



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Biorrecuperación de sedimentos contaminados con hidrocarburos totales generados en las estaciones de servicio**

**Fredy Alberto Mellizo**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ADMINISTRACIÓN  
PALMIRA - COLOMBIA

2017

# **Biorrecuperación de sedimentos contaminados con hidrocarburos totales generados en las estaciones de servicio**

**Fredy Alberto Mellizo**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ingeniería Ambiental**

Directora

Luz Stella Cadavid Rodríguez

Ingeniera Química PhD

BIORREMEDIACION DE SUELOS

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ADMINISTRACION  
PALMIRA - COLOMBIA**

2017

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi madre Edilma, quien desde niño y hasta ahora ha inculcado en mi el sentido de la superación basado no en el dinero sino en el conocimiento.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Luz Stella Cadavid Rodríguez, Director de este trabajo de grado, por su constante apoyo, acompañamiento, experiencias compartidas y su incondicional amistad.

A los docentes de la Universidad Nacional de Colombia (Juan Carlos Gómez, Diana Vásquez, Dorian Prato, Gabriel León, Luis Octavio), quienes compartieron e enriquecieron con sus conocimientos y experiencia este proceso de formación magistral.

A mi amigo Ronal Cerón, por el apoyo e insistencia para que no declinara en la culminación de este propósito.

A mis compañeros promoción (Rodrigo, Juan Esteban, Víctor) por la compañía y ayuda permanente en las labores académicas.

A mi esposa Alicia por su permanente compañía en la vida personal, académica y laboral, quien desde la partida de mi madre se convirtió en el soporte para todas las decisiones de la vida.

A mis hijas Marcela y Alejandra, seres mágicos y adorables que hacen que la vida sea más fácil, provocando permanentemente una sonrisa en mí aún en momentos que aparentemente todo había concluido.

A mi nieto Matías, mi amigo incondicional que desde que llego entendí que la vida me había dado otro aire y más oportunidades para luchar.

## Resumen

El presente estudio muestra los resultados de un ensayo realizado por un periodo de 3 meses donde se evaluó la fitorremediación y biorremediación de hidrocarburos totales, presentes en los sedimentos de la estación de servicio Texaco No. 27 localizada en Popayán, Para ello se utilizó plantas de girasol (*Helianthus annuus*) y unidades de tratamiento de lechos (UTL). Para cada uno de los tratamientos se diseñó una réplica y un testigo. La biorrecuperación para las UTL se realizó volteando y aireando manualmente el sedimento cada 8 días. Para la técnica de fitorremediación se sembraron 28 plantas de *Helianthus annuus* por unidad de investigación. La remoción de HCT (variable de respuesta) se evaluó cada 15 días, mediante la técnica de extracción por reflujo utilizando equipo Soxhlet y las variables de control, temperatura, pH y humedad permanecieron estables durante el proceso de evaluación. Se demostró que la efectividad del sistema de tratamiento de lechos (UTL) alcanzó remociones del 84.2 % con 6590 ppm removidas, mientras que la fitorremediación para biorrecuperar sedimentos estuvo en 72.85% con 5670 ppm removidas pero no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos. Con respecto a los testigos de los tratamientos los resultados de laboratorio indicaron que solo alcanzaron a remover 50.9% para la UTL y 16.9 % para la fitorremediación.

**Palabras clave:** Biorrecuperación, hidrocarburos totales, sedimentos contaminados, Fitorremediación, Unidad de tratamiento de lechos.

# Abstract

The present study shows the results of a 3-month trial where the phytoremediation and bioremediation of total hydrocarbons present in the sediments of the Texaco No. 27 service station located in Popayán was evaluated. Used sunflower plants (*Helianthus annuus*) and bed treatment units (UTL). For each of the treatments a replica and a control were designed. The bioreactor for UTL was performed by manually flipping and aerating the sediment every 8 days. For the phytoremediation technique, 28 *Helianthus annuus* plants were planted per research unit. HCT removal (response variable) was evaluated every 15 days using the Soxhlet reflow extraction technique and the control, temperature, pH and humidity variables remained stable during the evaluation process. It was shown that the effectiveness of the bed treatment system (UTL) reached 84.2% removals with 6555.5 ppm removed, while phytoremediation for bio-recovery of sediments was at 72.85% with 5670 ppm removed but there was no significant difference between the two treatments. Regarding the control witnesses, the laboratory results indicated that they only managed to remove 50.9% for UTL and 43.3% for phytoremediation.

**Keywords:** Bio-recovery, total hydrocarbons, contaminated sediment, Phytoremediation, Bed treatment unit.

# Contenido

Pág.

Introducción

<b>1. Capítulo 1</b> .....	<b>17</b>
1. ANTECEDENTES Y CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
<b>2. CAPÍTULO 2</b> .....	<b>22</b>
2.1 Revisión de literatura .....	22
2.1.1 Marco teórico .....	22
2.1.2 Estado del arte .....	41
<b>3. CAPÍTULO 3</b> .....	<b>47</b>
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
En este capítulo se presenta la metodología por fases que fue empleada para desarrollar cada uno de los objetivos propuestos en la investigación.....	47
3.1.1 Determinación de estrategias de biorrecuperación .....	47
3.1.2 Diseño experimental.....	48
3.1.3 Construcción de unidades experimentales .....	51
3.1.4 Monitoreo a unidades experimentales .....	60
3.1.5 Comparación entre la Fitorremediación y las Unidades de Tratamiento en Lechos (UTL) .....	68
<b>4. CAPÍTULO 4</b> .....	<b>70</b>
4.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	70
4.1.1 Caracterización del sedimento .....	70
4.1.2 Establecimiento de unidades o pilotos de investigación .....	72
4.1.3 Evaluación de parámetros y remoción de hidrocarburos totales.....	73
4.1.4 Comparación de la remoción de hidrocarburos totales entre el tratamiento con fitorremediación y unidades de tratamiento de lechos.....	86
<b>5. CAPÍTULO 5</b> .....	<b>88</b>
5.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	88
<b>6. CAPÍTULO 6</b> .....	<b>91</b>
6.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	91
Conclusiones.....	91
Recomendaciones .....	91



# Lista de figuras

Figura 1. Servicios de las estaciones de servicio.....	26
--	----

## Lista de tablas

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo (“DOF - Diario Oficial de la Federación,” n.d.).....	24
Tabla 2. Rangos óptimos ambientales para biorremediar suelos (Cuartas & Cristina, 2012) .....	36
Tabla 3. Factores, niveles y tratamientos .....	49
Tabla 4. Variables de respuesta y de control .....	49
Tabla 5. Cantidad de agua aplicada y volteo manual de UE en los UTL .....	59
Tabla 6. Parámetros y métodos de medición .....	68
Tabla 7. Caracterización del sedimento estación de servicio Texaco N° 27 .....	70
Tabla 8. Caracterización de la materia orgánica compostada adicionada a las unidades experimentales.....	71
Tabla 9. Resultados de remoción de HCT en la unidad de fitorremediación .....	74
Tabla 10. Resultados de remoción de HCT en la réplica de la unidad de fitorremediación .....	74
Tabla 11. Comportamiento de HCT en la unidad experimental testigo.....	75
Tabla 12. Prueba de homogeneidad de varianzas .....	79
Tabla 13. ANOVA .....	80
Tabla 14. Resultados de remoción de HCT en la unidad de tratamiento de lechos.....	80
Tabla 15. Resultados de remoción de HCT en la réplica de la unidad de tratamiento de lechos .....	81
Tabla 16. Comportamiento de HCT en la unidad experimental testigo.....	81
Tabla 17. Prueba de homogeneidad de varianzas .....	85
Tabla 18. ANOVA .....	85
Tabla 19. Descriptivos del análisis de varianza .....	87
Tabla 20. Prueba de homogeneidad de varianzas .....	87
Tabla 21. ANOVA .....	87

## Lista de gráficos

Gráfica 1. Diseño de unidades experimentales.....	52
Gráfica 2. Muestreo compuesto.....	60
Gráfica 3. Distribución y contenido de los pilotos de investigación .....	72
Gráfica 4. Comportamiento de la temperatura en el tratamiento de fitorremediación.....	75
Gráfica 5. Comportamiento de la humedad en el tratamiento de fitorremediación .....	76
<b>Gráfica 6.</b> Comportamiento del pH en el tratamiento de fitorremediación .....	78
Gráfica 7. Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales acumulado .....	78
Gráfica 8. Comportamiento de la temperatura en las unidades de tratamiento de lechos	82
Gráfica 9. Comportamiento de la humedad en las unidades de tratamiento de lechos ...	82
Gráfica 10. Comportamiento del pH en las unidades de tratamiento de lechos .....	83
Gráfica 11. Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales acumulado .....	84
Gráfica 12. Remoción de hidrocarburos totales con fitorremediación vs unidades de tratamiento de lechos .....	86

## Lista de fotografías

Foto 1. Diseño final módulo para Fitorremediación .....	53
Foto 2. Diseño final unidad de tratamiento de lechos (UTL) .....	54
Foto 3. Manejo de lixiviados en la unidad de tratamiento de lechos (UTL) .....	55
Foto 4. Aplicación manual de aire .....	58
Foto 5. Materiales empleados para determinar humedad .....	61
Foto 6. Medición de temperatura.....	62
Foto 7. Medición del pH .....	64
Foto 8. Materiales y procedimiento para obtención de HCT .....	67

# Introducción

El acelerado crecimiento de la población mundial ha dado como resultado una mayor demanda de combustibles fósiles, siendo la industria petrolera y petroquímica el eje principal en la cadena de producción de hidrocarburos y sus derivados, destinados a satisfacer los requerimientos energéticos de combustibles y productos lubricantes para la industria y el transporte (Semple et al., 2001).

La contaminación por hidrocarburos está ampliamente distribuida en el planeta y nuestro país no es la excepción, el efecto ambiental ocasionado por el vertido de sustancias tóxicas al suelo y fuentes de agua es incalculable. En las últimas décadas la contaminación ambiental generada por los continuos derrames de hidrocarburos y sus derivados a causa del inadecuado manejo, ha generado preocupación para los gobiernos de Latinoamérica y del mundo entero, debido a la acumulación de estos residuos en el suelo y cuerpos de agua; provocando daños al ambiente y a la salud humana (Bartha, 2002).

La venta permanente de combustible en las estaciones de servicio, son una de las actividades que mayor riesgo representa para el medio ambiente, debido a que regularmente se presentan derrames en las zonas de distribución, que se mezclan con arena, y con los sedimentos generados en las zonas de almacenamiento, distribución, trampas de grasas y desarenadores de lavado de autos ((Vallejo et al., 2005). En Colombia, los residuos sólidos y líquidos contaminados con aceites e hidrocarburos son considerados como residuos peligrosos según el anexo I y II numeral nueve (9) del convenio de Basilea, aprobado por la Ley 253 de 1996 (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 1996). En esta categoría entran de igual manera los sedimentos contaminados con hidrocarburos, producto del mantenimiento de las estructuras, de las estaciones de servicio.

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados principalmente por átomos de carbono a los que se unen átomos de hidrógeno y también elementos como oxígeno, nitrógeno, azufre, halógenos (cloro, bromo, yodo y flúor) y fósforo, entre otros. Las cadenas de átomos de carbono pueden ser lineales o ramificadas, abiertas o cerradas, diferenciándose dos tipos; aromáticos y alifáticos, dependiendo del tipo de enlace que unen entre sí los átomos de carbono, los hidrocarburos alifáticos, a su vez se clasifican en alcanos, alquenos y alquinos (Vallejo et al., 2005).

De acuerdo a la naturaleza de origen, los hidrocarburos se los define como compuestos orgánicos que se clasifican en biogénicos y antropogénicos; los cuales son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Bedair and Al-Saad, 1992).

Después de un evento de contaminación al suelo con hidrocarburos, se ha identificado que el impacto se manifiesta en reducción de la población de plantas sobre el área del derrame, en los cambios en su dinámica que sufre la fauna microbiana y que los cuerpos de agua subterránea se contamina por infiltración, en igual sentido se generan impactos de tipo social, económico y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Pardo J., 2004)

La biorrecuperación de sedimentos contaminados ya sea mediante el uso de plantas como por aplicación de aire, son tecnologías basadas en el uso de microorganismos presentes en el suelo y su potencial para degradar los contaminantes del medio, transformándolos en sustancias inocuas como  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Los hidrocarburos son los contaminantes que más fácilmente se degradados por los diferentes procesos de remediación de suelos (Rosenberg et al., 1992).

Dado que los productos petrolíferos son mezclas complejas de hidrocarburos y derivados, la biodegradación es selectiva ya que los microorganismos no degradan por igual las distintas familias de hidrocarburos (Alexander, 1999).

El municipio de Popayán cuenta en la actualidad con 24 Estaciones de Servicio, localizadas dentro de la zona urbana, con más de 20 años de funcionamiento

(Corporación Autónoma Regional del Cauca C.R.C.), muchas han optimizado su servicio involucrando modernas técnicas en cada una de sus actividades, pero no ejercen acción efectiva para minimizar impactos negativos al medio ambiente, dado que se ejerce un deficiente control sobre los focos de contaminación especialmente con los lodos y sedimentos que en ellas se generan. Los sedimentos contaminados que se originan en las estaciones de servicio del municipio de Popayán son recogidos periódicamente por la empresa Juanchito, que los transporta hasta el departamento del Valle donde son incinerados. El problema de ésta recolección radica en que los propietarios no envían todo lo que se genera en las estaciones de servicio, reportando solo una parte y la otra es depositada en terrenos baldíos a campo abierto. Los derrames de hidrocarburos, en la mayoría de estaciones de servicio terminan en el suelo, subsuelo (zona vadosa), en los cuerpos de agua subterránea (zona saturada), en los cursos de agua superficial y en la atmósfera a donde migran los componentes volátiles (Vasallo, 2002).

En este contexto la presente investigación se centra en evaluar la degradación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) presente en los sedimentos que se generan en la estación de servicio No.27 en el municipio de Popayán, departamento del Cauca. Para ello se evaluaron 2 procesos, el de fitorremediación utilizando plantas de girasol (*Helianthus annuus*) y biorremediación usando lechos como alternativa para el tratamiento de sedimentos contaminados con hidrocarburos.

La presente investigación es una herramienta o soporte importante desde el punto de vista técnico, para tratar sedimentos contaminados que permanentemente están generando las estaciones de servicio. De acuerdo a los resultados obtenidos, de aplicarse cualquiera de las estrategias planteadas, permitiría disminuir los impactos contaminantes que se producen cuando se depositan los sedimentos en el suelo sin ningún control





# 1. Capítulo 1

## 1. ANTECEDENTES Y CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

La existencia del problema de la contaminación por hidrocarburos en el suelo y especialmente en aguas marinas, se ha reconocido desde 1920, en esa época no se llegó a acuerdos concretos respecto a su disminución y control. Este tipo de contaminación ocasiona la destrucción y muerte de aves marinas y otros animales, causando efectos adversos en peces y microorganismos. Se conoce que después de un derrame de hidrocarburos; estos permanecen durante largo tiempo en el suelo, trasladándose a corrientes de agua subterránea, cayendo luego en aguas superficiales y finalmente ingresa al hombre afectando su salud (Stroud et al., 2007).

A mediados de la década del 60, la investigación científica estaba centrada en la solución de los problemas de contaminación únicamente del agua y el aire, pues se consideraba que las afectaciones al suelo no representaban un problema ambiental, desconociendo que los derrames de hidrocarburos al suelo disturban los bioprocesos que en él suceden, afectan su estructura, al igual que las poblaciones de plantas animales y microorganismos. Es a partir de la declaratoria de 1972 cuando los países industrializados inician procesos investigativos en áreas contaminadas, concluyendo que los tratamientos biológicos resultan más económicos que los químicos o físicos (Caplan, 1993).

El auge de la revolución industrial trajo consigo el crecimiento de la industria automotriz a nivel mundial, evidenciándose con ello la construcción acelerada de estaciones de servicio y en consecuencia los problemas de contaminación, dado que no se generaron

mecanismos para evitar fugas o derrames; ni tampoco implementación de prácticas o alternativas de remediación que minimizaran el impacto sobre el suelo y fuentes de agua, puesto que la investigación para ese entonces aún era incipiente.

El funcionamiento y operación de las estaciones de servicio implica la presencia de amenazas sobre los recursos naturales, debido a los productos químicos involucrados en la actividad. El riesgo de contaminación de suelos y aguas subterráneas, se incrementa por la ocurrencia permanente de derrames superficiales de combustibles, por fugas en sistemas de almacenamiento y por la mezcla de grasas y aceites que se combinan con los sedimentos que se generan en el lavado de automotores, siendo depositados o abandonados en terrenos baldíos a cielo abierto sin ningún control, representando un riesgo para la salud humana, razón por la cual la restauración de estos sitios contaminados se ha convertido en una prioridad a nivel mundial (Lee et al., 2006).

Es importante mencionar que en Bogotá, en el año 2013 la secretaría distrital del ambiente, identificó la contaminación ocasionada por el derrame de hidrocarburos sobre el suelo y fuentes de agua causado por la empresa perteneciente al GRUPO EDS AUTOGAS S.A.S, ordenando de manera inmediata el cierre de la estación de servicio las Margaritas (Tiempo, 2013). Incidentes de esta naturaleza se vienen presentando en todo el territorio nacional sin embargo hasta la fecha las autoridades ambientales no han tomado medidas para aplicar eficientemente la normatividad en materia de derrames, limitándose a sancionar presuntos infractores que de manera voluntaria o involuntaria hayan provocado eventos de contaminación.

En general, una de las actividades principales de las Estaciones de Servicio es la venta de combustibles líquidos, entre los que se encuentran gasolina y diésel principalmente; otros servicios alternos son el lavado, lubricación y engrase de automotores, cambio de aceite y filtros y servicio de monta llantas. Los derrames menores de combustible ocurren regularmente durante las actividades de operación de las Estaciones de Servicio. Las pérdidas en tanques y tuberías debido a fugas o derrames accidentales, han causado problemas ambientales en el suelo superficial y en el subsuelo. Una vez que los combustibles penetran el suelo, afectan las características físicas y químicas del mismo,

impactando sobre su productividad y la población microbiana presente, además de amenazar la salud pública.

Es de anotar que en los últimos 18 años la afectación de los ecosistemas por el derrame de hidrocarburos se ha visto incrementada considerablemente por la actividad terrorista, destruyendo oleoductos e instalaciones petroleras. Entre 1986 y 1998 la incursión violenta de grupos al margen de la ley provocó el derrame de dos millones de barriles que cayeron sobre pantanos, ciénagas, ríos, quebradas con aptitud para la pesca y también sobre suelos que en su mayoría eran de vocación agrícola o pecuaria. En resumen hasta esa fecha el impacto se estimó en 6000 hectáreas de terrenos con potencial agrícola y pecuario, 2600 kilómetros de ríos y quebradas contaminadas, 1600 hectáreas afectando ciénagas y humedales, dando lugar a grandes impactos de índole social, económica y ambiental (Miranda and Restrepo, 2005).

Son numerosas las investigaciones que se ha realizado en torno a la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados por derrame de los mismos y la fitorremediación es una de las técnicas que se utiliza para biorremediar suelos y sedimentos contaminados, evidenciado efectividad bajo ciertas condiciones (Reynolds et al., 1999). Otra técnica que se ha evaluado es el compostaje como técnica *ex situ*, donde se han empleado diferentes compuestos para aumentar el contenido de materia orgánica y así aumentar la dinámica de los microorganismos, los cuales logran descomponer el lubricante (Jørgensen et al., 2000).

Es de anotar que en todos los suelos contaminados el proceso de remediación no ocurre de la misma forma, está condicionada por factores ambientales, el tipo de suelo, la clase de bacterias y microorganismos presentes, las propiedades fisicoquímicas y la concentración del contaminante.

Estudios han permitido demostrar la existencia de plantas que tienen la capacidad de acumular contaminantes orgánicos como los hidrocarburos. (Huelster et al., 1994), sin embargo (Reynolds et al., 1999), sostiene que la biorremediación se incrementa en la medida en que se utilice especies de plantas que estimulen la actividad microbiana, mediante el aumento de la biomasa, con lo cual se evita tener que incinerar las plantas que acumulan el contaminante en su interior.

## ▪ Hipótesis

La mayor eficiencia en la remoción de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos que genera la estación de servicio Texaco No. 27 de Popayán, se logra en el tratamiento en lechos

La especie vegetativa *Helianthus annuus*, utilizada en la fitorremediación de hidrocarburos totales de petróleo presentes en los sedimentos, puede lograr eficiencia de remoción superiores al 60%

El tratamiento de lechos usado para tratar los hidrocarburos totales presentes en los sedimentos, puede lograr eficiencia de remoción superior al 60%.

## ▪ Pregunta de investigación

Entre las técnicas tratamiento en lechos y fitorremediación ¿cuál es la que genera mayor efecto en la degradación de hidrocarburos totales, presentes en los sedimentos que se originan en la estación de servicio Texaco No. 27 del municipio de Popayán?

## ▪ Objetivos

### General

Evaluar la efectividad de la fitorremediación y el tratamiento en lechos en la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos generados en la estación de servicio Texaco No. 27 de Popayán

### Específicos

- 
- Implementar un sistema de lechos y de fitorremediación para biorremediar y fitorremediar sedimentos generados en la estación de servicio Texaco No. 27 de Popayán.
  - Analizar la concentración de hidrocarburos totales presente en las unidades de tratamiento en lechos (UTL) y en el módulo de fitorremediación, utilizada como técnicas de biorrecuperación de sedimentos.
  - Evaluar el tratamiento que mayor degradación de hidrocarburos causa sobre los sedimentos generados por la estación de servicio de combustible

## **2.CAPÍTULO 2**

### **2.1 Revisión de literatura**

#### **2.1.1 Marco teórico**

##### **2.1.1.1. Origen y composición del petróleo**

El petróleo es un recurso natural no renovable que se originó a partir de la degradación anaerobia por largos periodos de tiempo de la materia orgánica sometida a condiciones de alta temperatura y presión, convirtiéndola en un gas natural, crudo y con múltiples derivados. El petróleo es una mezcla compleja y variable de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes (Acuña-González et al., 2004).

Los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) son llamados de esta forma por estar compuestos de moléculas que contienen básicamente carbono e hidrogeno, las cuales pueden organizarse en un número infinito de estructuras constituyendo cada una de ellas un único compuesto orgánico (Braibant-Wayens, 2004). Aunque cada compuesto posee características químicas únicas, se clasifican en grupos teniendo en cuenta el número de carbonos del compuesto o la reactividad química del mismo. Por lo anterior los hidrocarburos derivados del petróleo son clasificados en tres grandes grupos: alcanos, alquenos y aromáticos, los alcanos o hidrocarburos saturados son los mayores constituyentes de los productos derivados del petróleo (Hillel and Hatfield, 2004).

Los hidrocarburos son moléculas químicamente muy estables en las que el esqueleto carbonado se encuentra saturado de hidrógeno. Presentan estructuras lineales,

ramificadas o cíclicas, los ramificados conforman la mayor parte del petróleo (Braibant-Wayens, 2004). Los de cadena corta son más tóxicos que los de cadena larga, siendo estos últimos más hidrofóbicos (Balba et al., 1998). En este grupo se encuentran el hexano, el octano, el decano, el hexadecano, los isoalcanos y los cicloalcanos como el ciclohexano. El segundo grupo de los hidrocarburos de petróleo está constituido por los alquenos, que son compuestos inertes y por lo tanto más resistentes a la biodegradación. Estos compuestos son producto del proceso de refinación del petróleo; en este grupo se encuentran el etileno y el isobutileno los cuales son usados en la manufactura de químicos (Hillel and Hatfield, 2004).

### **2.1.1.2. Impactos Ambientales de los Hidrocarburos**

La contaminación de suelo y agua con hidrocarburos es un problema que se ha extendido como resultado de derrames de contenedores, rupturas de tuberías subterráneas y varios procesos industriales, los líquidos migran hacia el suelo y subsuelo mezclándose posteriormente con el agua subterránea, o también a través de los cursos de agua que los transporta ampliando su poder contaminante a otras áreas, los componentes volátiles migran a la atmósfera (Vasallo J. y., 2002). Cuando ocurre un derrame de petróleo, se produce un efecto negativo de los hidrocarburos sobre la vegetación de manera directa ocasionando la muerte y de manera indirecta afectando las condiciones físicas del suelo alterando principalmente su fertilidad (Pettenello and Feldman, 2012).

La afectación cuando ocurre un derrame está asociada al impedimento que se genera en el suelo para que pueda realizar adecuadamente el intercambio gaseoso con la atmósfera, dando lugar a que ocurran procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida provocaría mayor toxicidad (Miranda and Restrepo, 2005). En igual sentido se afecta la población de microorganismos, dado que se modifica la salinidad, por lo cual se entorpece el proceso biorremediador, debido a que gradientes altos de salinidad destruyen la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizan las enzimas y deshidratan las células, lo cual es letal para la fauna

microbiana (“The Regional Institute - Bioremediation of soils contaminated with organic compounds,” 2012).

Cuando se impacta el agua, se forma sobre la superficie una mancha o película generada por el hidrocarburo, flotando sin mezclarse por diferencia de densidades, impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando inicio a la solubilización de compuestos hidrosolubles, afectado el plancton en primera instancia, posteriormente los macroinvertebrados y finalmente afecta los bentos o población que habita el fondo de ríos y quebradas (Bento et al., 2003). En los ecosistemas forestales y plantas maderables la afectación ocurre cuando hay derrames de hidrocarburos poliaromáticos (PHA) provocando necrosamiento a nivel de las estructuras foliares (Smidt, 2000).

Las implicaciones a la salud humana se generan cuando el hidrocarburo que tiene características corrosivas, explosivas, inflamables y tóxicas contamina el suelo y cuerpos de agua, ingresando finalmente al organismo a través de los sistemas de acueducto, razón por lo cual la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) de EEUU clasifica los hidrocarburos y sus derivados como contaminantes primarios, y en Colombia se los identifica como residuos peligrosos, según el convenio de Basilea aprobado por la ley 253 de 1996 (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 1996).

**Tabla 1.** Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo  
(“DOF - Diario Oficial de la Federación,” n.d.)

Fracción de hidrocarburos	Usos del suelo predominante (mg kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1.200	1.200	5.000
Pesada	3.000	3.000	6.000

Fuente: (NOM-SEMARNAT/SS-2003)

Finalmente se concluye que el impacto ambiental negativo sobre el medio ambiente está relacionado con la inexistencia de una evaluación cuantitativa de la contaminación desde la fase exploración hasta la obtención de los petroquímicos básicos, por la ausencia de un periódico seguimiento a la infraestructura, (pozos de explotación, baterías de



separación, procesadores de gas, centrales de almacenamiento y bombeo y piletas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos), en igual sentido también lo determina la amplia gama de productos derivados que maneja la industria petrolera.

### **2.1.1.3. Estaciones de servicio**

De acuerdo con el decreto 1521 de 1998, expedido por el Ministerio de Minas y Energía, las estaciones de servicio son establecimientos destinados al almacenamiento y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo y/o gaseosos y gas licuado del petróleo (GLP), para vehículos automotores a través de equipos fijos (surtidores) que llenan directamente los tanques de combustible. Además, en algunas estaciones de servicio ofrecen los servicios de lubricación, lavado general y/o motor, cambio y reparación de llantas, alineación y balanceo, servicio de diagnóstico, trabajos menores de mantenimiento automotor, venta de llantas, neumáticos, lubricantes, baterías y accesorios y demás servicios afines. Existen algunas estaciones de servicio que realizan distribución de gas natural comprimido (GNC) (Ministerio del Medio Ambiente, 1999).

En las estaciones de servicio también podrán operar minimercados, tiendas de comidas rápidas, cajeros automáticos, tiendas de video y otros servicios afines a estos, siempre y cuando se obtengan de las autoridades competentes las autorizaciones correspondientes y se cumplan todas las normas de seguridad para cada uno de los servicios ofrecidos. De manera general se ilustran en la Figura 1 las actividades generales de la estación de servicio.

**Figura 1.** Servicios de las estaciones de servicio

#### 2.1.1.4. Actividades generadas en las estaciones de servicio

- **Venta de combustible:**

Consiste en extraer el hidrocarburo del estanque de almacenamiento subterráneo de la estaciones de servicio, para ser vendido a los usuarios que lo depositan en los tanques de combustible de los vehículos automotores.

- **Lavado de Automóviles:**

Actividad que consiste en el lavado de vehículos con sistemas de presión, donde generalmente incluye aseo de carrocería, chasis y motores. Las aguas de lavado son evacuadas a los sistemas públicos de alcantarillado; sin previo tratamiento de ellas.

- **Mantenimiento y Reparación de Automóviles:**

Generalmente está relacionado con frecuentes cambios de lubricantes y líquidos de frenos; mantenimiento de radiador y frenos, cambio y reparación de llantas y baterías; y eventualmente reparaciones mecánicas, en las cuales se utiliza solventes.

### **2.1.1.5. Contaminación Generada en las Estaciones de Servicio**

La contaminación que se genera en las estaciones de servicio es de diversos tipos, afectando el aire, el suelo y el agua.

#### **▪ Emisiones Atmosféricas**

Las emisiones atmosféricas por la evaporación de hidrocarburos, principalmente compuestos orgánicos volátiles (COV), se producen durante:

- a. El llenado y respiración de los estanques subterráneos de almacenamiento de combustible. Las emisiones se generan cuando los vapores de gasolina en el estanque son desplazados a la atmósfera por la gasolina que está siendo descargada.
- b. Los tanques de los automóviles por pérdidas durante el llenado. Las emisiones se producen por dos procesos: desplazamiento de vapores desde el tanque del automóvil por la gasolina cargada; y por derrames.

#### **▪ Residuos Líquidos**

Permanentemente las estaciones de servicio están generando residuos líquidos que generan impactos ambientales y se originan en las operaciones de:

- Lavado de pisos
- Derrames y pérdidas de gasolina, solventes, aceites y grasas
- Mantenimiento de vehículos
- Aguas lluvia.
- Lavado de vehículos automotores

Los residuos contienen principalmente sólidos suspendidos (barro), aceites y grasas, solventes halogenados, restos de combustibles, desengrasantes, detergentes y ceras

especiales, los otros residuos líquidos que se generan en la estación de servicio, son las aguas domésticas provenientes de los baños, duchas y centros de expendio de alimentos.

- **Residuos Sólidos**

Los residuos sólidos generados son:

- Lodos (sedimentos) provenientes del lavado de vehículos y tanques de almacenamiento.
- y filtros.
- Lodos provenientes de sistemas de tratamiento, ya sea se cámaras separadoras de aceites y grasas; o simples decantadores.
- Filtros dañados que se utilizan en el cambio de aceite.
- Textiles contaminados: materiales de absorción (para derrames) y paños de limpieza.
- Envases, plásticos y metálicos, contaminados con aceites, solventes, grasas, etc.
- Repuestos de vehículos que quedan después de ser cambiados (radiadores, baterías, llantas y neumáticos, etc.)

### **2.1.1.6. Técnicas de biorrecuperación de suelos**

La transformación biológica de contaminantes contenidos en terrenos y aguas subterráneas pueden ocurrir en forma natural, la cual puede ocurrir muy lentamente, estando limitada por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno o por los microorganismos adecuados. En igual sentido el tratamiento de suelos y aguas subterráneas (biorrecuperación) está relacionada con la alteración que puedan sufrir los factores influyentes en la reacción para incrementar la tasa de transformación biológica. El tratamiento en lechos sigue principios parecidos a los de las labores agrícolas, empleando equipos de laboreo similares para voltear y airear los suelos, por lo que solo se pueden tratar las capas de suelo menos profundas (Eweis, 1999).

- **Biorremediación**

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Mesa et al., 2006).

Así mismo, existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra (*lumbricus terrestris*) la cuál absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en las vías digestivas (Rojas-Avelizapa et al., 1999; Stres et al., 2004).

Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, sin embargo también se han utilizado Hongos, Algas, Cianobacterias y Actinomicetes para degradar compuestos tóxicos presentes en el suelo (Stres et al., 2004).

La biorremediación del suelo, se puede clasificar en estrategias *in situ* y estrategias *ex situ*. La primera corresponde al tratamiento que se realiza en el lugar donde sucede la contaminación y el tratamiento *ex situ* es un método donde se excava el suelo o el material a descontaminar y se lo trata en un sistema controlado como una celda de "landfarming" o algún tipo de biorreactor (Çelen and Kiliç, 2004; Song et al., 2000; Xu and Lu, 2010).

Las técnicas de biorremediación *in situ* presentan mayor ventaja sobre las *ex situ* por el menor costo y la disminución de la generación de residuos a eliminar en la superficie (Daane et al., 2001). La biorremediación *in situ* es la más aplicada y utiliza microorganismos autóctonos, los cuales pueden degradar un gran número de contaminantes pero su eficacia y su población son afectadas cuando algunos tóxicos están presentes en altas concentraciones. La reintroducción de microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos pueden degradar los constituyentes y tiene una gran tolerancia a la toxicidad.

Para la remoción o degradación de los derivados del petróleo se han usado diversos tipos de tecnologías entre las que se encuentran las físicas, químicas y fisicoquímicas. Los tratamientos físicos recurren a técnicas de separación física como la extracción por vapor que utiliza la diferencia de presiones, la extracción de solventes a través de la diferencia de solubilidad y la termo desorción que usa la temperatura; los tratamientos químicos emplean técnicas de reacciones bioquímicas y los tratamientos fisicoquímicos emplean procesos de reacción fisicoquímicos como la solidificación, incorporación al asfalto e incineración (Kostecky P., 2004).

Para contrarrestar los altos costos que conllevan las tecnologías de remediación convencionales se ha promovido el desarrollo de tecnologías biológicas de tratamiento las cuales se basan en la capacidad que tienen los propios microorganismos del suelo y los microorganismos asociados a algunos tipos de plantas, para transformar o degradar compuestos orgánicos en compuestos químicos más sencillos, logrando incluso una degradación completa transformándolos en bióxido de carbono y agua (Deyta A., 1998). La interacción raíz - microorganismos contribuye significativamente a la remoción, degradación o estabilización del contaminante, convirtiendo la Fitorremediación y la biorremediación en estrategias menos costosas y ambientalmente amigables para sanear suelos contaminados con hidrocarburos (White and Newman, 2011).

#### ▪ **Fitorremediación**

La fitorremediación, es el uso de plantas para la remoción de contaminantes de suelo y aguas, es una técnica apropiada para la remoción de metales pesados y radionucleos. Sin embargo, no se conoce sobre la habilidad de esta en el tratamiento de suelos con contaminantes orgánicos persistentes, un ejemplo lo constituye la especie *Thlaspi cauculencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio donde se encontró que los eliminaba del suelo agrícola (Blaz, 2004).

La Fitorremediación es un término general para las diversas maneras en que las plantas se usan para remediar in situ los suelos, lodos, sedimentos, y agua contaminada. Las plantas pueden degradar contaminantes orgánicos o contener y estabilizar metales pesados, además pueden ser usadas para remover pesticidas, solventes, explosivos,

lixiviados de rellenos sanitarios e hidrocarburos aromáticos mediante procesos como: fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización, fitodegradación, rizodegradación y fitovolatilización (EPA 1999). Sin embargo, debe considerarse que la fitoremediación requiere más esfuerzo que la simple plantación de la vegetación, debe contar con un mantenimiento mínimo que garantice el crecimiento normal de la planta, al igual que una comprensión de los procesos que ocurren en ellas (White and Newman, 2011).

Para el caso de los hidrocarburos, la fitoremediación se refiere al uso de plantas con capacidad para remover los contaminantes y con resistencia para crecer en suelos contaminados con HPT. Estas plantas son capaces de fitodegradar y estimular poblaciones de microorganismos en los sistemas rizosféricos. Se ha demostrado que las plantas pueden metabolizar o inmovilizar hidrocarburos del petróleo por medio de procesos como la oxidación metabólica o la co-oxidación dependiendo de los niveles de concentración de los hidrocarburos. En concentraciones bajas de toxicidad, el sistema rizosférico proporciona condiciones nutricionales y de aireación favorable para el aumento de las poblaciones, y bajo altas concentraciones de hidrocarburos se afecta la exudación de la raíz, los factores de crecimiento y los ácidos orgánicos con el consiguiente rompimiento del equilibrio rizosférico, la disminución de microorganismos totales (hongos y bacterias), de bacterias asimiladoras de nitrógeno y de fijadores de nitrógeno atmosférico (Pérez Vargas et al., 2002).

#### ▪ **Mecanismos de Fitorremediación**

Son muchos los mecanismos a través de los cuales las plantas pueden remediar los sitios contaminados: fitoextracción / fitoacumulación, Fitodegradación / fitotransformación, fitoestabilización, fitoestimulación, fitovolatilización y rizodegradación; las transformaciones de los contaminantes en las plantas pueden ser in situ, in vitro o in vivo. Igualmente existen factores que afectan la captura y distribución en las plantas como las propiedades físicas y químicas del compuesto contaminante, las características del medio y las características de la planta (Susarla et al., 2002). Sin embargo, existen tres mecanismos primarios a través de los cuales las plantas y los microorganismos remedian el suelo y las aguas subterráneas contaminadas con petróleo.

- **Rizodegradación**

Es el principal mecanismo de degradación petroquímica en fitorremediación, se presenta por la interacción plantas y microorganismos los cuales degradan los hidrocarburos y el petróleo en productos que generalmente son menos tóxicos y menos persistentes en el medio ambiente como alcoholes, ácidos, dióxido de carbono y agua (Eweis, 1999). La presencia de raíces estimula el crecimiento y la variedad de microorganismos en la zona, quienes toman los compuestos orgánicos para su nutrición y energía, los microorganismos a su vez estimulan el crecimiento de la rizósfera generando más exudados compuestos de azúcares, aminoácidos, y ácidos orgánicos acelerando el metabolismo de los contaminantes en la rizósfera (US EPA, n.d.).

- **Fitodegradación**

Implica el uso de plantas para reducir o eliminar la biodisponibilidad de contaminantes a otros componentes de la biota. Las plantas adsorben los hidrocarburos a través de la superficie de la raíz y los acumulan dentro de ellas (Frick, et al., 1999). La fitodegradación no depende de la asociación de los microorganismos con la rizósfera y puede ser empleada también para degradar solventes, herbicidas, insecticidas y nutrientes inorgánicos (US EPA, n.d.).

- **Fitovolatilización:**

Es la transferencia de hidrocarburos volátiles del suelo o el agua a la atmósfera realizada por las plantas a través de la transpiración en concentraciones bajas (Frick et al., 1999).

### **2.1.1.7. Tratamientos en lecho**

Benazon et al., 1995, definen el tratamiento en lechos como tratamiento por vía sólida y consiste en airear la matriz del suelo para optimizar la actividad microbiológica. Factores



como el tiempo, laboreo del suelo, adición de fertilizantes y control de la humedad permiten aumentar la eliminación biológica del contaminante.

El proceso consiste en esparcir en capas finas el medio contaminado; ya sea suelo, fango, sedimento o líquido residual y airear labrándolo para mejorar el transporte de masa y la bioaccesibilidad, es importante hacer seguimiento periódico y ajustes de nutrientes, pH y contenidos de humedad cuando sea necesario.

El tratamiento de suelo contaminado puede llevarse a cabo en el sitio donde ocurrió el derrame (*in situ*) o excavándolo y transportándolo hasta otro lugar (*ex situ*) para remediarlo, dependiendo de la zona, tipo de contaminación, y nivel de concentración del contaminante en el suelo. Para el tratamiento *ex situ* se debe construir una capa impermeable bajo el suelo contaminado para evitar o impedir la dispersión del contaminante a través de las capas subterráneas (contaminación cruzada).

La atenuación natural es otro proceso que biodegrada los contaminantes presentes en un medio contaminado de manera natural, transformándolos a formas menos peligrosas o menos tóxicas tanto para el ambiente como para la salud (Abu and Dike, 2008). Igualmente afirma que en la atenuación natural intervienen factores físicos como la evaporación, dispersión y dilución y factores químicos como la oxidación y reducción, que impactan sobre la población biológica del suelo propiciando la degradación del contaminante.

(Cuartas and Cristina, 2012) destacan otros factores que especialmente influyen sobre la viabilidad y eficacia de la degradación, reportando los siguientes:

- a. Condiciones geológicas y geoquímicas favorables.
- b. Confirmación de la existencia de los tipos y número de poblaciones de microorganismos que puedan biodegradar los contaminantes.
- c. Producción y conservación en el medio de subproductos de carácter persistente o más tóxicos que los iniciales, durante y después.
- d. La no existencia de producto libre en flotación sobre el nivel freático. Condiciones óptimas de concentración de oxígeno disuelto.
- e. Presencia de compuestos utilizados como aceptores de electrones en condiciones anaerobias como nitrógeno, fósforo, sulfatos entre otros.

- f. Existencia de un coeficiente de retardo favorable para que se produzcan los fenómenos de sorción con suficiente eficacia. Que se produzca una dilución suficiente para que la concentración se vea disminuida.

Aunque los hidrocarburos se degradan de forma aerobia y anaerobia, la tasa de biodegradación aerobia depende de la complejidad de la molécula contaminante y de la disponibilidad de aceptores de electrones. Un ejemplo son los hidrocarburos muy ramificados o con muchos anillos aromáticos, los cuales son muy difíciles de degradar principalmente por su baja solubilidad en agua y por lo complejo de su estructura que hace difícil que los microorganismos encuentren el lugar para realizar el ataque enzimático. Inicialmente, las bacterias introducen oxígeno en la molécula necesitando de energía y oxígeno elemental para este proceso, razón por la cual los productos de las reacciones de oxigenación se hacen más disponibles para los microorganismos; ya que en esta etapa son más solubles en agua y son fácilmente atacados en posteriores reacciones de deshidrogenación e hidroxilación (Arroyo, 2001).

#### **2.1.1.8. Factores que afectan la biorrecuperación**

Son los que se necesitan en el momento de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que biodegradan el contaminante. Los microorganismos son muy sensibles a cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad. Existen determinadas especies de microorganismos que tienen un rango óptimo característico dentro del cual crecen más rápidamente; especialmente la temperatura que les permite cumplir con su metabolismo pero por encima de este óptimo la actividad microbiana se detiene (Eweis, 1999). Con relación al potencial de Hidrógeno (pH) los microorganismos actúan mejor a un pH entre 6 y 9; siendo óptimo para su crecimiento entre 7 y 8.

Al momento de diseñar y poner en funcionamiento un proceso de biorrecuperación, se deben tener en cuenta los factores medioambientales, factores físicos y factores químicos; puestos que son lo que se deben controlar para mejorar la eficiencia de remediación.

Altas concentraciones de contaminante en el suelo, afecta negativamente su degradación, dado que inhibe la población de microorganismos del suelo, limitando su acción sobre los residuos tóxicos. En igual sentido la biorrecuperación se ve afectada por la ausencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, los cuales se necesitan para el crecimiento microbiano. Entre los factores que influyen en la biodegradación se encuentran la temperatura, pH, humedad, nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfato) y presencia de microorganismos (Roldan, 2002).

El oxígeno es el aceptor final de electrones empleado en proceso biológico y necesario en determinados tipos de reacciones de óxido reducción catalizadas por enzimas. La humedad es importante en biorremediación, ya que de la solución del suelo los microorganismos obtienen los nutrientes necesarios para su crecimiento, se debe tener especial cuidado puesto que el exceso de humedad baja la disponibilidad de oxígeno. Los valores óptimos de humedad para la biorremediación están entre 150 y 250 gramos por kilogramo de terreno seco (Eweis, 1999).

La disponibilidad del contaminante para los microorganismos, la presencia de agua y la provisión de un aceptor de electrones adecuado son los factores físicos más importantes para biorremediar suelos contaminados. Todos los contaminantes tienen afinidad hacia la fase sólida y gaseosa, muchos de los contaminantes más habituales poseen baja solubilidad en agua y son absorbidos con gran intensidad por partículas sólidas. Los hidrocarburos derivados del petróleo en general son apolares, tendiendo a distribuirse en la fase sólida principalmente, por lo que resulta muy baja la concentración en la fase líquida, en igual sentido los hidrocarburos ligeros tienden a distribuirse principalmente en la fase gaseosa. En general los tratamientos in situ no incrementan la disponibilidad, debido a que el contaminante puede quedarse retenido en el interior de los intersticios, los procesos ex situ permiten un mayor control.

El factor químico más importante en biorrecuperación es la estructura molecular del contaminante, como ésta afecta a sus propiedades químicas y físicas y su capacidad para ser biodegradado, la cual está relacionada con la solubilidad, el grado de saturación, el grado de ramificación y la naturaleza y efecto de los sustituyentes. Los

microorganismos degradan con dificultad anillos saturados o los alcanos muy ramificados (Evans, 1998).

En la Tabla 2 se presentan los valores óptimos de temperatura, humedad y pH para el desarrollo de microorganismo en un proceso de biorremediación.

**Tabla 2.** Rangos óptimos ambientales para biorremediar suelos (Cuartas and Cristina, 2012)

<b>FACTOR AMBIENTAL</b>	<b>RANGO</b>
Temperatura (°C)	18 a 30
Humedad (%)	20 a 75
pH	6 a 8

#### ▪ **Temperatura**

Es uno de los factores ambientales más importantes, esta tiene una gran influencia en la biodegradación por su efecto sobre la naturaleza física y química del petróleo y sus derivados (Pardo and Perdomo, 2004). A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce y disminuye la solubilidad del O<sub>2</sub> en agua, afectando así la biodegradación. Las tasas de degradación generalmente aumentan cuando la temperatura incrementa (Ríos, 2005). La temperatura también afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura entre 18 y 30°C, pero cuando supera los 40°C se produce disminución de la actividad microbiana, rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas o puede decrecer la biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias. Cuando la temperatura está a 0 °C detiene substancialmente la biodegradación (Al, 2008). Los cambios climáticos y de estaciones, seleccionan de manera natural a las poblaciones de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, los cuales se adaptan a las temperaturas ambientales (Ríos, 2005).

- **Humedad**

El transporte de oxígeno y nutrientes en el suelo, se ve favorecido cuando en él se presentan condiciones adecuadas de humedad. Investigaciones concluyen que el rango ideal para favorecer la biorremediación está entre 20 y 50% de la capacidad de campo. Es de anotar que el exceso de humedad baja la concentración de oxígeno en el suelo, inhibiendo el crecimiento bacteriano y en concentraciones de humedad bajas se limita el intercambio de gases con la atmósfera (Mesa et al., 2006).

- **pH**

El pH es un factor químico importante que influye en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, ya que determina el grado de adsorción de iones por las partículas del suelo, afectando así su solubilidad, movilidad, disponibilidad y sus formas (www.revistavirtualpro.com, n.d.).

Las formas catiónicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $(\text{PO}_4)^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) son más solubles a pH alcalino. Por lo tanto, si es necesario alcalinizar un suelo se utiliza arena de caliza e iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que para acidificar un suelo se utiliza  $\text{FeSO}_4$ . En otros estudios se ha reportado que la acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando compuestos del azufre.

El pH afecta las poblaciones microbianas, por la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía. A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. Generalmente los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, lo cual limita el crecimiento y la actividad de los microorganismos. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6 – 8 unidades de pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4–7.8, evitando al máximo las fluctuaciones. El pH también tiene efecto sobre la disponibilidad de los nutrientes, debido a que afecta la solubilidad y estado de los compuestos. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH de 6.5, mientras que el plomo se encuentra menos soluble a pH de 7 a 8. En general para minimizar el transporte de metales se recomienda un pH mayor a 6 (Ríos, 2005).

### ▪ Nutrientes

Los nutrientes son uno de los factores más relevantes por ser sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos, por lo que estos constituyentes se deben encontrar disponibles para su asimilación y síntesis, la disponibilidad de estos aumentan la eficiencia y el buen desarrollo de la biorremediación (Gómez S. G., 2008).

Los nutrientes se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes de mayor importancia metabólica se encuentran; el carbono (C) en este caso los hidrocarburos como contaminantes proporcionan la energía necesaria para la fabricación de compuestos celulares y productos metabólicos (dióxido de carbono, agua, enzimas); el Nitrógeno (N), forma parte principal de las biomoléculas de las células, es un elemento necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. En ocasiones la utilización de estos nutrientes es rápida, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades, siendo un factor limitante para la degradación, por lo cual se puede incorporar fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio y de origen orgánico como estiércol, para acelerar el proceso de biorremediación (Gómez S. G., 2008). El fósforo (P) que interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de las células y es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación, puede ser adicionado al suelo como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. El Potasio (K) requerido por una gran cantidad de enzimas para catalizar diferentes reacciones. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de macronutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encuentran en el rango normal se pueden adicionar al suelo. Si la concentración de nutrientes inorgánicos como N y P es baja, se produce una relación C/N y C/P muy altas, lo que no es favorable el crecimiento microbiano, la relación C:N:P debe estar dentro de un rango normal de 100:10:2 a 100:2:0,4, que beneficia los procesos de metabolismo microbiano en el suelo y contribuyen al proceso de degradación del contaminante. La fuente de micronutrientes, oligoelementos o elementos minoritarios constituye un conjunto variado de elementos entre los que se encuentra el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), azufre (S), cobalto (Co), manganeso (Mn), magnesio (Mg) y calcio (Ca), normalmente no se incorporan en el

proceso de biorremediación, puesto que el suelo provee estos elementos en cantidades suficientes (Vallejo, 2007)(Gómez S. G., 2008).

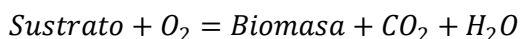
Una característica común en suelos contaminados con hidrocarburos, es que presente altas concentraciones de carbono, sin las cantidades suficientes de nitrógeno y fósforo en el suelo, se pueden limitar los procesos de crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos degradadores, disminuyendo las tasas de biodegradación. La adición de fuentes de N y P inorgánicas, suplen las necesidades fisiológicas de los microorganismos, dando como resultado el incrementando de las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Vallejo, 2007).

- **Aceptor de electrones**

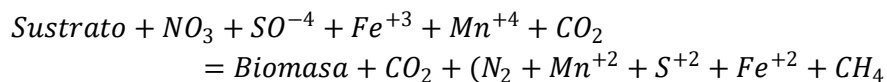
Los aceptores de electrones aumentan la actividad de las poblaciones microbianas nativas o inoculadas (Hamdi, 2007), citado por Ñustes, 2012. En la biorremediación es fundamental el proceso metabólico de transferencia de electrones. La energía necesaria para el crecimiento microbiano se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan la transferencia de los electrones. Los aceptores más utilizados por los microorganismos, son el oxígeno y los nitratos. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, los microorganismos convierten en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular, por enzimas oxigenasas. Sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono, se produce en condiciones reductoras o anaerobias (Gómez S. G., 2008).

El proceso de biorremediación aerobia y anaerobia puede esquematizarse de la siguiente manera:

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



El oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos u otros aceptores de electrones alternativos, logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación en forma anaerobia (Gómez S. G., 2008).

#### ▪ **Microorganismos**

La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxiden los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como el crudo. La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Rios, 2005), citado por Ñustes, D. 2012

Los reportes del porcentaje de bacterias y hongos presentes en suelos, varían de forma importante de entre 0.13% y 50% para bacterias, y de 6% a 82% para hongos, con respecto a la comunidad heterótrofa total del suelo. La proporción de hongos y bacterias dependerá de las condiciones del sitio. El número de microorganismos heterótrofos totales en suelo, considerado como típica se encuentra en una cuenta total de 107 a 109 UFC/g de suelo; para degradadoras potenciales en suelos no contaminados entre 105 y 106 UFC/g; y entre 106 y 108 UFC/g en suelos contaminados (Rios, 2005), citado por Ñustes, D. 2012.



En ecosistemas en donde las poblaciones microbiológicas degradadoras no son significativas, se han utilizado la bioaumentación con el propósito de incrementar la tasa de biodegradación de los contaminantes. Se prefiere la bioaumentación empleando microorganismos nativos, ya que otros microorganismos pueden presentar problemas de adaptación. Recientemente se ha considerado el uso de microorganismos genéticamente manipulados para la biorremediación de sitios contaminados (Rios, 2005), citado por Ñustes, D. 2012

### **2.1.2 Estado del arte**

La adición al suelo de aserrín de pino, heno de arroz y compost de estiércol de cerdo, produjeron efectos positivos en la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo. (Sang-Hwan et al 2007). En igual sentido se observó disminución de hidrocarburos del suelo, cuando se incentivó la actividad microbiana mediante la adición de agentes surfactantes y nutrientes o fertilizantes orgánicos (Pino et al 2007)

Utilizando microflora y agua para biorremediación, lograron eficiencias de remoción hasta de un 90% del contaminante utilizando los microorganismos del suelo y agua en sitios contaminados con gasolina. Igualmente se concluye que los microorganismos no actuaron eficientemente sobre compuestos como ciclohexano y trimetilpentano por ser altamente recalcitrantes (Margarida, 2003). La eficiencia sobre la implementación de una técnica de biorremediación está asociada a la concentración del hidrocarburo en el suelo; la cual debe estar por debajo de 50.000 ppm (Ulla B, 2002).

La implementación del tratamiento de lechos permitió demostrar la reducción de las concentraciones de tolueno y benceno en 77%, pasando de 42 a 4 ppm en 77 días, (Mueller, 1991). Igualmente reducciones en un 36% en aceites y grasas (Bogart, 1988).

Derrames de creosota al suelo procedente de la destilación de alquitrán de hulla la cual contenía compuestos fenólicos, fueron degradados bajando su concentración de 6300 a 800 ppm y de 3000 ppm a 100 ppm en 30 días, utilizando el tratamiento de lechos como técnica para descontaminar suelos.

Günter et al. (1996) demostraron en suelos plantados con Raigras (*Lolium multiflorum*) remociones superiores al 97% en su contenido de hidrocarburos totales (concentración inicial de 4330 mg TPH/kg suelo). Los autores atribuyeron este resultado al mayor número de microorganismos activos presentes en los suelos plantados en comparación con suelos no plantados. De otra parte Reilley et al. (1996) concluyen que la presencia de pastos y leguminosas mejoran la remoción de PAHs con un 30-40% en comparación con suelos no plantados.

Pradhan et al. (1998) en su investigación demostraron que suelos sembrados con alfalfa y otras especies de pastos reducen la concentración de PAHs en más de un 50% en un periodo de seis meses; concluyendo que el mejoramiento de la degradación biológica en la rizosfera, se debe a la acción del proceso fitorremediador de las especies vegetales; sin embargo en tal proceso se intervienen la lixiviación, absorción por plantas, degradación abiótica, mineralización, volatilización e irreversible adsorción,

Los microorganismos presentes en el suelo y el agua tienen la capacidad de distribuirse fácilmente, condición que favorece la biodegradación de hidrocarburos, sin embargo existen lugares donde su presencia es escasa, por lo cual se hace necesario inocular la zona con cepas microbianas para aumentar la biota y con ello la eficiencia para biodegradar hidrocarburos. (Supaphol et al. 2006, Yerushalmi et al. 2003)

Weatherly et al., en 2005 evaluaron la capacidad de la especie *Spartina alterniflora* (*Spartina marítima*) para capturar PAHs presentes en sedimentos y encontraron que la mayor concentración del contaminante se hallaba en las raíces y el tallo en dos y tres órdenes de magnitud respectivamente por debajo de la concentración del suelo. Los HTP detectados en las raíces están principalmente presentes en el suelo adherido a la superficie de la raíz, en lugar de transferirse al tejido de la misma.

Muchas investigaciones hablan del rol de las plantas en la remediación de suelos y aguas contaminadas, describiendo como las plantas a través de varios procesos disminuyen el grado de toxicidad, estos procesos incluyen: las modificaciones físicas y químicas de las propiedades del suelo contaminado; la relación de exudados en las

raíces para aumentar el carbón orgánico y aireación de la zona radicales (Susarla et al., 2002).

De otra parte Sangabriel et al.(2006) evaluaron la tolerancia y capacidad de las gramíneas y las leguminosas para fitorremediar combustóleo en el suelo, concluyendo que la especie *Bracharia brizantha* (Brizhanta o Marandú) es la de mayor capacidad de degradación en la rizósfera; y entre las leguminosas la única especie en tolerar y crecer en el suelo contaminado además de estimular la población microbiana en la rizósfera fue la *Phaseolus coccineus* (frijol), ambas especies pueden ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Phillips et al., (2006); evaluaron la fitorremediación de hidrocarburos con 6 especies diferentes de gramíneas (mixtas e individuales) y el efecto del tipo de tratamiento (mixto o individual) en la estimulación del crecimiento de la comunidad microbiana degradadora de HC, después de 4,5 meses encontraron que las mayores remociones del HC (50%) se dieron en los tratamientos individuales (*fetusca* roja), y que la alfalfa tiene un efecto dominante en las comunidades de microorganismos de la rizosfera, estimulando un relativo crecimiento de las mismas (tratamientos mixtos e individuales).

Sang-Hwan et al., (2007), midieron la capacidad de degradación de hidrocarburos y de disipación de fenantreno y pireno de 4 especies de plantas nativas de Corea comparando un sistema plantado y otro sin plantar. Los resultados muestran que las leguminosas (*Echinogalus* y *Astragalus membranaceus*) son las especies adecuados para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos recalcitrantes, ya que son capaces de crecer en el medio contaminado y poseen una eficiente producción de enzimas extracelulares que facilitan la actividad microbiana.

Peng S., et al., (2009), midieron la capacidad de la especie ornamental *Mirabilis jalapa* L. (Dondiego de noche, Donpedros, Periquitos) para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos procedente de un yacimiento petrolero ubicado en Dongying bajo condiciones de invernadero, después de 127 días obtuvieron remociones entre el 40 y 60%, resultados muy altos al compararse con los obtenidos por atenuación natural que estuvo entre 19 y 37%. Adicionalmente realizaron un análisis cualitativo y cuantitativo de la planta (peso, longitud de la raíz, síntomas de estrés), y concluyeron que la jalapa

presenta una peculiar tolerancia a la contaminación con hidrocarburos y que efectivamente pueden removerlos si las concentraciones son iguales o inferiores a 10.000 mg/Kg, al igual que la adaptación de los microorganismos.

Finalmente, en el año 2011, Moreira et al., usaron la *Rizophora mangle L.* para la fitorremediación de los sedimentos de manglares contaminados por la persistencia de hidrocarburos totales de petróleo y después de 90 días, observaron remociones del 87%, y que estas eficiencias se presentaron a medida que la población de microorganismos presentes en la rizosfera, también aumentaba, permitiendo concluir que la fitorremediación es una buena alternativa para la degradación de hidrocarburos en las zonas de manglares.

Estudios realizados demostraron que el análisis de hidrocarburos totales (TPH) por si solos no identifican los compuestos o el riesgo asociado con los contaminantes, incluyendo su toxicidad, movilidad, contacto con el hombre y con el medio ambiente, ya que una concentración de TPH puede contener diferentes compuestos y por lo tanto constituir diferentes riesgos (Roberts, 2000).

La aplicación de aire o bioventing, es una técnica eficiente para degradar hidrocarburos presentes en el suelo, se recomienda complementar con aplicaciones de nutrientes para bioestimular la actividad de los microorganismos indígenas. El oxígeno aplicado actúa sobre la zona vadosa degradando los hidrocarburos del petróleo a través de un proceso aerobio. (Khan, 2004), Afirmación que ya había sido corroborada utilizando biopilas de compos contaminadas con aceite diesel, donde se logró disminuir la concentración de 2400 mg a 700 mg (kg de peso seco), en 5 meses de estudio, además se concluyó que se logra mayor degradación de hidrocarburos presente en el suelo, en la medida en que se pueda bioaumentar la población nativa aplicando nutrientes, dado que en el suelo existe bacterias indígenas capaces de degradar los compuestos derivados del petróleo, sin necesidad de recurrir al uso de inóculos comerciales o a introducir al área contaminada microorganismos foráneos. (Jürgensen K., 1999)

Investigación realizada en la provincia de Liaoning (China) por 12 semanas, se demostró que suelos contaminados con aceite crudo, se pueden biorremediar utilizando fertilizantes inorgánicos para bioestimular los microorganismos, con lo que se logró

aumentar la población de bacterias autóctonas. La metodología utilizada consistió en el uso de un bioportador de microorganismos escala laboratorio, que funcionaba aprovechando las propiedades porosas y granulométricas de la cascara de maní pulverizada, se utilizó fertilizante  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , las bacterias se bioaumentaron usando muestras de suelo contaminado con aceite crudo depositadas sobre el bioportador, las cuales se removían cada dos días para simular la aplicación de aire, durante este periodo se lograron remociones entre el 26 y 61%. (Xu. Y. y Lu, 2010).

En Ontario – Canadá en el 2009, utilizaron siete suelos de diferentes características de textura y contenido de materia orgánica, a las cuales se adicionó nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , para determinar la correlación existente entre la constante de biodegradación de hidrocarburos totales (TPH) con las características de los suelos objeto de investigación, se utilizó gasolina sintética como contaminante para todas las pruebas. Se introdujo cada muestra en un respirómetro al cual se insertó un tubo para proporcionar oxígeno, igualmente se adicionó 30 ml de hidróxido de potasio (KOH). Los resultados indicaron que la tasa de biodegradación es constante medida en función de la concentración de gasolina, estudios con resultados similares fueron demostrados por (Del'Arco, 2001). Del estudio se puede concluir que la concentración de hidrocarburos totales (TPH) bajo los parámetros estudiados no afectó la constante de velocidad de degradación. (Ewazi M., 2009)

Estudios realizados en la Universidad Santa Catarina (Florianapolis – Brasil), para evaluar la capacidad de las gramíneas *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* y *Paspalum notatum* para adaptarse a suelos contaminados con diferentes concentraciones de diesel. El experimento se realizó por 10 semanas contemplando también la cuantificación del número de unidades formadoras de colonia (CFU), al final del experimento se demostró que la semilla de *Brachiaria brizantha* es tolerante a la concentración de diesel, dado que no evidenció efecto perjudicial germinando después de 7, 14 y 21 días, las otras dos especies no mostraron el mismo grado de tolerancia, dado que se evidenció una disminución significativa de la raíz y de la biomasa de los brotes, comparado con investigaciones realizadas por (Adam G., 2002) y (Kechavarzi C., 2007) donde encontraron resultados similares. En cuanto a las unidades formadoras de colonia (CFU) los resultados de la investigación se asemejan a los encontrados por (Jones, 2004), donde el número de bacterias en un suelo contaminado fue siete veces

mayor que las encontradas en el suelo sin contaminar, debido a la fuente de carbono es mayor donde hay concentraciones altas de hidrocarburos (Mezzari M. P., 2001).

## **3. CAPÍTULO 3**

### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

En este capítulo se presenta la metodología por fases que fue empleada para desarrollar cada uno de los objetivos propuestos en la investigación.

#### **FASE 1. Selección de estrategias de biorrecuperación**

##### **3.1.1 Determinación de estrategias de biorrecuperación**

Para la determinación de las estrategias de biorrecuperación a emplear se realizó la revisión y sistematización de información sobre estudios realizados a nivel internacional y nacional para biorrecuperar sedimentos y suelos contaminados con hidrocarburos. Los estudios fueron identificados a través de la revisión de literatura en bases de datos como Science Direct con los términos “Diesel oil”, “polycyclic aromatic hydrocarbons”, “bioremediation”, “oil-contaminated soil”, “composting”, “remediation” entre otros.

Después de revisar los artículos y demás documentos consultados, se determinaron las estrategias de biorrecuperación. Para evaluar la degradación de hidrocarburos totales (HCT) presentes en el sedimento que se genera en la estación de servicio TEXACO No. 27, se determinaron dos (2) estrategias de biorremediación, una fue el uso de plantas de *Helianthus annuus* como organismo fitorremediador y la otra fue el uso de unidades de tratamiento de lecho (UTL) con aplicación manual de aire para oxigenar el sedimento y aumentar la actividad de las poblaciones microbianas.

## **FASE 2. Diseño del experimento**

### **3.1.2 Diseño experimental**

Para resolver el problema y comprobar la hipótesis planteada, se realizó una investigación de tipo experimental donde se tuvo en cuenta la variable de respuesta y las variables del experimento a controlar, analizando los niveles y los tratamientos del experimento, para decidir finalmente el diseño estadístico que se aplicará.

#### **3.1.2.1 Factores**

Para la evaluación de la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos que se generan en la estación de servicio TEXACO No. 27, se determinó como factor la ***biorrecuperación*** de dicho sedimento, dado que es la variable a evaluar o de respuesta.

#### **3.1.2.2 Niveles**

Para determinar los tipos o grados específicos del factor, se determinaron dos niveles:

- Efecto de la fitorremediación (*Helianthus annuus*) en la degradación de hidrocarburos presentes en los sedimentos generados en las estaciones de servicio
- Efecto de la unidad de tratamiento en lechos (UTL) en la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos generados en las estaciones de servicio.

#### **3.1.2.3 Tratamientos**

Los tratamientos fueron el resultado de multiplicar el factor por los niveles, para la presente investigación se obtuvieron dos (2) tratamientos. Para mejorar el grado de precisión en el experimento se realizó una réplica, basado en que el material experimental es homogéneo y no presentaba variabilidad alguna y además por el tamaño de las unidades experimentales. En la Tabla 3 se presentan los factores, niveles y tratamientos determinados en el diseño experimental.



**Tabla 3.** Factores, niveles y tratamientos

Factor	Niveles		Tratamientos
	Tipo	Nº	
Biorrecuperación	Fitorremediación	1	2
	UTL	1	

### 3.1.2.4 Variable de respuesta

Para la biorrecuperación de los sedimentos contaminados con hidrocarburo, se identificó el parámetro dependiente sobre el cual se midió la variación de la concentración en el tiempo. Para la presente investigación se determinó como variable de respuesta los **hidrocarburos totales** presentes en los mencionados sedimentos.

### 3.1.2.5 Variables de control

La cuantificación de la variación de la concentración de los hidrocarburos totales se determinó teniendo en cuenta tres (3) variables de control (Tabla 4):

**Tabla 4.** Variables de respuesta y de control

Variables	
Respuesta	Control
Hidrocarburos totales	Temperatura
	% de humedad
	pH

### 3.1.2.6 Diseño estadístico

Dadas las características del experimento, el diseño estadístico para la presente investigación corresponde a un modelo matemático factorial con asignación completamente al azar, siendo la variable de respuesta a analizar los hidrocarburos totales (ver Ecuación  $Y_{ijklm} = \mu + B_{ijkl} + \epsilon_{ijklm}$  (1)).

$$Y_{ijklm} = \mu + B_{ijkl} + \epsilon_{ijklm} \quad (1)$$

Dónde

Y: Variable de respuesta HTC

ij: Fitorremediación

km: Unidad de tratamiento en lecho (UTL)

$\mu$ : Promedio total del experimento

Bijkl: Biorrecuperación

$\epsilon_{ijklm}$ : Error experimental

### 3.1.2.7 Hipótesis

a)  $H_0$ :

$$\mu_{Bi} = \mu_{Bj} = \mu_{Bk} = \mu_{Bl} \quad \text{Vs} \quad \mu_{Bi} \neq \mu_{Bj} \neq \mu_{Bk} \neq \mu_{Bl}$$

- **Hipótesis nula ( $H_0$ ):** No existen diferencias significativas entre las medias de los niveles
- **Hipótesis alternativa ( $H_a$ ):** Existen diferencias significativas entre algunas o todas las medias de los niveles.

b)  $H_0$ :

$$B_i = B_j = B_k = B_l \quad \text{Vs} \quad H_a: B_i \neq B_j \neq B_k \neq B_l$$

- **Hipótesis nula ( $H_0$ ):** No existen diferencias significativas entre los niveles de la biorrecuperación, para la degradación de hidrocarburos
- **Hipótesis alternativa ( $H_a$ ):** Existen diferencias significativas entre los niveles de la biorrecuperación para degradar hidrocarburos.

## **FASE 3. Diseño y construcción de unidades experimentales**

### **3.1.3 Construcción de unidades experimentales**

#### **3.1.3.1 Acondicionamiento de semillas de *Helianthus annuus***

Previo a la construcción y montaje de las unidades experimentales, se multiplicaron las semillas de *Helianthus annuus* en los germinadores del vivero de la CRC. Las plántulas se dejaron germinar durante 18 días y pasado este tiempo se trasplantaron a bolsas de polietileno que contenían como sustrato sedimento contaminado.

#### **3.1.3.2 Construcción de unidades experimentales**

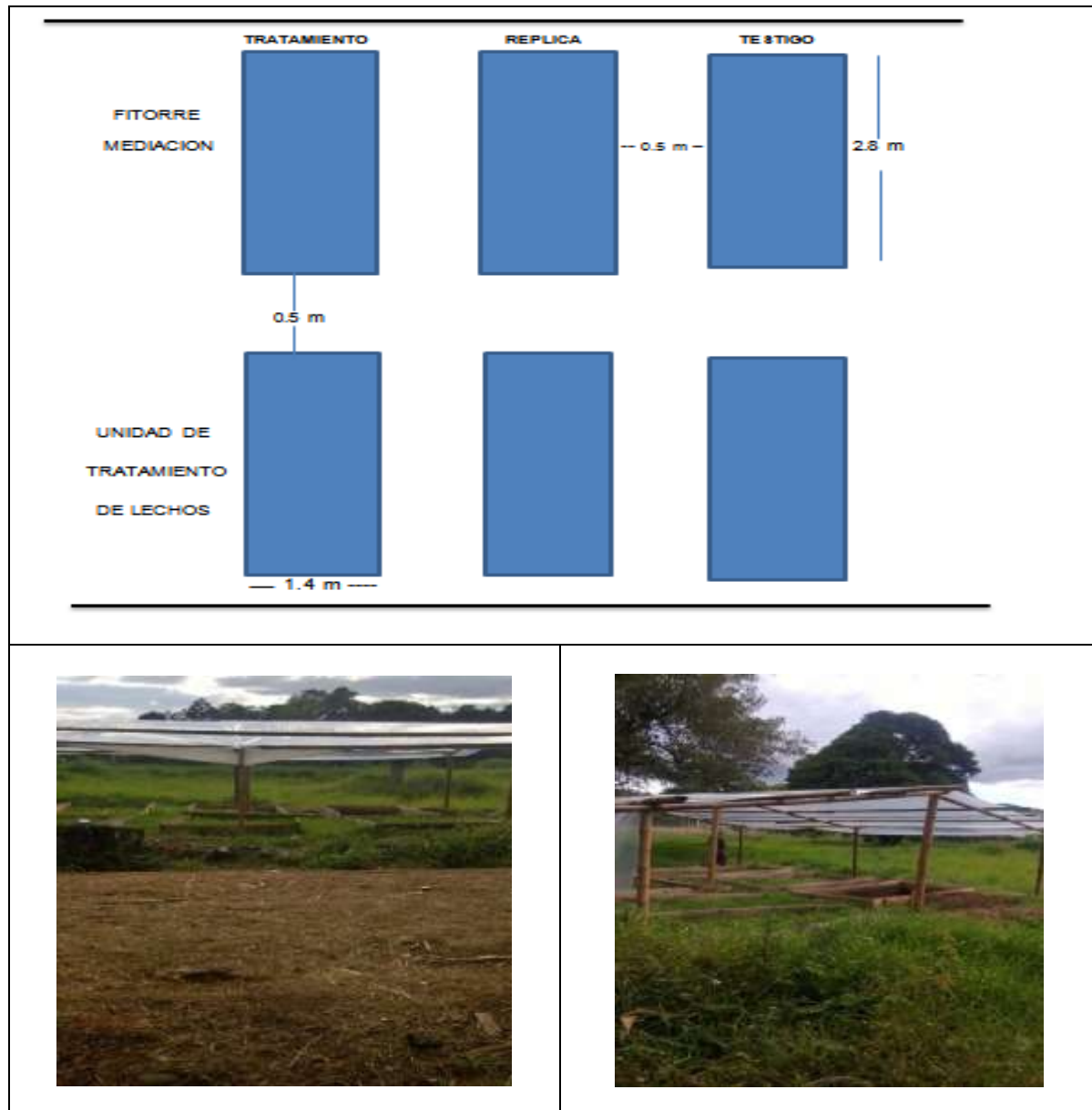
Para la construcción de las unidades experimentales se utilizaron los siguientes materiales:

- Sedimento contaminado recolectado en la estación de servicio TEXACO No. 27
- Semilla de *Helianthus annuus* de tipo comercial
- Tablas de madera
- Guadua
- Plástico transparente calibre 12
- Tubería sanitaria 2"
- Plástico negro de alta densidad calibre 40
- Herramientas de construcción y jardinería

Los sedimentos contaminados utilizados fueron extraídos de la trampa de grasas de la estación de servicio TEXACO No. 27 del Municipio de Popayán (Cauca), que recoge las aguas residuales del área de distribución de combustible y del área de lavado de automotores; los sedimentos son acopiados en un lecho de secado al cual no le hacen ningún tipo de tratamiento. La recolección se realiza cada semana cuando se hace el mantenimiento de la trampa de grasas, los sedimentos de mayor tiempo se depositan a un lado del lecho de secado, para dar espacio a los recién recolectados, finalmente son entregados a la empresa “Juanchito grasas” que los transporta hasta el Valle donde son incinerados.

En la Gráfica 1 se muestra el diseño y la distribución de las unidades experimentales empleadas para el estudio.

**Gráfica 1.** Diseño de unidades experimentales



## ▪ Fitorremediación

Para el proceso de fitorremediación se hicieron 3 excavaciones sobre la superficie del suelo de 2.8 m. X 1.4 m. X 0.25 m., separadas 0.5 metros una de otra y se protegieron los taludes con madera. Dado que el análisis de suelo, arrojó un resultado de textura arenosa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se empleó suelo arcilloso para construir sobre el fondo de la unidad una franja compacta de 10 cm de espesor que impidiera la contaminación cruzada a causa del desplazamiento interno del contaminante.

De las tres unidades construidas correspondieron a una unidad de tratamiento, una de réplica y un testigo.

A continuación se llenaron las tres unidades de tratamiento con 0.98 m<sup>3</sup> de sedimento proveniente de la estación de servicio TEXACO No.27 y 147 kg de materia orgánica compostada, los cuales se mezclaron para garantizar la distribución uniforme de los productos en toda el área, así, las tres unidades se llenaron con la misma mezcla del sedimento y la materia orgánica

Finalmente se realizó la siembra de las plantas de *Helianthus annuus*, en la unidad de tratamiento y en la réplica, estableciendo 28 plantas en cada unidad experimental (Foto 1).

**Foto 1.** Diseño final módulo para Fitorremediación



- **Unidad de tratamiento en lechos**

Contiguo a las unidades para fitorremediación se construyeron las unidades de tratamiento de lechos (Gráfica 1). Se separaron 0.5 metros uno de otro y se construyeron con dimensiones idénticas a las utilizadas para el establecimiento de las plantas de *Helianthus annuus* (1.4 m X 2.8 m X 0.25 m) pero con diferencias en cuanto a la pendiente que fue del 4%.

**Foto 2.** Diseño final unidad de tratamiento de lechos (UTL)



El piso de cada unidad se protegió con una película de polietileno de alta densidad calibre 40 mills, para evitar que el lixiviado entrara en contacto con el suelo y provocara contaminación cruzada. Sobre la película plástica se instaló un tubo de PVC de 2" y de 3.5 metros de longitud, perforado manualmente con broca en el tramo que se ubica dentro del módulo, este sector del tubo se protegió con geomembrana para evitar taponamientos, después del final de la unidad experimental, quedó una sección de 0.7 metros la cual no se perforó pero permitió transportar el lixiviado a un recipiente (Foto 3).

**Foto 3.** Manejo de lixiviados en la unidad de tratamiento de lechos (UTL)



Seguidamente se llenaron los pilotos de investigación con 0.98 m<sup>3</sup> de sedimento proveniente de la estación de servicio TEXACO No.27, 147 kg de materia orgánica compostada, se mezclaron para garantizar la distribución uniforme de los productos en toda el área del piloto. El testigo fue llenado con la mezcla del sedimento más materia orgánica en las proporciones antes citadas de igual manera que para las unidades de fitorremediación.

- **Aplicación manual de aire**

Tanto en el tratamiento como en la réplica de la UTL, se mezcló el sedimento de manera manual para proporcionar la aireación necesaria y optimizar la actividad microbiológica. El proceso de oxigenación del sedimento se realizó cada ocho (8) días por espacio de 25

minutos

(



Foto 4).

**Foto 4.** Aplicación manual de aire

#### ▪ **Aplicación de agua a los módulos de investigación**

La cantidad de agua necesaria para mantener en los pilotos un contenido de humedad entre el 20 y 60%, se calculó utilizando el método gravimétrico (Zagal, 2007) de la siguiente manera:

- Se llevó el sedimento del piloto a estrés hídrico o límite mínimo de humedad, permitiendo que el agua fuera retenida firmemente por la matriz del suelo o sedimento, siendo imposible se evapore o sea absorbida por las raíces de las plantas secando al máximo la humedad presente en el sedimento,
- Se aplicaron al piloto 40 litros de agua (cantidad que permitió determinar al tacto la capacidad de campo (50%) presente en el sedimento, el cual se desmorona pero se aglutina al ser presionado),
- A los 3 días se determinó en el laboratorio el porcentaje de humedad, utilizando el método gravimétrico
- Cada 3 días se irrigan los pilotos con la cantidad de agua perdida resultado del análisis

Las ecuaciones empleadas de acuerdo al método gravimétrico para determinar la humedad se presentan a continuación:

$$W(\%) = \frac{\text{Peso de suelo humedo} - \text{Peso de suelo seco}}{\text{Peso de suelo seco}}$$

$$W(\%) = \frac{\text{Peso del agua}}{\text{Peso de suelo seco}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%h = \frac{P_i - P'}{P'} \quad (3)$$

Dónde:

**W (%) = %h**

**%h=** Porcentaje de humedad

**P<sub>i</sub>=** Peso inicial (g)

**P'=** Peso seco de la muestra (g)

- **Ajuste del volumen de agua a aplicar cada 3 días**

De acuerdo a la cantidad de humedad perdida en cada una de las unidades experimentales se aplicó esta misma cantidad de agua cada 3 días según la información de la Tabla 5.

**Tabla 5.** Cantidad de agua aplicada y volteo manual de UE en los UTL

Días de la semana	Actividad	Cantidad de agua a aplicar
Lunes	Irrigación de las unidades experimentales	4lts
Miércoles		4lts
Viernes		4lts

## FASE 4. Determinación de remoción de hidrocarburos

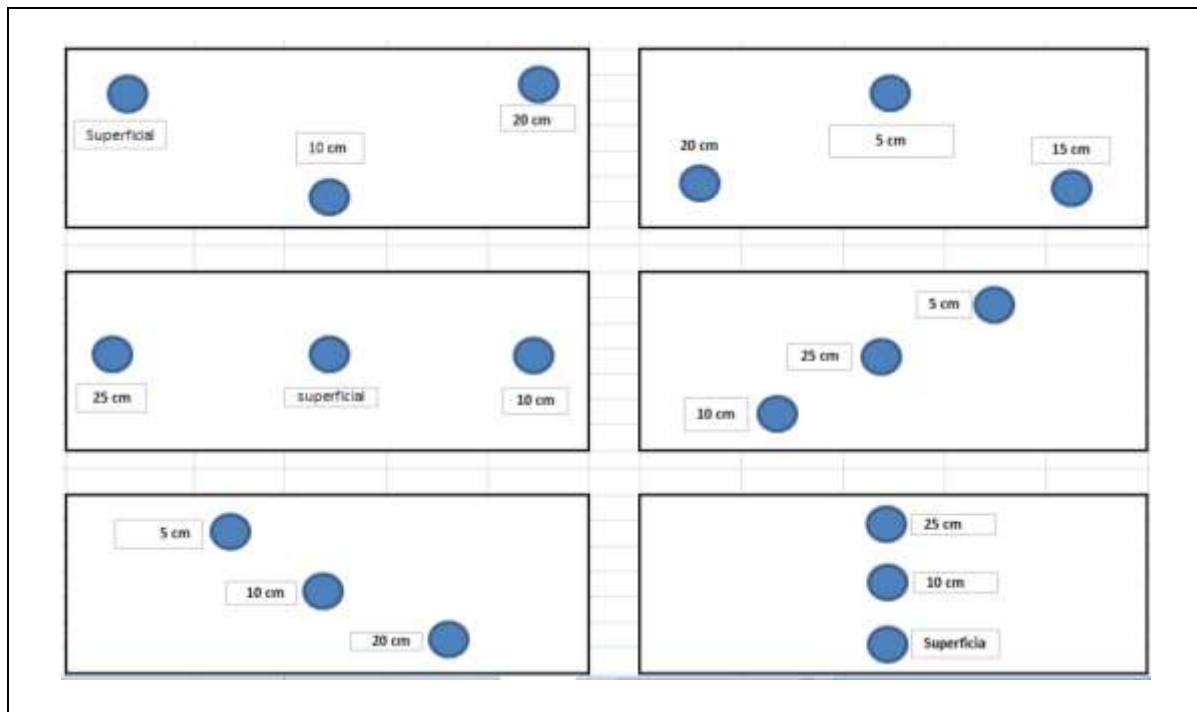
### 3.1.4 Monitoreo a unidades experimentales

#### 3.1.4.1 Recolección de muestras

Para determinar la remoción de hidrocarburos se recolectaron muestras cada 15 días en cada una de las unidades experimentales. La recolección se realizó tomando tres (3) muestras a diferentes profundidades en cada unidad experimental, las cuales se mezclaron y depositaron en bolsas plásticas esterilizadas y rotuladas (muestreo compuesto). De cada unidad experimental se analizaron los parámetros de humedad (%), temperatura (°C), pH y remoción de hidrocarburos. Las profundidades a las cuales se realizaron los muestreos en cada una de las UE se presentan en la

Gráfica 2.

Gráfica 2. Muestreo compuesto



### 3.1.4.2 Medición de parámetros

- **Humedad**

**Para la determinación del porcentaje de humedad se emplearon 20 gramos de sedimento, una balanza analítica, un beaker de 100 cc., y una espátula (**

Foto 5).

Los 20 gramos de sedimento se secaron en un horno a 105°C durante 24 horas. El contenido de humedad con base en peso se determinó mediante el uso de una balanza teniendo en cuenta el peso de la muestra húmeda y el peso del sedimento seco. Finalmente el contenido de agua en el sedimento es la cantidad almacenada en el sedimento después de haber sido sometido a alta temperatura. Los cálculos se determinaron por medio de las ecuaciones 2 y 3 (Zagal, 2007).

**Foto 5.** Materiales empleados para determinar humedad



- **Temperatura:**

Para determinar la temperatura de las muestras de sedimentos se empleó un termómetro de calibración. Previo a la medición se realizó la calibración del termómetro y posteriormente se realizó la determinación directa de la temperatura sobre la muestra de sedimento (Foto 6).

**Foto 6.** Medición de temperatura



- **pH**

El pH de las muestras se determinó por el método potenciométrico. Se mezclaron 10 gramos de suelo con 40 c.c. de agua des-ionizada en un beaker de 100 c.c., al cual se le adicionó un imán recubierto de plástico que permite al ser colocado sobre el agitador crear un campo magnético mezclando así homogéneamente la solución, esta operación se repitió cuatro (4) veces, cada 15 minutos, el tiempo de agitación se mantuvo por una (1) hora. Una vez agitada la muestra se realizó la lectura del pH directamente sobre la suspensión utilizando el peachimetro (

Foto 7).

**Foto 7.** Medición del pH**▪ Hidrocarburos totales (HCT):**

Los HCT se determinaron mediante el método de extracción por reflujo SOXHLET, utilizando hexano como disolvente orgánico cuyo procedimiento se describe a continuación:

**Preparación de la muestra**

Para realizar el procedimiento las muestras fueron secadas y molidas antes de ser sometidas a la extracción por reflujo, para lo cual se usó espátula, mortero, papel aluminio y frascos de vidrio de 30 ml.

**Procedimiento**

- Se tomaron 10 gr de la muestra y se extendió sobre papel aluminio durante 48 horas y a la sombra.
- Utilizando el mortero se molió la muestra hasta obtener partículas finas
- La muestra seca y molida se depositó en un frasco de vidrio seco y limpio, uno para cada muestra.



### **Extracción de hidrocarburos por reflujo (Soxhlet)**

Para la extracción de HCT se realizó empleó hexano como disolvente orgánico, con este método de extracción se buscó asegurar el contacto de la matriz de la muestra con el disolvente. Para la óptima extracción de los compuestos, el suelo se secó y pulverizo en partículas pequeñas para asegurar un mejor contacto, se evaporó el solvente al final de la prueba y el extracto se cuantifico gravimétricamente (EPA 3540C., 1996).

Los material y equipos empleados para el procedimiento fueron: Equipo de reflujo Soxhlet de 250 ml, perlas de ebullición, cartuchos de celulosa o fibra de vidrio, balanza analítica, vaso de precipitados 250 ml, viales y espátula. En cuanto a los reactivos se emplearon sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y hexano.

### **Procedimiento**

- Se colocaron 10 gramos de sedimento seco y finamente molido en un cartucho de celulosa
- Se adicionó al sedimento hexano en una relación 1:1, mezclándolos uniformemente.
- El cartucho con el contenido las muestras se ubicó dentro de la columna extractora del equipo Soxhlet.
- Se adicionaron 5 ml de hexano en el matraz de bola y se colocaron suficientes perlas de ebullición para evitar la proyección del solvente al calentarse.
- Se ensambló el equipo Soxhlet e inició el calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 45°C.
- Se mantuvo el reflujo en estas condiciones durante 8 horas, ocurriendo entre 6 y 8 reflujos por hora, lo que permitió la liberación de los analitos.
- Posteriormente se pasó el matraz bola por el rotoevaporador llevando el extracto orgánico a sequedad.
- Finalmente se recuperó el concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación por método gravimétrico.

### Cuantificación de hidrocarburos totales

Para la cuantificación de HCT se emplearon matraces de bola de 250 ml, rotoevaporador, viales o tubos de vidrio de 25 ml, balanza analítica y pinzas.

### Procedimiento

- Se llevó a peso constante el recipiente (matraz de bola) donde se colocó luego el extracto orgánico obtenido, colocando el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas, colocándolo luego en un desecador donde se enfrió, seguidamente se pesó y se instaló nuevamente dentro de la estufa, se repitió el procedimiento hasta que el peso no cambió, anotando el peso del recipiente.
- Una vez que el extracto orgánico obtenido estuvo en el matraz de bola, se hizo la evaporación total del solvente (hexano) en un rotoevaporador 740 ± 50 mbar y 45°C hasta sequedad.
- Se pesó nuevamente el matraz, anotando el peso.

### Cálculos

La determinación final de HCT se realizó a través de la ecuación 4.

$$\text{HCTs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}) \quad (4)$$

Dónde:

**HCTs** (mg kg<sup>-1</sup> de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kgde suelo seco.

**RA**= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

**RB** = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

**P** = cantidad de suelo extraído (g).

**FH** = factor de corrección de humedad (1- (%humedad/100)).

**FC** = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

**Foto 8.** Materiales y procedimiento para obtención de HCT

En la Foto 6 se presentan los parámetros descritos anteriormente, el método de medición y la frecuencia.

**Tabla 6.** Parámetros y métodos de medición

Parámetro	Método	Frecuencia
pH	Potenciométrico	Cada 15 días
Temperatura	Termómetro de calibración	
Hidrocarburos totales	Gravimétrico	
Porcentaje de humedad	Gravimétrico	
Aireación	Volteo manual (pala)	Cada 8 días

## FASE 5. Evaluación del potencial biorremediador

### 3.1.5 Comparación entre la Fitorremediación y las Unidades de Tratamiento en Lechos (UTL)

Después de realizar la recolección de las muestras de sedimento y medición de los parámetros se realizó la evaluación de cada tratamiento para comparar los resultados obtenidos.

La investigación tuvo una duración de 5 meses comprendidos entre febrero y junio de 2015. Estableciendo seis (6) unidades experimentales; 3 para el tratamiento de fitorremediación y 3 para las UTL.

Con los resultados obtenidos de los diferentes parámetros evaluados, se calculó la remoción de HCT teniendo en cuenta el valor inicial del sedimento obtenido en la estación de servicio. Se determinó el valor acumulado en el piloto y el correspondiente porcentaje de remoción. Este procedimiento se realizó para cada una de las unidades experimentales.

#### 3.1.5.1 Análisis estadístico

Para comparar las eficiencias de remoción entre el tratamiento con fitorremediación y el tratamiento con las unidades de lechos se realizó el análisis estadístico con el software SPSS. Se realizaron diferentes test para comparar los valores de remoción y las

diferencias los dos tratamientos empleados para de esta manera establecer el tratamiento más eficiente en cuanto a remoción de HCT de sedimentos.

## 4. CAPÍTULO 4

### 4.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 4.1.1 Caracterización del sedimento

Los resultados de laboratorio para determinar las características físicas, químicas y biológicas del sedimento recolectado en la estación de servicio Texaco N° 27 se presentan la Tabla 7. Esta caracterización determinó que los HCT presentan una concentración inicial de 7780 ppm.

**Tabla 7.** Caracterización del sedimento estación de servicio Texaco N° 27

Parámetro	Unidades	Valor
Hidrocarburos totales	ppm	7780
Humedad	%	29.4
Carbono orgánico	%	1.13
pH	-	7.22
Densidad aparente	gr/cm <sup>3</sup>	1.31
C.E.	dS/m	0.262
C.I.C.	cmo/kg	15.76
Nitrógeno	%	0.1
Fosforo	mg/kg	16.85
Potasio	me/100g	0.22
Calcio	me/100g	14.42
Magnesio	me/100g	0.92
Azufre	mg/kg	56.71
Temperatura	°C	20.7
Textura	-	Arenosa

El rango de temperatura en que el hidrocarburo se degrada con mayor efectividad está entre 18°C y 30°C (Pardo J., 2004), el resultado de laboratorio indica que el sedimento presenta una temperatura de 20.7°C, condición que tendría efecto sobre la naturaleza física y química de los hidrocarburos y sus derivados. De igual manera, la temperatura del sedimento favorece la velocidad de degradación de los hidrocarburos a través de la actividad microbiana por el favorecimiento de su actividad enzimática y celular (Al, 2008).

El rango de pH donde mayormente se ve favorecida la degradación de hidrocarburos está en el rango de 6 a 8 unidades (Ríos, 2005). El resultado del pH de 7.22 unidades evidenciado en los análisis de laboratorio, indica que el crecimiento de bacterias se ve favorecido y ayudarían a una mayor degradación de hidrocarburos, dado que en asocio con condiciones adecuadas de temperatura y humedad se incrementará su población.

La humedad del sedimento es de 29.4%, valor que lo ubica dentro del rango ideal de 20% y 75% para degradar hidrocarburos establecido por (Al, 2008), condición que favorece el transporte de nutrientes y permite mantener el oxígeno en condiciones normales ayudando a una buena aireación del mismo.

En cuanto a las características de la materia orgánica empleada para acondicionar los sedimentos con hidrocarburos se obtuvieron los datos presentados en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Caracterización de la materia orgánica compostada adicionada a las unidades experimentales

Parámetro	Unidades	Valor
Humedad	%	15.7
Cenizas	%	32.9
Carbono orgánico	%	21.2
pH	-	8.5
Densidad aparente	gr/cm <sup>3</sup>	0.48
C.E.	dS/m	16.2
Retención de humedad	%	168
C.I.C.	me/100g	43.9
Relación C/N	-	10
Nitrógeno	%	2.04
Fosforo	%	6.4
Potasio	%	3.6
Calcio	%	8.63

---

Magnesio	%	2.08
Azufre	%	0.8

La mezcla de los sedimentos con hidrocarburos y materia orgánica compostada permitió aumentar la cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento de las plantas en las unidades experimentales de fitorremediación y UTL.

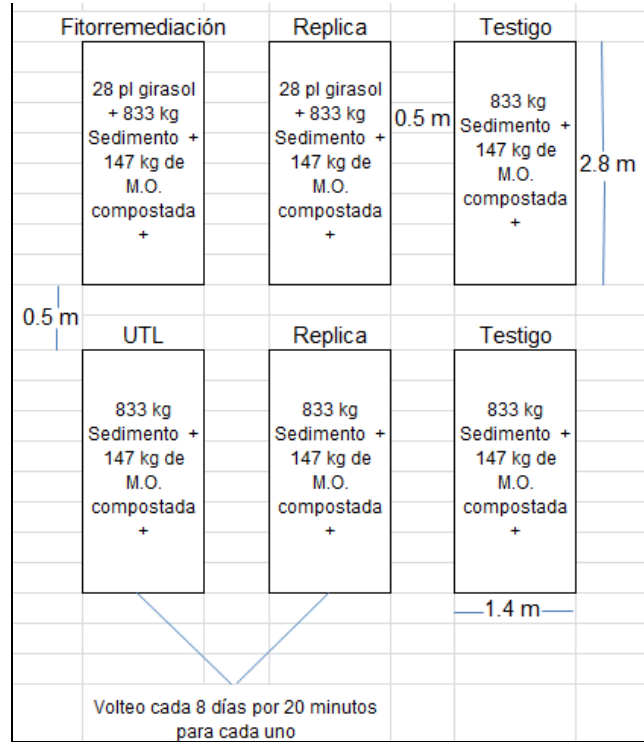
Tenido en cuenta la caracterización de sedimento presentada en la Tabla 7, el aporte de materia orgánica compostada incrementó el contenido de carbono orgánico ya que para el sedimento tan solo era de 1,13% mientras que el compost aporta un 21,2% (Tabla 8) lo que garantizó en el caso del tratamiento con *Helianthus annuus* que el desarrollo de las plántulas fuera exitoso. De igual manera, con la mezcla de compost se realiza un aporte importante de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio.

#### **4.1.2 Establecimiento de unidades o pilotos de investigación**

De acuerdo al diseño propuesto en la metodología sobre el tamaño, separación y contenido (Gráfica 3) se construyeron los pilotos de investigación en las instalaciones del vivero de la CRC.

**Gráfica 3.** Distribución y contenido de los pilotos de investigación





Para la utilización de las plantas en las unidades experimentales se realizó la multiplicación de las semillas de *Helianthus annuus* en los germinadores del vivero de la CRC y el sustrato empleado para la germinación fue el sedimento de la estación de servicio con hidrocarburos. Esta fase se llevó a cabo por un periodo de 18 días donde se observó que las plántulas se adaptaron al contenido de hidrocarburos de los sedimentos ya que su desarrollo y crecimiento fue normal. El desarrollo vegetativo observado permitió determinar que la especie *Helianthus annuus* soporta concentraciones altas de hidrocarburos totales provenientes de estaciones de servicio y puede ser empleada para procesos de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos por medio de fitorremediación.

### 4.1.3 Evaluación de parámetros y remoción de hidrocarburos totales

#### 4.1.3.1 Fitorremediación

Los resultados obtenidos durante el seguimiento y monitoreo del proceso de biorrecuperación de sedimentos con fitorremediación se presentan en la Tabla 9,

Tabla 10 y Tabla 11.

**Tabla 9.** Resultados de remoción de HCT en la unidad de fitorremediación

Fecha	<i>Helianthus anuss</i> PF1					
	Temperatura °C	Humedad %	pH	Hidrocarburos totales (HCT)		
				Remoción por muestreo (ppm)	Acumulado en el piloto (ppm)	Remoción por muestreo (%)
17/03/2014	Siembra					
31/03/2014	20.8	36.6	7.96	494	7,286	6.34
14/04/2014	20.9	38.2	7.88	527	6,759	6.77
28/04/2014	21.0	39.0	7.76	727	6,032	9.34
12/05/2014	20.2	34.7	7.7	996	5,036	12.8
26/05/2014	21.2	35.1	7.76	1238	3,798	15.9
09/06/2014	21.5	38,9	7.81	1688	2110	21.7
<b>Total acumulado</b>				<b>5670</b>		<b>72.85</b>

**Tabla 10.** Resultados de remoción de HCT en la réplica de la unidad de fitorremediación

Fecha	<i>Helianthus anuss</i> PF2 (Replica)					
	Temperatura °C	Humedad %	pH	Hidrocarburos totales (HCT)		
				Remoción por muestreo (ppm)	Acumulado en el piloto (ppm)	Remoción por muestreo (%)
17/03/2014	Siembra					
31/03/2014	20.4	41.2	8.07	406	6,898	5.21
14/04/2014	20.5	37.3	7.92	439	5,873	5.6
28/04/2014	20.8	39.2	7.92	771	4,271	9.9
12/05/2014	20.8	39.0	7.88	991	2876	12.7
26/05/2014	21.0	38.8	8.3	1379	1392	17.7
09/06/2014	21.4	39.4	8.1	1708	210	21.9
<b>Total acumulado</b>				<b>5694</b>		<b>73</b>

**Tabla 11.** Comportamiento de HCT en la unidad experimental testigo

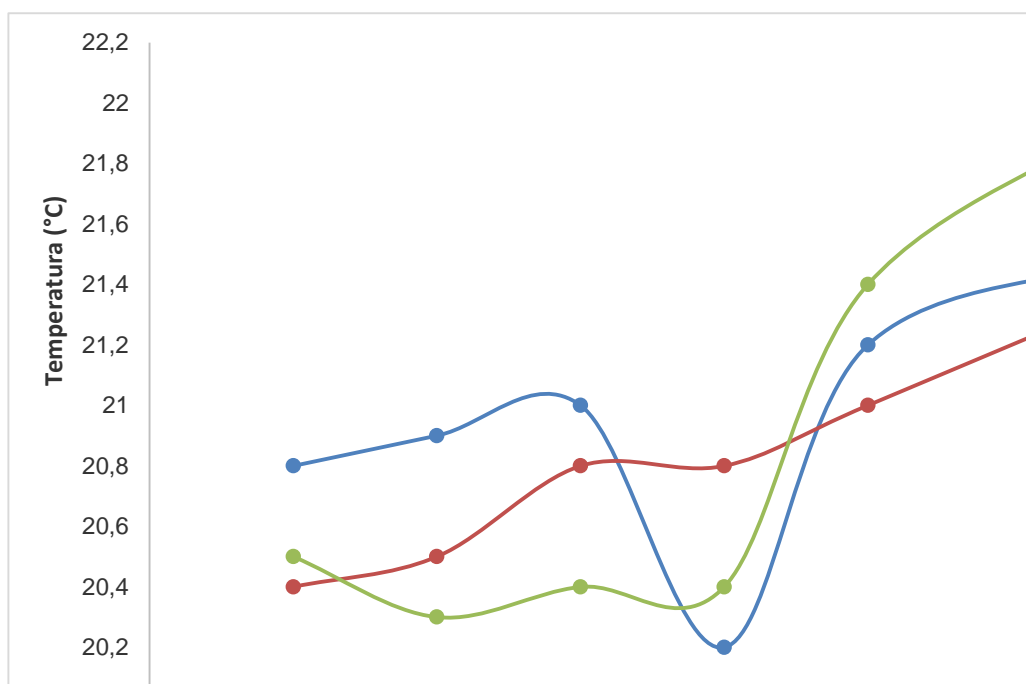
Fecha	Testigo PF3					
	Temperatura °C	Humedad %	pH	Hidrocarburos totales (HCT)		
				Remoción por muestreo (ppm)	Acumulado en el piloto (ppm)	Remoción por muestreo (%)
17/03/2014	Inicio					
31/03/2014	20,5	39.8	7.96	115	7895	1.5
14/04/2014	20.3	37.3	7.97	176	7719	2.3
28/04/2014	20.4	38.2	7.88	159	7560	2.0
12/05/2014	20.4	38.8	7.79	289	7271	3.7
26/05/2014	21.4	43.4	7.69	271	7000	3.5
09/06/2014	22.0	33.2	7.96	302	6698	3.9
<b>Total acumulado</b>				<b>1312</b>		<b>16,9</b>

El análisis de la temperatura, humedad, pH y remoción de hidrocarburos se presenta a continuación.

#### ▪ Comportamiento de la temperatura

La temperatura afecta a las tasas a las que los diversos mecanismos de Fitorremediación tienen lugar. El metabolismo de los microorganismos, la actividad enzimática y celular dependen de la temperatura, así mismo esta influye en los cambios estructurales y químicos del petróleo (Gomez, Romero, 2008) ; por lo anterior y teniendo en cuenta que la investigación fue *in situ* razón, se trató de conservar la temperatura promedio del sedimento en condiciones normales.

#### **Gráfica 4.** Comportamiento de la temperatura en el tratamiento de fitorremediación

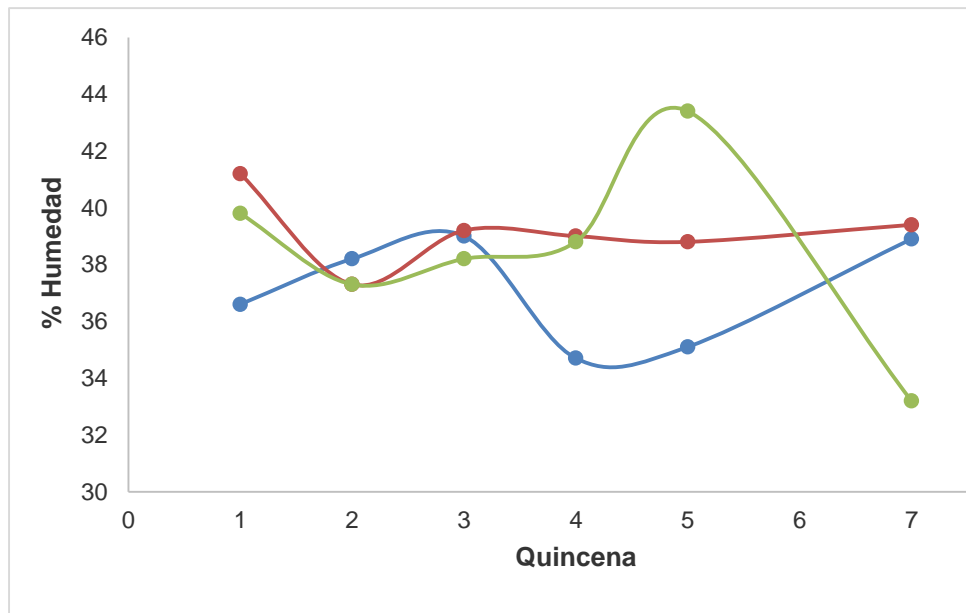


En el gráfico anterior se observa que la temperatura del sedimento en los 3 tratamientos osciló entre 20 y 22 °C a lo largo del periodo de la investigación, esto es causado por las condiciones climáticas del sitio del experimento (promedio de temperatura 21 °C, sin influencias de estaciones). No se detectó efectos significativos en las unidades experimentales.

#### ▪ Comportamiento de la humedad

Cuando el sedimento se satura con agua, el oxígeno se agota y los procesos metabólicos de las raíces y su crecimiento cesa. Dado que la humedad es un factor determinante para promover la degradación de hidrocarburos, se estableció la necesidad de mantener una humedad del orden del 20 - 75 % de la capacidad de campo, por tanto, se calculó el contenido de humedad del sedimento de acuerdo a la capacidad de campo del mismo (25 y 45%) y como se encontró en el rango sugerido (20 y 75%), se procuró mantener estas condiciones durante todo el experimento como se muestra en la Gráfica 5 y así poder generar condiciones estables.

**Gráfica 5.** Comportamiento de la humedad en el tratamiento de fitorremediación

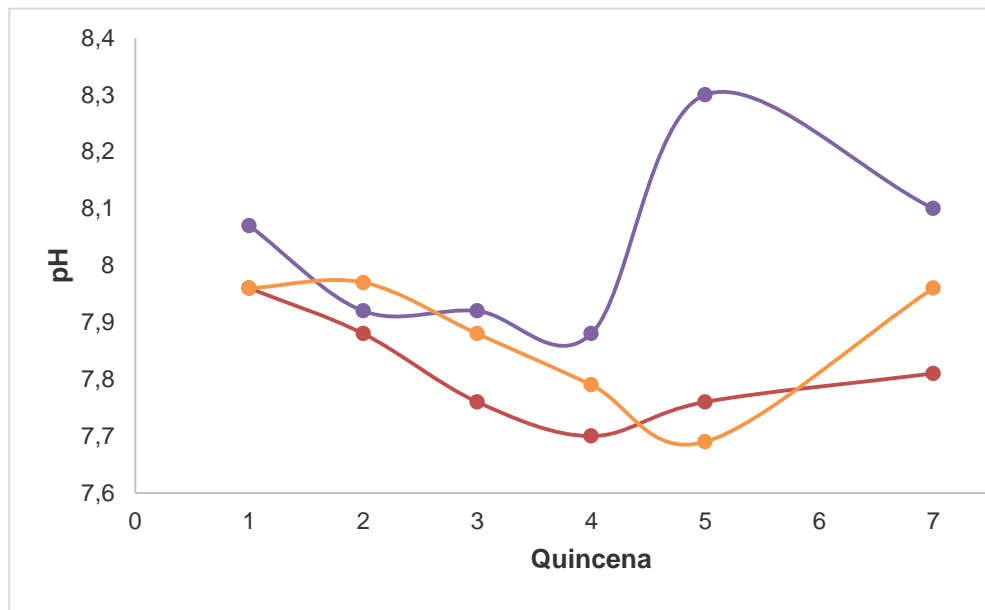


En la gráfica se observa que la humedad en la PF1 fluctuó durante el experimento en el orden de 2% de humedad similar al comportamiento en la réplica mientras que en el testigo alcanzó una variación del 10%. Esta diferencia de comportamiento entre las unidades experimentales de fitorremediación y el testigo se puede deber a la presencia de presencia de las plántula de *Helianthus annuus* que permitieron retener más eficientemente la humedad del sustrato.

#### ▪ Comportamiento del pH

Dependiendo del contenido de nutrientes en el suelo, el pH puede aumentar o disminuir así, en presencia de nutrientes el pH disminuye ya que bajo condiciones aerobias el nitrógeno amoniacal se oxida (nitrificación) con un efecto en la reducción del pH, lo que puede afectar e inhibir el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos asociados a la rizosfera (Vallejo et al., 2005).

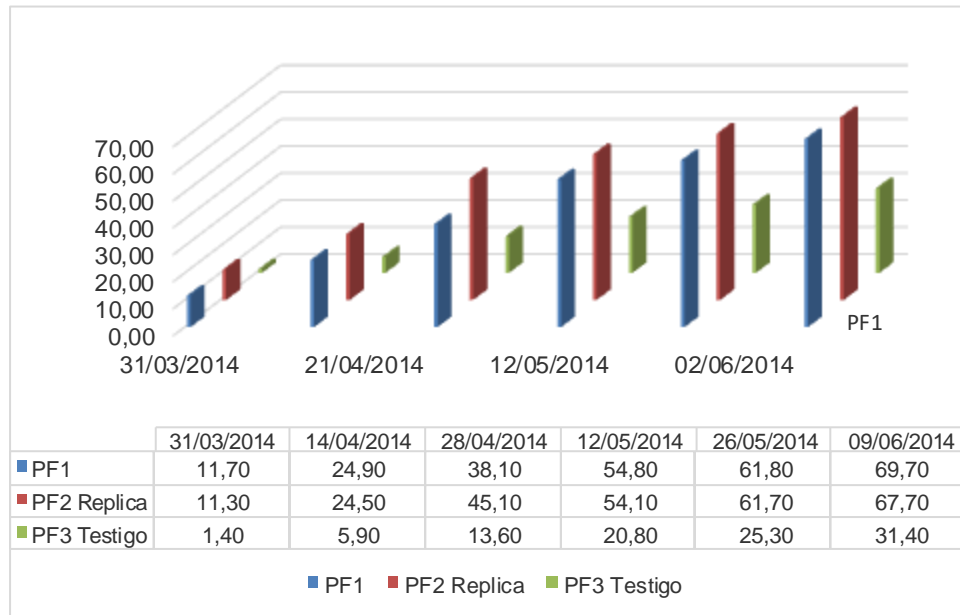
Para el caso de los experimentos con fitorremediación, el rango de pH se mantuvo entre 7,5 y 8,5 siendo propicio para que se diera el proceso de degradación de los HCT como se puede apreciar en la Gráfica 6.

**Gráfica 6.** Comportamiento del pH en el tratamiento de fitorremediación

- **Remoción de hidrocarburos totales**

Los porcentajes de remoción de hidrocarburos totales se presentan en la Gráfica 7.

**Gráfica 7.** Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales acumulado



En la unidad de fitorremediación, PF1, se identificó que el segundo mes de la investigación presentó la mayor degradación de HPT con 1306 ppm de hidrocarburos totales removidos del sedimento con un porcentaje acumulado del 38.1 %. Alcanzada la etapa de senescencia la remoción fue disminuyendo con respecto a su mayor pico. A final de tres meses y medio de seguimiento y monitoreo el porcentaje de remoción total fue de 69,70 %.

La media de remoción obtenida con el tratamiento de fitorremediación fue de 903,16 ppm (95%; IC 602,37-1203,96) mientras que para en el testigo la media de remoción fue de 407,16 ppm (95%; IC 221,09-593,24).

Al comparar la PF1 con la remoción en la unidad de réplica, PF2, se encontró que no existe diferencia significativa en sus resultados.

Para determinar si existe diferencia significativa en la remoción de hidrocarburos obtenida en la unidad de fitorremediación y la unidad testigo se realizó el análisis de varianza a través del programa estadístico SPSS. La prueba de homogeneidad de varianzas muestra un valor crítico de 0,297 (Tabla 12), lo que indica que hay diferencia de las varianzas de los dos tratamientos.

**Tabla 12.** Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de	gl1	gl2	Sig.
----------------	-----	-----	------

<b>Levene</b>			
1,212	1	10	0,297

Los valores de ANOVA muestran un valor de significancia  $p$  de 0,005 (Tabla 13) lo que indica que existe diferencia significativa entre el tratamiento de fitorremediación y el testigo además, al comparar la PF1 con el testigo, PF3, se observa que con este último solo se alcanzó a remover 31.4 %, siendo menos de la mitad alcanzada con el piloto de investigación donde se integró la *Helianthus anuss*.

**Tabla 13. ANOVA**

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	738048,000	1	738048,000	12,995	0,005
<b>Dentro de grupos</b>	567967,667	10	56796,767		

#### 4.1.3.2 Unidad de tratamiento de lechos (UTL)

Los resultados obtenidos durante el seguimiento y monitoreo del proceso de biorrecuperación de sedimentos con unidades de tratamiento de lechos se presentan en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16.

**Tabla 14. Resultados de remoción de HCT en la unidad de tratamiento de lechos**

<b>Fecha</b>	<b>Unidad de tratamiento de lechos UTL1</b>					
	<b>Temperatura °C</b>	<b>Humedad %</b>	<b>pH</b>	<b>Hidrocarburos totales (HCT)</b>		
				<b>Remoción por muestreo (ppm)</b>	<b>Acumulado en el piloto (ppm)</b>	<b>Remoción por muestreo (%)</b>
17/03/2014	<b>Preparación UTL</b>					
31/03/2014	20.6	38.4	7.71	784	6996	10.1
14/04/2014	20.5	38.9	7.63	831	6165	10.7
28/04/2014	20.6	39.1	7.74	997	5168	12.8
12/05/2014	20.5	37.2	7.7	1123	4045	14.4
26/05/2014	20.4	34.9	7.78	1399	2652	18.0



09/06/2014	21.1	38.4	7.96	1456	1196	18.7
<b>Total acumulado</b>				<b>6590</b>		<b>84.7</b>

**Tabla 15.** Resultados de remoción de HCT en la réplica de la unidad de tratamiento de lechos

Fecha	Unidad de tratamiento de lechos UTL2 (Réplica)					
	Temperatura °C	Humedad %	pH	Hidrocarburos totales (HCT)		
				Remoción por muestreo (ppm)	Acumulado en el piloto (ppm)	Remoción por muestreo (%)
17/03/2014	<b>Preparación UTL</b>					
31/03/2014	20.7	44.5	8.36	797	6983	12.8
14/04/2014	20.4	41.4	7.82	896	6,114	28.1
28/04/2014	20.6	38.3	7.79	1046	5068	41.6
12/05/2014	21.0	40.4	7.91	1109	3959	54.4
26/05/2014	21.4	38.9	7.78	1201	2758	67.3
09/06/2014	21.6	39.0	7.02	1462	1296	80.9
<b>Total acumulado</b>				<b>6511</b>		<b>83.7</b>

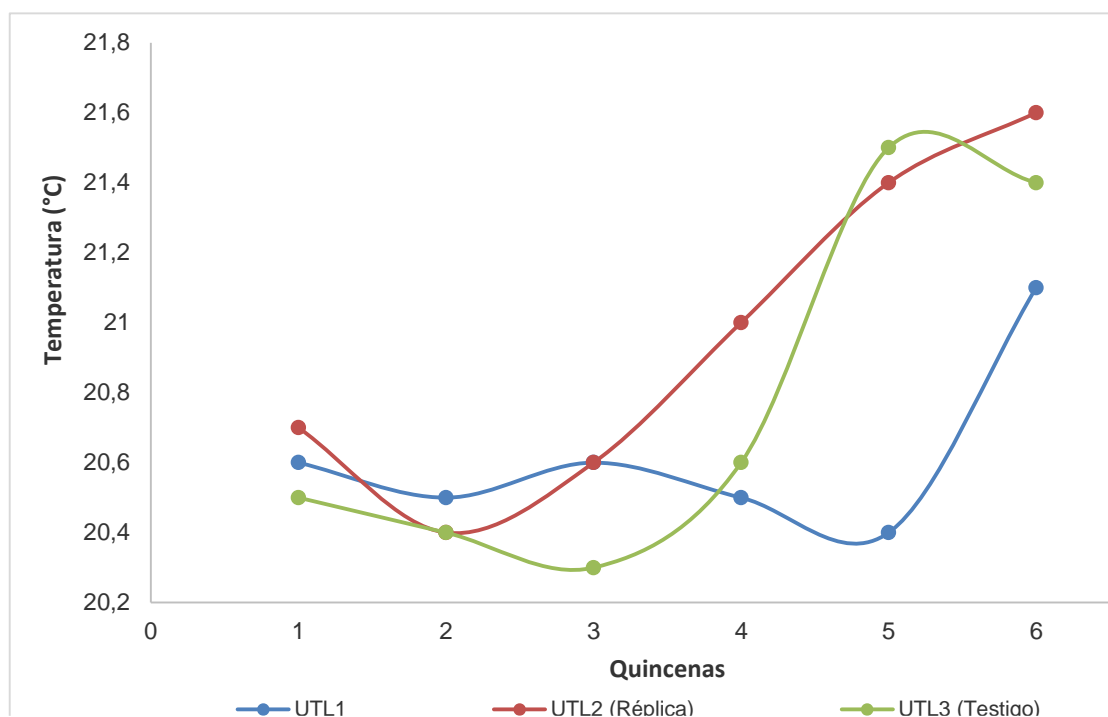
**Tabla 16.** Comportamiento de HCT en la unidad experimental testigo

Fecha	Testigo UTL3					
	Temperatura °C	Humedad %	pH	Hidrocarburos totales (HCT)		
				Remoción por muestreo (ppm)	Acumulado en el piloto (ppm)	Remoción por muestreo (%)
17/03/2014	<b>Preparación UTL</b>					
31/03/2014	20.5	39.9	7.74	133	7647	1.7
14/04/2014	20.4	40.1	7.6	227	7420	2.9
28/04/2014	20.3	42.9	7.73	207	7213	2.7
12/05/2014	20.6	38.7	7.21	329	6884	4.2
26/05/2014	21.5	34.9	8.21	390	6494	5.0

09/06/2014	21.4	39.0	8.02	452	6042	5.8
<b>Total acumulado</b>				<b>1738</b>		<b>22.3</b>

- **Comportamiento de la temperatura**

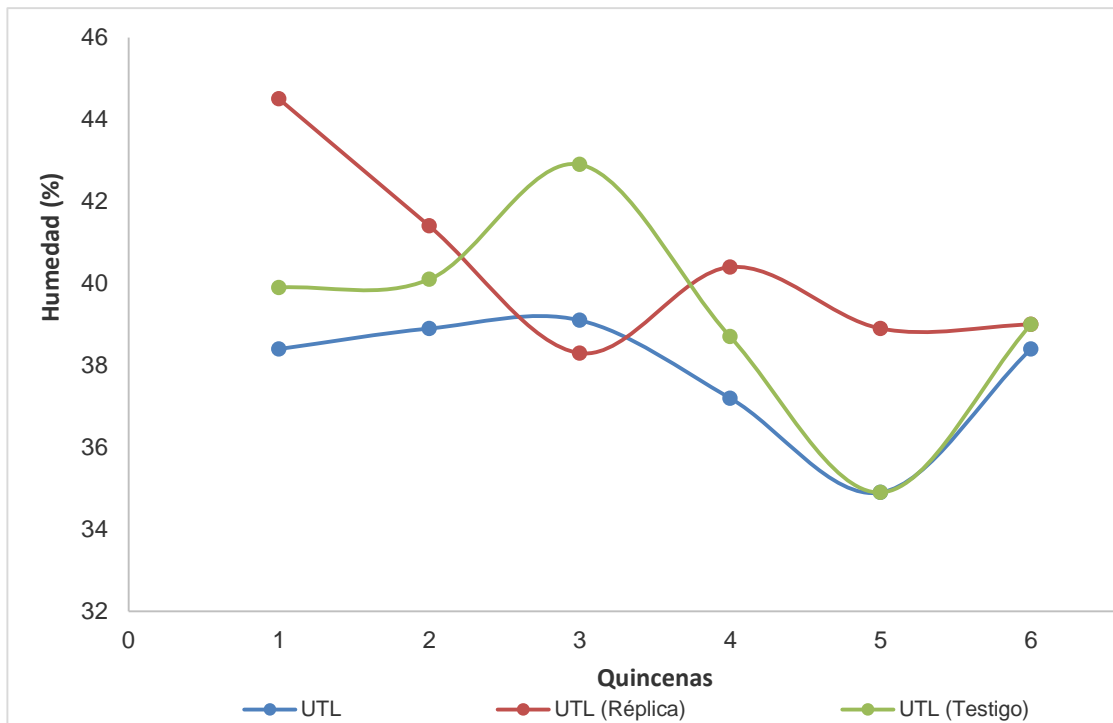
**Gráfica 8.** Comportamiento de la temperatura en las unidades de tratamiento de lechos



La Gráfica 8 muestra la variación de la temperatura en las UTL durante el estudio. a partir de la quincena 3 se observa un aumento pronunciado de la temperatura en la tres unidades (UTL1, UTL2, UTL3) con variaciones hasta de 1°C. Pese a esta variación, la temperatura se mantuvo en el rango adecuado para el desarrollo de los procesos microbiológicos.

- **Comportamiento de la humedad**

**Gráfica 9.** Comportamiento de la humedad en las unidades de tratamiento de lechos

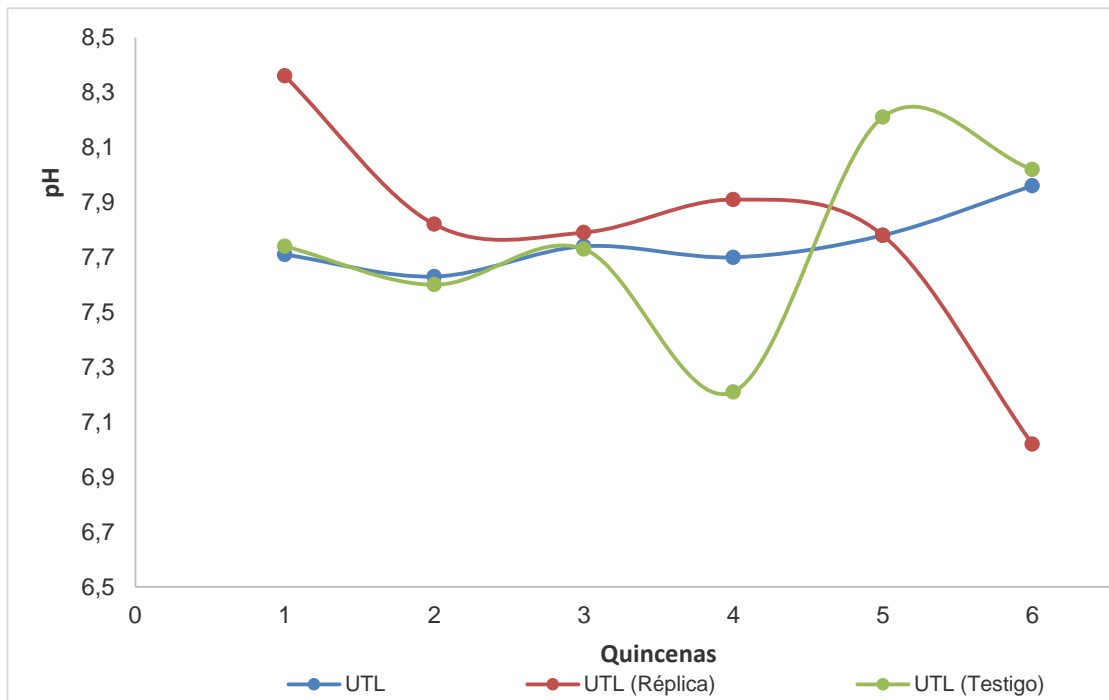


**Como se observa en la**

Gráfica 9, la humedad en las UTL presentó una tendencia decreciente excepto entre la quincena 5 y 6 que aumentó en el orden de 2%. El rango en el que observó la variación fue de 34 y 44 %, ligeramente mayor al que se presentó en las unidades de fitorremediación. Esta situación se pudo presentar porque la presencia de plántulas disminuye la cantidad de humedad del sustrato al requerir agua para su crecimiento.

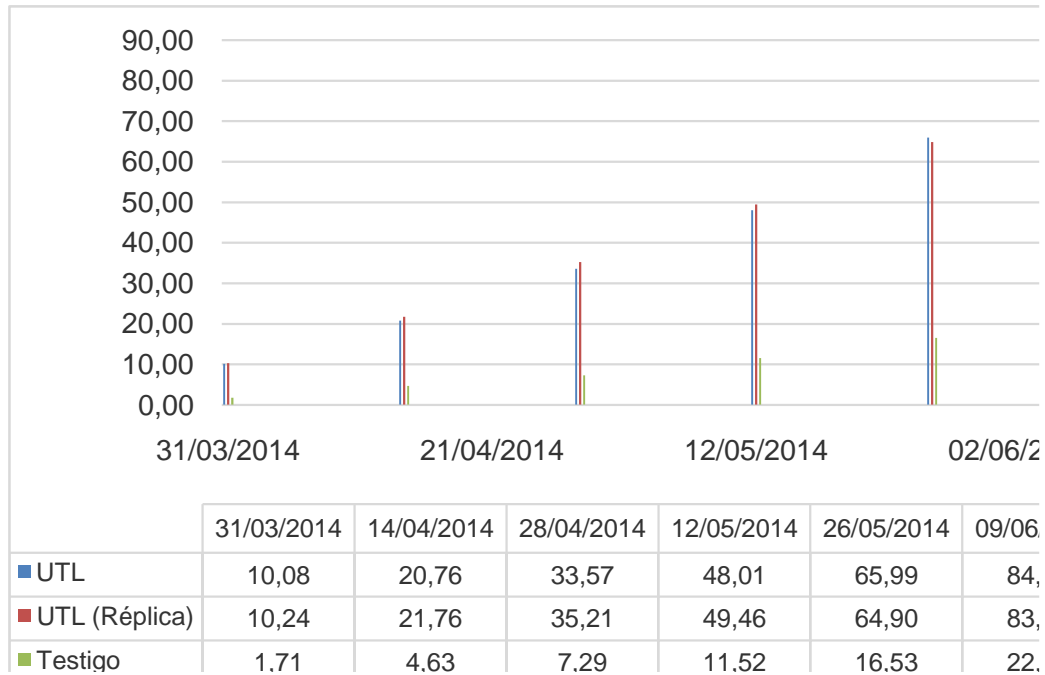
▪ **Comportamiento del pH**

**Gráfica 10.** Comportamiento del pH en las unidades de tratamiento de lechos



- **Remoción de hidrocarburos totales**

**Gráfica 11.** Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales acumulado



La media de remoción obtenida con la unidad de tratamiento de lechos fue de 1028,83 ppm (95%; IC 850,85-1206,81) mientras que para en el testigo la media de remoción fue de 529,16 ppm (95%; IC 361,48-696,84).

Para determinar si hubo diferencia significativa entre el tratamiento con UTL y el testigo se realizó el análisis de varianza, al realizar este, la prueba de homogeneidad arrojó un valor crítico de 0,931 (Tabla 17), lo que indica que hay diferencia de las varianzas de los dos tratamientos.

**Tabla 17.** Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,008	1	10	0,931

Los valores de ANOVA muestran un valor de significancia  $p$  de  $<0,001$  (Tabla 18) lo que indica que existe diferencia significativa entre el tratamiento de lechos y el testigo.

**Tabla 18.** ANOVA

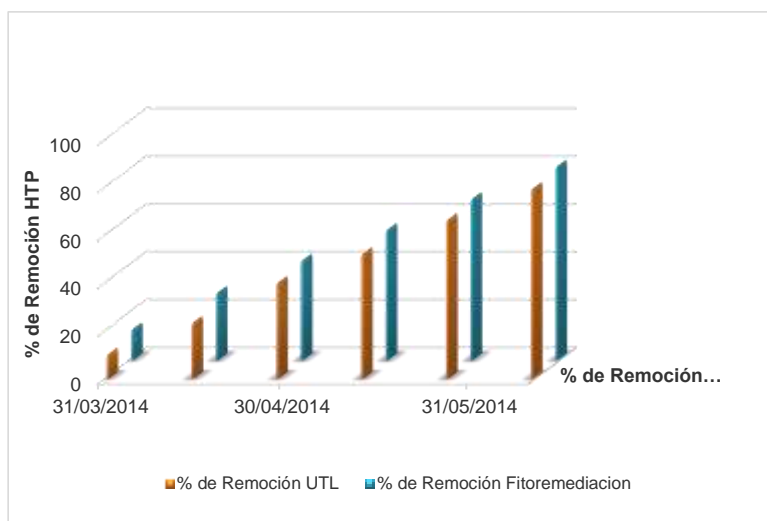
	Suma de	gl	Media	F	Sig.
--	---------	----	-------	---	------

	<b>cuadrados</b>		<b>cuadrática</b>		
<b>Entre grupos</b>	749000,333	1	749000,333	27,592	0,000
<b>Dentro de grupos</b>	271459,667	10	27145,967		

#### 4.1.4 Comparación de la remoción de hidrocarburos totales entre el tratamiento con fitorremediación y unidades de tratamiento de lechos

Para determinar el tratamiento más eficiente en términos de remoción de HCT entre fitorremediación y unidades de tratamiento de lechos, se compararon los resultados de remoción y se realizó el análisis de varianza.

**Gráfica 12.** Remoción de hidrocarburos totales con fitorremediación vs unidades de tratamiento de lechos



Para determinar si hubo diferencia significativa entre el tratamiento para remoción de hidrocarburos totales con fitorremediación y unidades de tratamiento de lechos, se realizó el análisis de varianza.

**Tabla 19.** Descriptivos del análisis de varianza

	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
<b>Fitorremediación</b>	903,16	286,62	117,01	602,37	1203,96	545,00	1306,00
<b>Unidad de tratamiento de lechos</b>	1028,83	169,59	69,23	850,85	1206,81	784,00	1297,00

La Tabla 19 muestra los valores del análisis de la varianza. Se observa que la media de remoción para UTL fue más alta con 1028, 83 ppm comprada con los 903,16 alcanzados con fitorremediación.

Al realizar el análisis de varianza la prueba de homogeneidad arrojó un valor crítico de 0,213 (Tabla 20), lo que indica que hay diferencia de las varianzas de los dos tratamientos.

**Tabla 20.** Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,768	1	10	0,213

Los valores de ANOVA muestran un valor de significancia  $p$  de 0,377 (Tabla 21) lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con fitorremediación y unidades de tratamiento de lechos para la remoción de hidrocarburos en sedimentos y por tanto la efectividad de ambos es similar.

**Tabla 21.** ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Entre grupos</b>	47376,333	1	47376,333	0,854	0,377
<b>Dentro de grupos</b>	554585,667	10	55458,567		

## 5. CAPÍTULO 5

### 5.1 DISCUSIÓN GENERAL

Durante el proceso de adecuación y construcción de las unidades experimentales de fitorremediación se observó que la planta *Helianthus annuus*, cuyo nombre común es girasol, se adaptó fácilmente a altas concentraciones de hidrocarburos en el suelo lo que demostró que esta planta tiene potencial para el uso en procesos de remediación de sedimentos contaminados con hidrocarburos.

Al realizar la caracterización del sedimento contaminado con hidrocarburo proveniente de la estación de servicio seleccionada para el estudio se determinó que las concentraciones de hidrocarburos totales fueron de 7780 ppm, valor que representa una alta concentración comparado con un suelo en condiciones normales además, se evidencia que este sedimento carece de nutrientes y materia orgánica. Estas características vienen dadas porque este tipo de material es producto de la acumulación de partículas del suelo que son arrastradas y atrapadas por la trampa de grasas de la estación de servicio.

En el tratamiento de fitorremediación, se observó un aumento progresivo de la temperatura que en el caso de las tres unidades experimentales alcanzó variaciones de aproximadamente 1°C. Esta variación pudo evidenciar que se encontraban activos los procesos de degradación de materia orgánica y por tanto la remoción de hidrocarburos, además, estos valores durante todo el experimento favorecieron la actividad de los microorganismos. Los resultados obtenidos en este tratamiento son similares a los registrados para las unidades de tratamiento de lechos, de lo que se puede concluir que



los procesos biológicos que se desarrollan en ambos son similares y no afectan la temperatura del proceso.

Durante el monitoreo del tratamiento de fitorremediación con *Helianthus annuus* se observó una reducción del pH entre la quincena 1 y 4 con una variación aproximada de 0,4 unidades a excepción de la réplica que mostró un aumento pronunciado en la quincena 5. Esta disminución inicial de pH pudo estar asociada a la baja capacidad amortiguadora del suelo y a la actividad metabólica de la comunidad microbiana del sustrato en presencia de hidrocarburos, además, esta disminución pudo haber sucedido por la formación de diferentes ácidos durante el proceso de descomposición de la materia orgánica presente en el material compostado adicionado y los sedimentos de la estación de servicio. Al comparar estos resultados con los observados para las unidades de tratamiento de lechos, se encontró que son muy similares y no hay fluctuaciones grandes del pH.

Al determinar las eficiencias para los dos tipos de tratamiento evaluados en el estudio, teniendo una concentración inicial de 7780 ppm de hidrocarburos totales, con fitorremediación se alcanzó un porcentaje de remoción de 72.85 y con las unidades de tratamiento de lechos de 84.7. El valor de remoción obtenido evidencia además que con el uso de la especie *Helianthus annuus* y las unidades de tratamiento de lechos es posible obtener eficiencias de remoción de hidrocarburos totales de sedimentos superiores al 60%.

Para los dos tipos de tratamiento se observó que los mayores valores de remoción se alcanzaron a partir de la mitad del tiempo en el que se realizó el estudio, lo cual podría indicar que tanto las plántulas de *Helianthus annuus* como los microorganismos responsables del proceso de degradación de hidrocarburos se encontraban adaptados y con una mayor actividad enzimática. Este comportamiento es contrario al reportado por algunos autores quienes observaron en estudios de degradación y remoción de hidrocarburos que los porcentajes disminuyen con el tiempo debido a que estos compuestos se vuelven menos disponibles para la biodegradación por su carácter recalcitrante y limitada biodisponibilidad (Vallejo et al., 2005).

Si bien los valores finales de remoción son superiores para la unidad de tratamiento de lechos, de acuerdo al análisis de varianza de los valores de remoción de hidrocarburos

totales alcanzados por los dos tratamientos, se determinó que no hay diferencia significativa entre el tratamiento con fitorremediación y las unidades de tratamiento de lechos lo que indica que con cualquiera de los dos sistemas de biorrecuperación implementados se logra la recuperación de sedimentos contaminados con hidrocarburos provenientes de estaciones de servicio.

## 6. CAPÍTULO 6

### 6.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

Los sistemas de fitorremediación con *Helianthus annuus* tiene potencial para el uso en procesos de recuperación de sedimentos contaminados con hidrocarburos y es una planta que se adapta fácilmente a altas concentraciones de hidrocarburos.

Con el sistema de fitorremediación empleando *Helianthus annuus* se alcanzó un valor final de remoción de hidrocarburos totales de 72,85% y con el sistema de unidades de tratamiento de lechos un 84,7%. Si bien los valores alcanzados en este último sistema son mayores, no hay diferencia significativa entre los resultados de remoción de los dos sistemas de tratamiento.

El sistema de fitorremediación y el sistema de tratamiento en lechos son efectivos para la remoción de hidrocarburos totales en sedimentos provenientes de la estación de servicio Texaco N°. 27 de Popayán.

#### Recomendaciones

La rama legislativa de Colombia, debe ser más preciso en crear leyes, códigos, decretos con penal carcelarias para aquellos que abusan de los recursos naturales y no hacen un buen manejo de los mismos, de tal manera que se siembre consciencia en la importancia del manejo de la extracción del crudo, de igual manera es vital que todas las demás ramas del poder público del estado se unan para la vigilancia, control y seguimiento de las empresas que extraen el crudo del subsuelo y las practicas empleadas.

El ministerio del medio ambiente, junto con los demás organismos influyentes en velar por la protección de los recursos naturales, debe cumplir con las comunidades para evitar que las industrias petroleras y no petroleras encargadas de la extracción de crudo y minerales, apliquen los procesos con debida y optima responsabilidad ambiental.



## Bibliografía

- Abu, G.O., Dike, P.O., 2008. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. *Bioresour. Technol.* 99, 4761–4767. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.063
- Acuña-González, J., Vargas-Zamora, J.A., Gómez-Ramírez, E., García-Céspedes, J., 2004. Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52, 43–50.
- Al, S.E.G.R. et, 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA* 6.
- Alexander, M., 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Gulf Professional Publishing.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods* 32, 155–164. doi:10.1016/S0167-7012(98)00020-7
- Bedair, H.M., Al-Saad, H.T., 1992. Dissolved and particulate-adsorbed hydrocarbons in the waters of shatt al-Arab River, Iraq. *Water. Air. Soil Pollut.* 61, 397–408. doi:10.1007/BF00482618
- Benazon, N., Belanger, D.W., Scheurlen, D.B., Lesky, M.J., 1995. Bioremediation of ethylbenzene- and styrene-contaminated soil using biopiles.
- Bento, F.M., Camargo, F.A. de O., Okeke, B., Frankenberger-Júnior, W.T., 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.* 34, 65–68. doi:10.1590/S1517-83822003000500022
- Braibant-Wayens, C., 2004. Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados.
- Caplan, J.A., 1993. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Trends Biotechnol.* 11, 320–323. doi:10.1016/0167-7799(93)90153-Z

- Çelen, E., Kiliç, M.A., 2004. Isolation and Characterization of Aerobic Denitrifiers from Agricultural Soil. *Turk. J. Biol.* 28, 9–14.
- Cuartas, Ñ., Cristina, D., 2012. Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible.
- Daane, L.L., Harjono, I., Zylstra, G.J., Häggblom, M.M., 2001. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2683–2691. doi:10.1128/AEM.67.6.2683-2691.2001
- DOF - Diario Oficial de la Federación [WWW Document], n.d. URL [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013) (accessed 5.12.17).
- Eweis, J.B., 1999. Principios de biorrecuperación: tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Aravaca.
- Gomez, Romero, S.E.G.R. et, 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA 6.
- Hillel, D., Hatfield, J.L., 2004. *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier/Academic Press.
- Huelster, A., Mueller, J.F., Marschner, H., 1994. Soil-Plant Transfer of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans to Vegetables of the Cucumber Family (Cucurbitaceae). *Environ. Sci. Technol.* 28, 1110–1115. doi:10.1021/es00055a021
- Jørgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.-M., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pollut.* 107, 245–254. doi:10.1016/S0269-7491(99)00144-X
- Lee, T.H., Byun, I.G., Kim, Y.O., Hwang, I.S., Park, T.J., 2006. Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 53, 263–272.
- Mesa, J.B.L. de, Quintero, G., Vizcaíno, A.L.G., Cáceres, D.C.J., Riaño, S.M.G., García, J.M., 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA 4.
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 1996. Ley 253 de 1996.

- Ministerio del Medio Ambiente, 1999. Guía de Manejo Ambiental para Estaciones de Servicio de Combustible.
- Miranda, D., Restrepo, R., 2005. Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales – impactos, consecuencias y prevención. la experiencia de Colombia. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* 2005, 571–575. doi:10.7901/2169-3358-2005-1-571
- Pardo, J., Perdomo, M., 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA*.
- Pérez Vargas, J., García Esquivel, G., Esparza García, F., 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Av. Perspect.* 21, 297–300.
- Petenello, M.C., Feldman, S.R., 2012. Evaluación de la Tolerancia a Suelos Contaminados con Aceite Diesel en Especies Vegetales con Potencial Biorremediador. *Acta Biológica Colomb.* 17, 589–598.
- Reynolds, C.M., Wolf, D.C., Gentry, T.J., Perry, L.B., Pidgeon, C.S., Koenen, B.A., Rogers, H.B., Beyrouy, C.A., 1999. Plant enhancement of indigenous soil microorganisms: a low-cost treatment of contaminated soils. *Polar Rec.* 35, 33–40. doi:10.1017/S0032247400026310
- Ríos, R., 2005. Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Univ. Autónoma Metrop. Unidad Iztapalapa Casa Abierta Al Tiempo México DF.
- Rojas-Avelizapa, N.G., Rodríguez-Vázquez, R., Enríquez-Villanueva, F., Martínez-Cruz, J., Poggi-Varaldo, H.M., 1999. Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. *Resour. Conserv. Recycl.* 27, 15–26. doi:10.1016/S0921-3449(98)00082-2
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., Ron, E.Z., 1992. Petroleum bioremediation — a multiphase problem. *Biodegradation* 3, 337–350. doi:10.1007/BF00129092
- Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollut.* 112, 269–283. doi:10.1016/S0269-7491(00)00099-3



- Song, B., Palleroni, N.J., Häggblom, M.M., 2000. Isolation and Characterization of Diverse Halobenzoate-Degrading Denitrifying Bacteria from Soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3446–3453.
- Stres, B., Mahne, I., Avgustin, G., Tiedje, J.M., 2004. Nitrous oxide reductase (nosZ) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 301–309.
- Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T., 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1239–1253. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03401.x
- The Regional Institute - Bioremediation of soils contaminated with organic compounds [WWW Document], 2012. URL [http://www.regional.org.au/au/asssi/supersoil2004/s3/poster/1455\\_sivakumarans.htm](http://www.regional.org.au/au/asssi/supersoil2004/s3/poster/1455_sivakumarans.htm) (accessed 5.13.17).
- Tiempo, C.E.E., 2013. Sellan estación de servicio en Usaquén por filtración de combustible [WWW Document]. *El Tiempo*. URL <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-12834662> (accessed 5.12.17).
- US EPA, O., n.d. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/remedytech/phytoremediation-contaminated-soil-and-ground-water-hazardous-waste-sites> (accessed 5.12.17).
- Vallejo, V., Salgado, L., Roldan, F., 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 7, 67–78.
- White, J.C., Newman, L.A., 2011. Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants, in: Xing, B., Senesi, N., Huang, P.M. (Eds.), *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 503–516. doi:10.1002/9780470944479.ch20
- www.revistavirtualpro.com, n.d. Tecnologías de remediación para suelos contaminados [WWW Document]. URL <http://www.revistavirtualpro.com/biblioteca> (accessed 5.13.17).

Xu, Y., Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *J. Hazard. Mater.* 183, 395–401. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.038