

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS
CON CAPACIDAD PARA LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS
PRESENTES EN AGUAS DE PRODUCCIÓN PARA USO POTENCIAL COMO
AGUA DE RIEGO EN LOS LLANOS ORIENTALES**

PAOLA MAYERLY PIMIENTA RUEDA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS
CON CAPACIDAD PARA LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS
PRESENTES EN AGUAS DE PRODUCCIÓN PARA USO POTENCIAL COMO
AGUA DE RIEGO EN LOS LLANOS ORIENTALES**

PAOLA MAYERLY PIMIENTA RUEDA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN QUIMICA AMBIENTAL**

Directora:

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ PhD

Codirectora:

ASTRID LORELY PIMIENTA RUEDA MSc

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 GESTIÓN AMBIENTAL ASOCIADA A LA INDUSTRIA PETRÓLERA....	19
2.2 AGUA DE PRODUCCIÓN.....	25
2.2.1 Generalidades.....	25
2.2.2 Composición de las aguas de producción.....	26
2.2.3 Alternativas tecnológicas para el manejo y disposición de aguas de producción	27
2.3 BIODEGRACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	30
2.3.1 Generalidades.....	30
2.3.2 Vías de biodegradación de los hidrocarburos del petróleo	31
2.3.3 Factores que condicionan la biodegradación microbiana de hidrocarburos	34
2.3.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.	35
2.5 BIORREMEDIACIÓN	38
2.5.1 Generalidades.....	38
2.5.2 Biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos.....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	42
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA.....	43

3.2.1	Aislamiento y caracterización de los microorganismos del suelo en el área de influencia del ASA.....	44
3.2.1.1	Muestreo de agua y suelo.....	44
3.2.1.2	Siembra en medios nutritivo y basal inorgánico con hidrocarburo.	44
3.2.2	Selección de bacterias nativas con potencial de degradación de hidrocarburos.....	47
3.2.2.1	Siembra en medio enriquecido con suelo.	47
3.2.2.2	Selección de microorganismos por presión selectiva en presencia de hidrocarburo (adaptado de Gerhardt <i>et al.</i> , 1994 y Demain and Davies, 1999).....	48
3.3	EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DEGRADADORA DE LOS MICROORGANISMOS	50
3.3.1	Cinéticas de crecimiento y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo castilla.....	50
3.3.1.1	Cinéticas de crecimiento y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo castilla.....	52
3.4	SIMULACIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO (MESOCOSMOS) DE CONDICIONES TÍPICAS DEL SISTEMA ASA.....	54
3.4.1	Construcción del mesocosmos.	54
3.4.2	Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos en columna de suelo (mesocosmos).....	58
3.4.3	Caracterización bioquímica e identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos seleccionados en el mesocosmos.....	59
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DEL ASA	61
4.1.1	Aislamiento de los microorganismos del suelo.....	61
4.1.2	Recuento de microorganismos.....	64
4.2	SELECCIÓN DE BIOTA BACTERIANA NATIVA CON POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS PRESENTES EN EL AGUA DE	

PRODUCCIÓN (ADAPTADO DE GERHARDT <i>ET AL.</i> , 1994 Y DEMAİN AND DAVIES, 1999).....	65
4.2.1 Siembra en medio enriquecido con suelo.	65
5.2.2 Selección de microorganismos por presión selectiva en presencia de hidrocarburo (adaptado de Gerhardt <i>et al.</i> , 1994 y Demain and Davies, 1999).....	66
4.3 EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS DE LOS MICROORGANISMOS	68
4.3.1 Cinéticas de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo Castilla.....	68
4.4 SIMULACIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO (MESOCOSMOS) DE CONDICIONES TÍPICAS DEL SISTEMA ASA, PARA EVALUAR LA COLONIZACIÓN Y BIODEGRADABILIDAD DE LAS POBLACIONES SELECCIONADAS	75
4.4.1 Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos de los microorganismos en columna de suelo (mesocosmos).	75
4.4.2 Caracterización bioquímica e identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos seleccionados en el mesocosmos.....	79
5. CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS.....	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias biodegradadoras de hidrocarburos más publicadas en investigaciones de <i>screening</i>	37
Tabla 2. Características macro y microscópica de las colonias aisladas en Agar Nutritivo a partir de las muestras de suelo del ASA.....	62
Tabla 3. Características macro y microscópicas de las colonias aisladas en medio selectivo de las muestras de suelo del ASA.....	63
Tabla 4. Recuentos microbianos obtenidos en los diferentes medios de cultivo, a partir de las muestras de suelo del ASA.....	64
Tabla 5. Características macro y microscópica de las colonias aisladas en medio enriquecido con extracto de suelo 10%.....	66
Tabla 6. Características macro y microscópica de las colonias recuperadas a partir de los subcultivos 3 y 4 (presión selectiva).....	68
Tabla 7. Resultados de cinética de crecimiento y de consumo de hidrocarburos (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, pH 7.2, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas).....	69
Tabla 8. Resultados de Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos en columna de suelo en Mesocosmos de suelo (Columnas de acrílico 60 cm alto x 20 cm diámetro con 20 Kg de suelo ASA parcela de caucho, riego de 561 mL/día, 30°C, 90 días).....	77
Tabla 9. Identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos recuperados del mesocosmos (Placa múltiple de 96 pozos con revelador cromogénico, incubación 24 horas, 30°C).....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrategia de Gestión Ambiental Ecopetrol – ICP 2013-2020	19
Figura 2.	Campo de producción Superintendencia Castilla - Chichimene	22
Figura 3.	Ubicación geográfica Distrito de Adecuación de Tierras, DAT	23
Figura 4.	Distrito de Adecuación de Tierras - DAT.....	23
Figura 5.	Esquema general del Distrito Piloto de Adecuación de Tierras (DAT)	24
Figura 6.	Comparación de la producción de petróleo y agua de producción en un campo petrolero.	26
Figura 7.	Riego con agua de producción proveniente de pozos de metano de capas de carbón	29
Figura 8.	Distrito de Aguas de Cawelo, Texas	30
Figura 9.	Algunas vías de degradación del petróleo	32
Figura 10.	Ruta bioquímica de oxidación subterminal de alcanos	33
Figura 11.	Dinámica de crecimiento microbiano, para la desaparición del sustrato.	40
Figura 12.	Metodología experimental del proyecto	44
Figura 13.	Dilución seriada a partir de la muestra de suelo del ASA.	45
Figura 14.	Medio de cultivo basal inorgánico (MBS) suplementado con hidrocarburo (0.1%) del Campo Castilla	47
Figura 15.	Medio enriquecido utilizando medio basal inorgánico, suplementado con extracto de suelo 10%.....	48
Figura 16.	Presión selectiva por subcultivos en pases sucesivos.	49
Figura 17.	Esquema general para el montaje del mesocosmos	56
Figura 8.	Experimento preliminar de empacado de las columnas utilizando suelo del ASA	56
Figura 8.	Homogenización mecánica del suelo con tornillo sinfín.....	57
Figura 20.	Empacado de las columnas con suelo del ASA después de la homogenización mecánica con tornillo sinfín.....	57
Figura 21.	Cultivos en agar nutritivo, a partir de la muestra de suelo del ASA. ...	61

Figura 22. Observación microscópica de las colonias aisladas en Agar Nutritivo a partir de las muestras de suelo del ASA	62
Figura 23. Cultivo en medio selectivo, a partir de la muestra de suelo del ASA. .	63
Figura 24. Observación microscópica de las colonias aisladas en medio selectivo de las muestras de suelo del ASA	63
Figura 25. Subcultivos sucesivos para selección de los microorganismos con capacidad degradadora de hidrocarburo (Matraces de 500 mL, con 200mL de MBS+HC (0.01 a 1%) y extracto de suelo (10 a 0%), incubación a 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)	67
Figura 26. Cultivo en agar nutritivo, a partir de los subcultivos 3 y 4 (presión selectiva) (Matraces de 500 mL, con 200mL de MBS+HC (0.01 a 1%), incubación a 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas. Recuperación por dilución seriada y siembra en agar MBS+HC y Agar Nutritivo).....	68
Figura 27. Cinética de crecimiento microbiano y consumo de hidrocarburos a escala de laboratorio (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)	70
Figura 28. Detalle de Cinética de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburo a escala de laboratorio (sin control negativo). (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, agitación orbital de 120 rpm, .	74
Figura 29. Montaje final de la cinética de crecimiento microbiano y degradación del hidrocarburo en mesocosmos (columnas de acrílico 60 cm alto x 20 cm diámetro con 20 Kg de suelo ASA parcela de caucho, riego de 561 mL/día,	76
Figura 30. Cinética de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburo en Mesocosmos en suelo (sin control negativo). (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas).....	78
Figura 31. Cultivo en Agar Nutritivo de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	80
Figura 32. Tinción de Gram <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	82
Figura 33. Cultivo en Agar Nutritivo de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> recuperada a partir de las muestras del mesocosmo	82
Figura 34. Tinción de Gram <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	83

Figura 35. Crecimiento de *Pseudomonas sp.* en agar King B.....83
Figura 36. Tinción de Gram de *Pseudomonas sp.*.....84

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Toma de muestras de agua y suelo en el ASA.....	98
Anexo B. Caracterización de aguas residuales industriales salida del campo castilla ii y cuerpos de agua superficiales naturales en el área de influencia del ASA	112
Anexo C. Cálculos de velocidad específica de crecimiento, velocidad de consumo de hidrocarburos y productividad para cada una de las condiciones experimentales.....	132
Anexo D. Cálculos de velocidad específica de crecimiento, velocidad de consumo de hidrocarburos y productividad en el mesocosmos.....	134
Anexo E. Reportes de caracterización bioquímica e identificación de microorganismos degradadores con Sistema Biolog®	136
Anexo F. Pruebas bioquímicas en la microplaca de Biolog®.....	144

RESUMEN

TITULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS CON CAPACIDAD PARA LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS PRESENTES EN AGUAS DE PRODUCCIÓN PARA USO POTENCIAL COMO AGUA DE RIEGO EN LOS LLANOS ORIENTALES*

AUTOR: PAOLA MAYERLY PIMIENTA RUEDA**

PALABRAS CLAVES: Agua de producción, Biodegradación, Hidrocarburos, Microorganismos Nativos, Mesocosmos, Riesgo de cultivos.

La extracción de petróleo y gas genera grandes cantidades de agua de producción, la cual a su vez contiene diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto se hace necesario implementar sistemas de manejo y disposición final que garanticen la calidad del ecosistema en el área de incidencia.

En los Llanos Orientales colombianos en el departamento del Meta, se encuentra ubicado el campo Castilla, operado por Ecopetrol, donde actualmente se producen 460 mil barriles diarios de agua en promedio, lo que equivale a casi cinco barriles de agua por cada barril de crudo producido (Hoyos, 2010). Esta situación ha llevado a la implementación del ASA (Área de Sostenibilidad Agroenergética, antes llamada DAT (Distrito de Adecuación de Tierras), con una extensión inicial de 46 Ha, para la disposición final de una parte del agua producida en el pozo. El agua de producción previamente tratada, es vertida sobre un terreno como agua de riego para cultivos.

La presente investigación tuvo como objeto aislar y caracterizar la microbiota edáfica con potencialidad para degradar hidrocarburos presentes en el agua de producción vertida en el ASA, y forma parte de un mcaro proyecto que adelanta Ecopetrol, para determinar la factibilidad técnica del sistema de disposición a largo plazo.

Se logró aislar y caracterizar un consorcio de microorganismos nativos (Consortio ASA), con capacidad para degradar los hidrocarburos presentes en el agua de producción del campo Castilla. Se determinó la capacidad de biodegradación a escala de laboratorio y piloto (mesocosmos), alcanzando porcentajes de remoción entre 70 y 80%, lo que representa una potencial utilización de los microorganismos aislados, para procesos de tratamiento continuo en el ASA.

* Tesis de grado

** Facultad De Ciencias. Escuela De Química. Directora: Claudia Cristina Ortiz López PhD

ABSTRACT

TITLE: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOIL MICROORGANISMS CAPABLE FOR BIODEGRADATION OF THESE WATERS IN OIL PRODUCTION AS POTENTIAL FOR IRRIGATION WATER IN THE EASTERN PLAINS*

AUTHOR: PAOLA MAYERLY PIMIENTA RUEDA**

PALABRAS CLAVES: Water production, Biodegradation, Hydrocarbons, Native microorganisms, Mesocosm, Crop irrigation.

The oil and gas extraction generates large amounts of produced water, which also contains various organic and inorganic compounds. Therefore it is necessary to implement management systems and disposal to ensure the quality of the ecosystem in the area of incidence.

In the Llanos Orientales Colombia in the department of Meta, is located the Castilla field operated by Ecopetrol, which currently 460,000 barrels of water are produced on average, equivalent to almost five barrels of water per barrel of oil produced (Hoyos, 2010). This situation has led to the implementation of the ASA (formerly called DAT), with an initial area of 46 hectares, for the disposal of a portion of the produced water in the well. The pretreated water production is dumped on land and irrigation water for crops.

The purpose of this research was to isolate and characterize the edaphic microbiota with potential to degrade hydrocarbons in water poured into the ASA production, and is part of a macro project that is being developed by Ecopetrol, to determine the technical feasibility of the long term disposal system.

It was possible to isolate and characterize a consortium of native microorganisms Consortium (ASA) with the ability to degrade hydrocarbons in water production Castilla field. Biodegradability was determined at laboratory scale and pilot (mesocosms) reaching removal percentages between 70 and 80%, representing a potential use of the isolates, to continuous processes for the ASA treatment.

* Tesis de grado

** Facultad De Ciencias. Escuela De Química. Directora: Claudia Cristina Ortiz López PhD

INTRODUCCION

Los campos petroleros maduros se caracterizan en general por la generación de grandes cantidades de agua de producción. Aproximadamente, por cada barril de petróleo, se generan como mínimo tres barriles de agua (Hoyos, 2010). En países como Estados Unidos, el agua de producción representa el 98% de los residuos generados por la industria petrolera (Veil, *et al* 2004); como producto de la operación se eliminan alrededor del 30 y el 40% del agua producida; sin embargo, los avances tecnológicos deben apuntar hacia la transformación y aprovechamiento de este pasivo económico como un recurso viable (Arnold *et al*, 2004).

La generación de grandes cantidades de agua de producción, sumada a la necesidad de contar con alternativas de eliminación, conduce a estudiar la utilización de esta agua para irrigación, uso industrial y otras aplicaciones. Las soluciones de manejo se centran en mantener el equilibrio del sistema de producción completo (pozos inyectores, pozos de producción y el sistema de manejo del agua); así como también el impacto ambiental que se puede dar en su disposición final.

El agua es un recurso renovable. Sin embargo en ciertas zonas, la demanda agrícola, el crecimiento de la población y los cambios climáticos han hecho que el agua dulce se consuma con mayor rapidez de la que se repone. Es así, que los 210 millones de barriles de agua producidos diariamente en las operaciones de petróleo y gas en el mundo, podrían desempeñar un rol clave en la mitigación de la demanda de agua dulce de nuestro planeta (Arnold *et al*, 2004).

En el campo de Castilla ubicado en el llano colombiano, departamento del Meta, y operado por Ecopetrol, los volúmenes de producción de crudo se han

incrementando a cerca de 130 mil barriles diarios. Por lo tanto ha aumentado el volumen de agua de producción, alcanzando los 460 mil barriles diarios de agua en promedio, equivalentes a casi cinco barriles de agua por cada barril de crudo producido (Hoyos, 2010).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este estudio se realizó la evaluación de una alternativa biológica para el tratamiento de las aguas de producción del campo Castilla. Se aislaron y caracterizaron microorganismos a partir de la microbiota edáfica nativa. Se evaluó la capacidad biodegradadora de hidrocarburos presentes en aguas producidas, previamente tratadas, para su vertimiento en un campo de cultivo –Área de Sostenibilidad Agroenergética, ASA- de los llanos orientales. Esta investigación formó parte de un proyecto técnico formulado por el Instituto Colombiano de Petróleo (ICP) para la Superintendencia de Operaciones Castilla – Chichimene (SCC) titulado: “Evaluación de riesgos e impactos ambientales asociados al riego de agua de producción en el asa del campo Castilla-Chichimene y su área de influencia”.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL.

Aislar y caracterizar microorganismos edáficos con capacidad para la biodegradación de los hidrocarburos presentes en aguas de producción y su posible uso posterior como agua de riego en la zona de los Llanos Orientales.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar y seleccionar la biota bacteriana nativa del suelo del ASA con capacidad de degradación de hidrocarburos.
- Evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos de los organismos seleccionados en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados para colonizar y degradar hidrocarburos en un sistema de escala de planta piloto (mesocosmos).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GESTIÓN AMBIENTAL ASOCIADA A LA INDUSTRIA PETRÓLERA

Dentro de la plataforma estratégica de Ecopetrol se incluye la responsabilidad corporativa, la cual busca que la operación de la empresa esté en armonía y equilibrio con el medio ambiente. Esta responsabilidad corporativa, se encuentra organizada en dos grandes líneas de trabajo, dentro de las cuales se encuentra “Gestión ambiental”, encaminada a cuidar el ambiente con un enfoque preventivo ante los desafíos ambientales mundiales.

En este contexto, Ecopetrol Instituto Colombiano del Petróleo-ICP, plantea la “Proyección de Desarrollo del Área Ambiental 2013-2020” la cual se encuentra organizada en cuatro estrategias: Excelencia Operacional; Viabilidad Ambiental; Gerenciamiento Ambiental de Agua y Gestión Ambiental Proactiva (Figura 1); asegurando con estas, la alineación corporativa con respecto al cumplimiento legal ambiental en la operación y en proyectos y la sostenibilidad de la empresa.

Figura 1. Estrategia de Gestión Ambiental Ecopetrol – ICP 2013-2020



Fuente: Instituto Colombiano del petróleo – ICP, 2013

El presente trabajo de investigación estaba incluido en la estrategia “Gerenciamiento Ambiental del Agua”, la cual busca mitigar el riesgo ambiental, dar cumplimiento a las normas legales y reducir los conflictos asociados al uso de agua y vertimientos. Una de las acciones propuestas dentro de esta estrategia, consideraba la identificación de alternativas viables para el manejo del agua de producción, entre las que se encuentran los sistemas agroforestales, que son áreas de sostenibilidad, destinadas para el cultivo de diversas especies nativas utilizando agua de producción, previamente tratada, para el riego.

Una de las áreas de mayor desarrollo de Ecopetrol, se encuentra en los Llanos Orientales, en donde específicamente la Superintendencia de Castilla-Chichimene presenta una proyección alta en la extracción de hidrocarburo y por tanto, de agua de producción. La disposición final de este residuo está limitada a un área específica limitada por disposición del Ministerio del Medio Ambiente, debido a la sensibilidad social y económica de la región a los vertimientos de gran volumen. Para superar esta condición, se identificó un piloto como área de disposición del agua de producción, mediante una estrategia de riego para el aprovechamiento agrícola. Dicha estrategia se enmarcó en la posibilidad de obtener cultivos aprovechables para producción de biocombustibles de primera y segunda generación, producción de biomasa para pirólisis y reserva forestal, entre otras; definiéndose ésta última como la alternativa a ejecutarse, denominada inicialmente Distrito de Adecuación de Tierras (DAT) y hoy, Área de Sostenibilidad Agroenergética (ASA).

Área de Sostenibilidad Agroenergética (ASA)

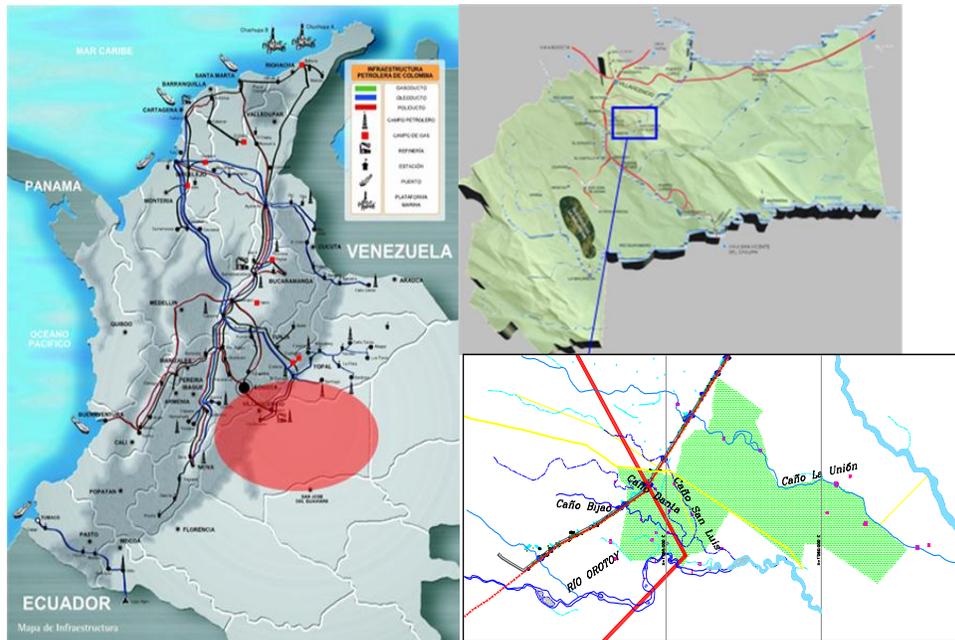
En el campo Castilla, ubicado en el llano colombiano, en el departamento del Meta, y operado por Ecopetrol de manera directa desde hace diez años (Figura 2), los volúmenes de producción de crudo se han incrementado a cerca de 130 mil

barriles diarios, lo que ha generado, debido a las condiciones de los yacimientos, aumento simultáneo en el agua asociada, llegando a los 460 mil barriles diarios de agua en promedio, es decir, un barril de crudo producido por casi cinco barriles de agua.

Ecopetrol, haciendo frente a las inquietudes planteadas por las comunidades que hacen parte del entorno de la operación en el Meta, inició en 2006 una alianza estratégica con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) para determinar, por medio de un monitoreo continuo y riguroso, el impacto de las aguas de producción en animales y especies vegetales.

Dicho monitoreo, se inició de manera controlada en las instalaciones del Centro de Investigación “La Libertad” de Corpoica, ubicado muy cerca al área operativa de Ecopetrol en Villavicencio. Para esto, se transportaban en promedio 3.000 galones de agua de producción, en carrotanques, de la Estación de Recolección Apiay hasta el centro de investigación, donde eran dispuestos para ser distribuidos en bebederos para el ganado y a minisistemas de riego para cultivos controlados de caña y sorgo. Posteriormente, se obtenían muestras de las plantas, del suelo y del ganado, las cuales eran sometidas a análisis de laboratorio, para determinar el impacto de las aguas de producción en los procesos de crecimiento y reproducción.

Figura 2. Campo de producción Superintendencia Castilla - Chichimene



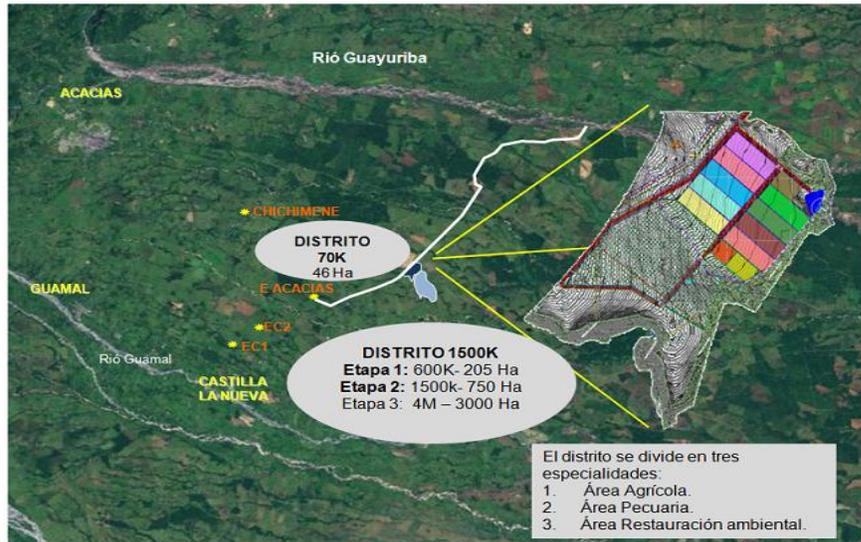
Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo ICP, 2011

Los resultados positivos de los monitoreos fueron la base para pensar un proyecto mucho más ambicioso. En sus inicios, el monitoreo se pensó como un estudio científico coyuntural que determinara hasta dónde el agua, los animales y algunas especies vegetales eran afectados por las aguas de producción del campo petrolero. Sin embargo, al obtener estos resultados, se vio la posibilidad de ampliar el estudio para validar el uso de las aguas de producción en sistemas de producción agropecuario, sacando el monitoreo de espacios controlados, a espacios abiertos o campos reales típicos de esta región del país.

Para continuar el proyecto, Ecopetrol y Corpoica firmaron en el 2009 un nuevo convenio de apoyo institucional, cuyo objetivo era hacer realidad un distrito de adecuación de tierras -DAT- en el cual se validara el uso de las aguas de producción en sistemas de producción agropecuaria (Adaptado de Hoyos, 2010)

(Figuras 3, 4 y 5). Desde finales del 2012, el DAT fue redesignado como Área de Sostenibilidad Agroenergética (ASA) (Instituto Colombiano del Petróleo ICP, 2013).

Figura 3. Ubicación geográfica Distrito de Adecuación de Tierras, DAT



Fuente: Instituto Colombiano del petróleo – ICP, 2011

Figura 4. Distrito de Adecuación de Tierras - DAT



Fuente: Instituto Colombiano del petróleo – ICP, 2011

Figura 5. Esquema general del Distrito Piloto de Adecuación de Tierras (DAT)



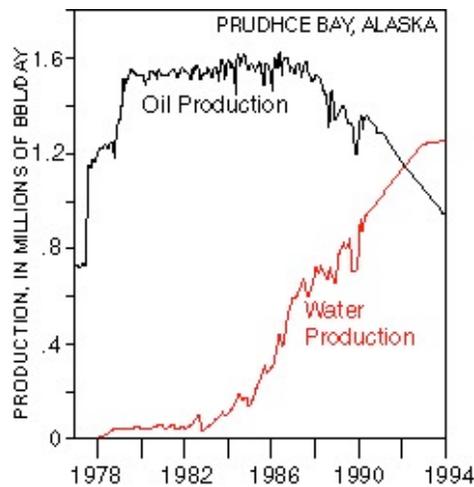
Fuente: Hoyos, 2010

2.2 AGUA DE PRODUCCIÓN

2.2.1 Generalidades. El agua de producción se define como el agua extraída de las capas del subsuelo durante el proceso de extracción de petróleo y/o gas (Veil, *et al* 2004; Admadun *et al*, 2009). En las formaciones del subsuelo, las rocas de origen natural son generalmente impregnadas de líquidos tales como agua, petróleo o gas (o alguna combinación de estos fluidos). Los hidrocarburos menos densos han emigrado a lugares trampa, desplazando un poco de agua de la formación para convertirse en yacimientos de hidrocarburos. Cuando los hidrocarburos se producen, son llevados a la superficie como una mezcla líquida. La composición de este fluido depende de si es petróleo crudo o gas natural, y por lo general incluye una mezcla de hidrocarburos líquidos y gaseosos, el agua producida, los sólidos disueltos o suspendidos, sólidos producidos como arena o limo, fluidos y aditivos inyectados que pueden haber sido colocados en la formación como resultado de las actividades de exploración y producción (Veil, *et al* 2004).

El agua producida representa el mayor volumen de los residuos asociados con las operaciones en la producción de petróleo y gas (Bonfá, 2011). De acuerdo con la *American Petroleum Institute* (API), unos 18 mil millones de barriles (bbl) de agua producida fueron generados por las operaciones de EE.UU. en tierra en 1995 (API 2000), así como grandes volúmenes en alta mar y en los miles de pozos en todo el mundo. En promedio, 210 millones de barriles de agua se producen cada día en todo el mundo. Este volumen representa alrededor de 77 mil millones de barriles de agua producida durante todo el año (Arnold *et al*, 2004; Yeung, 2011). Por lo general, en los pozos de petróleo y gas, el agua de producción aumenta con el tiempo. Alrededor de 7 a 10 barriles por cada barril de crudo (Figura 6).

Figura 6. Comparación de la producción de petróleo y agua de producción en un campo petrolero.



Tomado de: Summi, 2005

2.2.2 Composición de las aguas de producción. El agua de producción es una mezcla en la que se pueden encontrar: aceites y grasas, compuestos orgánicos tales como beneceno, naftaleno, tolueno, fenantreno, entre otros; así como también sales (principalmente cloruros y sulfuros de Ca, Mg, y Na) y algunos metales (Bario, Hierro, Estroncio, Zinc, Plata, Cadmio, Cobre, Mercurio, Arsénico, Boro y Antimonio) (Sirivedhin, 2004; Summi, 2005; Admadun *et al*, 2009).

Las propiedades físicas y químicas del agua de producción varían considerablemente dependiendo de la ubicación geográfica del campo, la formación geológica con la que el agua producida ha estado en contacto desde hace miles de años, y el tipo de hidrocarburo que se produce. Incluso, las propiedades y el volumen pueden variar durante la vida útil de un yacimiento. Si las operaciones de producción que se llevan a cabo incluyen inyección de agua, estas propiedades y los volúmenes pueden variar aún más dramáticamente (Veil, et al 2004).

2.2.3 Alternativas tecnológicas para el manejo y disposición de aguas de producción. Existen diferentes enfoques para la gestión del agua de producción. La opción más apropiada estará en función de varios factores, incluyendo la ubicación del sitio, la normativa vigente, la viabilidad técnica, el costo y disponibilidad de infraestructura y el equipamiento. Las alternativas principales que se utilizan actualmente son la reinyección subterránea, la descarga (vertimiento) y la reutilización con fines agrícolas o industriales (Admadun *et al*, 2009).

- **Reinyección subterránea.** El método más comúnmente utilizado para el tratamiento del agua en tierra es la reinyección en una formación subterránea. La mayoría del agua de producción (aproximadamente el 70%) se inyecta para mantener la presión del yacimiento (Sirivedhin, 2004). Esta práctica se conoce como agua de inundaciones, o si se calienta el agua para producir vapor, se conoce como agua de inundaciones de vapor. Históricamente, las fuentes hídricas se han utilizado para este propósito; pero ante la escasez de agua dulce que se presenta actualmente, el uso de agua de producción para este fin, puede desempeñar un rol clave en lo que respecta a aliviar la demanda impuesta sobre los sistemas naturales de agua dulce de nuestro planeta (Veil, *et al* 2004).

- **Reutilización con diferentes fines.** El tratamiento del agua de producción para su posterior reutilización, es una opción eficaz porque permite aprovechar el potencial que tiene este residuo. Así, cuando se utiliza para mejorar las prácticas agrícolas e industriales, el agua de producción deja de ser un residuo y se convierte en un recurso (Arnold *et al*, 2004).

El agua de producción tratada puede ser utilizada directamente como fuente de agua potable para animales como ganado, peces u otros silvestres; de hecho, el ganado puede tolerar una variedad de contaminantes en el agua potable (Admadun *et al*, 2009). Algunos proyectos que se han desarrollado en las Montañas Rocosas han creado embalses que recogen y retienen grandes

volúmenes de agua de producción. Estos embalses son una fuente de agua potable para la vida silvestre y ofrecen un hábitat para peces y aves acuáticas en un entorno árido. Los embalses también pueden proporcionar oportunidades recreativas adicionales para la observación de la caza, la pesca y paseos en bote (Veil, *et al* 2004).

Otra opción de reutilización del agua de producción, es en las prácticas de la industria. Por ejemplo, para el control del polvo en las carreteras y en zonas de actividad minera; para el lavado de equipos y vehículos; para la generación de energía (se utiliza para el abastecimiento de agua para producir vapor) y para la refrigeración de las centrales eléctricas; incluso para controlar incendios en zonas de sequías. Es probable que la gama de posibles usos para el agua de producción se ampliara en el futuro (Veil, *et al* 2004).

- **Estrategia de riego.** La utilización del agua en la agricultura representa como mínimo dos tercios del consumo global; sin embargo, actualmente los recursos tradicionales de aguas superficiales y subterráneas son escasos. De los más de 210 millones de barriles de agua de producción que se generan diariamente en las operaciones de petróleo y gas, entre un 30% y un 40% se consideran un residuo y se elimina. Sometidos a un tratamiento adecuado, estos 11.7 millones de m³ de agua de producción tienen el potencial de desempeñar un rol clave en lo que respecta a aliviar la demanda impuesta sobre los sistemas naturales de agua dulce (Arnold *et al*, 2004).

Es así como varias instituciones públicas y privadas en todo el mundo, adelantan estudios para el aprovechamiento del agua de producción de los campos petroleros, como estrategia de riego en el sector agropecuario. Por ejemplo, en la Universidad Estatal de Nuevo México (NMSU), los científicos están trabajando en conjunto con varias compañías de exploración y producción y con la Dirección de Administración de Tierras de EUA, en la selección de seis sitios para llevar a cabo

experimentos destinados a identificar variedades de hierbas con capacidad de crecimiento sostenido en el clima árido de Nuevo México. Estas hierbas serían sustentadas únicamente por las limitadas lluvias naturales y por irrigación con agua de producción en pozos de metano de capas de carbón como lo muestra la Figura 7 (Arnold *et al*, 2004).

Igualmente, en la Universidad de Texas A&M, College Station, Texas, EUA, un equipo de ingenieros y especialistas en tierras de pastoreos, suelos, especies silvestres e irrigación, está adelantando el proceso de irrigación de tierras de pastoreo con agua de producción. Se espera que cada vez más operadores apliquen tecnología de reutilización del agua en los próximos años. Se estima que para el año 2020, más de 10% del agua utilizada en Texas, provendrá de fuentes recicladas, representando un ahorro de hasta 115.000 m³/d (40 millones de galones por día) de agua dulce (Arnold *et al*, 2004).

Figura 7. Riego con agua de producción proveniente de pozos de metano de capas de carbón



Tomado de Arnold *et al*, 2004

Así mismo, en el Valle de San Joaquín en California, EUA, donde se encuentra ubicado el campo petrolero gigante *Kern River*, se tiene uno de los más grandes proyectos de reutilización del agua de producción, el Distrito de Aguas de Cawelo

(Figura 8), el cual recibe diariamente 69.300 m³ (436.000 barriles) de agua producida, provenientes de este campo maduro de Chevron Texaco. Una vez en el distrito, el agua es tratada y almacenada, para posteriormente ser utilizada en el riego de una variedad de cultivos incluyendo uvas, frutas cítricas, almendras y pistachos (Arnord, et al 2004).

Figura 8. Distrito de Aguas de Cawelo, Texas



(Tomado de Arnold, 2004)

2.3 BIODEGRACIÓN DE HIDROCARBUROS

23.1 Generalidades. El petróleo es un producto natural, que se origina por la transformación anaeróbica de la biomasa en condiciones de temperaturas y presión elevadas. La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, pero su biodegradación es relativamente lenta. La susceptibilidad a la biodegradación varía con el tipo y el tamaño de la molécula de hidrocarburo. La mayoría de los n-alcenos de longitud de cadena intermedia (C₁₀ – C₂₄) se degradan rápidamente. Los alcanos de cadena corta son tóxicos para la mayoría de los organismos, pero generalmente se evaporan de la capa de petróleo rápidamente. Los alcanos de cadena larga son más resistentes a la

biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta. Así mismo, la presencia de ramificaciones reduce la tasa de biodegradación, porque los átomos de carbono terciario y cuaternario interfieren con los mecanismos de degradación o la bloquean totalmente. Los compuestos aromáticos, especialmente los que son de tipo polinuclear condensado, se degradan más lentamente que los alcanos (Atlas y Bartha, 2002).

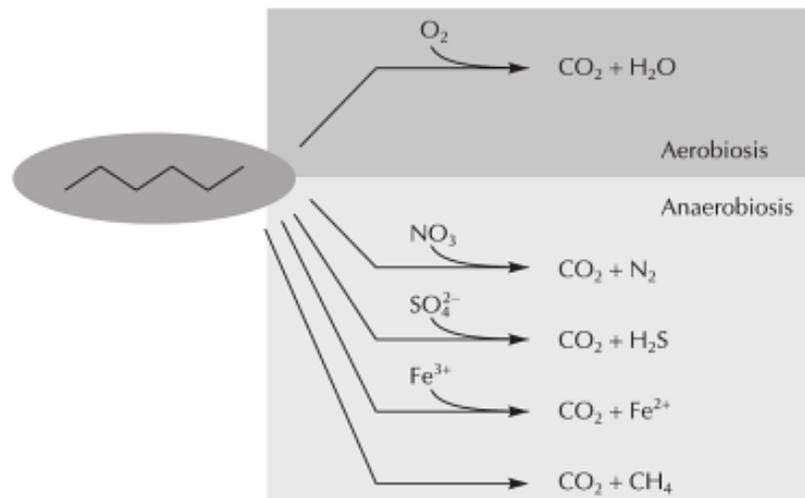
Por tal razón, para degradar hidrocarburos contaminante, por lo general se requiere de más de una especie de microorganismo, puesto que los microorganismos individualmente solo pueden metabolizar un rango limitado de compuestos, pero una población variada, con una amplia capacidad enzimática, favorece una mayor velocidad de degradación (Ghazali, 2004). Es decir, estos compuestos pueden ser degradados por co-metabolismo, cuando dos o más cepas microbianas, con capacidades metabólicas complementarias, actúan en cooperación (García-Rivero, 2008; Atlas y Bartha, 2002).

2.3.2 Vías de biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. Uno de los factores primordiales para que suceda la biodegradación, es la presencia de aceptores de electrones y nutrientes adecuados para mantener activos los microorganismos de la diferentes especies. Los microorganismos aerobios necesitan de la presencia del oxígeno molecular (condiciones óxicas) para su crecimiento y para convertir los hidrocarburos en CO_2 , H_2O y biomasa. Los microorganismos facultativos pueden crecer en la presencia (aerobiosis) ó ausencia (anaerobiosis, fermentación) de oxígeno (condiciones anóxicas). Los anaerobios estrictos utilizan diferentes aceptores, como nitratos (NO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}) y iones férricos (Fe^{3+}) para metabolizar los hidrocarburos. Otros anaerobios (aerotolerantes) crecen en presencia de concentraciones traza de oxígeno disuelto, pero no utilizan este gas metabólicamente. Además de eso, existen aquellos microorganismos que requieren aceptores de electrones específicos, como los fermentadores ó acetogénicos que utilizan acetatos

(CH_3COO^-) para convertir a los hidrocarburos en CH_4 y CO_2 , como se presenta en la Figura 9 (Feitosa, 2014; Castillo, 2005).

En la ausencia de aceptores de electrones, tales como sulfato y nitrato, los hidrocarburos son transformados en productos finales (CH_4 y CO_2) a través de la interacción de varios grupos de microorganismos como, por ejemplo, bacterias fermentativas, acetogénicas productoras de hidrógeno, metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas (Feitosa, 2014)

Figura 9. Algunas vías de degradación del petróleo



(Tomado de Castillo, 2005)

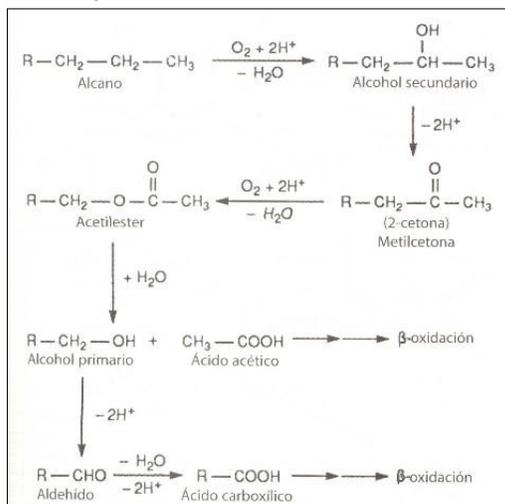
En los alcanos, el ataque inicial lo realizan enzimas que tienen una necesidad estricta de oxígeno molecular, como las monooxigenasas o dioxigenasas (Britton 1984, Singer y Finnerty 1984 en Atlas 2002). Frecuentemente, el ataque inicial se realiza sobre un grupo metilo terminal, formando un alcohol primario que, a su vez, se oxida posteriormente a un aldehído y un ácido graso. Una vez se forma un ácido graso, el catabolismo de la molécula continúa mediante la secuencia de la β -oxidación (Figura 9). El ácido graso de cadena larga se transforma en la forma de acetil CoA mediante una serie de reacciones posteriores y finalmente las unidades

de Acetil CoA se convierten en CO₂ a través del ciclo del ácido tricarboxílico. Por tanto, los productos finales de la mineralización de los hidrocarburos son CO₂ y H₂O. La secuencia de la β-oxidación no requiere la presencia de oxígeno molecular. Después de la oxigenación inicial, la degradación de los ácidos grasos puede suceder en condiciones anóxicas (Feitosa, 2014; Atlas y Bartha, 2002).

La biodegradación de compuestos aromáticos por microorganismos aerobios también es iniciada por la acción de oxigenasas (mono- ó dioxigenasas) que promueven la oxidación del sustrato formando dioles, seguida de clivaje del anillo y la formación de catecol que, posteriormente, es degradado formando diferentes intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico, como acetaldehído, piruvato y succinato y acetil- COA (Feitosa, 2014; Atlas y Bartha, 2002).

Los hidrocarburos poliaromáticos pueden además degradarse a productos más volátiles como resultado de la rotura del anillo aromático y formación de compuestos de bajo peso molecular. Esto puede ser especialmente importante en el metabolismo de hongos de HPA (Hidrocarburos poliaromáticos) donde las enzimas extracelulares son usadas para romper los anillos aromáticos.

Figura 10. Ruta bioquímica de oxidación subterminal de alcanos



(Tomado de Atlas y Bartha, 2002)

3.3.3 Factores que condicionan la biodegradación microbiana de hidrocarburos Son tres los factores que condicionan el proceso: los relacionados con las características del producto petrolífero, con el medio y con los microorganismos (Solanas, 2009).

Con respecto a las características del petróleo, los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen entre 10 y 20 carbonos. Los alcanos conocidos como ceras ($C_{20} - C_{40}$) son sustancias hidrófobas y por lo tanto son difíciles de degradar (Balba et al, 1998). Los isoprenoides, y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo, por tanto, su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación. Otro aspecto importante relacionado con las características de los productos petrolíferos son su hidrofobicidad y su facilidad para adsorberse en partículas del suelo como las arcillas o absorberse o en la materia orgánica. Estos fenómenos, así como la difusión en microporos dan lugar a una disminución de su biodisponibilidad hacia los microorganismos que deben degradarlos (Solanas, 2009).

El medio donde se encuentra el contaminante debe proporcionar las mejores condiciones a los microorganismos para que su actividad metabólica sea la adecuada para degradar los hidrocarburos. Varios factores ambientales influyen en la biodegradación de contaminantes. Uno de ellos es el contenido de materia orgánica, fuente primaria de carbono para los organismos heterótrofos. Un suelo con alto contenido de materia orgánica, se caracteriza por un alto número de microorganismos y de actividad metabólica. Por el contrario, zonas usualmente de bajos contenidos de materia orgánica, resultan en menor cantidad de microorganismos y por tanto, en menor actividad metabólica (Maier et al, 2009)

Otros factores químicos y físicos, que influyen en los procesos de biodegradación son la disponibilidad de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH y la salinidad (Maier et al, 2009).

El oxígeno es especialmente importante para los procesos degradativos. En el caso de los hidrocarburos, aunque existen microorganismos que pueden degradarlos anaeróbicamente, el metabolismo más eficaz es el aeróbico, por lo que la presencia de oxígeno será un requisito imprescindible (Solanas, 2009). Por ejemplo, los hidrocarburos del petróleo que se han vertido en aguas frescas de lagos y ríos en condiciones completamente aeróbicas, son generalmente susceptibles a la degradación microbiana; pero el crudo que se ha acumulado en el sedimento anaerobio, puede permanecer por mucho tiempo (Atlas y Bartha, 2002; Maier et al, 2009)

Por lo que respecta a los factores relacionados con los microorganismos, se define el período de aclimatación como aquel tiempo que requieren las poblaciones microbianas presentes en una zona particular para empezar a degradar los contaminantes. En este sentido, se conocen distintos factores que pueden disminuir o aumentar este tiempo pero en términos generales están relacionados con el historial de contaminación (Solanas, 2009).

2.3.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos. Las bacterias degradadoras de hidrocarburos están ampliamente distribuidas en los ecosistemas, sin embargo se trata de un grupo de bacterias muy variado y complejo, debido a la naturaleza de los compuestos que son capaces de metabolizar (Olga *et al.*, 2008). La mayoría de bacterias reportadas en la remoción de compuestos derivados de la industria petrolera son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes y simples del petróleo (Atlas, 1995), sin embargo algunas de estas bacterias son capaces de oxidar las cadenas alquílicas de algunos HPA (Hidrocarburos Poliaromáticos). También existen otras que pueden

degradar compuestos más complejos como los HPA de bajo y elevado peso molecular (Viñas, 2005).

La degradación del petróleo crudo y refinado, involucra consorcios de microorganismos eucariotas y procariotas. Los géneros más comunes que se conocen como responsable de la degradación del petróleo son en su mayoría *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces* (Balba et al, 1998; Das, 2007).

Entre los géneros bacterianos reportados en sitios contaminados con hidrocarburos se encuentran *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* y *Mycobacterium*, aislados en un screening realizado en suelos contaminados con petróleo, en un medio mínimo de sales suplementado con un crudo liviano (Chaillan et al. 2004)

En el estudio realizado por Margesin y colaboradores, se realizó una búsqueda de bacterias capaces de biodegradar hidrocarburos del petróleo en suelos alpinos contaminados. Encontraron los siguientes géneros que prevalecían en la degradación de n-alcános: *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.*, *Rhodococcus spp.*, En cuanto a la degradación de aromáticos *Pseudomonas putida* y *Mycobacterium sp.* cepa PYR-1 (Margesin et al., 2003; Bento et al., 2005)

Métodos para el *screening* o selección de bacterias degradadoras de petróleo y/o derivados

El *screening* de cepas es usado para la selección de microorganismos con una capacidad metabólica deseada, por ejemplo la degradación de petróleo y/o derivados. Su éxito depende de los criterios y presión de selección a los que se sometan las matrices a partir de las cuales se quieren obtener las bacterias. La

aplicación de las cepas obtenidas en estos procesos son variados, dentro los más importantes se encuentra su uso en la biorremediación de suelos y/o aguas contaminadas, produciendo inóculos para bioaumentar las bacterias nativas de los estas matrices y mejorar el proceso de remoción de contaminantes (Ferrara-Carrato *et al.* 2006; Karamalidis *et al.* 2010).

En la tabla 1 se encuentran relacionados los géneros de bacterias más publicados como degradadores de petróleo. *Pseudomonas spp.* es el género de bacteria más estudiado por su habilidad de degradación de múltiples compuestos del petróleo y sus derivados, entre ellos se ha analizado su capacidad para metabolizar n-alcenos y algunos HPA.

Tabla 1. Bacterias biodegradadoras de hidrocarburos más publicadas en investigaciones de *screening*

Microorganismo	Autores
<i>Sphingomonas</i>	(Viñas, 2005)
<i>Azospirillum</i>	(Viñas, 2005)
<i>Roseomonas</i>	(Viñas, 2005)
<i>Brevundimonas</i>	(Viñas, 2005)
<i>Trojanella</i>	(Viñas, 2005)
<i>Agrobacterium</i>	(Viñas, 2005)
Alcaligenes	(Kiyohora <i>et al.</i> , 1982, Viñas 2005)
<i>Xanthomonas</i>	(Viñas, 2005)
<i>Achromobacter</i>	(Viñas, 2005)
<i>Sinorhizobium</i>	(Viñas, 2005)
<i>Erytrobacter</i>	(Viñas, 2005)
<i>Cytophaga</i>	(Viñas, 2005)
<i>Rhodococcus</i>	(Margesin <i>et al.</i> , 2003, Viña, 2005, La Rosa <i>et al.</i> , 2006)
Pseudomonas	(Kiyohora <i>et al.</i> , 1982, Margesin <i>et al.</i> , 2003, Bento <i>et al.</i> , 2005, Das, 2007, Karamalidis <i>et al.</i> , 2010)
<i>Beijerinckia</i>	(Kiyohora <i>et al.</i> , 1982)
<i>Acinetobacter</i>	(Margesin <i>et al.</i> , 2003, Bento <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium</i>	(Margesin <i>et al.</i> , 2003)
<i>Gordonia</i>	(Chaillan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Brevibacterium</i>	(Chaillan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aeromicrobium</i>	(Chaillan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Dietzia</i>	(Chaillan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Burkholderia</i>	(Chaillan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bacillus</i>	(Bento <i>et al.</i> , 2005, Das, 2007)

Existen diferentes metodologías para lograr el aislamiento de estas cepas. En general se usa un medio mínimo de sales suplementado con una fuente de carbono compleja igual o similar al compuesto blanco. Las diferencias en los estudios radican en el camino para llegar al objetivo. Algunas investigaciones realizan primero cuantificación de las poblaciones de interés por siembra directa en placa o en tubos múltiples (Número más probable) y a partir de allí seleccionan las colonias o los tubos con mayor crecimiento. Posteriormente se lleva a cabo el proceso de aislamiento de cepas (Kiyohora et al. 1982, Viñas 2005; Vallejo, 2010). Otros estudios realizan primero el enriquecimiento de las muestras, incubándolas en medio mínimo de sales con la fuente de carbono, durante 7 a 14 días, en agitación, haciendo pases sucesivos, posteriormente se hacen siembras en placa para el aislamiento de las bacterias de interés (Chaillan *et al.* 2004; Angel, 2006; Abu, 2008; Karamalidis *et al.* 2010). El enriquecimiento favorece la selección natural de las cepas con la capacidad de degradar el sustrato de interés y el “fortalecimiento” de dicha capacidad. Este método requiere de más tiempo y materiales, mientras que el primero es más rápido ya que se genera una presión de selección agresiva desde el primer paso, pues el filtro de selección es menos amplio.

2.5 BIORREMEDIACIÓN

2.5.1 Generalidades. La biorremediación es el uso de microorganismos para eliminar contaminantes (Atlas y Bartha, 2002), basado en la capacidad que tienen los microorganismos de degradar diferentes compuestos orgánicos, transformándolos en otros productos más simples poco o nada contaminantes.

La degradación de contaminantes en el ambiente es un proceso complejo que depende de la naturaleza y cantidad del contaminante, de las condiciones locales y estacionales y de la composición de la comunidad microbiana autóctona.

Las dos estrategias generales de la biorremediación son la modificación de las condiciones ambientales, por ejemplo la aplicación de nutrientes y la aireación; y la adición o inóculo de microorganismos degradadores apropiados. Los productos finales del proceso eficaz tales como el agua y el dióxido de carbono, son inocuos y no representan un riesgo para el ecosistema. Así mismo, la biorremediación es un proceso económico en comparación con otros métodos convencionales, que exigen el traslado de grandes cantidades de desecho y el uso de equipos más sofisticados, mientras que la biorremediación puede ser *in situ* y solo requiere un equipamiento sencillo.

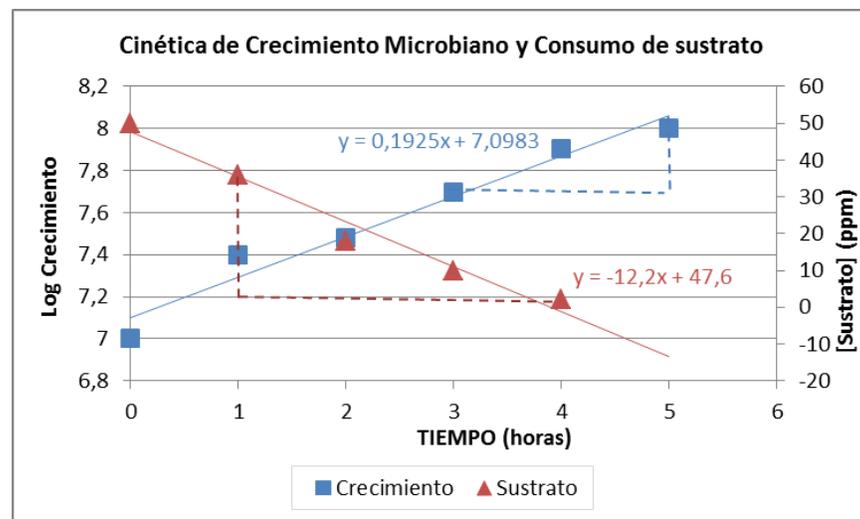
Para demostrar la utilidad potencial de una técnica de biorremediación es importante documentar la biodegradación aumentada del contaminante en condiciones controladas. Para esto se requieren ensayos de laboratorio que demuestren el potencial de un tratamiento particular para estimular la eliminación de un compuesto xenobiótico presente en un ambiente contaminado. Los experimentos de laboratorio que reproducen fielmente las condiciones ambientales reales es muy probable que den los mejores resultados. En muchos casos, esto implica el uso de muestras recogidas sobre el terreno con poblaciones autóctonas (Atlas y Bartha, 2002).

Las variables que se miden habitualmente en los ensayos de biorremediación de laboratorio, incluyen el recuento de poblaciones microbianas (Song y Bartha 1990 en Atlas y Bartha, 2002) y la determinación de la velocidad de degradación (desaparición de contaminantes individuales o totales) en comparación con los controles no tratados. Sin duda, la medida más directa de la eficacia de la biorremediación es el registro de la velocidad de desaparición del contaminante.

En procesos de tratamiento biológico, el sustrato que los microorganismos emplean como fuente de carbono y energía es normalmente el contaminante a eliminar y

para el que se diseña el proceso. Por eso, la modelación del consumo de sustrato es importante en el diseño del proceso y en la predicción del comportamiento del mismo. Sin embargo en muchos casos, el consumo del sustrato depende de muchas variables, que incluyen la predación por otros microorganismos, disponibilidad del sustrato, la presencia de fuentes preferenciales de carbono y la necesidad de un periodo de aclimatación. Los modelos simples tienen que ser formulados para el caso donde la desaparición del sustrato es solamente función de la concentración del sustrato y de la biomasa microbiana (Eweis et al., 1999) (figura 10).

Figura 11. Dinámica de crecimiento microbiano, para la desaparición del sustrato



(Adaptado de García-Rivero, 2008)

2.5.2 Biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos. Más de dos mil millones de toneladas métricas de petróleo son producidas por año en todo el mundo (Bartha, 1986 en Ewiss, et al, 1999) y una larga cantidad de los productos finales contamina los ambientes marinos y terrestres. Las pequeñas descargas de bajo nivel (escorrentías urbanas, efluentes, etc.) contabilizan el 90% de los hidrocarburos totales que se descargan. Algunos accidentes tales como

derrames de tanques, ruptura de tuberías y extracción de pozos contabilizan el 10% de estas descargas (Ewiss, et al, 1999). Ante este panorama, la biorremediación representa una herramienta clave para la limpieza de los suelos que han sido expuestos a hidrocarburos.

Existen numerosas tecnologías de remediación de suelos contaminados y de acuerdo a Martínez-Prado *et al*, 2011 se pueden agrupar en 3 tipos: a) biológicos (biorremediación, bioestimulación, fitorremediación, biolabranza, etc.), en donde las actividades metabólicas de ciertos organismos permiten la degradación, transformación o remoción de los contaminantes a productos metabólicos inocuos; b) fisicoquímicos (electrorremediación, lavado, solidificación/estabilización, etc.), aquí se toma ventaja de las propiedades físicas y químicas de los contaminantes para destruir, separar o contener la contaminación; y c) térmicos (incineración, vitrificación, desorción térmica, etc.), en los cuales se utiliza calor para promover la volatilización, quemar, descomponer o inmovilizar los contaminantes en un suelo.

La biorremediación puede emplear organismos autóctonos del sitio contaminado o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Martínez-Prado *et al*, 2011)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales

Frascos Schott de 250 mL

Tubos tapa rosca con 9 mL de agua peptonada

Matraces de 500 mL

Micropipeta de 1 mL y 100 μ l

Puntas estériles para micropipeta

Rastrillos de vidrio o plástico estériles

Cajas de Petri

Probetas de plástico de 1000mL

Frascos ámbar de 75 mL

Columnas en acrílico de 60 cm alto x 20 cm diámetro

Soporte múltiple metálico

Bolsa dosificadora acoplada con macrogoteo

Microplacas del Biolog®

Reactivos y medios. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

Agua destilada

Solución de dilución estéril (Agua peptonada 0.1%)

Acido Nítrico al 65% - Merck

Agar Cetrimide – Merck

Agar King B - Merck

Agar nutritivo – Merck

Para el Medio Basal Inorgánico (MBS) se utilizaron las siguientes sales adquiridas de Merck:

K_2HPO_4

KH_2PO_4

CaCl_2

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

Agar-Agar

Equipos

Incubadora a 30°C

Agitador shaker a 120 rpm

Contador de colonias

Tornillo sinfin

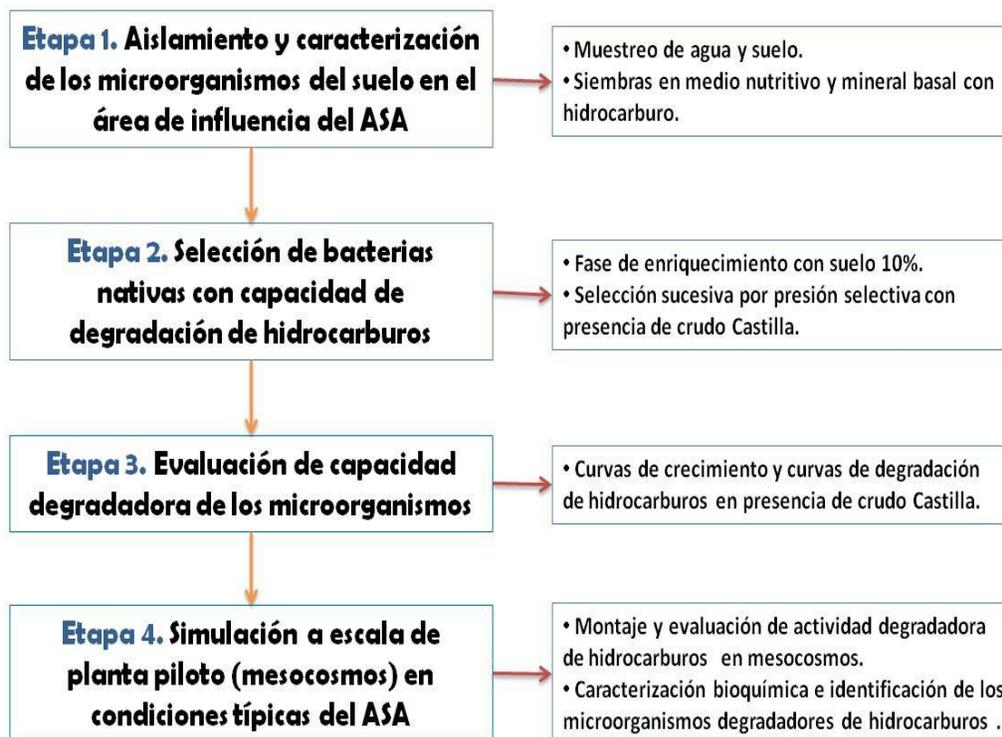
Sistema de Identificación Software MicroLog® del Biolog®

Base de datos del Biolog® (GEN III)

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA

La metodología experimental del presente trabajo se organizó en cuatro etapas tal como se presenta en la Figura 11:

Figura 12. Metodología experimental del proyecto



3.2.1 Aislamiento y caracterización de los microorganismos del suelo en el área de influencia del ASA

3.2.1.1 Muestreo de agua y suelo. Las muestras de agua y suelo, fueron recolectadas por personal del ICP siguiendo las especificaciones establecidas en el método SM 1060/05 “Collection and Preservation” del Standard Methods, Ed. 21 de 2005, Norma Técnica Colombiana NTC 3656, y EPA SW 846 Test methods evaluating solid waste, physical/chemical methods revisión 1 July 1992 (Anexo 1) y posteriormente caracterizadas en los laboratorios del ICP (Anexo 2).

3.2.1.2 Siembra en medios nutritivo y basal inorgánico con hidrocarburo. La caracterización microbiológica y demás estudios concernientes a este proyecto de investigación se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, ubicado en la Escuela de Química de

la Universidad Industrial de Santander –UIS y en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo-ICP.

Teniendo en cuenta que el área de influencia del ASA es muy amplia (Anexo 1), para los análisis microbiológicos se seleccionó al azar la parcela de caucho como representante de todo el sistema. Se tomaron ocho muestras puntuales en esta parcela y a partir de éstas, se preparó una muestra compuesta tomando 10 g de cada una, que luego se mezclaron y se homogenizaron de manera manual. Este mismo procedimiento se le aplicó a la muestra control negativo, tomada fuera del área delimitada para el ASA (detrás de la barcaza) y que no es regada con agua de producción.

Para el aislamiento preliminar de los microorganismos nativos presentes en las muestras de suelo del ASA, se preparó una suspensión líquida (suspensión madre), a partir de la muestra compuesta de suelo, tomando 25 g de suelo en 75 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL y agitando manualmente durante un minuto. Luego, en un frasco Schott de 250 mL, se preparó otra suspensión utilizando una dilución 1:10. Para conseguir este factor de dilución, se tomaron 10 mL de la suspensión madre y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada 0.1%. A partir de esta dilución, se prepararon las siguientes diluciones (1:100; 1:1000; 1:10000), transfiriendo 1 mL de la dilución previa en 9 mL de diluyente (agua peptonada 0.1%) como se muestra en la Figura 12 (Madigan *et al*, 2004).

Figura 13. Dilución seriada a partir de la muestra de suelo del ASA.



A partir de cada dilución se realizaron siembras en superficie en cajas de Petri que contenían Agar Nutritivo, tomando 0.1 mL de cada dilución. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 30° C durante 24 horas. Este procedimiento se realizó de la misma forma con la muestra de suelo que se utilizó como control negativo de riego.

Una vez incubadas las cajas, se hizo una observación macroscópica de las colonias y coloración de Gram (Madigan, *et al*, 2004) para la observación microscópica. Así mismo, se realizaron recuentos de bacterias mediante el método de siembra en superficie (Madigan, *et al*, 2004). Los resultados se informaron como UFC/g.

Posteriormente, para suprimir el crecimiento de la microbiota competitiva normal y potenciar el cultivo y crecimiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburo, se utilizó la metodología anteriormente descrita y adicionalmente se realizaron siembras en cajas de petri que contenían un medio de cultivo basal inorgánico (MBS), seleccionado por revisión bibliográfica, y suplementado con hidrocarburo (0.1%) del Campo Castilla (de donde procede el agua de producción vertida en el ASA). Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas (Figura 13). Igualmente se realizó observación macro y microscópica de las colonias y recuento de bacterias.

El medio basal inorgánico se trabajó con la siguiente formulación (Gerhard *et al*, 1994):

K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
CaSO ₄ **	0.05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Agar	20g
H ₂ O destilada	1000 mL

** Reemplazado por CaCl₂

Figura 14. Medio de cultivo basal inorgánico (MBS) suplementado con hidrocarburo (0.1%) del Campo Castilla



3.2.2 Selección de bacterias nativas con potencial de degradación de hidrocarburos

3.2.2.1 Siembra en medio enriquecido con suelo. Para aumentar las poblaciones de microorganismos que se obtuvieron en el medio sólido selectivo en la etapa anterior, se desarrolló una fase de enriquecimiento utilizando el mismo medio basal inorgánico en fase líquida, suplementado con extracto de suelo (10%). En un matraz de 500 mL se prepararon 200mL de medio enriquecido (por duplicado) y se incubaron a 30°C, con agitación orbital de 120 rpm, durante 48 horas (Figura 14). Luego, se realizaron siembras en superficie en cajas de Petri que contenían Agar Nutritivo, tomando 0.1 mL de medio, para recuperación de las poblaciones. Se realizaron observaciones macro y microscópicas de las colonias recuperadas.

Figura 15. Medio enriquecido utilizando medio basal inorgánico, suplementado con extracto de suelo 10%



3.2.2.2 Selección de microorganismos por presión selectiva en presencia de hidrocarburo (adaptado de Gerhardt *et al.*, 1994 y Demain and Davies, 1999). A partir del cultivo obtenido en la etapa anterior, el cual corresponde al inóculo inicial de esta fase, se realizó el proceso de reducir paulatinamente la riqueza nutricional del medio, mediante subcultivos en pases sucesivos, retirando el extracto de suelo y aumentando la concentración de hidrocarburo (presión selectiva), para verificar la capacidad de biodegradabilidad de la fuente de carbono de interés (Crudo Castilla). En este proceso se consideraron como parámetros de selección la tolerancia y el crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes de hidrocarburos.

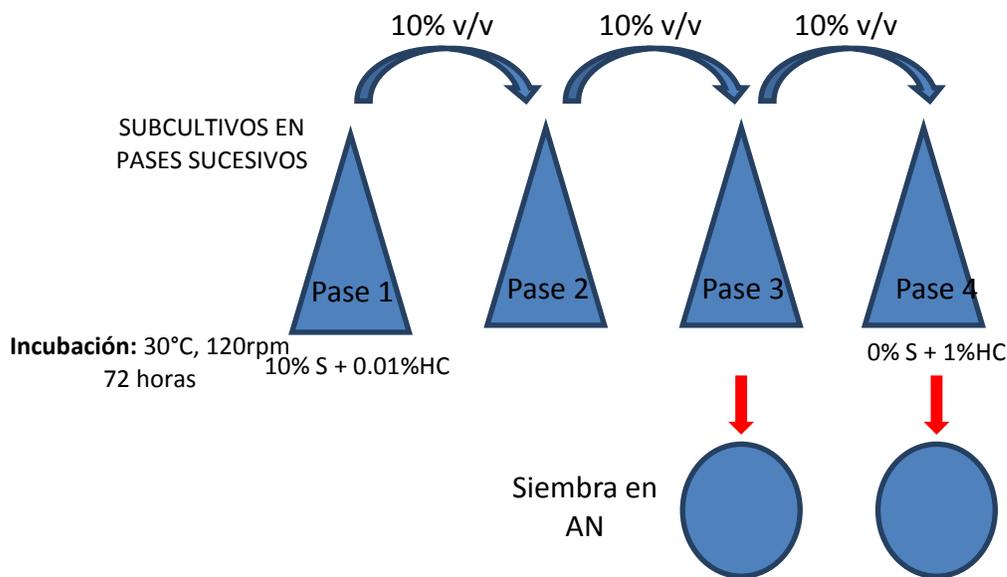
Para esta fase se prepararon cuatro matraces de 500 mL (por duplicado) conteniendo 200 mL de medio basal inorgánico y se suplementaron como se presenta a continuación:

	SUBCULTIVO 1	SUBCULTIVO 2	SUBCULTIVO 3	SUBCULTIVO 4
% suelo	10	1	0.1	0
% HC	0.01	0.1	1	1

HC: Crudo Castilla

Los subcultivos se realizaron en pases sucesivos por inoculación periódica al 10% V/V. Para lograr esto, se transfirieron 20 mL del medio de cultivo previo para inocular el siguiente subcultivo, como se presenta en la figura 15, y se incubaron a 30°C, con agitación orbital de 120 rpm, durante 72 horas. Así mismo, se verificó el crecimiento microbiano, mediante observación directa de los medios (desarrollo de turbidez) y se tomaron muestras para observación microscópica con coloración de Gram. Se realizó siembra en cajas de petri que contenían Agar Nutritivo de los subcultivos 3 y 4, con el fin de recuperar las cepas bacterianas seleccionadas positivamente en estas condiciones. Las cepas que crecieron en esta etapa del proceso fueron agrupadas en un consorcio microbiano denominado Consorcio ASA.

Figura 16. Presión selectiva por subcultivos en pases sucesivos.



3.3 EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DEGRADADORA DE LOS MICROORGANISMOS

3.3.1 Cinéticas de crecimiento y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo castilla. Para el diseño de las evaluaciones de degradación de hidrocarburos se tuvieron en cuenta cuatro (4) criterios críticos de cultivo para el posible escalado del proceso de tratamiento con el Consorcio ASA recuperado en la fase de presión selectiva, al campo Castilla, así:

- **Tiempo de residencia**

Considerando que el sistema deberá operar en continuo y poder tratar volúmenes crecientes de agua producida de entre 20.000 y 200.000 barriles diarios, se trabajaron tiempos de residencia relativamente bajos (0 – 72 horas), para evitar la acumulación del agua residual al extrapolar el dimensionamiento de reactores para el piloto y posteriormente para la implementación a escala real que se lleva a cabo sin reactores controlados, debido al gran volumen a tratar.

Por ello se hizo énfasis en un tiempo de evaluación de 72 horas, toda vez que tiempos menores de residencia hacen inviable la implementación de la biodegradación a bajas concentraciones de hidrocarburos (menores a 40 ppm) las cuales limitan la fuente de carbono para el crecimiento celular, causando igualmente que la velocidad de degradación del hidrocarburo por vía microbiana sea baja (Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2013).

- **Temperatura**

La condición medioambiental más crítica es la temperatura por lo que se estableció como condición operativa básica en caso de ubicar el sistema de tratamiento biológico en alguna etapa posterior al vertimiento en que temperaturas similares o ligeramente superiores, se presentan. En los procesos de crecimiento y

recuperación de microorganismos se emplean temperaturas en un rango de +/- 5°C a lo reportado en campo sin variaciones significativas en el comportamiento de la población por lo que se escogió 30°C como la condición de trabajo para esta etapa. (Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2013).

- **Concentración del inóculo**

Se emplearon inóculos que no superaran el 10%V/V ya que el costo de producción del caldo microbiano semilla es alto y requiere infraestructura para el escalado del mismo. Dado que se requiere garantizar bacterias suficientes para tratar volúmenes crecientes entre 20.000 y 200.000 barriles diarios de agua de producción, en donde se requerirían entre 2000 a 20.000 barriles de inóculo cada 72 horas (siendo coherentes con el tiempo de residencia explicado antes) o el equivalente entre 667 a 6.667 barriles diarios de inóculo por lo que no es posible mantener un sistema de producción de bacterias con volúmenes mayores que pudieran ser escalables en el campo. (Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2013).

- **Nutrientes**

Aplicando el mismo principio de condiciones simples que sean fácilmente escalables, el sistema debe ser autosuficiente en el aspecto nutricional, pues cualquier adición de nutrientes incrementa los costos y no son fáciles de mantener en volúmenes crecientes en el campo. Por esta razón, se trabajó con un medio de referencia sin suplementos especiales para el crecimiento del sistema. (Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2013).

Para las evaluaciones se realizaron 2 tipos de montajes los cuales se fueron manejados con muestras acuosas de los puntos monitoreados en el sistema de

tratamiento de aguas residuales del Campo Castilla: Cinéticas de degradación de laboratorio y mesocosmos para la simulación de aplicación en campo en el suelo.

3.3.1.1 Cinéticas de crecimiento y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo castilla. El montaje para determinar las cinéticas de crecimiento y biodegradación se realizó con el consorcio resultante de la etapa de selección (identificado como ASA), en las siguientes condiciones:

-Inóculo: Consorcio ASA en proporción 1:1 de un cultivo en fase exponencial de 36 horas (10% V/V).

-Reactores: Matraces de 500 mL con 200 mL de medio por triplicado

-Medio de cultivo: MBS (estéril) + 50 ppm de crudo Castilla (no estéril, para evitar la pérdida de los componentes volátiles)

-Condiciones de Incubación: Cultivo *batch* a 30°C, con agitación orbital de 120 rpm, 72 horas de cultivo.

-Controles: Consorcio ICP (componente del Producto ECOBIOL hoy ECOMAXBACT®: Declaración de producto tecnológico - ICP 2002) como referente de biodegradación comprobada y un control negativo abiótico sin inoculación de microorganismos.

-Frecuencia de monitoreo: Se tomaron muestras destructivas en 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas.

La concentración del sustrato (hidrocarburo) fue definida en concentración de 10X con respecto al rango encontrado en las aguas de producción del ASA (1-5 ppm) para comprobar la eficacia de la actividad degradadora en condiciones aumentadas del contaminante (Atlas y Bartha, 2002), debido a que el montaje en medio por composición a escala de laboratorio, tiene hidrocarburo como única fuente de carbono. La evaluación de biodegradación con agua de producción en el ASA se evaluó en el mesocosmos.

A partir de los resultados de estas cinéticas se calcularon la velocidad de crecimiento microbiano, la velocidad de degradación de hidrocarburos y la productividad, utilizando las siguientes ecuaciones:

Durante el crecimiento exponencial, los cambios en el número de células bacterianas son directamente proporcionales al número de células presentes, expresada así (Eweis et al., et al, 1999):

$$\frac{dN}{dt} = kN$$

Donde,

N= número de células por volumen de medio

t= Tiempo

k = constante de proporcionalidad, frecuentemente referida como la masa de crecimiento específico t^{-1}

La velocidad específica de crecimiento durante el crecimiento exponencial está directamente relacionada con el tiempo de duplicación (t_d). Para un tiempo de duplicación, $N = 2N_0$, se expresa:

$$\ln(2) = k * t_d$$
$$k = \frac{\ln(2)}{t_d}$$

Para la modelación del consumo del sustrato (en este caso el hidrocarburo) se considera una cinética modificada de Monod por ser la adecuada para describir la dinámica de crecimiento de un cultivo bacteriano, limitado solamente por la concentración del sustrato. La ecuación que relaciona la masa de células

producidas por masa de sustrato utilizado (r_g) se define como (Eweis et al., et al, 1999):

$$r_g = - Yr_o$$

donde, Y = rendimiento microbiano, g de células producido/g de sustrato utilizado
 r_o = cantidad de contaminante eliminado, mg/(l.día)

La productividad está determinada por la relación entre la biomasa del cultivo por unidad de tiempo (Ramírez y Molina, 2005), así:

$$P = \frac{\text{Biomasa} \left(\frac{UFC}{ml} \right)}{\text{Tiempo (horas)}}$$

3.4 SIMULACIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO (MESOCOSMOS) DE CONDICIONES TÍPICAS DEL SISTEMA ASA

3.4.1 Construcción del mesocosmos. Los montajes y las evaluaciones del mesocosmos para evaluar la capacidad de colonización y biodegradabilidad de las poblaciones seleccionadas, fueron llevadas a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP).

Para este tipo de simulación se emplearon las columnas de acrílico descritas en materiales y equipos. El suelo de la muestra compuesta de la parcela de caucho del ASA y el consorcio ASA aislado en la fase de presión selectiva. El montaje general del mesocosmos incluyó dos condiciones experimentales (Figura 16):

Tratamiento ASA: 3 columnas llenas de suelo, inoculadas con cultivo microbiano (consorcio ASA) y regadas con agua de producción.

Control Negativo: 3 columnas llenas de suelo, sin inóculo microbiano y regadas con agua de producción.

Para la construcción de mesocosmos, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Inoculación del suelo con cultivo microbiano (Consortio ASA)
- Empacado de las columnas con el suelo del ASA: Aproximadamente 20 Kg
- Adecuación del riego (agua de producción y agua de grifo)
- Recolección del lixiviado del mesocosmos

Inoculación del suelo con cultivo microbiano

Para la inoculación del tratamiento ASA, se realizó la incorporación del cultivo por humectación directa al suelo (en una concentración aproximada de 10^4 - 10^6 UFC/Kg suelo), previo al proceso de empacado.

Empacado de las columnas con suelo del ASA

La primera estrategia considerada para el empacado de suelo en las columnas del mesocosmos consistió en emplear suelo humedecido. El procedimiento de humectación consistió en tomar porciones del suelo y agregar agua utilizando 500 mL por cada 3500g y homogenizar manualmente hasta alcanzar una textura uniforme de suelo.

Posteriormente, se procedió a realizar el empacado manual y secuencial de las columnas con el material humedecido, asegurándose de obtener homogeneidad en el llenado del recipiente y evitar la formación y/o generación de espacios vacíos. Se adaptó algodón sintético en el fondo de la columna para delimitar el sistema. El proceso y el aspecto de la columna se muestran en la figura 17.

Figura 17. Esquema general para el montaje del mesocosmos

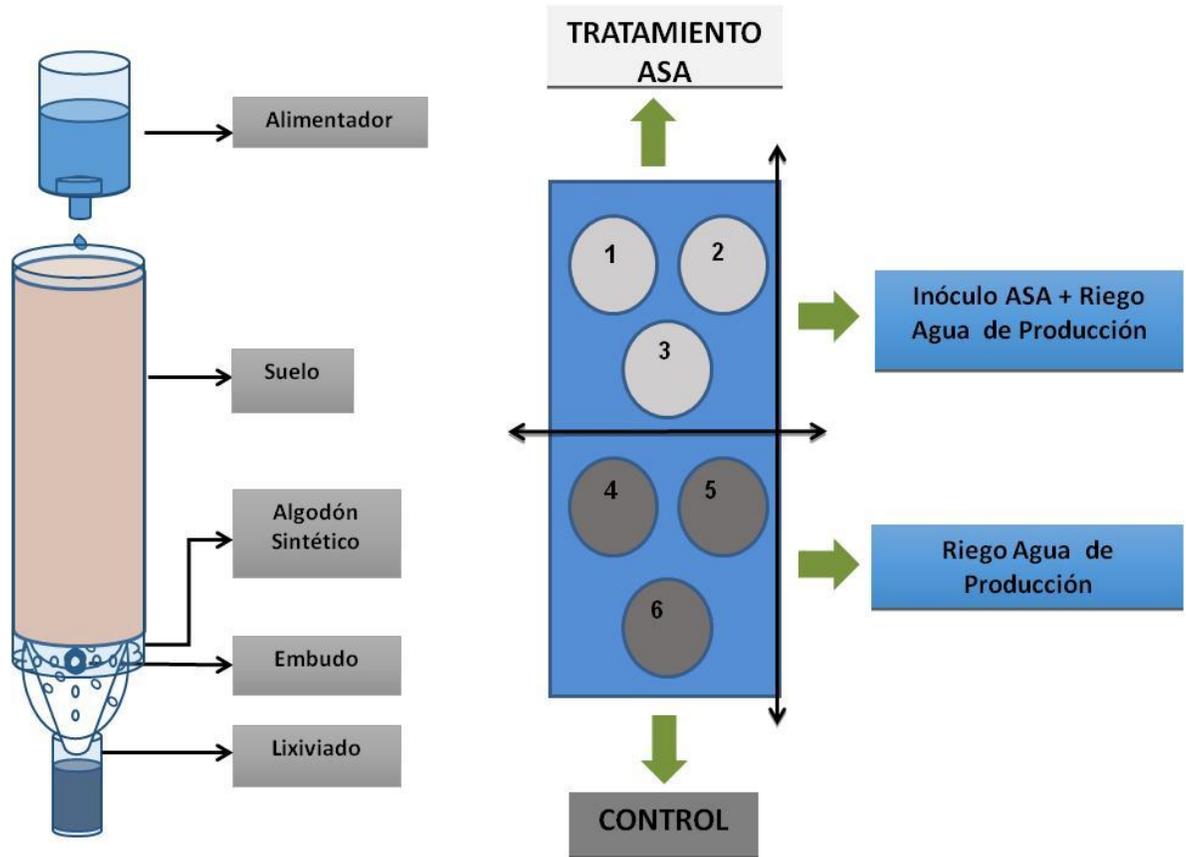


Figura 18. Experimento preliminar de empacado de las columnas utilizando suelo del ASA



a segunda estrategia de llenado de las columnas del mesocosmos incluyó la homogenización mecánica previa, del suelo muestreado en el ASA. Para el procedimiento de homogenización mecánica y reducción del tamaño de partícula del suelo se empleó un tornillo sinfín con una capacidad de carga de 400 Kg el cual fue cargado y operado durante 20 min para obtener un suelo homogéneo (Figura 18).

Figura 19. Homogenización mecánica del suelo con tornillo sinfín



Una vez finalizada la homogenización del suelo se procedió a realizar el empaclado de las columnas del mesocosmos. Igualmente se adaptó algodón sintético en el fondo de la columna para delimitar el sistema (Figura 19):

Figura 20. Empacado de las columnas con suelo del ASA después de la homogenización mecánica con tornillo sinfín



Adecuación del riego con agua de producción al mesocosmos

La adecuación del sistema de alimentación de agua de las columnas consistió en el uso de una bolsa con capacidad de 2000 mL, acoplada a un sistema de macrogoteo para el suministro de 561mL de agua/día (equivalente a un flujo 2 L/s.Ha en el ASA) la cual se adapta en altura para graduar el flujo de riego con una llave reguladora que se alimenta periódicamente por la parte superior para garantizar el flujo continuo durante 90 días (tiempo total de experimentación).

Recolección del lixiviado del mesocosmos

Para la recolección del lixiviado se emplearon probetas plásticas de 1 L en la parte inferior de las columnas, las cuales fueron cubiertas con papel celofán para evitar pérdidas por evaporación o contaminación con el medio.

Finalmente, las columnas fueron montadas en un soporte metálico múltiple que permitió la adecuación tanto del riego como de la recolección del lixiviado.

3.4.2 Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos en columna de suelo (mesocosmos). La evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburo se realizó en los sistemas en columna (mesocosmos), para las dos condiciones experimentales: Tratamiento ASA y Control. El tiempo de experimentación fue de 90 días con muestras cada 30 días.

Toma de muestras para análisis fisicoquímico y microbiológico

Mensualmente se preparó una muestra individual compuesta con todos los lixiviados recogidos por columna y se llevó a cabo la determinación de la concentración de bacterias degradadoras, grasas y aceites-hidrocarburos, de la siguiente manera:

1. Análisis Microbiológicos. Se envasa y rotula la muestra en un frasco de vidrio estéril de 250 mL y se mantiene refrigerada para análisis.
2. Análisis de Grasas y Aceites-Hidrocarburos. Se envasa y rotula la muestra en un frasco de vidrio ámbar de 1 L y se refrigera para análisis.

3.4.3 Caracterización bioquímica e identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos seleccionados en el mesocosmos. Para la identificación de las bacterias aisladas se utilizó el sistema Biolog MicroStation™, que es un micrométodo estandarizado de 95 pruebas bioquímicas para identificar un amplio rango de microorganismos: bacterias aeróbicas Gram positivas y Gram negativas y levaduras. Las microplacas del Biolog® constan de 95 pozos que contienen los sustratos deshidratados junto con violeta de tetrazolio como indicador colorimétrico (violeta de tetrazolio) (Anexo 1).

Las pruebas se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los sustratos inicialmente incoloros. El sistema evalúa la habilidad del microorganismo para utilizar u oxidar diferentes fuentes de carbono. El viraje del indicador de violeta de tetrazolio del color transparente al violeta indica que el sustrato ha sido utilizado. El lector de microplacas es capaz de detectar el cambio de color a una longitud de onda de 590 nm. La prueba produce un patrón bioquímico característico de pozos coloreados que constituyen una huella digital metabólica.

El sistema de identificación se encuentra asociado a un software de apoyo que constituye las bases de datos que soportan la identificación de los microorganismos. El sistema de Software MicroLog® del Biolog® permite la alimentación automática por medio del lector de microplacas (MicroStation 2). Las bases de datos contemplan la fuente (clínico o no clínico) y el grupo al que pertenece el microorganismo (bacteria Gram positiva, bacteria Gram negativa o levadura).

La identificación del microorganismo la realiza automáticamente el sistema con la base de datos correspondiente (GEN III), analizando el patrón metabólico obtenido con respecto a la amplia biblioteca de especies. Si encuentra una especie apropiada con un coeficiente de similaridad superior a 0.50, se identifica el microorganismo.

El coeficiente de similitud es un índice de confianza del sistema que indica el grado de cercanía filogenética entre el microorganismo por identificar y la base de datos existente en el sistema. Entre más cercano a 1.0 más precisa es la identificación.

Igualmente, se realizaron siembras en cajas de petri con Agar Nutritivo, para la caracterización macro y microscópica de las cepas identificadas.

En caso de no obtener una identificación positiva con el sistema de identificación, se emplearán medios complementarios para una confirmación presuntiva.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

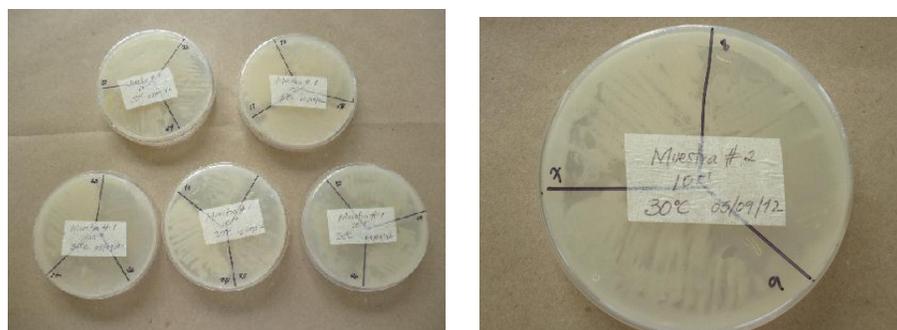
4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DEL ASA

4.1.1 Aislamiento de los microorganismos del suelo. La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se les siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permite identificar las bacterias porque las distintas especies forman colonias con una forma, tamaño, color y aspecto característico.

A partir de la suspensión madre inicial de la muestra compuesta de suelo se evaluaron las poblaciones totales (en placas de Petri conteniendo Agar nutritivo) y las potenciales biodegradadoras en medios selectivos (placas de Petri con agar y Medio selectivo + Hidrocarburo).

A partir de las cajas en agar Nutritivo, se evidenció un crecimiento abundante en todas las diluciones (hasta 10^{-4}) de tres tipos de colonias (figura 20).

Figura 21. Cultivos en agar nutritivo, a partir de la muestra de suelo del ASA.



Para la observación microscópica se utilizó coloración de Gram que permite la identificación bacteriana de acuerdo a la clasificación según su respuesta, en Gram positiva o Gram negativas. Una vez terminada la coloración de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color morado, mientras que las Gram negativas presentan color rojo (Madigan *et al*, 2004).

En la tabla 2 se presentan las características macro y microscópicas de las colonias aisladas en agar nutritivo a partir de las muestras de suelo del ASA. La figura 21 muestra la observación microscópica de cada una de las colonias.

Tabla 2. Características macro y microscópica de las colonias aisladas en Agar Nutritivo a partir de las muestras de suelo del ASA

Colonia	Observación macroscópica	Observación microscópica
1	Color blanco, apariencia cremosa, borde liso	Bacilos Gram negativos
2	Color blanco, apariencia cremosa, borde festoneado	Bacilos Gram negativos
3	Color blanco, apariencia cremosa, borde filamentososo	Bacilos Gram positivos

Figura 22. Observación microscópica de las colonias aisladas en Agar Nutritivo a partir de las muestras de suelo del ASA



En las siembras con medio selectivo, el crecimiento fue pobre y puntiforme debido a la presión selectiva del hidrocarburo (figura 22). Sin embargo, se diferenciaron

dos tipos de colonias. En la tabla 3 se presentan las características macro y microscópicas de las colonias aisladas en medio selectivo a partir de las muestras de suelo del ASA. La figura 23 muestra la observación microscópica de cada una de las colonias.

Con la recuperación de estas colonias en medio selectivo, se presume que existe capacidad degradadora de hidrocarburos en la microbiota nativa la cual se corroboró en el proceso de adaptación y selección con concentración creciente de hidrocarburo.

Figura 23. Cultivo en medio selectivo, a partir de la muestra de suelo del ASA.

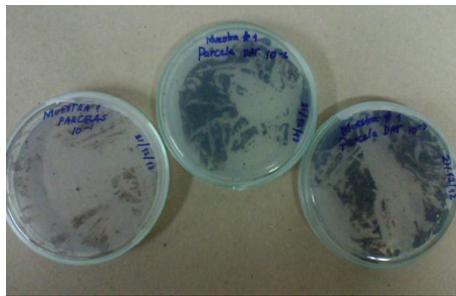
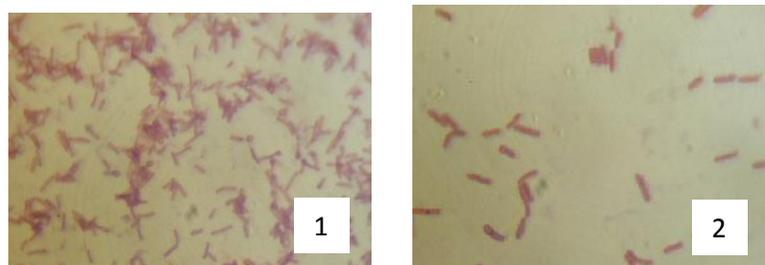


Tabla 3. Características macro y microscópicas de las colonias aisladas en medio selectivo de las muestras de suelo del ASA

Colonia	Observación macroscópica	Observación microscópica
1	Color blanco, apariencia cremosa, borde liso y aspecto puntiforme.	Bacilos Gram negativos
2	Color blanco, apariencia cremosa, borde liso y aspecto aplanado.	Bacilos Gram negativos

Figura 24. Observación microscópica de las colonias aisladas en medio selectivo de las muestras de suelo del ASA



4.1.2 Recuento de microorganismos. Los recuentos microbiológicos son útiles para valorar la integridad del suelo y permiten seguir procesos de recuperación o establecer la composición del suelo y su prospección para procesos biológicos con base en la distribución y proporcionalidad de las especies que la conforman.

El crecimiento de poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas (por ejemplo, proteína) o en el peso seco total de las células a lo largo del tiempo (Madigan *et al*, 2004).

En la tabla 4 se encuentran los recuentos microbianos obtenidos en los dos diferentes medios de cultivo.

Tabla 4. Recuentos microbianos obtenidos en los diferentes medios de cultivo, a partir de las muestras de suelo del ASA.

Muestra	AN (UFC/g)	MBS+HC (UFC/g)
Parcela de caucho	5.90E+05	6.50E+05
Control Negativo	7.90E+03	6,00E+03

El crecimiento en los medios de cultivo conteniendo 0.1% de hidrocarburo ejerce una presión de selección de las bacterias que sean capaces de crecer a expensas de esta única fuente de carbono, por lo tanto es una prueba de la presunta capacidad de degradación de hidrocarburos; sin embargo no es definitiva, pues se ha observado que pueden crecer otras bacterias que no tiene esta capacidad, sino que crecen gracias a metabolitos de la degradación de la fuente de carbono por parte de las bacterias que sí tienen la capacidad de transformación de los compuestos iniciales (Viñas, 2005). Es posible que ésta sea la razón por la cual los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos sean iguales o ligeramente superiores a los de las bacterias totales, aun cuando los valores absolutos no son significativamente diferentes y las diferencias pueden ser por el

error atribuible al método de recuento por heterogeneidad de la muestra. Además, considerando que hay una carga menor continua de hidrocarburo en el suelo del ASA como consecuencia del riego con el agua de producción proveniente del Campo Castilla, estas poblaciones que toleran o crecen a expensas del hidrocarburo, se seleccionan y aumentan con el tiempo.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo arrojaron que la concentración de hidrocarburos es muy baja (entre 0,01 – 0,04% masa), tal y como lo referencia *Louisiana Administrative Code Natural Resources. Subpart 1. Statewide Order 29B* (United States, 2005), en que concentraciones inferiores a 1% se consideran aceptables en suelos biorremediados o controles por la dificultad técnica de lograr reducciones menores eficientes en tiempo y recurso y en la mayoría de casos no es detectable, con lo cual se esperaría que la concentración de bacterias degradadoras fuera baja. Sin embargo, el título recuperado de estas poblaciones pueden ser debido a lo mencionado anteriormente, y a la adaptación de la población, que cuando es sometida a un ambiente que solo contiene una fuente de carbono (en este caso, hidrocarburo), modifica su metabolismo para lograr sobrevivir en estas condiciones (Chaillan *et al*, 2004, Viñas, 2005).

4.2 SELECCIÓN DE BIOTA BACTERIANA NATIVA CON POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS PRESENTES EN EL AGUA DE PRODUCCIÓN (ADAPTADO DE GERHARDT *ET AL.*, 1994 Y DEMAINE AND DAVIES, 1999).

4.2.1 Siembra en medio enriquecido con suelo. La fase de enriquecimiento permitió mantener y/o aumentar la biomasa microbiana obtenida preliminarmente en la etapa de aislamiento utilizando el medio selectivo (suplementado con 10 % del extracto de suelo).

De esta manera, se garantizó la supervivencia de las poblaciones, al proporcionar a las células, ingredientes químicos que necesitan para hacer procesos metabólicos y así aumentar su velocidad de reproducción.

En las siembras con agar nutritivo, el crecimiento fue abundante, y se diferenciaron dos tipos de colonias, similares a las recuperadas en el medio selectivo de la fase de aislamiento. En la tabla 5 se presentan las características macro y microscópicas de las colonias aisladas en medio enriquecido con extracto de suelo 10%.

Tabla 5. Características macro y microscópica de las colonias aisladas en medio enriquecido con extracto de suelo 10%

Colonia	Observación macroscópica	Observación microscópica
1	Color blanco, apariencia cremosa, borde liso	Bacilos Gram negativos
2	Color blanco, apariencia cremosa, extendida con borde irregular	Bacilos Gram negativos

5.2.2 Selección de microorganismos por presión selectiva en presencia de hidrocarburo (adaptado de Gerhardt *et al.*, 1994 y Demain and Davies, 1999).

El proceso de selección incluyó 4 pases en medio selectivo cada 72 horas con concentraciones crecientes de hidrocarburo y decrecientes de extracto de suelo, las cuales se presentan en la figura 24.

Figura 25. Subcultivos sucesivos para selección de los microorganismos con capacidad degradadora de hidrocarburo (Matraces de 500 mL, con 200mL de MBS+HC (0.01 a 1%) y extracto de suelo (10 a 0%), incubación a 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)



Convenciones: MBS: Medio basal inorgánico; HC: Hidrocarburo

Esta fase contribuyó a la selección y aumento del número celular por presión del contaminante de las poblaciones de microorganismos con capacidad de degradación del hidrocarburo ya que al retirar paulatinamente el suplemento de enriquecimiento (extracto de suelo), sólo podían mantenerse aquellas bacterias que realmente pudieran multiplicarse a partir del contaminante y selecciona de forma negativa a las oportunistas.

En las siembras con Agar Nutritivo de los subcultivos 3 y 4, el crecimiento fue abundante y se recuperaron dos poblaciones (Figura 25). En la tabla 6 se presentan las observaciones macro y microscópica de las colonias, coincidiendo con las características observadas en las fases de enriquecimiento.

Figura 26. Cultivo en agar nutritivo, a partir de los subcultivos 3 y 4 (presión selectiva) (Matraces de 500 mL, con 200mL de MBS+HC (0.01 a 1%), incubación a 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas. Recuperación por dilución seriada y siembra en agar MBS+HC y Agar Nutritivo)



Convenciones: MBS: Medio basal inorgánico; HC: Hidrocarburo

Tabla 6. Características macro y microscópica de las colonias recuperadas a partir de los subcultivos 3 y 4 (presión selectiva)

Colonia	Observación macroscópica	Observación microscópica
1	Color blanco, apariencia cremosa, borde liso	Bacilos Gram negativos
2	Color blanco, apariencia cremosa, extendida con borde irregular	Bacilos Gram negativos

4.3 EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS DE LOS MICROORGANISMOS

4.3.1 Cinéticas de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburos en presencia de crudo Castilla. La variación de la velocidad específica de crecimiento de una población bacteriana depende de la cepa, las condiciones y composición del medio de cultivo. Así mismo, la velocidad de desaparición del sustrato (hidrocarburo) está determinada por la dinámica de crecimiento del cultivo

bacteriano, en relación a la masa de células producidas por masa de sustrato utilizado (Atlas y Bartha, 2002; Eweis et al., 1999)

Los resultados de la cinética de crecimiento microbiano y de consumo de hidrocarburo en condiciones controladas de laboratorio se presentan en la Tabla 7 y la Figura 26.

Tabla 7. Resultados de cinética de crecimiento y de consumo de hidrocarburos (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, pH 7.2, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)

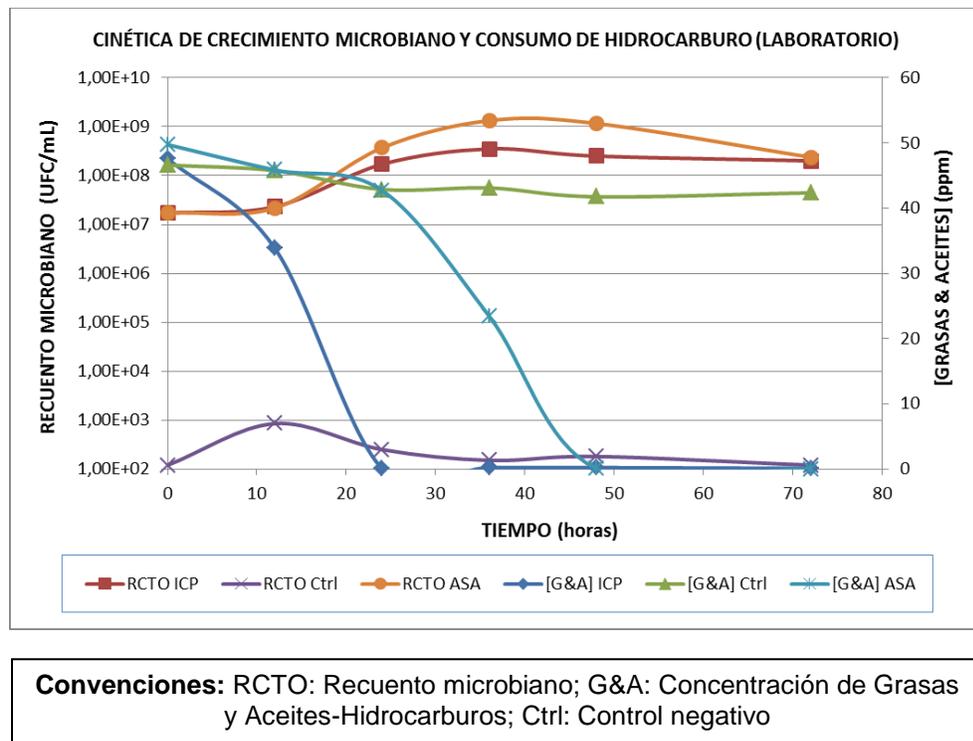
TIEMPO (horas)	MUESTRA	[GRASAS& ACEITES] (ppm)	RECUENTO (UFC/mL)	pH
0	Consortio ASA	49.75	1.7E+07	7.19
12	Consortio ASA	45.85	2.2E+07	7.05
24	Consortio ASA	42.72	3.7E+08	7.00
36	Consortio ASA	23.42	1.3E+09	6.97
48	Consortio ASA	0.042	1.2E+09	7.05
72	Consortio ASA	0.032	2.4E+08	7.14
0	Consortio ICP	47.6	1.70E+07	7.18
12	Consortio ICP	33.85	2.30E+07	7.11
24	Consortio ICP	0.09	1.70E+08	6.92
36	Consortio ICP	0.22	3.50E+08	6.92
48	Consortio ICP	0.219	2.50E+08	7.0
72	Consortio ICP	0.105	2.00E+08	7.1
0	Control negativo	46.6	1.20E+02	7.19
12	Control negativo	45.75	8.50E+02	7.2
24	Control negativo	42.87	2.50E+02	7.16
36	Control negativo	43.1	1.50E+02	7.04
48	Control negativo	41.75	1.80E+02	7.01
72	Control negativo	42.35	1.20E+02	7.2

Estos resultados muestran que el hidrocarburo que se suplementó en el medio salino como fuente de carbono (50 ppm) fue consumido por ambos consorcios microbianos a las 24 horas en el caso del Consortio ICP y a las 48 horas en el caso del Consortio ASA y como resultado de esto se presentó incremento en número celular de los mismos.

Sin embargo, dado que el hidrocarburo es una fuente compleja de difícil transformación y mineralización, la concentración de carbono que puede ser aprovechado en forma de biomasa es relativamente baja, razón por la cual no se observan crecimiento mayor de dos órdenes de magnitud con respecto al recuento inicial en cualquiera de los consorcios (Martínez-Prada, 2011; Eweis et al., 1999).

En cuanto al comportamiento del pH, se observa que todos los montajes durante la cinética se mantienen alrededor de la condición de neutralidad con una disminución máxima de 0.2 unidades de pH durante la fase de consumo de hidrocarburos, debido a la generación de ácidos orgánicos productos de los ciclos de degradación.

Figura 27. Cinética de crecimiento microbiano y consumo de hidrocarburos a escala de laboratorio (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)



Velocidades específicas de crecimiento microbiano y degradación del hidrocarburo

A partir de los resultados de la cinética de crecimiento microbiano y consumo de hidrocarburos se realizaron los cálculos de velocidad específica de crecimiento y velocidad de consumo de hidrocarburos para cada una de las condiciones experimentales. En el Anexo 3 se presenta un ejemplo de cálculo.

En el caso del consorcio ASA se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.0745 h^{-1} en el rango de 12 a 36 horas y la velocidad de consumo del hidrocarburo se calculó como máxima en $1.6085 \text{ ppm hidrocarburo / h}$ en el rango de 24 a 36 horas; mientras que en el caso del Consorcio ICP la velocidad específica de crecimiento es menor (0.0493 h^{-1} en el rango de 12 a 36 horas), y la velocidad de consumo de hidrocarburo es mayor y se obtiene el máximo en menos tiempo ($2.8133 \text{ ppm hidrocarburo / h}$ en el rango de 12 a 24 horas). Teniendo en cuenta las velocidades de consumo de hidrocarburo obtenidas, éstas se consideran bajas con respecto a sistemas con hidrocarburo inicial entre 0.1 y 1% Masa (entre 1.000 y 10.000 ppm de hidrocarburo) pero adecuadas para sistemas con concentraciones iniciales de hidrocarburos menores a 100 ppm (Karamalidis *et al.*, 2010, Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2014).

Así mismo, para verificar que las condiciones del montaje fueron adecuadas para evaluar la capacidad de degradación, se incluyó un control negativo sin inoculación de microorganismos en que numéricamente se calcularon tanto velocidad específica de crecimiento (0.004 h^{-1} entre 12 – 36 horas) como velocidad de consumo del hidrocarburo ($0,24 \text{ ppm hidrocarburo / h}$ entre 12 a 24 horas), resultado de la posible presencia de biota no específica presente en el crudo Castilla y considerado además dentro del error del experimento por efecto del muestreo.

De acuerdo con el análisis de los resultados, se encontró que el Consorcio ICP tiene una capacidad degradadora mayor que el consorcio ASA, aun cuando el crecimiento en biomasa (número celular) fue mayor en el caso del Consorcio ASA, dado que más del 99% del consumo del hidrocarburo se presentó a las 24 y 48 horas, respectivamente. Esto se corrobora con el cálculo de la velocidad de degradación de cada grupo de microorganismos en que la velocidad del Consorcio ICP es 1.75 veces mayor que la del Consorcio ASA.

Por otro lado, las velocidades de degradación son bajas en ambos sistemas por posible limitación nutricional, lo que retrasa el crecimiento y por ende reduce la velocidad de degradación por parte de los microorganismos y esto se debe a la concentración igualmente baja de hidrocarburo (50 ppm), lo que limita la biodisponibilidad para el crecimiento de los microorganismos (United States, 2005; Karamalidis *et al.*, 2010; Laboratorio de Biotecnología-ICP, Piedecuesta, Colombia, observación inédita, 2014).

Complementariamente, la concentración baja de nutrientes limita el crecimiento microbiano por competencia nutricional de las células y además porque las vías de degradación de estos contaminantes son inducibles en presencia del contaminante y requieren energía para activar la maquinaria metabólica asociada a la transformación de éstos debido a que los genes no son constitutivos o esenciales para el crecimiento típico del organismo (Nie, et al, 2009; Kiyohora, 1982).

Pese a ello, el Consorcio ASA tiene potencial para su escalado y aplicación en un proceso continuo de tratamiento del agua de producción con trazas de crudo Castilla en el ASA (Meta) dado que su capacidad de consumo total del hidrocarburo se logró en 48 horas, mejorando la premisa del tiempo de evaluación del sistema considerando un máximo tolerable de 72 horas en los criterios críticos de cultivo, incluido en el numeral 5.3.1., al presentarse una eficiencia de

transformación máxima que redujo en al menos 12 horas el tiempo de residencia del proceso (a 48 horas) a falta de datos intermedios entre 36 y 48 horas que permitan determinar si la eficiencia es anterior a las 48 horas de cultivo.

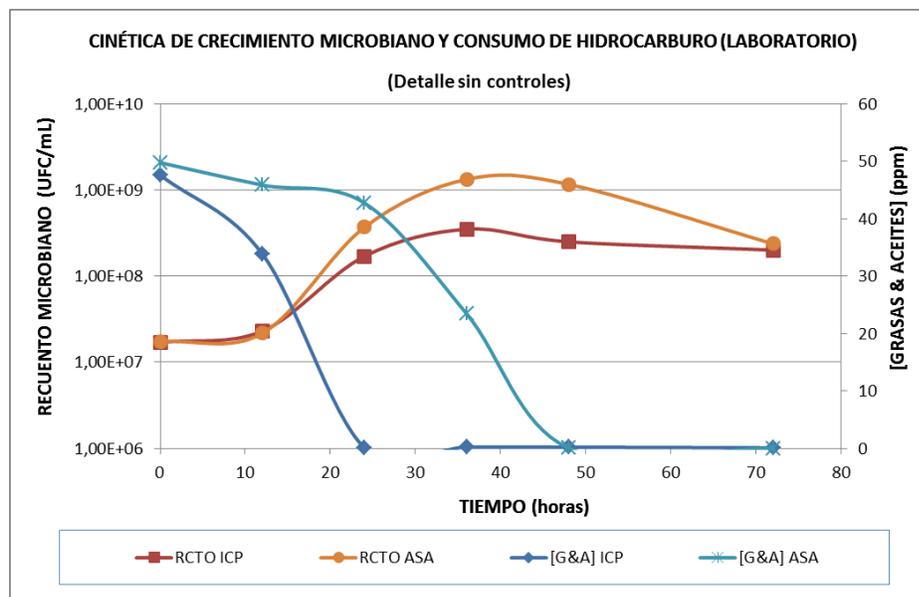
En cuanto al crecimiento microbiano y la concentración de biomasa, no se presenta una diferencia significativa en la concentración de biomasa obtenida por uno u otro consorcio, incluso siendo ligeramente mayor el número celular neto obtenido por el Consorcio ASA con una productividad máxima de $3.7E+07$ UFC/mL.h en 36 horas de cultivo con respecto al Consorcio ICP ($9.7E+06$ UFC/mL.h a 36 horas de cultivo).

Una mayor concentración de biomasa celular parece ser necesaria para activar el metabolismo de degradación del contaminante en el Consorcio ASA que degrada mayoritariamente el hidrocarburo entre 24 y 48 horas de cultivo. Esto se debe a la asociación (cruce de variables), en el inicio activo de degradación máxima del hidrocarburo y el crecimiento microbiano al alcanzar 24 horas de cultivo (Ver Figura 27), debido a que el muestreo se realizó en rangos relativamente largos de 12 horas. Como consecuencia, se presume la capacidad de degradación del Consorcio ASA asociada a la fase logarítmica tardía o fase estacionaria del crecimiento, en donde se ve retrasada la degradación con respecto a lo observado en el Consorcio ICP cuya actividad de degradación máxima se observa a partir de 12 horas de cultivo, coincidiendo con la fase logarítmica temprana.

En el caso del Consorcio ICP, el proceso de biodegradación se activa antes (*trigger*) entre 12 y 24 horas, en la etapa logarítmica temprana del crecimiento, mostrando un alto grado de adaptación al crecimiento a expensas de este tipo de sustrato con una velocidad de crecimiento 1,5 veces mayor y una latencia o etapa preparativa menor en el tiempo (Eweis et al., 1999). Estos detalles se aprecian mejor en la Figura 27 (no se incluyen los datos del control negativo para ampliar la escala).

El estudio realizado demostró que el Consorcio ASA presentaba capacidad de biodegradar hasta 50 ppm de hidrocarburo Castilla en medio basal inorgánico (MBS). Además, puede ser adaptado sucesivamente en el mismo medio y llevarse a condiciones más exigentes de cultivo para reducir su tiempo de latencia y/o preparación celular y siendo nativo del área de tratamiento en los Llanos Orientales y su posible aplicación se requiere en un proceso continuo, tiene la ventaja que éste no competiría con las poblaciones de suelo ya establecidas.

Figura 28. Detalle de Cinética de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburo a escala de laboratorio (sin control negativo). (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C, agitación orbital de 120 rpm, durante 72 horas)



Convenciones: RCTO: Recuento microbiano; G&A: Concentración de Grasas y Aceites-Hidrocarburos; Ctrl: Control negativo

El control negativo sin adición de microorganismos mostró que el crudo Castilla tiene poblaciones basales de microorganismos pero éstos no resultaron interferentes en la evaluación al no presentar crecimiento a partir de la biomasa inicial ni consumo significativo de crudo (NACE TM 0194, 2004).

4.4 SIMULACIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO (MESOCOSMOS) DE CONDICIONES TÍPICAS DEL SISTEMA ASA, PARA EVALUAR LA COLONIZACIÓN Y BIODEGRADABILIDAD DE LAS POBLACIONES SELECCIONADAS

5.4.1 Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos de los microorganismos en columna de suelo (mesocosmos). Esta evaluación fue clave para comprobar si el Consorcio ASA tiene el potencial de ser aplicado (por riego controlado) en el suelo, dentro de la estrategia de tratamiento y disposición del agua de producción del campo Castilla, debido a que cada ecosistema tiene microorganismos que son nativos y con los cuales los microorganismos introducidos deben competir en nutrición y establecimiento de población.

Las condiciones iniciales de partida del sistema fueron:

- Concentración de hidrocarburo en el Agua de producción adicionada: de 5,26 ppm medido como Grasas & Aceites.
- Título del inóculo del Consorcio ASA homogeneizado en suelo: 5,6 E+06 UFC/g

El montaje final del mesocosmos en columnas de acrílico con suelo se muestra en la figura 28 y los resultados de la evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos en columna de suelo se presentan en la Tabla 8 y la Figura 29.

Figura 29. Montaje final de la cinética de crecimiento microbiano y degradación del hidrocarburo en mesocosmos (columnas de acrílico 60 cm alto x 20 cm diámetro con 20 Kg de suelo ASA parcela de caucho, riego de 561 mL/día, 30°C, durante 90 días)



De acuerdo con estos resultados, la concentración de hidrocarburo inicial presente en el agua de producción adicionada por macrogoteo de 5.26 ppm fue consumida en un 80,23%, con un incremento en número celular de tres órdenes de magnitud en el Consorcio ASA en 90 días de evaluación, lo que significa que el mesocosmos en suelo cumple los criterios de un sistema de tratamiento de aguas ya que la norma vigente (Dec 1594/84) pide que se demuestre el 80% de remoción en carga. Finalmente, el hidrocarburo no degradado probablemente es el resultado de la presencia de componentes no degradables del crudo.

Tabla 8. Resultados de Evaluación de la actividad degradadora de hidrocarburos en columna de suelo en Mesocosmos de suelo (Columnas de acrílico 60 cm alto x 20 cm diámetro con 20 Kg de suelo ASA parcela de caucho, riego de 561 mL/día, 30°C, 90 días)

TIEMPO (días)	MUESTRA	[G&A] lixiviado (ppm)	RECuento (UFC/mL)
0	Consorcio ASA	4,85	2,10E+05
30	Consorcio ASA	3,99	1,50E+06
60	Consorcio ASA	2,32	5,73E+07
90	Consorcio ASA	1,04	1,08E+08
0	Control negativo	5,15	9,40E+02
30	Control negativo	5,01	1,41E+03
60	Control negativo	5,09	9,03E+02
90	Control negativo	4,99	1,77E+03

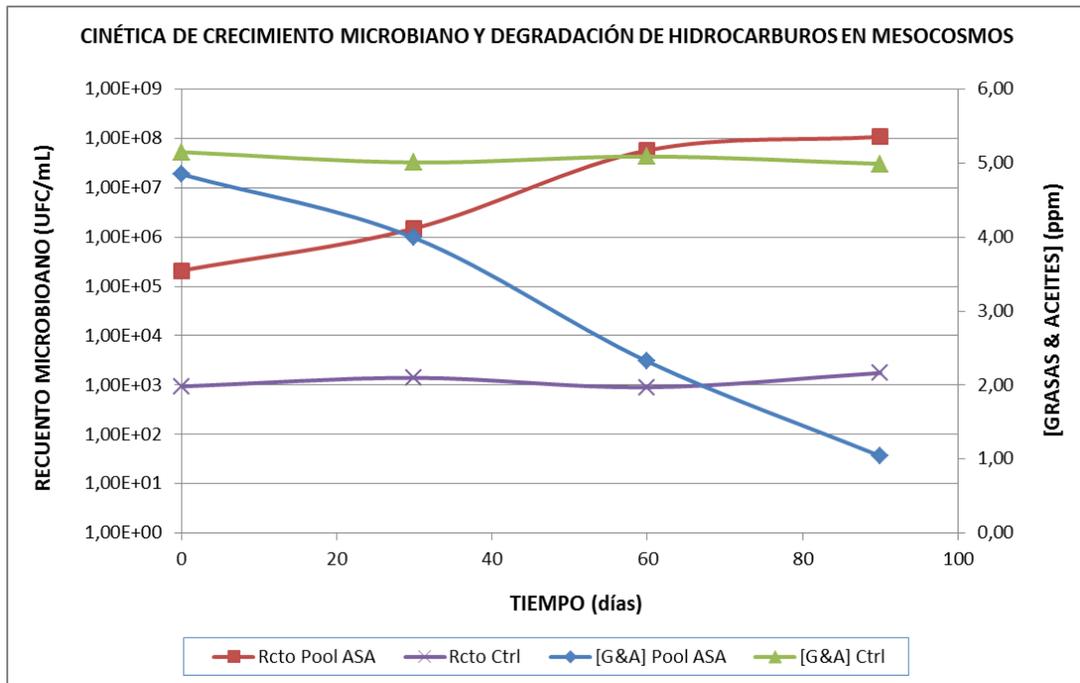
En el mismo sentido, en el control hay una reducción neta del 5% de la concentración de hidrocarburo suplementada en el agua de producción, atribuible a la capacidad de retención del suelo y a la actividad degradadora basal de los microorganismos nativos presentes. Considerando que el Consorcio ASA fue recuperado del mismo suelo, el 75% de la capacidad de degradación del consorcio es el resultado del proceso de adaptación y activación a concentraciones altas de hidrocarburo realizado en la etapa de presión selectiva y a la bioaumentación previa (Inóculo inicial).

A partir de los resultados de la cinética de crecimiento microbiano y consumo de hidrocarburos se realizaron los cálculos de velocidad específica de crecimiento, velocidad de consumo de hidrocarburos y productividad para el mesocosmos. En el Anexo 4 se presenta un ejemplo de cálculo.

La concentración de la población homogeneizada en el suelo mostró un ligero decrecimiento inicial (2,1 E+05 con respecto a 5,6E+06)) atribuible posiblemente al efecto de lavado y dilución del agua de producción, además al período de aclimatación de los microorganismos al contaminante y una vez estabilizado el sistema con el riego, se pudo apreciar incremento en la población consiguiéndose

una velocidad de crecimiento microbiano de $0,0406 \text{ d}^{-1}$ en el mesocosmos (medida entre 0 y 60 días) y una productividad de $1.2\text{E}+06 \text{ UFC/mL.día}$ (medida a 90 días).

Figura 30. Cinética de crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburo en Mesocosmos en suelo (sin control negativo). (Matraces de 500 mL con 200 mL de MBS+50ppm Crudo Castilla, 30°C , agitación orbital de 120 rpm, 72 horas)



Convenciones: RCTO: Recuento microbiano; G&A: Concentración de Grasas y Aceites-Hidrocarburos; Ctrl: Control negativo

La capacidad de degradación de las bacterias nativas recuperadas en las etapas previas de aislamiento y presión selectiva y suplementadas al sistema en el Consorcio ASA es 23 veces mayor que sólo estimular los organismos que se encuentren presentes en el suelo. Es decir, que presentó velocidad de consumo de $0,0491 \text{ ppm hidrocarburo/ día}$, medida entre 30 y 90 días. Este efecto es el resultado del proceso de adaptación a concentraciones crecientes de hidrocarburos en la etapa de presión selectiva, que activa el metabolismo de los

microorganismos haciéndoles más eficientes que un sistema estimulado, sin adición de microorganismos (Karamalidis *et al.*, 2010, Eweis *et al.*, 1999).

Además, la condición de degradación retardada en el tiempo con respecto al montaje a escala de laboratorio con 50 ppm se agudiza en concentraciones tan bajas como las presentadas en el agua de vertimiento de la Estación Acacias (entre 1 y 5 ppm), presentes en la evaluación del mesocosmos, por lo que la velocidad de consumo del hidrocarburo es menor a la observada en la evaluación a escala de laboratorio, pero en condiciones no controladas en el ASA, la nutrición se complementa con otros componentes del suelo. (Karamalidis *et al.*, 2010).

Finalmente, el Consorcio ASA recuperado del mesocosmos y posteriormente caracterizado bioquímicamente para la identificación de las cepas sobrevivientes, puede estar conformado por organismos formulados y reintroducidos (resultantes del proceso de presión selectiva descrito en el numeral 6.2.2 y microorganismos nativos del suelo con que se llenaron las columnas (no estéril) ya que los microorganismos responden a las condiciones medioambientales y nutricionales del medio en que se desarrollan.

Con esta evaluación se corroboró que el Consorcio ASA era estable y activo para la degradación de hidrocarburos no sólo en sistemas líquidos sino en matriz sólida y tiene la capacidad de biodegradar 5 ppm de hidrocarburo Castilla en un sistema alimentado en continuo (90 días). Considerando que los procesos de biodegradación en suelo típicamente se realizan en tiempos de tratamiento de entre 3 y 8 meses, según la naturaleza y concentración inicial de hidrocarburos, el tipo de suelo y las condiciones medioambientales (Atlas & Bartha, 2002).

4.4.2 Caracterización bioquímica e identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos seleccionados en el mesocosmos. La caracterización bioquímica e identificación de los microorganismos degradadores

de hidrocarburos se realizó a partir de las cepas recuperadas y aisladas del mesocosmos como se ilustra en la tabla 9. Los reportes de la base de datos GEN III del Biolog® utilizados para la identificación de los microorganismos, se encuentran en los Anexos 5 y 6.

Los resultados de la caracterización e identificación bioquímica de los aislamientos mostraron que el cultivo mixto de microorganismos degradadores recuperados del mesocosmos está en su mayoría conformado por la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* (62% de los aislamientos) con una probabilidad de correspondencia entre 0.815 y 0.984, la cual es muy reportada por su capacidad para resistir a altas concentraciones de metales pesados y de remoción de contaminantes provenientes de la industria del petróleo (Figuras 30 y 31).

Figura 31. Cultivo en Agar Nutritivo de *Stenotrophomonas maltophilia* recuperada a partir de las muestras del mesocosmos (30°C)



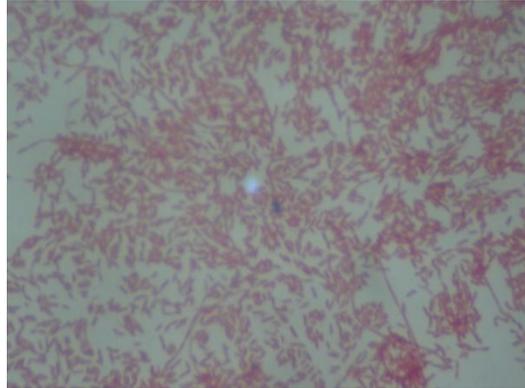
Tabla 9. Identificación de los microorganismos degradadores de hidrocarburos recuperados del mesocosmos (Placa múltiple de 96 pozos con revelador cromogénico, incubación 24 horas, 30°C)

COLONIA	DESCRIPCION	IDENTIFICACIÓN	PROBABILIDAD /SIM
1	Colonias blancas, aspecto cremoso brillante, borde liso, bacilos Gram negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.938
2	Colonias blancas, aspecto cremoso brillante, borde liso, bacilos Gram negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.815
3	Colonias blancas, aspecto cremoso brillante, borde liso, bacilos Gram negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.984
4	Colonias blancas, aspecto cremoso brillante, borde liso, bacilos Gram negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.842
5	Colonias blancas, aspecto cremoso, borde liso	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	0.962
6	Colonias blancas, aspecto cremoso brillante, borde liso, células con forma de bacilos Gram negativos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.984
7	Colonias blancas, aspecto cremoso, borde liso, cocobacilos Gram negativos	Posible <i>Pseudomonas sp</i>	-
8	Colonias blancas, aspecto cremoso, borde liso	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	0.804

En la investigación realizada por Zafra y colaboradores (2014), realizaron aislamiento y selección de un consorcio con potencial de degradación de hidrocarburos poli aromáticos a partir de suelos contaminados con crudos pesados, en el cual encontró *Stenotrophomonas maltophilia* entre otras bacterias. De esta misma forma esta bacteria ha sido encontrada en sitios contaminados con petróleo o sus derivados (Juhasz, *et al.*, 2000; Urszula, *et al.*, 2009; Salek, *et al.*, 2013). También ha sido reportada por su capacidad de producir biosurfactantes, coadyuvantes en la degradación por la disminución de la tensión superficial y otros mecanismos que ayudan en la solubilización y/o biodisponibilidad de los contaminantes (Boonchan, *et al.*, 1998). En cuanto a la tolerancia frente a altas

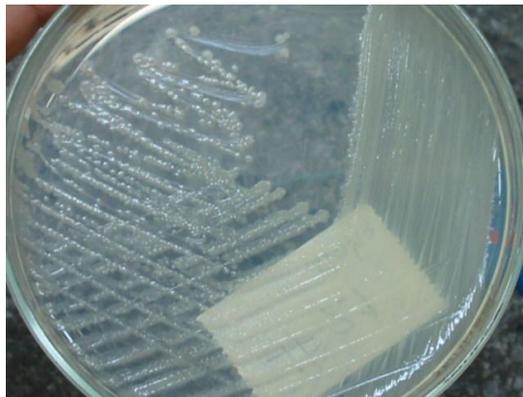
concentraciones de metales pesados, Pages *et al.* 2008, evaluaron la capacidad de resistir a concentraciones elevadas de metales tóxicos como Cd, Pb, Co, Zn, Hg, Ag, selenito, telurito y uranilo (Chien, *et al.*, 2008; Pages, *et al.*, 2008).

Figura 32. Tinción de Gram *Stenotrophomonas maltophilia*



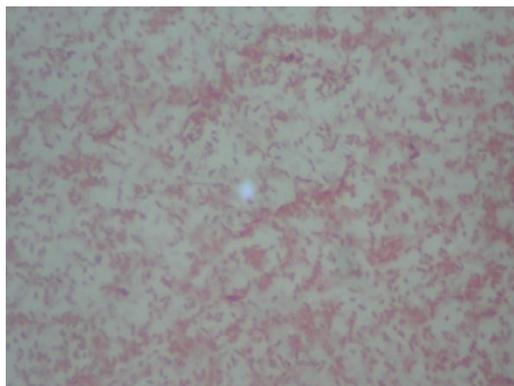
A su vez también se encontró la bacteria *Burkholderia vietnamiensis* (25% de los aislamientos) con una probabilidad de identificación entre 0.802 y 0.962, que ha sido reportada en degradación de BTEX en aguas (Doug, *et al.*, 2013) y asociada a la rizósfera (Ortega-González, *et al.*, 2012) (Figuras 32 y 33).

Figura 33. Cultivo en Agar Nutritivo de *Burkholderia vietnamiensis* recuperada a partir de las muestras del mesocosmo



S

Figura 34. Tinción de Gram *Burkholderia vietnamiensis*



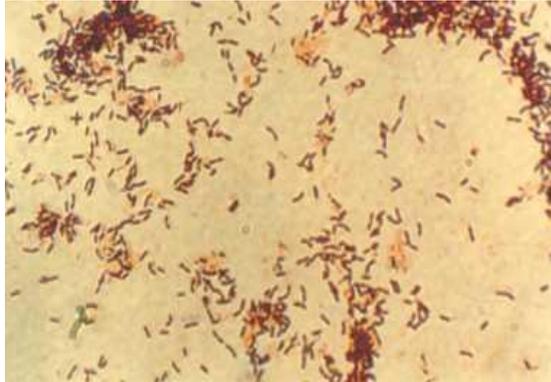
Únicamente uno de los aislamientos fue imposible de identificar (12.5% de los aislamientos) pero según el listado de organismos más cercanos filogenéticamente que arroja el sistema de identificación BIOLOG®, pertenece al género *Pseudomonas*, organismos muy comunes en los procesos de degradación de hidrocarburos. (Kiyohora *et al.*, 1982, Margesin *et al.*, 2003, Bento *et al.*, 2005, Das, 2007, Karamalidis *et al.*, 2010; Balba *et al.*, 1998).

Su filiación al género se corroboró mediante pruebas complementarias mediante el crecimiento en Agar King B y agar Cetrimide *para Pseudomonas* e incubación a 30°C. Los resultados muestran crecimiento en el medio King B (Figura 34 y 35), pero no mostró crecimiento en Agar Cetrimide, confirmando que la cepa pertenece al género *Pseudomonas* del grupo fluorescente pero descartando *P. aeruginosa* (cepas típicas) (Merck, 2010).

Figura 35. Crecimiento de *Pseudomonas sp.* en agar King B



Figura 36. Tinción de Gram de *Pseudomonas* sp.



5. CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología que permitió el aislamiento y selección por presión selectiva con hidrocarburo en subcultivos secuenciales con concentraciones crecientes hasta 1% de crudo, de microorganismos con capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos a partir de muestras de suelo del ASA con la recuperación preliminar de 3 cepas con potencial de aplicación en un sistema de tratamiento de aguas de producción contaminadas con trazas de crudo Castilla.

Se obtuvo un consorcio microbiano con capacidad para degradar hidrocarburos en condiciones de laboratorio en batch, en matriz acuosa hasta 50 ppm de crudo Castilla como única fuente de carbono en matraces de 500 mL con 200 mL de medio basal inorgánico, a 30°C, con agitación orbital de 120 rpm y 72 horas de cultivo, obteniéndose velocidades de crecimiento microbiano de 0.0745 h^{-1} (12-36 horas) y la velocidad de consumo del hidrocarburo de 1.6085 ppm hidrocarburo / h (24- 36 horas) y una remoción de hidrocarburo de 99,94%.

En cuanto a la capacidad de los microorganismos seleccionados en el Consorcio ASA para colonizar y degradar hidrocarburos en un sistema de escala de planta piloto en matriz sólida (suelo), se obtuvieron porcentajes de remoción del hidrocarburo del 80,23% y velocidad de crecimiento microbiano de $0,0406 \text{ d}^{-1}$ (0-60 días) y velocidad de consumo de hidrocarburos de 0,0491 ppm hidrocarburo/ día (30-90 días).

A partir de los resultados obtenidos en el mesocosmos, se determinó que la capacidad de degradación de las bacterias nativas recuperadas, reintroducidas y suplementadas al sistema en el Consorcio ASA, aumenta y está determinado por la exposición previa que tienen los microorganismos al hidrocarburo con el

proceso de adaptación creciente a la presencia y concentración de hidrocarburos en la etapa de presión selectiva por lo que el tiempo de aclimatación de los microorganismos nativos al sistema de riego con agua de producción fue rápido.

Por consiguiente, para la aplicación en campo, donde las concentraciones de crudo son muy bajas (3 – 5 ppm), éstas son suficientes como agente de presión selectiva sobre los microorganismos degradadores, para activar la maquinaria enzimática necesaria para la biodegradación de hidrocarburos (metabolismo inducible), y así lograr mejores desempeños en el proceso de biorremediación del suelo contaminado.

De acuerdo con el estudio de identificación , mediante el sistema de identificación BIOLOG®, los microorganismos que conforman el Consorcio microbiano degradador ASA recuperado a partir del Mesocosmos, dando como resultado la identificación de las bacterias *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia vietnamiensis* y *Pseudomonas sp.*, organismos que a la luz de la revisión bibliográfica, se reportan con capacidad de remoción de hidrocarburos y cuyo potencial de degradación a bajas concentraciones se demostró en la evaluación realizada tanto a escala de laboratorio como en mesocosmos.

Finalmente, se recomienda el uso del Consorcio ASA en la definición de una posible estrategia de tratamiento y disposición de aguas de producción contaminada con trazas de crudo Castilla para la Estación Acacias – Campo Castilla en las condiciones de trabajo estandarizadas en la presente tesis o su adaptación previa y evaluación a condiciones modificadas del sistema de tratamiento de aguas del campo o de riego en el área del ASA y su área de crecimiento a 240 Ha.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABU GO and Dike PO "A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta". *Bioresource Technology*; 2008. 99: 4761-4767.
2. ADETUTU EM, Ball AS, Weber J, Aloor S, Dandie CE and Juhasz AL. "Impact of bacterial and fungal processes on ¹⁴C-hexadecane mineralisation in weathered hydrocarbon contaminated soil." *Science of The Total Environment*. 2012; 414: 585-591.
3. AGRODINCO LTDA. Informe: "Ingeniería Conceptual y caracterización de suelos con fines de riego y drenaje para disponer aproximadamente de dos millones de barriles diarios de las aguas tratadas de producción de la Superintendencia de Operación de Castilla La Nueva, Meta (SCC), 2012.
4. AHMAD SA, Syed MA, Arif NM, Abdul MY and Shamman NA. "Isolation, identification and characterization of elevated phenol degrading *Acinetobacter* sp. Strain AQ5NOL 1." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011, 5: 1035 - 1045.
5. AHMADUN *et al.* Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 170: 530–551
6. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, Designation E1326-98. Standard Guide for Evaluating Nonconventional Microbiological Test Used for Enumerating Bacteria. Current edition approved Oct.10, 1998, Reapproved 2006. Published December, 2004.

7. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, Designation D5465-93. Reapproved 2004. Standard Practice for Determining Microbial Counts from waters Analyzed by Plating Methods. Current edition approved Sept 15, 1993, Reapproved 2004. Published 2004.
8. ANGEL, D. Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Microbiologo Industrial Pre-grado, Pontificia Universidad Javeriana. 2006
9. ARNOLD R, *et al.* Manejo de la producción de agua: De residuo a recurso. Universidad Estatal de Nuevo México, EUA, 2004.
10. ATLAS RM. "Bioremediation of petroleum pollutants." International Biodeterioration & Biodegradation 1995, 35: 317-327.
11. ATLAS R. y Bartha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley. 4ta Edición. Madrid, España 2002.
12. BALBA MT *et al.* Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Microbiological Methods. 1998, 32: 155–164
13. BENTO FM, Camargo FA, Okeke BC and Frankenberger WT. "Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation." Bioresource Technology. 2005, 96: 1049-1055.
14. BONFÁ M, Grossman MJ, Mellado E, Durrant LR. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the

chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere*. 2011 84:1671–1676

15. BOONCHAN SM, Britz L and Stanley GA. "Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*." *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, 59: 482-494.

16. CANTERA J, Carvajal Y y Castro L. *Caudal ambiental. Conceptos, experiencias y desafíos*. Edición 1. Editorial Universidad del Valle. 2009. Colombia. 325p

17. CASTILLO F, Roldán ML, Blasco R, Huertas MJ, Caballero FJ, Conrado V y Martínez M. *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tebar, SL. Madrid, 2005

18. CASTRO H. *Fundamentos para el conocimiento y manejo de suelos agrícolas*, Manual técnico, editorial, instituto universitario Juan de Castellanos. 1998.

19. CÉBRON A, Norini MP, Beguiristain T and Leyval C. "Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples." *Journal of Microbiological Methods*. 2008, 73: 148-159.

20. CHAILLAN F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A and Oudot J. "Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms." *Research in Microbiology*. 2004, 155: 587-595.

21. CHIEN C, Kuo Y, Chen C, Hung C, Yeh C and Yeh W. "Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals." *Journal of Environmental Sciences*. 2008, 20: 359-363.
22. COLOMBIA, Ministerio de Salud, Decreto 1594 de 1984 Usos del agua y residuos Líquidos (Diario Oficial de la Nación No. 36.700, Julio de 1984).
23. DAS K. and Mukherjee A. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*. 2007, 98: 1339–1345
24. DEMAIN A. and Davies J. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. 2^a edition. USA.1999.
25. DOUG S, Li J, and Shim H. "Bioremoval of Trichloroethylene/Toluene mixture by *Burkholderia vietnamiensis* G4 from water." *Research Journal of Chemistry and Environment*. 2013, 17: 32 - 38.
26. EWEIS JB, Sarina JE, Chang DPY, Schroeder ED. *Principios de Biorrecuperación. Tratamiento para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. McGrawHill Interamericana de España, 1999.
27. FEITOSA G. y Marsaioli A. Procesos naturales de biodegradación del petróleo en los reservorios. El Portal de los Laboratorios Analíticos [Internet] [Consultado Junio 2014] Disponible en: <http://www.catlab.com.ar/notas.php?idm=1469&accion1=notas>

28. FERRERA-CERRATO R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alarcón A and Cañizares-Villanueva RO. "Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos." *Revista latinoamericana de microbiología*. 2006 48: 179 - 187.
29. FOOD & AGRICULTURE ORG. (FAO). Manual de prácticas integradas de manejo y conservación de suelos. Volumen 8 de boletín de tierras y aguas de la FAO. 2000
30. GARCÍA-RIVERO M y Peralta-Pérez MR. Cometabolismo en la Biodegradación de Hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2008, 7: 1-12
31. GERHARDT P (Editor-in Chief), Murray RG, Wood W.A. and Krieg, NR. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press. Washington USA. 1994
32. GHAZALI F, Rahman RNZA, Salleh AB, Barsi M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2004, 54: 61 – 67.
33. HOYOS R. Aguas de producción de Castilla: De residuo a recurso. Carta Petrolera N° 124. Bogotá, Colombia, 2010.
34. INE. Manual de Técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. Instituto Nacional de Ecología. México D.F. 2006.
35. INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETRÓLEO. Informe técnico caracterización fisicoquímica aguas residuales industriales Área de Sostenibilidad

Agroindustrial (ASA) y cuerpo de agua receptor del vertimiento (caño La Danta), Piedecuesta, Colombia, 2013.

36. INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETRÓLEO. Informe técnico caracterización fisicoquímica de suelos Área de Sostenibilidad Agroindustrial (ASA), Piedecuesta, Colombia, 2013

37. JURELEVICIUS D, Alvarez VM, Peixoto R, Rosado AS and Seldin L. "Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases (PAH-RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula." *Applied Soil Ecology*. 2012, 55: 1-9.

38. JUHASZ AL, Stanley GA and Britz ML. "Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003." *Letters in Applied Microbiology*. 2000, 30: 396-401.

39. KARAMALIDIS AK, Evangelou AC, Karabika E, Koukkou AI, Drainas C and Voudrias EA. "Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet." *Bioresource Technology*. 2010, 10: 6545 - 6552.

40. KIYOHORA H, Nagao K and Yana K. "Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates." *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, 43: 454 - 457.

41. LA ROSA G, De Carolis E, Sali M, Papacchini M, Riccardi C and Mansi A. "Genetic Diversity of Bacterial Strains Isolated from Soils, Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, by 16S rRNA Gene sequencing and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint." *Microbiol Res*. 2006, 161: 150-157.

42. MADIGAN M, Martinko J, Parker, J. Brock Biología de los microorganismos. 10 edición. Prentice Hall Iberia. Madrid. España. 2004.
43. MAIER R, Pepper IL, Gerba CP. Environment Microbiology. Second Edition. Academic Press, Elsevier Inc., 2009.
44. MANUA
L DE PROCEDIMIENTOS DEL SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN BIOLÓGICA
MICROSTATION™, Versión 4.01. 1999.
45. MARGESIN R, Labbé D, Schinner F, Geer CW and Whyte LG. "Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils." Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69: 3085 - 3092.
46. MARTINEZ-PRADA A, Pérez-Lopez ME, Pinto-Espinoza J, Gurrola-Nevarez BA y Osorio-Rodríguez AL. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. Rev. Int. Contam. Ambie. 2011, 27(3): 241-252.
47. MERCK. Microbiology Manual. 2010.
48. MICHALOWICZ J. and Duda W. "Phenols transformations in the environment and living organisms." Current Topics in Biophysics. 2007, 30: 24 - 36.
49. NACE International the Corrosion Society. TM0194, Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems [Internet]. 2004. Disponible en:

<http://www.nace.org/cstm/Store/Product.aspx?id=192ca10a-9f0a-4cb1-b3a6-519337417ee1>

50. NIE M, Zhang X -d, Wang J.-q, Jiang L -f, Yang J, Quan Z -x, Cui X -h, Fang C -m and Li B."Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization." *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, 41: 2535-2542.
51. NÚÑEZ J. *Fundamentos de Edafología*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José de Costa Rica. 2000.
52. OLGA P, Petar K, Jelena M and Srdjan R. "Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens." *Journal of Microbiological Methods*. 2008, 74:110-113.
53. ORTEGA-GONZÁLEZ DK, Zaragoza D, Aguirre-Garrido J, Ramírez-Saad H, César HR and Jan-Roblero J. "Degradation of benzene, toluene, and xylene isomers by a bacterial consortium obtained from rhizosphere soil of *Cyperus* sp. grown in a petroleum-contaminated area". 2012, *Folia Microbiol* 58: 569 - 577.
54. PAGES DJ, Rose S, Conrod S, Cuine P, Carrier T and Achouak W. "Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*". *PLOS ONE*. 2008, 2: e1539.
55. PARRA MA. *Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas*. Ediciones Mundi-Prensa Libros. Madrid, España. 2003.
56. RAMIREZ O y Molina M. Evaluación de Parámetros cinéticos para *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando agua de coco como sustrato. 2005, San José, Costa Rica. *Ingeniería* 15: 91-110.

57. RODIER J. Análisis de las aguas naturales, aguas residuales, aguas de mar. Edición 1. Editorial Omega, S.A. plato 26. Barcelona. 1998.
58. ROMERO, J. Tratamiento de aguas residuales: Teoría y principios de diseño. Edición 2. Ed. Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia. 2002.
59. SAŁEK KA, Zgoła-Grzeškowiak and Kaczorek E. "Modification of surface and enzymatic properties of *Achromobacter denitrificans* and *Stenotrophomonas maltophilia* in association with diesel oil biodegradation enhanced with alkyl polyglucosides." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, 111: 36-42.
60. SÁNCHEZ, O. Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México. Instituto Nacional de Ecología. 2007.
61. SIRIVEDHIN T and Dallbauman L. Organic matrix in produced water from the Osage-Skiatook Petroleum Environmental Research site, Osage county, Oklahoma. *Chemosphere*. 2004, 57:463–469.
62. SOLANAS AM. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 2009.
63. SUMMI, L. Oil and Gas Accountability Project. Presentation at the 2005 People's Oil and Gas Summit. Farmington [Internet] New Mexico, EUA, 2005. [Consultado en Mayo 2012] Disponible en: <http://www.earthworksaction.org/files/publications/Sumi2.pdf?pubs/Sumi2.pdf>
64. URSZULA G, Izabela G, Danuta W and Sylwia AE. "Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing

various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation." *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, 40: 285-291.

65. USON A, *et al.* *Tecnología de Suelos: Estudio de Casos*. Ediciones de la Universidad de Lleida. Zaragoza, España. 2010.

66. UNITED STATES. Louisiana Administrative Code. Natural Resources. Subpart 1. Statewide Order 29b. Chapter 3: On-site storage, treatment and Disposal of Nonhazardous Oilfield Waste (NOW) Generated from the Drilling and Production of Oil and Gas Wells. 2005.

67. VALLEJO VE, Yanine H, and Roldan FA. "Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable". *Acta Biológica Colombiana*. 2010, 15:75 - 90.

68. VEIL JA, Puder MG, Elcock D, Redweik RJ Jr. A White paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane. U. S. Department Energy. EUA, 2004

69. VIÑAS, M. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universitat de Barcelona. 2005.

70. YEUNG CW, Law BA, Milligan TG, Lee K, Whyte LG, and Greer CW. Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform. *Marine Pollution Bulletin* 2011, 62:2095–2105.

71. ZAFRA G, Absalón A, Cuevas MD and Cortés-Espinosa D. "Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils." *Water, Air, & Soil Pollution*. 2014, 225: 1-18.

ANEXOS

Anexo A. Toma de muestras de agua y suelo en el ASA

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

TOMA DE MUESTRAS DE AGUA

Las muestras para análisis fisicoquímicos y microbiológico fueron recolectadas por el personal técnico del ICP, siguiendo las especificaciones establecidas en el método AWWA 1060/05 “Collection and Preservation” del Standard Methods, Ed. 21 de 2005.

Tipo de muestreo. El tipo de muestreo realizado al ASA de la Estación Acacias del Campo Castilla fue puntual.

El protocolo de muestreo incluye:

- Medición de parámetros in situ de oxígeno disuelto, pH y temperatura
- Toma de muestras puntuales para análisis de: conductividad, aniones (Cl^- y SO_4^{2-}), nitrógeno orgánico, sólidos suspendidos, grasas y aceites, hidrocarburos totales, DQO, fósforo y fosfatos, fenoles, metales (cromo, cobre, cadmio, plomo, bario, níquel, plata, selenio, arsénico y mercurio) y recuento de microorganismos aerobios totales.
- Preservación (acidulación) de las muestras que lo requieren y refrigeración.
- Envío de las muestras al ICP para análisis.

Sitios de muestreo. El monitoreo de las aguas residuales industriales de la Estación Acacias del Campo Castilla, se llevó a cabo del 27 al 30 de Abril del 2013.

A continuación se relacionan los puntos monitoreados considerados:

Salida del STAP – Estación Acacias al Río Guayuriba (Canalización al ASA)

Canal ASA de descarga al Caño La Danta.

Caño La Danta 500m aguas arriba del canal de descarga

Caño La Danta 250m aguas abajo del canal de descarga

De la salida del STAP hacia el Río Guayuriba se canaliza el agua tratada por tubería hasta el ASA donde es empleada para riego de los cultivos y agua de abrevadero para los animales (búfalos y bovinos).

El ASA, está delimitado por el Sur con el caño Bijao el cuál entrega sus aguas al río Orotoy ubicado en dirección suroriental; por el norte limita con el caño Danta, el cual desemboca en el caño San Luis y éste confluye con el río Orotoy a 2 kilómetros aproximadamente aguas abajo de la confluencia del caño Bijao.

En la figura 1, se ilustra el área de estudio y los cuerpos de agua objeto de la caracterización fisicoquímica.

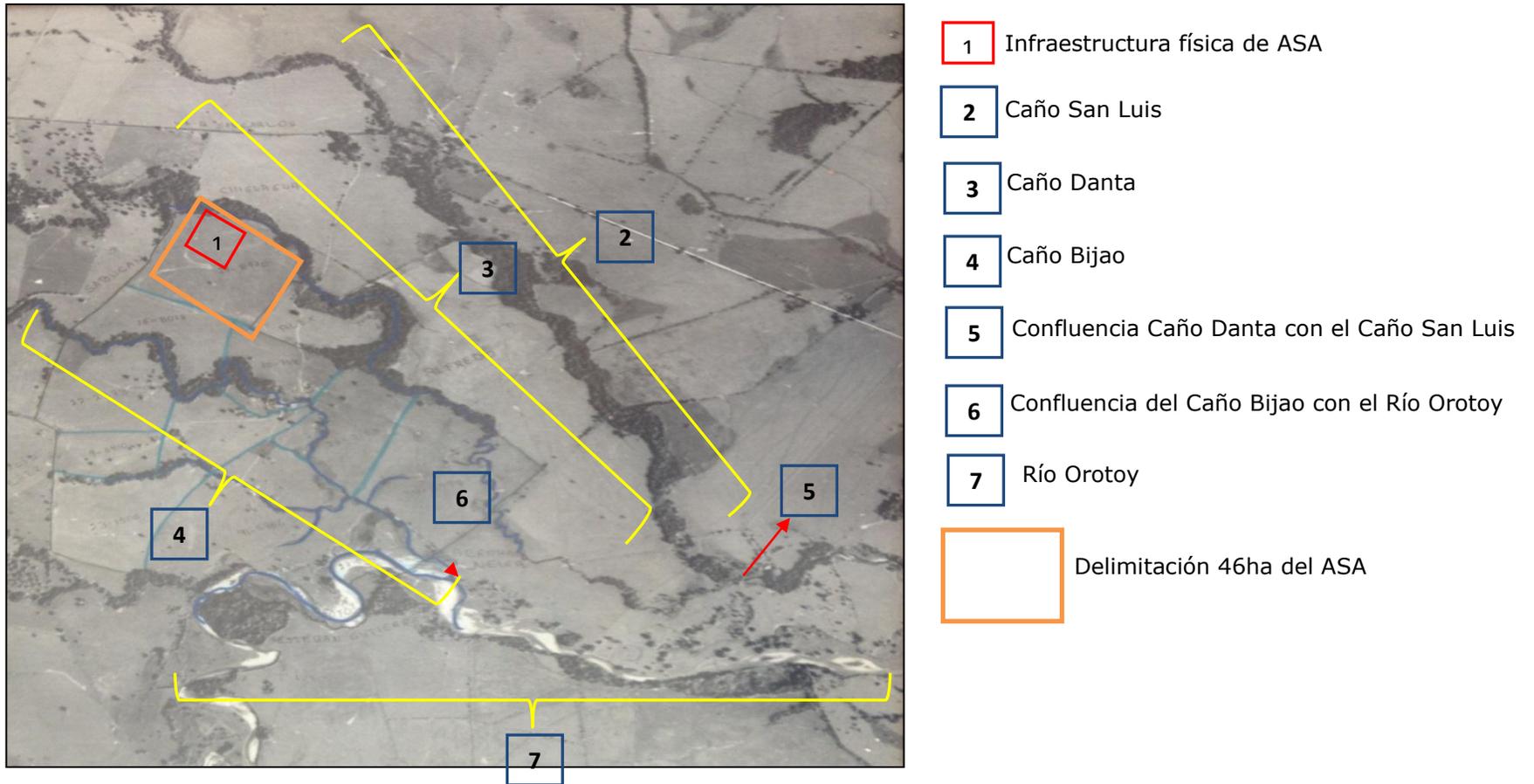


Figura 1. Cuerpos de agua naturales dentro del área de influencia del ASA – Campo Castilla

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)



Figura 3.1		Figura 3.2	
LUGAR	Vertimiento canal ASA	LUGAR	Canal ASA de descarga al caño La Danta

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

ANALISIS DE LABORATORIO MUESTRAS DE AGUA

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en los laboratorios de Aguas y Suelos, Cromatografía, Espectroscopia y Biotecnología del ICP, siguiendo las especificaciones de las normas técnicas descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Normas técnicas empleadas en los análisis de laboratorio de las muestras de agua

Parámetro	Norma	Nivel de detección
PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS		
pH	AWWA 4500-05	0 -14
Oxígeno disuelto (MCD)	AWWA 4500-O/05	0.0 mg/L
Conductividad (MCC)	AWWA 2510 A, B/05	0.89 μ mhos/cm
Sólidos suspendidos (MCD)	AWWA 2540/05	0.10 mg/L
Cloruros y sulfatos por cromatografía iónica (MCC)	AWWA 4110/05	Cl ⁻ : 0.23 mg Cl ⁻ /L SO ₄ ⁻² : 0.45 mgSO ₄ ⁻² /L
Cianuros - colorimétrico (MCC)	AWWA 4500-CN, E/05	0.013 mg/L
Nitrógeno Orgánico (Kjeldhal) (MCC)	AWWA 4500-N org-A,B-05	0.82 mg/L
Grasas y aceites e hidrocarburos totales (MCC)	AWWA 5520-A,B/05	1.07 mg/L
DQO - reflujo cerrado (MCC)	AWWA 5220/05	15.0 mgO ₂ /L
Fósforo total - colorimétrico (MCC)	AWWA 4500-P. A, B, D/05	0.020 mg P/L
Fosfatos (MCC)	AWWA 4500- PO ₄ ⁻³ A, B, D/05	0.061 mg PO ₄ /L

Fenoles - fotométrico (MCC)	AWWA 5530 A,B,D/05	0.029 mg/L
Metales por ICP-MS (Cr, Cu, Cd, Pb, Ba, Ni, Ag, Se y As) (MCD)	AWWA 3010, 3110, 3030/05	Cromo: 0.115 µg/L Cobre: 2.102 µg/L Cadmio: 0.026 µg/L Plomo: 0.284 µg/L Bario: 0.105 µg/L Níquel: 0.249 µg/L Plata: 0.013 µg/L Selenio: 0.86 µg/L Arsénico: 0.14 µg/L
Metales por Absorción Atómica: Mercurio (MCD)	AWWA 3112, 3114/05	Hg: 0.0600 µg/L
Análisis SARA (Saturados, Aromáticos, Resinas, asfaltenos)	IP143/96, ASTM 2549/02 y D2007/03	N.A.

MCD: mínima concentración detectable

MCC: mínima concentración cuantificable

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DEL AREA DE SOSTENIBILIDAD AGROENERGÉTICA (ASA)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Con el fin de establecer los puntos de monitoreos más relevantes y que representaran adecuadamente el área de estudio del ASA, se revisó la información cartográfica que ilustra de forma descriptiva la ubicación de la distintas plantaciones, áreas de pastoreo y zonas de control o blancos, que son aquellos sitios en los que no se realiza riego con el agua de producción. Posteriormente, se recorrió cada cultivo para verificar el número de especies y la distribución espacial de los mismos en el área, mientras que se evidenciaba la metodología de riego establecida, la cual consiste en una serie canales en tierra que inician desde la parte más alta del terreno, donde se encuentra el sistema de barcazas utilizadas para verter de manera controlada 20000 barriles de agua de producción/día, al canal principal de distribución de aguas de producción, el cual se divide al llegar a cada una de las parcelas, donde el agua ingresa por una serie

de tubos enterrados y que recorren cada surco de las parcelas. En la figura 4, se ilustra la distribución de líneas de riego.

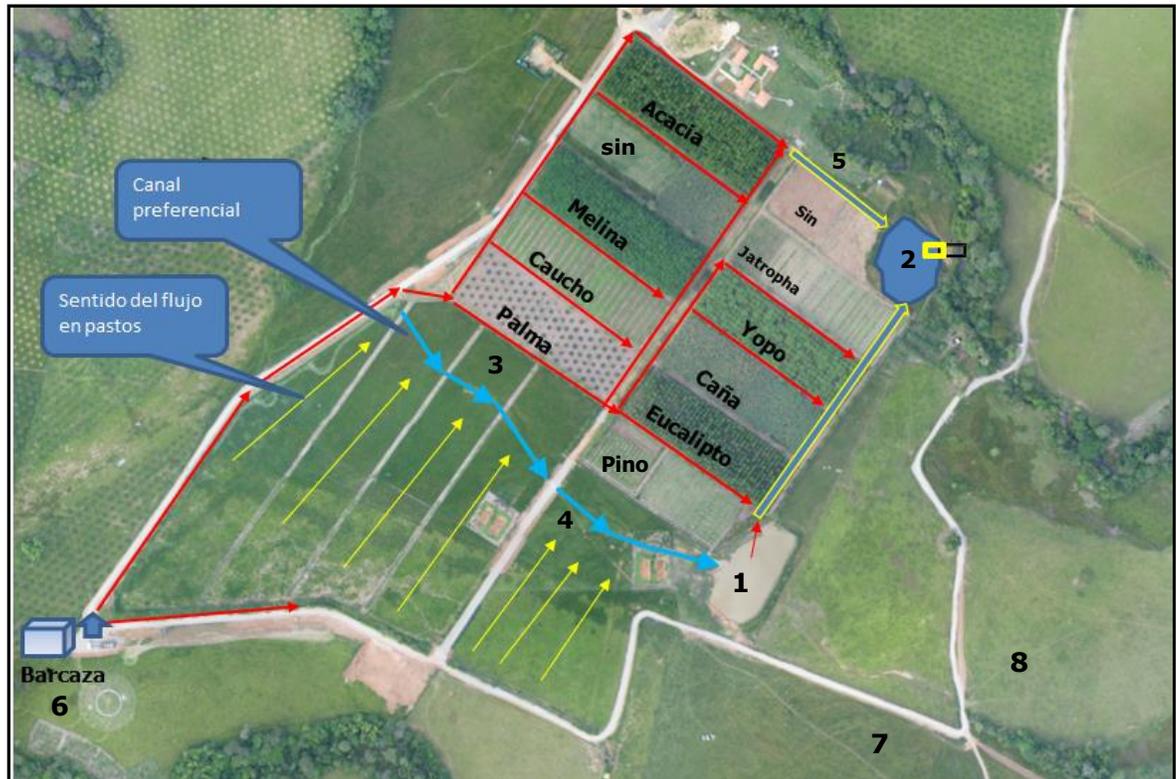


Figura 4. Sistema de riego y conducción de agua de producción.

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

Convenciones

SIMBOLO/CODIGO	DESCRIPCION
1	Laguna de los Búfalos
2	Laguna de Estabilización
3	Potrero 1
4	Potrero 2
5	Blanco 1 abajo drenaje de las parcelas
6	Blanco 2 detrás de la barcaza
7	Blanco 3 cerca al portón vía a la cabaña
8	Blanco 4 cerca al nacedero
9	Cultivos Amazónicos
Sin	Áreas sin cultivo
	Área Barcazas



	Canal de vertimiento sobre el caño Danta
	Canales de distribución/conducción de agua de producción
	Líneas dirección de agua en los pastos
	Líneas de preferencia del agua en los pastos
	Canales principales de recolección de agua

Mediante una tubería principal, el agua de las Barcazas, es vertida en un canal de concreto, en el cual puede ser direccionado el flujo del hacia las parcelas (flujo de la izquierda) o hacia la áreas de pastoreo (flujo de la derecha) y posteriormente el agua corre por canales en tierra por la zona limítrofe de las parcelas. Como se puede observar en la figura 2, el agua que no se infiltra, se direcciona hacia dos canales principales que finalmente convergen en la laguna de estabilización y ésta vierte al caño Danta por medio de un canal de concreto.

El monitoreo de los suelos del ASA, fue realizado por personal técnico y siguiendo el plan de muestreo ICP. En la tabla 2 se relacionan los puntos de muestreo de los suelos en estudio.

Tabla 2. Identificación de las muestras de suelo del ASA

IDENTIFICACIÓN	PUNTOS DE MUESTREO
PARCELA CAUCHO	SURCOS (3, 9, 15, 21)
	CALLES (5, 12, 17, 24)
PARCELA MELINA	SURCOS (5, 15, 25, 35)
	CALLES (10, 20, 30, 40)
PARCELA PALMA	SURCOS (3, 9, 15, 20)
	CALLES (5, 11, 17, 21)
PARCELA EUCALIPTO	SURCOS (5, 15, 25, 35)
	CALLES (10, 20, 30, 40)
POTRERO 1	DETRÁS PARCELA PALMA
POTRERO 2	DETRÁS PARCELA PINO
BLANCO 2	DETRÁS DE LA BARCAZA
BLANCO 3	CERCA AL PORTON VIA A LA CABAÑA
BLANCO 4	CERCA AL NACEDERO

Fuente: Instituto colombiano del petróleo (2013)

Las figuras 5.1 – 5.4 muestran los sitios de monitoreo de los suelos del ASA.

			
Figura 5.1		Figura 5.2	
LUGAR	Parcela caucho	LUGAR	Parcela melina
			
Figura 5.3		Figura 5.4	
LUGAR	Parcela palma	LUGAR	Parcela eucalipto

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

Una vez conocida el área de muestreo (figura 6), en cada parcela se establecieron aleatoriamente puntos de toma de muestras de suelos puntuales en “surcos” y “calles”, los primeros hacen referencia a la fila de árboles o especie sembradas, por donde escurre el agua de riego; mientras que las calles, representa el espacio entre dos surcos. En cada punto de monitoreo (círculos en rojo), se tomó una muestra superficial (0.30m) y una profunda (1.20m); una vez extraído el suelo, fue puesto en el respectivo empaque acondicionado según el análisis a realizar.

El muestreo de los suelos del ASA fue puntual, se recolectaron muestras en cuatro parcelas, dos potreros y tres blancos. Se analizaron las muestras de los suelos regados actualmente con aguas de producción.

- **Parcelas con surcos y calles:** en las parcelas de Caucho, Melina, Palma y Eucalipto, se tomaron muestras puntuales superficiales y profundas en un número determinado de surcos y calles, lo cual, dependía del número de individuos sembrados.
- **Potreros y Blancos:** en los potreros 1 y 2, blanco 2, 3 y 4, se tomó un solo punto de muestreo con su respectiva muestra superficial y profunda.

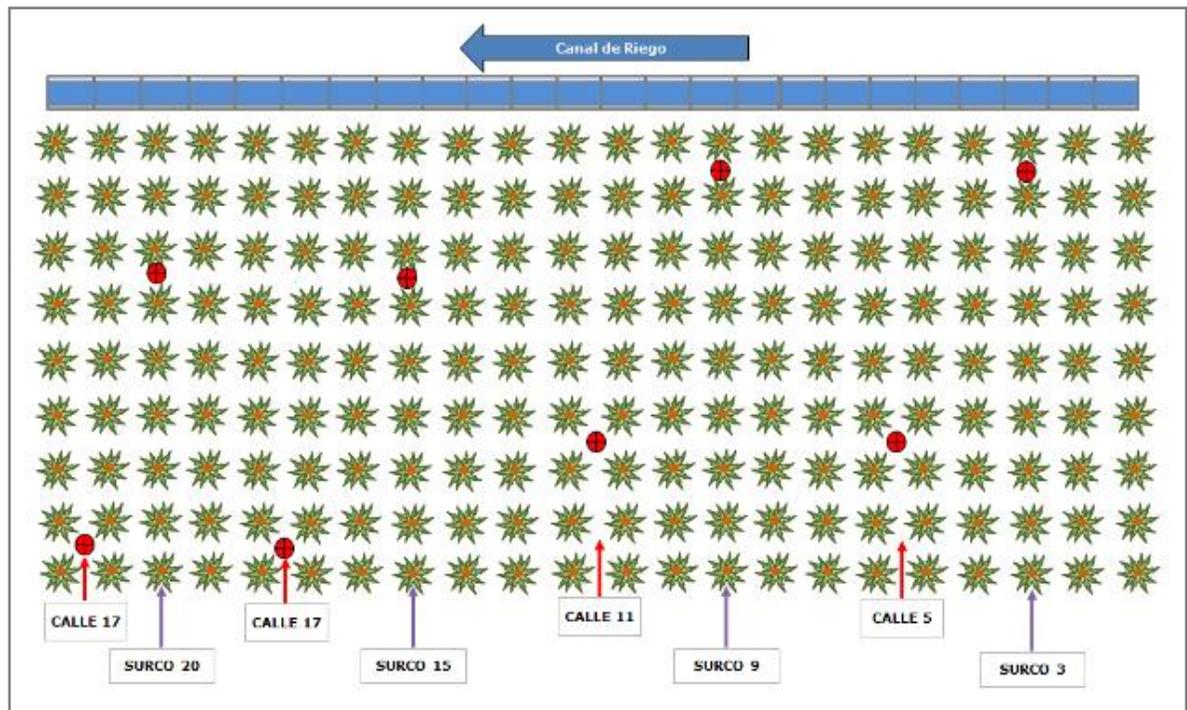


Figura 6. Representación del muestreo en surcos y calles de una parcela de cultivo.

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

El protocolo seguido se resume a continuación:

Toma de muestras puntuales para los análisis de: pH, Humedad, Conductividad, Acidez intercambiable, Textura, carbono orgánico total (COT), fósforo disponible, nitrógeno amoniacal intercambiable, nitratos, nitritos, cationes intercambiables, capacidad de intercambio catiónico (CIC), grasas y aceites-hidrocarburos, hidrocarburos no polares, compuestos fenólicos, recuento de microorganismos aerobios totales y metales (bario, calcio, cadmio, cobre, potasio, magnesio, manganeso, sodio, níquel, plomo, vanadio, aluminio, hierro, plata, arsénico, berilio, cobalto, litio, molibdeno, selenio, zinc, boro, mercurio)

- Refrigeración de las muestras.
- Envío de las muestras a los laboratorios del ICP para análisis.

TOMA DE MUESTRA DE SUELO PARA MESOCOSMOS

El monitoreo de suelo para el montaje del mesocosmos del ASA, se llevó a cabo en Diciembre de 2012. (Figura 7) (Tabla 3).

Tabla 3. Esquema de muestreo del sistema ASA realizado para el modelamiento experimental

Suelo	Lugar de Muestreo	Profundidad	Cantidad Muestreada
Control Sin Riego de AP (Suelo Control)	Pastos detrás de la barcaza	0 a 40 cm	15 bultos
Suelo con Riego de AP (Suelo ASA)	Parcela de caucho	0 a 40 cm	15 bultos

Los bultos de suelo muestreado tenían un contenido en peso que oscila entre 40 y 50 Kg.

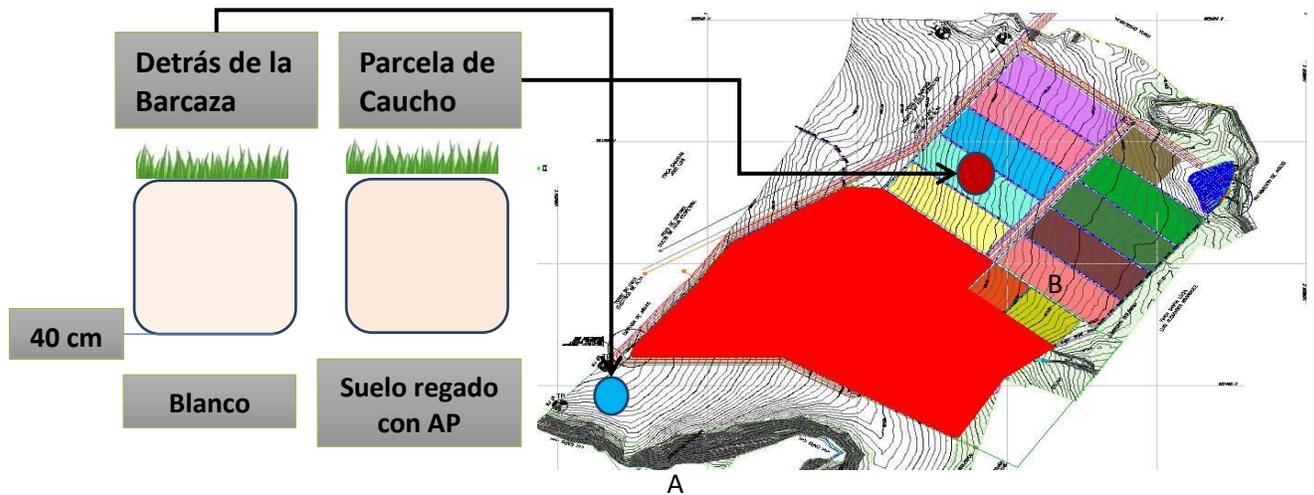


Figura 7. Mapa del ASA y zonas muestreadas
Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2012)

ANÁLISIS DE LABORATORIO MUESTRAS DE SUELO

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en los laboratorios de Aguas y Suelos, Cromatografía, Espectroscopia y Biotecnología del ICP, siguiendo las especificaciones de las normas técnicas descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Equipos y normas técnicas empleadas para el análisis de laboratorio de las muestras de suelo

Parámetro	Norma	Equipos empleados	Nivel de detección - cuantificación	Acreditado IDEAM
SUELOS				
Análisis de laboratorio				
Pretratamiento de suelos para análisis fisicoquímicos	ICONTEC NTC-ISO 11464:1995	-	-	
Acidez intercambiable (MCC en meq/100g)	Pretratamiento: NTC-ISO 11464:1995 Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos, IGAC, 6ª edición, 2006	Dosimat con Agitador Magnético	0.50	Acidez Intercambiable: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Extracción con KCl 1 N, Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos, IGAC, 6ª edición, 2006
Capacidad de intercambio catiónico (MCC en meq/100g)	Pretratamiento: NTC-ISO (Métodos analíticos del laboratorio de suelos, IGAC, 2006)	pH-metro Orión 710A	5.98	Capacidad de Intercambio Catiónico: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Acetato de Amonio 1 N, pH 7.0, Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos, IGAC, 6ª edición, 2006
Conductividad (MCC en $\mu\text{S}/\text{cm}$)	(Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995; Extracción M. L. Jackson:1982; SM 2510 B: 2005)	Conductímetro Horiba DS 12	0.89	Conductividad Eléctrica: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Extracción: Determinación de Conductividad Eléctrica de las Disoluciones obtenidas a partir de los Suelos y de las Aguas como medida del contenido de sales, Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982. - Electrométrico 2510B
Nitrógeno amoniacal intercambiable (Potenciométrico) (MCC en $\text{mg NH}_4\text{N}/\text{Kg}$)	UST-LAS-I-364//2012 (Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 -Análisis químico de suelos, M, L Jackson, 4a edición, 1982 - SM 4500 NH3 B y C)	pH-metro Orión 420A	12.4	Nitrógeno Amoniacal Intercambiable: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Extracción: Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982 - SM 4500 NH3 B y C.
Nitrógeno total Kjeldahl (MCC en mgN/Kg)	(Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995, Métodos analíticos de laboratorio de suelos, IGAC, 6a edición, 2006)	pH-metro Orión 420A	145	Nitrógeno Total: Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995 - Kjeldhal Modificado, Métodos Analíticos de Laboratorio de Suelos, IGAC, 6ª edición, 2006
Nitrogeno Total $\text{mg N}/\text{kg}$	SEOÁNEZ, M., 2000. Cálculo	-	-	
pH o acidez activa (MCD en Unidades de pH)	Pretratamiento: NTC-ISO 11464:1995 ISO 10390:2005	pH-metro Orion 710 A	0.01	pH: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Relación 1:5 en agua, Electrométrico ISO 10390:2005
Textura	(Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995, Método Bouyoucos IGAC:2006)	Densímetro de Bouyoucos	-	Textura: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Bouyoucos, Métodos Analíticos de Laboratorio de Suelos, IGAC, 6ª edición, 2006
Grasas y aceites-hidrocarburos (MCC en % masa)	EPA 9071 B modificado EPA Method 9071B // 1998 - EPA 1664 // 1999	Balanza Mettler Toledo AB 104S	0.0100	Grasas y Aceites: Extracción Acelerada - Material Extractable con n-Hexano para Muestras Sólidas, Lodos y Sedimentos, EPA 9071 B Modificado
Hidrocarburos no polares (MCC en % masa)	EPA Method 9071B // 1998 - EPA 1664 // 1999	Balanza Mettler Toledo AB 104S	0.00500	
Parámetro no acreditado MCD: Mínima Concentración Detectable MCC: Mínima Concentración Cuantificable SM: Standard Methods NTC: Norma Técnica Colombiana EPA: Environmental Protection Agency ISO: International Organization of Estandarization ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación			NA: No Aplica UST: Unidad de Servicios Técnicos ICA: Instituto Colombiano Agropecuario IGAC: Instituto Geográfico Agustín Codazzi API: American Petroleum Institute ASTM: American Society for Testing and Materials OECD: Organisation for Economic Co-operation and IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia	
En los datos reportados, el punto (.) equivale a decimales				

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

(Continuación Tabla 4)

Parámetro	Norma	Equipos empleados	Nivel de detección - cuantificación		Acreditado IDEAM
SUELOS					
Análisis de laboratorio					
Humedad a 105° C (MCC en % peso)	(Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Manual de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas para Riego, ICA, 2ª edición, 1993)	BALANZA SARTORIUS 275	0.288		Humedad: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Contenido de Humedad de la Muestra de Suelos, Manual de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas para Riego, ICA, 2ª edición, 1993
Carbono orgánico total (COT) (MCC en mg/Kg)	UST-118-P-124 // 2009 (ISO 14235/1998)	Espectrofotómetro UV-VIS NIR Cary Varian 5000	600		Carbono Orgánico Total: Espectrofotométrico Carbono Orgánico por Oxidación Sulfoclorámica, ISO 14235:1998
Fósforo disponible (MCC en mg P/kg)	(Método de Hunter (Olsen Modificado), Manual de análisis de suelos plantas y aguas para riego. ICA/1993)	Espectrofotómetro UV-VIS NIR Cary Varian 5000	5.0		
Nitratos (Fotométrico) (MCC en mg NO ₃ -N/Kg)	(Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995, Extracción: Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982 - Espectrofotométrico Salicilato de Sodio, Análisis de Aguas, J. Rodier, 3ª edición, 1998)	Espectrofotómetro UV-VIS NIR Cary Varian 5000	1.58		Nitratos: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Extracción: Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982 - Espectrofotométrico Salicilato de Sodio, Análisis de Aguas, J. Rodier, 3ª edición, 1998.
Nitritos (Fotométrico) (MCC en mg NO ₂ -N/Kg)	(Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995, Extracción: Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982.- Espectrofotométrico Reactivo de Zambelli, Análisis de Aguas, J. Rodier, 3ª edición, 1998)	Espectrofotómetro UV-VIS NIR Cary Varian 5000	0.076		Nitritos: Pretratamiento, NTC-ISO 11464:1995 - Extracción: Análisis Químico de Suelos, M. L. Jackson, 4ª edición, 1982.- Espectrofotométrico Reactivo de Zambelli, Análisis de Aguas, J. Rodier, 3ª edición, 1998.
Relación de adsorción de sodio-RAS	(Manual de análisis de suelos plantas y aguas para riego. ICA/1993)	-	-		
Salinidad (mgNaCl/L)	API RP 45 - 68:1998	-	-		
Cationes intercambiables (Ca, Mg, Na, K) con determinación por ICP-OES (meq/100g)	(Pretratamiento NTC-ISO 11464:1995; Métodos analíticos de laboratorio de suelos, IGAC. 6ª edición, 2006)	Espectrofotómetro ICP- OES Optima 2100DV	-		
Metales totales por ICP-OES: Ba, Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V, Al, Fe, Ag, As, Be, Co, Li, Mo, Se, Zn, B (MCC en mg/Kg)	Digestión Ácida EPA 3050 B / 1996 SM 3120 B: 2005 SM 3120B//2005 y Método EPA 3050B	Espectrómetro ICP-OES OPTIMA 2100 DV	Ca: 0.651 Mg: 0.089 Na: 0.409 K: 1.57 Fe: 0.369 Al: 0.864 Mn: 0.043 B: 0.903 Cu: 0.147 Cd: 0.227 Zn: 0.292	Pb: 0.572 Ba: 0.166 Ni: 0.265 V: 0.141 Mo: 0.223 Co: 0.171 Ag: 0.054 Be: 0.039 Se: 0.699 As: 0.491 Li: 0.086	Metales Totales [Al, As, Ba, Be, Cd, Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, K, Se, Na, V, Zn]: Digestión Ácida EPA 3050 B, revisión 2 diciembre 1996 - Espectroscopia de Emisión en Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), SM 3120 B
Metales por AA-Generador de Hidruros: Hg (MCC en µg/Kg)	(EPA 245.5/01 y EPA 7471A/94)	Espectrofotómetro AA Perkin Elmer 400	19.9		Mercurio: Espectrofotometría de Absorción Atómica - Vapor frío, EPA 245.5 revisión 3 febrero de 2001 y EPA 7471 A, revisión 1 septiembre 1994
Parámetro no acreditado			NA: No Aplica UST: Unidad de Servicios Técnicos ICA: Instituto Colombiano Agropecuario IGAC: Instituto Geográfico Agustín Codazzi API: American Petroleum Institute ASTM: American Society for Testing and Materials OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia		
MCD: Mínima Concentración Detectable MCC: Mínima Concentración Cuantificable SM: Standard Methods NTC: Norma Técnica Colombiana EPA: Environmental Protection Agency ISO: International Organization of Estandarization ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación					
En los datos reportados, el punto (.) equivale a decimales					

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

Anexo B. Caracterización de aguas residuales industriales salida del campo castilla ii y cuerpos de agua superficiales naturales en el área de influencia del ASA

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

Los resultados de la caracterización de las aguas residuales industriales de la estación Acacias del campo Castilla se presenta en la tabla 1. En la tabla 2 se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos *in situ* y de laboratorio de las aguas superficiales naturales del ASA en el campo Castilla.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES

Las aguas residuales industriales del Área de Sostenibilidad Agroindustrial (ASA) se comparan con respecto a lo estipulado en los Artículos 72 y 74 del Decreto 1594/84 del Ministerio de Salud, donde se establecen los criterios de calidad de vertimiento a un cuerpo de agua. Según los resultados se puede concluir:

Las aguas residuales industriales del canal ASA de descarga al caño La Danta, registran valores de pH, temperatura y concentraciones de cianuro disuelto, fenoles, halogenados purgables, pesticidas organoclorados, pesticidas organofosforados y metales (cromo hexavalente, cadmio, cobre, plomo, níquel, plata, bario, arsénico, selenio, mercurio) que se encuentran dentro de lo estipulado en la norma ambiental referida.

La evaluación de la calidad del agua del caño La Danta se realiza conforme a los siguientes artículos del Decreto 1594/84:

Artículo 38: criterios para la destinación del recurso al uso humano y doméstico, previo tratamiento convencional

Artículo 39: criterios para la destinación del recurso al uso humano y doméstico, previa desinfección

Artículo 40: criterios admisibles para la destinación del recurso al uso agrícola

Artículo 41: criterios admisibles para la destinación del recurso al uso pecuario

Artículo 42: criterios para la destinación del recurso con fines recreativos mediante contacto primario

Los valores de los siguientes parámetros en el caño La Danta se ajustan a los artículos citados anteriormente: aniones (cloruros, nitratos, nitritos, sulfatos), nitratos + nitritos, nitrógeno amoniacal, contenido de sales, metales (cromo hexavalente, cadmio, cobre, plomo, arsénico, selenio, mercurio, níquel, vanadio, plata, manganeso, aluminio, hierro, zinc, bario, cobalto, berilio, litio, molibdeno, boro). Adicionalmente, las aguas superficiales analizadas registran valores de pH que se encuentran dentro del rango establecido por los Artículos 38, 40 y 42 del Decreto 1594/84, sin embargo, este parámetro se encuentra por fuera del Artículo 39.

Referente al análisis bacteriológico, se detectó la presencia de coliformes totales en niveles superiores a los estipulados en los Artículos 39, 40 y 42 (caño La Danta aguas arriba) y 38, 39, 40 y 42 (caño La Danta aguas abajo) del Decreto 1594/84; por su parte, los valores de los coliformes fecales en las aguas analizadas se encuentran dentro de lo legislado en los Artículos 38, 40 y 42, se exceptúa de este criterio el valor aguas abajo con respecto al artículo 42.

Con relación a los pesticidas organoclorados y pesticidas organofosforados, el caño La Danta en los dos sitios de monitoreo reporta concentraciones inferiores a las mínimas cuantificables de las metodologías de determinación, por lo que se consideran concentraciones bajas de estos contaminantes.

Las concentraciones registradas de DBO_5 y DQO indican la ausencia de contaminación por presencia de materia orgánica biodegradable y sustancias químicamente oxidables; a su vez, los altos niveles de oxígeno disuelto registrados garantizan la supervivencia de las especies acuáticas a lo largo del tramo evaluado.

De acuerdo a los resultados de conductividad y RAS, el agua del caño La Danta (en ambos puntos), se clasifica como C1-S1, catalogándola como agua apta para el riego de la mayor parte de los cultivos, en cualquier tipo de suelo, con muy poca probabilidad de que desarrolle salinidad y niveles peligrosos de sodio intercambiable (Romero, 2002). Este resultado se correlaciona con el valor de Carbonato de Sodio Residual (CSR) del cual se infiere que tiene niveles adecuados de bicarbonatos, siendo apta como agua de riego.

Por último, las concentraciones de grasas y aceites-hidrocarburos y sólidos suspendidos en la descarga del canal ASA no incrementan la presencia de estos parámetros en el cuerpo de agua receptor y por ende no se altera la calidad del mismo, adicionalmente, no se observó formación *in situ* de iridiscencia sobre el sistema lótico, condición que se ajusta con lo establecido en los Artículos 38, 39 y 42.

Tabla 1. Resultados Físicoquímicos aguas residuales industriales de la Estación Acacias del Campo Castilla

AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES Y AGUAS SUPERFICIALES CAMPO CASTILLA	IDENTIFIC. MUESTRA	VTO CANAL ASA ESTACION ACACIAS CAMPO CASTILLA II		CANAL ASA DE DESCARGA AL CAÑO LA DANTA	DECRETO 1594/84 ART 72-74	CAÑO LA DANTA 50M A. ARRIBA DEL CANAL DE DESCARGA	CAÑO LA DANTA 250M A. ABAJO DEL CANAL DE DESCARGA	ARTICULO 38
		27-28-abril-2013	27-28-abril-2013			27-28-abril-2013	27-28-abril-2013	
SUBMISSION: 100107361-100117110	FECHA DE MUESTREO	27-28-abril-2013	27-28-abril-2013			27-28-abril-2013	27-28-abril-2013	
Componente	Unidad	200882782/84	200882783/85			200882786/88	200882787/89	
ANALISIS IN SITU								
CAUDAL	L/s	22,8	18,8	NR		1111	1085	NR
OXIGENO DISUELTO	mg O2/L	2,7	4,0	NR		5,6	5,4	NR
SATURACION DE OD (ODS)	mgO2/L	NS	NS	NR		NS	NS	NR
SATURACION DE OD CALC (ODSc)	mgO2/L	NS	NS	NR		NS	NS	NR
% SATURACION DE OXIGENO	%	NS	NS	NR		NS	NS	NR
TEMPERATURA AMBIENTE	°C	28,6	29,7	NR		30,6	30,8	NR
TEMPERATURA DEL AGUA	°C	29,6	28,4	≤40		24,9	24,8	NR
PH / T (GR C)	Uni. pH	7.96/29.6	5.50/28.4	5 a 9 unidades		6.11/24.9	5.82/24.8	5.0-9.0
ANALISIS DE LABORATORIO								
ANALISIS FISICOQUIMICOS								
CARBONATOS	mg CO3=/L	0,0	0,0	NR		0,0	0,0	NR
BICARBONATOS	mg HCO3-/L	96,9	11,4	NR		3,49	3,56	NR
CIANURO DISUELTO	mg CN-/L	<0.010	<0.010	1,0		NS	NS	0,2
CLORUROS	mg/L	133	14,5	NR		1,14	1,32	250,0
CONDUCTIVIDAD	uS/cm/°C	648/25.0	85.5/25.0	NR		10.3/25.0	10.0/25.0	NR
DBO5	mg O2/L	2,50	<2.00	≥80% R.C		<2.00	<2.00	NR
DQO	mg O2/L	96,6	<15.0	NR		16,7	17,3	NR
FENOLES	mg/L	0,18	<0.10	0,2		NS	NS	0,002
FOSFORO DISUELTO	mg P/L	NS	NS	NR		<0.010	<0.010	NR
FOSFATO DISUELTO	mg PO4-3/L	NS	NS	NR		<0.031	<0.031	NR
FOSFORO TOTAL	mg P/L	<0.030	<0.030	NR		<0.030	<0.030	NR
FOSFATO TOTAL	mg PO4-3/L	NS	NS	NR		<0.092	<0.092	NR
GRASAS Y ACEITES	mg/L	2,02	<2.00	≥80% R.C		<2.00	<2.00	No se acepta película visible
NITRATOS	mg NO3-N/L	<0.090	<0.090	NR		0,10	0,097	10,0
NITRITOS	mg NO2-N/L	0,035	<0.070	NR		<0.070	<0.070	1,0
NITRATOS + NITRITOS	mg N/L	0,13	<0.16	NR		0,17	0,17	NR
NITROGENO AMONIAICAL	mg NH3-N/L	<0.49	<0.49	NR		<0.49	<0.49	1,0
NITROGENO KJELDAHL	mg N/L	<1.00	<1.00	NR		<1.00	<1.00	NR
NITROGENO TOTAL	mg N/L	1,62	<1.65	NR		1,66	1,66	NR
SOLIDOS SUSPENDIDOS	mg/L	<5.00	<5.00	≥80% R.C		<5.00	<5.00	NR
SULFATOS	mg SO4=/L	9,79	0,56	NR		<0.50	<0.50	400,0
CONTENIDO DE SALES	% peso	NS	NS	NR		0,000181	0,000199	NR
RAS								
CALCIO	meq/L	NS	NS	NR		0,085	0,18	NR
MAGNESIO	meq/L	NS	NS	NR		0,015	0,014	NR
SODIO	meq/L	NS	NS	NR		0,020	0,027	NR
PORCENTAJE DE SODIO POSIBLE	%	NS	NS	NR		8,95	18,8	NR
SALINIDAD EFECTIVA	meq/L	NS	NS	NR		0,23	0,15	NR
SALINIDAD POTENCIAL	meq/L	NS	NS	NR		0,037	0,042	NR
CARBONATO DE SODIO RESIDUAL	meq/L	NS	NS	NR		-0,058	0,011	NR
COLOR REAL	U Pt-Co	NS	NS	NR		NS	NS	75
PH / T (GR C)	Uni. pH	NS	NS	5 a 9 unidades		NS	NS	NR
SALINIDAD EQUIVALENTE	mg NaCl/L	NS	NS	NR		NS	NS	NR
SURFACTANTES	mg SAAM/L	NS	NS	NR		NS	NS	0,5
TURBIEDAD	NTU	NS	NS	NR		NS	NS	NR
ANALISIS DE FENOLES								
FENOL	mg/L	NA	NA	0,2		NS	NS	0,002

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

(Continuación Tabla 1)

AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES Y AGUAS SUPERFICIALES CAMPO CASTILLA	IDENTIFIC. MUESTRA							ARTICULO 38
		VTO CANAL ASA ESTACION ACACIAS CAMPO CASTILLA II	CANAL ASA DE DESCARGA AL CAÑO LA DANTA	DECRETO 1594/84 ART 72-74	CAÑO LA DANTA 50M A. ARRIBA DEL CANAL DE DESCARGA	CAÑO LA DANTA 250M A. ABAJO DEL CANAL DE DESCARGA		
SUBMISSION: 100107361- 100117110	FECHA DE MUESTREO	27-28-abril-2013	27-28-abril-2013			27-28-abril-2013		27-28-abril-2013
Componente	Unidad	200882782/84	200882783/85		200882786/88	200882787/89		
ANALISIS BACTERIOLOGICOS								
RECUENTO COLIFORMES TOTALES	UFC/100 mL	1,60E+03	7,40E+03	NR	8,80E+03	2,20E+04	2,00E+04	
RECUENTO ESCHERICHIA COLI	UFC/100 mL	0,00E+00	5,00E+00	NR	1,00E+02	3,60E+02	2,00E+03	
TOTALES	UFC/100 mL	8,30E+05	1,50E+05	NR	4,50E+05	3,70E+05	NR	
ANALISIS DE METALES								
CROMO +6	mg Cr+6/L	<0.015	<0.015	0,5	<0.015	<0.015	0,05	
CALCIO	µg/L	NS	NS	NR	2006	669	NR	
BORO	µg/L	NS	NS	NR	3,65	3,50	NR	
SODIO	mg/L	NS	NS	NR	0,469	0,630	NR	
CADMIO	µg/L	<0.034	<0.034	100*	<0.034	0,0360	10*	
COBRE	µg/L	0,669	0,523	3000*	0,770	0,653	1000*	
PLOMO	µg/L	0,299	0,544	500*	0,488	0,961	50*	
NIQUEL	µg/L	0,622	0,372	2000*	1,57	0,493	NR	
VANADIO	µg/L	NS	NS	NR	0,992	0,860	NR	
MANGANESO	µg/L	NS	NS	NR	26,7	21,6	NR	
PLATA	µg/L	<1.41	<1.41	500*	<1.41	<1.41	50*	
MAGNESIO	µg/L	NS	NS		187	174	NR	
ALUMINIO	µg/L	NS	NS	NR	350	353	NR	
HIERRO	µg/L	NS	NS		799	820	NR	
ZINC	µg/L	NS	NS	NR	<16.7	<16.7	15000*	
BARIO	µg/L	1315	50,5	5000*	24,9	27,0	1000*	
POTASIO	µg/L	NS	NS		2198	535	NR	
COBALTO	µg/L	NS	NS	NR	0,103	0,0470	NR	
ARSENICO	µg/L	1,31	0,337	500*	0,117	0,110	50*	
SELENIO	µg/L	1,57	0,307	500*	<0.273	<0.273	10*	
BERILIO	µg/L	NS	NS	NR	<0.157	<0.157	NR	
LITIO	µg/L	NS	NS	NR	0,357	0,439	NR	
MOLIBDENO	µg/L	NS	NS	NR	<0.056	<0.056	NR	
MERCURIO	µg/L	<0.439	<0.439	20*	<0.439	<0.439	2*	
NR: No Reporta RC: Remocion de carga NS: No Solicitado ND: No Detectable NA: No Aplica (*) Aun cuando la norma reporta las concentraciones en mg/L, se hace la conversión a µg/L debido a las bajas concentraciones de las muestras analizadas (**) Aun cuando la norma reporta la concentración en unidades Jackson de turbiedad UJT, se hace la conversión a unidades nefelométricas de turbiedad NTU								

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

Tabla 2. Resultados análisis fisicoquímicos *in situ* y laboratorio aguas superficiales naturales ASA campo Castilla

AGUAS SUPERFICIALES ASA CAMPO CASTILLA	IDENTIFIC. MUESTRA	CAÑO BIAJO		CAÑO SAN LUIS		CAÑO DANTA				RIO OROTOY			DECRETO 1594/84 ART. 38
		ANTES DE LA INFLUENCIA DEL ASA	DESPUÉS DE LA INFLUENCIA DEL ASA	250M A. ARRIBA DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO DANTA	100M A. ABAJO DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO DANTA	700M A. ARRIBA DE LA DESCARGA	100M A. ABAJO DE LA DESCARGA	400M A. ABAJO DE LA DESCARGA	550M A. ABAJO DE LA DESCARGA	250M A. ARRIBA DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO BIAJO	PTO. INTERMEDIO ENTRE LAS CONFLUENCIAS DEL CAÑO BIAJO Y EL CAÑO SAN LUIS	250M A. ABAJO DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO SAN LUIS	
SUBMISSION: 100139955	FECHA DE MUESTREO	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	
Componente	Unidad	200872658/69	200872659/70	200872660/71	200872661/72	200872662/73	200872663/74	200872664/75	200872665/76	200872666/77	200872667/78	200872668/79	
ANÁLISIS <i>IN SITU</i>													
CAUDAL	L/s	103	163	498	1169	1190	1116	1113	1019	N.M	N.M	N.M	NR
OXÍGENO DISUELT	mg O2/L	6.5	6.5	6.9	6.8	5.9	6.4	7.0	6.8	7.1	6.4	5.8	NR
TEMPERATURA AMBIENTE	°C	27.7	28.8	28.2	29.1	28.2	28.6	29.1	29.1	24.7	24.4	24.4	NR
TEMPERATURA DEL AGUA	°C	26.5	26.1	26.4	26.6	28.2	28.1	26.5	26.5	24.0	23.9	24.0	NR
PH / T (°C)	Unif. pH	5.76/26.5	5.68/26.1	5.57/26.4	5.78/26.6	5.77/28.2	5.69/28.1	5.71/26.5	5.80/26.5	5.97/23.9	5.83/23.9	5.76/24.0	5.0 - 9.0
ANÁLISIS DE LABORATORIO													
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS													
ALCALINIDAD TOTAL	mg CaCO3/L	1.36	1.06	1.19	1.46	1.37	1.32	1.33	1.34	2.21	2.46	2.40	NR
CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)	mg COT/L	NS	NS	NS	NS	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	NS	NS	NS	NR
CIANURO DISUELT	mg CN-/L	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	0.2
CLORUROS	mg Cl-/L	1.41	3.14	1.33	1.64	1.63	1.41	1.61	1.70	1.40	1.39	1.37	250.0
CONDUCTIVIDAD	uS/cm/°C	9.54/25.0	16.2/25.0	8.45/25.0	13.3/25.0	10.3/25.0	10.9/25.0	28.6/25.0	11.1/25.0	15.4/25.0	15.8/25.0	15.4/25.0	NR
DBO5	mg O2/L	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	NR
COLOR REAL	U Pt-Co	4.44	5.55	12.4	9.66	12.9	11.2	11.5	9.66	9.06	8.85	8.39	75
DQO	mg O2/L	<15.0	17.5	17.4	17.1	17.5	11.5	30.3	29.5	43.4	17.4	43.7	NR
DUREZA TOTAL	mg CaCO3/L	2.27	2.09	2.39	2.49	2.99	3.15	3.62	3.70	10.8	6.99	8.56	NR
FÓSFORO DISUELT	mg P/L	<0.010	0.014	<0.010	<0.010	<0.010	0.022	<0.010	<0.010	0.024	0.016	0.026	NR
FOSFATO DISUELT	mg PO4(-3)/L	<0.031	0.043	<0.031	<0.031	<0.031	0.067	<0.031	<0.031	0.073	0.049	0.080	NR
FÓSFORO TOTAL	mg P/L	<0.030	<0.030	<0.030	<0.030	<0.030	0.044	<0.030	0.035	0.059	0.070	<0.030	NR
FOSFATO TOTAL	mg PO4(-3)/L	<0.092	<0.092	<0.092	<0.092	<0.092	0.13	<0.092	0.11	0.18	0.21	<0.092	NR
GYA-HIDROCARBUROS	mg/L	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	No se acepta película visible
NITRATOS NO3	mg NO3-N/L	0.13	0.13	<0.11	<0.11	<0.11	<0.11	<0.11	<0.11	<0.11	0.12	0.13	10.0
NITRITOS (NO2)	mg NO2-N/L	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011	1.0
NITRÓGENO AMONIACAL	mg NH3-N/L	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	<0.49	1.0
NITRÓGENO KJELDAHL	mg N/L	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	1.19	1.04	1.12	NR
NITRÓGENO TOTAL	mg N/L	1.63	1.63	<1.61	<1.61	<1.61	<1.61	<1.61	<1.61	<1.61	1.66	1.75	NR
SÓLIDOS DISUELTOS	mg/L	11.5	20.6	17.2	29.2	20.0	17.2	31.8	14.6	42.0	44.4	33.2	NR
SÓLIDOS SUSPENDIDOS	mg/L	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	200	215	161	NR
SULFATOS	mg SO4= /L	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	<4.00	5.21	<4.00	400.0
SURFACTANTES	mg SAAM/L	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	<0.28	0.5
TURBIDEZ	NTU	2.12	2.58	5.17	7.72	9.25	9.06	8.54	8.77	26.1	25.4	32.8	NR

NR: No Reporta NS: No Solicitado ND: No Detectable NM: No Medido
 (*) Aun cuando la norma reporta las concentraciones en mg/L, se hace la conversión a microg/L debido a las bajas concentraciones de las muestras analizadas

AGUAS SUPERFICIALES ASA CAMPO CASTILLA	IDENTIFIC. MUESTRA	CAÑO BIAJO		CAÑO SAN LUIS		CAÑO DANTA				RIO OROTOY			DECRETO 1594/84 ART. 38
		ANTES DE LA INFLUENCIA DEL ASA	DESPUÉS DE LA INFLUENCIA DEL ASA	250M A. ARRIBA DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO DANTA	100M A. ABAJO DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO DANTA	700M A. ARRIBA DE LA DESCARGA	100M A. ABAJO DE LA DESCARGA	400M A. ABAJO DE LA DESCARGA	550M A. ABAJO DE LA DESCARGA	250M A. ARRIBA DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO BIAJO	PTO. INTERMEDIO ENTRE LAS CONFLUENCIAS DEL CAÑO BIAJO Y EL CAÑO SAN LUIS	250M A. ABAJO DE LA CONFLUENCIA CON EL CAÑO SAN LUIS	
SUBMISSION: 100139955	FECHA DE MUESTREO	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	27-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	28-30/abr-13	
Componente	Unidad	200872658/69	200872659/70	200872660/71	200872661/72	200872662/73	200872663/74	200872664/75	200872665/76	200872666/77	200872667/78	200872668/79	
ANÁLISIS DE LABORATORIO													
ANÁLISIS DE FENOLES													
FENOL	mg/L	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	<1.70E-4	0.002
ANÁLISIS METALES TOTALES													
CROMO +6	mg Cr+6/L	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	0.05
CALCIO	microg/L	298	265	441	416	395	478	489	468	724	824	2671	NR
CADMIO	microg/L	0.0360	0.0680	0.0560	0.0720	0.0400	0.0370	0.0450	0.0380	0.140	0.112	0.148	10*
COBRE	microg/L	0.265	0.417	0.378	0.411	0.371	0.366	0.478	0.349	4.69	3.22	4.45	1000*
PLOMO	microg/L	<0.114	0.451	<0.114	0.542	<0.114	0.319	<0.114	0.319	<0.114	1.66	2.13	50*
PLATA	microg/L	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41	17.8
ZINC	microg/L	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	<16.7	15000*
BARIO	microg/L	18.6	11.9	10.7	14.0	17.5	16.5	18.3	16.9	35.1	28.1	33.0	1000*
ARSENICO	microg/L	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	0.339	0.251	0.305	50*
SELENO	microg/L	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	<0.273	10*
MERCURIO	microg/L	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	<0.439	2*
ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS													
RECuento COLIFORMES TOTALES	UFC/100 mL	4.20E+04	8.30E+04	5.00E+04	3.70E+04	2.80E+04	3.10E+04	4.20E+04	5.50E+04	3.10E+04	3.30E+04	3.40E+04	2.00E+04
RECuento ESCHERICHIA COLI	UFC/100 mL	1.00E+02	8.00E+01	1.80E+02	2.70E+02	1.60E+02	8.50E+02	4.70E+02	4.30E+02	1.30E+02	8.00E+01	4.00E+01	2.00E+03
RECuento DE MESOFILIOS TOTALES	UFC/100 mL	8.00E+05	4.20E+05	5.30E+05	5.70E+05	1.30E+06	2.90E+05	8.50E+05	1.50E+06	6.60E+05	1.10E+06	9.40E+05	NR

NR: No Reporta NS: No Solicitado ND: No Detectable NM: No Medido
 (*) Aun cuando la norma reporta las concentraciones en mg/L, se hace la conversión a microg/L debido a las bajas concentraciones de las muestras analizadas

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo (2013)

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE AGUA SUPERFICIALES NATURALES

El análisis de los resultados obtenidos de las aguas superficiales de los caños Bijao, San Luis, Danta y río Orotoy, se realiza con base en las concentraciones registradas, con el fin de determinar la calidad fisicoquímica de los recursos naturales del Área de Sostenibilidad Agroenergética (ASA). Adicionalmente, los datos reportados se comparan con Artículo 38 del Decreto 1594/84 del Ministerio de Salud, en el cual se establecen los criterios de calidad para destinar el recurso a consumo humano y doméstico, previo tratamiento convencional.

A partir de los análisis realizados se obtienen los siguientes resultados:

El agua recolectada en los caños (Danta, San Luis, Bijao) y el río Orotoy presenta en general valores de pH, cianuros, color real, cloruros, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal, sulfatos y surfactantes considerados bajos por ser del orden de las mínimas cuantificables de las metodologías de determinación, a su vez, los resultados se encuentran dentro de los niveles estipulados de acuerdo al Artículo 38 del Decreto 1594/84 del Ministerio de Salud.

La alcalinidad, está asociada con las formas en las cuales el gas carbónico puede encontrarse en el cuerpo de agua natural y es una de las maneras para indicar fundamentalmente la presencia de iones de bicarbonato y carbonato. La mayoría de las aguas naturales y en especial, aquellas que poseen valores altos de alcalinidad total, resisten mejor los cambios drásticos de pH, y por consiguiente, son propicias para el desarrollo de la biota acuática; la alcalinidad del agua, depende en gran parte de la naturaleza geoquímica del sustrato, generalmente los valores de alcalinidad total para los sistemas acuáticos continentales tropicales, son relativamente bajos, (hasta 70 mgCaCO₃/L) (Cantera *et al*, 2009) como ocurre en las aguas superficiales analizadas que reportan valores de alcalinidad inferiores e iguales a 2.46 mgCaCO₃/L.

Otro de los parámetros para determinar la calidad del agua es la dureza; en un agua natural los iones que más contribuyen a la dureza son los iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}); en especial los bicarbonatos de calcio y magnesio. La dureza del agua no tiene efectos perjudiciales para la salud y su remoción obedece a la necesidad económica de reducir el consumo de jabón y los depósitos de precipitados en artefactos de calentamiento del agua. Aguas con durezas intermedias pueden poseer flora y fauna más variada, pero son menos productivas en términos de biomasa. Según la clasificación de la dureza (Cantera *et al*, 2009), las aguas superficiales del ASA se catalogan como blandas en todos los puntos analizados, ya que presentan esta propiedad en un rango entre 0-75mg CaCO_3/L .

Los valores de conductividad dependen de la concentración total de sustancias disueltas ionizadas en el agua, es un estimativo del contenido de sólidos disueltos y permite evaluar aproximadamente la mineralización global del agua. De acuerdo a la conductividad reportada en las aguas superficiales del ASA y a la clasificación presentada en Rodier, 1998, las aguas monitoreadas tiene un grado de mineralización muy débil.

En la tabla 3 se presenta la clasificación del agua en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) (Sánchez, 2007). Según esta clasificación, se puede decir que las aguas de los caños Danta, San Luis, Bijao y río Orotoy con relación a la DBO_5 , son aguas de excelente calidad por tener concentraciones menores a 3.0 mg/L; Por otra parte y referente a la DQO las aguas de los caños Bijao, San Luis, Danta (700m aguas arriba y 100 m aguas abajo de la descarga) y río Orotoy (pto intermedio entre las confluencias del caño Bijao y San Luis) se clasifican como buena calidad, mientras que el caño Danta (400m y 550m a. abajo de la descarga) son aguas de calidad aceptable y río Orotoy (250m a. arriba de la confluencia con el caño Bijao y 250m a. abajo de la confluencia con el caño San Luis) se clasifica como agua contaminada por presentar valores de DQO mayores a 40 y menores a 200 mg/L.

Tabla 3. Clasificación de las aguas en términos de DBO₅ y DQO

Concentración de DBO₅	Concentración de DQO	Criterio	Descripción
Menor o igual a 3 mg/L	Menor o igual a 10 mg/L	Excelente	No contaminada
Mayor a 3 mg/L y menor o igual a 6 mg/L	Mayor a 10 mg/L y menor o igual a 20 mg/L	Buena calidad	Aguas superficiales con bajo contenido de materia orgánica biodegradable y no biodegradable
Mayor a 6 mg/L y menor o igual a 30 mg/L	Mayor a 20 mg/L y menor o igual a 40 mg/L	Aceptable	Con indicio de contaminación. Aguas superficiales con capacidad de autodepuración o con descarga de aguas residuales tratadas biológicamente
Mayor de 30 mg/L y menor o igual a 120 mg/L	Mayor de 40 mg/L y menor o igual a 200 mg/L	Contaminada	Aguas superficiales con descargas de aguas residuales crudas, principalmente de origen municipal.
Mayor a 120 mg/L	Mayor a 200 mg/L	Fuertemente contaminada	Aguas superficiales con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales

Fuente: Sánchez, 2007. Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México

En cuanto a las concentraciones de grasas y aceites-hidrocarburos (G&A-HC) e hidrocarburos no polares (HC) en los caños y el río Orotoy, es muy baja por ser inferior a la mínima cuantificable de la metodología empleada de análisis (<2.00 mg/L y <1.00 mg/L respectivamente), por lo anterior se infiere que el agua monitoreada en el ASA no presenta afectación por compuestos grasos. Adicionalmente, durante la jornada de monitoreo no se observó *in situ* película de grasas en la superficie del agua, condición que se ajusta a la norma.

Con respecto a los sólidos suspendidos (SS) y turbiedad en las aguas superficiales del ASA. Se visualiza que los niveles del material suspendido varían considerablemente entre los caños monitoreados y el río Orotoy, reportando los mayores contenidos las aguas del río Orotoy. En cuanto a la turbiedad, este

parámetro se relaciona con la materia en suspensión, por consiguiente, se observa la misma tendencia de los sólidos suspendidos, pues los valores aumentan en río Orotoy, condición que se puede deber a las lluvias que se presentaron en la jornada de monitoreo del río. La turbidez incide directamente en la transparencia, en la capacidad de penetración lumínica, y por ende, en el flujo de energía dentro del sistema acuático y en los niveles de productividad; valores próximos o superiores a 200 NTU, pueden presentar una alteración drástica en los niveles tróficos (Cantera *et al*, 2009). Sin embargo, normalmente los ecosistemas acuáticos tropicales, en especial ríos y embalses de bajas alturas sobre el nivel del mar, son muy turbios por el arrastre de materiales, propiciado por la alta lixiviación que se da en estas regiones.

Con relación al nitrógeno, éste es uno de los elementos esenciales para el crecimiento de algas, al ser oxidado por las bacterias nitrificantes, reduciendo los niveles de oxígeno disuelto en el agua. En general, las aguas naturales sin contaminación fuerte tienen un contenido de nitrógeno total de 0.18 – 3.0 mg/L (Romero, 2005). Las aguas superficiales del ASA reportan concentraciones de nitrógeno total inferiores e iguales a 1.75 mgN/L, resultados que infieren que el cuerpo de agua no presenta indicios de contaminación por este nutriente.

Al igual que el nitrógeno, el fósforo es un elemento esencial en el crecimiento de plantas y animales, es considerado como uno de los nutrientes que controlan el crecimiento de algas, su determinación es necesaria en estudios de polución de cuerpos de agua. En los ecosistemas acuáticos, se encuentra en forma de ortofosfatos, y el fosfato se forma fundamentalmente por el fósforo orgánico disuelto, el cual es descompuesto por acción bacteriana y es así como las macrófitas acuáticas lo pueden incorporar (Cantera *et al*, 2009). En general, en aguas naturales la concentración de fósforo es baja, de 0.01 a 1 mg P/L (Romero, 2005) como se presenta en los caños y río Orotoy.

En cuanto a los metales (cromo hexavalente, cadmio, cobre, plomo, plata, zinc, bario, arsénico, selenio, mercurio) las concentraciones obtenidas de consideran aceptables para destinar el recurso a consumo humano y doméstico.

Con respecto al análisis bacteriológico (coliformes totales, coliformes fecales), en general, en los puntos aguas arriba y aguas abajo de la influencia del ASA sobre los cuerpos de agua, se mantienen concentraciones de orden similar, a su vez se observa que el recuento de coliformes totales supera el límite establecido en el Artículo 38. La presencia de coliformes en las aguas superficiales indica contaminación proveniente de residuos humanos, animales o erosión del suelo separadamente, o de una combinación de las tres fuentes (Romero, 2005).

CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DEL AREA DE SOSTENIBILIDAD AGROENERGÉTICA (ASA)

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados de caracterización de suelos con riego en los diferentes cultivos de las parcelas del ASA y el control sin riego.

Tabla 4. Resultados de los análisis de laboratorio muestras puntuales de suelo-ASA

PERFIL SUELOS LISMETROS AREA DE SOSTENIBILIDAD AGROINDUSTRIAL (ASA) CAMPO CASTILLA	IDENTIFIC. MUESTRA	LS5 E100 CAÑA DE AZUCAR		LS20 E100 JATROPHA		SUELO LS31 E80 CAUCHO		LX15 E50 JATROPHA		LS15 E100 PASTO ELEFANTE		LS42 E100 SIN CULTIVO	
	Profundidad	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)	(SUPERFICIAL)	(PROFUNDA)
SUBMISSION: 100140536	FECHA DE MUESTREO	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013	26-abr-2013
Componente	Unidad	200874832	200874833	200874840	200874841	200874830	200874831	200874838	200874839	200874836	200874837	200874834	200874835
ANÁLISIS DE LABORATORIO													
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS													
HUMEDAD A 105 GR C	% Peso	1.83	1.93	2.04	2.01	1.94	2.18	1.80	2.04	1.97	2.04	1.52	1.50
TEXTURA													
ARENA	% Peso	68.8	67.4	62.8	67.4	60.2	63.8	70.3	65.3	59.7	67.4	57.4	61.4
ARCILLA	% Peso	7.2	6.1	7.4	12.2	11.7	12.1	7.4	8.2	11.5	10.2	12.2	12.2
LIMO	% Peso	24	26.5	29.8	20.4	28.1	24.1	22.3	26.5	28.8	22.4	30.4	26.4
TEXTURA	Distribución de tamaño	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso

Fuente: Instituto colombiano del petróleo (2013)

(Continuación Tabla 4)

SUELOS ÁREA DE SOSTENIBILIDAD AGROENERGÉTICA (ASA)		SUBMISSION: 100147597	Componente	GYA-HIDROCARBUROS	
IDENTIFIC. MUESTRA	PROFUNDIDAD	FECHA DE MUESTREO	Unidad	% Masa	
PARCELA CAUCHO	SURCO 3	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904868	0.0173
	SURCO 3	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904869	0.0223
	CALLE 5	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904870	0.0195
	CALLE 5	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904871	0.0255
	SURCO 9	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904872	0.0261
	SURCO 9	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904873	0.0356
	CALLE 12	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904874	0.0224
	CALLE 12	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904875	0.0337
	SURCO 15	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904876	0.0118
	SURCO 15	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904877	0.0343
	CALLE 17	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904878	0.0282
	CALLE 17	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904879	0.0309
	SURCO 21	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904880	0.0406
	SURCO 21	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904881	0.0262
CALLE 24	SUPERFICIAL (0.30m)	12-jul-2013	200904882	0.0325	
CALLE 24	PROFUNDA (1.20m)	12-jul-2013	200904883	0.0306	
BLANCO 2	DETRÁS DE LA BARCAZA	SUPERFICIAL (0.30m)	16-jul-2013	200904946	0.0287
	DETRÁS DE LA BARCAZA	PROFUNDA (1.20m)	16-jul-2013	200904947	0.0291
BLANCO 3	CERCA AL PORTON VIA A LA CABAÑA	SUPERFICIAL (0.30m)	17-jul-2013	200904948	0.0200
	CERCA AL PORTON VIA A LA CABAÑA	PROFUNDA (1.20m)	17-jul-2013	200904949	0.0198
BLANCO 4	CERCA AL NACEDERO	SUPERFICIAL (0.30m)	17-jul-2013	200904950	0.0353
	CERCA AL NACEDERO	PROFUNDA (1.20m)	17-jul-2013	200904951	0.0304
LOUISIANA ADMINISTRATIVE CODE. NATURAL RESOURCES. SUBPART 1. STATEWADE ORDER 29B. Capt 3. Onsite Storage, Treatment and Disposal of Nonhazardous Oilfield Waste (NOW)				<1	

Fuente: Instituto colombiano del petróleo (2013)

Tabla 5. Resultados de los análisis de laboratorio muestras compuestas suelos ASA (Ejemplo: Parcela de caucho).

SUELOS ÁREA DE SOSTENIBILIDAD AGROENERGÉTICA (ASA)	IDENTIFIC. MUESTRA	PARCELA CAUCHO																Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health	LOUISIANA ADMINISTRATIVE CODE. NATURAL RESOURCES. SUBPART 1. STATEWIDE ORDER 298, Capt 3, Onsite Storage, Treatment and Disposal of Nonhazardous Offfield Waste (NOW)		
		SURCO 3		CALLE 5		SURCO 9		CALLE 12		SURCO 15		CALLE 17		SURCO 21		CALLE 24					
		Profundidad	SUPERFICIAL (0.30m)	PROFUNDA (1.20m)	SUPERFICIAL (0.30m)			PROFUNDA (1.20m)													
SUBMISSION: 100147597	FECHA DE MUESTREO	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013				
Componente	Unidad	200904868	200904869	200904870	200904871	200904872	200904873	200904874	200904875	200904876	200904877	200904878	200904879	200904880	200904881	200904882	200904883				
ANÁLISIS DE LABORATORIO																					
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS																					
PH / T (GR C) EN SUELOS RELACION 1:5	Uni. pH	5.57/21.9	4.94/21.9	5.11/21.7	4.88/21.5	5.50/20.3	4.80/20.8	5.16/20.5	5.22/19.1	5.11/20.4	4.79/20.3	4.75/21.4	4.75/19.6	5.22/20.6	4.51/21.2	4.88/20.4	4.73/21.1	6-8	6-9		
CONDUCTIVIDAD RELACION 1:5 / T	uS/cm/°C	20.5/25.0	50.8/25.0	15.4/25.0	10.0/25.0	22.1/25.0	28.8/25.0	13.5/25.0	14.9/25.0	24.2/25.0	27.8/25.0	44.0/25.0	16.4/25.0	19.6/25.0	31.6/25.0	19.7/25.0	17.0/25.0	2000**	<4000*		
FOSFORO DISPONIBLE	mg/kg	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	6.85	<5.00	9.97	<5.00	6.84	<5.00	NR	NR		
GYA- HIDROCARBUROS	% Masa	0.0173	0.0223	0.0195	0.0255	0.0261	0.0356	0.0224	0.0337	0.0118	0.0343	0.0282	0.0309	0.0406	0.0262	0.0325	0.0306	NR	<1		
HIDROCARBUROS NO POLARES	% Masa	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	<0.00500	NR	NR		
HUMEDAD A 105 GR C	% Peso	1.13	0.862	1.43	0.993	1.15	0.967	1.23	0.867	1.29	1.25	0.905	1.27	1.33	1.40	0.954	1.21	NR	NR		
NITRATOS	mg NO3- N/Kg	3.40	<1.58	4.10	1.95	2.05	<1.58	2.95	<1.58	2.30	<1.58	8.15	2.50	2.65	<1.58	4.10	4.40	NR	NR		
NITRITOS	mg NO2- N/Kg	0.39	<0.076	0.20	<0.076	0.11	<0.076	0.09	<0.076	0.11	<0.076	0.70	<0.076	<0.076	<0.076	0.60	<0.076	NR	NR		
NITROGENO AMONIAICAL INTERCAMBIABLE	mg NH4- N/Kg	<12.4	<12.4	21.4	<12.4	<12.4	22.4	<12.4	<12.4	28.8	<12.4	<12.4	<12.4	<12.4	16.4	<12.4	<12.4	NR	NR		
NITROGENO TOTAL KJELDAHL	mg N/Kg	1117	383	1009	<145	879	299	769	518	1104	436	1109	475	856	451	1017	523	NR	NR		
NITROGENO TOTAL	mg N/L	1133	397	1035	159	894	323	784	532	1135	450	1130	490	871	469	1034	540	NR	NR		
CARBONO ORGANICO TOTAL	mg/kg	7831	3755	3354	3412	9350	4956	9854	4201	10700	3613	11100	3901	8145	3492	12200	4555	NR	NR		
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO	meq/100 g	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	8.82	<5.98	<5.98	<5.98	<5.98	6.95	6.98	<5.98	NR	NR		
ACIDEZ INTERCAMBIABLE	meq/100 g	0.79	1.57	1.76	1.76	0.81	1.93	1.33	1.08	1.68	2.27	1.32	2.40	1.49	2.91	1.73	2.28	NR	NR		
SALINIDAD EQUIVALENTE	mg NaCl/Kg	10.3	26.6	7.65	4.87	11.2	14.7	6.66	7.39	12.3	14.2	22.9	8.17	9.84	16.2	9.89	8.48	NR	NR		
RAS	Relacion Abs.de Sodio	4.84	9.23	1.21	1.37	5.52	7.01	1.39	2.26	2.82	4.19	1.14	2.26	4.05	3.64	0.73	2.43	5	<12		
CALCIO	meq/L	0.079	0.15	0.068	0.076	0.076	0.098	0.11	0.044	0.071	0.078	0.90	0.15	0.10	0.11	0.31	0.079	NR	NR		
MAGNESIO	meq/L	0.066	0.096	0.069	0.033	0.052	0.030	0.094	0.047	0.10	0.049	0.70	0.047	0.091	0.075	0.32	0.050	NR	NR		
SODIO	meq/L	1.31	3.24	0.32	0.32	1.40	1.77	0.44	0.48	0.83	1.06	1.02	0.70	1.26	1.10	0.41	0.62	NR	NR		
TEXTURA																					
ARENA	% Peso	69.3	67.3	73.2	73.4	71.3	71.3	73.3	61.3	71.2	67.2	71.3	69.2	67.6	67.6	69.7	65.6	NR	NR		
ARCILLA	% Peso	10.5	18.6	6.50	16.6	8.50	16.6	10.5	24.6	10.5	18.6	10.5	16.6	12.1	18.2	12.1	20.2	NR	NR		
LIMO	% Peso	20.2	14.1	20.3	10.0	20.2	12.1	16.2	14.1	18.3	14.2	18.2	14.2	20.3	14.2	18.2	14.2	NR	NR		
TEXTURA	Distribucion de tamaño	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arcillo Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arcillo Arenoso	NR	NR		
FENOL	mg/Kg	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	<1.70E-2	0.1	NR		

Fuente: Instituto colombiano del petróleo (2013)

(Continuación Tabla 5)

SUELOS ÁREA DE SOSTENIBILIDAD AGROENERGÉTICA (ASA)	IDENTIFIC. MUESTRA	PARCELA CAUCHO																Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health	LOUISIANA ADMINISTRATIVE CODE, NATURAL RESOURCES, SUBPART 1, STATEWIDE ORDER 298, Capt 3. Onsite Storage, Treatment and Disposal of Nonhazardous Oilfield Waste (NOW)
		SURCO 3		CALLE 5		SURCO 9		CALLE 12		SURCO 15		CALLE 17		SURCO 21		CALLE 24			
		Profundidad	SUPERFICIAL (0.30m)	PROFUNDA (1.20m)	SUPERFICIAL (0.30m)														
SUBMISSION: 100147597	FECHA DE MUESTREO	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013	12-jul-2013		
Componente	Unidad	200904868	200904869	200904870	200904871	200904872	200904873	200904874	200904875	200904876	200904877	200904878	200904879	200904880	200904881	200904882	200904883		
ANÁLISIS DE LABORATORIO																			
ANÁLISIS DE METALES																			
BARIO	mg/kg	35.12	6.515	7.106	7.729	42.05	15.66	11.38	14.53	11.26	8.301	10.03	7.109	9.953	4.282	9.817	7.298	750	20000
CALCIO	mg/kg	349	61.24	130	46.33	306.0	70.66	322	157	175.0	65.54	363	81.38	207	49.05	374	56.48	NR	NR
CADMIO	mg/kg	0.520	0.849	0.674	0.527	<0.227	0.449	0.404	0.559	0.444	<0.227	0.669	0.716	0.513	0.524	0.573	0.587	1.4	10
COBRE	mg/kg	7.926	6.069	8.423	8.778	7.985	13.43	12.36	13.77	12.53	11.88	10.12	10.76	9.687	7.366	10.98	9.506	63	NR
POTASIO	mg/kg	226	107	179	165	156	399	314	418	258	182	274	232	202	125	391	210	NR	NR
MAGNESIO	mg/kg	151	54.2	110	91.63	107	192	195	226	157	125	221	160	146	64.41	284	139	NR	NR
MANGANESO	mg/kg	59.20	23.78	68.09	33.78	82.78	55.19	91.30	47.06	90.34	69.22	114	53.28	62.09	60.17	102	54.26	NR	NR
SODIO	mg/kg	85.16	92.0	53.36	46.12	87.4	87.75	59.97	78.25	60.7	56.45	72.51	67.4	89.35	70.2	77.15	69.95	NR	NR
NIQUEL	mg/kg	4.732	2.485	2.911	3.557	2.564	7.938	4.783	7.223	8.039	3.960	5.794	4.160	5.877	5.465	7.302	3.813	50	NR
PLOMO	mg/kg	14.59	14.07	10.88	13.93	6.897	7.623	7.817	9.150	7.273	8.037	5.672	6.665	10.78	5.239	5.428	4.786	70	500
VANADIO	mg/kg	45.20	41.44	49.73	57.11	44.6	74.52	53.59	75.39	60.97	72.47	52.28	62.64	45.65	46.06	51.25	61.53	130	NR
ALUMINIO	% Peso	1.86	1.57	1.86	2.99	1.66	4.41	2.84	4.98	3.09	3.65	2.67	3.61	2.20	2.01	3.13	3.18	NR	NR
HIERRO	% Peso	2.87	2.93	2.76	3.86	2.57	4.20	2.97	4.39	3.13	4.13	2.94	4.13	2.71	2.72	2.80	3.58	NR	NR
PLATA	mg/kg	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	<0.054	20	200
ARSENICO	mg/kg	4.375	3.328	4.144	4.675	4.363	6.508	4.941	6.441	5.088	6.223	3.919	5.679	3.362	2.460	4.032	4.696	12	10
BERILIO	mg/kg	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	<0.039	4	NR
COBALTO	mg/kg	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	<0.171	40	NR
LITIO	mg/kg	8.991	3.328	4.607	7.097	9.319	11.96	6.578	13.16	7.600	8.585	5.701	8.368	5.682	3.829	7.234	7.647	NR	NR
MOLIBDENO	mg/kg	0.548	0.861	0.650	1.331	0.846	1.035	0.740	1.145	1.013	1.453	0.828	1.169	1.063	1.225	0.900	1.090	5	NR
SELENIO	mg/kg	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	<0.699	1	10
ZINC	mg/kg	14.39	11.7	15.14	16.73	13.1	25.26	19.24	26.03	20.3	21.1	17.66	20.11	13.56	11.24	19.82	19.71	200	500
BORO	mg/kg	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	<0.903	2	NR
MERCURIO	µg/kg	72.6	77.0	69.4	109	87.0	89.6	90.4	127	96.0	107	92.4	125	95.7	108	87.9	119	6600***	10000***
NA: No Aplica NR: No Reporta																			
(**) Aun cuando la norma reporta la conductividad en mmhos/cm, se hace la conversión a µS/cm debido a las bajas conductividades de las muestras analizadas.																			
(***) Aun cuando la norma reporta la conductividad en dS/m, se hace la conversión a µS/cm debido a las bajas conductividades de las muestras analizadas.																			
(***) Aun cuando la norma reporta la concentración en mg/kg, se hace la conversión a µg/kg debido a las bajas concentraciones de las muestras analizadas																			

Fuente: Instituto colombiano del petróleo (2013)

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE SUELO.

En Colombia, la legislación ambiental no decreta límites máximos de contaminantes en los suelos, por lo que se hace necesario tomar como referencia las regulaciones ambientales internacionales. Por ende, los resultados obtenidos del análisis de los suelos del área de sostenibilidad agroenergética se evalúan con la norma ambiental estadounidense *Lousiana Administrative Code Natural Resources. Subpart 1. Statewide Order 29B*, donde se establecen los criterios para el almacenamiento, tratamiento y disposición de residuos no peligrosos generados de operaciones de exploración y producción de pozos de petróleo y gas. A su vez, se compara con la regulación ambiental *Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*, donde se establecen los criterios de calidad como punto de referencia en suelos para evaluar la necesidad de saneamiento o remediación con respecto al uso específico del mismo; para los suelos evaluados se establece uso agrícola.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede deducir que la muestra del blanco de suelo, recolectadas a ambas profundidades, presentan bajos contenidos de grasas y aceites-hidrocarburos, con magnitudes del orden de la mínima concentración cuantificable del método de determinación (MCC) (<0.0100 % masa), evidenciando que este terreno se encuentra libre de material graso.

Las muestras puntuales de los suelos del ASA, presentan valores de grasas y aceites - hidrocarburos que se ajustan al requisito estipulado en la legislación ambiental *Lousiana Administrative Code 29B*, con concentraciones entre 0.0118 y 0.0938 % masa, siendo la muestra del potrero 1 ubicada detrás de la parcela palma (profundidad 1.20m), la que registra la mayor concentración de compuestos grasos; por lo cual se puede inferir la mínima influencia en el suelo por la escorrentía de aguas de la industria petrolera.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las muestras compuestas se puede indicar:

- **Propiedades físicas.** Demuestran que la textura franco arenosa abarca un porcentaje superior a 80 % en el ASA, seguido de una textura franco arcillo arenosa, distribuidos en la parte central del área considerada con pequeñas islas de suelos francos y franco arcillosos. Los suelos franco arenosos se presentan en la parte periférica del área y colindan con los drenajes naturales actuales (Informe Agrodinco, 2012). Las características de estos suelos se asocian con su importancia agrícola, su capacidad de drenaje interno y lixiviación.

- **pH.** El pH juega un papel muy importante en los procesos edáficos y en la estabilidad estructural del suelo; se ha comprobado que la mayor estabilidad del suelo se presenta entre las unidades de pH 7.0 – 8.0, ya que en este rango se encuentra la mayor saturación de Calcio y Magnesio, y disponibilidad de diversos elementos nutritivos como el fósforo, Mn, Cu, Zn, y B (Parra, 2003). Con referencia a lo anterior y según los valores obtenidos de pH en las muestras analizadas de los suelos del ASA, la mayoría de los puntos monitoreados presentan tendencia muy ácida a ácida, al reportar valores entre 4.27 y 5.94 uni. pH, además de encontrarse por fuera del rango establecido por la norma internacional (6 a 9 uni. pH); únicamente el suelo de la parcela eucalipto – calle 40 (Profundidad 1.20m) se ajusta al criterio de la regulación contemplada. Los suelos de los Llanos Orientales tienen poca acidez total y alta acidez intercambiable, lo que se correlaciona con pH muy ácido (Castro, 1998), demostrado en las muestras blanco recolectadas, que no tienen incidencia de riego por las aguas de producción.

- **Conductividad.** Todos los suelos monitoreados se catalogan como No Salinos por registrar valores de conductividad dentro del rango 0 - 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Usón, A. *et al*, 2010), a su vez, los valores de conductividad en los suelos del ASA, se ajustan a lo permitido por las normas internacionales referidas (2000 y <4000 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

- **Nitrógeno.** El principal elemento que limita el crecimiento de las plantas forrajeras es el nitrógeno; las pasturas toman el nitrógeno del suelo, mayormente en forma de nitratos y amonio; el contenido de este elemento en los suelos varía considerablemente, pero los valores normales para la capa superficial son del 0.2 al 0.7% peso (Usón, A. *et al*, 2010). En las muestras analizadas de suelos del ASA, las concentraciones de nitrógeno total se encuentran entre 0.0159- 0.1434%, las cuales están por fuera del rango considerado como “normal” para la capa superficial, con concentraciones muy bajas.

- **Fósforo.** Los suelos monitoreados tienen concentraciones muy bajas de este elemento. Se excluye el suelo de la parcela palma, calle 5 (superficial 0.30m), el cual tiene un valor medio de fósforo. En suelos ácidos, la disponibilidad del P es muy baja debido a que el elemento se encuentra adsorbido específicamente como fosfato en las superficies de los óxidos de hierro y aluminio, y precipitado en forma de fosfatos de hierro y aluminio muy insolubles. (Parra, M. 2003)

- **Humedad.** Los suelos analizados en el ASA presentan baja humedad entre <0.305 y 1.86% peso, por ende, una baja capacidad de retención de agua. La falta de humedad podría estar relacionada con baja infiltración, alta evaporación, baja capacidad de retención de humedad del suelo, bajas lluvias o lluvias irregulares (FAO, 2000). El mayor porcentaje de humedad se reporta en los suelos de la parcela palma-surco 20 (superficial).

- **Carbono.** La materia orgánica del suelo es la fracción orgánica que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos provenientes de las actividades industriales del hombre, como la contaminación de suelos por hidrocarburos del petróleo (INE, 2006). En los suelos analizados las concentraciones de Carbono Orgánico Total se encuentran entre 0.18 y 1.58% peso, lo cual según la

clasificación de Núñez (2000), son suelos con media y baja concentración de COT.

- **Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).** Se define como la capacidad del suelo para retener e intercambiar cationes, y depende del número de cargas negativas existentes en la superficie de la arcilla y de la materia orgánica. Si la CIC es alta, se asocia con una buena saturación de bases, ya que esto indica un gran potencial de suministro y reserva de calcio, magnesio y potasio; cuando un suelo presenta baja CIC es índice de baja fertilidad (Castro, H. 1998). Adicionalmente, los suelos con mayor contenido de arcilla y materia orgánica tienen mayor CIC (INE, 2006). Los suelos del ASA, tienen una capacidad de intercambio catiónico baja y por lo tanto una baja fertilidad, lo anterior, coherente con el bajo contenido de arcilla y materia orgánica de estos suelos.

- **Relación de adsorción de sodio (RAS)** es un índice efectivo de peligro de sodificación de un suelo y está directamente relacionado con el porcentaje de sodio intercambiable (ESP). De acuerdo a Usón, A. *et al*, 2010, la mayoría de los suelos del ASA, son No sódicos a partir de la Relación de Adsorción de Sodio. Por otro lado, los valores de RAS en todos los suelos analizados, se ajustan a la norma de *Louisiana* (<12).

- **Metales.** Las concentraciones de metales en el suelo de las parcelas evaluadas: bario, cadmio, cobre, níquel, plomo, vanadio, plata, arsénico, berilio, cobalto, molibdeno, selenio, zinc, boro y mercurio se ajustan a los criterios de calidad de suelos establecidos en las normas *Louisiana Administrative Code* y/o *canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health*. Por su parte, se observa mínima variación de concentración de metales en los diferentes perfiles del suelo muestreado en las parcelas sembradas, dando como resultado en general mayores concentraciones a nivel superficial; sin embargo, las concentraciones de muestras blanco (controles no sometidas a riego) presentan

similar tendencia en los dos niveles analizados, mientras que en las muestras de potreros (controles sometidos a riego) la tendencia de los metales es aumentar la concentración en estratos inferiores.

Teniendo en cuenta la presencia de metales pesados asociados a la industria de petróleo, se encontró que para el metal Plomo las mayores concentraciones (10.8 - 14.6 ppm) se registran de acuerdo a la topografía del terreno, en la parte superior de los drenajes, caso particular que se observa en la parcela de caucho (surco 3 y calle 5), mientras que caso contrario sucede en la parcela eucalipto (surco 15, calle 20, surco 25, calle 30), donde las concentraciones más representativas (8.6 – 16.3 ppm) se presentan desde la zona media de la parcela hasta la más baja de los drenajes siguiendo la dirección de flujo o escorrentía. Las concentraciones de las referencias con riego (potreros 1 y 1) y sin riego (Blancos 1, 2, 3 y 4) oscilaron en un rango entre 3.2 y 7.4 ppm.

Las evidencias anteriores, demuestran de igual forma para el Manganeso, las mayores concentraciones se registran en el nivel superficial (59.2 – 191 ppm), que sobrepasa en algunos casos las recomendaciones agrícolas (100 mg/Kg), no obstante el blanco 4 ratifica la misma tendencia en el suelo que no es sometido a proceso de riego. La presencia de manganeso en el suelo puede alcanzar concentraciones tóxicas si se asocia a otras características como la acidez ($\text{pH} < 5.5$) que permiten su aumentar la solubilidad.

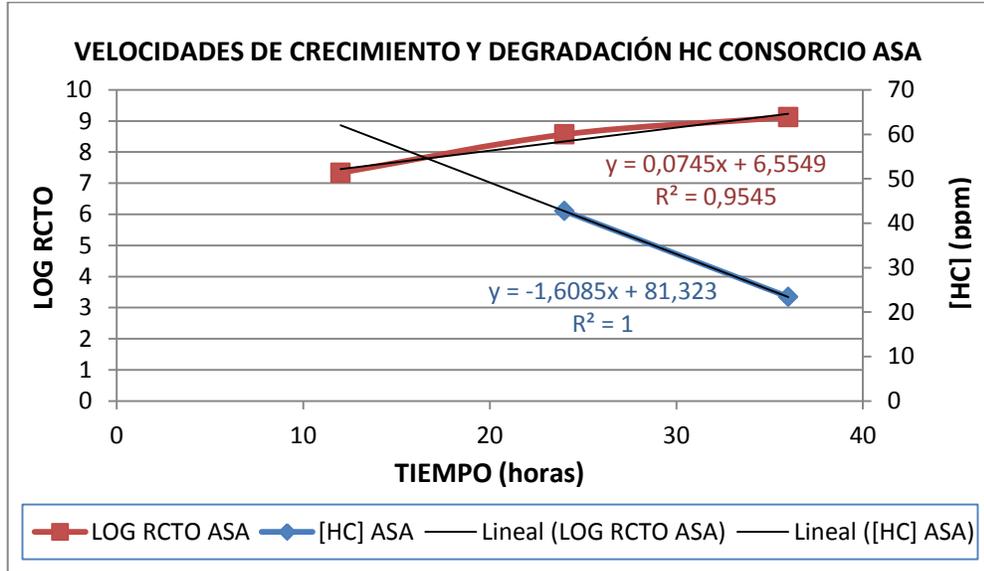
Así mismo, puede ser notable para los suelos de los Llanos Orientales, elevados índices de Aluminio y Hierro en el suelo. La presencia de Aluminio en el suelo depende el pH y en algunas ocasiones puede ser tóxico provocando efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas. Para el caso del hierro, las condiciones se asocian a las formaciones y otras características físicas de los suelos, tales como la coloración rojiza que fue muy común en estratos inferiores a la capa arable (0.3 m) de las parcelas monitoreadas en el área de estudio.

Por otro lado, algunos elementos en menor proporción importantes de igual manera para crecimiento de las plantas, tales como Boro, Zinc, Cobre y Molibdeno superan los niveles de criticidad que se recomiendan para suelos agrícolas, especialmente en la capa arable (0.3m). Cabe resaltar que las condiciones de alta acidez en el suelo como se presenta en los Llanos Orientales, provoca en muchos casos detrimento en los elementos menores como B, Cu y Zn, situación que no se refleja en los resultados tomados en época climática seca, factor que induce las deficiencias nutricionales en cultivos para los elementos de K, B y Zn (Castro, 1998).

- **Mineralogía y granulometría.** De acuerdo con los resultados mineralógicos y granulométricos obtenidos se puede resaltar las siguientes características:

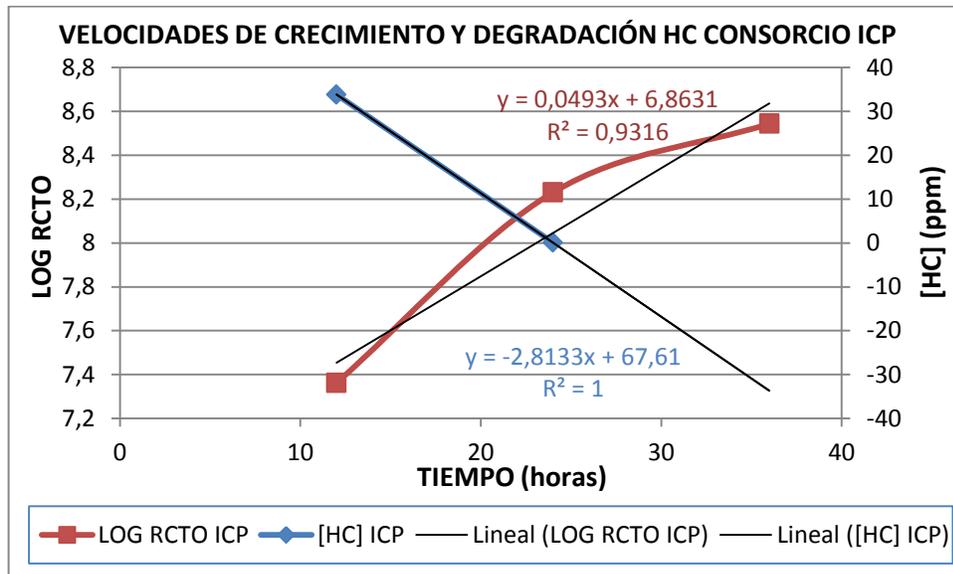
- Presentan altos contenidos de Cuarzo (74-90% en peso) y bajos contenidos de Minerales arcillosos (Tr(2)-21% en peso).
- La arcilla 14Å(3) corresponde a una arcilla con escaso a nulo carácter hinchable reflejado en su comportamiento ante los tratamientos químicos con Etilenglicol, característico de estructuras cristalinas de minerales arcillosos tipo Vermiculita; este mineral se evidencia en contenidos que no exceden al 14% en peso a nivel de la fracción menor de 2 micras.
- Los minerales arcillosos predominantes corresponde a Caolinita (9%-93% en peso a nivel de la fracción menor de 2 micras) e Illita (ND(4)-75% en peso a nivel de la fracción menor de 2 micras).
- Los tamaños de grano se clasifican como Limos (11%-67%) y Arenas (33%-89%).
- El modelo geológico realizado muestra que la mayor distribución de espesores de la unidad gravosa se en la parte este y sureste del área estudiada. Los mayores espesores de arcilla limosa se pueden observar al oeste y centro del modelo 3D.

Anexo C. Cálculos de velocidad específica de crecimiento, velocidad de consumo de hidrocarburos y productividad para cada una de las condiciones experimentales



Vel Crecim ASA 0.0745 h-1

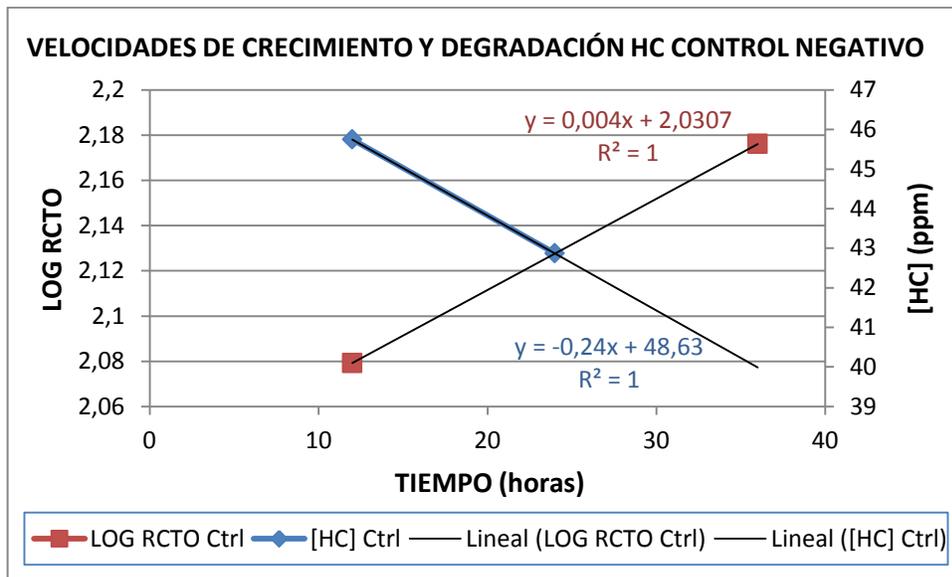
Vel degrad HC ASA 1.6085 ppm/h



Vel Crecim ICP 0.0493 h-1

Vel degrad HC

ICP 2.8133 ppm/h

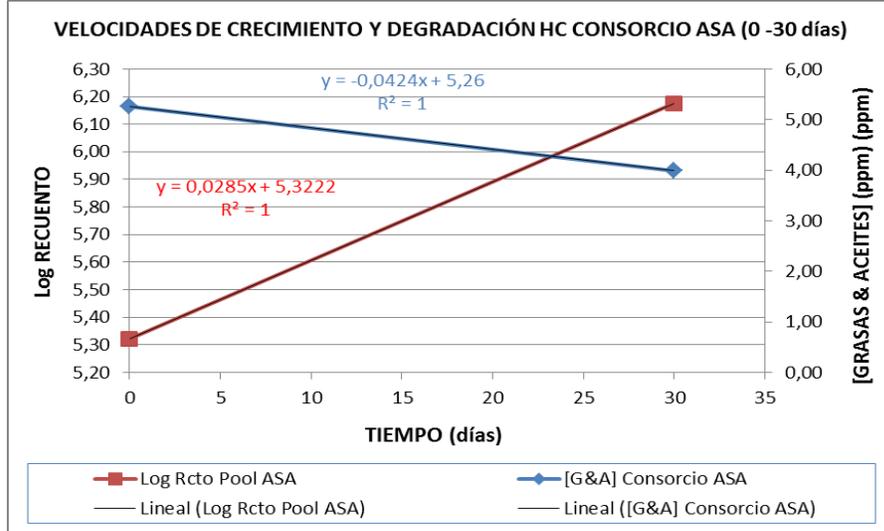


Vel Crecim Ctrl 0.004 h-1

Vel degrad HC Ctrl 0.24 ppm/h

TIEMPO (horas)	MUESTRA	RECuento (UFC/mL)	PRODUCTIVIDAD (UFC/mL.h)
0	Pool ASA	1.73E+07	
12	Pool ASA	2.17E+07	1.81E+06
24	Pool ASA	3.69E+08	1.54E+07
36	Pool ASA	1.33E+09	3.69E+07
48	Pool ASA	1.16E+09	2.42E+07
72	Pool ASA	2.37E+08	3.29E+06
0	Pool ICP	1.70E+07	
12	Pool ICP	2.30E+07	1.92E+06
24	Pool ICP	1.70E+08	7.08E+06
36	Pool ICP	3.50E+08	9.72E+06
48	Pool ICP	2.50E+08	5.21E+06
72	Pool ICP	2.00E+08	2.78E+06

Anexo D. Cálculos de velocidad específica de crecimiento, velocidad de consumo de hidrocarburos y productividad en el mesocosmos

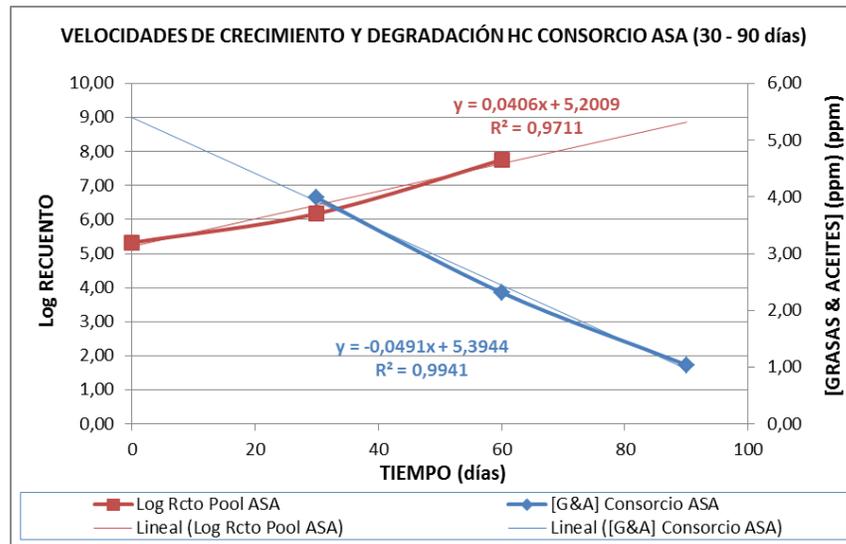


Vel Crecim Pool ASA

0,0285 d⁻¹

Vel degrad G&A Pool ASA (0-30 días)

0,0424 ppm/día

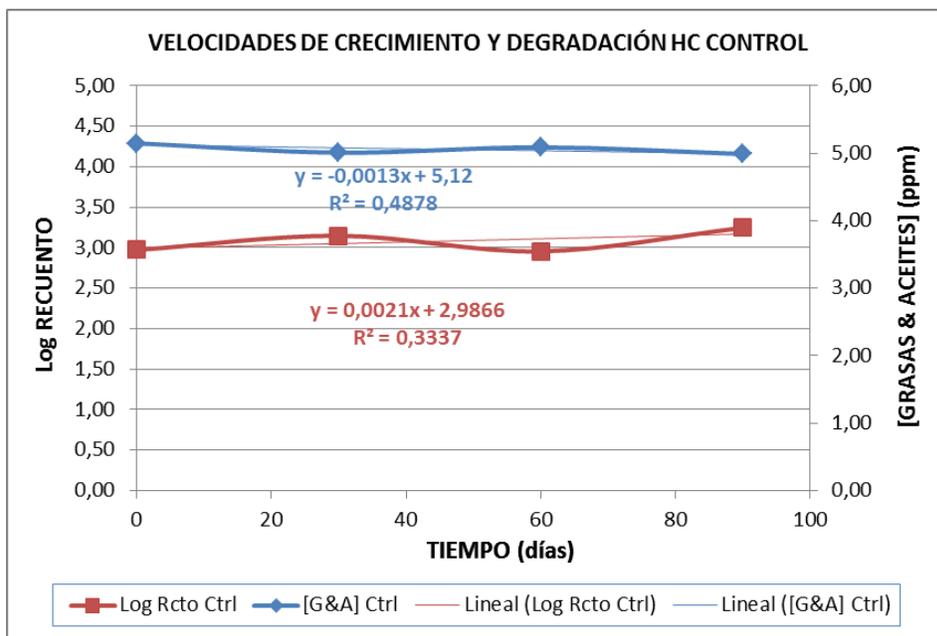


Vel Crecim Pool ASA

0,0406 d⁻¹

Vel degrad G&A Pool ASA (30-90 días)

0,0491 ppm/día



Vel Crecim Control 0,0013 d⁻¹

Vel degrad G&A

Control 0,0021 ppm/día

TIEMPO (horas)	MUESTRA	RECUEENTO (UFC/mL)	PRODUCTIVIDAD (UFC/mL.h)
0	Pool ASA	2.10E+05	
30	Pool ASA	1.50E+06	5.00E+04
60	Pool ASA	5.73E+07	9.55E+05
90	Pool ASA	1.08E+08	1.20E+06

Anexo E. Reportes de caracterización bioquímica e identificación de microorganismos degradadores con Sistema Biolog®

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 1 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 28 2014 8:07 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.I5G

Result	Species ID: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.938	0.682	4.543	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	0.062	0.042	5.525	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
3	0.000	0.000	9.117	GN-Nent	<i>Pseudomonas pseudoaeruginosa</i> ss <i>pseudoaeruginosa</i>
4	0.000	0.000	10.122	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	< 473	< 564	49	{ 117	{ 125	31	54	6	< 987	< 821	< 708
B	6	62	67	47	{ 93	< 536	31	< 644	3	< 957	337	33
C	{ 103	< 428	< 211	< 632	- { 70	{ 114	{ 122	{ 84	34	< 914	{ 475	- { 402
D	-12	10	8	12	17	64	{ 134	13	3	< 774	< 934	47
E	< 681	< 291	17 +	5	9	40	55	16	38	< 921	< 965	< 759
F	-4	{ 86	-21	1	{ 92	< 226	30	3	8	< 878	< 1156	< 1557
G	-13	{ 83	14	{ 113	- < 679	11	17	< 792	< 488	- 221	< 921	55
H	{ 106	-20	3	-1	-17	{ 141	< 336	< 616	11	< 966	303	73

Report Date May 28 2014 8:07 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 2 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 28 2014 8:09 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.ISG

Result	Species ID: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.815	0.532	6.370	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	0.185	0.114	6.906	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
3	0.000	0.000	10.474	GN-Nent	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ss <i>pseudoalcaligenes</i>
4	0.000	0.000	11.998	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	< 500	< 633	31	{ 75	{ 81	27	33	-1	< 949	< 944	< 655	
B	28	19	{ 67	7	{ 72	< 543	22	< 621	3	< 969	362	36	
C	< 122	< 426	< 266	< 544	-	27	{ 70	{ 72	{ 67	18	< 882	{ 479 - 355	
D	-9	0	33	-6	14	{ 94	< 147	11	30	< 832	< 992	55	
E	< 666	-17 +	29 +	34	47	47	{ 80	36	37	< 981	< 988	< 590	
F	< 107	< 133	-6	16	< 143	< 240	{ 76	11	30	< 996	< 1452	22 +	
G	-11	-28	29	< 98	-	< 672	{ 58	48	< 770	< 186	344	< 879	61
H	< 306	-8	19	12	12	< 153	< 297	< 640	19	< 997	353	66	

Report Date May 28 2014 8:09 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 28 2014 8:11 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.I5G

Result Species ID: *Stenotrophomonas maltophilia*
 Comment
 Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.984	0.642	6.216	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	0.016	0.009	7.699	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
3	0.000	0.000	10.653	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
4	0.000	0.000	10.774	GN-Nent	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ss <i>pseudoalcaligenes</i>

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	< 594	< 636	82	{ 148	< 170	92	86	33	< 1056	< 881	< 757
B	94	87	< 160	63	< 191	< 560	79	< 652	25	< 943	{ 571	133
C	< 185	< 454	< 329	< 595	- 91	< 188	{ 139	{ 130	69	< 993	< 942	< 713
D	2	33	54	49	45	< 176	< 299	45	51	< 939	< 1071	98
E	< 668	< 369	{ 135	- 73	97	105	< 171	107	{ 138	< 1094	< 938	< 671
F	{ 121	< 220	22	83	< 227	< 328	{ 145	57	{ 121	< 1033	< 1159	< 1216
G	5	{ 143	88	< 197	< 668	110	96	< 765	< 565	- < 696	< 914	105
H	< 254	3	81	+ 76	67	+ < 239	< 371	< 612	83	< 1088	< 824	211

Report Date May 28 2014 8:11 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 8 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 28 2014 8:17 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.J5G

Result	Species ID: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.842	0.549	5.918	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	0.158	0.103	6.521	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
3	0.000	0.000	9.177	GN-Nent	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ss <i>pseudoalcaligenes</i>
4	0.000	0.000	10.635	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	< 521	< 612	48	{ 114	{ 143	46	62	25	< 930	< 934	< 818 -
B	37	50	{ 90	47	{ 125	< 589	46	< 624	25	< 944	366	30
C	{ 110	< 475	< 190	< 635 -	67	{ 112	{ 90	{ 93	43	< 939	298	323
D	14	16	29	{ 92	31	72	{ 149	16	25	< 796	< 1008	50
E	< 663	-7 +	39 +	36	32	60	{ 139	39	54	< 901	< 910	< 643
F	36	{ 104	-3	9	{ 102	< 209	49	15	15	< 847	< 1383	< 1497
G	5	62	26	{ 130 -	< 713	45	33	< 755	-27	17	15 +	16
H	< 321	1	21	10	22	{ 144	< 369	< 563	25	< 934	330	57

Report Date May 28 2014 8:17 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID 1.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 5 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 29 2014 8:20 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.I5G

Result	Species ID: Burkholderia vietnamlensis
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.962	0.735	4.135	GN-Nent	Burkholderia vietnamlensis
2	0.034	0.024	5.337	GN-Nent	Burkholderia anthina/carbensis
3	0.003	0.002	6.221	GN-Nent	Burkholderia ambifaria
4	0.001	0.001	6.634	GN-Nent	Burkholderia stabilis

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	41	-13	{ 145	23	6	< 794	17	-3	< 1179	< 1090	< 882
B	{ 100	63	19	13	-9	< 824	59	84	24	< 1193	62	44
C	< 709	< 811	< 863	< 841	{ 111	< 310	< 835	- 63	12	< 1213	73	64
D	< 742	< 814	< 819	< 853	< 798	< 907	< 916	< 1066	- -52	< 1029	< 1232	64
E	-19	{ 108	< 878	< 1032	< 989	< 1107	< 1079	< 1071	< 768	< 1250	< 926	- 370
F	< 374	< 910	-6	< 1018	< 895	< 556	< 1029	< 968	< 1071	< 1271	< 1752	6 +
G	< 770	< 583	35	< 1067	< 895	< 203	< 762	< 1056	< 591	< 1170	70	< 793
H	< 562	< 956	< 713	< 867	< 303	84	< 873	< 935	< 453	154	87	51

Report Date May 29 2014 8:20 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID 1.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 6 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 29 2014 8:21 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.I5G

Result Species ID: *Stenotrophomonas maltophilia*
 Comment
 Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.984	0.714	4.908	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	0.016	0.011	6.387	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3	0.000	0.000	8.197	GN-Nent	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>malvacearum</i>
4	0.000	0.000	11.525	GN-Nent	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	< 719	< 745	< 643	< 712	< 751	< 686	< 176	3	< 1249	< 1158	< 899
B	31	{ 126	< 679	< 244	{ 97	< 854	18	< 924	5	< 1331	< 1120	58
C	< 226	< 712	< 592	< 761	- 20	{ 87	58	58	38	< 1321	< 1172	289
D	0	-1	8	0	3	62	< 158	13	38	< 1410	< 1328	{ 523
E	< 999	< 949	< 811	29	{ 129	48	{ 91	35	< 442	< 1331	< 1299	< 830
F	62	{ 114	-3	9	{ 102	< 235	56	13	26	< 1208	< 1306	< 1729
G	0	< 393	25	< 916	< 1006	< 432	39	< 1084	< 778	- 435	< 1263	48
H	< 682	1	50	16	35	{ 130	< 1002	< 900	20	< 1261	< 1148	60

Report Date May 29 2014 8:21 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPA INOCULO HC ASTRID 2.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 7 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read Jun 04 2014 8:31 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.J5G

Result	No ID
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	—	0.205	8.641	GN-Nent	<i>Pseudomonas viridilivida</i>
2	—	0.111	9.346	GN-Nent	<i>Pseudomonas asplenii</i>
3	—	0.106	9.419	GN-Nent	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
4	—	0.086	9.718	GN-Nent	<i>Burkholderia stabilis</i>

Key: <x: positive, x: negative, <-x: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	104	72	118	< 199	130	137	< 180	150	< 938	{ 496	235
B	52	< 212	< 192	< 220	< 197	< 526	< 221	< 328	139	< 1119	169	137
C	< 576	< 205	< 276	< 611	< 372	< 368	< 267	< 238	< 271	< 1230	< 1068	214
D	88	< 199	< 285	< 248	< 1106	< 259	< 425	< 802	61	< 705	< 1170	114
E	30	153	< 971	< 1063	< 1016	< 1033	< 896	< 1010	< 989	< 1166	< 1033	55
F	46	< 745	29	< 874	< 910	< 923	< 744	< 799	< 926	< 1095	< 1964	57 +
G	28	< 576	< 231	< 1065	< 812	< 929	< 292	< 843	< 620	< 964	212	32
H	130	< 582	< 372	< 680	< 526	< 295	< 400	< 435	< 441	255	228	154

Report Date Jun 04 2014 8:31 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 33
 Project ML5
 File Name CEPAS INOCULO HC ASTRID 1.D5E
 User ICP
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 0
 Incubation Hours 22.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Sample ID CEPA 8 HC
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read May 29 2014 8:24 AM
 Biolog ID DB Biolog GEN III DB.J5G

Result	Species ID: Burkholderia vietnamiensis
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.804	0.614	4.418	GN-Nent	Burkholderia vietnamiensis
2	0.163	0.118	4.994	GN-Nent	Burkholderia anthina/caribensis
3	0.019	0.013	5.763	GN-Nent	Burkholderia ambifaria
4	0.014	0.010	5.867	GN-Nent	Burkholderia stabilis

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	{ 112	-8	< 236	22	29	< 719	36	3	< 1186	< 1044	< 1011
B	55	57	31	-4	30	< 587	63	{ 91	11	< 1091	61	46
C	< 628	< 784	< 790	< 812	58	< 161	< 746	52	26	< 1165	158	63
D	< 616	< 758	< 692	< 846	< 716	< 874	< 890	< 1069	-17	< 795	< 1207	75
E	43	-2	< 805	< 893	< 1140	< 1153	< 1028	< 986	< 704	< 1164	< 1012	73
F	< 483	< 854	-2	< 954	< 849	< 508	< 1015	< 923	< 1035	< 1161	< 1436	< 1491
G	< 689	< 484	70	< 1024	< 954	< 785	< 872	< 1045	< 737	< 826	67	204 +
H	< 524	< 831	< 372	< 859	< 212	{ 106	< 746	< 790	< 637	369	60	35

Report Date May 29 2014 8:24 AM

Anexo F. Pruebas bioquímicas en la microplaca de Biolog®

1. MICROPLACA GP DEL BIOLOG: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS AEROBICAS GRAM POSITIVAS

A1 Agua	A2 α -ciclodextrina	A3 β -ciclodextrina	A4 Dextrina	A5 Glicógeno	A6 Inulina	A7 Manano	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-acetil-D-glucosamina	A11 N-acetil-D-manosamina	A12 Amigdalina
B1 L-arabinosa	B2 D-arabitol	B3 Arbutina	B4 Celobiosa	B5 D-fructosa	B6 L-fucosa	B7 D-galactosa	B8 Acido D-galacturónico	B9 Gentiobiosa	B10 Acido D-glucónico	B11 α -D-glucosa	B12 m-inositol
C1 α -D-lactosa	C2 Lactulosa	C3 Maltosa	C4 Maltotriosa	C5 D-manitol	C6 D-manosa	C7 D-melezitosa	C8 D-melibiosa	C9 α -metil-D-galactósido	C10 β -metil-D-galactósido	C11 3-metilglucosa	C12 α -metil-D-glucósido
D1 β -metil-D-glucósido	D2 α -metil-D-manósido	D3 Palatinosa	D4 D-psicosa	D5 D-rafinosa	D6 L-ramnosa	D7 D-ribosa	D8 Salicina	D9 Sedoheptulosano	D10 D-sorbitol	D11 Estaquirosa	D12 Sucrosa
E1 D-tagatosa	E2 D-trehalosa	E3 Turanosa	E4 Xilitol	E5 D-xilosa	E6 Acido acético	E7 A-Acido hidroxibutírico	E8 β -Acido hidroxibutírico	E9 Γ -Acido hidroxibutírico	E10 Acido p-hidroxifenilacético	E11 α -Acido cetoglutárico	E12 α -Acido cetovalérico
F1 Lactamida	F2 Acido D-láctico metiléster	F3 Acido L-láctico	F4 Acido D-málico	F5 Acido L-málico	F6 Metilpiruvato	F7 Metilsuccinato	F8 Acido propiónico	F9 Acido pirúvico	F10 Acido succinámico	F11 Acido succínico	F12 Acido N-acetil-L-glutámico
G1 Alaninamida	G2 D-alanina	G3 L-alanina	G4 L-alanilglicina	G5 L-asparagina	G6 Acido L-glutámico	G7 Acido glicil-L-glutámico	G8 Acido L-piroglutámico	G9 L-serina	G10 Putrescina	G11 2,3-butanediol	G12 Glicerol
H1 Adenosina	H2 2'-deoxiadenosina	H3 Inosina	H4 Timidina	H5 Uridina	H6 Adenosina-5'-monofosfato	H7 Timidina-5'-monofosfato	H8 Uridina-5'-monofosfato	H9 Fructosa-6-fosfato	H10 Glucosa-1-fosfato	H11 Glucosa-6-fosfato	H12 D-L- α -glicerol fosfato

2. MICROPLACA GN DEL BIOLOG®: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS AEROBICAS GRAM NEGATIVAS

A1 Agua	A2 α -ciclodextrina	A3 Dextrina	A4 Glicógeno	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-acetil-D-galactosamina	A8 N-acetilglucosamina	A9 Adonitol	A10 L-arabinosa	A11 D-arabitol	A12 Celobiosa
B1 ϵ -eritritol	B2 D-fructosa	B3 L-fructosa	B4 D-galactosa	B5 Gentiobiosa	B6 α -D-glucosa	B7 m-inositol	B8 α -lactosa	B9 α -D-lactosa lactulosa	B10 Maltosa	B11 D-manitol	B12 D-manosa
C1 D-melibiosa	C2 β -metil-D-glucósido	C3 D-psicosa	C4 D-rafinosa	C5 L-ramnosa	C6 D-sorbitol	C7 Sucrosa	C8 D-trehalosa	C9 Turanosa	C10 Xilitol	C11 Metilpiruvato	C12 Mono-metilsuccinato
D1 Acido acético	D2 Acido cis-aconítico	D3 Acido cítrico	D4 Acido fórmico	D5 Acido D-galactónico lactona	D6 Acido D-galacturónico	D7 Acido glucónico	D8 Acido D-glucosamínico	D9 Acido D-glucurónico	D10 α -Acido hidroxibutírico	D11 β -Acido hidroxibutírico	D12 Γ -Acido hidroxibutírico
E1 Acido p-hidroxifenilacético	E2 Acido itacónico	E3 α -Acido cetoglutárico	E4 α -Acido Cetoglutárico	E5 A-Acido cetovalérico	E6 α -Acido D,L-láctico	E7 Acido malónico	E8 Acido propiónico	E9 Acido quínico	E10 Acido D-sacárico	E11 Acido sebáico	E12 Acido succínico
F1 Acido bromo succínico	F2 Acido succinámico	F3 Glucuronamida	F4 Alaninamida	F5 D-alanina	F6 L-alanina	F7 L-alanilglicina	F8 L-asparagina	F9 Acido aspártico	F10 Acido L-glutámico	F11 Acido glicil-L-aspártico	F12 Acido glicil-L-glutámico
G1 L-histidina	G2 L-hidroxi prolina	G3 L-leucina	G4 L-ornitina	G5 L-fenilalanina	G6 L-prolina	G7 Acido L-piroglutámico	G8 D-serina	G9 L-serina	G10 L-treonina	G11 D,L-carnitina	G12 Γ -Acido aminobutírico
H1 Acido urocánico	H2 Inosina	H3 Uridina	H4 Timidina	H5 Fenil etilamina	H6 Putrescina	H7 2-amino etanol	H8 2,3-butanediol	H9 Glicerol	H10 D-L- α -glicerol fosfato	H11 Glucosa-1-fosfato	H12 Glucosa-6-fosfato