente orgánico volátil apropiado, que es reflujaado a través de la muestra varias veces durante un tiempo determinado.

Pasos

- 1) Se coloca de 5 a 10 g de suelo seco y finamente molido en un cartucho de celulosa o fibra de vidrio.
- 2) Adición de sulfato de sodio anhidro en una relación suelo:sulfato 1:1 y mezclar.
- 3) Se coloca cada cartucho conteniendo las muestras dentro de la camisa o columna extractora del equipo Soxhlet.
- 4) Adición de 125 ± 5 ml de diclorometano en el matraz de bola y colocar suficientes perlas de ebullición para evitar la proyección del solvente al calentarse.
- 5) Se ensambla el equipo Soxhlet e iniciar calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 45°C .
- 6) Se mantiene el reflujo en estas condiciones durante 8 horas, de tal manera que se efectúen entre 6 y 8 reflujos por hora, lo que permitirá la liberación de los analitos.
- 7) Después de 8 horas, el extracto orgánico contendrá todos los hidrocarburos solubles en diclorometano. Se pasar el matraz bola a un rotoevaporador y concentrar el extracto orgánico a sequedad.
- 8) Recuperación del concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación

Después de realizar la extracción y/o fraccionamiento del hidrocarburo contenido en la muestra de suelo, estos se cuantifican por el método gravimétrico para la cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo.

Pasos

- 1) Se pone a peso constante el recipiente donde se colocará el extracto orgánico obtenido (matraz de bola para la extracción, vial o tubo de vidrio) (ver sección 5.2). Colocar el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas. Sacar este material y colocarlo en un desecador para que se enfríe. Pesarse el recipiente, después colocarlo otra vez dentro de la estufa y volver a realizar el procedimiento hasta que el peso no cambie. Anotar el peso del recipiente (RA).
- 2) Una vez que el extracto orgánico obtenido esté en un matraz de bola, tubo o vial de vidrio a peso constante, se procede a la evaporación total del solvente (diclorometano) en un rotoevaporador 740 ± 50 mbar y 45°C hasta sequedad.
- 3) Se pesa nuevamente el matraz, vial o tubo con el extracto libre de solvente. Anotar el peso (RB).

➤ **pH.** Es un factor químico importante que influye en el proceso de biodegradación, ya que afecta principalmente a las poblaciones microbianas y la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía, aunque los microorganismos se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas, tienen un determinado rango de tolerancia. A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta.

El rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7,4–7,8.

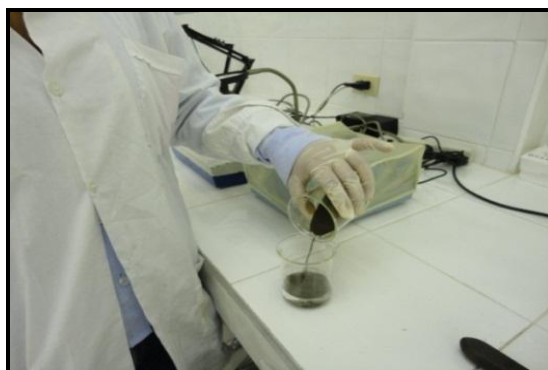
• **Procedimiento de Laboratorio. Método Potenciométrico.** Se llevó a cabo por medio del pH-metro JENCO, de la siguiente manera:

- Conectar el equipo a la línea de voltaje requerida (110-115 V)
- Verificar que la sonda esté conectada al medidor

- Encienda el equipo y verifique calibración midiendo una de las soluciones tampón, preferiblemente la de pH 7,0.
- Sumerja el electrodo en la muestra y oprima el botón de medición (MEASURE). En la pantalla aparece el valor medido se recomienda realizar las mediciones de las muestras con agitación lenta para homogenizar el pH.

Respectivamente en un vaso precipitado se miden 40 ml de agua destilada y 40 ml de suelo; luego de esto se adicionan en un vaso precipitado de 100 ml, agitando hasta que se obtenga una mezcla homogénea (Ver Figura 12).

Figura 13. Preparación de la muestra para la prueba de pH



Fuente: Autor del proyecto

Terminada la homogenización, se ubica la muestra en el pH-metro activándolo para obtener el resultado requerido por cada montaje. Ver Figura 13).

Figura 14. Lectura del resultado del pHmetro



Fuente: Autor del proyecto

➤ **Humedad.** La biodegradación de hidrocarburos en suelos puede ser limitada por la cantidad de agua disponible en el medio para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Una alta humedad puede impedir la transferencia de gases a través del suelo, que afecta los procesos de biorremediación, mientras que una baja humedad reduce la actividad metabólica bacteriana.

- **Procedimiento de Laboratorio. Método Gravimétrico**

El contenido de humedad es determinado por la diferencia en peso de la muestra húmeda con la seca. La muestra de suelo es recogida y pesada. Luego se seca la muestra en un horno durante 24 horas a 105 °C y después se pesa la muestra secada.

La ecuación básica para expresar el contenido de humedad en base a la masa seca es:

$$W: M_w / M_s$$

Dónde:

W contenido de humedad del suelo (%)

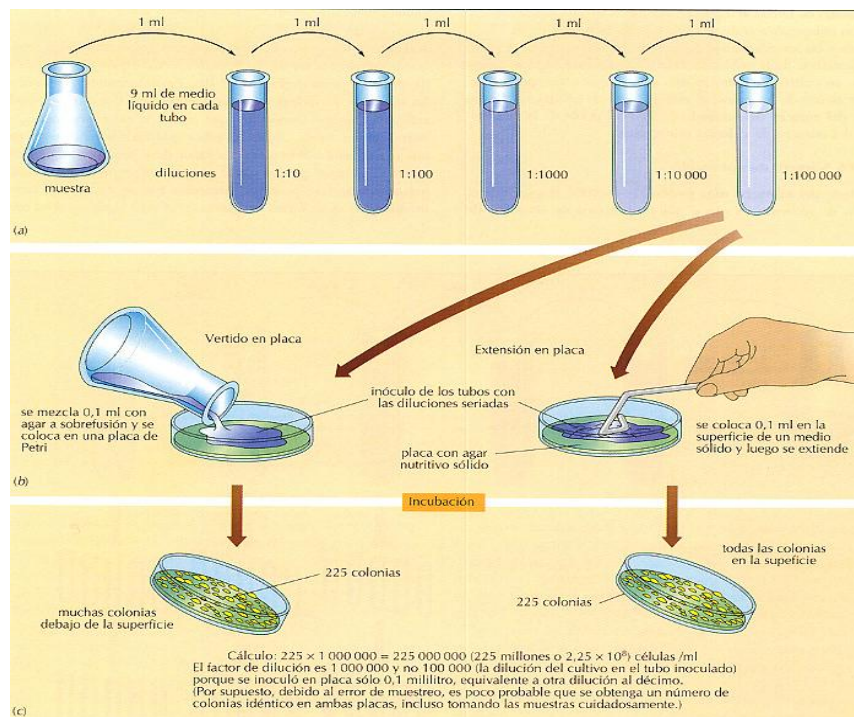
M_w masa de agua en la muestra de suelo (g)

M_s masa de la muestra de suelo secado al horno (g)

➤ **Microorganismos.** El método de recuento en gota se puede usar para la determinación del número de suspensiones bacterianas viables

- **Procedimiento para recuento de microorganismos aerobios totales.** El método de recuento en gota se puede usar para la determinación del número de suspensiones bacterianas viables.

Figura 15. Esquema de técnica de siembra en placa



Fuente: Manual para análisis del laboratorio, PTAR-Ecopetrol, 2011

Para la realización de un conteo estándar en placa es necesario hacer diluciones en agua desionizada estéril de las muestras a analizar. Si la muestra es sólida o semisólida se debe pesar 1 g de muestra en 9 ml de agua desionizada estéril (1:10) como dilución inicial, a partir de la cual se realizan diluciones seriadas. En el caso de muestras líquidas se puede empezar a sembrar desde la muestra inicial y posteriormente las diluciones siguientes.

- Mezclar en vortex
- Hacer diluciones seriadas (1:10) usando solución o agua de dilución en tubos eppendorf los cuales contienen 900 µl de agua. Se pipetea 100 µl de muestra en el tubo de la dilución que contiene los 900 µl de agua estéril. Es necesario purgar la punta de la micropipeta 3 veces antes de tomar la muestra definitiva.

- Mezclar bien este tubo mediante vortex por 8 segundos. Después del vortex, tomar 100 µl de este tubo y disponer en el segundo tubo de dilución. Este proceso se repite exactamente hasta la dilución que se crea pertinente.

Se recomienda que las cajas con medio de cultivo sólido sobre las cuales se van a llevar a cabo las inoculaciones se preparen con 2 días de anterioridad para lograr una buena compactación y control de calidad del medio.

Marcar las cajas. Se pueden definir 4 hileras, cada una de ellas por dilución. La micropipeta se ajusta para tomar y dispensar 20 µl de muestra.

La inoculación se puede llevar a cabo de la última a la primera dilución. Por tanto el tubo de la última dilución se mezcla mediante vortex por 6 seg., y se recogen 20 µl de muestra y dispone en el agar. Operación se hace 5 veces sobre una misma hilera o cuadrante. Este proceso se repite por cada uno de las series de diluciones.

Figura 16. Técnica de siembra en gota



Fuente: Autor del proyecto

- Dejar secar las gotas, sin mover la caja.
- Invertir las cajas de petri e incubar a 32 - 35°C (o la temperatura establecida), de 16-24 horas.

- Se cuentan las colonias usando un Contador de colonias (Leica) usando un magnificador apropiado para facilidad del conteo de colonias en las gotas.

5.2.1.4 Obtención de un Consorcio Microbiano degradador de hidrocarburo

Conociendo la gran eficiencia y versatilidad de las *Pseudomonas sp* para degradar hidrocarburos contenidos en suelos, se definió que la base para la obtención del consorcio microbiano seria precisamente este tipo de microorganismos.

➤ Producto microbiano OIL FREE

El inóculo original utilizado se obtuvo del aislamiento de microorganismos presentes en suelos contaminados existentes en áreas impactadas por actividades de explotación de hidrocarburos en la zona del campo petrolero de Casabe en el municipio de Yondó (Antioquia), en la cual hace presencia Ecopetrol para la operación del mismo.

Este suelo se caracteriza por estar expuesto a contaminación crónica por hidrocarburos, y en consecuencia, la mayor probabilidad de encontrar poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos debido al factor de aclimatación.

El producto ha venido siendo empleado de manera masiva en el saneamiento de los pasivos ambientales de diferentes áreas del Magdalena Medio, logrando obtener resultados significativos con gran eficiencia en la biodegradación de los hidrocarburos contenidos en estos suelos.

➤ Microorganismos nativos del área de estudio

Los microorganismos nativos fueron obtenidos de una muestra de suelo representativa extraída del área de tratamiento biológico ATB, para lo cual se siguieron de manera rigurosa las exigencias de toma y preservación de la muestra, con lo que se aseguró que las condiciones de los microorganismos se preservaran al momento de ser recibidas en el laboratorio microbiológico.

(Seguimiento de la remediación microbiana de hidrocarburos en el suelo, Chikere CB, 2011)

➤ **Obtención de un consorcio degradador de hidrocarburo**

El procesamiento del consorcio microbiano consistió en la mezcla del producto OIL FREE y la muestra de suelo extraída del área objeto de estudio. Esta muestra fue enviada a Bogotá para ser procesada con el fin de enriquecer por medio de procesos de incubación y medios de cultivo enriquecidos las poblaciones de microorganismos presentes en la misma.

El proceso de incubación es controlado por máquinas automatizadas que aseguran una temperatura constante hasta llegar a pH deseable en la muestra. Las muestras (5 kilos) fueron fraccionadas y maceradas buscando dilución con agua corriente de las cuales se obtuvieron dos (2) con las que se comenzó el trabajo de incubación. Cuatrocientos (400) gramos de muestra por cuatro (4) litros de agua en dilución, en recipientes rectangulares plásticos con tapa semitransparente fueron dispuestos para realizar el proceso.

El medio de cultivo utilizado es de formulación exclusiva y hace parte de la propiedad intelectual de la empresa proveedora. Este medio busca ofrecer todos y cada uno de los nutrientes que requieren los microorganismos durante el proceso de incubación, asegurando números suficientes de unidades formadoras de colonias viables para su posterior aplicación en campo, después de su preparación pasa por proceso de autoclavado que aseguran que no haya contaminación cruzada con otro tipo de microorganismos ambientales.

Al terminar el proceso de incubación y tener temperatura ambiente los microorganismos enriquecidos procedentes de la muestra del ATB fueron mezclados con OIL-FREE en igual porcentaje volumen a volumen.

Luego fue empacado en un galón de polietileno blanco de alta densidad en material nuevo previamente desinfectado, y despachado para comenzar las actividades de campo que competen a este trabajo.

Figura 17. Recipiente con Consorcio microbiano



Fuente: Autor del proyecto

5.2.1.5 Ensayo de Tratabilidad: Una vez obtenido el consorcio microbiano a utilizar en el proceso de biorremediación del suelo existente en el área de tratamiento biológico ATB, se procedió a implementar una prueba a escala laboratorio que permitiera evaluar el comportamiento del material en presencia del consorcio y la eficiencia de este en la biodegradación del hidrocarburo contenido en la matriz objeto de estudio.

Para lo anterior, se realizó el montaje de tres (3) recipientes con suelo contaminado con hidrocarburo, extraído de cada uno de los montones acopiados en un sitio aledaño al área de tratamiento biológico, durante la actividad de toma de muestras en los puntos calientes.

Así mismo, se definió con base en los resultados del análisis de porcentaje de hidrocarburo (%HC) realizados a cada una de las muestras de suelo, emplear la técnica de bioaumentación y bioestimulación en dos (2) recipientes, aplicando

como producto biodegradador de hidrocarburo el consorcio microbiano desarrollado. Para el tercer recipiente no se empleó ningún tipo de producto, a fin de determinar la capacidad degradadora de los microorganismos nativos presentes en el suelo contaminado, solo bajo condiciones controladas de humedad y suministro de aireación por medio de volteos.

De esta forma, el ensayo de tratabilidad se desarrolló durante diez (10) semanas en las instalaciones del laboratorio de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Industriales de la Refinería de Barrancabermeja, bajo condiciones constantes y en la cual se realizaron actividades de seguimiento y control fisicoquímico y microbiológico de los parámetros de interés, que permitieron determinar las capacidades biodegradativas en términos de reducción de la concentración de hidrocarburo (% HC) y el comportamiento de los microorganismos degradadores presentes en el material en proceso contenido en cada uno de los recipientes.

Las actividades de seguimiento y control fisicoquímico y microbiológico fueron desarrolladas con la utilización de los siguientes equipos y técnicas:

Tabla 5. Parámetros y técnicas de seguimiento y control del proceso de Biorremediación

Parámetro	Equipo/Técnica
Porcentaje de hidrocarburo (%HC)	Kit Retorta
Microorganismos	Recuento de microorganismos aerobios
pH	pH-metro
Humedad	Gravimétrico

Fuente: Autor del proyecto

Figura 18. Montaje de la prueba a escala de laboratorio



Fuente: Autor del proyecto

Figura 19. Elementos empleados en la prueba a escala de laboratorio



Fuente: Autor del proyecto

5.2.1.6 Prueba Piloto en Campo: Una vez finalizado el ensayo de tratabilidad del suelo contaminado, se procedió a realizar este proceso de biorremediación a una prueba piloto en campo con las mismas condiciones de aplicación del consorcio microbiano y características de las muestras de suelo contaminado a tratar, empleadas en el desarrollo del montaje de los recipientes para el ensayo de laboratorio, a fin de validar los resultados alcanzados durante esta primera fase de experimentación.

La prueba piloto se desarrolló en un tiempo igual al empleado durante el ensayo de tratabilidad (10 semanas) y fue implementado en un sitio ubicado en el interior del área de tratamiento biológico ATB, de manera que las condiciones bajo las cuales estuvo expuesto el piloto de campo se asimilaran lo más cercano posible a las condiciones reales bajo las cuales está emplazado el área objeto de estudio de este proyecto.

Figura 20. Montaje de la prueba piloto en campo



Fuente: Autor del proyecto

Como se puede evidenciar en la figura 19, para el montaje fue necesario acondicionar un área en la cual se pudo implementar pistas o eras de tratamiento piloto con dimensiones de 1,0 m de ancho, 1,5 m de largo y 0,3 metros de espesor, correspondiente a un volumen de $0,45 \text{ m}^3$ de material en proceso de biorremediación contenido en cada pista de tratamiento.

Figura 21. Prueba piloto de biorremediación



Fuente: Autor del proyecto

Durante el desarrollo de la prueba en campo se realizaron sistemáticamente actividades de seguimiento y control del material en proceso de biodegradación, mediante la revisión de los parámetros de interés para el proceso (microorganismos, humedad, pH y porcentaje de hidrocarburo (%HC)) con lo cual se pudo determinar en una etapa posterior la evolución de los microorganismos en estudio y el comportamiento en la remoción del hidrocarburo contenido en el suelo contaminado en proceso de biorremediación presente en cada pista.

5.2.1.7 Seguimiento y control al proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos: El aseguramiento de la correcta ejecución y análisis del progreso del proceso se llevó a cabo mediante un plan de control y seguimiento que incorporó las siguientes acciones:

➤ **Seguimiento de las condiciones del proceso**

Se adelantó una revisión permanente en campo de las condiciones del proceso, así como también se registró con frecuencias semanales y quincenales la variación de concentración de TPH, pH, humedad y microorganismos utilizando equipo de campo y de laboratorio.

Figura 22. Preparación de muestras durante seguimiento del proceso en campo



➤ **Control del proceso de biodegradación**

Las actividades de control de los parámetros de interés para la evolución satisfactoria del proceso de biorremediación microbiana fueron realizadas de forma sistemática, mediante la aplicación de nutrientes, ajuste de pH, aplicación de producto microbiano, aireación y control de humedad

En esta etapa se analizaron los resultados obtenidos, haciendo un balance de los objetivos alcanzados y los marcados inicialmente para el proceso. De igual forma, se implementaron las mejoras o modificaciones necesarias para la optimización del proceso.

Figura 23. Aplicación de agua para control de humedad en ensayo de laboratorio



Figura 24. Aplicación de consorcio microbiano durante la prueba piloto en campo



5.2.1.8 Análisis y evaluación del sistema de biorremediación microbiana: Se determinó el comportamiento del TPH, humedad, pH y microorganismos durante el piloto de campo por medio de curvas de variación en el tiempo, se analizaran los requerimientos de control aplicados, la respuesta del sistema para la biodegradación del hidrocarburo presente en el suelo y los costos asociados durante la implementación y operación del piloto en campo.

La evolución del tratamiento y el avance en la remoción de hidrocarburos totales se valoró mediante la evaluación de las siguientes variables de seguimiento y control del proceso:

1. Concentración inicial y final de hidrocarburos totales (%HC)
2. Concentración de microorganismos
3. Cambio de parámetros de seguimiento y control: pH, humedad, aireación, disponibilidad de nutrientes

Figura 25. Evaluación de microbiológica del proceso de biorremediación



5.2.2 Análisis estadístico. Para el análisis de la información, se utilizó un diseño en Bloques Completamente al Azar, con las siguientes características

- **Bloques:** Análisis realizados mediante una etapa inicial de laboratorio, consistente en un ensayo de tratabilidad, en la cual se determinaron los valores de % de hidrocarburo con un equipo de campo. Para la segunda etapa, se desarrolló el escalamiento a campo del proceso realizado en laboratorio, en el cual los valores de hidrocarburo se determinaron semanalmente por medio de un equipo de campo y quincenalmente con el soporte de un laboratorio para el caso de la variable 1 (porcentaje de hidrocarburos); para las demás variables, los bloques fueron: análisis en laboratorio durante el ensayo de tratabilidad y análisis en laboratorio para la prueba piloto en campo.
- **Tratamientos**
 - Pista A (%HC1 aplicación de consorcio microbiano),
 - Pista B (%HC2 aplicación de consorcio microbiano)
 - Pista C (%HC3 utilización de microorganismos nativos)
- **Nivel de significancia:** 5%

Para el análisis de varianza se tomó el resultado obtenido en la primera semana y se le restó el valor obtenido en la última prueba realizada. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, 0.05) con el programa estadístico SAS (SAS Institute 2002).

- **Variable 1. porcentaje de hidrocarburos**

Tabla 6. Comportamiento del porcentaje de hidrocarburos al cabo de 10 semanas

TRATAMIENTOS	BLOQUE 1 LABORATORIO	BLOQUE 2 CAMPO	BLOQUE 3 BIORREMEDIACION CAMPO	TOTAL	PROMEDIO
PISTA A	20,0	22,6	19,0	61,6	20,5
PISTA B	10,0	11,0	10,0	31,0	10,3
PISTA C	6,0	12,6	11,0	29,6	9,9
TOTAL	36,0	46,2	40,0	122,2	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Variable Dependiente: Porcentaje de hidrocarburos (%HC)

$$F_{0.05(2,4)} = 6,94$$

Tabla 7. Variable Dependiente: Porcentaje de hidrocarburos (%HC)

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	Fcalculada
Bloques	2	17,54	8,77	2,59 32,2
Tratamientos***	2	218	109	
Error	4	14	3,4	
TOTAL	8	249		

***. Diferencia significativa al 5%

Bloques

En el cuadro 1, se observa que no existe diferencia significativa entre los bloques, es decir, no existe evidencia suficiente para afirmar, que el tipo de análisis realizado incide significativamente en el porcentaje de hidrocarburos.

Tratamientos

En el análisis de varianza se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir, que el porcentaje de hidrocarburos depende de la pista que se utilice.

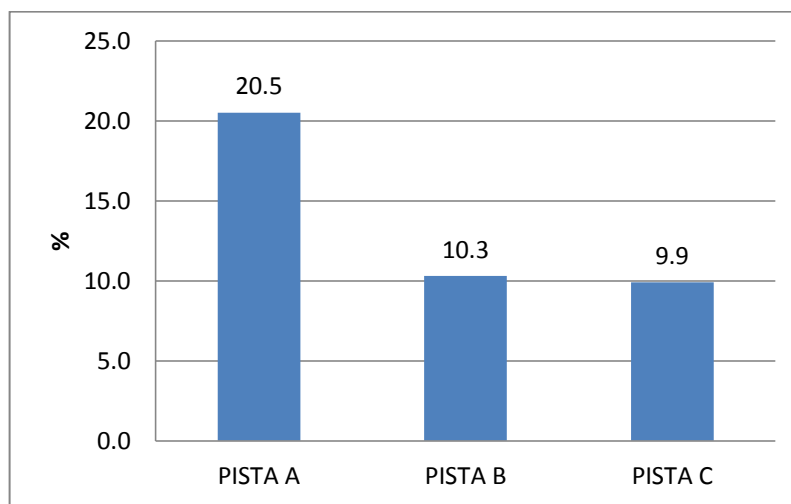
Prueba de TUKEY para comparar el porcentaje de hidrocarburos en cada tratamiento.

Tabla 8. Porcentaje de hidrocarburos en cada tratamiento

GRUPO TUKEY	PROMEDIO	TRATAMIENTO
A	20.5	PISTA A
B	10.3	PISTA B
BC	9.9	PISTA C

En el Test de Tukey se observa, que el tratamiento T1 (Pista A), se diferencia estadísticamente de los demás, mientras que los tratamientos T2 y T3 (Pista B y C), no se diferencian estadísticamente entre sí.

Figura 26. Nombrar y colocar en la lista de figuras



En la figura 1, se observa que el mayor descenso de hidrocarburos se presentó con la Pista A, con una disminución del 20.5%, y la menor disminución se presentó con las Pistas C y B con 9.9% y 10.3% respectivamente.

- **Variable 2. comportamiento del contenido de microorganismos**

Tabla 9. Comportamiento del contenido de microorganismos al cabo de 10 semanas

TRATAMIENTOS	BLOQUE 1 LABORATORIO	BLOQUE 2 BIORREMEDIACION CAMPO	TOTAL	PROMEDIO
PISTA A	30000	20000	50000	20000
PISTA B	20000	50000	70000	30000
PISTA C	3800	3000	6800	3400
TOTAL	4290	3690	7980	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Variable Dependiente: Microorganismos

$$F_{0.05(1,2)} = 18,5$$

$$F_{0.05(2,2)} = 19$$

Tabla 10. Variable Dependiente: Microorganismos

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	Fcalculada
Bloques	1	600000000	600000000	0,39 41,6
Tratamientos***	2	1300000	600000	
Error	2	0,000000	0,00000015	
TOTAL	5	0,000013		

*****: Diferencia significativa al 5%**

Bloques

En el cuadro 2, se observa que no existe diferencia significativa entre los bloques, es decir, no existe evidencia suficiente para afirmar, que el tipo de análisis realizado incide significativamente en el contenido de microorganismos.

Tratamientos

En el análisis de varianza se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir, que el contenido de hidrocarburos depende de la pista que se utilice.

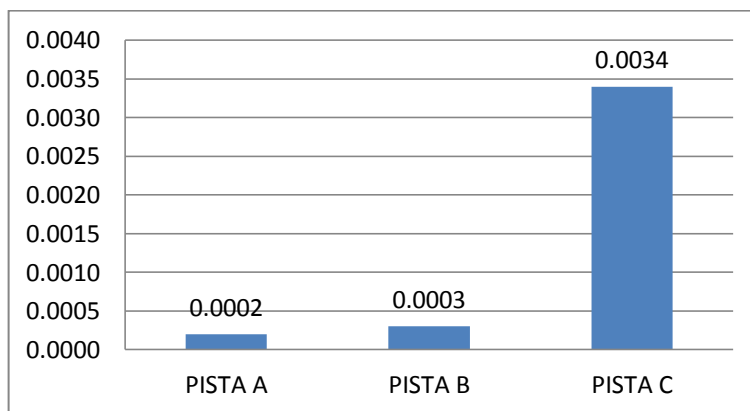
Prueba de TUKEY para comparar el promedio del contenido de microorganismos en cada tratamiento.

Tabla 11. Prueba de TUKEY para comparar el promedio del contenido de microorganismos en cada tratamiento.

GRUPO TUKEY	PROMEDIO	TRATAMIENTO
A	3400	PISTA C
B	30000	PISTA B
BC	20000	PISTA A

En el Test de Tukey se observa, que el tratamiento T3 (Pista C), se diferencia estadísticamente de los demás, mientras que los tratamientos T1 y T2 (Pista A y B), no se diferencian estadísticamente entre sí.

Figura 27. Comportamiento del contenido de microorganismos, al cabo de 10 semanas



En la figura 6, se observa que el mayor descenso de microorganismos se presentó con la Pista C, con una disminución de 3400 y la menor disminución se presentó con las Pistas A y B con 20000 y 30000 respectivamente.

- **Variable 3. comportamiento del contenido de pH**

Tabla 12. Comportamiento del contenido de PH al cabo de 10 semanas

TRATAMIENTOS	BLOQUE 1 LABORATORIO	BLOQUE 2 BIORREMEDIACION CAMPO	TOTAL	PROMEDIO
PISTA A	0,00	0,00	0,00	0,00
PISTA B	0,00	0,00	0,00	0,00
PISTA C	0,00	-0,30	-0,30	-0,15
TOTAL	0,00	-0,30	-0,30	

Análisis de varianza

Variable Dependiente: PH

$$F_{0.05(1,2)} = 18,5$$

$$F_{0.05(2,2)} = 19$$

Tabla 13. Variable Dependiente: PH

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	Fcalculada
Bloques	1	0,015	0,0150	1,00 1,0
Tratamientos	2	0,030	0,0150	
Error	2	0,030	0,0150	
TOTAL	5	0,075		

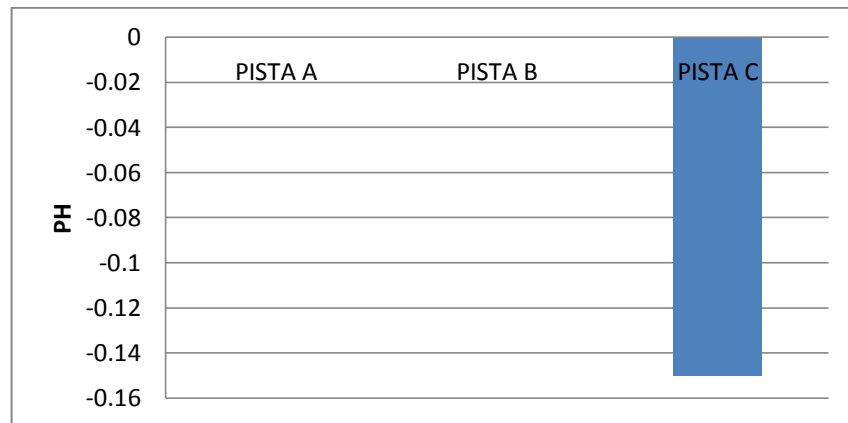
Bloques

En el cuadro 3, se observa que no existe diferencia significativa entre los bloques, es decir, no existe evidencia suficiente para afirmar, que el tipo de análisis realizado incide significativamente en el contenido de PH.

Tratamientos

En el análisis de varianza se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir, que el contenido de PH no depende de la pista que se utilice.

Figura 28. Comportamiento del contenido de PH, al cabo de 10 semanas



En la Figura 10, se observa que para los tratamientos T1 y T2 (Pistas A y B), el contenido del PH se mantuvo durante las semanas, mientras que con el tratamiento T3 (Pista C), el contenido de PH aumentó, aunque estadísticamente éste no fue significativo.

- **Variable 4. comportamiento del porcentaje de humedad**

Tabla 14. Comportamiento del porcentaje de Humedad, al cabo de 10 semanas

TRATAMIENTOS	BLOQUE 1 LABORATORIO	BLOQUE 2 BIORREMEDIACION CAMPO	TOTAL	PROMEDIO
PISTA A	-16,00	-18,00	-34,00	-17,00
PISTA C	-13,00	-12,00	-25,00	-12,50
TOTAL	-47,00	-47,00	-94,00	

Análisis de varianza

Variable Dependiente: % Humedad

$$F_{0.05(1,2)} = 18,5$$

$$F_{0.05(2,2)} = 19$$

Tabla 15. Variable Dependiente: % Humedad

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	Fcalculada
Bloques	1	0,00	0,00	0,00 10,1
Tratamientos***	2	30,33	15,17	
Error	2	3,00	1,50	
TOTAL	5	33,33		

***: Diferencia significativa al 5%

Bloques

En el cuadro 4, se observa que no existe diferencia significativa entre los bloques, es decir, no existe evidencia suficiente para afirmar, que el tipo de análisis realizado incide significativamente en el contenido de humedad.

Tratamientos

En el análisis de varianza se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir, que el contenido de humedad depende de la pista que se utilice.

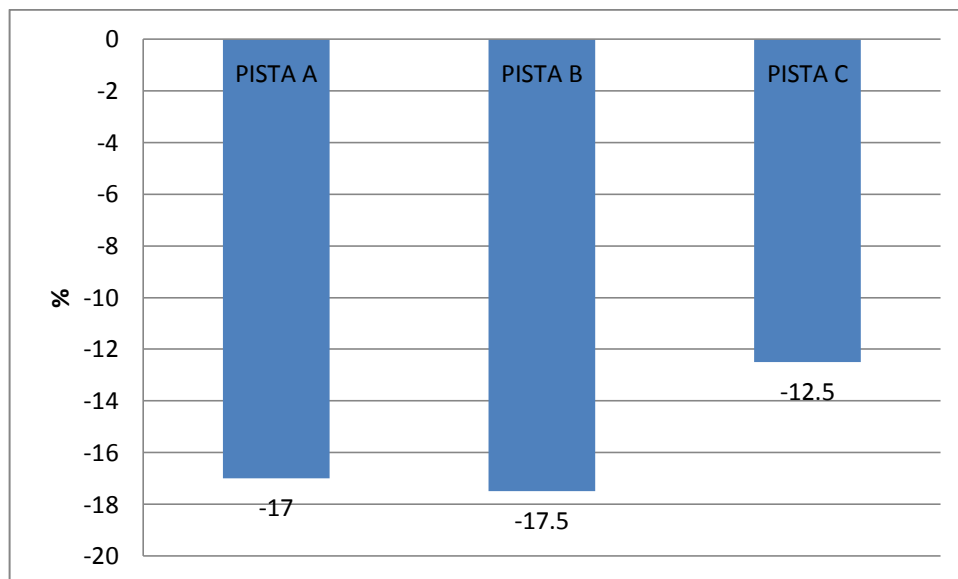
Prueba de TUKEY para comparar el porcentaje de humedad en cada tratamiento.

Tabla 16. Prueba de TUKEY para comparar el porcentaje de humedad en cada tratamiento.

GRUPO TUKEY	PORCENTAJE	TRATAMIENTO
A	-12.5	PISTA C
AB	-17.0	PISTA A
BC	-17.5	PISTA B

En el Test de Tukey se observa, que el tratamiento T3 (Pista C), se diferencia estadísticamente del tratamiento T2 (Pista B), mientras que los tratamientos T1 y T2 (Pista A y B), no se diferencian estadísticamente entre sí.

Figura 29. Comportamiento del porcentaje de humedad, al cabo de 10 semanas



En la figura 14, se observa que la temperatura aumentó, siendo mayor el aumento en los tratamientos T1 y T2 (Pistas A y B), con un -17% y -17,5% respectivamente, y el menor aumento se presentó con el tratamiento T3 (Pista C), con un -12.5%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO CONTAMINADO

En tabla 5 se indican los resultados obtenidos de la caracterización realizada en el laboratorio de servicios industriales de la Universidad Industrial de Santander UIS al suelo contaminado objeto de estudio, frente a los parámetros incluidos en el protocolo Louisiana 29B, encontrándose que estos registros presentan niveles aceptados para la estabilización de suelos contaminados.

De igual forma, se registra la presencia de microorganismos (*Pseudomona sp*) por medio del recuento microbiológico desarrollado en el laboratorio de la planta de tratamiento de aguas residuales de la PTAR de la refinería. El valor encontrado según la lectura de colonias alcanzó una concentración celular de $4,0 \times 10^3$ UFC/ml, evidenciándose que existen poblaciones de microorganismos de interés para la biorremediación pero en concentraciones que no permiten una remoción importante del hidrocarburo presente en suelo contaminado objeto de estudio. Estas concentraciones son más bajas a las encontradas en procesos de biorremediación donde se aplican técnicas de bioestimulación y bioaumentación para potencializar la actividad metabólica, alcanzando concentraciones del orden de $1,0 \times 10^7$ UFC/ml, lo cual permite mayores niveles de reducción del hidrocarburo presente en el suelo (GLAZER, AN; NIKAIDO H, 2007).

Tabla 17. Características del suelo contaminado objeto de estudio

PARÁMETRO	RESULTADO	NORMA 29B*	MÉTODO
Hidrocarburo Totales %	18,64	< 1%	Extracción Soxhlet/Gravimétrico
pH (Unidades de pH)	7,26	6-9	Potenciométrico
Conductividad (μS/cm)	2080	< 4000	Conductivimétrico
Zinc (mg Zn/Kg)	1283	< 500	Absorción atómica
Arsénico (mg As/Kg)	0,060	10	Absorción atómica /Generación de Hidruros
Selenio (mg Se/Kg)	66,00	10	Absorción atómica /Generación de Hidruros
Mercurio (mg Hg/Kg)	0,18	10	Absorción atómica /Generación de Hidruros
Plomo (mg Pb/Kg)	63,8	500	Absorción atómica
Cromo Total (mg Cr/Kg)	27,0	500	Absorción atómica
Cadmio (mg Cd/Kg)	1,10	10	Absorción atómica
Cromo Hexavalente (mg/Kg)	<L.D.	5	Espectrofotométrico
Bario (mg Ba/Kg)	57,9	20000	Absorción atómica
RAS	2,27	< 12	Cálculo Matemático
PSI	2,22	< 15	Cálculo Matemático
Cloruros (mg Cl/Kg)	654		Argentométrico
Calcio (mg Ca/Kg)	7852		Absorción atómica
Magnesio (mg Mg/Kg)	2034		Absorción atómica
Sodio (mg Na/Kg)	878		Absorción atómica
Plata (mg Ag/Kg)	<0,33		Absorción atómica
Humedad (%)	-		Gravimétrico
* Referencia: Norma 29B del Estado de Louisiana, Estados Unidos de América, Sept.1999 y Diciembre de 2008.			
L.D.: Limite de Detección del Cromo Hexavalente= 0,006 (mg Cr ⁺⁶ /L)			

Fuente: autor del proyecto

6.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBURO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Se presenta el análisis realizado con relación a la evolución y el comportamiento que presentó la variación del hidrocarburo contenido en el suelo de cada muestra de tratamiento, durante el ensayo de tratabilidad y la prueba piloto en campo, teniendo como base que las condiciones iniciales equivalen al tiempo cero de biorremediación del suelo.

El ensayo de tratabilidad se realizó con tres (3) pistas de biodegradación a escala laboratorio con suelo contaminado con hidrocarburo, durante diez (10) semanas y con las siguientes características:

Pista A: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 28). Aplicación de consorcio microbiano, aireación por medio de volteos periódicos y control de humedad.

Pista B: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 15). Aplicación de consorcio microbiano, aireación por medio de volteos periódicos y control de humedad

Pista C: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 25). Aplicación de aireación y control de Humedad

Así mismo, la prueba piloto en campo se realizó con tres (3) pistas de biodegradación, durante 10 semanas y manteniendo las condiciones de calidad del suelo con las mismas características de inicio aplicadas en el ensayo de tratabilidad. A continuación las pistas y las características de la prueba piloto en campo:

Pista A: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 28). Aplicación de consorcio microbiano, aireación por medio de volteos periódicos y control de humedad.

Pista B: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 15). Aplicación de consorcio microbiano, aireación por medio de volteos periódicos y control de humedad

Pista C: Suelo contaminado con hidrocarburo (concentración inicial, %HC: 25).
Aplicación de nutrientes a partir de la cuarta semana de la prueba, aireación y control de Humedad

6.2.1 Ensayo de tratabilidad. Para el caso del ensayo de tratabilidad se observó que se presentaron cambios significativos en los valores de TPH en las pistas A y B. Los resultados mostraron una disminución de la concentración del hidrocarburo en las pistas A y B, correspondientes al suelo contaminado que fue sometido a la aplicación sistemática semanal del consorcio microbiano (bioaumentación), y por medio del control de la humedad y el suministro de aireación por medio de volteos periódicos, lo que permitió alcanzar porcentajes de remoción de hidrocarburo de 71% y 66 % para las pistas A y B, respectivamente.

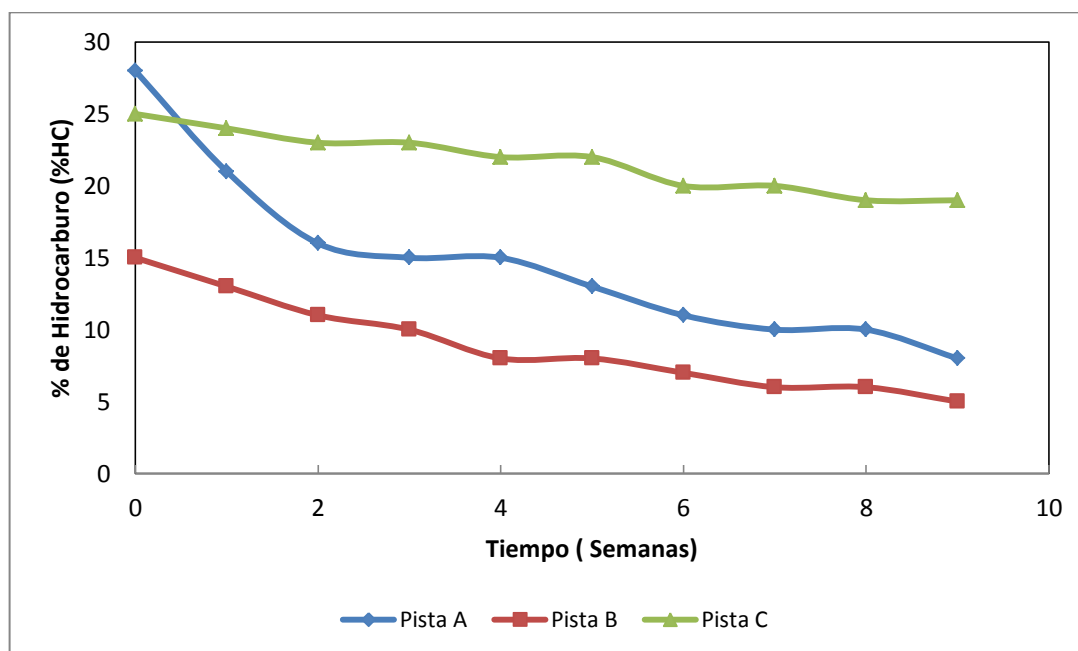
La reducción de la concentración de TPH en la pista C no mostró cambios significativos, alcanzando un porcentaje de reducción de 24% durante el proceso de biorremediación. Lo anterior indica que las acciones tendientes a favorecer la bioestimulación por medio del control de la humedad y el suministro de aireación por medio de volteos periódicos no fueron suficientes para establecer condiciones favorables que permitieran consolidar un proceso eficiente en la remoción del hidrocarburo presente del suelo en tratamiento.

Tabla 18. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados en prueba a escala laboratorio, con equipo de campo (Kit Retorta)

Ensayo de tratabilidad en laboratorio			
Análisis realizado con equipo de campo (Retorta)			
Parámetro evaluado: % de Hidrocarburo (%HC)			
Periodicidad: Semanal			
Tiempo (semanas)	Pista A	Pista B	Pista C
0	28	15	25
1	21	13	24
2	16	11	23

Ensayo de tratabilidad en laboratorio			
Análisis realizado con equipo de campo (Retorta)			
Parámetro evaluado: % de Hidrocarburo (%HC)			
Periodicidad: Semanal			
Tiempo	Pista A	Pista B	Pista C
3	15	10	23
4	15	8	22
5	13	8	22
6	11	7	20
7	10	6	20
8	10	6	19
9	8	5	19

Gráfica 1. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos a escala de laboratorio
(Masa de tierra: 3528 gramos).



6.2.2 Prueba piloto en campo. Para el caso de la prueba piloto en campo se observó que se presentaron cambios significativos en los valores de TPH en cuanto a la disminución de la concentración del hidrocarburo en las pistas A, B y C. Cabe anotar que debido a que la reducción del porcentaje de hidrocarburo en la pista C durante la prueba piloto de campo venía presentando el mismo

comportamiento mostrado en el ensayo de tratabilidad, se decidió a partir de la cuarta semana de la prueba, incorporar medidas tendientes a la bioestimulación de las poblaciones microbianas existentes con capacidad para biodegradar el hidrocarburo contenido en el suelo. Para ello se llevó a cabo la aplicación de un nutriente de presentación líquida (T7) que contiene fósforo (P), nitrógeno (N) y potasio (K), el cual viene siendo utilizado normalmente para mejorar condiciones del proceso de biodegradación en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales PTAR de la refinería de Barrancabermeja.

➤ **Análisis con equipo de campo**

Para el caso de los resultados obtenidos a partir de la utilización del equipo de campo, se observó una disminución de la concentración del hidrocarburo presente en las pistas A y B, y una menor remoción en la pista C. Cabe anotar que hasta la cuarta semana la variación en la concentración de hidrocarburo no registró diferencias relevantes frente a las encontradas en el ensayo de tratabilidad. A partir de la cuarta semana se evidenció un cambio significativo en la variación de la concentración de hidrocarburo presente en la pista C con relación al comportamiento presentado en este mismo período de tiempo en el ensayo de tratabilidad, alcanzando porcentajes de remoción de hidrocarburo en la misma proporción del presentado en las pistas A y B.

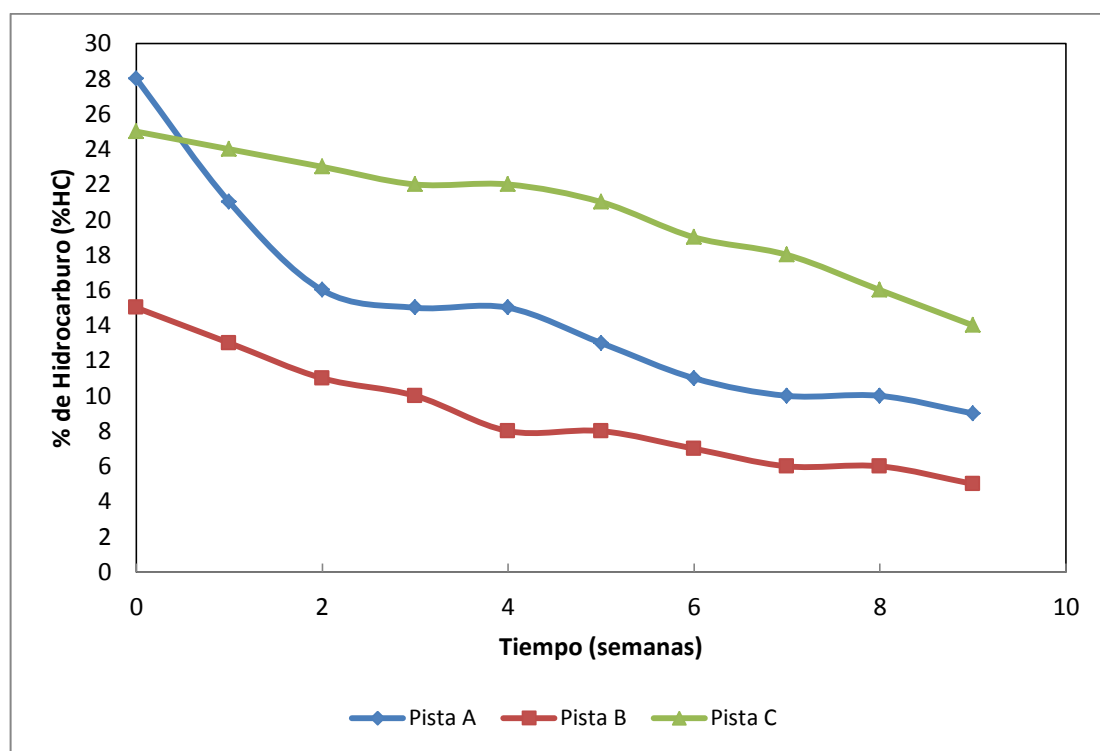
Lo anterior indica que la aplicación del nutriente T7(N, P, K) como medida adicional para favorecer la bioestimulación de la población microbiana, incidió favorablemente en la actividad metabólica de la microbiota y con esto en la eficiencia de remoción del hidrocarburo contenido en el suelo en proceso de biorremediación existente en la pista C. (Estudio del efecto de la formulación de fertilizantes y bioaumentación sobre biodegradación y la lixiviación de los crudos y productos refinados en los suelos, COULON F, 2012)

Los valores globales de remoción de hidrocarburo finales alcanzaron valores de 67%, 66% y 44% en las pistas A, B y C respectivamente, en tan solo diez (10) semanas de proceso de biorremediación.

Tabla 19. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados en prueba a escala piloto, con equipo de campo (Kit Retorta)

Prueba piloto en campo			
Análisis realizado con equipo de campo (Retorta)			
Parámetro evaluado: % de Hidrocarburo (%HC)			
Periodicidad: Semanal			
Tiempo (semanas)	Pista A	Pista B	Pista C
0	28	15	25
1	21	13	24
2	16	11	23
3	15	10	22
4	15	8	22
5	13	8	21
6	11	7	19
7	10	6	18
8	10	6	16
9	9	5	14

Gráfica 2. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos durante prueba a escala piloto.
Análisis con equipo de campo. (Masa de tierra: 675 kg)



➤ Análisis con equipo de laboratorio

Para el caso de la validación de los resultados obtenidos a partir de la utilización del equipo de campo, se observó que los resultados arrojados por el análisis desarrollado en un laboratorio certificado no presentaron desviaciones significativas en los valores de TPH frente a los mismos análisis determinados con equipo de campo (Kit Retorta), como se puede evidenciar en los resultados obtenidos.

Los porcentajes globales de remoción de hidrocarburo durante el período de biorremediación evaluado alcanzaron valores de 73%, 72% y 46% frente al contenido inicial del hidrocarburo presente en las pistas A, B y C respectivamente, mismos resultados que representan mejores tasas de biodegradación comparados con los arrojados en la investigación de SINGH B en el 2012, sobre la

biodegradación de hidrocarburos en una refinería utilizando consorcios de nuevas cepas bacterianas.

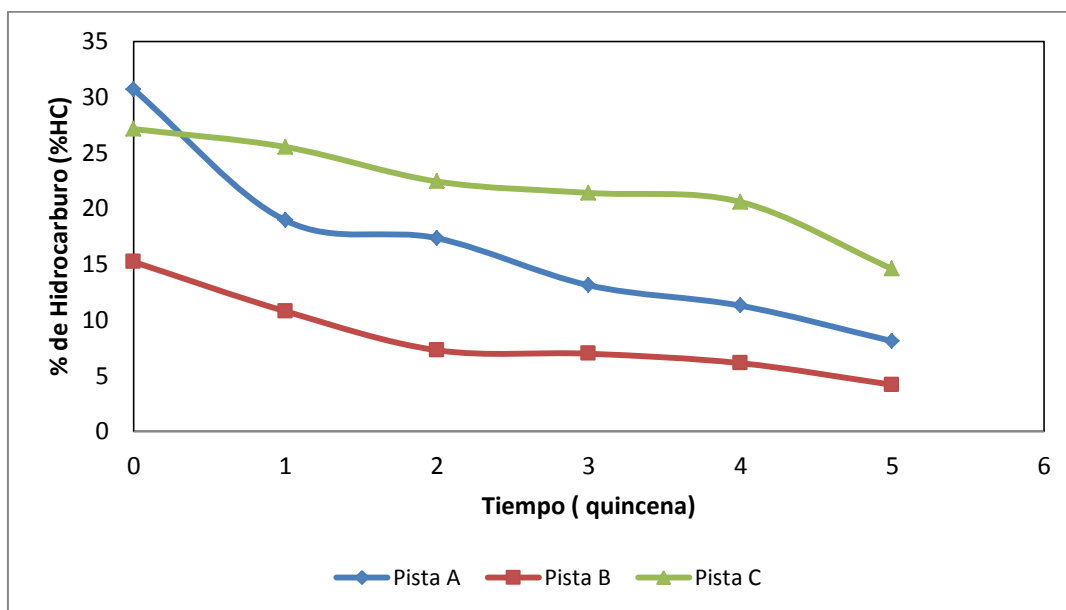
Lo anterior indica que la aplicación de técnicas de bioaumentación y bioestimulación en las pistas de tratamiento A, B y C, generaron en forma eficaz el aumento de la población microbiana y la potencialización de la actividad metabólica de la microbiota degradadora requeridas para propiciar procesos de biorremediación eficientes (GLAZER, AN; NIKAIDO H, 2007).

Tabla 20. Resultados de porcentajes de hidrocarburo determinados durante prueba a escala piloto, en laboratorio certificado

Prueba piloto de Biorremediación en Campo			
Análisis realizado en laboratorio certificado			
Parámetro evaluado: % de Hidrocarburo (%HC)			
Periodicidad: Quincenal			
Nº de Ensayo	Pista A	Pista B	Pista C
0	30,69	15,21	27,14
1	18,94	10,78	25,53
2	17,34	7,28	22,43
3	13,11	6,97	21,41
4	11,28	6,12	20,59
5	8,10	4,18	14,58

Fuente: Autor del proyecto

Gráfica 3. Cinética de Biodegradación de hidrocarburos durante prueba a escala piloto.
Análisis con equipo de laboratorio. (Masa de tierra: 675 kg)



6.3 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

En esta sección se presenta el análisis realizado con relación a la evolución y el comportamiento que presentó la variación de la concentración de microorganismos presentes en el suelo de cada muestra de tratamiento, durante el ensayo de tratatabilidad y la prueba piloto en campo.

➤ Ensayo de tratatabilidad

Para el caso de los resultados obtenidos en los recuentos de microorganismos presentes en las muestras sometidas a tratamiento, se observó que se presentaron cambios significativos en estos valores con relación a la concentración que inicialmente fue analizada en laboratorio. Por lo tanto, se evidenció claramente un aumento significativo de la población microbiana en las pistas A y B, encontrándose valores finales en los recuentos del orden de 10^6 (UFC/ml). Con relación a la pista C, el crecimiento microbiano no registró

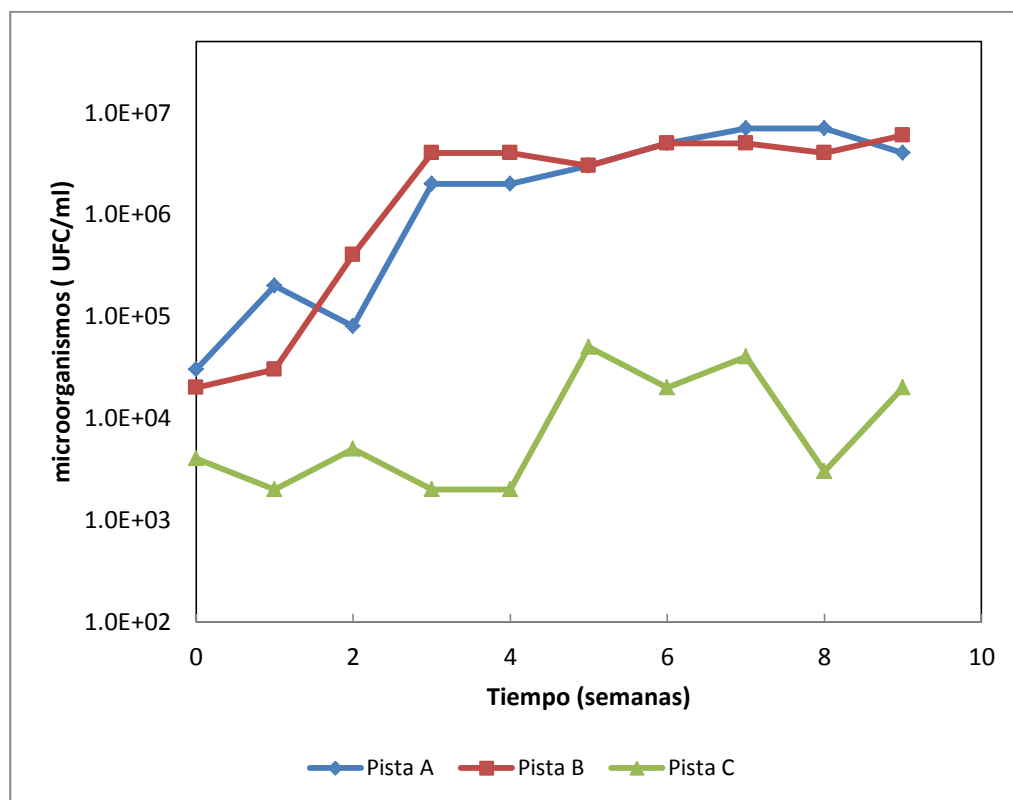
aumentos en la población microbiana, presentando valores promedio en los recuentos del orden de 10^3 (UFC/ml).

Lo anterior indica que la aplicación del consorcio microbiano en las pistas A y B generó un efecto positivo en el incremento de las poblaciones microbianas, redundando en el aumento de las tasas de biodegradación del hidrocarburo contenido en el suelo en tratamiento. Los resultados alcanzados en la pista C, evidencian que las acciones encaminadas a proporcionar una bioestimulación por medio del control de humedad y suministro de aire por medio de volteos no fueron suficientes para favorecer el crecimiento microbiano presente en el suelo contaminado.

Tabla 21. Resultados de recuentos microbiológicos durante el ensayo de tratabilidad, determinados en laboratorio de campo

Ensayo de tratabilidad			
Análisis realizado en laboratorio Refinería			
Parámetro evaluado: microorganismos			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$
1	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$
2	$8,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
3	$2,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$
4	$2,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$
5	$3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$
6	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$
7	$7,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$
8	$7,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$
9	$4,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$

Gráfica 4. Evolución de la microbiota durante la biodegradación de hidrocarburos a escala laboratorio.



➤ **Prueba piloto en campo**

Los resultados obtenidos en los recuentos de microorganismos durante la prueba piloto de campo permitieron evidenciar que se presentaron cambios significativos en la concentración de microorganismos con relación a la concentración que inicialmente fue analizada en laboratorio, la cual presentaba recuentos del orden de 10^3 (UFC/ml). Tal como se muestra en el cuadro de registro de concentración de microorganismos, se comprobó que al final de la prueba, la población microbiana presente en la totalidad de las pistas de tratamiento, alcanza recuentos del orden de 10^6 (UFC/ml).

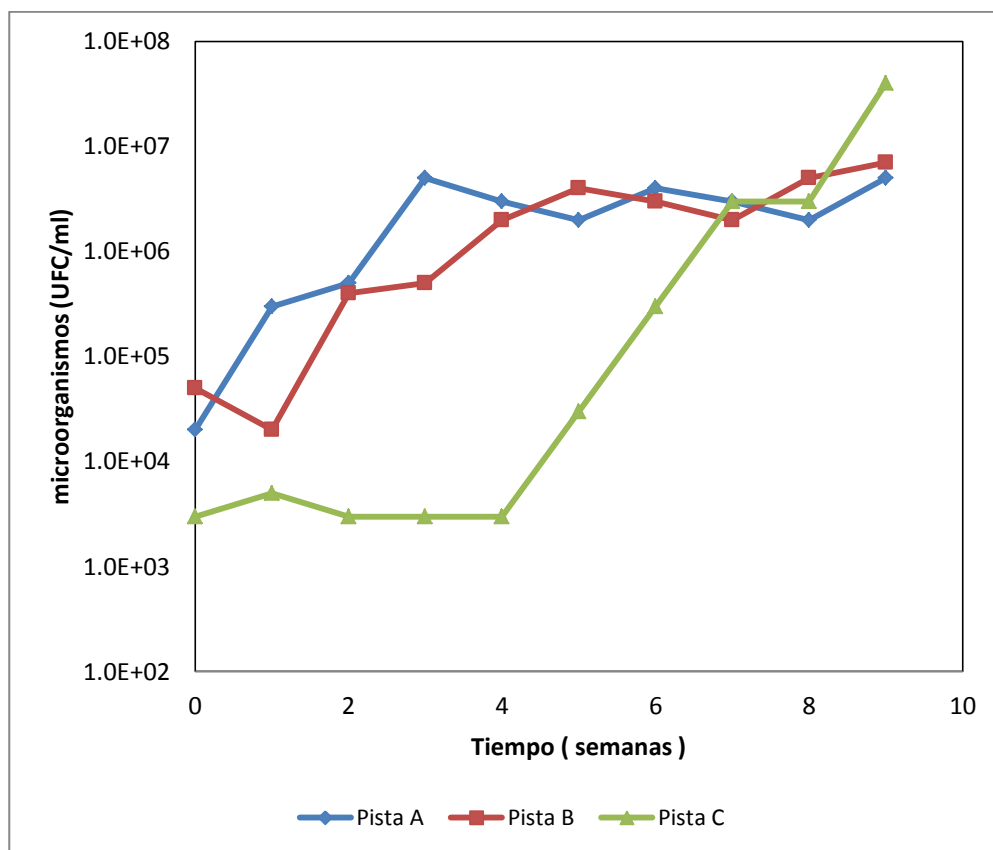
Con relación a la pista C, se evidencia que el crecimiento microbiano registró a partir de la cuarta semana aumentos significativos con conteos de microorganismos del orden de 10^6 (UFC/ml) y del orden de 10^7 (UFC/ml) para la última semana de la prueba piloto en campo.

Lo anterior ratificó que la aplicación del consorcio microbiano en las pistas A y B generó un efecto positivo en el incremento de las poblaciones microbianas, y que la implementación de una medida adicional de bioestimulación en la pista C, mediante la aplicación de un nutriente en forma líquida, permitió demostrar que la población de microorganismos nativos presente en el suelo aumento significativamente, propiciando condiciones para una mejor capacidad degradativa del hidrocarburo. (Biodegradación de un derrame de petróleo en una refinería utilizando consorcios de nuevas cepas bacterianas, SINGH B, 2012)

Tabla 22. Resultados de recuentos microbiológicos durante prueba a escala piloto, determinados en laboratorio de campo

Prueba a escala piloto			
Análisis realizado en laboratorio Refinería			
Parámetro evaluado: microorganismos			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
1	$3,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$
2	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
3	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
4	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$
5	$2,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$
6	$4,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
7	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
8	$2,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
9	$5,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^7$

Gráfica 5. Evolución de la microbiota durante la biodegradación de hidrocarburos a escala piloto



6.4 ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DEL pH DEL SUELO DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.

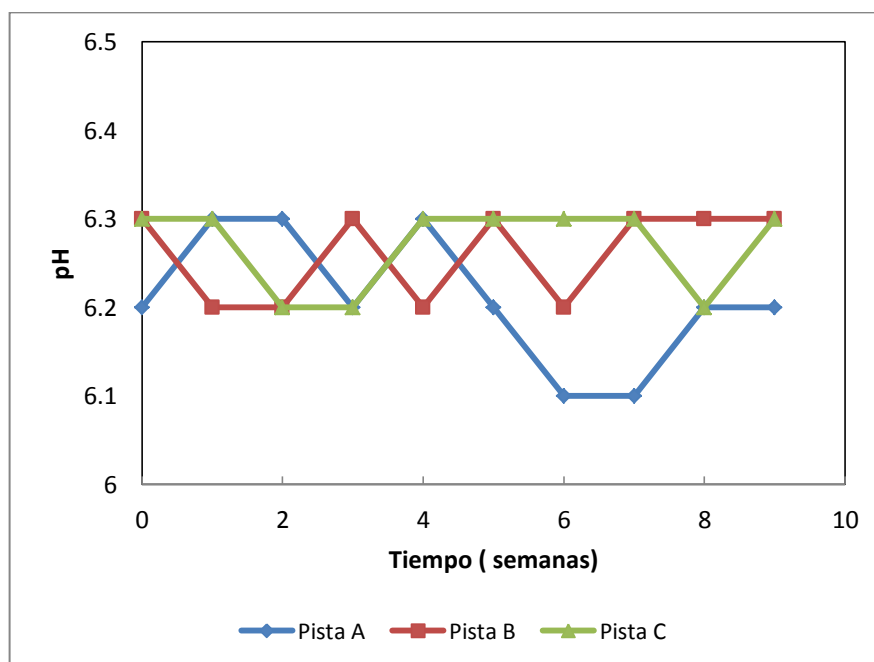
➤ Ensayo de tratabilidad

El desarrollo de los análisis en laboratorio mostró que el comportamiento del potencial de hidrógeno del suelo en proceso de tratamiento presenta valores relativamente neutros, por lo cual la mineralización de hidrocarburos se ve favorecida, redundando en mejores condiciones para la población microbiana y por ende mejores tasas de degradación del contaminante.

Tabla 23. Resultados del comportamiento del potencial de hidrógeno durante la prueba a escala laboratorio

Ensayo de tratabilidad en laboratorio			
Análisis realizado en laboratorio Refinería			
Parámetro evaluado: pH			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	6,2	6,3	6,3
1	6,3	6,2	6,3
2	6,3	6,2	6,2
3	6,2	6,3	6,2
4	6,3	6,2	6,3
5	6,2	6,3	6,3
6	6,1	6,2	6,3
7	6,1	6,3	6,3
8	6,2	6,3	6,2
9	6,2	6,3	6,3

Gráfica 6. Variación del pH del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos en la prueba a escala laboratorio



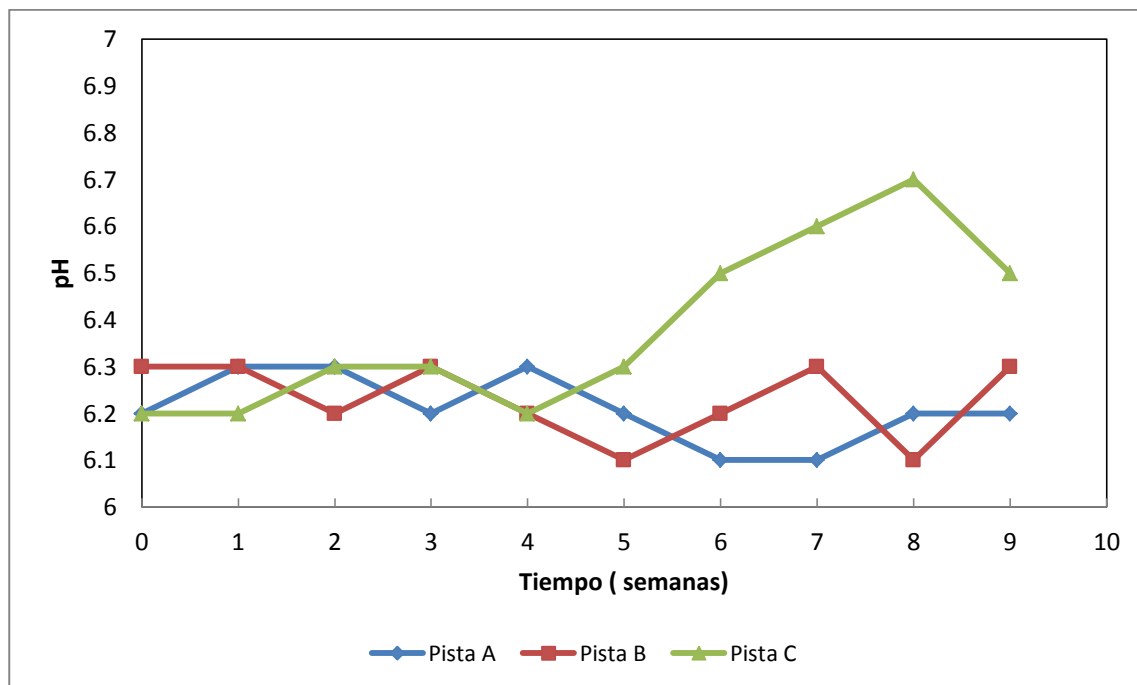
➤ Prueba piloto en campo

Los resultados de la variación del pH durante el proceso de biodegradación, fueron ratificados con los resultados obtenidos en la fase de campo, los cuales arrojaron que los valores están próximos a la neutralidad. En la pista C, se presentó un leve aumento del potencial de hidrógeno, el cual estaría asociado a la aplicación del nutriente inorgánico en forma líquida, sin afectar el desempeño del proceso de biorremediación microbiana (el pH del nutriente T7 oscila entre 6.8 y 7.2, descrito en la hoja de seguridad del producto suministrada por la empresa productora).

Tabla 24. Resultados del comportamiento del potencial de hidrógeno durante la prueba a escala piloto

Prueba piloto de Biorremediación en campo			
Análisis realizado en laboratorio Refinería			
Parámetro evaluado: pH			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	6,2	6,3	6,2
1	6,3	6,3	6,2
2	6,3	6,2	6,3
3	6,2	6,3	6,3
4	6,3	6,2	6,2
5	6,2	6,1	6,3
6	6,1	6,2	6,5
7	6,1	6,3	6,6
8	6,2	6,1	6,7
9	6,2	6,3	6,5

Gráfica 7. Comportamiento potencial de hidrogeno durante la prueba a escala piloto



6.5 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LA HUMEDAD DURANTE EL PROCESO

Es preciso anotar que durante el desarrollo de las fases de desarrollo del ensayo de tratabilidad y la prueba piloto en campo, el parámetro de humedad fue manipulado para garantizar los rangos de humedad requeridos por el proceso de biorremediación microbiana, para lo cual periódicamente se aplicó agua, teniendo en cuenta los valores encontrados durante la fase de seguimiento y control del proceso y el valor óptimo de humedad (30%) indicado por la empresa productora del consorcio microbiano, para garantizar que los microorganismos mantengan condiciones propicias para su crecimiento y actividad degradadora del hidrocarburo contenido en el suelo contaminado.

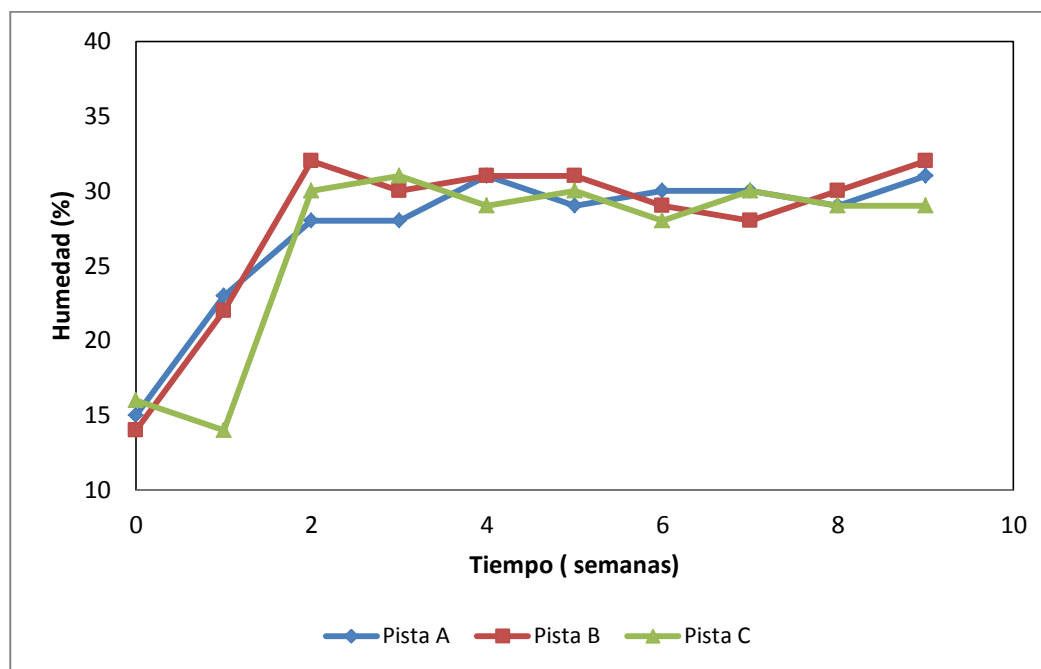
➤ **Ensayo de tratabilidad**

La muestra de suelo contaminado tomada inicialmente para el establecimiento del ensayo, presentó un bajo contenido de humedad (<15%), lo cual requirió la aplicación de agua de forma sistemática y controlada, hasta asegurar que el material en proceso de biodegradación presentara una humedad cercana al rango óptimo para la biorremediación microbiana.

Tabla 25. Resultados del contenido de la humedad durante la prueba a escala laboratorio

Ensayo de tratabilidad en laboratorio			
Análisis realizado en laboratorio Refinería			
Parámetro evaluado: % de humedad			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	15	14	16
1	23	22	14
2	28	32	30
3	28	30	31
4	31	31	29
5	29	31	30
6	30	29	28
7	30	28	30
8	29	30	29
9	31	32	29

Gráfica 8. Variación de la humedad del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos a escala de laboratorio.



➤ Prueba piloto en campo

Teniendo en cuenta que la muestra de suelo contaminado utilizada para la prueba a escala piloto presentó rangos similares de humedad con relación a las condiciones iniciales del material empleado para la prueba a escala de laboratorio, fue necesario aplicar un procedimiento igual para la manipulación del contenido de humedad durante el proceso de biorremediación microbiana. Esto se llevó a cabo mediante la aplicación sistemática de agua hasta alcanzar el valor óptimo de humedad (30%), de forma que se pudiera validar los resultados alcanzados en el ensayo a escala laboratorio.

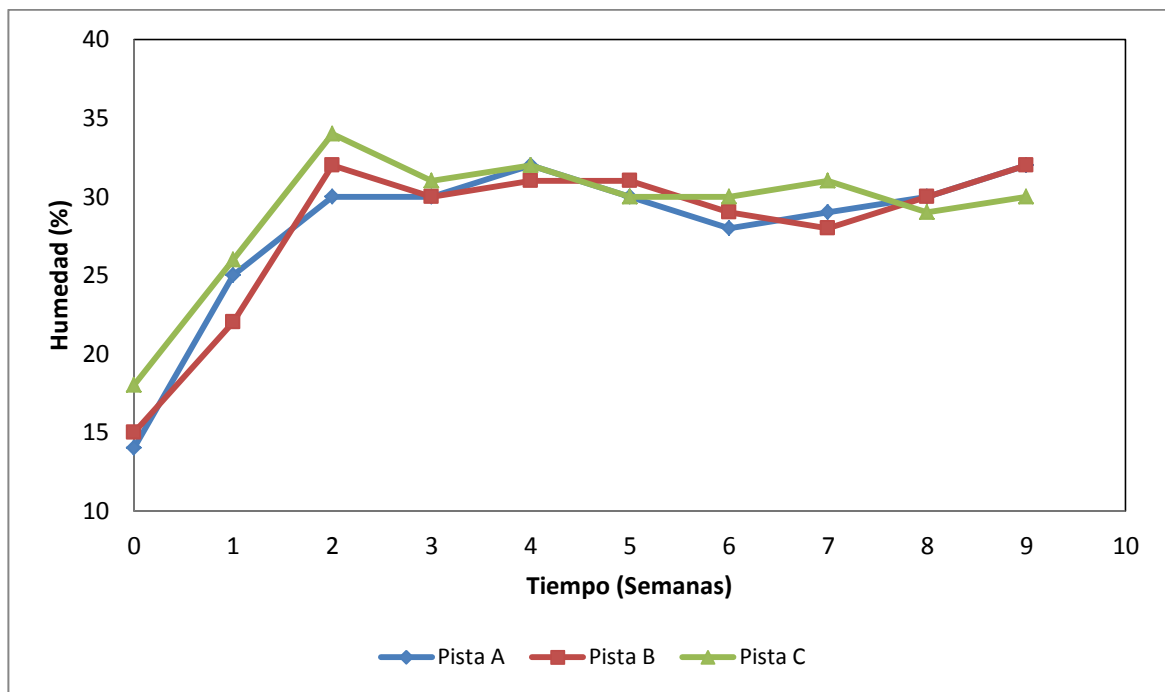
Lo anterior permitió corroborar los datos obtenidos en la primera fase del desarrollo experimental (prueba a escala laboratorio) y establecer que el parámetro de humedad juega un papel fundamental en el proceso de biorremediación microbiana implementado. Por esta razón, se hace necesario

mantener en un sistema de control y seguimiento rigurosos del comportamiento de esta variable.

Tabla 26. Resultados del comportamiento de la Humedad durante la prueba a escala piloto

Prueba piloto de Biorremediación en campo			
Análisis realizado en laboratorio			
Refinería			
Parámetro evaluado: % de humedad			
Periodicidad: Semanal			
Prueba No	Pista A	Pista B	Pista C
0	14	15	18
1	25	22	26
2	30	32	34
3	30	30	31
4	32	31	32
5	30	31	30
6	28	29	30
7	29	28	31
8	30	30	29
9	32	32	30

Gráfica 9. Variación de la humedad del suelo durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos a escala piloto



7. CONCLUSIONES

La estrategia de implementación inicial del ensayo de tratabilidad y escalamiento a una prueba piloto en campo, permitió validar los resultados obtenidos y establecer oportunidades de mejora durante el desarrollo del proceso de biorremediación en campo.

La implementación de la técnica de bioestimulación mediante la adición del nutriente líquido T7 (N, F, K) en la pista C durante la fase de la prueba piloto en campo, propicio condiciones de mejoramiento de la cinética de la degradación del hidrocarburo contenido en el suelo contaminado, alcanzando altos porcentajes de remoción en un tiempo de 10 semanas en proceso de biorremediación .

El proceso de biorremediación microbiana implementado con la aplicación de la técnica de bioaumentación por medio de la adición al suelo contaminado de un consorcio microbiano desarrollado exclusivamente para este proyecto, permitió alcanzar tasas de biodegradación significativas y porcentajes de remoción de hidrocarburos en promedio de 71% durante un periodo de diez (10) semanas.

La aplicación de la tecnología de biorremediación microbiana *in situ* en procesos de descontaminación del pasivo ambiental “antigua área de tratamiento biológico ATB) representa una alternativa ecológica y económica frente a las alternativas existentes para desarrollar un tratamientos *ex situ* que requieren del traslado de la contaminación al área de tratamiento seleccionada.

El proceso de biorremediación microbiana llevado a cabo en este trabajo de aplicación, pone de manifiesto una remoción de hidrocarburos contenidos en suelos contaminados en un período de tiempo corto (10 semanas) frente a otras tecnologías que demandan una mayor inversión económica y tiempo de tratamiento.

La adición de fertilizantes inorgánicos como nitrógeno, fósforo y potasio, aumentan la capacidad degradativa de los microorganismos.

La reintroducción de microorganismos nativos tiene mayor efectividad en la biodegradación de crudo de petróleo, cuando el microorganismo dispone de fertilizantes inorgánicos.

8. RECOMENDACIONES

La tecnología de biorremediación microbiana propuesta en este proyecto de aplicación, se convierte en una alternativa viable técnica y económicamente para ser implementada en la descontaminación del pasivo ambiental existente en la antigua área de tratamiento biológico ATB de la Gerencia Refinería de Barrancabermeja.

Continuar explorando en la generación de consorcios microbianos a partir de microorganismos nativos presentes en las áreas contaminadas, en razón a que estos tienen mayor poder degradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático del consorcio es más completa y por tanto ofrece mayores probabilidades de degradación de hidrocarburos en áreas contaminadas.

Para aumentar la eficiencia de la técnica de bioestimulación el trabajo incorporo la aplicación de un nutriente líquido T7, sin embargo se recomienda que esta medida deba implementarse preferiblemente cuando previamente se tenga establecido toda la batería enzimática para degradar hidrocarburos de los microorganismos nativos presentes en las áreas objeto de estudio.

La aplicación sistemática de la técnica de bioestimulación por medio de la adición de nutriente, podría generar riesgos toxicológicos para el proceso de biorremediación, para lo cual se recomienda realizar la experimentación requerida para determinar con un a mayor precisión las cantidades de aplicación específica requerida para un proceso de biorremediación microbiana.

Los estudios de degradación para valorar el potencial y condiciones medioambientales para el éxito de la biorremediación de un lugar contaminado, deben de ser desarrollados bajo condiciones controladas para poder determinar

los porcentajes de remoción del contaminante, bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas en el lugar. Por lo tanto, los estudios deben comprender el monitoreo de parámetros como temperatura, humedad del suelo, aireación y estatus de nutrientes.

BIBLIOGRAFIA

ABALOS A. y Col. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

ABALOS, A; VIÑAS, M; SABATÉ, J; MANRESA, MA; SOLANAS, AM. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation. 15(4): 249-60.

ABED, RM; SAFI, NM; KÖSTER, J; DE BEER, D; EL-NAHHAL, Y; RULLKÖTTER, J; et al. (1998). Microbial diversity of near alkybenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* so. HB 1017. Bull Environ Contam Toxicol. 60(2): 329-34.

ABED, RMM; KÖSTER, J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. Int Biodeterior Biodegr. 55:29-37.

AISSLABIE J. 1998. Potencial of biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. Applied and Environmental Microbiology. 49(2): 210-214.

AL-HASAN, RH; AL-BADER, DA; SORKHOH, NA; RADWAN, SS. (1998). Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. Mar Biol. 130: 521-7.

ATLAS RM. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbial Rev. 45: 180-209.

ATLAS, RM; BARTHA, R. Stimulated. (1973). Biodegradation of oil slick using oleophilic fertilizers. Environ Sci Technol. 7: 538-41.

BELLOSO C. 1999. Enhancement of hydrocarbons biodegradation rate during landfarming using exogenous microorganisms: A Field study. Ex situ Biological Treatments Technologies. Battelle Press (8): 64-76. USA.

BELLOSO C. 1999. Hydrocarbons biodegradation in landfarming soil using exogenous microorganisms obtained from different sources; a field study. Alleman B. C. y A. Lenon (Eds.) Bioreactor and Ex Situ Biological Treatments Technology. Battelle Press (5): 75-80. USA.

BLACKBURN, JW; HAFKER, WR. (1993). The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. Trends Biotechnol. 11: 328-33.

BORDENAVE, S; GONI-URRIZA, MS; CAUMETTE, P; DURÁN, R. (2007). Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. Appl Environ Microbiol. 73: 6089-97.

BRACHO M. y Col. 2004. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos con petróleo en el estado de Zulia. Revista N°3- División de Medio Ambiente. Venezuela.

BRIDIE, A; BOS, J. (1971). Biological degradation of mineral oil in sea water. J Inst Petrol. 57: 270-7.

Centro de Investigación del Petróleo CEINPET. La Habana, Cuba. 2011

CERNIGLIA, CE; GIBSON, DT; VAN BAALEN, C. (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. Biochem Biophys Res Commun. 88(1):50-8.

_____. (1980). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. J Gen Microbiol. 116: 495-500.

CHEN, CI; TAYLOR, RT. (1997). Batch and fedbatch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. Appl Microbiol Biotechnol. 47: 726-33.

CHIKERE CB, Mar 2011. Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcosms during nutrient-enhanced bioremediation.

COHEN, Y; CASTENHOLZ, RW; HALVORSON, HO; editors. (1984). Microbial mats. Stromatolites. New York: Alan R Liss Inc.

COHEN, Y; ROSENBERG, E, editors. (1989). Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities. Washington DC: American Society for Microbiology.

COULON F, Sep 2012 Effect of fertilizer formulation and bioaugmentation on biodegradation and leaching of crude oils and refined products in soils. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Febrero 11 de 2013.

COUTO MN, Sep 2012. Role of natural attenuation, phytoremediation and hybrid technologies in the remediation of a refinery soil with old/recent petroleum hydrocarbons contamination. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Febrero 11 de 2013.

DAVIS, JB. (1967). Petroleum Microbiology. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. P. 34-536.

DEYTA A. y SAVAL S. 1999. Biodegradación de BTX a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. Instituto de Ingeniería. Coordinación de Bioprocesos Ambientales. Universidad Autónoma de México. Pág. 452. México.

DUA, M; SINGH, A; SETHUNATHAN, N; JOHRI, AK. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Appl Microbial Biotechnol. 59 (2-3): 143-52.

DYKSTERHOUSE, SE; GRAY, JP; HERWIG, RP; LARA, JC; STALEY, JT. (1995). *Cyclocasticus pugetii* gen. nov., sp. Nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. Int J Syst Bacteriol. 45(1): 116-23.

ECOPETROL. Plan de Manejo Ambiental PMRB. 2010

ENGELHARDT, MA; DALY SWANNELL, RP; HEAD, IM. (2001). Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. Nov. J Appl Microbiol. 90(2): 237-47.

ERCOLI, G; GÁLVEZ, J. Paola P; CANTERO, J; VIDELA, S; MEDAURA, M. et al. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

ESCALANTE R. 2002. Biodegradación de Crudo de Petróleo en Terrarios. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

FEITKENHAUER, H; MÜLLER, R; MÄRKL, H. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation*. 14: 367-72.

FENG ZZ, Jul 2012. Microbial degradation of fomesafen by a newly isolated strain *Pseudomonas zeshuii* BY-1 and the biochemical degradation pathway. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Febrero 08 de 2013.

FIELD, JS; JONG, E; FEIJOO-COSTA DE BONT, Jam. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol*. 11: 44 -9.

FONSECA, F. Bioil: (1995). Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar. Tesis en opción al título de Máster. Universidad de la Habana, Cuba.

GADD, GM. (1992). Metals and microorganism: a problem of definition. *FEMS Microbiol Lett*. 100: 197-204.

GAUTHIER, MJ; LAFAY, B; CHRISTEN, R; FERNANDEZ, L; ACQUAVIVA, M; BONIN, P; et al. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol*. 42(4): 568-76.

GILEWICZ, M; NI`MATUZHROH, NADALIG, T, BUDZINSKI, H; DIUMENQ, P; MICHOTEY, V. et al. (1997). Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methyphenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol*. 48(4): 528-33.

GLAZER, AN; NIKAIDO H. (2007). Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. 8: 510-28.

GOLYSHIN, PN; CHERNIKOVA, TN; ABRAHAM, WR; LÜNSDORF, H; TIMMIS, KN; YAKIMOV, MM. (2002). *Oleiphilaceae* fam. Nov, to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. Nov., a navel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52(Pt 3): 901-11.

GRIFOLL, M; SELIFONOV, SA; GATLIN, CV; CHAPMAN, PJ. (1995). Actions of a versatile fluorine degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl Environ Microbiol. 61: 3711-23.

GRÖTZSCHEL, S. KÖSTER, J; ABED, RM; DE BEER, D. (2002). Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. Biodegradation. 13(4): 273-83.

GRUIZ, K; KRISTON, E. (1995). In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. J Soil Contam. 4: 163-73.

HÄGGBLOM, M; VALO, R. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: Young L, Cerniglia C, editors. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. New York: John Wiley & Sons, P. 389-434.

HARAYAMA, S; KASAI, Y; HARA, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr Opin Biotechnol. 15(3): 205-14.

HARTMAN, L. (1999). Historical development of wastewater treatment processes. In: J Winter, editor. Biotechnology-Environmental processes I. Weinheim: Wiley-VCH.

HUNKELER, D; HÖHENER, P; ZEYER, J. (2002). Engineered and subsequent intrinsic *in situ* bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. J Contam Hydrol. 59(3-4): 231-45.

IN, Joseph; CAPO, MS. BELLOTA, M. (1994). Ramos Y, Ramos I, Fuentes M. Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la plataforma cubana. Ciencias Biológicas. 27: 137-48.

Instituto Colombiano del Petróleo – ICP. Caracterización del área del ATB. 2010

JUNTEAU, P; BISAILLON, JG; LÉPINE, F; RATHEAU, V; BEAUDET, R; VILLEMUR, R. (2003). Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. Biodegradation. 14: 31-40.

KIM, JS; CROWLEY, D. (2007). Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. Appl Environ Microbiol. 73: 4579-91.

LAGREGA, MD; BUCKINGHAM, PL; EVANS, JC; (2001). Environmental Resources Management group. Hazardous waste management. 2nd ed Boston: McGraw – Hill; P. 7-23.

LEAHY, JG, COLWELL, RR. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev. 54(3): 305-15.

LEÓN, N; INFANTE, C; ARIAS, M; MÁRQUEZ, M; GORRIN, A. (1998). Biodegradability of Venezuela crude oils. SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production, 7-10, Caracas, Venezuela.

LLADÓ S, Oct 2012. A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Febrero 05 de 2013.

LOPOLITO M. y Col. 2005. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo y compuestos relacionados. Instituto nacional de ciencias y técnicas hídricas. Argentina.

M., Alexander. (1999). Biodegradation and bioremediation. 2nd Ed. New York: Academic Press.

M., Robert; MERCADÉ, E; C., Andrés; ESPUNY, MJ; MANRESA, MA; GUINEA, J. (1991). Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Grasas aceites. 42: 1-7.

MACCORMACK, WP; FRAILE, ER. (1997). Caracterización of a hydrocarbon degrading psychrophilic Antarctic Bacterium. Antarct Sci. 9: 150-5.

MACHIN J. 1999. Efecto de la Bioestimulación en la Biodegradación de Hidrocarburos de un suelo contaminado, en reactores de Fase Semisólida. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 365. México.

MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER J., Brock. (2004). Biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid: Prentice Hall Iberia (Madrid). P. 986.

MAIER, R. (2002). Microorganisms and organic pollutants. In: Maier R, Pepper IL and CP Gerba, editors. Environmental Microbiology. San Diego, CA: Academic Press. P 363-400.

MANSY, AE; EL-BESTAWY, E. (2002). Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. World J Microbiol Biotechnol. 18: 125-31.

MARGESIN R. y SCHINNER F. 2001. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation of Diesel-oil contaminated soil in Alpine Glacier Skiing area. U.S.A. Applied and Environmental Microbiology. 67(7).

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; (1999). Biological decontamination of oil spills in cold environments. J. Chem Technol Biotechnol. 74: 381-9.

MAUGERI, TL; GUGLIANDOLO, C; CACCAMO, D; STACKEBRANDT, E. (2002). Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. Syst Appl Microbiol. 25(3): 450-5.

MERINO F. 1998. Estudio de microorganismos nativos productores de Emulsificantes de Petróleo. Tesis para optar al título de Magister. UNMSM. Lima-Perú.

MISHRA S. y JIOT J. 2001. In situ bioremediation potential of an oily sludge degrading bacteria consortium. Current Microbiology. 43: 328-335.

MOAT, AG; FOSTER, JW. (1995). Microbial Physiology. 3rd. ed New York: John Wiley.

MORALES D., MACHIN C. y Trejo M. 1999. Biodegradación de Petróleo Crudo tipo Maya en Medio Acuoso. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 410. México.

MORGAN N. y Col. 2005. Biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos de petróleo. Revista cubana de Medio ambiente. Cuba.

MURADA, MA; MIRÓN, J; GONZÁLEZ, MP. (1996). Tratamiento microbiológico de la contaminación por petróleo en ambientes marinos. Estudio de su posible optimización. En: Seguimiento de la contaminación producida por el accidente del buque Aegean Sea. Centro de Publicaciones, Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. P. 168-85.

NÁPOLES, J. (2005). Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidad de Oriente, Cuba.

NÁPOLES, J; ÁVALOS, A. (2008). Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos (Internet). Monografías de la Universidad de Oriente, (cited 13 Jun 2010). Available from: <http://monografías.uo.edu.cu/index.php/monografías/article/view/4/6>. Fecha de consulta: Enero 10 de 2013.

NÚÑEZ, R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Cuba.

NWACHUKWU S. 2001. Bioremediation of Sterile Agricultural Soils Polluted with Crude Petroleum by application of de soil bacterium, *Pseudomonas putida*, with Inorganic Nutrient Supplementation. *Current Microbiology*. 42: 231-236.

OLIZYM. Productos de biotecnología de última generación para la biorremediación acelerada de los derivados del petróleo. 2004 Sep (cited 2010 Sep 7), Available from: <http://ecobiotec.com/Spainintro.html>. Fecha de consulta: Enero 08 de 2013

ORTIZ A., QUINTERO R. y TREJO R. 1999. Biodegradación de Petróleo Crudo Maya en Fase Sólida. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 412. México.

OTREMBA, Z; TOCZEK, H. (2002). Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and aquatorial factors. Polish J Environ Stud. 11(5): 555-9.

PARALES R. y DITTY J. 2000. Toluene degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene. Applied and Environmental Microbiology. 66(9): 4098-4104.

PARDO J. y Col. 2004. Afecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo- a nivel laboratorio. Revista de medio ambiente y microbiología de suelos. Méjico.

POLLARD, SJT; HENEDAY, SE; FEDORAK, PM. (1994). Bioremediation of petroleum-and creosote-contaminated soils; a review of constrains. Waste Manage Res. 12: 173-94.

PRASAD, KS, KUMAR, NS, SHARMA, S. (2010). Bioremediation: Developments, current practices and perspectives. Genet Eng Biotechnol J.; 1-20.

PRENAFETA – BOLDÚ, FX; SUMMERBELL, R; SYBREN DE HOOG, G. (2006). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev. 30(1): 109-30.

PRESCOTT, LM; HARLEY, JP; KLEIN, DA. (2002). Microbiology. Fundamentals of applied microbiology: 1012-4.

PROSKURIAKOZ, VA; DRABKIN, AE. (1984). Química del petróleo y del gas. Moscú: Mir.

RADWAN, SS; AL-HASSAN, RH. (2000). Oil pollution and cyanobacteria. In: Whitton BA, Patts M, editors. The ecology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. P. 307-19.

RAGHUKUMAR, C; VIPPARTY, V; DAVID, JJ; CHANDRAMOHAN, D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 57(3): 433-6.

RODRÍGUEZ GALLEGO, José Luis. Universidad de Oviedo. Disponible en www.ingenierosdeminas.org/docu/documentos/biorremediacionexxonvaldes.pdf. p.24. Fecha de consulta: Febrero 13 de 2013

RODRÍGUEZ, S; FERNÁNDEZ, M; BERMÚDEZ, RC; MORRIS, H. (2003). Tratamiento de influentes industriales coloreados con *Pleurotus* sp. Rev Iberoamer Micol. 20(4): 164-8.

SABATER, J; VIÑAS, M; VÁSQUEZ, A; SOLANAS, AM; GANDARILLAS, C; VÁSQUEZ, V; (2001). et al. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. Residuos. Revista técnica. 59: 78-82.

SANTIESTEBAN, A. Qué es el petróleo.

SARUBBI, AJ. Biorremediación. Aspectos de importancia (cited 2004 Nov 23). Available from: <http://www.aidisar.org/index.html>. Fecha de consulta: Enero 15 de 2013

SCHULTZ, H. Using. (1996). Bioremediation to help clean-up the Exxon Valdez oil spill. Dec 2 (cited 2009 Apr 14). Available from: gwyn.tux.org/pub/tux/hschultz/paper.doc. Fecha de consulta: Enero 18 de 2013

SEMPLE, KT; REID, BJ; FERMOR, TR. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ Pollut.* 112: 269-83.

SHAGAS-SPINELLI AC, Dic 2012 .Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Enero 20 de 2013

SILVA-CASTRO GA, Feb 2013, Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Enero 22 de 2013

SINGH B, Ago 2012. Biodegradation of oil spill by petroleum refineries using consortia of novel bacterial strains. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Enero 21 de 2013

SIRON, R; PELLETIER, E; BROCHU, C. (1995). Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold sea water. *Arch Environ Contamin Toxicol.* 28: 406-16.

SONG, HG; WANG, X; BARTHA, R; (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spill. *Appl Environ Microbiol.* 56: 652-6.

STAL, LJ; CAUMETTE, P; editors. (1994). Microbial mats: structure, development and environmental significance (NATO ASI Series/Ecological Sciences). Berlín: Springer-Verlag.

STRONG, PJ, BURGESS, JE. (2008). Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. *Bioremediat J.*; 12: 70-87.

SUTTON NB, Dic 2012, Biodegradation of aged diesel in diverse soil matrixes: impact of environmental conditions and bioavailability on microbial remediation capacity. www.pubmed.org. Fecha de consulta: Enero 23 de 2013

VAN HAMME, JD; SINGH A, Ward OP. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4): 503-49.

VIGUERAS, JG. (2007). Estudio de la respuesta fisiológica de hongos filamentosos al crecer con sustratos gaseosos de diferentes grados de hidrofobicidad. Tesis para la obtención del grado de Master en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

VIÑAS, M; SABATÉ, J; ESPUNY, MJ; SOLANAS, AM. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 71: 7008-18.

VOLKE T., VELASCO J. 2003. Biodegradación de hidrocarburo de petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Centro nacional de Investigación y capacitación Ambiental. México.

WATANABE, K. (2001). Microorganism relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 12(3): 237-41.

WHYTE, LG; BOURBONNIÉRE, L. GREER, CW. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both

alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. Appl Environ Microbiol. 63: 3719-23.

WHYTE, LG; HAWARI, J; ZHOU, E; BOUNBONIÉRE, L; INNIS, WE; GREER, CW. (1998). Biodegradation of variable-chain length alkanes at low temperatures by psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Appl Environ Microbiol. 64(7): 2578-84.

YAKIMOV, MM; GIULIANO, L; GENTILE, G; CRISAFI, E; CHERNIKOVA, TN; ABRAHAM, WR; et al. (2003). *Oleispira antarctica* gen. Nov., sp. Nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. Int J Syst Evol Microbiol. 53(Pt 3): 779-85.

YAKIMOV, MM; GOLYSHIN, PN; LANG, S; MOORE, ER; ABRAHAM, WR; LÜNSDORF, H; et al. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. Nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. Int J Syst Bacteriol. 48 Pt 2: 339-48.

YAN, GA; JIANG, JW; WU, G; YAN, X. (1998). Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. Bull Environ Contam Toxicol. 60(2): 329-34.

YOUNG, L; CERNIGLIA, C. (1995). Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. 1 st ed. New York: Jhon Wiley & Sons. P. 629.

ZHUANG, WQ; TAY, JH; MASZENAN, AM; TAY, ST. (2003). Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. Water Sci Technol. 47(1): 303-8.

ZILSTRAA, GJ, KUKOR, JJ. (2005). what is environmental biotechnology? Curr Opin Biotech; 16(3): 243-5.

ZOBELL, CE. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol Rev.* 10:1-49.

ZUCCHI M. y Col. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil polluted soil. *Journal of Applied Microbiology.* 94 (2): 248-257.

ANEXOS

ANEXO A. Ficha técnica Oil-free

FICHA TÉCNICA OIL-FREE
SECCIÓN 1. Identificación del producto: OIL-FREE Fabricado por: ÁLVARO LEGUIZAMÓN, Biotecnología Aplicada Extractos Botánicos Dirección: Calle 128 # 57 – 42 Telefax. 2 533 719 Bogotá Email: alvaro_leguizamon@yahoo.com
SECCIÓN 2. Información del producto. Nombre del Producto: Oil-free Nombre Comercial: Oil-free Nombre Químico: Inoculante consorcio microbiológico para la digestión y reducción de hidrocarburos Tipo del producto: Agente biodegradable a base de microorganismos. Producido bajo pedido específico del cliente.

Biotransformación y biorremediación de lodos provenientes de extracción de crudo por medio de la metodología de inoculación del sustrato y posterior Land-farming para biorremediar los lodos procedentes de extracción de crudo con tecnologías alternativas (microbiología aplicada a soluciones ambientales).

Oil-Free es un producto que contiene microorganismos benéficos, que por sus diversos procesos bioquímicos y metabólicos ayuda a digerir y reducir la concentración de hidrocarburos en los sustratos a tratar. Compuesto por microorganismos de tipo benéfico, no alteran los ecosistemas donde son aplicados.

Por tanto, es un inoculante estabilizante de elección acelera la biorremediación de este tipo de sustrato por diferentes vías metabólicas y bioquímicas, tiene características que son de total interés para este tipo de proceso.

Altas concentraciones por c.c., que aseguran mayor capacidad de transformación y homogeneidad sobre el sustrato, además de volúmenes de aplicación bajos.

Estabilidad del producto.

Seguridad en su aplicación: Compuesto por microorganismos inocuos para el ambiente y los seres vivos.

SECCIÓN 3. Propiedades fisicoquímicas.

Apariencia: Liquido

Color: Transparente - Amarillo

pH: 5 ± 7

Solubilidad en H₂O: 100%

Olor: Fuerte – Lixiviados

SECCIÓN 4. Composición.

Producto compuesto por 8 cepas de microorganismos vivos de los grupos: lacto bacilos, levaduras, estreptococos y espora formadores en concentración 1×10^{10} U.F.C. por ml.

SECCIÓN 5. Información de seguridad.

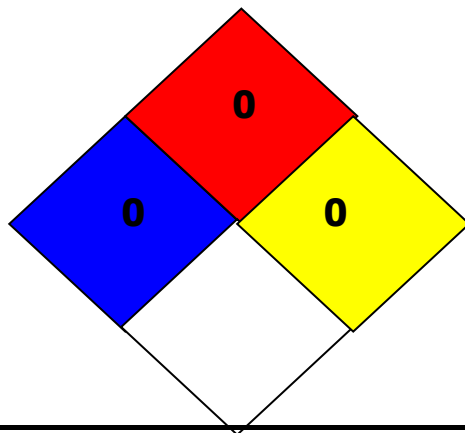
No es un producto inflamable. No genera vapores contaminantes. No corrosivo. Si el contacto es con los ojos, lavar con abundante agua y buscar asesoría médica. En caso de ingestión, Beber abundante agua y buscar asesoría médica. Mantener fuera del alcance de los niños.

Manipular medidas de protección personal adecuadas, como se ilustra en la etiqueta del producto.

Información de ingrediente. Producto alcalino, no posee materiales peligrosos.

Ácido Alquilbencenosulfónico lineal 40%, éter monobutílico del etilenglicol 20%, Sal sódica del ácido silícico 10 % y Agua 30%.

Identificación de riesgos.



Indicaciones adicionales sobre los riesgos para personas y el medio

ambiente: El producto no representa riesgo alguno para las personas y/o el medio ambiente; está compuesto de microorganismos benéficos como los lacto bacilos, levaduras, estreptococos y espora formadores en concentración de 1×10^{10} ufc/ml.

Medidas contra incendios.

Sustancias extintoras apropiadas

CO₂, polvo químico seco o agua a presión y/o espuma.

Equipo especial de protección: No requiere medidas especiales

Medidas en caso de derrame accidental.

Medidas preventivas relativas a personas: No es necesario

Medidas para la protección del medio ambiente: No es necesario

Procedimiento de limpieza: Mediante un chorro de agua rociada.

Información de manejo y almacenaje.

Manipulación: No requieren medidas especiales.

Protección de incendios y explosiones: No requieren medidas especiales.

Almacenamiento: Temperatura ambiente.

Almacenar separado de medicamentos, desinfectantes y en especial de antibióticos.

Almacenar en los envases originales bien cerrados en lugares frescos.

Controles de exposición y protección personal.

Instrucciones para el acondicionamiento de instalaciones técnicas: Sin datos adicionales

Componentes con valores límite admisibles que deban controlarse: el producto no contiene sustancias con valores límites que exijan un control en el puesto de trabajo.

Equipo de protección individual: Medidas generales de protección e higiene: las requeridas para la manipulación de productos agros biológicos.

Protección respiratoria: No requerido

Protección de ojos, manos y cuerpo: No requerido

Estabilidad y reactividad.

No se descompone

Incompatible con medicamentos, desinfectantes y antibióticos

No se conocen reacciones peligrosas

No presenta productos de degradación.

Información toxicológica. Producto inocuo para la salud humana.

Información ecológica. Producto inocuo para los animales y las plantas

ANEXO B. Resultados laboratorio certificado

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16	
		Página 1 de 1	



Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1659 de 2011, en los parámetros pH, DBO₅, DQO, SST, fenoles, SAAM, grasas y aceites en aguas, metales totales y disueltos en aguas, metales totales en suelos y toma de muestras puntuales y compuestas



Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 5534 de 2010, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano

Informe de resultados No.	12-510	Fecha de emisión:	Septiembre 28 de 2012
Ciente:	DEBBIE CADENA		
Dirección del cliente:	Universidad Industrial de Santander / Maestría Química Ambiental		
Solicitud de servicio No.	12-449	No. de muestras:	01
Fecha de recepción de las muestras:	Agosto 17 de 2012		
Muestras recibidas por:	Johanna Riveros		
Fecha de análisis:	Agosto 22 de 2012 – Agosto 30 de 2012		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-449-01	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Suelo Contaminado		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Refinería de Barrancabermeja / ATB		
Fecha del muestreo:	Agosto 17 de 2012		

PARAMETRO	RESULTADO	NORMA 29B*	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	49,70	<1%	Extracción Soxhlet / Gravimétrico

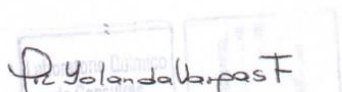
Observaciones: Ninguna

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comuniquen con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Revisó y aprobó:


Luz Yolanda Vargas Fralio
Directora del Laboratorio
Química. Msc Química UIS
MP PQ 1144

Elaboró: Johanna Riveros

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009
Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;
laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 1 de 3	



"Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1659 de 2011, en los parámetros pH, DBO₅, DQO, SST, fenoles, SAAM, grasas y aceites en aguas, metales totales y disueltos en aguas, metales totales en suelos y toma de muestras puntuales y compuestas"



"Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 5534 de 2010, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano"

Informe de resultados No.	12-509	Fecha de emisión:	Septiembre 28 de 2012
Cliente:	DEBBIE CADENA		
Dirección del cliente:	Universidad Industrial de Santander / Maestría Química Ambiental		
Solicitud de servicio No.	12-495	No. de muestras:	02
Fecha de recepción de las muestras:	Septiembre 17 de 2012		
Muestras recibidas por:	Johanna Riveros		
Fecha de análisis:	Septiembre 17 de 2012 – Septiembre 21 de 2012		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-495-01	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Suelo Contaminado Puente Caliente		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Refinería de Barrancabermeja / ATB		
Fecha del muestreo:	Septiembre 16 de 2012		

PARAMETRO	RESULTADO	NORMA 29B*	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	18,64	<1%	Extracción Soxhlet / Gravimétrico
pH (Unidades de pH)	7,26	6-9	Potenciométrico
Conductividad (µS/cm)	2080	<4000	Conductivimétrico
Cinc (mg Zn/Kg)	1283	<500	Absorción Atómica
Arsénico (mg As/Kg)	0,060	10	Absorción Atómica / Generación de Hidruros
Selenio (mg Se/Kg)	66,0	10	Absorción Atómica / Generación de Hidruros
Mercurio(mg Hg/Kg)	0,18	10	Absorción Atómica / Generación de Hidruros
Plomo (mg Pb/Kg)	63,8	500	Absorción Atómica
Cromo Total (mq Cr/Kg)	27,0	500	Absorción Atómica
Cadmio (mq Cd/Kg)	1,10	10	Absorción Atómica
Cromo Hexavalente (mg/Kg)	<L.D.	5	Espectrofotométrico
Bario (mq Ba/Kg)	57,9	20000	Absorción Atómica
RAS	2,27	<12	Cálculo Matemático
PSI	2,22	<15	Cálculo Matemático

NOTA: Los resultados se encuentran reportados en base seca

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222

Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009

Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;

laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co

Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 2 de 3	

Informe de resultados No. 12-509

Solicitud de servicio No. 12-495

PARAMETRO	RESULTADO	NORMA 29B*	METODO
Cloruros (mg Cl ⁻ /Kg)	654	-----	Argentométrico
Calcio (mg Ca/Kg)	7852	-----	Absorción Atómica
Magnesio (mg Mg/Kg)	2034	-----	Absorción Atómica
Sodio (mg Na/Kg)	878	-----	Absorción Atómica
Plata (mg Ag/Kg)	<0,33	-----	Absorción Atómica
Humedad (%)	39,25	-----	Gravimétrico

2. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-495-02	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Suelo Contaminado Mezclado		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Refinería de Barrancabermeja / ATB		
Fecha del muestreo:	Septiembre 16 de 2012		

PARAMETRO	RESULTADO	NORMA 29B*	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	17,3	<1%	Extracción Soxhlet / Gravimétrico

L.D: Limite de Detección del Cromo Hexavalente = 0,006 (mg Cr⁺⁶/L)

*** Referencia: Norma 29B del Estado de Louisiana, Estados Unidos de América, Sept. 1999 y Diciembre de 2008**

Observaciones: Ninguna

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
 Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009
 Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;
laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co
 Bucaramanga - Colombia

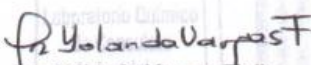
	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 3 de 3	

Informe de resultados No. 12-509

Solicitud de servicio No. 12-495

Estimado cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Revisó y aprobó:


Luz Yolanda Vargas Fiallo
Directora del Laboratorio
Química. Msc Química UIS
MP PQ 1144

Elaboró: Johanna Riveros

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16	
		Página 1 de 4	



"Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1659 de 2011, en los parámetros pH, DBO₅, DQO, SST, fenoles, SAAM, grasas y aceites en aguas, metales totales y disueltos en aguas, metales totales en suelos y toma de muestras puntuales y compuestas"



"Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 5534 de 2010, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano"

Informe de resultados No.	12-643	Fecha de emisión:	Diciembre 11 de 2012
Cliente:	DEYBY CADENA		
Dirección del cliente:	Maestría en Química Ambiental		
Solicitud de servicio No.	12-626	No. de muestras:	06
Fecha de recepción de las muestras:	Noviembre 19 de 2012		
Muestras recibidas por:	Johanna Riveros		
Fecha de análisis:	Diciembre 03 de 2012		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-01	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 4		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 4		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	11,28	Extracción Soxhlet

2. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-02	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 4		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 4		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	6,97	Extracción Soxhlet

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
 Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009
 Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;
laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co
 Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 2 de 4	

Informe de resultados No. 12-643 Solicitud de servicio No. 12-626

3. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-03	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 4		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 4		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	21,41	Extracción Soxhlet

4. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-04	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 5		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 5		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	8,10	Extracción Soxhlet

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 3 de 4	

Informe de resultados No. 12-843 Solicitud de servicio No. 12-828

5. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-05	Tipo de muestra:	Puntual
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 5		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 5		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	4,18	Extracción Soxhlet

6. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-626-06	Tipo de muestra:	Puntual
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 5		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 5		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	14,58	Extracción Soxhlet

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16	
		Página 4 de 4	

Informe de resultados No. 12-643

Solicitud de servicio No. 12-626

Observaciones: *Ninguna*

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Revisó y aprobó:



Luz Yolanda Vargas Fiallo
Directora del Laboratorio
Química. Msc Química UIS
MP PQ 1144

Elaboró: *Johanna Riveros*

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16	
		Página 1 de 7	



"Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1659 de 2011, en los parámetros pH, DBO₅, DQO, SST, fenoles, SAAM, grasas y aceites en aguas, metales totales y disueltos en aguas, metales totales en suelos y toma de muestras puntuales y compuestas"



"Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 5534 de 2010, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano"

Informe de resultados No.	12-642	Fecha de emisión:	Noviembre 09 de 2012
Cliente:	DEYBY CADENA		
Dirección del cliente:	Maestría en Química Ambiental		
Solicitud de servicio No.	12-604	No. de muestras:	12
Fecha de recepción de las muestras:	Noviembre 06 de 2012		
Muestras recibidas por:	Johanna Riveros		
Fecha de análisis:	Noviembre 08 de 2012		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-01	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 0 -100912		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 0 - 100912		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	30,69	Extracción Soxhlet

2. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-02	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 1- 21012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 1- 21012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	18,94	Extracción Soxhlet

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222

Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009

Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;

laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co

Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16	
		Página 2 de 7	

Informe de resultados No. 12-642

Solicitud de servicio No. 12-604

3. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-03	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 2 -051012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 2 -051012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	17,34	Extracción Soxhlet

4. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-04	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista A Muestra 3 -191012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista A Muestra 3 -191012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	13,11	Extracción Soxhlet

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222

Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009

Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;

laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co

Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 3 de 7	

Informe de resultados No. 12-642

Solicitud de servicio No. 12-604

5. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-05	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 0 -100912		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 0 -100912		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	15,21	Extracción Soxhlet

6. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-06	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 1 - 210912		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 1 - 210912		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	10,78	Extracción Soxhlet

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222

Conmutador: (7) 6344000 Ext. 2465. Telefax: (7) 6349009

Página web: <http://ciencias.uis.edu.co/lqci/> E-mail: labquimco@gmail.com;

laboratorioquimicodeconsultas@uis.edu.co

Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 4 de 7	

Informe de resultados No. 12-642

Solicitud de servicio No. 12-604

7. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-07	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 2-051012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 2-051012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	6,12	Extracción Soxhlet

8. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-08	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista B Muestra 3 191012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista B Muestra 3 191012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	7,28	Extracción Soxhlet

	LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 5 de 7	

Informe de resultados No. 12-642

Solicitud de servicio No. 12-604

9. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-09	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 0 - 100912		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 0 - 100912		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	27,14	Extracción Soxhlet

10. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-10	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 1- 210912		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 1 -210912		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	25,53	Extracción Soxhlet

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 6 de 7	

Informe de resultados No. 12-642

Solicitud de servicio No. 12-604

11. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-11	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 2-051012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 2-051012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	20,59	Extracción Soxhlet

12. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	12-604-12	Tipo de muestra:	Compuesta
Identificación de la muestra:	Pista C Muestra 3- 191012		
Matriz de la muestra:	Suelo		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Pista C Muestra 3- 191012		
Fecha del muestreo:	No Suministrado		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Hidrocarburos Totales (%)	22,43	Extracción Soxhlet

	LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 7 de 7	

Informe de resultados No. 12-642 Solicitud de servicio No. 12-604

Observaciones: *Ninguna*

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Revisó y aprobó:



Luz Yolanda Vargas Fiallo
Directora del Laboratorio
Química. Msc Química UIS
MP PQ 1144

Elaboró: *Johanna Riveros*

ANEXO C. Abono Liquido T 7



Fertilizantes : Químicos
Químico Orgánicos
Líquidos

HOJA DE DATOS SOBRE SEGURIDAD DE MATERIAL FERTILIZANTE T-7

I INFORMACION DEL PRODUCTO Y LA COMPAÑIA

NOMBRE DEL PRODUCTO : Fertilizante T-7
TIPO DE PRODUCTO : Fertilizante liquido mezcla de sales simple en disolución
CLASIFICACION: No peligroso
OTRAS REGULACIONES : Ninguna
NOMBRE DE LA COMPAÑIA : ASEQUIMAGRO
DIRECCION: Fabrica km 27 via la Costa , Portachuelo , finca la Fortuna.
TELEFAX : 6413505
USO DEL PRODUCTO : Fertilizante , Nutriente de microorganismos beneficios

II INFORMACION SOBRE LA COMPOSICION

Sales de Cloruro de Potasio, Fosfatos de Amonio y Urea disueltas y balanceadas en solucion acuosa en mezcla fisica , sin reaccion quimica

III IDENTIFICACION DE RIESGOS

La clasificacion se hace en base a los riesgos de los componentes

CLASIFICACION DE RIESGOS EN CASO DE EMERGENCIA

Indice de riesgo (NFPA)	Escala de clasificacion
Fuego = 0	0= minimo
Especial =0	1= Ligero
Salud = 1	2 = Moderado
Reactividad = 0	3= Grave

IDENTIFICACION DE RIESGO DE MATERIALES (HMIS III)

Identificación de riesgo (HMIS III)	Escala de clasificacion
Salud = 1	Posibilidad de irritacion en piel, ojos y mucosas
Inflamabilidad =0	El producto liquido acuoso no es combustible
Riesgo fisico = 0	Los componentes en mezcla y disueltos en agua normalmente son estables en condiciones normales , solo sometidos a calentamiento muy fuerte pueden generar vapores de amoniaco , no se polimerizan ni reaccionan entre si mismos

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 via al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97

IV DIAMANTE DE SEGURIDAD

Hacerlo salud 1 inflamabilidad 0 reactividad 0

IDENTIFICACIÓN PELIGROS de acuerdo a las propiedades de los componentes

Efectos salud agudos potenciales :

Piel: contacto repetido o prolongado puede causar irritación.

Ingestión: puede causar trastornos gastrointestinales, náuseas , vomito , diarrea, dolor de cabeza y confusión

Ojos y piel :

Ojos: irritante fuerte.

Piel: Ligeramente irritante. Contacto repetido o prolongado puede causar enrojecimiento, picor e inflamación.

Inhalación: Puede causar irritación de las vías respiratorias, aunque no se han notificado incidentes

Ingestión: Puede causar trastornos gastrointestinales. Los síntomas pueden incluir irritación, náusea,vómitos y diarrea.

Efectos de salud crónicos

potenciales :

Ninguno conocido. La urea se encuentra de forma natural en el cuerpo. Es un producto final de metabolismo proteínico y se excreta en la orina. el Cloruro de Potasio se utiliza en reemplazo del Cloruro de Sodio en la sal dietética y los Fosfatos de amonio se utilizan en medicamentos y en alimentos como refrescos

Listas de cancerigenidad Monografía IARC: No **NTP:** No **OSHA:** No **Reactividad Salud**

Riesgo específico

Código NFPA

No aplica por ser producto m preparado especialmente

Sección V – Medidas en caso de incendio

Punto repentino: no pertinente **Temperatura autoignición:** no pertinente

Límite explosivo más bajo: no pertinente **Límite explosivo más alto:** no pertinente

Riesgos de explosión y de

fuego poco corrientes:

Al calentar por encima de 130 C se generan vapores de Amoníaco provenientes de la Urea.

Breve exposición a gases puede conducir a irritación de las mucosas por el efecto pungente del Amoníaco

Medios de extinción:

Todos los sistemas estándar son aceptables. Use método de extinción adecuado para el fuego circundante. El material no se quema .

Equipo y procedimiento

especiales contra incendios:

Puede haber emisión de sustancias tóxicas irritantes durante una descomposición termal (sometida primero a una a evaporación del solvente Agua) de los componentes especialmente por la Urea de presentarse esta situación los bomberos expuestos deben protegerse con aparatos respiratorios aprobados por NIOSH con

protección de cara entera y traje completamente protector

- Medidas de desprendimiento accidental

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 vía al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97

Pequeño derrame:

Si no está contaminado, se recupera y se reusa como producto.

Gran derrame: Por ser producto fertilizante no causa daño a la vegetación sino beneficioso, en fuentes de agua crea efecto de Eutrofización (crecimiento de algas, Plancton) y se diluye fácilmente sin afectar la vida animal derrames.

Notas de

desprendimiento:

Si el derrame llegara accidentalmente a cualquier masa de agua, incluyendo los riachuelos intermitentemente para fuente de agua potable póngase en contacto con las autoridades locales.

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Ventilación: en condiciones normales de almacenamiento no necesita ventilación

Manipulación:

Evite contacto con los ojos. Evite contacto repetido prolongado con la piel o la ropa. No deben llevarse lentes de contacto.

Almacenamiento:

Almacene en contenedores cerrados en una área fresca, seca, no mezcle con sustancias incompatibles como álcalis que pueden generar vapores de Amoníaco e hipocloritos que pueden generar sustancias tóxicas. Evite la contaminación con otros materiales.

Precauciones especiales/Procedimientos/ Instrucciones en etiqueta:

Evite contenedores, cañerías o accesorios de latón, bronce u otras aleaciones o metales galvanizados diferentes al acero o plástico ya que es ligeramente corrosivo.

Sección IV – Medidas de primeros auxilios

Ojos: Limpie rápidamente con agua. Los párpados se deben apartar del globo ocular para asegurar un lavado completo. Si la irritación persiste, consulte un médico inmediatamente.

Piel: Limpie el área de contacto completamente con agua y jabón. Lave la piel con agua fría. Lave la ropa antes de reusarla.

Ingestión:

No provoque el vómito. Procure que la persona afectada esté caliente y trátela por choque. Obtenga atención médica.

Inhalación: Aparte la persona afectada de la fuente de exposición. Si no respira, asegúrese de abrir vía de aire e inicie RCP. Si la respiración es difícil, administre oxígeno; si puede, obtenga atención médica.

CONTROLES DE EXPOSICIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL

Controles de ingeniería: Utilizar material de acero o plástico para manipulación

Protección ojos: Lleve lentes de seguridad cuando se manipule

Ropa protectora:

Lleve lentes de seguridad o anteojos químicos para evitar contacto con los ojos. No lleve lentes de contacto cuando trabaje con esta sustancia. Disponga de lugar para lavar los ojos allí donde pueda ocurrir el contacto con los ojos.

Protección respiratoria

Normalmente no es necesaria. El equipo respiratorio aprobado por NIOSH debe estar disponible para uso no rutinario y de emergencia.

Otro equipo o ropa protectora: Normalmente no es necesario.

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 vía al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97

– PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Apariencia / Color / Olor:

líquido, transparente o ligeramente turbio color café
con ligero olor de amoníaco.

Punto de ebullición: 130°C

Solubilidad en agua: miscible

Gravedad específica: 1,18 **Peso molecular:** No pertinente

Densidad vapor: No pertinente **% Volátiles:** No pertinente

Densidad general: 1,18 g/ml **Índice de evaporación:** No pertinente

pH: 6,8-7,2 **Punto de congelación:** No pertinente

Viscosidad: No pertinente

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad: Estable

Polimerización peligrosa: No ocurrirá

Condiciones a evitar: Puede hidrolizarse lentamente en carbamato amónico después de un período largo de tiempo en el que se descompone en amoníaco y dióxido de carbono.

Materiales a evitar

(incompatibles):

Evitar contacto con oxidantes fuertes o bases.. Reacciona con

hipoclorito sódico o cálcico para formar tricloruro de nitrógeno Evitar contacto con hipocloritos.

Productos de

descomposición peligrosa:

Se descompone en amoníaco, biuret, óxidos de nitrógeno y óxidos de carbono. Puede reaccionar con hipocloritos para formar el explosivo tricloruro de nitrógeno.

INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

Principales vías de

exposición: Ojos, vía digestiva, vía respiratoria, piel.

Toxicidad oral aguda: Datos de los componentes del producto

Urea (rata) LD50=14,300-15,000 mg/kg; (ratón) LD50 = 11,500-13,00 mg/kg;(ganado) LD50 = 510 mg/kg. Cloruro de Potasio (rata) LD50=2600-4000 mg/kg; Fosfato de Amonio Mono y Dibásico LD50 = 6500 mg/Kg , LD50 dermico = 7950 mg/kg (raton)

Toxicidad aguda por

inhalación: Datos no disponibles

Toxicidad aguda: Otras vías: Datos no disponibles

Toxicidad cutánea aguda: Datos no disponibles

Toxicidad dosis repetida: (rata) 24 semanas; cutánea – NOAEL = 40% en ungüento

Toxicidad en

animales:

Irritación/corrosión piel/ojos: Irritación/corrosión piel: ratón – no irritante (solución 10%)

Irritación/corrosión ojos: conejo – no irritante (solución 50%)

No se declaró tóxica por exposición oral tal como lo define OSHA para sus componentes

Basado en datos de toxicidad para otro compuesto (nitrato amónico), no

se espera que sea tóxica por exposición cutánea e inhalación tal como lo define OSHA.

Toxicidad en reproducción: No hay efectos tóxicos en gónadas de ratón hasta 6.750 mg/kg al día.

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 vía al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97

No hay efectos tóxicos en gónadas de rata hasta 2.250 mg/kg al día.

Toxicidad en

desarrollo/teratología: No es teratológico.

Otros efectos en humanos:

A pesar del uso médico extenso, no se han declarado efectos secundarios significativos en humanos de sus componentes.

Observaciones especiales sobre efectos crónicos en humanos:

No hay efectos crónicos conocidos de sus componentes.

Observaciones especiales sobre otros efectos en humanos:

Puede ser irritante no sensibiliza la

piel. A pesar del uso médico extenso, no se han declarado efectos secundarios significativos en humanos.

INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Valoración toxicidad ecológica EPA:

Toxicidad aguda en peces: 96 -h: (*Barillius barna*) LC50 = > 9,100 mg/L. especialmente de la Urea

Toxicidad crónica en peces: No hay datos disponibles

Toxicidad aguda en invertebrados

acuáticos: (*Daphnia magna*): 24 - h EC50: > 10,000 mg/L. especialmente de la Urea

Toxicidad en plantas acuáticas: efecto conocido en agronomía con intoxicación por excesos no se presentan por ser los tres principales elementos que necesitan los vegetales para su desarrollo, se genera efecto de Eutrofización (crecimiento acelerado de algas)

Toxicidad en bacteria: (lodo activo): No hay datos disponibles

Toxicidad en organismos que viven en el suelo:

Aplicaciones de fertilizantes Nitrogenados y Fosforados en prados durante un largo período puede tener efectos nocivos en lombrices en ausencia de encalado.

Toxicidad en otras especies

terrestres no mamíferos:

(Paloma)- Subcutáneo-LDLO=16,000 mg/kg. Puesto que la urea se utiliza como fertilizante, puede promover eutrofización en masas de agua. No es tóxico en organismos acuáticos tal como lo define USEPA.

Ecotoxicidad:

Toxicidad en plantas terrestres: 7 días de exposición a 0 mg urea / hoja - necrosis de la punta de la hoja

Estabilidad en agua: T1/2 > 1 año.

Estabilidad en suelo: se incorpora al agregado del suelo y entra a formar parte del mismo por mecanismos de intercambio iónico los cuales en agronomía son beneficios.

Resultado

medioambiental:

No hay toxicidad en organismos acuáticos tal como se define en USEPA. No hay toxicidad conocida.

Biodegradación: La Urea es definitiva biodegradable (OECDTG 302B) 93-98% (SCAS)

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 vía al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97



Fertilizantes: Químicos
Químico Orgánicos
Líquidos

24 hr) para los otros componentes (Cloruro de potasio y fosfato de Amonio) no aplica por ser sales inorgánicas

CONSIDERACIONES SOBRE LA ELIMINACIÓN

Eliminación del producto:

La eliminación del producto puede estar sujeta a regulaciones locales, estatales o federales.

Comentarios generales:

Los usuarios deben revisar sus operaciones en términos de regulaciones y leyes locales, estatales o federales aplicables, y después consultar con las agencias reguladoras apropiadas antes de liberar o eliminar material de desecho. pero en términos generales no tiene consecuencias nocivas en el medio ambiente, se puede en pequeñas cantidades utilizar para fertilizar praderas, árboles, cultivos comerciales y desarrollo comercial de camarón agregándolo en las piscinas para alimentación del plancton que sirve de alimentación al camarón

INFORMACIÓN SOBRE TRANSPORTE

Nombre envío adecuado: No regulado No regulado

Categoría de riesgo:

Número de identificación:

Grupo envasado (nombre técnico):

Etiquetaje:

Envasado autorizado:

Observaciones:

Transportar en recipientes de acero inoxidable o plástico de alta densidad

Producto químico CAS NO.

CLASIFICACIÓN Y SÍMBOLO DE PELIGRO

WHMIS:

Este producto no está controlado por WHMIS

LISTA DE DIVULGACIÓN DE INGREDIENTES:

Este producto no contiene ingrediente(s) de esta lista.

PROTECCIÓN MEDIOAMBIENTAL:

Todos los ingredientes intencionales salen en la lista DSL (Lista de Sustancias Domésticas).

EINECS#: (Urea) 200-315-5

California: Prop 65: No se conoce que este producto químico sea cancerígeno, y no sale en la lista.

OTRA INFORMACIÓN

Salud: 1

Incendio: 0 Reactividad: 0 Riesgos especiales: Valoración de riesgo

NFPA:

: 0 = Insignificante 1 = leve 2 = Moderado 3 = alto 4 = extremo

COMENTARIOS:

Este producto no lleva TSE/BSE (Encefalopatía Espongiforme Transmisible/Encefalopatía Espongiforme

Bovina). No se han utilizado constituyentes animales en la manufactura de sus componentes, (Aunque la información expuesta se ofrece de buena fe, ESTA INFORMACIÓN SE DA EXPRESAMENTE SIN NINGUNA GARANTÍA

(EXPRESADA O IMPLICADA) NI NINGUNA SEGURIDAD DE SU PRECISIÓN O SUFICIENCIA y el usuario la acepta a su propio

Nueva dirección Finca la Fortuna Km. 27 vía al mar. Portachuelo. Rionegro. Telefax 6413505. Cel 315 635 54 84 315 634 86 97



Fertilizantes: Químicos
Químico Orgánicos
Líquidos

riesgo. El usuario es el único responsable de determinar el uso apropiado en cada situación particular. PCS Sales específicamente
DECLINA TODA RESPONSABILIDAD POR EL USO DE ESTA INFORMACIÓN, incluyendo sin limitación cualquier recomendación que el usuario interprete e intente aplicar con la que infrinja o viole patentes, licencias o derechos de propiedad intelectual válidos.