

EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN FRENTE A LA ATENUACIÓN NATURAL Y LA BIOAUMENTACIÓN EN UN SUELO CONTAMINADO CON UNA MEZCLA DE GASOLINA - DIESEL

ASSESSMENT OF THE BIOSTIMULATION AGAINST BIOAUGMENTATION AND NATURAL ATTENUATION ON CONTAMINATED SOIL WITH DIESEL-GASOLINE MIXING

WILMAR GÓMEZ

Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia-Medellín, M.Sc. en Biotecnología, wagomez0@unal.edu.co

JAIR GAVIRIA

Profesor, Universidad Nacional de Colombia-Medellín, Facultad de Ciencias, jgarango@unal.edu.co

SANTIAGO CARDONA

Profesor, Universidad Nacional de Colombia-Medellín, scardona@unal.edu.co

Recibido para revisar marzo 7 de 2009, aceptado mayo 21 de 2009, versión final mayo 27 de 2009

RESUMEN: En este estudio se realizó la biorremediación de un suelo contaminado con la mezcla de combustibles gasolina-diesel a escala de laboratorio, para evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación. La reducción en la concentración de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en un periodo de tres meses fue del 52.79 % para el tratamiento por atenuación natural, 60.45 % para el tratamiento por bioestimulación y del 64.92 % para el tratamiento por bioaumentación. Para la inoculación del tratamiento por bioaumentación se aisló una bacteria con capacidad para degradar hidrocarburos, la cual fue identificada como *Bacillus* sp.

PALABRAS CLAVE: biorremediación, *Bacillus* sp., hidrocarburos, atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación.

ABSTRACT: In this study carried out the bioremediation of a contaminated soil with a gasoline-diesel fuel mixture in a laboratory scale, to evaluate biostimulation against natural attenuation and bioaugmentation. The reduction of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) concentration during three months was 52.79 % for natural attenuation, 60.45 % for biostimulation and 64.92 % for bioaugmentation. For the inoculation in the bioaugmentation treatment, was isolated a bacterium with the capacity of degrade hydrocarbons which was identified as *Bacillus* sp.

KEYWORDS: bioremediation, *Bacillus* sp., hydrocarbons, natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation.

1. INTRODUCCIÓN

La biorremediación es una tecnología aplicada en la limpieza de hidrocarburos del petróleo derramados en el suelo, por ser una técnica de fácil construcción, operación y mantenimiento,

es aplicable a grandes extensiones de tierra a bajo costo; y puede completar la remoción del contaminante [1].

Los procesos de biorremediación pueden ser divididos básicamente en tres clases. Primero, en

atenuación natural, donde la concentración de contaminantes es reducida por los microorganismos nativos del suelo. Segundo, la bioestimulación, donde se adicionan nutrientes y un aceptor de electrones al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación. Finalmente la bioaumentación, en donde se inocula el sistema con uno o varios microorganismos apropiados [2].

La atenuación natural es un método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea [3]. Los resultados de la atenuación natural dependen de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, oxígeno disuelto, el nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes [4].

La bioestimulación es el método más empleado para reducir la concentración de contaminantes [5]. En la bioestimulación la actividad natural de los microorganismos es estimulada por la circulación de soluciones a través del suelo contaminado con nutrientes y oxígeno u otro aceptor de electrones.

La bioaumentación de los suelos contaminados se puede determinar por una serie de pruebas de laboratorio, especialmente de caracterización de las poblaciones de microorganismos y del estudio en microcosmos, sumado a la evaluación de los microorganismos con capacidad para colonizar y degradar a los contaminantes del suelo [6].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación a escala de laboratorio. Para realizar el procedimiento de bioaumentación fue aislada e identificada una bacteria con capacidad para degradar hidrocarburos bajo las condiciones de operación y de fácil adaptación al suelo actuando como un agente exógeno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del Suelo

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad

Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Agronomía, empleando un suelo obtenido de los predios de la universidad. Para su caracterización se determinaron sus principales propiedades físicas, químicas y biológicas; este suelo se eligió dado su carácter arcilloso, propio de las estaciones de servicio en el área urbana de Medellín.

Tabla 1. Algunas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo

Table 1. Some physical, chemical and biological proprieties of soil

Parámetros	Valor
Textura	Arcilla
Arena (%)	20
Limo (%)	28
Arcilla (%)	52
Densidad real (g/cm ³)	2,68
Densidad aparente (g/cm ³)	1,4
Porosidad (%)	47,76
Aluminio (cmolc/kg)	0,4
pH	5,4
C. E. (dS/m)	0,2
Materia orgánica (%)	3,6
Fósforo total (mg/kg)	20
N-NO ³⁻ (mg/kg)	7
N-NH ⁴ (mg/kg)	16
Nitrógeno total (%)	0,24
UFC/g suelo	1.4x10 ⁵

C.E.: Conductividad eléctrica.

Descripción del Experimento y su Montaje

El suelo recibió un tratamiento previo de secado, desagregado y tamizado. Para el montaje de los tratamientos se empleó el suelo con tamaños de partículas entre 2 y 2.36 mm, de esta forma se garantizó que el proceso fuera aeróbico y se logrará una distribución más homogénea del combustible. La porción del suelo para el control se esterilizó en una autoclave operando a una temperatura de 121°C y una presión de 1.5 Kg/cm² durante 4 horas.

Se realizó el vertido de la mezcla de combustibles gasolina-diesel en igual cantidad en bandejas de un volumen nominal de 9000 cm³, las cuales contenían 2 kg de suelo cada una para los siguientes tratamientos [7]:

- A: suelo estéril, combustibles, HCl 2M para inhibir el crecimiento de las bacterias (control)
- B: suelo más combustibles (atenuación natural).
- C: suelo más combustibles y nutrientes, (bioestimulación).
- D: suelo más combustible, nutrientes e inóculo (bioestimulación).

Los nutrientes empleados en los dos últimos tratamientos fueron: urea al 99.8% de pureza (Gentech) al 0.03M y fosfato de potasio dibásico (Mallinckrodt AR®) al 0.003M; calculados empleando la ecuación de McCarty en una relación de C:N:P de 100:17,5:1,75 [8]. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y además fueron agitados con regularidad a excepción del tratamiento por atenuación natural.

Medios de Cultivo

Para realizar las diluciones se tomó un gramo de suelo de cada tratamiento y se agregó a 9 ml de agua destilada estéril. Luego de agitar 40 veces se realizaron las diluciones hasta 10^{-8} , empleando para los recuentos las diluciones entre 10^{-3} hasta 10^{-8} .

Los recuentos para bacterias heterótrofas se realizaron en el medio mínimo Luria Bertani (Difco™). A las cajas de Petri solidificadas se adicionaron 150 µl de la dilución y se expusieron a temperatura ambiente durante 3 días.

Para el recuento de bacterias hidrocarburoclastas se utilizó el medio mínimo Bushnell Hass con la siguiente composición: 1 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g/l de KNO_3 , 1 g/l de KH_2PO_4 , 0.2 g/l de MgSO_4 , 0.02 g/l de CaCl_2 , 0.05 g/l de FeCl_3 y 15 g de agar nutritivo. Luego de sembrar las cajas con la dilución de suelo apropiada se adicionó 500µl de la mezcla de hidrocarburos en un filtro Watman N°45 y estas permanecieron a temperatura ambiente durante 7 días.

2.4 Selección y Manejo del Inóculo

Para realizar la bioaumentación se aisló e identificó un microorganismo de un terreno dedicado a la reparación y el mantenimiento de maquinaria pesada. La caracterización molecular

se realizó mediante secuenciación del gen ribosomal 16S, el cual se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) utilizando los primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y pC5B (5'-TACCTTGTACGACTT-3'). La secuenciación del producto de PCR fue realizada por Macrogen Inc., Seoul, Korea y registrada en el Genbank bajo el código FJ42374.

Este microorganismo se inóculo en 5 ml del medio Luria Bertani líquido durante 12 horas. Luego, se paso a un volumen de 50 ml del mismo medio a unas condiciones de operación de 180 rpm y una temperatura de 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, fue centrifugado a 4000 rpm durante 5 minutos, obteniendo el pellet que fue resuspendido en 300 ml de agua ultrapura.

2.5 Proceso de Extracción de los Hidrocarburos

La recuperación de los hidrocarburos del suelo, se realizó con el método de la agitación – centrifugación [9]. En viales de polipropileno para centrifuga de 50 ml se depositó 1 g de suelo seco, al cual se le adicionaron 2.5 g de Na_2SO_4 anhidro (Panreac). Luego se le agregó a cada vial 5 ml de diclorometano (Chemi, grado analítico) y se llevo al vortex por 90 segundos. Las muestras fueron centrifugadas en un equipo Jouan serie MR22 a 7000 rpm durante 20 minutos. El proceso de lavado del suelo se repitió dos veces más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen de 15 ml de sobrenadante.

Se empleó un rotoevaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40 °C y una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente y el extracto se resuspendió en 1ml de diclorometano [10]. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -5 °C para ser analizadas posteriormente.

2.6 Análisis de los Hidrocarburos

La concentración de los HTP se midió empleando cromatografía de gas acoplada a

espectrofotometría de masas (CG/EM) en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Se utilizó un cromatógrafo marca Agilent serie 6890N con un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un inyector Agilent 7683. Se empleó una columna DB-TPH Agilent Technologies de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y una película de 0.25 μm . Todas las muestras fueron corridas bajo las siguientes condiciones: la temperatura inicial fue de 60 °C durante 2 minutos, posteriormente la temperatura aumento 8 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 300 °C manteniéndose allí por 8 minutos más; la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C; mientras que la temperatura del detector fue de 340 °C; el gas de arrastre usado fue hidrogeno trabajando a un flujo constante de 2 ml por minuto [11].

La concentración de contaminante en las muestras fue identificada y cuantificada utilizando un estándar que contenía una mezcla de hidrocarburos alifáticos de C₈-C₄₀ (S-4149-500-MX, Chiron AS) con un total de 35 analitos resuspendidos en disulfuro de carbono-diclorometano (3:1).

2.7 Análisis Estadístico

La consideración de normalidad y homogeneidad para la concentración remanente de los HTP al final de los tratamientos reportados en la tabla 3 se confirmó con las pruebas de Cramer-Von Mises y de Bartlett; respectivamente. Se realizó el análisis de varianza de los datos y la prueba de mínima significancia ($P < 0,05$). Los tratamientos se consideraron diferentes cuando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis del Suelo Después de los Tratamientos

Los análisis finales del suelo muestran el cambio de textura para tratamiento control. Se atribuye este cambio a la adición del ácido clorhídrico, el cual diluyo la arcilla liberándose el aluminio contenido en ella; incrementándose su valor de

0,4 cmolc/kg a 26,8 cmolc/kg (ver tabla 2). Así, la arcilla liberó sus silicatos aumentando la cantidad de arena y el aluminio presente actúo como un floculante, permitiendo que partículas pequeñas se aglomerasen debido a la diferencia de carga, registrando el aumento de los limos.

La alta cantidad de aluminio presente en el control disparó la conductividad eléctrica del suelo alcanzando un valor de 42dS/m, el cual en los otros tratamientos no sobrepaso de 1 dS/m.

La variación en el pH al final del experimento lo explican los diferentes tratamientos aplicados, con su disminución en el tratamiento A hasta 2,6 y su aumento en los tratamientos C hasta 7,6 y D hasta 7,4. Para el tratamiento B no se aprecia ningún cambio debido a que esté no recibió ninguna sustancia adicional (ver tabla 2).

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos del suelo luego de los tratamientos

Table 2. Physical and chemical parameters of soil after the treatments

Parámetro medido	Valores por tratamiento			
	A	B	C	D
Textura	FA	Ar	Ar	Ar
Arena (%)	56	26	28	26
Limo (%)	42	24	26	24
Arcilla (%)	2	50	46	50
Aluminio (cmolc/kg)	26,8	0,4	nd	nd
pH	2,6	5,3	7,6	7,4
C.E. (dS/m)	42	0,3	0,6	1
Materia orgánica (%)	4,9	5,9	5,5	5,0
Fósforo total (mg/kg)	23	18	43	57
N-NO ₃ - (mg/kg)	nd	nd	6	7
N-NH ₄ (mg/kg)	15	10	1300	1300
Nitrógeno total (%)	0,28	0,26	0,4	0,38

En la tabla; Ar: Arcilla, FA: Franco Arenoso, nd: no detectable, C.E.: Conductividad eléctrica.

La materia orgánica en el suelo se incremento en todos los tratamientos debido a la adición de los combustibles, pasando del 3,6 al 4,9% en el tratamiento A, al 5,9% en el tratamiento B, al 5,5% en el tratamiento C y al 5,0% en el tratamiento D (ver tabla 2).

Tabla 3. Concentración residual de los hidrocarburos alifáticos en el suelo contaminado después de los tratamientos
Table 3. Residual concentration of aliphatic hydrocarbons in the contaminated soil after the treatments

Analitos	Concentración inicial (mg/l)	Concentración encontrada tres meses después de los tratamientos (mg/l)											
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
C11	40,33	20,17	20,34	20,89	19,94	20,58	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C12	63,98	24,43	24,96	26,85	22,28	22,77	20,69	20,98	22,51	22,36	n.d	n.d	n.d
C13	78,80	30,23	30,90	32,85	28,00	27,02	23,26	23,90	26,85	27,13	24,86	26,28	25,87
C14	121,65	39,72	40,04	43,93	39,60	37,22	30,62	31,59	36,98	37,10	32,64	35,05	34,17
C15	153,64	51,93	52,12	57,97	59,40	54,08	44,15	43,45	54,74	54,26	46,29	45,64	46,96
C16	178,60	59,50	61,01	64,43	74,89	70,44	54,18	53,10	67,24	68,09	55,63	55,40	57,46
C17	182,42	58,79	60,40	65,98	84,01	80,03	61,72	56,83	72,93	75,16	59,34	58,69	61,63
Pr	165,67	95,94	95,91	94,13	139,61	125,12	126,29	74,93	93,26	98,99	87,23	77,24	85,76
C18	188,10	66,09	70,92	73,32	104,53	95,09	79,10	67,50	83,76	90,35	69,93	66,43	70,62
Ph	102,50	73,45	72,42	71,15	101,89	93,85	95,04	56,84	66,61	69,26	64,94	58,03	64,89
C19	175,35	66,61	69,78	75,51	109,95	96,81	79,96	62,54	79,15	89,20	72,42	67,69	71,10
C20	155,45	57,21	60,52	65,36	93,15	87,35	71,32	60,79	75,52	80,10	68,34	61,89	66,22
C21	123,73	52,85	54,27	57,67	79,40	74,10	60,50	51,39	62,33	66,65	55,67	53,87	55,54
C22	110,92	53,54	53,01	23,08	78,16	73,13	23,08	52,24	61,98	23,08	58,36	54,32	23,08
C23	86,05	45,12	46,66	49,27	64,28	61,22	51,68	44,47	50,86	52,37	48,43	45,84	48,37
C24	65,52	37,77	38,71	39,50	52,06	49,93	43,55	36,82	42,07	41,16	40,06	37,19	42,66
C25	50,35	32,37	35,25	33,78	43,50	43,74	43,34	32,45	38,39	38,81	34,52	34,40	34,83
C26	35,76	28,78	29,84	30,60	35,10	33,31	31,83	28,96	30,22	32,00	30,23	30,17	30,29
C27	26,99	27,91	28,41	28,75	30,96	30,11	28,60	28,08	28,45	28,51	28,34	28,27	28,22
C28	22,14	29,37	29,63	29,08	30,42	27,76	28,05	27,66	27,26	27,39	27,08	26,85	28,06
C29	20,77	27,88	28,20	28,35	28,38	28,42	28,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HTP (mg/l)	2148,74	979,65	1003,31	1012,45	1319,51	1232,07	1025,93	854,53	1021,12	1021,99	904,33	863,26	875,72
HTP(mg/kg)	2847,90	1164,03	1164,61	1248,86	1429,59	1392,17	1212,11	1030,06	1178,99	1169,73	1017,36	999,83	980,21

La concentración inicial corresponde al promedio de cuatro mediciones, una por cada tratamiento.

El cambio de unidades a mg/kg de suelo seco al final de la tabla se realizó utilizando la expresión reportada en el Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Ed. Semarnat. Mexico. Páginas 111-112 [12].

En la tabla Pr: pristano, Ph: fitano y nd: no detectado.

3.2 Degradación de los HTP

En los tratamientos con la aplicación de nutrientes el amonio se incremento por la adición de urea, el cual representa la fuente más directa de nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos [12]. Además, el tratamiento por atenuación natural presenta la reducción de una parte de la cantidad inicial del amonio y el agotamiento, así como en el control, de la concentración de nitrato (ver tabla 2).

Para el análisis de los hidrocarburos alifáticos se tuvieron como blanco 19 compuestos desde el undecano hasta el nonacosano. En la tabla 3 se aprecia como para los primeros 10 compuestos su concentración se reduce alrededor de una tercera parte y al ir creciendo la cadena de hidrocarburos, dicha reducción en la concentración va disminuyendo. Además, existe una incongruencia con los resultados obtenidos para los tres últimos compuestos, los cuales reportan una concentración final por encima de la inicial. Este resultado se puede explicar por las limitaciones del método, el cual es apropiado para analizar mezclas de hidrocarburos desde C10 hasta C24 en concentraciones de 10 hasta 200 mg/l [12].

La figura 1 presenta los cromatogramas con las concentraciones iniciales y finales de los HTP para los cuatro tratamientos, en todos ellos se aprecia la disminución en el tamaño de los picos evaluados al final de los distintos procesos. Además, se ve claramente como en el tratamiento B por atenuación natural hay una mayor reducción hasta el hexadecano y de allí en adelante el cromatograma se confunde con el inicial.

Los resultados señalan que el tratamiento por atenuación natural presentó una concentración residual de los HTP de 1344.62 ± 116.27 mg/kg, mientras que el tratamiento control y el tratamiento por bioestimulación reportaron valores muy cercanos sin una diferencia significativa de 1192.50 ± 48.81 y 1126.26 ± 83.44 mg/kg, respectivamente. Y finalmente, el tratamiento por bioaumentación alcanzó la mayor reducción de la concentración residual de los HTP en un valor de 999.13 ± 18.58 mg/kg, aunque no mostró una diferencia significativa con la bioestimulación.

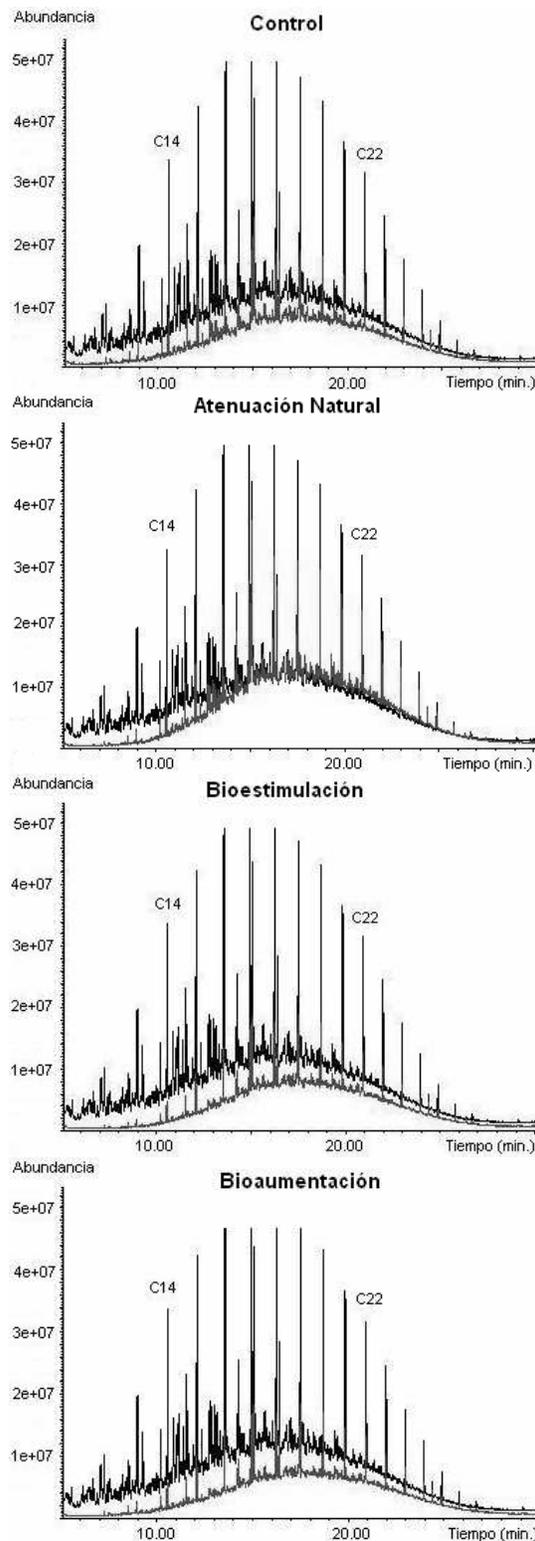
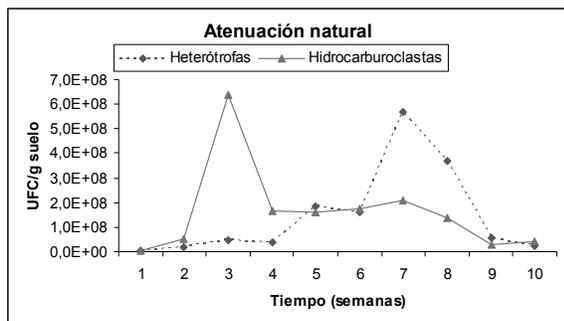


Figura 1. Cromatogramas por CG/EM, arriba el perfil inicial y abajo el perfil final
Figure 1. GC/MS chromatograms, initial profile above and final profile below

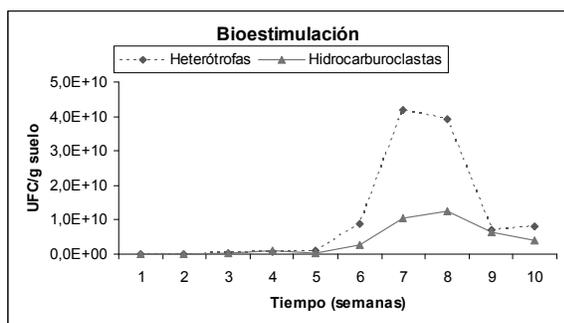
3.3 Recuento de Bacterias

Los recuentos se realizaron durante las primeras 10 semanas del experimento tomando una muestra representativa de cada tratamiento.

a.



b.



c.

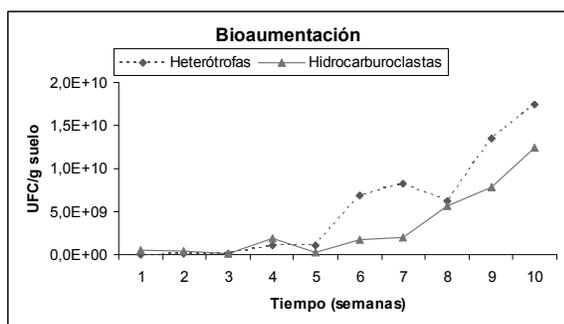


Figura 2. UFC para bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos durante las primeras 10 semanas

Figure 2. UFC for heterotrophas and hydrocarbon degrader bacteria during 10 weeks

Para todos los tratamientos, el crecimiento de las bacterias heterótrofas es superior al observado para las bacterias hidrocarburoclastas con excepción de las primeras 5 semanas del tratamiento por atenuación natural. Igualmente, se evidenció la presencia de bacterias hidrocarburoclastas en todos los tratamientos, lo

que sugiere la adaptación de los microorganismos a la nueva fuente de carbono y energía. El crecimiento de ambas poblaciones demuestra que no hubo inhibición de las bacterias por el suministro de nutrientes.

En la figura 2 se observa la presencia de una fase inicial para los tratamientos por bioestimulación y por bioaumentación de 5 y 3 semanas, respectivamente. Esta diferencia se atribuye a la presencia de la bacteria inoculada.

A diferencia de las curvas para los tratamientos por atenuación natural y por bioestimulación, las curvas para el tratamiento por bioaumentación describen una tendencia de crecimiento que continua en aumento las últimas semanas. Ello sugiere la extensión por más tiempo de la prueba para lograr una mayor eliminación.

4. DISCUSIÓN

Los tratamientos de carácter biológico aplicados para subsanar la contaminación del medio ambiente están enmarcados por la disciplina de la biorremediación [13]. Esta ciencia cuenta con técnicas que han sido aplicadas exitosamente para el tratamiento de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo [14, 15, 16 y 17].

El análisis inicial del suelo permitió establecer las características más importantes de la matriz donde tendría lugar el proceso de eliminación de los combustibles adicionados; revelando el valor de parámetros de interés para realizar el biotratamiento de los suelos contaminados con hidrocarburos, como: su textura, el pH, la materia orgánica, la densidad de la población microbial y su disposición de nutrientes (fósforo y nitrógeno). La naturaleza del suelo y la presencia de microorganismos en una densidad adecuada son determinantes para lograr la degradación de los contaminantes e influyen en la concentración residual de los mismos [12].

Los hidrocarburos alifáticos cuantificados para obtener los hidrocarburos totales de petróleo, corresponden a la fracción media, debido a que el experimento no contó con un control rígido para los componentes volátiles. Así, quedaron

por fuera del análisis una gran cantidad de compuestos como los hidrocarburos alifáticos livianos, los de estructuras ramificadas y cíclicas y los BTEX, entre otros. De esta manera se identificaron y cuantificaron 19 hidrocarburos lineales con estructuras de carbono en un rango de C11 a C29, de los cuales los primeros compuestos de cadenas más cortas son degradados más fácilmente por los microorganismos [18, 19 y 20].

El tratamiento por atenuación natural reporto una reducción de los HTP del 52.79 % en los 3 meses del proceso, del cual, el 15 % se atribuye a los procesos abióticos [21] y el 37.79 % a la degradación por parte de los microorganismos del suelo. Debido a las condiciones de esta prueba no se puede establecer que porcentaje corresponde a la volatilización del contaminante.

Al respecto, se ha reportado que la fracción volátil del diesel (5 %) desaparece después de 50 días principalmente por volatilización [22]. Lo anterior sugiere que finalizado el proceso habrían desaparecido todos los volátiles de fracción media del suelo.

La disminución de los HTP en el control se atribuye a factores abióticos como: las transformaciones químicas por la adición de HCl, para limitar la actividad de las bacterias en el suelo [23]; la intervención en el proceso de otros microorganismos como los hongos, de los cuales no se realizó ningún tipo de control; la volatilidad de los compuestos analizados y el cambio de la estructura del suelo en este tratamiento.

Aunque la densidad de microorganismos en el suelo estéril se registró en 3.07×10^3 UFC/g para bacterias heterótrofas, cantidad con la cual es posible realizar biorremediación de los hidrocarburos [24] y además, se evidenció crecimiento de estas bacterias durante las primeras semanas del experimento, este comportamiento fue controlado con la adición de ácido clorhídrico.

La bioestimulación alcanzó un porcentaje del 60.45 % en la reducción de los HTP. Un resultado semejante lo logran al monitorear la

actividad biológica para la biorremediación de hidrocarburos realizando la bioestimulación con los mismos nutrientes en una relación C:N de 10:1 [25]. El efecto de la bioestimulación logro un valor adicional del 7.66 % sobre el tratamiento por atenuación natural.

El proceso que mostró una mayor reducción fue la bioaumentación, el cual presentó un porcentaje de eliminación de los HTP del 64.92 %. Utilizando la bioaumentación se han logrado eficiencias superiores en columnas empacadas para la degradación de combustible diesel con un consorcio bacterial [26]. La bioaumentación mejoró la degradación de los hidrocarburos con respecto a la atenuación natural en un 12.13 % y se situó en casi un 5 % por encima de la bioestimulación.

La concentración residual del 35.08 % para el tratamiento por bioaumentación se acerca al rango del 10-30 % propuesto por Allard y Neilson, (2007) para las estructuras recalcitrantes y de muy limitada biodisponibilidad [27]. El contenido de hidrocarburos en el suelo no puede ser reducido totalmente empleando metodologías biológicas, aún después de un tiempo prolongado [7].

El valor final para la concentración remanente de HTP de 999.13 mg/kg de suelo seco en el tratamiento por bioaumentación es inferior a los límites máximos permisibles establecidos por la norma mexicana NOM-SEMARNAT/SS2003 [12] e igualmente esta por debajo de la norma colombiana establecida en la resolución 1170 de 1997.

El microorganismo inoculado identificado como *Bacillus* sp. incidió en la reducción de la concentración de los hidrocarburos. Esta familia ha sido reportada en suelo contaminado con diesel a diferentes profundidades en compost con biodesechos [28].

En todos los tratamientos se evidenció paralelamente al crecimiento de bacterias heterótrofas una aparición representativa de bacterias hidrocarburoclastas. Los recuentos de las unidades formadoras de colonias pasaron de 10^6 a 10^8 /g de suelo en la atenuación natural y de

10^7 a 10^{10} /g de suelo por bioestimulación y bioaumentación. Los resultados del pH durante la experiencia permanecieron dentro del rango óptimo de 5 a 9 para la mayoría de las bacterias del suelo [29].

Tanto para el tratamiento por atenuación natural como por bioestimulación la población microbial decrece después de la semana 7. Este mismo comportamiento fue observado por Menendez et al., (2007) reportando una caída en el crecimiento microbial después de tres meses [4]. De manera distinta a los dos anteriores el tratamiento por bioaumentación en las últimas semanas presentaba un comportamiento creciente en las poblaciones microbiales, demostrando una buena adaptación del inóculo y sugiriendo la extensión del proceso para lograr un mayor nivel de degradación.

Además, contrario a la atenuación natural la bioestimulación y la bioaumentación mostraron una fase de iniciación [30], donde las bacterias se adaptaron al contaminante en 5 y 3 semanas; respectivamente. Esta diferencia se puede justificar por la presencia del *Bacillus* sp., el cual pudo haber producido biosurfactantes logrando una mayor biodisponibilidad de los hidrocarburos hacia los microorganismos [31].

5. CONCLUSION

En esta investigación se comparó la bioestimulación con la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo de carácter arcilloso, con un mejor desempeño en este último tratamiento, logrando un resultado por debajo del máximo que exige la normatividad mexicana, donde existe un control riguroso en los niveles de contaminación del suelo.

El microorganismo *Bacillus* sp. aislado e inoculado durante este proceso de investigación, demostró tener capacidad para degradar hidrocarburos en suelo contaminado, favoreciendo este proceso en consorcio con los microorganismos autóctonos del suelo.

6. AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación de este proyecto identificado con el código 20201006195. Así mismo, se agradece la colaboración de los laboratorios de Química de Suelos, Análisis Instrumental, Microbiología Molecular y Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por su apoyo al desarrollo de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- [1] HUESEMANN, M. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Journal Soil Contaminated*. 3, pp 299-318, 1994.
- [2] SALINAS A., SANTOS M., SOTO O., DELGADO E., PÉREZ H., HAÚAD L. A. Y MEDRANA H. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal Environmental Management*. 88, pp 115-119, 2007
- [3] KAO, C. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Res.* Vol. 35, N°8, pp 1951-1960, 2001
- [4] MENÉNDEZ D., GALLEGRO J. L., PELÁEZ A. I., FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA G., MORENO J., MUÑOZ D. Y SÁNCHEZ J. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*. 43, pp 310-321, 2007
- [5] CUNNINGHAM C. Y PHILIP J. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation*. 8, pp 261 – 269, 2000.

- [6] SABATÉ J., VINAS M. Y SOLANAS A. Laboratory-scale biorremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soil. *International Biodeterioration & biodegradation* 54, pp 19 – 25, 2004.
- [7] MARGESIN R., ZIMMERBAUER A., Y SCHINNER F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40, pp 339-346, 2000.
- [8] COOKSON, JR. J. *Bioremediation Engineering Design and Application*. McGrawHill. Appendix B. New York, 1995.
- [9] SCHWAB A., SU J., WETZEL S., PEKAREK S., Y BANKS M. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* 33, pp 1940-1945, 1999.
- [10] ARCE O., RODRÍGUEZ V. Y ROJAS A. Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *Environ Sci & Health part A*, 39 (6): pp 1535-1545, 2004.
- [11] NOCENTINI M., PIMELLI D. Y FAVA F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbons mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, pp 1115-1123, 2000.
- [12] FERNÁNDEZ L. *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Ed. Semarnat. Mexico, pp 111-112, 2006
- [13] FRANKENBERGER W. Hydrocarbons contaminated. *Soils Groundwater* 2, pp 237-243, 1992.
- [14] ODOKUMA L. Y DICKSON A. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global Journal of Environmental Sciences*, Vol 2, N°1, pp 29-40, 2003.
- [15] ARRAR J., CHEKIR N. Y BENTAHAR F. Treatment of diesel fuel contaminated soil in jet-fluidized bed. *Biochemical Engineering Journal*. 37, pp 131-138, 2007.
- [16] SALINAS A., SANTOS M., SOTO O., DELGADO E., PÉREZ H., AGUAD L. Y MEDRANO H. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal of Environmental Management* 88, pp 115-119, 2008.
- [17] MANCERA M., ESPARZA F., CHAVÉZ B., RODRÍGUEZ R., SAUCEDO G. Y BARRERA J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & biodegradation* 61, pp 151-160, 2008.
- [18] BOOPATHY R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 74, pp 63-67, 2000.
- [19] SAADOUN I. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their to degrade diesel fuel. *Microbiology* 42, pp 422-430, 2002.
- [20] FARINAZLEEN M., RAJA N., ABU B., Y MAHIRAN B. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & biodegradation* 54, pp 61-67, 2004.
- [21] MÁRQUEZ F., HERNÁNDEZ V. Y LAMELA M. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air and Soil Pollution* 128, pp 313-320, 2001.
- [22] SERRANO A., GALLEGO M., GONZÁLEZ J. Y TEJADA M. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution*. 151, pp 494-502, 2007.
- [23] NANO G., BORRÓN A. Y ROTA R. Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials B100*, pp 79-94, 2003.
- [24] PROVIDENTÍ M., LEE H. Y TREVORS J. Selecting factors limiting the microbial

degradation of recalcitrant compounds. *Journal of industrial Microbiology* 12, pp 379-395, 1993.

[25] MARGESIN R., ZIMMERBAUER A., Y SCHINNER F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40, pp 339-346, 2000.

[26] GRACE LUI P., WHANG L., YANG M. Y CHENG S. Biodegradation of diesel-contaminated soil: A soil column study. *Journal of the Chinese of Chemical Engineers*. 39, pp 419-428, 2008.

[27] ALLARD A. Y NEILSON A. Bioremediation of organic waste site: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & biodegradation* 39, pp 253-285, 1997.

[28] VAN GESTEL K., MERGAERT J., SWINGS J., COOSEMANS J. Y RYEKEBOER. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution* 125, pp 361-368, 2003.

[29] METING F. *Soil Microbial Ecology*. Ed. Hispanoamericana's, pp 496, 1993

[30] HÖHENER P., DUWING C., PASTERIS G., KAUFMANN K., DAKHEL N. Y HAARMS H. Biodegradation of petroleum hydrocarbons studies on rates and kinetics in unsaturated alluvial sand. *Journal of Contaminant Hydrology* 66, pp 93-115, 2003.

[31] DAS K. Y 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* 98, pp 1339-1345, 2007.