

**USO Y EVALUACIÓN DE (*PSEUDOMONAS SP*) PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE  
HTP'S EN SUELOS CONTAMINADOS, BAJO EL MODELO DE CAJA NEGRA**

**PRESENTADO POR**

**JOSE GUILLERMO DIAZ ROJAS  
ANGELA ROCIO MINA CHIQUIZA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TITULO DE INGENIERO  
AMBIENTAL**

**ESCUELA COLOMBIANA DE CARRERAS INDUSTRIALES  
FACULTAD DE INGENIERIA  
PROGRAMA INGENIERIA AMBIENTAL  
BOGOTÁ, D.C.  
2014**

**USO Y EVALUACION DE (PSEUDOMONAS SP) PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE  
HTP'S EN SUELOS CONTAMINADOS, BAJO EL MODELO DE CAJA NEGRA**

**PRESENTADO POR**

**JOSE GUILLERMO DIAZ ROJAS  
ANGELA ROCIO MINA CHIQUIZA**

**DIRECTOR  
ANDRES FELIPE MOLANO GUARIN**

**ESCUELA COLOMBIANA DE CARRERAS INDUSTRIALES  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D.C.  
2014**

### **Dedicatoria Guillermo Diaz:**

A mi familia

A mi madre que me brindo el apoyo en estos años de carrera  
A mi hermana Lorena por brindar lo mejor de ella para mis estudios

### **Dedicatoria Angela Mina**

A mi madre por confiar siempre en mis capacidades, a mi abuela por estar siempre presente en cada paso de mi vida, a mi papá por su colaboración.  
Por ultimo a mi prima Lorena, por regalarme su computador para poder hacer esta investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a mi Dios por estas bendiciones de poder terminar mi carrera como ingeniero ambiental y poder presentar este trabajo de investigación.

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos al Microbiólogo Industrial. Andrés Felipe Molano Guarín por su apoyo y disposición durante el desarrollo de esta tesis. Del mismo modo manifestar mi admiración por la profundidad y seriedad del trabajo.

Agradezco a mi madre, mi padre y hermanos por confiar en mí para sacar adelante esta carrera y ser un profesional de muchos éxitos.

A mis amigos y compañeros de batalla durante estos diez semestre de arduo estudio y también por compartir momentos únicos en nuestra vida de estudiantes.

Por último agradecer a mi compañera Ángela Mina, compañera de trabajo de grado, gracias a ella sacamos adelante este trabajo de investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE TABLAS.....	6
INTRODUCCIÓN .....	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
JUSTIFICACIÓN.....	4
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
OBJETIVOS .....	6
GENERAL .....	6
ESPECIFICOS.....	6
ESTADO DEL ARTE.....	7
MARCO METODOLÓGICO .....	10
RESULTADOS .....	23
CONCENTRACIÓN 1,5%.....	29
CONCENTRACIÓN 2% .....	32
ABSORCIÓN INFRARROJA HT's .....	35
ABSORCIÓN INFRARROJA DE HTP'S.....	36
ANÁLISIS.....	37
CONCLUSIONES .....	38
RECOMENDACIONES.....	39
MARCO CONCEPTUAL .....	40
ANEXOS.....	41
BALANCE.....	44
BIBLIOGRAFIA .....	45

## TABLA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Comparación de biorremediación in situ vs ex situ</i> .....	9
<i>Tabla 2 Estadística ANOVA</i> .....	22
<i>Tabla 3 Datos macronutrientes del suelo</i> .....	23
<i>Tabla 4 Datos micronutrientes del suelo.</i> .....	23
<i>Tabla 5. Datos físicos del suelo en la pasta de saturación</i> .....	24
<i>Tabla 6 Recuento de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo de (Pseudomonas sp)</i> .....	25
<i>Tabla 7 Datos significativos concentración al 1%</i> .....	26
<i>Tabla 8 Datos significativos concentración al 1.5%</i> .....	29
<i>Tabla 9 Datos significativos concentración al 2%</i> .....	32
<i>Tabla 10 Resultados de HT's</i> .....	35
<i>Tabla 11. Resultados de HTP's</i> .....	36
<i>Tabla 12 Datos concentración al 1%</i> .....	41
<i>Tabla 13 Datos concentración al 1.5%</i> .....	42
<i>Tabla 14 Datos concentración al 2%</i> .....	43

## TABLA DE IMÁGENES

<i>Imagen 1 Identificación de Polipedones; método IGAC .....</i>	<i>11</i>
<i>Imagen 2 Identificación del tamiz .....</i>	<i>12</i>
<i>Imagen 3 Identificación del potenciómetro en la pasta de saturación .....</i>	<i>13</i>
<i>Imagen 4 Identificación del kit de macronutrientes.....</i>	<i>14</i>
<i>Imagen 5 Comparación de nitrato con la tabla de color .....</i>	<i>14</i>
<i>Imagen 6 . Identificación del kit de micronutrientes.....</i>	<i>15</i>
<i>Imagen 7 Comparación de sulfato.....</i>	<i>15</i>
<i>Imagen 8 Pre-enriquecimiento de la muestra.....</i>	<i>16</i>
<i>Imagen 9 Soluciones seriadas.....</i>	<i>17</i>
<i>Imagen 10 Siembra de microorganismo.....</i>	<i>17</i>
<i>Imagen 11 Conteo de unidades formadoras de colonia .....</i>	<i>18</i>
<i>Imagen 12 Erlenmeyer r con microorganismo e hidrocarburo.....</i>	<i>19</i>
<i>Imagen 13 Agitador magnético.....</i>	<i>19</i>
<i>Imagen 14 Cadena de custodia de las muestras ámbar .....</i>	<i>20</i>

## TABLA DE GRAFICAS

<i>Gráfica 1 Comportamiento de Crecimiento (Pseudomonas sp) al 1% de Crudo</i> .....	27
<i>Gráfica 2 Comportamiento de Velocidad Especifica (Pseudomonas sp) al 1% de Crudo</i> .....	27
<i>Gráfica 3 Comportamiento Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 1% de Crudo</i> .....	28
<i>Gráfica 4 Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 1% de Crudo</i> .....	28
<i>Gráfica 5 Comportamiento de Crecimiento (Pseudomonas sp) al 1% de Crudo</i> .....	30
<i>Gráfica 6 Comportamiento de Velocidad Especifica (Pseudomonas sp) al 1.5% de Crudo</i> .....	30
<i>Gráfica 7 Comportamiento Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 1.5% de Crudo</i> .....	31
<i>Gráfica 8 Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 1.5% de Crudo</i> .....	31
<i>Gráfica 9 Comportamiento de Crecimiento (Pseudomonas sp) al 2% de Crudo</i> .....	33
<i>Gráfica 10 Comportamiento de Velocidad Especifica (Pseudomonas sp) al 2% de Crudo</i> .....	33
<i>Gráfica 11 Comportamiento Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 2% de Crudo</i> .....	34
<i>Gráfica 12 Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (Pseudomonas sp) al 2% de Crudo</i> .....	34



## INTRODUCCIÓN

El sector de hidrocarburos tiene una serie de actividades relacionadas con la explotación, producción, transporte, refinación o procesamiento y comercialización del recurso natural no renovable; el hidrocarburo puede estar en estado líquido (crudo) o en estado gaseoso (gas natural). Es de tipo orgánico, compuesto principalmente por hidrogeno y carbono contenido en rocas sedimentarias (ANH, 2014). El petróleo es uno de los más importantes productos que se negocian en el mercado mundial de materias primas. Las bolsas de Nueva York (NIMEX) y de Londres (IPC) son los principales centros donde se transa; existen parámetros internacionales, como los del Instituto Americano de Petróleo (API) que diferencia la calidad del petróleo y, por tanto su valor, así entre más API tenga mejor su calidad. Los petróleos de mejor calidad son aquellos que se clasifican como "livianos" o "suaves" y "dulces" y son aquellos que tiene más de 26° API, los "intermedios" se sitúan entre 20° y 26° API, y los "pesados" por debajo de 20° API. Al Refinarlos, los petróleos livianos y dulces producen más gasolina y causan menos contaminación y por tanto son los más apetecidos (Ecopetrol, 2003)

Cuando el crudo entra al medio ambiente en situaciones como los vertimientos, se generan lodos a base agua y aceites, residuos sólidos y emisiones. Es así que los lodos generados contienen altas concentraciones de Hidrocarburos Totales del Petróleo los cuales están compuestos por sustancias alifáticas y aromáticas que afectan directamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo generando un detrimento en la calidad ambiental del recurso (Anish Ghimire; 2012). El daño ambiental que generan estos derrames es la poca fertilidad, bajo rendimiento en las plantas, contaminación en cuerpos de agua y afectación a los seres vivos.

Para cumplir con la remediación de los suelos, se deben cumplir con algunos de los objetivos de separar el contaminante del suelo, aislarlo o inmovilizarlo o destruirlo. (Sellers, K. 1999) aprovechando las habilidades bioquímicas de los microorganismos, interactuando de una forma física o química, dependiendo de las actividades catabólicas del microorganismo, siendo el contaminante una fuente de alimento y energía, favoreciendo las condiciones necesarias para el crecimiento y la degradación. La biorremediación puede emplear organismos nativos, o exógenos, y puede realizarse de forma in situ o ex situ, en condiciones aerobias o anaerobias (Eweis y col, 1998). El objetivo de la biorremediación es la mineralización del contaminante y esta ocurre con la biodegradación completa de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (Alexander, 1994).

La investigación está basada en el modelo de monod, el cual es utilizado frecuentemente para relacionar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de formación de la biomasa. El crecimiento celular es resultado de las interacciones entre reacciones bioquímicas y fenómenos de transporte con múltiples fases y sistemas multicomponentes, la mezcla entre células jóvenes y viejas experimentan un cambio continuo mientras se adaptan a un medio ambiente cuyas condiciones físicas y quícas varían constantemente (Duarte, A. 2014).

La metodología que se desarrolló fue experimental, para este proyecto fue basado en etapas, la primera fue plantear el problema y buscar referencias o revisión bibliográfica, se definió el territorio a tratar y se procedieron a la toma de muestras, se llevaron a laboratorio y se realizaron análisis fisicoquímicos del suelo y análisis microbiológico, la segunda etapa fue el diseño, operación y puesta en marcha de los mesocosmos con un blanco y muestras de HTP's<sup>1</sup> al 1.0%, 1.5% y 2.0%, la tercera etapa se basó en el análisis

---

<sup>1</sup> Los HTP's son Hidrocarburo totales de petróleo, una mezcla de productos químicos compuesto principalmente de hidrogeno y carbono, llamados hidrocarburos. cada fracción de los HTP's contiene sustancias químicas como hexano, benceno, tolueno, fluorenos entre otras (Sermernat; 2003).

fisicoquímico del mesocosmo y la remoción de los HTP's finalizando la cuarta etapa con la discusión de resultados y entrega final del documento.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante los últimos años el recurso suelo se ha visto afectado por actividades como, la agricultura, ganadería y la explotación de hidrocarburos. En el caso del sector de hidrocarburos en las etapas de exploración, perforación, extracción y explotación se producen diversas actividades que afectan el ambiente como (vertimientos, lodos base agua y aceites, residuos sólidos y emisiones). Es así que los lodos generados contienen altas concentraciones de HTP's que están compuestos por sustancias alifáticas y aromáticas que afectan directamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo generando un detrimento en la calidad ambiental del recurso (Anish Ghimire; 2012). El daño ambiental que generan estos derrames es la poca fertilidad, bajo rendimiento en las plantas, contaminación en cuerpos de agua y afectación a los seres vivos.

Se ha cuestionado el grado de toxicidad que genera los hidrocarburos en el suelo y en las plantas, Plice 1948; considera que si el hidrocarburo se encuentra en un porcentaje bajo (0,75%) de crudo en suelo arenoso estimula el crecimiento de soya, y también observo que si hay un incremento del 4%, las plantas mueren. Los efectos en las propiedades físicas y químicas por los derrames se evidencian en las condiciones de fertilidad, donde se observa incrementos en el nitrógeno y contenido de la materia orgánica. Se analizó que al ser comparados los suelos contaminados con hidrocarburos y los que están libres de este, hay mayor actividad microbiana en el que está contaminado. (Dobson y Wilson, 1964). Es importante considerar el efecto que tiene los HTP'S en el crecimiento y estabilidad de las plantas, en la disponibilidad de macronutrientes y micronutrientes en el suelo pues estos están en función de la concentración, tipo de hidrocarburo y tipo de suelo, al producir cambios importantes en las propiedades de textura, materia orgánica, densidad real y porosidad de suelo arcilloso (López, 2001).

El derrame con mayor cantidad de petróleo vertido fue durante la llamada "Guerra del Golfo". Se produjo como resultado de las medidas adoptadas por el ejército de Iraq durante la guerra que liberaron contra Estados Unidos en 1991. Se estima que se derramaron 36 billones de galones de petróleo, la marea negra llegó a un tamaño máximo de 4.242 kilómetros cuadrados con 12 centímetros de espesor. (Bronder y Zelle, 2010) A nivel de América Latina se encuentran empresas extranjeras trabajando en estos territorios las cuales no conocen muy bien la formación geológica del territorio y debido a esto se ven accidentes como el ocurrido en marzo de 2012 en el litoral del estado de Río de Janeiro, con una mancha de un kilómetro de extensión por la hendidura en la roca submarina causada por la empresa Chevron (El Lun, 2012). Por ultimo tenemos el panorama colombiano, en donde se ha sido 11 veces más derramado el petróleo que el que se derramo en 1989 en la tragedia del buque petrolero Exxon Valdez. Aunque ha habido derrame accidental la mayoría corresponden a las voladuras de oleoductos por parte de la guerrilla (NULLVALUE, 1997).

Como se dijo anteriormente en Colombia la mayor causa de derrame se debe a los grupos guerrilleros que hacen voladuras de los oleoductos. Según el Ministerio de Defensa, después de un pico de 184 voladuras en el 2003, estas se redujeron a 31 en 2010. Pero el número salto en el año 2011 a 84 explosiones. En aumento pero en menores niveles, se mantuvo el 2012. Marco Tulio Restrepo coordinador de seguridad de Ecopetrol en el año 1997, de cada 100 barriles de crudo derramado por los atentados solo se recuperan entre 25 a 30. En Caño Limón- Coveñas el oleoducto que se ve afectado con frecuencia por atentados, sufre una voladura por cada cuatro días desde que inicio el 2012 (Semana, 2012).

Uno de los casos actuales, fue el hecho ocurrido en Putumayo el miércoles 23 de julio en donde se vieron obligados los conductores de cuatro tracto mulas cargadas de petróleo a derramarlo cerca de la carretera, fueron alrededor de 4.400 galones los que se vertieron contaminando quebradas, esto obliga a que se declare una emergencia ambiental a nivel del departamento por los constantes ataques a oleoductos y derrame fortuitos a camiones (El Tiempo, 2014), también obliga a que se haga fuerte presencia de ejército para proteger el transporte del crudo, Pero en muchas ocasiones se ve afectada debido a que son casi 9.000 kilómetros de tubo que transportan gas y combustible, 770 kilómetros del oleoducto Caño Limón- Coveñas, o los 960 que tendrá el Bicentenario, que pasan por zonas desoladas y son blancos de ataque (Semana, 2012).

La remediación es una tecnología que hace referencia a la aplicación de estrategias fisicoquímicas para evitar el daño y la contaminación de los suelos donde confluyen procesos físicos como aireación y procesos químicos como la oxidación y los procesos bioquímicos; en la remediación de los suelos el método más utilizado y efectivo es el proceso biológico, en el cual se utiliza microorganismo para estos procesos. Por otro lado el uso de tecnologías limpias como tratamiento a este tipo de escenarios, se han venido desarrollando en Europa central y medio oriente; una de las tecnologías en estudio con mayor concentración de esfuerzos es la fitorremediación que consiste en aprovechar la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo (Delgadillo; 2012).

En Colombia según ICP<sup>2</sup> se viene trabajando en el proceso de biorremediación in-situ con microorganismos nativos para el tratamiento de lodos aceitosos que se generan en los derrames de hidrocarburos. Esto con el fin de aplicar tecnologías verdes en los procesos de producción; el ICP con el fin de promover las investigaciones y la sostenibilidad con el ambiente creó este espacio de investigación, para aplicar los nuevos conceptos de ecología verde e ingeniería sostenible; en la edición número 5 de la revista ICP habla sobre el esquema de producción tecnológica en los procesos de tratamiento de suelos, utilizando cepas nativas para el control biológico del suelo. Esta investigación se publicó en el año 2013. Con estos estudios se pretende tener nuevas alternativas y nuevos conceptos para el tratamiento de los suelos.

Otras técnicas que se utilizan para la remediación de suelos es la bioventilación in-situ basándose en la extracción de vapores del suelo mediante una diferencia de presión generada por el bombeo de aire desde el exterior. Se aplica en suelos no saturados contaminados con hidrocarburos, los gases generados deben ser tratados por filtros con carbón activado, una desventaja de este sistema es que no se tiene aplicación para la recuperación de la parte líquida. La incineración otra técnica que se hace ex -situ en donde se somete el suelo contaminado por hidrocarburos a altas temperaturas (1.200 °c) en donde los contaminantes se evaporan y luego se queman en condiciones controladas para este sistema se requiere de la depuración de gases y en cuanto la disposición final de los suelos se realiza en hornos de cementos con la técnica de valorización de residuos<sup>3</sup> (Coria, 2007).

En cuanto al tratamiento de forma química se requiere la modificación o destrucción de los contaminantes como la pirolisis, buscando alterar la estructura química del contaminante, aprovechando sus propiedades como la volatilización, solubilidad, carga eléctrica, y pueden ser utilizados en los dos tipos de tecnología la ex -situ o in- situ; teniendo en cuenta que esta forma tiene algunas desventajas como la generación de residuos por las técnicas de separación donde deben ser separados y tratados elevando los costos y realizar la búsqueda de permisos, otro desventaja son los fluidos de extracción que pueden aumentar la movilidad de los contaminantes donde se necesitarían sistemas de recuperación (Volke. T y Velasco. J, 2002).

---

<sup>2</sup> Instituto colombiano de petróleos sitio de referencia [www.ICP.com.co](http://www.ICP.com.co), "Esquema de Producción Tecnológica en los Procesos de tratamiento de suelos Utilizando Cepas Nativas 5 Edición 2013"

<sup>3</sup> Valorización de residuos: Permite una eliminación segura de pasivos ambientales.

## JUSTIFICACIÓN

Debido al crecimiento industrial; el sector petrolero se ha tenido que ampliar en un gran porcentaje, esto hizo que las petroleras hicieran grandes avances e inversiones para extraer y transportar la mayor cantidad de petróleo en poco tiempo para industrias grandes como la automotriz. Pero esto trajo efectos negativos en la extracción del petróleo, como los vertimientos o derrames que se presentan a la hora de transportar el hidrocarburo ya sea por oleoductos, tanques y camiones, o también a los ataques que realizan la guerrilla para ejercer presión al gobierno colombiano, contaminando recursos vitales como el agua o suelo y en menor porcentaje el aire; en este estudio se dan las razones por el cual se debe trabajar con una alternativa de biorremediación que es más benéfica para el medio ambiente trabajando con bacterias nativas ayudando a reducir los costos de implementación.

A causa de la situación actual de Colombia, en el incremento de ataques de grupos vandálicos a los oleoductos como forma de ejercer presión, desestabilizando al Gobierno y las empresas, donde al final nadie se hace cargo ni hace seguimiento de los problemas de contaminación, esto afectando a la población, deteriorando la fauna y flora, se desea que con esta investigación se aporte conocimientos y conceptos a la aplicación de tecnologías limpias para remediar acciones industriales entre otras que causan daño al ambiente.

Con esta investigación se busca que empresas dedicadas al sector petrolero o afines que tengan problemas de contaminación por HTP's puedan tener acceso a esta información y la adopten como tecnología para remediar los suelos; estas se pueden realizar de dos formas las *ex situ* e *in situ* donde cada una tiene ventajas y desventajas, dependiendo de la cantidad de suelo a tratar de cada metodología. En este proyecto se buscó que por medio de modificaciones realizadas en el laboratorio para adecuar el modelo *in situ* se utilizaron cepas nativas las cuales se inocularon del suelo donde se encontraban en la explotación de hidrocarburo que se encuentra ubicado en Casanare; el modelo de caja negra nos permite conocer la modelación biológica bajo parámetros y variables en donde se identifica la degradación máxima de la bacteria en condiciones ideales. Cumpliendo con el objetivo de saber en qué porcentaje las bacterias degradan el hidrocarburo.

## FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el porcentaje de degradación de HTP'S, mediante biorremediación aeróbica, usando cepa nativa (*Pseudomonas sp*); en suelos contaminados?

## OBJETIVOS

### GENERAL

Identificar el potencial de la (*Pseudomonas sp*); en el proceso de Biorremediación Aeróbica en suelos contaminados con HTP'S para el tratamiento in-situ (mesocosmos).

### ESPECIFICOS

- Evaluar cuál es la concentración a la cual (*pseudomonas*) remueve mayor cantidad de Hidrocarburo Total de Petróleo HTP's .
- Determinar la eficiencia en porcentaje de remoción de la ( *Pseudomonas*); como alternativa en tratamientos biológicos de suelos; mediante el modelo de la Caja Negra.
- Determinar los beneficios del tratamiento biológico del suelo como factor principal de recuperación in-situ (mesocosmos).

## ESTADO DEL ARTE

Los efectos o consecuencias derivadas de los derrames de petróleo, tiene diferentes enfoques dependiendo del conjunto ambiental involucrado, para el trabajo el factor suelo. A mediados del siglo XX iniciaron las primeras investigaciones encaminadas a buscar el potencial de los microorganismos para biodegradar sustancias (Zobell, 1946; Davis, 1956). Las primeras técnicas fueron parecidas al “*landfarming*” (labranza) los que apoyaron la biorremediación fueron petroleras que patentaron para la remediación de vertimientos de gasolina en los años 70. Para los años 80 suministraron el uso de aire y peróxido mejorando la oxigenación y así la aceleración de los procesos de degradación. En la década de los 90 mejoraron las técnicas de “*air sparging*” (burbujeo de oxígeno) la cual hizo posible la biorremediación por debajo de zonas del nivel freático, también realizaron implementaciones en laboratorio como los primeros intentos con metales pesados y en ambientes anaerobios apoyándose de técnicas de la ingeniería. (Riser-Roberts, 1998).

En algunos países afirman que la biorremediación ha pasado por un proceso evolutivo en principio pensaron que era una técnica marginal y ahora se considera una verdadera industria, para buscar mejorar algunas líneas, se resumieron en los siguientes puntos: A. Biología molecular permitió desarrollar una técnica más rápida permitiendo trabajar en zonas contaminadas, con caracterización de población indígena utilizando su potencial enzimático. (Theron y Cloete, 2000; Watanabe, 2001) B. Integración de los procesos y técnicas innovadoras (por ejemplo geofísica de superficie) que ayudan a comprender y controlar los fenómenos de transporte de nutrientes y otros posibles aditivos. C. biodisponibilidad “*bioavailability*” trata de un factor que en muchos casos está limitando la biodegradación y en otros reduciendo la toxicidad de los contaminantes. D. Desarrollo definitivo de técnicas de bioaumentación realmente útiles (Major et al, 2012).

En cuanto a los factores suelo y agua la remediación por contaminación con hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas y metales pesados, se considerada actualmente como prioridad para el mejoramiento de la calidad ambiental, Dodor 2004; considera que la presencia de estos agentes tóxicos representan un serio riesgo para la salud animal, humana y del ambiente. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y plaguicidas pueden ser transformados y/o utilizados como fuente de nutrientes por diversos microorganismos consiguiendo así su degradación no obstante, los metales pesados no se pueden degradar pero son susceptibles a la transformación y acumulación microbiana (Chaudhry y Ali, 1998).

La contaminación por HTP's puede ser reducida por tecnología convencional, que remueven, alteran o aíslan los contaminantes. Algunas de las tecnologías que son utilizadas es la *ex situ*, como la incineración remoción de suelo contaminado o el bombeo de las aguas contaminadas, o *in situ*, como el recubrimiento o inmovilización física de los contaminantes en el sitio contaminado (EPA, 1995). Todas las tecnologías tienen sus limitaciones y desventajas es así como las tecnologías convencionales generalmente incrementan los riesgos durante la trasferencia de los contaminantes a otros ambientes especialmente en manipulación, transporte y tratamiento. Estas tecnologías son costosas y en la mayoría de casos no destruyen los contaminantes pero lo transfieren de un ambiente a otro. Una complicación de la técnica *in situ* no siempre soluciona el problema y es necesario un monitoreo por largos periodos de tiempo (Litchfield, 2005).

Existe como hipótesis que con el desarrollo de la civilización, los factores antropogénicos tomaron el papel principal en los cambios que pueden sufrir los ecosistemas, a causa de esto busca definir cómo y en que intensidad afecta la realización de investigaciones en torno a un uso sostenible en donde conserve el recurso suelo, cuya condición y funcionamiento depende de la capacidad de funciones tan importantes como las de filtrar, amortiguar y transformar la materia, para proteger el ambiente, entre otras, funciones que incluye procesos metabólicos microbianos implicados en la descomposición de materiales orgánicos; proceso donde

la catálisis del suelo posee un papel fundamental para entender los niveles de actividad microbiana responsables de los procesos que implica biorremediación y degradación de contaminantes y xenobióticos y el estado de los ciclos de los nutrientes durante el desarrollo de tales procesos, estudian las actividades enzimáticas del suelo, y participan procesos metabólicos bióticos, siendo sensibles a los cambios generados por contaminación y están relacionadas directamente con otros factores biológicos, químicos y físicos (Cerón. L 2005)

En la búsqueda de estrategias para la recuperación de suelos con problemas por este tipo de contaminación se ha estudiado ampliamente la identidad y los mecanismos de degradación (Van Hamme *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2001), de microorganismos capaces de catalizar compuestos tóxicos, en las investigaciones que han adelantado para encontrar maneras de incrementar la tasa de degradación de los compuestos tóxicos han desarrollado diferentes tecnologías biorreactivas de alternativa, como el uso directo de los microorganismos en el ambiente o la aplicación de enzimas en los procesos de remediación (Dodor *et al.*, 2004). Cerón y Melgarejo, 2005; presentaron ventajas frente a las metodologías químicas convencionales, para la recuperación de suelos degradados, estas han ofrecido buenos resultados pero hay otros interrogantes acerca del impacto por esta alternativa, la aproximación a estos interrogantes dependieron del tipo de variable, del diseño experimental y la interpretación de los resultados y estará limitada por la sensibilidad de las medidas, las escalas espacio temporales y el conocimiento que tengan para interpretar las funciones del ecosistema.

Un ejemplo, la contaminación por aceite diesel en la base aérea localizada en Yugoslavia, a través de introducción de un índice biológico de fertilidad Mw, que trata de la combinación de las actividades (ureasa, deshidrogenasa, fosfatasa acida y alcalina) y el carbono orgánico total. El carbono orgánico regula la persistencia y degradación de residuos orgánicos (Fenton *et al.*, 1999). La presencia de los hidrocarburos estimulo la mayoría de las actividades estudiadas, encontraron correlaciones significativas entre la cantidad y composición de los contaminantes y el índice de fertilidad Mw, demostrando la relación entre las actividades y la degradación parcial de los hidrocarburos. En algunos casos pueden formar combinaciones muy estables con la materia orgánica, por lo tanto los contaminantes no están disponibles para los microorganismos y así se puede retardar su efecto toxico sobre la micro y mesobiota, pero, por efecto de la inmovilización los procesos de biorremediación queda limitados, así como otros factores (disponibilidad de nutrientes y pH) son necesarios para que se dé la utilización de tales contaminantes como fuente de carbón.

La biorremediación es una alternativa *in situ* o *ex situ*, esta opción debe ser evaluada por el rango de compuestos que pueden ser degradados, en largos periodos de tiempo y las condiciones específicas en cada sitio contaminado. Los factores que afectan la biorremediación dependerá de las condiciones ambientales del sitio contaminado (hidrogeoquímica), el tipo y numero de microorganismos presentes y la estructura química de los contaminantes que serán degradados. La biorremediación puede ser afectada por otros factores como la temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos orgánicos, interacciones abióticas y composición de la comunidad microbiana. Para más información de las ventajas y desventajas de la biorremediación *ex situ* e *in situ* (ver tabla N° 1).



**Tabla 1. Comparación de biorremediación *in situ* vs *ex situ***

	<b>IN SITU</b>	<b>EX SITU</b>
<b>Sistema</b>	Depósito de material contaminado donde hay contaminación, para controlar y modificar las condiciones y estimular la biodegradación.	Excavación de material a trabajar de forma controlada, en forma de celda "lang farming" o en algún tipo de reactor
<b>Caracterización</b>	Requiere de mayor detalle al momento de hacer el muestreo, como las fisicoquímicas y de hidrogeología	Realiza el muestreo; ventaja, manipulación en laboratorio.
<b>Ventajas</b>	Menor costo en contaminación a profundidad, y es utilizada bajo instalaciones	Mejor control de condiciones
<b>Desventajas</b>	El control de las condiciones es más difícil y depende mucho de las condiciones subterráneas.	Puede ser más costosa
<b>Observaciones</b>	Muy útil para contaminación subterránea de plantas petroquímicas, en suelos arenosos y zonas costeras, las limitaciones se ven en suelos arcillosos y con hidrocarburos muy viscosos.	Usado para contaminación superficial de vegetación pantanosa contaminada, algunos lodos de perforación y recortes contaminados, suelos agrícolas contaminados.

**FUENTE:** Bioremediation Potential of Oil Impacted Soil and Water in the Mexican Tropics; Verónica Domínguez, Leonardo García; modificado por los autores. 2014.

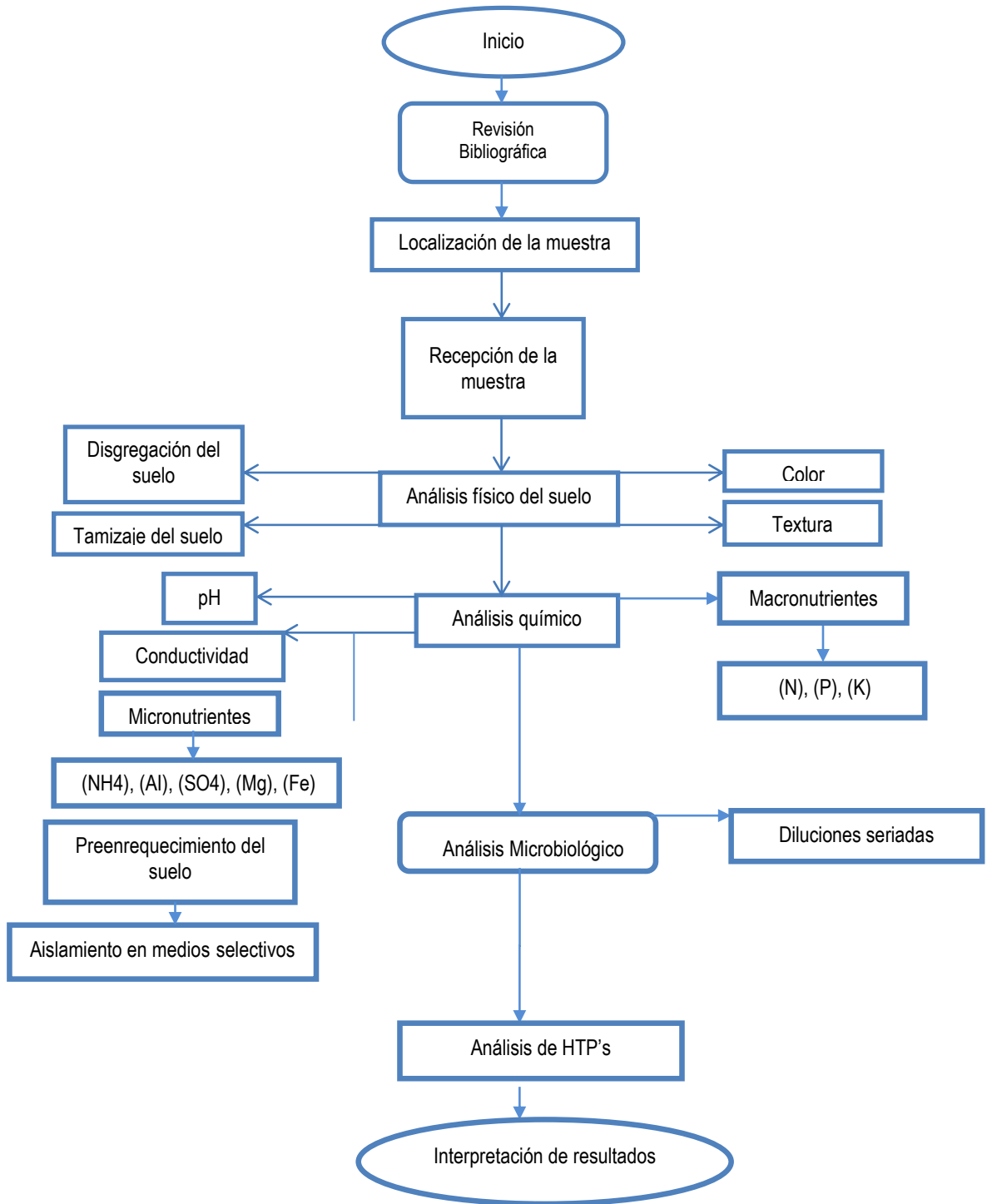
Estrategias de Biorremediación, *in situ*, utilizada por la facilidad de no escavar no transportar la matriz contaminada, lo cual genera un bajo impacto en otros ambientes. Generalmente, los factores limitantes para una biodegradación eficiente son la baja disponibilidad de ATE<sup>4</sup> y nutrientes y en algunas ocasiones la baja población de microorganismos degradadores nativos (Venosa y Zhu, 2003).

El tratamiento más utilizado durante la biorremediación es la bioestimulación, donde se identifican y suministran los factores limitantes logrando un balance de masas y aumentando las tasas de degradación. Generalmente casi todos los ambientes poseen microorganismos nativos con capacidad para degradar los compuestos orgánicos contaminantes (Vidali, 2001), los microorganismos son cultivados en laboratorio y posteriormente reintroducidos. La bioaumentación con microorganismos nativos o externos se emplea para lograr tasas de biorremediación mayores. Los microorganismos externos (modificados genéticamente o no) difícilmente pueden establecerse y mantenerse en ambientes contaminados, sin embargo trabajan para que dé resultados.

La biorremediación *ex situ* involucra la remoción y transporte de la matriz contaminada, controlando las condiciones ambientales y aumentando las tasas de degradación; la biolabranza (*landfarming*) utiliza los microorganismos degradadores nativos del suelo, durante el desarrollo de la técnica se debe prestar especial atención a la concentración de nutrientes, pH y humedad del suelos. Con el tiempo, se logra establecer una población de degradadores con una alta capacidad degradadora (Cleves y Sandoval, 2001).

<sup>4</sup> ATE: Aceptores terminales de electrones.

## MARCO METODOLÓGICO



Fuente: Los Autores, 2014

**Localización.** El presente trabajo se realizó con 2 Kilogramos de muestra<sup>5</sup>, de suelo contaminado con Hidrocarburo, provenientes del pozo 32 de pacify rubiales ubicado en la población de Orocue Casanare. En cuanto al desarrollo de análisis físicos, químicos y microbiológicos de la muestra de suelo contaminada, se realizaron bajo los protocolos de Lamotte 2010<sup>6</sup>, los análisis físicos y químicos; en cuanto a los procedimiento metodológicos microbiológicos se llevaron a cabo mediante protocolos de Martínez; 1998; en los Laboratorio de Microbiología y Biología de la Universidad ECCI, Bogotá Colombia.

**Análisis Físico del Suelo.** Para este ítem se realizó bajo el protocolo del IGAC, se disgregó el suelo para conocer los porcentajes de humedad presente en la muestra, cada vez que se disgregó la muestra se observó que era compacta de color café y presentaba trazas de materia orgánica 20/08 según lo indica la tabla munsell para determinar color en muestras de suelo; para este análisis se tomó la muestra y se dejó airear para su deshidratar, se procedió a realizar la limpieza de pasto y otros residuos; se identificaron polipredones (ver imagen1).

**Imagen 1** Identificación de Polipredones; método IGAC



**Fuente. Los autores; 2014.**

<sup>5</sup> La muestra del suelo del Orocue Casanare se pudo clasificar como suelos entisoles, los cuales son suelos jóvenes generalmente fértiles de la zona productiva de la región del Casanare. Cuando se realizó el análisis de la muestra se evidenció grandes cantidades de arenas cuando se le realizó el tamizaje correspondiente y también presentaba grandes concentración de humedad en el suelo, Los cuales son característicos de la región.

<sup>6</sup> Lamotte; 2010; Modelo Combinación STH suelo han ofrecido métodos simplificados para la determinación de nutrientes disponibles se encuentran en los suelos agrícolas por más de cuarenta años. Métodos de ensayo colorimétricos se utilizan para la mayoría de los factores de prueba. Las pruebas de calcio, sulfato y cloruros se basan en mediciones de turbidez. Análisis de potasio también emplea una medición de la turbidez, el uso de un dispositivo de lectura única diseñada en laboratorios La Motte para leer directamente en libras por acre. Un procedimiento de extracción simple, utilizando Morgan Solución de Extracción universal, proporciona el extracto de suelo líquido para todas las pruebas de nutrientes con la excepción de cloruro, que se extrae con agua desmineralizada. La prueba de cribado Humus, realizado sobre una muestra-desmineralizada suspensión de agua del suelo, emplea a cinco estándares de color para la medición rápida del contenido de humus del suelo. *La Motte Soil Handbook* (Order Code 1504) by Staff, LaMotte Company.

Cuentan con trazos de arena y manchas naranjas, estas se deben a la presencia de minerales como (sílice coloide) tiene presencia de orificios las cuales se asume que son hechos por lombriz; tiene forma laminar y rectangular los polipredones tienen un tamaño de 1,5 cm los cuales se disgregan para hacer más fácil la tarea del tamizaje del restante de las muestras de suelo.

Se procedió a tamizar el suelo en 8n tamices de diferentes tamaños. El primer tamaño del tamiz es de 2.000 micras, 850 micras, 425 ppm, 425 micras, 300 ppm, 300 micras, 250 micras y 125 micras (ver imagen 2)

**Imagen 2** Identificación del tamiz



**Fuente. Los autores; 2014**

El tamizaje se realiza de una forma constante durante 20 minutos, el color del suelo se va aclarando proporcionalmente dependiendo de las micras, su forma granulométrica es de diferentes tamaños y se evidenciaron arenas al final del último tamiz de la muestra de suelo.

**Análisis Químico del Suelo.** En esta etapa se utilizó Modelo Combinación STH, para la determinación de macronutrientes (Nitrógeno N, Potasio K y Fosforo P) y micronutrientes (Manganeso Mn; Magnesio Mg; Sulfato SO<sub>4</sub>, Hierro Fe, Aluminio Al, Amonio NH<sub>4</sub>) en cuanto a las determinaciones químicas: para pH (se realizó por potenciometria<sup>7</sup>) y para Conductividad Eléctrica (Conductivímetro<sup>8</sup>) ítems para poder realizar los análisis de pH y de conductividad en la muestra del suelo, se tomó en un vaso precipitado 10 mililitros de agua destilada y 100 gramos de suelo del ultimo tamizaje; se procedió a realizar una mezcla de pasta

---

<sup>7</sup>Los métodos potenciométricos se basan en la medida del potencial eléctrico (respecto a una referencia) de un electrodo sumergido en la disolución problema, a partir de la cual es posible establecer la concentración de la misma directa o indirectamente (Calderón F;2000)

<sup>8</sup> Es un instrumento específicamente diseñado para medir la conductividad en suelos y soluciones de regado de forma correcta y rápida. Se suministra completo con dos sondas. con punta cónica de acero inoxidable para mediciones directas de suelo, y para Soluciones de regadío enriquecidas con fertilizantes. mide tanto la conductividad del suelo (mS/cm) como la sal en gramos por litro. Pueden seleccionarse las diferentes escalas mediante dos teclas en la parte frontal y dos LEDs separados indican el parámetro que está siendo analizado (Calderón F; 2000).

saturación<sup>9</sup> del suelo con el propósito de tomar los datos de pH y conductividad en la muestra del suelo (ver imagen 3)

**Imagen 3** Identificación del potenciómetro en la pasta de saturación



**Fuente, Los Autores; 2014**

Los resultados de pH y Conductividad se tomaron directamente en la pasta de saturación con el multiparametro de bolsillo ATAGO DEC-2<sup>10</sup>, para realizar la toma de los datos se calibro el equipo con los buffer que trae el multiparametro del laboratorio; teniendo el equipo previamente calibrado y ajustado se procedió a tomar los datos de pH y Conductividad.

**Análisis de macronutrientes.** Para realizar el análisis correspondiente para este parámetro químico, se utilizó suelo tamizado para realizar los análisis correspondientes del equipo *La Motte* de macronutrientes (ver imagen 4)

---

<sup>9</sup> Un método muy conveniente de analizar el suelo es en base volumétrica de pasta saturada. Este método tiene la ventaja de que no es necesario secar el suelo. Se gana tiempo y espacio. Las condiciones de pasta saturada son bastante reproducibles. Durante el proceso de Saturación y amasado se elimina el aire de los poros. Los resultados suelen ser bastante fieles y reflejan muy bien la realidad del campo. Como precaución especial, a la pasta saturada se le debe medir el pH lo más pronto posible ya que este variará con el tiempo.

<sup>10</sup> pH metro de bolsillo 2010; El medidor de pH de Atago DPH-2 Por estas características es perfecto para diferentes aplicaciones incluyendo: control de producción de comidas y bebidas, elaboración de cerveza, fermentación, tierra, hidrocultivo, aceite de corte, líquidos de lavado alcalinos, y otras soluciones solubles. Esta pHmetro de alta calidad posee excelentes características, Además de medir el pH en soluciones líquidas este equipo es capaz de medir el pH en alimentos semisólidos, como el pH del paté, pH de carnes enlatadas, Mide el pH sin necesidad de diluir la muestra.

**Imagen 4** Identificación del kit de macronutrientes



**Fuente. Los Autores; 2014**

Los cuales consiste en medir (NPK) del suelo presente en la muestra adquirida; Con la pasta de saturación ya lista se procedía a tomar de 5 a 10 gotas del agua filtrada con extracto de suelo, se procedía a colocar en una cuchara y se le agrega una gota de reactivo # 1 de nitratos y se homogenizaba durante un minuto aproximadamente, después se le agregaba 1 gota de reactivo # 2 de nitratos y se esperaba aproximadamente un minuto y se comparaba con la tabla de color. Este era el caso para nitrato pero también era lo mismo para potasio y fosforo, lo único que cambiaba era el agente reactor para cada medición química (ver imagen 5).

**Imagen 5** Comparación de nitrato con la tabla de color



**Fuente. Los Autores; 2014**

**Análisis de Micronutrientes.** Para este ítems se utilizó el kit de micronutrientes (ver imagen 6) de la marca *La Motte* el cual se nos facilitó en el laboratorio de la universidad ECCI.

**Imagen 6 .** Identificación del kit de micronutrientes



**Fuente.** Los Autores; 2014

Con este kit se realizó en análisis a varias propiedades químicas del suelo entre esta Aluminio, Amonio, sulfato entre otras. Para este ejemplo se tomó el kit de sulfatos que consiste en tomar 5 gotas del extracto del suelo y llevarlo a la cuchara, de ahí se procedía a agregar 1 gota del reactivo # 1 de sulfatos y se homogenizaba durante un minuto, se dejaba precipitar 1 minuto y se procedía a comparar con la tabla de color para sulfato y dar una conclusión de este parámetro (ver imagen 7).

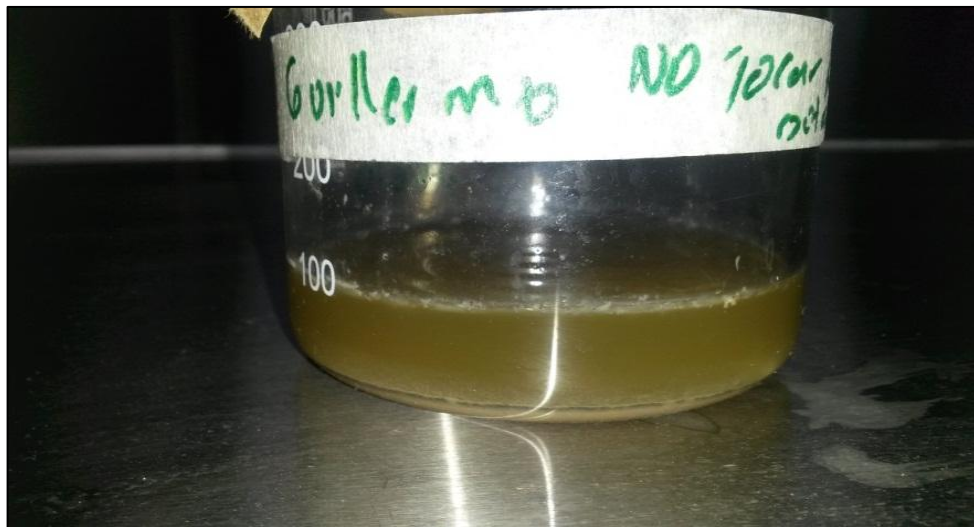
**Imagen 7** Comparación de sulfato



**Fuente.** Los Autores; 2014

**Análisis Microbiológico del Suelo.** Se realizó un pre-enriquecimiento del suelo en agua peptonada al 1% de Extracto de Levadura y 1% Cloruro de Sodio (NaCl), en el cual se llevó a un beaker con agua destilada que contenía 300 ml. Después de haber homogenizado se procede a sellar la boca del vaso precipitado con un papel craft colocando la cinta indicadora de esterilización; se procedía a colocar este Beaker en la autoclave durante 45 minutos para poder esterilizar el pre-enriquecimiento en donde se iba a colocar parte del suelo para reactivar los microorganismos presentes en la muestra, ya teniendo esterilizado el medio en el cual se va realizar el pre-enriquecimiento se procedía a agregar 100 gr de la muestra del suelo previamente tamizada en el beaker, todo este proceso se realizaba en la cabina de flujo laminar la cual garantiza una esterilización en el proceso. Por último se procede a dejar la muestra 48 horas en la incubadora. (Ver imagen 8).

**Imagen 8** Pre-enriquecimiento de la muestra

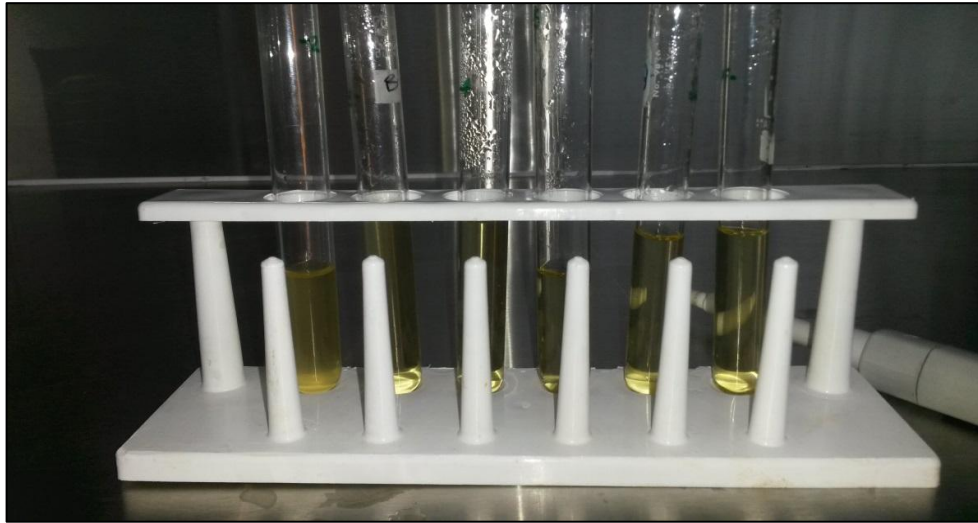


**Fuente. Los Autores; 2014**

**Diluciones Seriadadas.** Las diluciones seriadas consiste en tomar una muestra de un medio y llevarla a las -2, -3,-4 hasta -9 de una sustancia escogida; para el caso de esta investigación se tomó un mililitro del pre-enriquecimiento en cual ya llevaba 48 horas de incubación y presentaba olores fétidos provenientes de la actividad microbiana en la muestra del beaker, se tenía una seria de 9 tubos tapa rosca de 16 x 150 con caldo nutritivo, se procede a sacar un mililitro de la muestra del Beaker y se pasa al tubo de la -2, después del tubo de la -2 se procede a sacar 1 mililitro y se pasa al tubo de la -3. Todo este proceso se hacer hasta el tubo a la -9. Se deja estos tubos incubando por un periodo de 24 horas para poder tener diferentes concentraciones de los microorganismos en los tubos tapa rosca (ver imagen9).



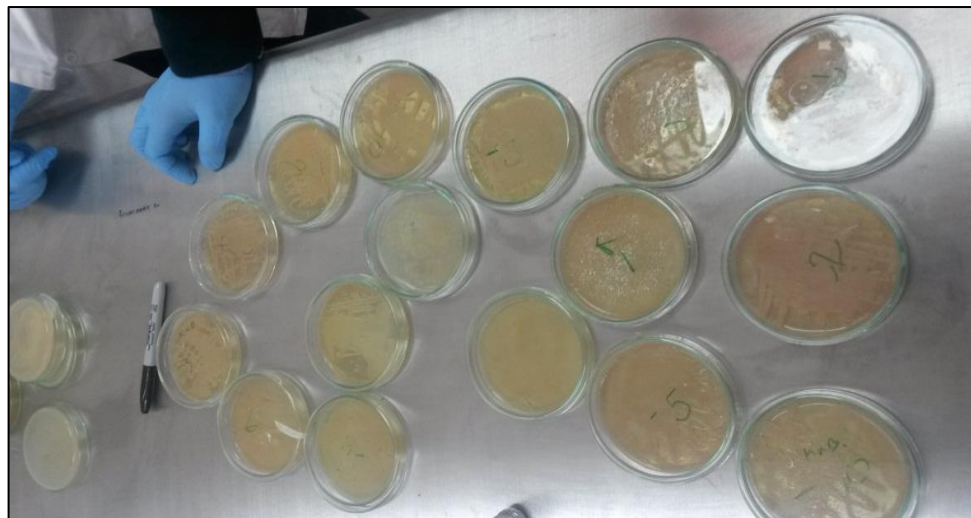
**Imagen 9** Soluciones seriadas



**Fuente. Los Autores; 2014**

**Aislamiento en medios selectivos.** En el aislamiento consiste en seleccionar medios de cultivos los cuales sean específicos para que crezcan las colonias de los microorganismos, seleccionar el medio más adecuado para la biorremediación del suelo; para este aislamiento se seleccionó el medio de cultivo cetrimide y el medio selectivo kin B. Después de tener la preparación de los medios se procede a servir en cajas de Petri previamente esterilizada y se le adiciona a estas cajas 1 ml de cada de los tubos de las soluciones seriadas (ver imagen 10).

**Imagen 10** Siembra de microorganismo



**Fuente. Los autores; 2014**

Después de haber realizado la siembra de los microorganismos en la caja de Petri se procedía a dejar en incubación durante 48 horas a una temperatura de 28 a 32 grados centígrados. Se cumplía las 48 horas de incubación y se procedía a realizar en conteo de las unidades formadoras de colonia presente en cada caja de Petri. (Ver imagen 11)

**Imagen 11** Conteo de unidades formadoras de colonia



**Fuente. Los autores; 2014**

Después de haber realizado el conteo de cada una de las cajas de petri se procedió a realizar la tinción de gram<sup>11</sup>. Se pudo identificar que lo microorganismo que se encontraron en estos medios fue *pseudomonas* gran negativa. Con los artículos se iba a la fija que se tendría *Pseudomonas* a la hora de realizar la siembra, también se sabe que el medio King B es un agar selectivo para esta clase de microorganismo y además se le adicióno glicerina la cual indica si se dan los microorganismo en este medio.

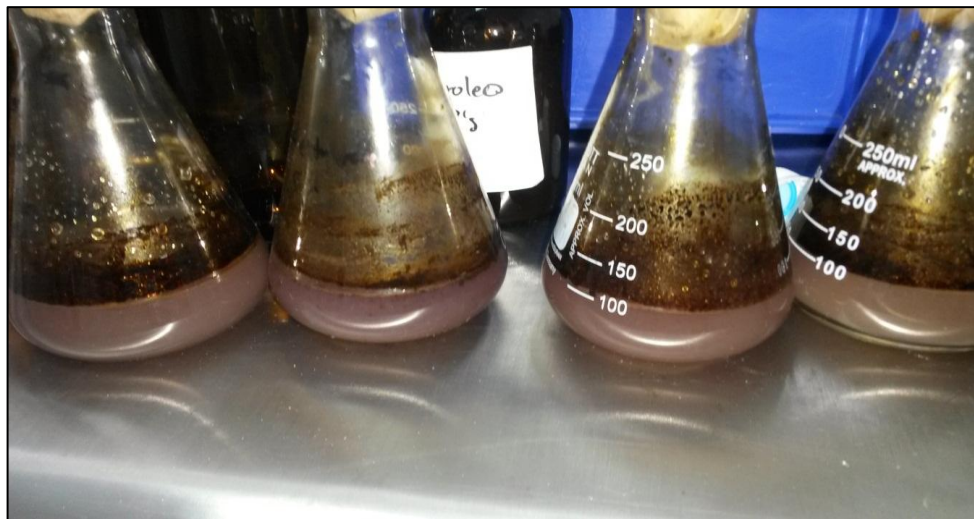
**Cinética de *Pseudomonas sp* vs Contaminante.** La cinética de crecimiento consiste en preparar un medio en el cual se va a colocar los microorganismos de las cajas de Petri en nueve enlermeyer que contiene 150 ml del medio de PSD<sup>12</sup> el cual se creó en el laboratorio para colocar los microorganismos con el hidrocarburo. (Ver imagen 12)

---

<sup>11</sup> La tinción de gram o coloración de gram es un tipo de tinción diferencial empleado para la visualización de las estructuras de bacterias, esto con el fin de distinguir la morfología de cada microorganismo los cuales son diferentes a cada género de microorganismo que se encuentra en nuestro entorno natural.

<sup>12</sup> PSD: Nombre del medio creado en el laboratorio por los autores. El medio PSD contiene extracto de carne, caldo nutritivo y cloruro de sodio.

**Imagen 12** Erlenmeyer r con microorganismo e hidrocarburo



**Fuente. Los autores 2014**

En nueve Erlenmeyer se colocaron muestra de las cajas de Petri, tres Erlenmeyer contienen la siembra de organismos de -8 con una concentración del 1% y los siguientes tres también contienen el medio selectivo de -8 con concentración de 1.5%, y los tres últimos erlenmeyer con una concentración del 2% en un medio selectivo de a la -9 Se colocaron los nueve erlenmeyer en agitador magnético. Estas concentraciones corresponden al hidrocarburo presente en el medio (ver imagen 13).

**Imagen 13** Agitador magnético



**Fuente. Los autores; 2014**

Durante una semana se tomaron datos de absorbancia cada 8 horas, para identificar el crecimiento de los microorganismos vs la concentración del contaminante a una longitud de onda de 540nm; Al siguiente día se

realizó la misma prueba y se tomó 16 muestras de pH, oxígeno cada hora hasta completar las 16 muestras necesarias en el laboratorio.

**Análisis de HTP's.** Los análisis de HTP's se realizaron en el laboratorio de la empresa ANTEK, el cual contaba con el equipo infrarrojo de absorción para realizar los análisis de HTP's tanto a la muestra de hidrocarburo y a la muestra con microorganismo. Esto con el fin conocer la concentración inicial y final de las muestras para conocer la cantidad de remoción lograda por los microorganismo. Para esta prueba se tomó una muestra del 1%, 1.5% y 2% para que se realizara el análisis; estas muestras se procesaron en botellas ámbar para tener la cadena de custodia y garantizar que las muestras no sufrieran ninguna alteración. (Ver imagen 14)

**Imagen 14** Cadena de custodia de las muestras ámbar



**Fuente. Los autores; 2014**

Como se puede evidenciar en la imagen es importante que las muestras se embalaran en botellas ámbar para garantizar el movimiento de los frascos del laboratorio de la Universidad ECCI hasta las instalaciones de los laboratorios de Antek los cuales quedan ubicados en la dirección calle 25B No. 85B - 54. Las muestras fueron recibidas en la parte de recepción por la ingeniera Lady Rodríguez coordinadora de proyectos.

### Ecuaciones de Aplicación del Modelo de Monod.

*Velocidad específica*

$$(\mu) = \frac{x_1 - x_2}{t_2 - t_1} \text{ (Ecuación 1.)}$$

*Dónde:  $X_1$  = Absorbancia n (inicial)*

*Dónde:  $X_2$  = Absorbancia n (final)*

*Dónde:  $t_1$  = Tiempo 1*

*Dónde:  $t_2$  = Tiempo 2*

*Tiempo de duplicación =  $\log(2 * (X_n))$ . (Ecuación 2.)*

*$X_n$  = Absorbancia. (la diferencia en Absorbancia inicial y final)*

$$\text{Velocidad máxima } (\mu_{max}) = \frac{\mu_1 + 1}{\mu_1 + k}, \text{ (Ecuación 3)}$$

*(k) constante de crecimiento = 0,429. (Aplica para las tres concentraciones). (constante de crecimiento de la Pseudomonas)*

## ESTADISTICA DE LOS DATOS

**Tabla 2** Estadística ANOVA

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
2,558	29	49,692	1,713517241	0,248853473	0.77	
2,269	29	46,009	1,586517241	0,267552401	0.83	
2,116	29	49,809	1,717551724	0,312251756	100	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,322048023	2	0,161024011	0,582957324	0,560487315	3,105156608
Dentro de los grupos	23,20241366	84	0,27621921			
Total	23,52446168	86				

**Fuente: Los autores 2015**

El análisis de varianza permite determinar la diferencia entre las tres concentraciones de Hidrocarburo, en este caso demostrando que la del 2% difiere con un resultado de 0,3122518 ante las otras dos concentraciones 1% (0,2488535) y 1.5% (0,2675524) respectivamente.

## RESULTADOS

**Análisis de Macronutrientes.** Para realizar el análisis de este parámetro de macronutrientes se tomó muestras de suelo tamizados; que consistía tomar cada uno de estos parámetros químicos para caracterizar

**Tabla 3** Datos macronutrientes del suelo

Parámetro	Unidades	Valor
NO <sub>2</sub> -N	ppm	10
NH <sub>3</sub> -N	ppm	5
(NO <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> -N	ppm	1
P	ppm	75
K <sup>+</sup>	ppm	4
Mg <sup>+</sup>	ppm	5

**Fuente. Los autores; 2014**

Con estudios de suelo, se pueden evidenciar con los datos obtenidos que estos suelos son ricos en concentraciones de materia orgánica natural a su zona; los cuales se recalcan con los datos obtenidos en el laboratorio, revisando en la base de datos del Instituto Agustín Codazzi los suelos de la región del Casanare son suelos arenosos. En las muestras de suelos que se analizó en el laboratorio se identificaron alta presencia de minerales, con trazas constantes de hierro, lo cual nos lleva a la conclusión que los suelos de la región del Casanare por sus propiedades naturales no han sufrido ninguna alteración entrópica. La única alteración que se le está realizando a este suelo son las actividades de la industria petrolera por lo consiguiente la agricultura no se ha trabajado en estos lugares en donde ahora solo se está realizando la actividad de extracción del hidrocarburo. El parámetro más relevante en análisis de macronutrientes es el elemento del Fósforo (P), se debe que el macronutriente fósforo (P) es esencial para los procesos metabólicos de la plantas de la zonas y se encuentra este en los minerales del suelo. Debido a la mayor presencia del fósforo en el suelo este elemento es poco soluble. Para mantener este equilibrio en la zona la mayor parte del fósforo es absorbido por las raíces de las plantas y vuelve a ser depositado en el suelo para mantener el equilibrio y no afectar las condiciones naturales de la zona.

**Análisis Micronutrientes.** Para el análisis micronutrientes se tomaron las mismas muestras de suelos las cuales estaban previamente tamizadas. Se procedió a realizar el análisis químico a la muestra según el proceso del kit lamotte. Los datos que se obtuvieron fueron los siguientes.

**Tabla 4** Datos micronutrientes del suelo.

Parámetro	Unidades	Resultados Obtenidos
Ca	ppm	1400

Cl <sup>-</sup>	ppm	500
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ppm	15
Al <sup>+2</sup>	ppm	10
Mn <sup>+</sup>	ppm	5

**Fuente. Los autores; 2014**

En el caso de cloruro están presente en el mayor parte del suelo en concentraciones pequeñas, pero en el caso del sector de Casanare se evidencia mayores concentración de cloruro y hierro producto de las actividades industriales de la zona de estudio en el caso de esta investigación. Se muestra varias trazas de hierro férrico y de los dos restantes se evidencio poca concentración de los minerales presente en la muestra del suelo. Que la materia orgánica presente en esta muestra de suelo es de forma natural, para el caso del calcio como esta zona del Casanare no está húmeda en sus condiciones climatológicas como menor evaporidad genera estas mayores concentraciones en el suelo.

**Análisis Físicos.** Se tomaron como parámetros físicos el pH, la conductividad, temperatura y textura. Con estos análisis se buscaba conocer el estado del suelo y poder caracterizar sus condiciones física, a continuación se relaciona los resultados obtenidos en el laboratorio.

**Tabla 5. Datos físicos del suelo en la pasta de saturación.**

Parámetros	Unidades	Resultados
pH	n/a	5.3
Conductividad	Ms/cm3	0.1
Temperatura	°C	22.3
Textura	n/a	Granulométrica

**Fuente. Los autores; 2014**

Con el pH que se obtuvo en el análisis se dice que son suelos ácidos a las concentraciones de los diversos minerales en la muestra del estudio, se determina que la conductividad es baja por la poca concentración de los minerales; las cuales son las apropiadas para que las plantas de la zona absorban estos nutrientes en la muestra del suelo.

**Crecimiento en medio selectivo King B:**



**Tabla 6** Recuento de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo de (*Pseudomonas sp*)

Dilución Seriada 2	Dilución Seriada 2	Dilución Seriada 3	Dilución Seriada 3	Dilución Seriada 4	Dilución Seriada 4
1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>4</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>5</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X1 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>5</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
Dilución Seriada 5	Dilución Seriada 5	Dilución Seriada 6	Dilución Seriada 6	Dilución Seriada 7	Dilución Seriada 7
1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>4</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>4</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>5</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>5</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>4</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>2</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc
Dilución Seriada 8	Dilución Seriada 8	Dilución Seriada 9	Dilución Seriada 9	Dilución Seriada 10	Dilución Seriada 10
1X10 <sup>7</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>4</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>6</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>8</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>17</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>17</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>3</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>6</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc
1X10 <sup>10</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>11</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>7</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>10</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc	1X10 <sup>1</sup> gcell/ml ufc

**Fuente. Los autores; 2014**

El conteo de las colonias se tomó a partir de las diluciones seriadas, las cuales contenían muestras de suelo previamente tamizado y de caldo nutritivo; después de tener las diluciones se procede a tomar un mililitro de cada muestra y depositarla en la caja de Petri la cual contenía medio nutritivo selectivo King B. Ya teniendo inoculado las cajas de Petri se procede a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonia. Se toma la caja de Petri y se divide en cuatro secciones; en una de las secciones se empiezan a contar cada punto que se encuentra en esa sección y el resultado obtenido en la sección se multiplica por las otras tres secciones. Para caja de Petri se procedió a realizar el mismo conteo, los resultados del conteo de las unidades formadoras de colonia se puede ver en la tabla número 5 se puede evidenciar el conteo de las colonias que se encontraron en cada una de la caja de petri, las unidades que se contaron los microorganismo fueron UFC (unidades formadoras de colonia). Para el trabajo de grado se escogieron las diluciones de las -8 y -9 porque presentaba mayor población de microorganismo. Las diluciones anteriores se descartaron porque presentaban una población menor a las muestras menores a las concentraciones de -8. Después de obtener el conteo de las cajas de petri, se procedía a identificar la estructura del microorganismo; por último se procedió a conservar las cajas de -8 y -9 y desechar las otras cajas. Después de tener las otras cajas conservadas se procedió a duplicar para contar con más réplicas del microorganismo y con esto poderlas utilizar en la tapa de investigación.

**Identificación de los microorganismos mediante tinción de Gram.** Para la identificación de los microorganismos se tomó la metodología de tinción de Gram, se identificó que el microorganismo que se habían obtenido era *Pseudomonas* gram negativa, las cuales se obtuvieron del mismo suelo. Por tal motivo se denominan microorganismo nativos por su extracción que se logró en el suelo del Casanare. De cada caja de Petri seriada se tomó una muestra de la unidades formadoras de colonia para identificar los microorganismo; se tomaba con un asa redonda cada muestra y se coloca sobre una lámina se flamea por 30 segundos. Después realizar este paso se procede a colocar lugol, fucsina, acetona y por ultimo cristal violeta, esto con el fin de identificar la estructura del microorganismo. De cada caja petri se realizó el mismo procedimiento para identificar cada especie.

## CONCENTRACIÓN 1%:

**Tabla 7** Datos significativos concentración al 1%<sup>13</sup>

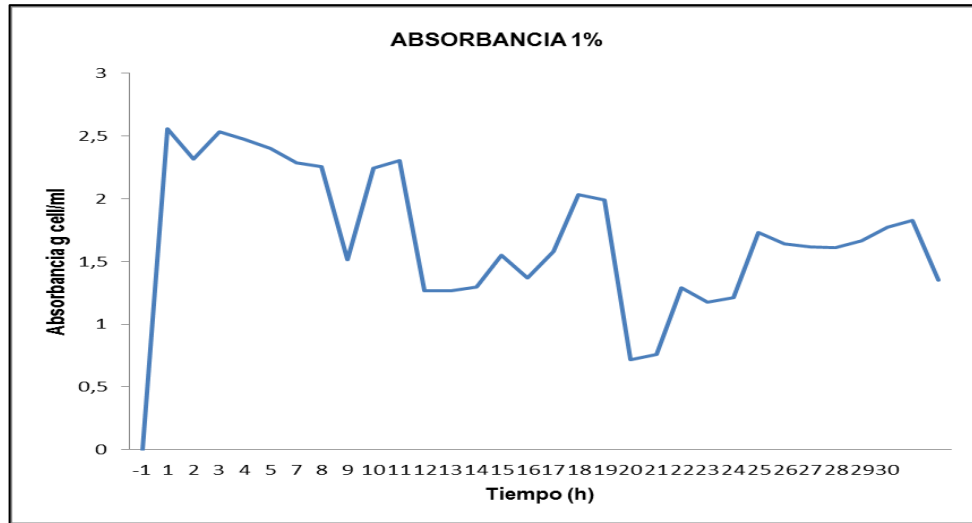
Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica (μ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima (μ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O2 (ppm)
-1	2,558	-0,12	0,70893054	2,84789644	8	13,90%
1	2,318	0,218	0,66614343	1,88253478	8	6,60%
4	2,400	-0,113	0,68124124	2,80696203	8	6,60%
8	1,511	0,732	0,48029446	1,4918174	8	3,10%
9	2,243	0,058	0,65185927	2,1724846	8	1,30%
10	2,301	-1,037	0,66294661	0,06085526	8	2,40%
11	1,264	-0,001	0,40277707	2,33411215	8	3,50%
17	2,032	-0,042	0,6089537	2,4754522	8	3,20%
18	1,990	-1,272	0,59988307	0,32265718	8	7,30%
19	0,718	0,039	0,15715444	2,22008547	8	6,40%
20	0,757	0,533	0,18012588	1,59355509	8	5,90%
24	1,733	-0,09	0,53982856	2,68436578	8	4,50%
25	1,643	-0,03	0,51666756	2,43107769	8	7,50%
30	1,830	-0,478	0,56348109	-10,6530612	8	6,50%

**Fuente. Los autores; 2014**

Se tomaron 30 datos los cuales fueron obtenidos desde la hora cero y se procedió a tomar datos cada hora; el pH siempre fue constante en un rango de 8 (básico). En la hora <sup>-1</sup> se puede evidenciar que el tiempo de duplicación inicial de la muestra es de 0,7089 gcell/ml, con crecimiento significativo en las horas 9 y 10 con valores de 0,6518 gcell/ml y 0,6629 gcell/ml respectivamente, debido a sustrato y las condiciones estos datos varían constantemente siendo los datos más bajos de tiempo de duplicación las horas 19 y 20 con 0,1571 gcell/ml y 0,1801 gcell/ml.(ver tabla 11. Datos completos)

<sup>13</sup> Los Datos que se representan en las tablas 6,7 y 8 tienen numeración saltada debido a que son los datos más relevantes, para ver todos los datos en orden, ver anexos.

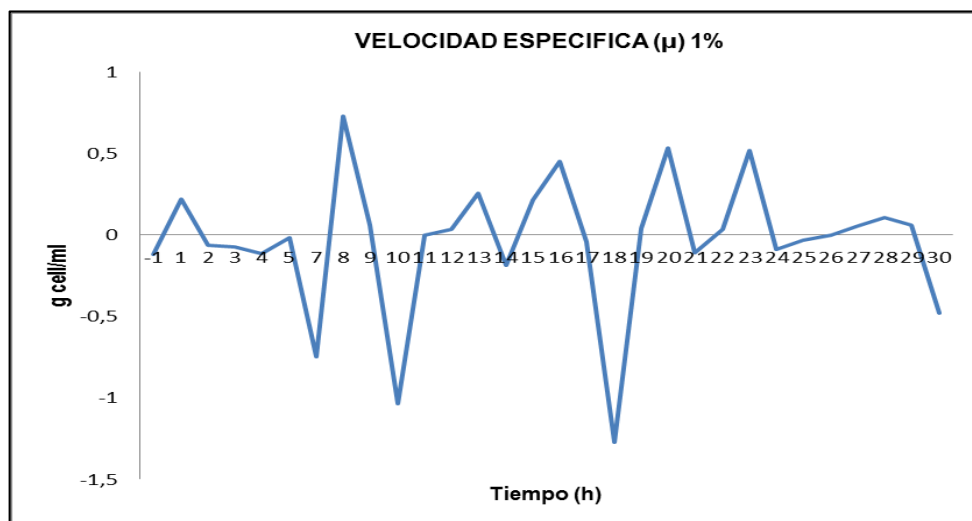
**Gráfica 1** Comportamiento de Crecimiento (*Pseudomonas sp*) al 1% de Crudo



**Fuente. Los autores, 2015.**

Se observa que con el 1% de HTP's hay una tendencia a disminuir la absorbancia, partiendo de los valores de 2,558 gcell/ml hasta llegar a 1,830 gcell/ml. Demostrando que la población de bacterias varía durante el tiempo de experimentación, debido a los procesos metabólicos específicos y al grado de reacción de las colonias bacterianas ante las diferentes concentraciones de HTP's. La población disminuye a medida que se reduce el sustrato. La diferencia para el 1% es de 728 gcell/ml.

**Gráfica 2** Comportamiento de Velocidad Especifica (*Pseudomonas sp*) al 1% de Crudo

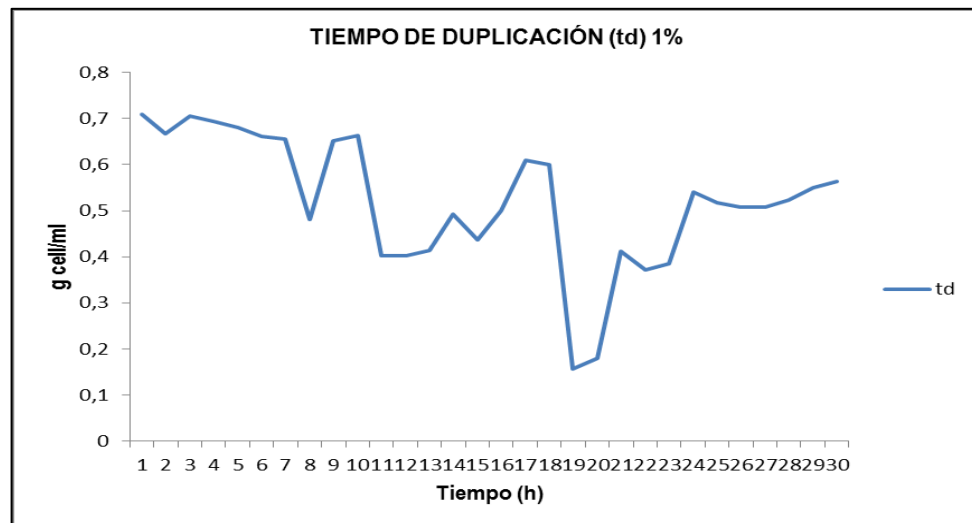


**Fuente. Los autores, 2015.**

Concentración de 1% en los valores de velocidad específica tenemos 10 valores que son relevantes los cuales se presenta en fase exponencial, estos son los que van del punto 12-13, 15-16, 19-20, 22,23 y de 27-

28 que se encuentran en valores positivos. Del punto 28 hasta el 30 se encuentra en una fase de declinación o muerte en donde se puede determinar el agotamiento de los nutrientes.

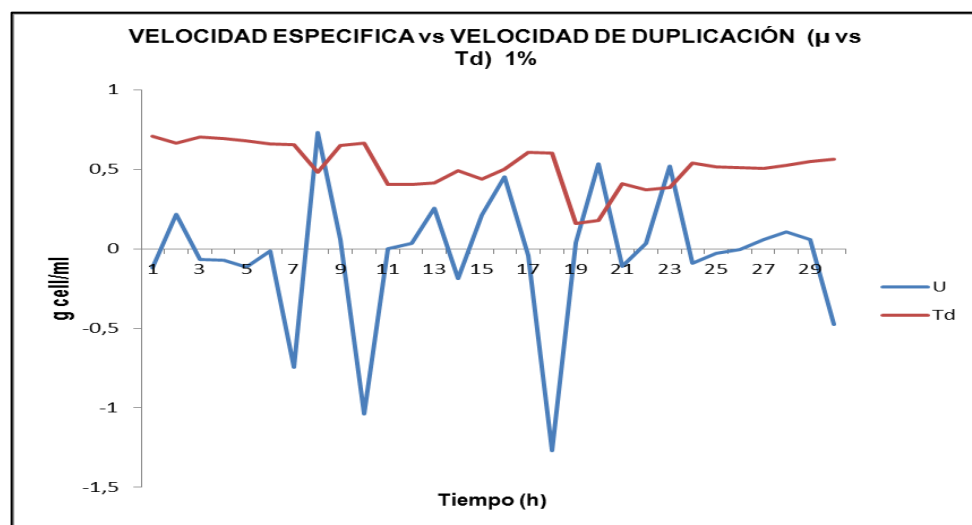
**Gráfica 3** Comportamiento Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 1% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

Para la concentración del 1% la velocidad de duplicación es nula debido a que inicialmente comienza con un valor de 0,7089 y no hay un valor que supere este, en medio del procedimiento hay descensos y vuelve a reproducirse pero no exceden la inicial; a diferencia de las concentraciones de 1.5% y 2% la velocidad de duplicación tiene algunos datos que supera los iniciales.

**Gráfica 4** Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 1% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

La velocidad específica es inversamente proporcional a la velocidad de duplicación, debido que en la  $\mu$  hay varios picos donde se tiene un estado estacionario que dependen de los nutrientes, en la  $td$  o velocidad de duplicación disminuye, porque al haber menos duplicación de microorganismo hay menor velocidad en la cual se está degradando el sustrato, en este caso su alimento es el HTP's.

## CONCENTRACIÓN 1,5%

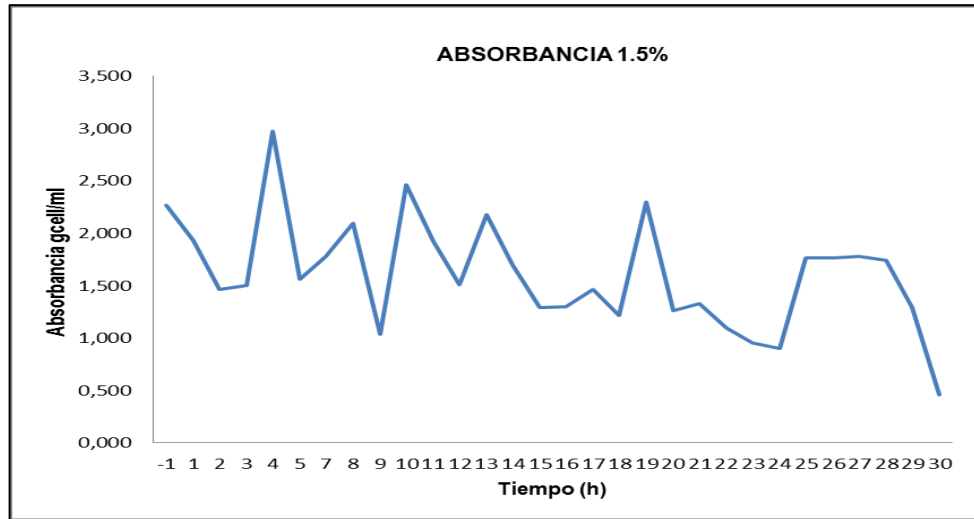
**Tabla 8** Datos significativos concentración al 1.5%

Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica ( $\mu$ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima ( $\mu$ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O2 (ppm)
-1	2,269	-0,1695	0,656864492	3,200385356	8	8,90%
1	1,930	-0,465	0,586587305	-14,86111111	8	7,00%
2	1,465	0,035	0,46686762	2,230603448	8	6,00%
3	1,500	1,473	0,477121255	1,300210305	8	1,40%
4	2,973	-1,413	0,774224905	0,419715447	8	5,00%
5	1,560	0,1105	0,494154594	2,058387396	8	4,00%
7	1,781	0,311	0,551693915	1,771621622	8	1,10%
18	1,217	1,082	0,386320574	1,377895433	8	4,50%
19	2,299	-1,04	0,662568967	0,065466448	8	4,70%
20	1,259	0,069	0,401055726	2,146586345	8	7,00%
21	1,328	-0,229	0,424228071	3,855	8	5,50%
22	1,099	-0,146	0,342027688	3,017667845	8	7,30%
23	0,953	-0,049	0,280122896	2,502631579	8	1,50%
24	0,904	0,862	0,257198426	1,442292796	8	4,10%
25	1,766	-0,003	0,548020695	2,340375587	8	7,90%
30	0,461	1,099	-0,035269079	1,373691099	8	2,60%

**FUENTE: los autores 2014**

Se tomaron 30 datos los cuales fueron obtenidos desde la hora cero y se procedió a tomar datos cada hora; el pH siempre fue constante en un rango de 8 (básico). En la hora  $-1$  se tiene una absorbancia de 2,269 gcell/ml disminuyendo hasta el punto 7 con un valor de 1,781 gcell/ml, el oxígeno varía constantemente; eso se debe que la demanda es mayor y varía la concentración de oxígeno presente en la muestra, indicando que son anaeróbicos. El intervalo que va de la hora 18 a la 25 se encuentra una reducción considerable de la absorbancia (ver tabla 12. Datos completos)

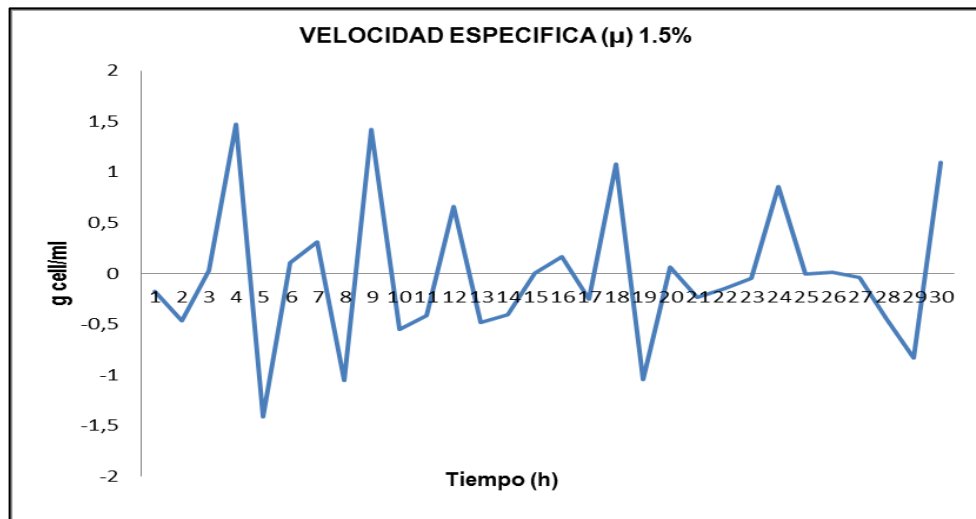
**Gráfica 5** Comportamiento de Crecimiento (*Pseudomonas sp*) al 1% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

Para la concentración de 1.5% de HTP's, comienza con un valor mayor al ser un inulo inicial de 2,269 g cell/ml y termina con un valor de 0,461 g cell/ml, la diferencia es de 1929,539 g cell/ml; este comportamiento de disminución se debe a las condiciones como sustrato, temperatura o pH, la concentración de 1.5% no tiene un notorio crecimiento logarítmico, esto sucede porque parte de la energía producida para consumir el sustrato no es utilizada del todo para degradar el HTP'S, sino que es empleada para los requerimientos propios de la bacteria.

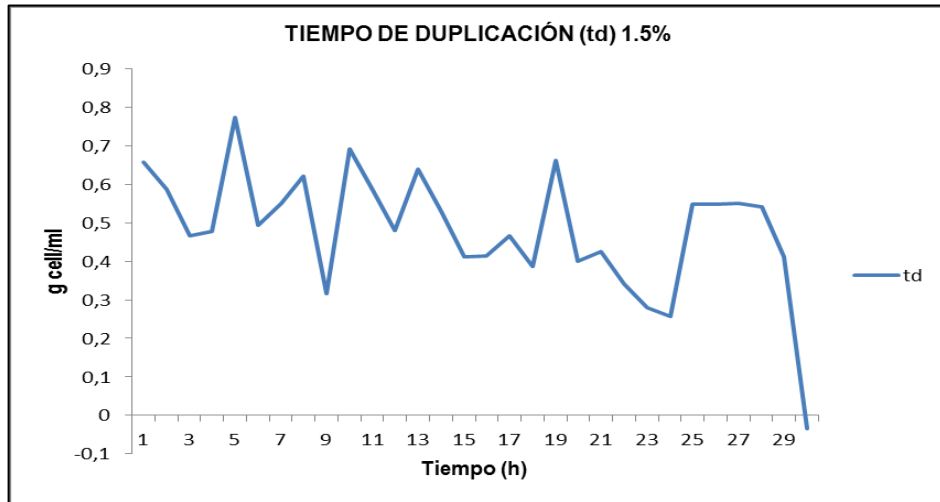
**Gráfica 6** Comportamiento de Velocidad Especifica (*Pseudomonas sp*) al 1.5% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

En un cultivo como el que se realizó en esta investigación donde no se renueva el medio de cultivo el crecimiento exponencial no ocurre indefinidamente, pero se resaltan 6 valores que son relevantes los cuales presentan una fase exponencial, los cuales va de 2-3, 5-7, 15-16 que se encuentran en valores positivos. En este caso el fase terminal la velocidad de muerte es lenta que la velocidad decrecimiento exponencial.

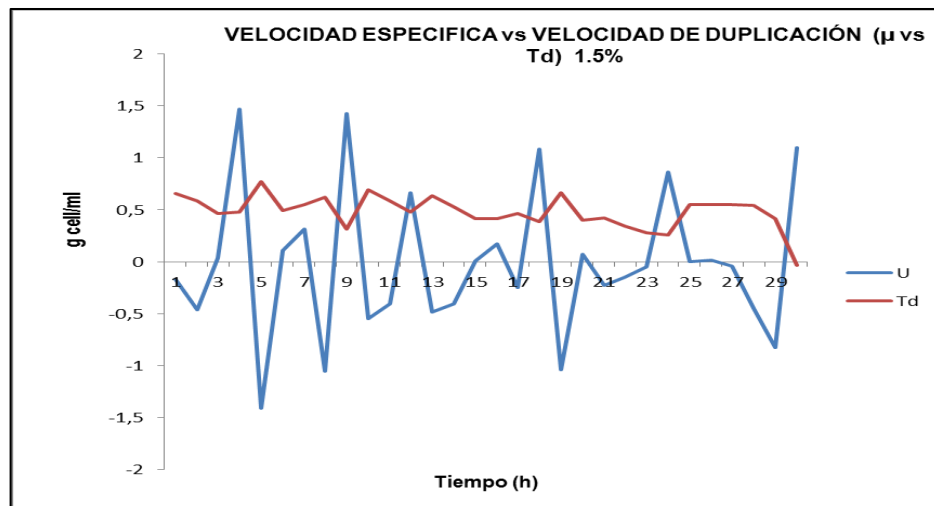
**Gráfica 7** Comportamiento Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 1.5% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

La velocidad de duplicación es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células, para la concentración del 1.5% la velocidad de duplicación aumenta en el punto 5 con un valor de 0,774 gcell/ml donde supera el inicial que tiene un valor de 0,656 gcell/ml, en medio del comportamiento de la velocidad de duplicación no hay otro pico que sobre pase el punto 5 pero aunque no hay duplicación, ocurren funciones celulares, incluyendo el metabolismo bio-energetico y algunos procesos bio-sinteticos. A partir del punto 25 se evidencia una disminución hasta que la unidad formadora de colonia (UFC) muere.

**Gráfica 8** Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 1.5% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

La velocidad específica es inversamente proporcional a la velocidad de duplicación, debido que en la  $\mu$  hay varios picos donde se tiene un estado estacionario que dependen de los nutrientes, en la  $t_d$  o velocidad de duplicación disminuye, porque al haber menos duplicación de microorganismo hay menor velocidad en la cual se está degradando el sustrato, los resultados significativos van de los puntos 3-4, 9-10, 17-19, 23-25 y el más relevante que va de 25-30.

## CONCENTRACIÓN 2%

Tabla 9 Datos significativos concentración al 2%

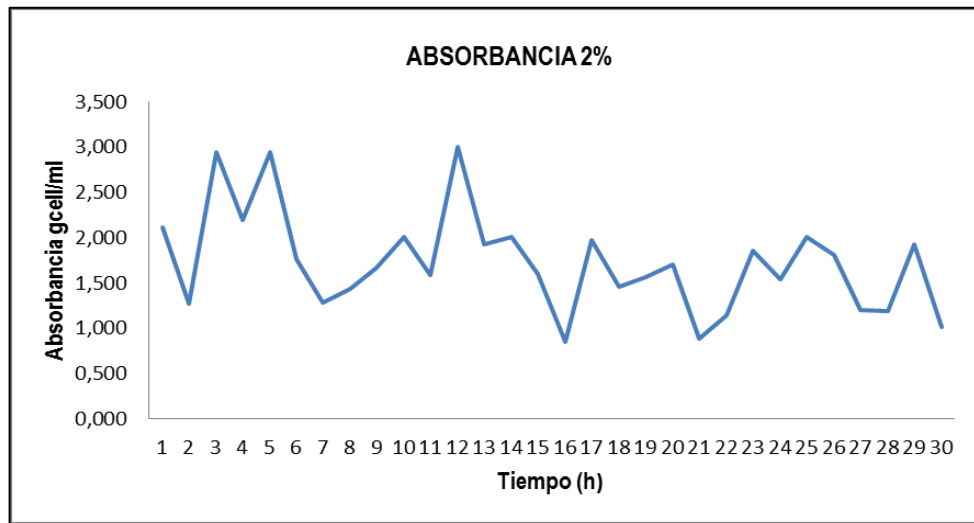
Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica ( $\mu$ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima ( $\mu$ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O2 (ppm)
-1	2,116	-0,423	0,626545659	96,16666667	8	8,60%
1	1,270	1,676	0,404833717	1,271258907	8	6,00%
2	2,946	-0,745	0,770262738	-0,806962025	8	5,30%
3	2,201	0,744	0,643650038	1,486786019	8	3,80%
4	2,945	-1,182	0,770115295	0,241699867	8	2,00%
5	1,763	-0,2415	0,547282308	4,045333333	8	2,50%
7	1,280	0,158	0,408239965	1,97274276	8	0,70%
12	2,999	-1,072	0,778006461	0,111975117	8	3,70%
16	0,851	1,12	0,230959556	1,368624919	8	4,90%
21	0,888	0,26	0,249442961	1,8287373	8	6,80%
22	1,148	0,709	0,360971884	1,501757469	8	2,20%
24	1,545	0,461	0,489958479	1,641573034	8	1,50%
26	1,813	-0,61	0,5594278	-2,154696133	8	8,10%
28	1,195	0,735	0,378397901	1,490549828	8	3,30%
30	1,015	1,179	0,307496038	1,355099502	8	5,50%

FUENTE: los autores 2014

Se tomaron 30 datos los cuales fueron obtenidos desde la hora cero y se procedió a tomar datos cada hora; el pH siempre fue constante en un rango de 8 (básico). En la hora  $-1$  se inicia con una absorbancia de 2,116 gcell/ml, la absorbancia más alta se da en la hora 12 con un valor de 2,999 gcell/ml y la más baja en la hora 16 con un valor de 0,851 gcell/ml, en la concentración del 2% se encuentra una gran variedad de en los datos esto se debe al sustrato y las condiciones para el crecimiento bacteriano y posterior degradación del crudo. ,(Ver tabla 13. Datos completos)



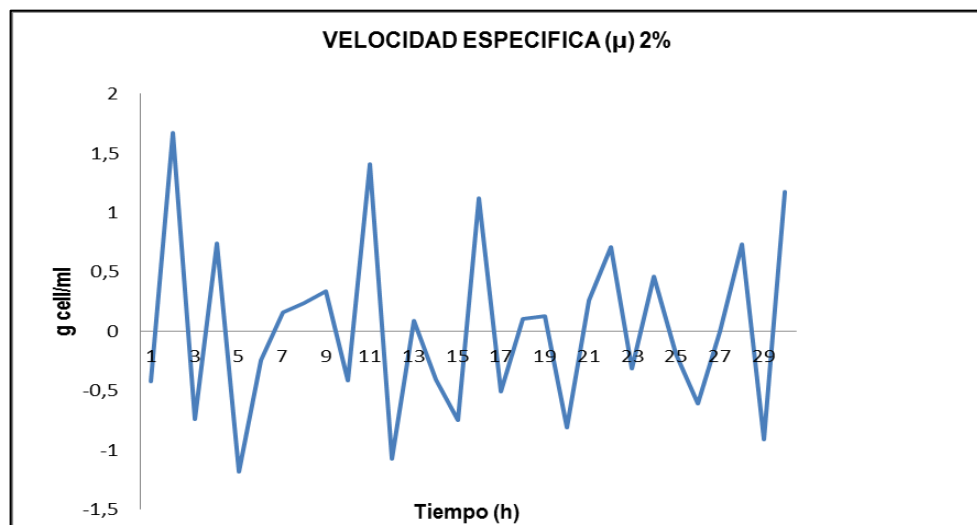
**Gráfica 9** Comportamiento de Crecimiento (*Pseudomonas sp*) al 2% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

La absorbancia para la concentración de 2% de HTP's dio como resultado al crecimiento de las bacterias con valores iniciales de 2,116 gcell/ml y termina con un valor de 1,015 gcell/ml y su diferencia es de 1,101 gcell/ml, al contrario de las concentraciones de 1% y 1.5% su comportamiento es de adaptación y se mantiene, no tiende a disminuir drásticamente al mantener un medio adecuado para su desarrollo y crecimiento. Los datos a resaltar son del punto 3-5 y punto 12.

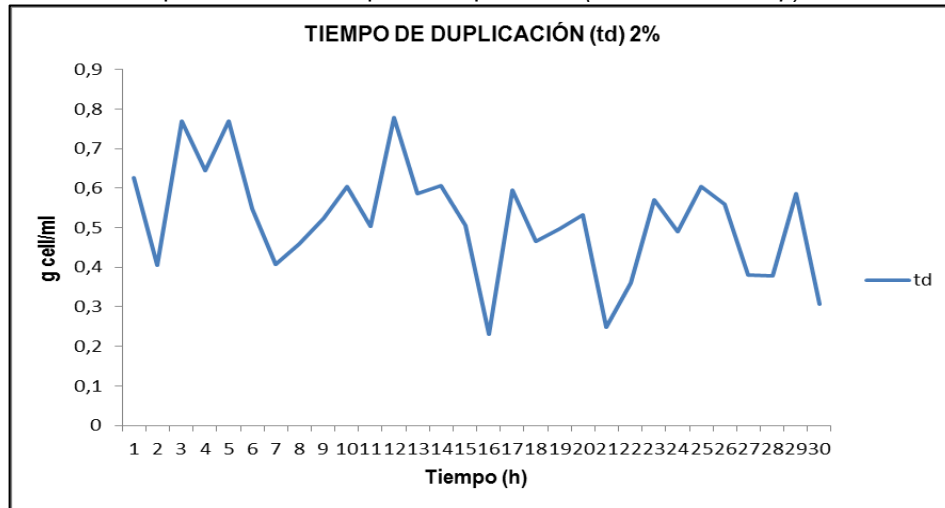
**Gráfica 10** Comportamiento de Velocidad Especifica (*Pseudomonas sp*) al 2% de Crudo



Fuente. Los autores, 2015.

La velocidad específica del cultivo donde la concentración de 2% se resalta en 7 valores que son relevantes los cuales presentan una fase exponencial, los cuales va de 7-9, 18-19, 21-22 que se encuentran en valores positivos. Se presentan cultivos de adaptación donde los microorganismos sufren una reorganización tanto de su velocidad de crecimiento como en sus constituyentes macromoleculares, donde la masa celular puede cambiar sin cambiar el número de células.

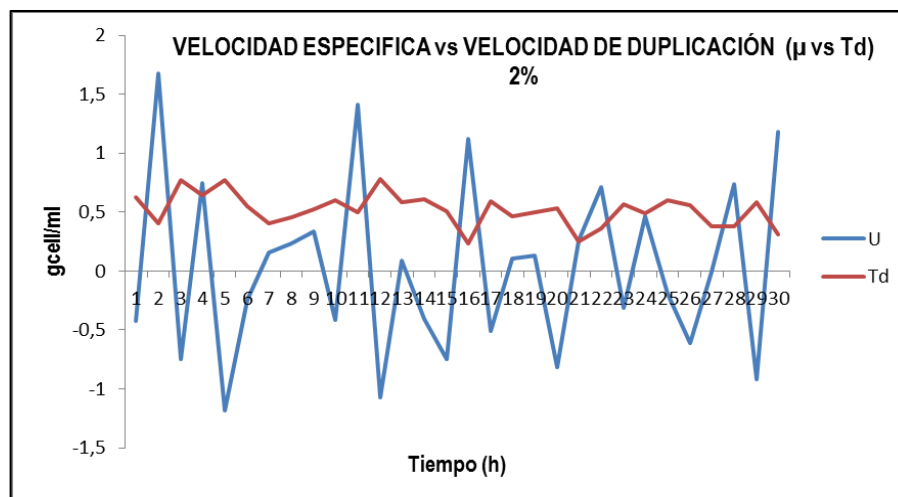
**Gráfica 11** Comportamiento Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 2% de Crudo



**Fuente. Los autores, 2015.**

En la gráfica de velocidad de duplicación en la concentración de 2%, tiene 3 datos relevantes debido a que son mayores que el inicial, demostrando que hubo una duplicación de las bacterias estos datos se encuentran en los puntos 3 con un valor de 0,7702, punto 5 con un valor de 0,7702 y punto 12 con valor de 0,7780, superando al inicial con un valor de 0,6265. Al haber mayor número de microorganismos, mayor velocidad a la cual es utilizado el alimento o sustrato, por ende este es más eficiente que las concentraciones al 1% y 1.5%.

**Gráfica 12** Comportamiento de Velocidad Especifica vs Tiempo de Duplicación (*Pseudomonas sp*) al 2% de Crudo



**Fuente. Los autores, 2015.**

La velocidad específica es inversamente proporcional a la velocidad de duplicación, debido que en la  $\mu$  hay varios picos donde se tiene un estado estacionario que dependen de los nutrientes, en la  $t_d$  o velocidad de duplicación disminuye, porque al haber menos duplicación de microorganismo hay menor velocidad en la cual se está degradando el sustrato, los resultados significativos van de los puntos 2-3, 10-12, 16-17, 21-22, 28-30 y 24-27 siendo este el más relevante.

### ABSORCION INFRARROJA HT's

La prueba de hidrocarburo totales y de HTP's se realizó mediante la técnica de participación infrarroja, la cual consiste de pasar muestras en tubos transparentes para saber qué cantidad de HT y HTP's quedaban presente en cada una de las muestras.

Para estos análisis se enviaron una muestra de 1%, 1.5% y 2.0%. También con estas muestras se envió una muestra del hidrocarburo sin ninguna modificación, esto con el fin de obtener los HT y HTP's al inicio de la prueba y después de la prueba del laboratorio. Esta prueba del laboratorio se desarrolló por el método SM 5520 C SM 5520 F el cual se encuentra acreditado los laboratorios Antek para el ensayo. A continuación ver tabla N° 9.

**Tabla 10** Resultados de HT's

MUESTRA	TECNICA	METODO	HT (Mg/L)
1%	PARTICION/INFRARROJO - INFRARROJO	SM 5520 C SM 5520 F	<b>336</b>
1.5%	PARTICION/INFRARROJO - INFRARROJO	SM 5520 C SM 5520 F	<b>372</b>
2.0%	PARTICION/INFRARROJO - INFRARROJO	SM 5520 C SM 5520 F	<b>288</b>
Muestra Blanca	PARTICION/INFRARROJO - INFRARROJO	SM 5520 C SM 5520 F	<b>18.888</b>

**Fuente Los autores 2014, con colaboración de. Laboratorio Antek;**

Como se puede observar en la tabla numero 12, la concentración de la muestra blanca antes de realizar el tratamiento de biorremediación con los microorganismo era de 18.800 mg/L o 18.800 ppm (partes por millón). Después de haber realizado la biorremediación se obtuvieron datos los cuales expresaban que se había disminuido en un 80% la presencia de hidrocarburo. Se puede concluir que la biorremediación con estos microorganismos es muy efectivo; en el trascurso de mes y medio que duro el tratamiento las pseudomonas pudieron obtener como su alimento principal las fuentes de carbono presente en la muestra de hidrocarburo. Obteniendo estos resultados en nuestra investigación nos atrevemos a decir que el tratamiento del suelo con estas bacterias fue un éxito, ya que estos microorganismos se obtuvieron del mismo sitio de estudio y se llevo a uno de los objetivos que era que la mejor efectividad se presento a una concentración mayor de hidrocarburo. Observando detalladamente la tabla el mejor resultado se obtuvo de la muestra de 2.0%.

Porque la muestra blanca era de 18-800 mg/L y al terminar la etapa experimental de la caja negra se obtuvo un resultado de 288 mg/L. el HT significa en nuestro análisis es el porcentaje de hidrocarburo que quedo en cada uno de las tres muestras. Este análisis era importante desarrollar para poder interpretar que cantidad del petróleo había quedado en las muestras del mesocosmo.

### ABSORCIÓN INFRARROJA DE HTP'S

El análisis de HTP's se realizó mediante la técnica de participación infrarroja, la cual consiste de pasar muestras en tubos transparentes para saber qué cantidad de HT y HTP's quedaban presente en cada una de las muestras. Para estos análisis se enviaron una muestra de 1%, 1-5% y 2.0%. También con estas muestras se envió una muestra del hidrocarburo sin ninguna modificación, esto con el fin de obtener los HT y HTP's al inicio de la prueba y después de la prueba del laboratorio. Esta prueba del laboratorio se desarrolló por el método SM 5520 C SM 5520 F el cual se encuentra acreditado los laboratorios Antek para el ensayo. A continuación ver tabla N° 13.

**Tabla 11.** Resultados de HTP's

MUESTRA	TECNICA	METODO	HTP's Mg/l
1.0%	Infrarrojo	SM 5520 C SM 5520 F	297
1.50%	Infrarrojo	SM 5520 C SM 5520 F	310
2.0%	infrarrojo	SM 5520 C SM 5520 F	200
Muestra blanca	infrarrojo	SM 5520 C SM 5520 F	18.800

**Fuente Los autores 2014, con colaboración de. Laboratorio Antek;**

Para interpretar la tabla anterior se puede decir que el resultado de HTP's fue más de lo que se esperaba. El hidrocarburo presente en la muestra era menor lo cual nos dice que el tratamiento con la pseudomonas sp pudo degradar en todo su ambiente el hidrocarburo y lo tomo como su fuente de alimento para que la bacteria se pudiera reproducir en este entorno poco natural. El hidrocarburo se volvió metabolitos secundarios los cuales no afecto en ningún momento las condiciones físico química del suelo de estudio.

A la hora de recibir el informe por parte de la ingeniería Lady Rodríguez nos informaba que las muestras presentaban olores desagradables y de una tonalidad de color café. Característico de las muestras de estudios que se realizan a los microorganismo en los estudios de tratamiento biológico de suelos.

## ANALISIS

El objetivo de la investigación consiste en identificar el potencial de la cepa nativa (*Pseudomonas sp*), en el proceso de Biorremediación Aeróbica en suelos contaminados con HTP's para el tratamiento in-situ (mesocosmos). Puntualmente se requirió evaluar la eficiencia en porcentaje de remoción de la cepa nativa; como alternativa en tratamientos biológicos de suelos, mediante el modelo de la caja negra. Esto significa que si la población bacteriana aumenta es inversamente proporcional a la degradación de HTP's. El método que se utilizó para evaluar el crecimiento fue a través de la medición de absorbancia, el cual se basa en el hecho que la luz dispersada es proporcional al cociente entre tamaño de la partícula y la longitud de onda incidente; la sensibilidad de la técnica aumenta pues a longitudes de onda ( $\lambda$ ) cortas. La proporcionalidad entre A y masa bacteriana sólo es válida para  $>10^7$  céls/ml. En los ensayos se utilizó inóculos de  $10^8$  céls/ml para 1% a 1,5% concentraciones de HTP's, y de  $10^9$  céls/ml para concentraciones de HTP's de 2%.

Para evaluar el crecimiento de las bacterias se determinó por medio de absorbancia en un tiempo de 30 horas, observando que con el 1% de HTP's hay una tendencia general a disminuir la absorbancia, partiendo de valores de 2558 gcell/ml a 1830 gcell/ml. Para 1,5% de HTP's 2,269 mg/ml a 0,461 mg/ml. Para 2% de HTP's 2116 mg/ml a 1015 mg/ml. Los resultados en general demuestran que la población de bacterias varía durante el tiempo de experimentación, debido a los procesos metabólicos específicos y al grado de reacción de las colonias bacterianas ante las diferentes concentraciones de HTPs utilizadas. Al inicio de la investigación la población es mayor pues se parte de un inóculo inicial, sin embargo ante las condiciones del cultivo mucha UFC mueren, pero otras se adaptan, replicándose y metabolizando el sustrato. También es posible que la población disminuya a medida que se reduce el sustrato. La diferencia para 1% es de 728 mg/ml, para 1,5% es de 1929,539 mg/ml; para 2% es de 1101 mg/ml.

Estos datos pueden explicarse de varias maneras: el crecimiento como la capacidad para multiplicarse que tienen las células individuales, esto es iniciar y completar una división celular. De esta forma, se considera a los microorganismos como partículas discretas y el crecimiento es entendido como un aumento en el número total de partículas bacterianas. Para los fisiólogos bacterianos, bioquímicos y biólogos moleculares una medida del crecimiento es el incremento de biomasa. Para ellos, la síntesis macromolecular y un incremento en la capacidad para la síntesis de los componentes celulares es una medida del crecimiento. Para este grupo la división celular es un proceso esencial pero menor que rara vez limita el crecimiento, ya que lo que limita el crecimiento es la capacidad del sistema enzimático para utilizar los recursos del medio y formar biomasa. Un último se entiende al crecimiento sobre la base de la influencia que ejercen los microorganismos en los cambios químicos de su entorno como consecuencia del incremento de la biomasa.

Ahora bien, se debe considerar que los métodos de dispersión de la luz como técnicas más utilizadas para monitorear el crecimiento de los cultivos bacterianos. Son muy útiles pero pueden llevar a resultados erróneos. Principalmente, dan información sobre el peso seco (contenido macromolecular).

El primer parámetro para responder la pregunta ¿Cuál es el porcentaje de degradación de HTP'S, mediante biorremediación aeróbica, usando la cepa nativa (*Pseudomonas sp*); en suelos contaminados? Es la biomasa celular, que da cuenta de los procesos de replicación pero hay otros parámetros bioquímicos fundamentales en el análisis de la degradación de los HTPs. En el caso de la saturación de oxígeno se detectó en general una disminución durante el ensayo, lo que es coherente con la disminución de la biomasa celular y el aumento de la temperatura del sustrato como resultado del metabolismo celular. El ph se mantuvo constante en un valor de 8, ligeramente básico durante el ensayo. Los parámetros de oxígeno y ph son claves para optimizar y aumentar la velocidad de degradación de los Hidrocarburos por las bacterias utilizadas. Además, en el caso del oxígeno, las bacterias utilizadas como *Pseudomonas sp* son aeróbicas, por lo tanto al reducirse la concentración de oxígeno, se condiciona el crecimiento de las bacterias y consecuentemente la degradación de los HTP's

## CONCLUSIONES

- Para identificar cuál de las tres concentraciones es la más eficiente en la remoción de HTP's, se pudo concluir que el mejor resultado que se obtuvo fue en el mesocosmo tres a una concentración del 2% de hidrocarburo. Durante la fase de análisis de resultados se observó que a mayor concentración del contaminante (crudo) fuente principal alimento de los microorganismos por sus enlaces de carbono, hay mayor degradación. La bacteria (*Pseudomona sp*) degradó a una concentración de 200 ppm de HTP's y 288 HT a una concentración 18.800 ppm la muestra blanco antes de la degradación del hidrocarburo.
- Al evaluar la eficiencia en porcentaje de remoción por parte de la cepa nativa. Los resultados que se obtuvieron de eficiencia fue en el mesocosmo 1 con una eficiencia de 98,43%, en el mesocosmo 2 con una eficiencia de 98,36% y en el mesocosmos 3 con una eficiencia de 98,89. Esto significa que si la población bacteriana aumenta es inversamente proporcional a la degradación de HTP's.
- La biorremediación, como tecnología, tiene gran potencial en la recuperación de los suelos contaminados por hidrocarburos, los microorganismos nativos se ven estimulados considerablemente por la concentración de hidrocarburo, esto reduciendo significativamente los costos. Se pueden modificar algunas condiciones para mejorar la eficiencia de los microorganismos y así encontrar el comportamiento más efectivo para la máxima degradación.

## RECOMENDACIONES

Una vez concluido el trabajo de grado, se considera interesante investigar sobre otros aspectos relacionados con las concentraciones de los mesocosmos.

- Extender la investigación expuesta en esta tesis para la remoción de HTP's por medio de bacterias nativas a los estudiantes de ingeniería ambiental, porque a partir de los resultados que se obtuvieron se demuestra que los microorganismos son alternativas biológicas para la recuperación de suelos y posiblemente en aguas.
- Trabajar en mejorar el modelo dinámico utilizado en esta tesis para determinar las condiciones necesarias para hallar el clímax de las bacterias a partir del tiempo de experimentación como mínimo una semana, para tener un amplio rango de datos y así realizar al mismo tiempo las pruebas de absorbancia, pH y oxígeno.
- La siembra de los microorganismo se debe hacer por triplicado, esto con el fin de preservar al máximo los microorganismo y poderlo utilizar en la biorremediación del suelo.
- En laboratorio se debe tener calibrados los equipos para no alterar los resultados que puedan dar. Se recomienda que el espectrofotómetro se deje en una curva de calibración de 540 nm, esto con el fin de realizar los análisis de absorbancia en este rango.
- Por último, no gustaría que la universidad ECCI hiciera una inversión para adquirir el equipo infrarrojo para análisis de hidrocarburo, el cual es muy importante para seguir desarrollando investigaciones en temas de tratamientos de suelos contaminados. Además este equipo es multifuncional; también se puede utilizar para análisis de metales pesados presentes en agua y suelos. La segunda recomendación que se hace es que la universidad disponga de mayor espacio en los laboratorios para poder desarrollar la fase experimental. La cual es muy importante para obtener buenos resultados. Porque en el laboratorio no cuenta con un espacio específico para dejar las muestras para que personas externas no afecten en la fase de investigación.

## MARCO CONCEPTUAL

- **ABSORBANCIA:** Análisis en el cual consta de pasar una luz sobre una muestra la cual absorbe la radiación de luz y se mide este efecto.
- 
- **AISLAMIENTO:** Mecanismo en el cual se aísla algún microorganismo para realizar su duplicación en sus condiciones naturales.
- 
- **BIORREMEDIACION:** Proceso en el cual se puede recuperar o estabilizar un lugar el cual fue afectado por una actividad antrópica.
- 
- **CADENA DE CUSTODIA:** Mecanismo de embalaje en el cual se garantiza las condiciones de la muestra a la hora de realizar un buen análisis de laboratorio.
- 
- **CAJA NEGRA:** Sistema en el cual se pone a interactuar contaminante vs microorganismo, para observar los resultados de remoción en un sistema cerrado.
- 
- **CEPA NATIVA:** Microorganismo de origen nativo del suelo extraído del lugar de estudios, mediante proceso biológico.
- 
- **CONTAMINACION:** Presencia de agentes físicos, químicos y biológicos que pueden ser nocivo para la salud, vida vegetal y animal.
- 
- **DERRAME:** Vertido de alguna sustancia líquida sobre la cobertura terrestre, el cual puede afectar la estabilidad ambiental de la zona.
- 
- **EFICIENCIA:** Capacidad de disponer de alguien o algo para conseguir un efecto deseado.
- 
- **MESOCOSMO:** Sistema de tratamiento para la recuperación de suelo mediante de parcela por microorganismo nativo.
- 
- **MODELO DE MONOT:** Modelo matemático especial para interpretar el crecimiento microbiano en la fase de experimentación.
- 
- **REMOCION:** Proceso en el cual se puede remover un contaminante criterio en superficie mediante algún microorganismo.
- 
- **SUELO:** Sistema de dinámico en el cual opera el sistema productivo agrologico y interactúan agua, aire, los seres humanos y sus interrelaciones.
- 
- **TOXICIDAD:** Capacidad de la sustancia química para producir efectos perjudiciales sobre un recurso natural o sobre un ser vivo.
- 
- **TRATAMIENTO BIOLÓGICO:** Proceso en el cual se utiliza microorganismo para el control y tratamiento de suelos contaminados. Produciendo compuesto de menor poder contaminante para la recuperación de suelos.



## ANEXOS

**Tabla 12** Datos concentración al 1%

Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica ( $\mu$ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima ( $\mu$ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O <sub>2</sub> (ppm)
-1	2,558	-0,12	0,70893054	2,84789644	8	13,90%
1	2,318	0,218	0,66614343	1,88253478	8	6,60%
2	2,536	-0,065	0,70517924	2,56868132	8	14,00%
3	2,471	-0,071	0,69390274	2,59497207	8	8,80%
4	2,400	-0,113	0,68124124	2,80696203	8	6,60%
5	2,287	-0,0145	0,66029616	2,37756333	8	6,20%
7	2,258	-0,747	0,65475393	-0,79559748	8	5,50%
8	1,511	0,732	0,48029446	1,4918174	8	3,10%
9	2,243	0,058	0,65185927	2,1724846	8	1,30%
10	2,301	-1,037	0,66294661	0,06085526	8	2,40%
11	1,264	-0,001	0,40277707	2,33411215	8	3,50%
12	1,263	0,034	0,40243335	2,23326134	8	4,20%
13	1,297	0,255	0,41396997	1,83479532	8	2,00%
14	1,552	-0,186	0,49192171	3,34979424	8	3,00%
15	1,366	0,214	0,4364807	1,88802488	8	3,10%
16	1,580	0,452	0,49968708	1,64812713	8	3,50%
17	2,032	-0,042	0,6089537	2,4754522	8	3,20%
18	1,990	-1,272	0,59988307	0,32265718	8	7,30%
19	0,718	0,039	0,15715444	2,22008547	8	6,40%
20	0,757	0,533	0,18012588	1,59355509	8	5,90%
21	1,290	-0,112	0,41161971	2,80126183	8	4,30%
22	1,178	0,035	0,37217529	2,23060345	8	8,50%
23	1,213	0,52	0,3848908	1,60168599	8	6,20%
24	1,733	-0,09	0,53982856	2,68436578	8	4,50%
25	1,643	-0,03	0,51666756	2,43107769	8	7,50%
26	1,613	-0,003	0,50866436	2,34037559	8	7,70%
27	1,610	0,056	0,50785587	2,17731959	8	8,40%
28	1,666	0,106	0,52270499	2,06728972	8	4,50%
29	1,772	0,058	0,54949371	2,1724846	8	3,80%
30	1,830	-0,478	0,56348109	-10,6530612	8	6,50%

Fuente: Los Autores 2014

Tabla 13 Datos concentración al 1.5%

Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica ( $\mu$ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima ( $\mu$ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O2 (ppm)
-1	2,269	-0,1695	0,656864492	3,200385356	8	8,90%
1	1,930	-0,465	0,586587305	-14,861111111	8	7,00%
2	1,465	0,035	0,46686762	2,230603448	8	6,00%
3	1,500	1,473	0,477121255	1,300210305	8	1,40%
4	2,973	-1,413	0,774224905	0,419715447	8	5,00%
5	1,560	0,1105	0,494154594	2,058387396	8	4,00%
7	1,781	0,311	0,551693915	1,771621622	8	1,10%
8	2,092	-1,056	0,621591676	0,089314195	8	4,20%
9	1,036	1,428	0,316389751	1,307485191	8	1,10%
10	2,464	-0,546	0,692670699	-3,88034188	8	3,10%
11	1,918	-0,408	0,583878598	28,19047619	8	2,60%
12	1,510	0,667	0,480006943	1,520985401	8	3,30%
13	2,177	-0,483	0,638888425	-9,574074074	8	2,90%
14	1,694	-0,403	0,529943402	22,96153846	8	2,00%
15	1,291	0,006	0,411956238	2,312643678	8	2,90%
16	1,297	0,17	0,413969972	1,953255426	8	4,10%
17	1,467	-0,25	0,46746011	4,189944134	8	5,40%
18	1,217	1,082	0,386320574	1,377895433	8	4,50%
19	2,299	-1,04	0,662568967	0,065466448	8	4,70%
20	1,259	0,069	0,401055726	2,146586345	8	7,00%
21	1,328	-0,229	0,424228071	3,855	8	5,50%
22	1,099	-0,146	0,342027688	3,017667845	8	7,30%
23	0,953	-0,049	0,280122896	2,502631579	8	1,50%
24	0,904	0,862	0,257198426	1,442292796	8	4,10%
25	1,766	-0,003	0,548020695	2,340375587	8	7,90%
26	1,763	0,014	0,547282308	2,288939052	8	7,30%
27	1,777	-0,039	0,550717423	2,464102564	8	6,90%
28	1,738	-0,448	0,541079768	-29,05263158	8	4,30%
29	1,290	-0,829	0,411619706	-0,4275	8	5,00%
30	0,461	1,099	-0,035269079	1,373691099	8	2,60%

Fuente: Los Autores 2014

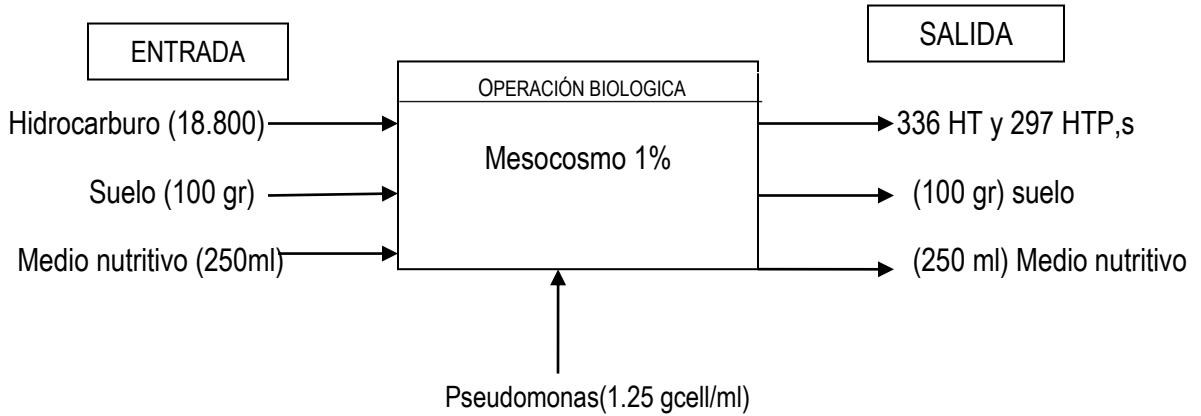
Tabla 14 Datos concentración al 2%

Tiempo (H)	Absorbancia (g cell/ml)	Velocidad específica ( $\mu$ g cell/ml)	Tiempo de duplicación (td g cell/ml)	Velocidad máxima ( $\mu$ max g cell/ml)	pH (-log10)	Concentración O2 (ppm)
-1	2,116	-0,423	0,626545659	96,16666667	8	8,60%
1	1,270	1,676	0,404833717	1,271258907	8	6,00%
2	2,946	-0,745	0,770262738	-0,806962025	8	5,30%
3	2,201	0,744	0,643650038	1,486786019	8	3,80%
4	2,945	-1,182	0,770115295	0,241699867	8	2,00%
5	1,763	-0,2415	0,547282308	4,045333333	8	2,50%
7	1,280	0,158	0,408239965	1,97274276	8	0,70%
8	1,438	0,234	0,458788882	1,861236802	8	0,90%
9	1,672	0,334	0,524266269	1,74836173	8	0,40%
10	2,006	-0,416	0,603360924	44,92307692	8	3,30%
11	1,590	1,409	0,50242712	1,310663765	8	3,30%
12	2,999	-1,072	0,778006461	0,111975117	8	3,70%
13	1,927	0,087	0,58591171	2,106589147	8	3,00%
14	2,014	-0,411	0,605089462	32,72222222	8	2,80%
15	1,603	-0,752	0,505963518	-0,767801858	8	2,50%
16	0,851	1,12	0,230959556	1,368624919	8	4,90%
17	1,971	-0,509	0,59571662	-6,1375	8	5,10%
18	1,462	0,108	0,465977368	2,063314711	8	4,90%
19	1,570	0,131	0,496929648	2,019642857	8	5,70%
20	1,701	-0,813	0,531734309	-0,486979167	8	7,00%
21	0,888	0,26	0,249442961	1,8287373	8	6,80%
22	1,148	0,709	0,360971884	1,501757469	8	2,20%
23	1,857	-0,312	0,569841899	5,88034188	8	6,50%
24	1,545	0,461	0,489958479	1,641573034	8	1,50%
25	2,006	-0,193	0,603360924	3,419491525	8	8,60%
26	1,813	-0,61	0,5594278	-2,154696133	8	8,10%
27	1,203	-0,008	0,381295623	2,356294537	8	6,90%
28	1,195	0,735	0,378397901	1,490549828	8	3,30%
29	1,930	-0,915	0,586587305	-0,174897119	8	7,40%
30	1,015	1,179	0,307496038	1,355099502	8	5,50%

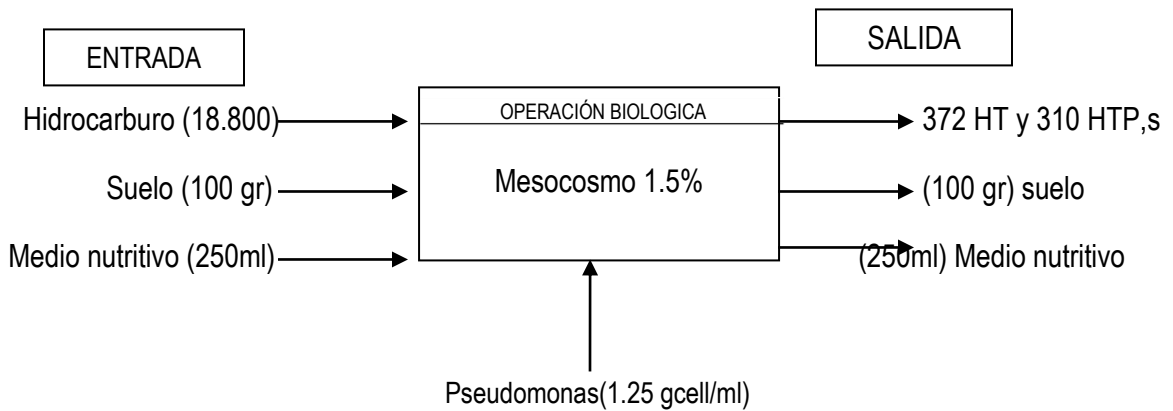
Fuente: Los Autores 2014

## BALANCE

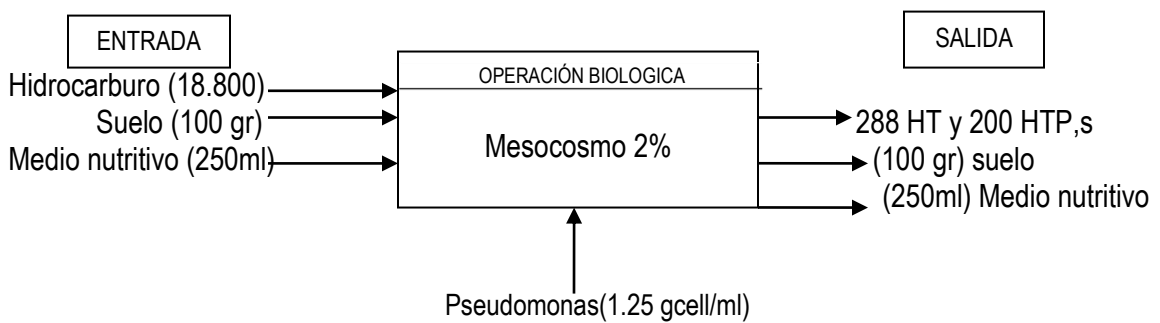
### BALANCE DE MATERIA Y ENERGIA



En nuestro balance de materia y energía la entrada de hidrocarburo era de una concentración de 18-800 mg/L y a la hora de estar en la operación biológica del suelo se obtuvo una reducción notoria del hidrocarburo.



En nuestro balance de materia y energía la entrada de hidrocarburo era de una concentración de 18-800 mg/L y a la hora de estar en la operación biológica del suelo se obtuvo una reducción notoria del hidrocarburo.



En nuestro balance de materia y energía la entrada de hidrocarburo era de una concentración de 18-800 mg/L y a la hora de estar en la operación biológica del suelo se obtuvo una reducción notoria del hidrocarburo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego. 302pp  
[http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2002\\_1/biorremediacion.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2002_1/biorremediacion.pdf)
2. ANH, 2014. Programa de regionalización sector hidrocarburos, la cadena del sector hidrocarburos. [Fecha de consulta: Diciembre 13 de 2014] Disponible en <http://www.anh.gov.co/porta regionalizacion/Paginas/inicio.aspx>
3. Anish G. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminante in soil. Kathmandu university journal of science, engineering and technology. Volumen 8. Numero 1. February 2012. pp 164-170.
4. Bronder. J y Zeller. T. (2010). Gulf Oil Spill Is Bad, but How Bad?. The New York Times. [Fecha de consulta: Diciembre 09 de 2014] Disponible en [http://www.nytimes.com/2010/05/04/us/04enviro.html?\\_r=1&](http://www.nytimes.com/2010/05/04/us/04enviro.html?_r=1&)
5. Cerón L. XXXX. Enzimas de suelo: Ambiente y biotecnología, Universidad de los Llanos, hecho en la vereda Barcelona, Villavicencio, Meta.
6. Cerón R, L.E., L.M Melgarejo M. 2005. Enzimas de suelo: indicadores de salud y calidad. Acta Biológica Colombiana 10: 5-17.
7. Chaudhry, G. R. A. N Ali. 1998. Bacterial Metabolism of Carbofuran. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1414-1419
8. Cleves I., M. Sandoval. 2001. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados con lodos aceitosos de la industria petrolera (Huila- Colombia). Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana.
9. Coria. I. (2007). Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. UANIS Sustentabilidad. Ref, Ingeniería y Gerenciamiento ambiental. [Fecha de consulta: Diciembre 10 de 2014] Disponible en <http://www.sustentabilidad.uai.edu.ar/pdf/ing/uais-iga-600-001%20-%20remediacion.pdf>
10. Davis, J.B (1956). Microbial decomposition of hydrocarbons. Ind. Eng. Chem. 48: 1444-1448.
11. Delgadillo, F. 2012. Tecnologías limpias para desarrollo sostenible. Vol 1. Revista de educación abierta y a distancia Universidad Santo Tomas Colombia.
12. Dj el Lun. (2012). Temen más derrames en el campo de crudo explotado por Chevron. Informe21.com. [Fecha de consulta: Diciembre 09 de 2014] Disponible en <http://informe21.com/actualidad/12/03/19/brasil-temen-mas-derrames-en-el-campo-de-crudo-explotado-por-chevron>

13. Dodor, D.E., H. M. Hwang, S.I.N. Ekunwe. 2004. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 2 10-215
14. Duarte, A. 2014. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de monod. Biblioteca digital Universidad Nacional de Colombia. . [Fecha de consulta: Diciembre 13 de 2014] Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/23831/1/20908-70689-1-PB.pdf>
15. El Tiempo. (2014). Nuevo derrame de petróleo en Putumayo. El Tiempo. [Fecha de consulta: Diciembre 10 de 2014] Disponible en <http://www.eltiempo.com/colombia/otras-ciudades/nuevo-derrame-de-petroleo-en-putumayo/14291376>
16. Empresa Colombiana de Petróleos, ECOPETROL, 2003; El petróleo y su mundo, comercialización de crudo y derivados 45: 46-4., (9ª. Ed.9). Bogotá, D.C, Comunicaciones Corporativas ECOPETROL
17. Eweis, J.B; Ergas, S.J; Chap, D.P Y Schroeder, E.D 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.
18. Gibson, D.T. y V. Subramaina. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Pp. 52-83. In D.T Gibson (ed.). *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
19. Litchfield C, 2005. Thirty years and counting: bioremediation in its prime? *Bioscience*. 55(3):573-577.
20. López., A. 2000. Diagnóstico sobre el manejo y disposición de lodos perforación en la zona lacustre Julivá-Santa Anita, Tabasco, México. Tesis de Licenciatura en Ing. Ambiental. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
21. Major et al. (2002). Field Demonstration of Successful Bioaugmentation to Achieve Dechlorination of Tetrachloethene To Ethene. *Environmenta Science & Technology*. 36: 5106- 5116.
22. Martine 1998. *Manual de Microbiología Ambiental y Analisis Rutinarios*. Pontifica Universidad Javeriana. 1998. Ed. Primavera Javergraf.
23. NULLVALUE (1997). Contaminación por derrames de petróleo. El Tiempo. [Fecha de consulta: Diciembre 09 de 2014] Disponible en <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-555907>
24. Riser Roberts, E (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils*, CRC Press. Lewis publishers.
25. Sellers, K. 1999. *Fundamentals of hazardous waste site remediation*. Lewis Publisher 326pp.
26. Semana (2012). ¡Bum! petrolero. *Semana*. [Fecha de consulta: Diciembre 10 de 2014] Disponible en <http://www.semana.com/nacion/articulo/bum-petrolero/254671-3>

27. Theron, J. y Cloete, T.E. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Rev. Microbiol.* 26: 37-57
28. Van Hamme, J. D., A. Singh, O. P. Ward. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology *Microbiology And Molecular Biology Reviews.* 67: 503-549 and Rehmann, K., N, Hertkoorn. A. A. Kettrup. 2001 Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. Strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth *Microbiology* 147: 2783-2794.
29. Venosa A., S. Zhu. 2003. Biodegradation of crude oil contamination marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology.* 8(2): 163- 178.
30. Vidali M. 2001. Bioremediation. An Overview. *Pure Applied Chemistry.* 73(7): 1163- 1172.
31. Volke. T y Velasco, J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología ( INE- SEMARNAT) v.65 hecho en México. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/372.pdf>
32. Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 237-241.
33. Zobell, C.E. (1946) Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bact. Rev* 10: 1-49