

**BIORREMEDIACION PARA LA DEGRADACION DE HIDROCARBUROS
TOTALES PRESENTES EN LOS SEDIMENTOS DE LA ESTACION DE SERVICIO
TEXACO PUERTO GAITAN**

YARHA HEYDI GUTIERREZ CASTAÑEDA

2011260001

ANGELA PATRICIA ARANGO ORDOÑEZ

2013160123

RAFAEL MEZA

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERA AMBIENTAL

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA COLOMBIANA DE CARRERAS INDUSTRIALES - ECCI

BOGOTÁ D.C, SEPTIEMBRE DEL 2013

**BIORREMEDIACION PARA LA DEGRADACION DE HIDROCARBUROS
TOTALES PRESENTES EN LOS SEDIMENTOS DE LA ESTACION DE SERVICIO
TEXACO PUERTO GAITAN**

YARHA HEYDI GUTIERREZ CASTAÑEDA

2011260001

ANGELA PATRICIA ARANGO ORDOÑEZ

2013160123

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERA AMBIENTAL

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA COLOMBIANA DE CARRERAS INDUSTRIALES - ECCI

BOGOTÁ D.C, SEPTIEMBRE DEL 2013

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. PREGUNTA PROBLEMA	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. OBJETIVO GENERAL	16
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
6. MARCO DE REFERENCIA	17
6.1. MARCO TEORICO	17
6.1.2. DESCRIPCIÓN Y SIGNIFICADO DE LA BACTERIA PSEUDOMONA AERUGINOSA.	17
6.1.3. ESTRUCTURA CELULAR Y METABOLISMO DE LA BACTERIA PSEUDOMONA AERUGINOSA	18
6.1.4. HABITAT	20
6.1.5. INVESTIGACIONES ACTUALES:	21
6.2. MARCO CONCEPTUAL	24
6.2.1. BIOREMEDIACIÓN	24
6.2.2. TECNICAS DE BIORREMEDIACION:	24
6.2.3. PSEUDOMONA AERUGINOSA	25
PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS	26
6.2.4. COLIFORMES:	26
6.2.5. MESOFILOS,	27
PARAMETROS FISICOQUIMICOS	28
6.2.6. CONDUCTIVIDAD:	28
6.2.7. TEMPERATURA:	30

6.2.8. POTENCIAL DE HIDROGENIONES:-----	31
6.2.9. NITROGENO TOTAL: -----	32
6.2.10. GRASAS Y ACEITES -----	32
6.2.11. FENOLES TOTALES:-----	33
6.2.12. HIDROCARBUROS TOTALES:-----	33
6.2.13. HUMEDAD -----	34
6.2.14. NUTRIENTES-----	34
6.2.15. MICROORGANISMOS -----	34
6.2.16. METABOLISMO: -----	36
6.2.17. SUELO -----	36
6.2.18. ACUIFERO-----	36
6.2.19. ESTUDIOS DESCRIPTIVOS -----	36
6.2.20. ESTUDIOS CORRELACIONALES -----	37
6.2.21. VARIABLE DEPENDIENTE -----	37
6.2.22. VARIABLE INDEPENDIENTE:-----	37
6.3. MARCO LEGAL-----	38
6.4. MARCO GEOGRAFICO -----	39
7. TIPO DE INVESTIGACIÓN – PROCEDIMIENTO.-----	40
8. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	48
TEMPERATURA -----	50
HUMEDAD-----	51
pH -----	52
COLIFORMES -----	53
GRASAS Y ACEITES E HIDROCARBUROS TOTALES -----	54
NITROGENO TOTAL Y FENOLES -----	55
9. RESULTADOS ALCANZADOS-----	57

10. CONCLUSIONES	59
11. BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coliformes fecales en heces animales y el hombre	27
Tabla 2. Relación mineralización - conductividad.	29
Tabla 3. Marco Legal	38
Tabla 4. Etapas en el desarrollo del proyecto de investigación.	41
Tabla 5. Tabla de resultados físicos químicos y microbiológicos	48
Tabla 6. Resultado finales obtenidos durante los 28 días	49

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Vista panorámica estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán.....	39
Fotografía 2. Visita Preliminar y selección del punto de muestreo	42
Fotografía 3. Toma de muestra Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán	44
Fotografía 4. Embalaje de las muestras y diligenciamientos del registro técnico.	45
Fotografía 5. Preparación de la Cepa Bacteriana Pseudomona Aeruginosa.....	47

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Comportamiento Temperatura	50
Ilustración 2. Comportamiento de Humedad	51
Ilustración 3. Comportamiento pH	52
Ilustración 4. Comportamiento de Coliformes Totales y Fecales	53
Ilustración 5. Comportamiento de las Grasas y Aceites e Hidrocarburos	55
Ilustración 6, Comportamiento del Nitrógeno Total y Fenoles	56

ANEXOS

Anexo I. Reportes de resultados de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

Anexos II: Manual de procedimiento muestreo de agua.

Anexos III: ficha técnica Pseudomona Aeruginosa.

Anexos IV: ficha técnica Agar Nutritivo.

RESUMEN

La Biorremediación es una rama de la biotecnología, también denominada como un proceso que utiliza microorganismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana; para este estudio se seleccionó como agente biorremediador la *Pseudomona Aeruginosa*, una bacteria que posee la habilidad de utilizar diversos sustratos, incluyendo aquellos creados por el petróleo.

Se tomó una muestra puntual de lodos en las instalaciones de la Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán ubicada en el municipio del Meta, antes del tratamiento preliminar que se le realiza, esta muestra es llevada al laboratorio para ser caracterizada fisicoquímica y microbiológicamente, y de esta manera conocer específicamente la concentración de: coliformes totales y fecales, hidrocarburos totales, grasas y aceites, fenoles totales, nitrógeno total.

Una vez obtenidos los resultados se proceder a realizar el cultivo a través de un método de Bioestimulación con la Bacteria *Pseudomona Aeruginosa*, el cual tiene una duración de 28 días, realizando mediciones de la siguiente manera: 7, 11, 21 y 28 días, en pro de establecer el efecto microbiológico de esta Bacteria en el lodo de interés.

Finalmente se puede establecer la alta eficiencia de la *Pseudomona Aeruginosa* al controlar estos microorganismos patógenos (C. Totales y fecales) y ayudar al proceso de remoción de: fenoles, hidrocarburos totales grasas y aceites, debido a que las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos involucrados en procesos de remoción

de aceites y productos relacionados, estos se debe a que estos microorganismos extracelulares solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica; contienen además enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática.

Palabras claves: Biorremediación, Bioestimulación, Pseudomona Aeruginosa, hidrocarburos, fenoles, Coliformes totales, Coliformes fecales, suelos, acuíferos.

ABSTRACT

Bioremediation is a branch of biotechnology, also known as a process that uses microorganisms as plants, fungi, natural or genetically engineered bacteria to neutralize toxic substances, transforming them into less toxic substances or making them safe for the environment and human health, to this study was selected as bioremediator agent *Pseudomonas Aeruginosa*, a bacterium that has the ability to use various substrates, including those created by oil.

It took a grab sample of sludge facilities Texaco Service Station located in Puerto Gaitan Meta Township, preliminary treatment before he performs, this sample is brought to the laboratory for physicochemical and microbiological characterized, and this way to know specifically concentration: total and fecal coliforms, total hydrocarbons, fats and oils, total phenolics, total nitrogen.

Once the results are obtained proceed with the cultivation through a biostimulation method *Bacteria Pseudomonas Aeruginosa*, which has a duration of 28 days, making measurements as follows: 7, 11, 21 and 28 days, towards establishing the microbiological effect of this bacterium in the mud of interest.

Finally you can set the high efficiency of *Pseudomonas Aeruginosa* to control these pathogens (C. Totalesy faeces) and help the removal process: phenols, total hydrocarbons fats and oils because the *Pseudomonas* are bacteria producing biosurfactants as rhamnolipids removal processes involved in oil and related products, such is because these microorganisms and

extracellular solubilized facilitate penetration of the hydrocarbons through the cell wall hydrophilicity ; degrading enzymes also contain hydrocarbons in the cytoplasmic membrane.

Keywords: Bioremediation, Biostimulation , Pseudomona Aeruginosa , hydrocarbons , phenols , total coliforms , fecal coliforms , soils, aquifers.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales más importantes de la actualidad es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados. En el caso de los suelos, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal en el lugar del derramé, cambios en la dinámica poblacional de la fauna, de la biota microbiana y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos.

Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado.

En Colombia las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos son las actividades de explotación, transporte y almacenamiento de combustibles.

La Biorremediación surge de la necesidad de disminuir el impacto ambiental negativo de los derrames de hidrocarburos en los diferentes ambientes (agua y suelos) usando microorganismos, plantas o enzimas, de manera estratégica con el fin de restaurar la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema.

Dado que la sociedad moderna usa gran cantidad de productos basados en hidrocarburos, como la gasolina, el queroseno y el diesel, la contaminación del ambiente es un riesgo latente. Una de las actividades de riesgo es la venta de combustible en las Estaciones de servicio, debido a que en estas instalaciones regularmente se presentan pequeños derrames en las zonas de distribución, que son contenidos con arena, estos, al igual que los sedimentos generados en el mantenimiento de sus unidades de rejillas perimetrales de las zonas de almacenamiento,

distribución, trampas de grasas conectadas a estas rejillas y los desarenadores de lavado de autos, son elementos considerados RESPEL por su contenido de hidrocarburos¹, por lo tanto se ve la necesidad de presentar una estrategia viable para disminuir el contenido de hidrocarburos, neutralizando el riesgo de contaminaciones mayores.

El presente documento tiene como finalidad desarrollar un estudio experimental, asociado con tipos de investigación tales como la descriptiva y correlacional, dado que se intenta conocer el comportamiento del microorganismo *Pseudomonas Aeruginosa* como un agente bioremediador en las muestras de lodos sin tratamiento de la Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán y evaluar el proceso de degradación de hidrocarburos presentes.

¹ (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las actividades principales de las Estaciones de Servicio es la venta de combustibles líquidos, entre los que se encuentran la gasolina y el diesel, principalmente; otros servicios alternos son el lavado, lubricación y engrase, de vehículos automotores así como cambio de aceite y de filtros de los mismos.

El Municipio de Puerto Gaitán, ubicado en el Departamento del Meta, cuenta en la actualidad con 3 estaciones de servicio, las cuales están ubicadas en la zona urbana del municipio.

Del total de las estaciones identificadas la mayoría tiene un tiempo de servicios largo, por lo tanto los equipos entre los cuales se encuentran tanques de almacenamiento y surtidores ya han superado su vida útil. Como consecuencia, se han encontrado equipos en deterioro, así como la ausencia de accesorios para control de derrames como cajas contenedoras y cierres automáticos de válvulas de suministro, entre otras

Lo anterior se debe a que la normatividad que reglamenta a las Estaciones de Servicios en aspectos técnicos y ambientales² es posterior al establecimiento de la gran mayoría de las Estaciones de Servicio.

Los derrames menores de combustible ocurren regularmente durante las actividades de operación de las Estaciones de Servicio, más aún cuando los equipos no cumplen con los requerimientos técnicos para la prevención de los mismos.

² Decreto 1521 de 1998. por el cual se reglamenta el almacenamiento, manejo, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo, para estaciones de servicio.

Las pérdidas en tanques y tuberías debido a fugas, derrames accidentales, han causado problemas ambientales en el suelo superficial y en el subsuelo. Una vez que los combustibles penetran el suelo, afectan las características físicas y químicas, dañando su productividad y la población microbiana presente, además de amenazar la salud pública, como una consecuencia de su migración y contacto con los mantos freático, aguas superficiales y subterráneas.

Asimismo las actividades de mantenimiento dentro de las estaciones de servicio, generan sedimentos contaminados con hidrocarburos, que son depositados en lechos de secado, canecas y en otros casos, en terrenos baldíos cercanos a la estación de servicio, estos elementos se convierten en un riesgo latente para la comunidad y los recursos naturales aledaños, si no se plantean buenas prácticas de remediación y tratamiento de los recursos contaminados.

3. PREGUNTA PROBLEMA

¿Es posible realizar la degradación de hidrocarburos totales presentes en la estación de servicios Texaco Puerto Gaitán ubicado en el departamento del Meta a través del método de Biorremediación con la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa*?

4. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, los residuos sólidos y líquidos contaminados con aceites e hidrocarburos son considerados como residuos peligrosos³. En esta categoría entran de igual manera los sedimentos contaminados con hidrocarburos, producto del mantenimiento de las estructuras de las estaciones de servicio; entre los procesos de remediación de hidrocarburos, la Biorremediación activa está naciendo como una tecnología prometedora, ya que se ha definido como "el acto de utilizar procesos naturales inducidos a ambientes contaminados para producir una aceleración de los procesos de degradación", logrando mejores tasas de remediación en menor tiempo.

Esta tecnología se basa en la premisa de que un gran porcentaje de los componentes del hidrocarburo son biodegradables en la naturaleza, además de presentar varias ventajas potenciales sobre las tecnologías convencionales, como menor costo, son menos intrusivos en el sitio contaminado, más respetuosas del medio ambiente en términos de sus productos finales y requieren de un mínimo o ningún tratamiento posterior⁴

La investigación considera que la tecnología de Biorremediación se pueden llevar a cabo dentro de las instalaciones de la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán, contribuyendo a si a la disminución de los impactos negativos a los recursos naturales dados por esta actividad, además de aportar un referente científico-práctico de estas estrategias, que pueden ser

³ según el anexo I y II numeral nueve (9) del convenio de Basilea, aprobado por la Ley 253 de 1996 (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005).

⁴ (EPA, 2004).

consideradas parte de las actividades dentro del plan de contingencia, que estas instalaciones deben presentar a las autoridades ambientales⁵, los acuíferos que reciben los vertimientos productos de la Biorremediación realizada pueden ser utilizados como fuente de abastecimiento. Los suelos, particularmente en la agricultura, a través de la Biorremediación se degradan moléculas potencialmente cancerígenas como son los fenoles y otros hidrocarburos

⁵ Decreto 3930 de 2010, según el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la efectividad de la Biorremediación en la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos generados en la Estación de Servicio TEXACO Puerto Gaitán.

5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar el efecto de la biodegradación de hidrocarburos totales en los sedimentos generados por la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán, para verificar si la acción microbiana de la Pseudomona Aeruginosa es efectiva o no.
- Establecer las tasas de degradación de hidrocarburos totales a través de la Biorremediación con la Bacteria Pseudomona Aeruginosa.
- Disminuir el impacto ambiental Negativo causado por los hidrocarburos totales y fenoles presentes en los lodos contaminados.

6. MARCO DE REFERENCIA

6.1. MARCO TEORICO

6.1.2. DESCRIPCIÓN Y SIGNIFICADO DE LA BACTERIA PSEUDOMONA AERUGINOSA.

El género *Pseudomona* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*, que además comprenden la familia *Moraxellaceae*.

La *Pseudomona Aeruginosa*, fue aislada por primera vez de las muestras ambientales por Schroeter en 18726. Debido a que las colonias son pigmentadas, la denominación de la especie denomina de la palabra *Aeruginosa* (*aeruginous*) que significa “el color del cobre oxidado”; reflejando el característico color azul-verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos.

Es un bacilo Gran-negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos, como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Aunque, se clasifica como aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante des nitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato.

⁶ PalleroniNj. Genus I, *Pseudomonas* In:N. R Kreig J.G. Holt (Eds) *Bergey's Manuel of systematic Bacteriology*: Williams and Wilkins. Baltimore, MA 1984 pp 141-199

Debido a su habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos, y como consecuencia a su gran versatilidad metabólica, estos organismos han llegado a ser problemáticos en ambientes hospitalarios.

Dentro del género de *Pseudomonas* se encuentra también algunas otras especies como *P. Florescens*, *P. Putida*, *P. syringae*, *P. alcaligenes* y *P. Aeruginosa*, se encuentran altamente distribuidas en la naturaleza, se pueden aislar de muestras de suelos y aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana* y a invertebrados como *Caenorhabditis elegans*.

6.1.3. ESTRUCTURA CELULAR Y METABOLISMO DE LA BACTERIA

PSEUDOMONA AERUGINOSA

Las bacterias *Pseudomonas Aeruginosa* están constituidas por microorganismos Gram-negativos, aerobios no formador de esporas, siempre móviles con flagelación polar, la movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimio taxis) y poder localizar los substratos en bajas concentraciones. Puede presentar de 1.5 a 5 μm de largo y un diámetro de 0.5 a 1 μm .

Es oxidasa y catalasa positiva, la mayoría de especies no crecen en condiciones ácidas (pH 4.5 unidades o menor). Poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO_3) o la arginina como aceptores finales de electrones. Cuando crecen en un medio líquido se puede observar la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas.

Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno de gas.

Tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con alto contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20 y 42°C.

El metabolismo central de azúcares en este grupo se desarrolla por la vía de Etnier-Doudoroff, y disponen de un ciclo de Ácidos Tricarboxílicos normal.

Algunas *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de llevar a cabo procesos de des nitrificación ($\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^- \longrightarrow \text{N}_2$) con lo que se empobrecen los suelos de nitrógeno utilizable desde el punto de vista agrícola. Este proceso de reducción del nitrógeno (que actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración anaerobia) se denomina reducción disimilatoria del nitrógeno.

La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. Esto confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas Aeruginosa* como digestores aerobios de materiales animales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica.

Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo

La gran versatilidad metabólica de las bacterias del género *Pseudomonas* las han hecho candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o por la acumulación de compuestos xenobióticos.

Varias especies del *Pseudomonas* contienen plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados. Estas enzimas suelen ser inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede permitir reducir los niveles de contaminación por estos compuestos xenobióticos.

La biodegradación de hidrocarburos y de otros compuestos orgánicos es realizada con eficiencia variable dependiendo de la estructura del hidrocarburo (lineal o ramificado, alifático o aromático) y de la presencia de átomos sustituyentes. Algo similar ocurre con la biodegradación de compuestos insecticidas, herbicidas y detergentes y emulgentes.

6.1.4. HABITAT

Es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos nutritivos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica.

Estas especies pueden vivir en diferentes hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras, por lo tanto el hábitat primario es ambiental.

Un hábitat con un rango de temperatura 4-42 °C, un pH comprendido entre 4 y 8 unidades, y que contengan compuestos orgánicos simples y compuestos es un hábitat potencial para la

Pseudomona Aeruginosa, se encuentran en suelos y aguas que presentan condiciones aeróbicas, mesofilicas y pH neutro.

6.1.5. INVESTIGACIONES ACTUALES:

En la actualidad la bacteria Pseudomona Aeruginosa es la más estudiada a nivel mundial, debido a que esta bacteria puede causar múltiples efectos en los seres vivos y que sus consecuencias pueden llegar a ser mortales y también puede servir para controlar problemáticas de tipo ambiental.

Dentro de los estudios realizados más recientes encontramos los siguientes:

LOS INVESTIGADORES DEL HOSPITAL BRIGHAM Y DE MUJERES (BWH) HAN DESCUBIERTO UNA VACUNA NUEVA PARA LA BACTERIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA APROVECHANDO UN NUEVO MECANISMO DE LA INMUNIDAD⁷.

Pseudomonas Aeruginosa es la principal causa de infecciones adquiridas en hospitales, particularmente en pacientes con respiradores, donde puede causar neumonía llamada asociada a la ventilación, que tiene una tasa de mortalidad muy alta.

Pseudomonas también causa infecciones pulmonares en personas con fibrosis quística, un trastorno genético que hace que los pulmones sean susceptibles a la infección bacteriana.

A pesar de más de 40 años de investigación y desarrollo de vacunas, no existe una vacuna disponible clínicamente para esta bacteria. La mayoría de los esfuerzos de las vacunas anteriores se han centrado en la generación de anticuerpos contra las toxinas de Pseudomonas

⁷ Artículo completo en <http://www.medicalpress.es/investigadores-descubren-vacuna-candidata-para-la-pseudomonas-aeruginosa#ixzz2dlh4z1>

o moléculas de la superficie, especialmente la capa de azúcar en el insecto llamado el antígeno O del lipopolisacárido. Estos enfoques no han producido una vacuna con licencia para los seres humanos.

Gregorio Priebe, MD, División BWH de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina, y la División de Niños de Boston Hospital de Medicina de Cuidados Críticos, Departamento de Anestesiología, perioperatoria y Medicina del Dolor, junto con investigadores de la Harvard Medical School, construyó una vacuna basada en un nuevo mecanismo de la inmunidad a *Pseudomonas* mediada por T helper 17 (Th17) células. Las células Th17 son un tipo descrito recientemente de células T ayudantes que secretan la citocina IL-17 y mejorar las defensas antibacterianas mucosas.

En los estudios actuales, los investigadores diseñaron una pantalla para antígenos proteicos Th17 estimulantes expresadas por una biblioteca molecular de ADN que codifican proteínas de *Pseudomonas*. La pantalla descubrió que la proteína *Pseudomonas* POPB es un estimulador muy eficaz de la inmunidad Th17, y la inmunización con purificado POPB ratones protegidos de la neumonía letal de una manera independiente de anticuerpos.

Los investigadores están tomando su trabajo un paso más allá mediante la construcción de las vacunas conjugadas con POPB como un portador de proteína con la esperanza de mejorar la eficacia de la vacuna. Tienen la esperanza de que la vacuna basada en POPB algún día podría ser usado para prevenir las infecciones por *Pseudomonas* en pacientes hospitalizados y en personas con fibrosis quística.

Ambientalmente se han desarrollado múltiples estudios asociados a la disminución de contaminantes o procesos de Biorremediación.

Entre ellos encontramos **EVALUACION DE LA ESTIMULACION EN LA BIODEGRADACION DE TPH'S EN SUELOS CONTAMINADOS POR PETROLEO**, estudio realizado por Victoria Vallejo, Laura Salgado y Fabio Roldan, estudio que se basaba básicamente en evaluar la adición de nutrientes en forma de sales inorgánicas simple y un fertilizante inorgánico compuesto se emplearon bacterias Pseudomona Aeruginosa a través de un cultivo que duro 125 días y de esta forma verificar el proceso de Biorremediación, este estudio fue realizado en el invernadero de la universidad Pontificia Universidad Javeriana en la ciudad de Bogotá.

BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETROLEO, Estudio realizado en Bogotá, por Joaquín Benavides, Gladis Quintero Andrea Guevara, diana Jaimes, Investigadores de la universidad de la sallé, donde básicamente colocan a prueba una serie de microorganismos degradadores de hidrocarburos y pueden observar cual e estos métodos es más efectivos y pueden realizar una correlación de acuerdo al método evaluado.

También existen una serie de estudios microbiológicos donde buscan estudiar más a fondo el metabolismo y estructura de las bacterias Pseudomonas Aeruginosa.

Pseudomona Aeruginosa: **APORTACION AL RECONOCIMEINTO DE SUS ESTRUCTURA Y AL DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS**, es una investigación de doctorado realizada Lidia Ruiz, en Barcelona en año de 1997, este estudio básicamente se trata en observar y comparar dos cepas bacterianas y poder concluir si las cepas patógenas que viven en el interior de los hospitales tienen alguna relación genética con las cepas libremente en el

entorno, para ellos es utilizada la *Pseudomona Aeruginosa*, esto por las múltiples causas y efectos que trae para la salud humana.

6.2. MARCO CONCEPTUAL

6.2.1. **BIOREMEDIACIÓN:** Proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La Biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales.

6.2.2. TECNICAS DE BIORREMEDIACION:

6.2.2.1. **Bioaumentación:** Consiste en la adición al medio (suelo, agua) al objeto de optimizar la biodegradación de microorganismos autóctonos vivos especializados, cuya eficiencia en la degradación del contaminante esté probada. Se incrementa la población nativa de microorganismos del sistema incorporando un inóculo de otros adaptados selectivamente, desarrollados para que tengan la capacidad para degradar los contaminantes en cuestión, compuestos previamente considerados como no o difícilmente biodegradables. Estos microorganismos pueden ser naturales o modificados genéticamente.

6.2.2.2. **Bioestimulación:** Responde a la idea de aplicar Biorremediación, pero creando condiciones. Es decir intentar que se alcancen las condiciones para que la biodegradación transcurra de forma idónea. La Bioestimulación consiste en estimular a los microorganismos

autóctonos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes y otros aditivos, de humedad y aireación del sistema para así mejorar la eliminación de los contaminantes.

6.2.2.3. Degradación enzimática: Consiste en agregar enzimas al sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad. Una de las ventajas de las enzimas es que las reacciones es que las reacciones mediadas por éstas poseen tasas de velocidad significativamente mayores que las reacciones en las cuales no se encuentran estos catalizadores.

6.2.2.4. Fitoremediación: Es un término utilizado para describir el tratamiento de problemas ambientales a través de la utilización de plantas. Es la descomposición de los suelos, la depuración de las aguas residuales o la limpieza del aire interior usando plantas basculantes algas u hongos y por extensión ecosistemas que contienen estas plantas.

6.2.3. PSEUDOMONA AERUGINOSA

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* están constituidas por microorganismos Gram-negativos, aerobios no formador de esporas, siempre móviles con flagelación polar, la movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimio taxis) y poder localizar los substratos en bajas concentraciones. Puede presentar de 1.5 a 5 μm de largo y un diámetro de 0.5 a 1 μm .

Es oxidasa y catalasa positiva, la mayoría de especies no crecen en condiciones ácidas (pH 4.5 unidades o menor). Poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO₃) o la arginina como aceptores finales de electrones. Cuando crecen en un medio líquido se puede observar la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno de gas.

Tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con alto contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20 y 42°C.

PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS

6.2.4. COLIFORMES: Se define como un grupo de bacterias en forma de bacilo, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, que no forman esporas, con capacidad de fermentar la lactosa y otros azúcares con producción de ácido y de gas a una temperatura entre 35 y 37°C durante un lapso de 24 a 48 horas. Los géneros pertenecientes al grupo Coliformes son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. (González 2011)

Entre las principales características de este grupo está su resistencia a condiciones ambientales adversas, la cual es igual o superior a la de los patógenos; además, se comportan de manera similar a éstos. Se encuentran también en el intestino de animales de sangre caliente, lo cual es un buen indicador de contaminación animal. Adicionalmente, los coliformes se pueden encontrar en

el suelo, viviendo como saprofitos independientes; de esta manera para separar los géneros de origen fecal de los saprofitos independientes, se les dio el nombre a los primeros de coliformes fecales y a los segundos de coliformes totales. Cada ser humano excreta de 100.000 a 400.000 millones de coliformes por día. (González 2011)

Tabla 1. Coliformes fecales en heces animales y el hombre

HECES	COLIFORMES FECALES DENSIDAD/GRAMO
Hombre	13 000 000
Vaca	230 000
Pollo	1 300 000
Perro	23 000 000
Gato	7 900 000
Cerdo	3 300 000
Oveja	16 000 000
Ratón	330 000

FUENTE: Microbiología del agua (González 2011)

6.2.5. MESOFILOS, El término **mesófilo**, usado sobre todo en el campo de la microbiología, se refiere a un organismo cuya temperatura de crecimiento óptima está entre los 15 y los 35 °C

(un rango considerado moderado).⁸ Por el contrario, los organismos que prefieren temperaturas frías se denominan psicrófilos, y los que crecen de forma óptima a altas temperaturas son llamados termófilos.

El hábitat de los organismos mesófilos incluye el suelo, el cuerpo de un animal, etc. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 37 °C, la temperatura normal de un cuerpo humano.

PARAMETROS FISICOQUIMICOS

6.2.6. CONDUCTIVIDAD: La conductividad del agua es una expresión numérica de su habilidad para transportar una corriente eléctrica, que depende de la concentración total de sustancias disueltas ionizadas en el agua y de la temperatura a la cual se haga la determinación. Por tanto, cualquier cambio en la cantidad de sustancias disueltas, en la movilidad de los iones disueltos y en su valencia, implica un cambio en la conductividad. Por esta razón, el valor de la conductividad se usa mucho en análisis de aguas para obtener un estimativo rápido del contenido de sólidos disueltos⁹.

La medida de la conductividad permite evaluar de forma rápida y aproximada la mineralización global del agua y seguir la evolución. En general la conductividad se eleva de forma progresiva de arriba hacia abajo en los cursos de agua; las divergencias son tanto más importante cuanto más débil es la mineralización inicial, en particular en las zonas con sustrato ácido o subsuelo silíceo. En el caso de un control de distribución de agua potable, el

⁸ ↑ Sociedad Española de Ciencias Forestales. «Diccionario Forestal» (en español) pág. 770. España: Ediciones Mundi-Prensa. Consultado el 22 de diciembre de 2011.

⁹ Romero 2009

interés de este método no reside en una única medida sino en una serie de determinaciones o registros sin interrupción que permitirán detectar las variaciones de composición que podrán indicar la llegada de agua susceptible de estar contaminada. En las aguas superficiales y los vertidos de aguas residuales, se pueden producir con rapidez durante el día modificaciones importantes en la conductividad. Se puede admitir que la situación es particular o anormal más allá de $2000 \mu\text{s/cm}^{10}$.

La tabla siguiente ofrece algunas indicaciones sobre la relación que existe entre la mineralización y la conductividad:

Tabla 2. Relación mineralización - conductividad.

Conductividad < $100 \mu\text{s/cm}$	mineralización muy débil
$100 \mu\text{s/cm}$ < conductividad < $200 \mu\text{s/cm}$	mineralización débil
$200 \mu\text{s/cm}$ < conductividad < $333 \mu\text{s/cm}$	mineralización media
$333 \mu\text{s/cm}$ < conductividad < $666 \mu\text{s/cm}$	mineralización media acentuada
$666 \mu\text{s/cm}$ < conductividad < $1000 \mu\text{s/cm}$	mineralización importante
conductividad > $1000 \mu\text{s/cm}$	mineralización elevada

FUENTE: Análisis del agua. (Rodier 2009)

¹⁰ (Rodier 2009).

6.2.7. TEMPERATURA:

Es uno de los factores ambientales más importantes, esta tiene una gran influencia en la biodegradación por su efecto sobre la naturaleza física y química del petróleo y sus derivados¹¹. A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce y disminuye la solubilidad del O₂ en agua, afectando así la biodegradación. Las tasas de degradación generalmente aumentan cuando la temperatura incrementa¹².

La temperatura también afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 18 y 30°C (condiciones mesófilas), Cuando supera los 40°C se produce una disminución de la actividad microbiana, una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas o puede decrecer la Biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias. Cuando la temperatura esta a 0°C se detiene substancialmente la biodegradación¹³, también se ha dado la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos, a 5°C en suelos árticos, a 60°C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití¹⁴. Los cambios climáticos y de

¹¹ (Pardo, J., *et al.*, 2004).

¹² (Ríos, R., 2005).

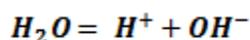
¹³ (Gómez, S., *et al.*, 2008)

¹⁴ (Torres, K. y Zuluaga, T., 2009)

estaciones, seleccionan de manera natural a las poblaciones de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, los cuales se adaptan a las temperaturas ambientales.

6.2.8. POTENCIAL DE HIDROGENIONES: El termino pH es una forma de expresar la concentración del ion hidrogeno o, más exactamente, la actividad del ion hidrogeno (H^+). En general se usa para expresar la intensidad de la condición acida o alcalina de una solución, sin que esto quiera decir que mida la acidez total o la alcalinidad total. (Romero 2009).

La disociación iónica del agua puede representarse por el equilibrio:



Su constante de disociación será:

$$K_i = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

En agua pura la magnitud de su ionización es muy pequeña. Para el equilibrio solo están presentes 10^{-7} moles/L de H^+ y de OH^- , lo cual permite suponer que la actividad o concentración del agua es esencialmente constante; así la ecuación anterior se convierte en:

$$K_w = [H^+][OH^-] = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$$

La constante K_w es conocida como la constante de ionización del agua y su valor debe satisfacerse en cualquier solución acuosa. Por tanto cuando se añade un ácido al agua, este se ioniza en ella, aumentando la concentración de iones H^+ ; consecuentemente, debe disminuir la concentración de iones OH^- para que K_w se mantenga constante. Es importante recordar que en ningún caso la concentración de ion H^+ o de ion OH^- puede reducirse a cero, no importa lo acida o básica que sea la solución. (Romero 2009).

El pH se define como el logaritmo del inverso de la concentración del ion hidrogeno, o sea:

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]}$$

$$pH = -\log[H^+]$$

6.2.9. NITROGENO TOTAL:

Nitrógeno es uno de los elementos principales para la vida. Es esencial para la vida de las plantas porque estimula el crecimiento por encima del suelo y contribuye al brillante color verde característico de las plantas saludables. Aunque el nitrógeno molecular (N₂) compone el 78% de la atmósfera, esta forma de nitrógeno no puede usarse por los animales ni por la mayoría de las plantas en la fabricación de aminoácidos y proteínas esenciales.

6.2.10. GRASAS Y ACEITES

Se entiende por grasas y aceites el conjunto de sustancias pobremente solubles que se separan de la porción acuosa y flotan formando natas, películas y capas iridiscentes sobre el agua, muy ofensivas estéticamente. En aguas residuales los aceites, las grasas y las ceras son los principales lípidos de importancia. El parámetro grasas y aceites incluye los ésteres de ácidos grasos de cadena larga, compuestos con cadenas largas de hidrocarburos, comúnmente con un grupo ácido carboxílico en un extremo; materiales solubles en solventes orgánicos, pero muy insolubles en agua debido a la estructura larga hidrofóbica del hidrocarburo. Estos compuestos sirven como alimentos para las bacterias, puesto que pueden ser hidrolizados en los ácidos grasos y alcoholes correspondientes¹⁵. (Romero, 2009).

¹⁵ (Romero 2009).

6.2.11. FENOLES TOTALES: Los fenoles, por su nombre y por su fórmula, son alcoholes aromáticos con un grupo hidroxilo (-OH) unido directamente a un átomo de carbono de un anillo bencénico, o sea son derivados del benceno con un grupo hidroxilo; son germicidas. El fenol se considera el alcohol aromático más sencillo, que tiene por fórmula molecular C_6H_5OH ; se conoce como ácido carbónico o hidroxibenceno, se ioniza en agua como ácido y exhibe las características de un ácido. Es un residuo común en la industria del petróleo, del carbón y otras aguas residuales; también se lo ha encontrado en algunas aguas crudas y en lixiviados de rellenos sanitarios. Los fenoles pueden producir con el cloro problemas de sabor de aguas potables y en concentraciones altas pueden ser perjudiciales para la salud humana; su presencia es más común en alimentos que en aguas. El pentaclorofenol se emplea mucho para preservar maderas y se encuentra en aguas naturales, aguas residuales y escorrentía superficial. (Romero 2009).

6.2.12. HIDROCARBUROS TOTALES: El término HTP corresponde a una medida de los compuestos que se solubilizan en ciertos solventes y son detectados por ciertos métodos analíticos (infrarrojo, gravimétrico, cromatografía gaseosa). Muchos compuestos, diferentes a los hidrocarburos del petróleo (cera de las plantas, materia húmica del suelo, grasa animal, etc.) pueden ser medidos como HTP. Además la misma muestra analizada por diferentes métodos para HTP producirá diferentes concentraciones debido a diferencias en el tipo de solvente, método de extracción, método de detección, y estándar de cuantificación. Los hidrocarburos del petróleo se definen por el método analítico que es usado para su determinación. La definición de HTP depende del método analítico usado para su determinación, ya que la medida de HTP es la concentración total de los hidrocarburos

extraídos y medidos por un método particular (McMILLEN, S.J., KERR, J.M., NAKLES, D.V., 2001).

6.2.13. HUMEDAD

La humedad es un factor importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma bacteriano, este proceso es necesario para su crecimiento y desarrollo. Es conveniente mantener una humedad del orden del 20 - 75 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación (Gómez, S., *et al.*, 2008). Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo y una poco o nula humedad priva el intercambio de gases y da como resultado zonas anaeróbicas. Por lo anterior, la humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación (Torres, K. y Zuluaga, T., 2009).

6.2.14. NUTRIENTES

Los nutrientes son uno de los factores más relevantes por ser sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos, por lo que estos constituyentes se deben encontrar disponibles para su asimilación y síntesis, la disponibilidad de estos aumentan la eficiencia y el buen desarrollo de la Biorremediación.¹⁶

6.2.15. MICROORGANISMOS

¹⁶

La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxiden los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como el crudo.

La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Ríos, R., 2005).

Los reportes del porcentaje de bacterias y hongos presentes en suelos, varían de forma importante de entre 0.13% y 50% para bacterias, y de 6% a 82% para hongos, con respecto a la comunidad heterótrofa total del suelo. La proporción de hongos y bacterias dependerá de las condiciones del sitio. El número de microorganismos heterótrofos totales en suelo, considerado como típica se encuentra en una cuenta total de 10^7 a 10^9 UFC/g de suelo; para degradadoras potenciales en suelos no contaminados entre 10^5 y 10^6 UFC/g; y entre 10^6 y 10^8 UFC/g en suelos contaminados (Ríos, R., 2005).

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

6.2.16. METABOLISMO: Es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo. Estos complejos procesos interrelacionados son la base de la vida a escala molecular, y permiten las diversas actividades de las células: crecer, reproducirse, mantener sus estructuras, responder a estímulos, etc. La metabolización es el proceso por el cual el organismo consigue que sustancias activas se transformen en no activas.

6.2.17. SUELO: El suelo incluye los horizontes cercanos a la superficie que difieren del material del lecho de roca como resultado de la interacción, a través del tiempo, del clima, de los organismos vivos, del material parental y del relieve. En algunos lugares, se puede encontrar delgados horizontes cementados impenetrables para las raíces, animales, o también carecen de marcas o huellas de cualquier actividad biológica. En consecuencia, el límite inferior del suelo, normalmente corresponde al límite inferior de la actividad biológica, la cual generalmente coincide con la profundidad común de las raíces de plantas perennes. (Soil Survey Staff 1975)

6.2.18. ACUIFERO: es un depósito subterráneo de agua, pero no es como un cráter vacío como las reservas en la superficie pueden ser. El agua de lluvia es absorbida por el suelo y llena los espacios entre piedras, la arena, y la grava. Continúa a hundirse más profundamente con la gravedad hasta que es parado por una capa del suelo que no permitirá el pasaje del agua. Ellos llaman esta capa una capa impermeable. (Gómez, S., et al., 2008).

6.2.19. ESTUDIOS DESCRIPTIVOS: Muy frecuentemente el propósito del investigador es describir situaciones y eventos. Esto es, decir cómo es y se manifiesta denominando fenómeno. *Los estudios descriptivos buscan especificar las propiedades importantes de personas, grupos, comunidades o cualquier otro fenómeno que sea sometido a análisis* (Dankhe, 1986), Miden y

evalúan diversos aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno o fenómenos a investigar. Desde el punto de vista científico, describir es medir. Esto es, *en un estudio descriptivo se selecciona una serie de cuestiones y se mide cada una de ellas independientemente, para así y valga la redundancia describir lo que se investiga.*

6.2.20. ESTUDIOS CORRELACIONALES: Los estudios correlacionales pretenden responder a preguntas de investigación; además de tiene como propósito medir el grado de relación que existe entre dos o más conceptos o variables. La utilidad y el propósito principal de los estudios correlacionales son saber cómo se pueden comportar un concepto o variable conociendo el comportamiento de una u otras variables relacionadas.

6.2.21. VARIABLE DEPENDIENTE: La variable dependiente no se manipula, sino que se mide para ver el efecto que la manipulación de la variable independiente tiene en ella.

6.2.22. VARIABLE INDEPENDIENTE: Es la variable que se varía o manipula por el investigador. Esta es la respuesta de la causa.

6.3. MARCO LEGAL

Tabla 3. Marco Legal

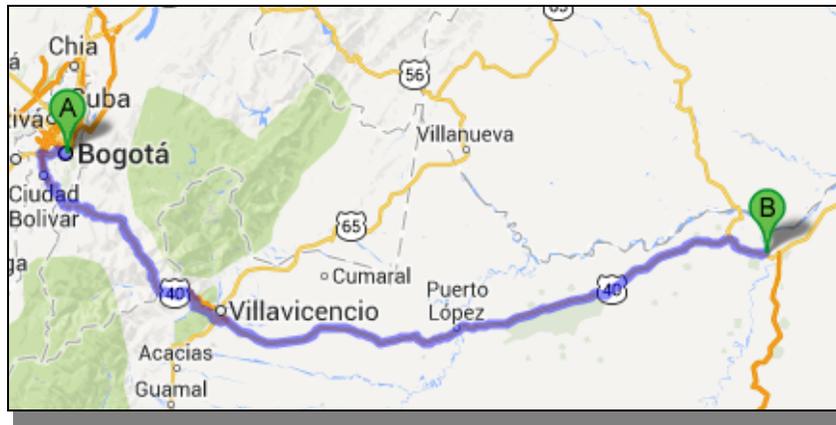
NORMA	DESCRIPCION	ENTIDAD
DECRETO 283/90	Por el cual se reglamenta el almacenamiento, manejo, transporte, distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo y el transporte por carro tanques de petróleo crudo	MIN MINAS Y ENERGIA
DECRETO 353/91	Por el cual se reglamenta la Ley 26 de 1989 y se modifica parcialmente el Decreto 283 de 1990	MIN MINAS Y ENERGIA
Ley 253 de 1996	Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación"	CONVENIO INTERNACIONAL
RESOLUCION 1170/97	por medio de la cual se dictan normas sobre estaciones de servicio e instalaciones afines y se deroga la Resolución 245 del 15 abril de 1997	DAMA
Decreto 1521 de 1998	Por el cual se reglamenta el almacenamiento, manejo, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo, para estaciones de servicio.	MIN MINAS Y ENERGIA
DECRETO 321 DE 1999	Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas	MAVDT
GUIA AMBIENTAL DE ESTACIONES DE SERVICIOS 2008	Por el cual se reglamenta la Ley 26 de 1989 y se modifica parcialmente el Decreto 283 de 1990	MAVDT
Decreto 3930 de 2010	El presente decreto establece las disposiciones relacionadas con los usos del recurso hídrico, el Ordenamiento del Recurso Hídrico y los vertimientos al recurso hídrico, al suelo y a los alcantarillados.	MAVDT

FUENTE: Autoras

6.4. MARCO GEOGRAFICO

La Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán en donde se extrajo la muestra para realizar el proceso de Biorremediación, se encuentra ubicada en el Municipio de Puerto Gaitán en el Departamento del Meta a 307 km desde la ciudad de Bogotá aproximadamente a 5 horas y media, la estación está ubicada sobre la vía principal a unos cuantos kilómetros del obelisco a la entrada del municipio.

Grafica 1. Mapa de Ubicación



Fuente: Google Maps

Fotografía 1. Vista panorámica estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán



Fuente: Autoras

7. TIPO DE INVESTIGACIÓN – PROCEDIMIENTO.

El tipo de Investigación utilizado en el desarrollo de este proyecto fue la combinación del estudio descriptivo y de correlación. El primero debido a que tiene como propósito describir situaciones y eventos, que para este caso se describirá el procedimiento utilizado (desde la toma de muestra) para conocer el comportamiento de la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* en la muestras del lodo contaminado con Hidrocarburos tomada en la Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán. Adicional a esta metodología se recurrirá al estudio correlacional que pretende responder a preguntas de investigación; además tiene como propósito medir el grado de relación que existe entre dos o más conceptos o variables que para este proyecto de investigación se entenderá como la variable independiente la cepa bacteriana *Pseudomona Aeruginosa* y como variable dependiente las concentraciones de Hidrocarburos totales.. La utilidad y el propósito principal de los estudios correlacionales son saber cómo se pueden comportar un concepto o variable conociendo el comportamiento de una u otras variables relacionadas (*Pseudomona Aeruginosa*).

Las etapas que se desarrollaron en la realización del presente proyecto de investigación se presentan a continuación en la tabla 4:

Tabla 4. Etapas en el desarrollo del proyecto de investigación.

Fechas	Etapa
16 de abril del 2013-30 de abril de 2013	Revisión bibliográfica
01 de mayo al 30 de mayo de 2013	Trabajo de campo
15 de junio-30 de julio de 2013	Análisis y resultados
06 de Agosto al 28 de agosto 2013	Elaboración del documento final

FUENTE: Autoras

En primera medida frente a la fase de campo fue realizar la inspección preliminar que permitió conocer el sistema de tratamiento empleado en la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán Meta poder identificar el lugar del muestreo y empezar a tramitar los permisos de trabajo correspondientes para dicha actividad en el lugar.

Una vez identificado el punto del muestreo, se coordina con el administrador de la estación la fecha de la toma de la muestra la cual se realizaría de manera puntual.

A continuación se muestra el correspondiente registro fotográfico que permite evidenciar el punto de la toma de muestras.

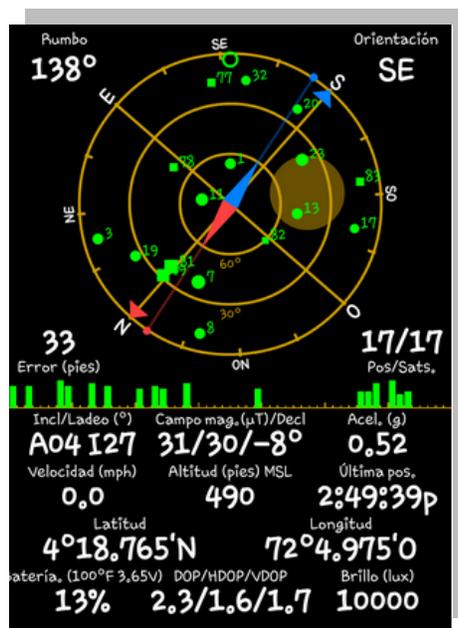
Fotografía 2. Visita Preliminar y selección del punto de muestreo



FUENTE: Mayo 17 de 2013 (Autoras).

Posterior a esto se programa el monitoreo para el día miércoles 29 de mayo, la muestra se toma de manera puntual en el sistema de tratamiento preliminar en los tanques sedimentadores antes de pasar a las trampas de grasas, a las 13:30 , según los lineamientos para la toma de lodos y suelos, según el registro técnico MPC-5.7-21 “muestreo de agua versión 7 del 18 de julio de 2011” y MPC-5.7-33 “Muestreo de Suelos” versión 6 del 28 de enero de 2013, elaborado por el laboratorio de análisis ambiental y geoquímica Antek S.A.

Grafica 2. Coordenadas punto de muestreo



Fuente: 29 de Mayo 2013, Autoras

Fotografía 3. Toma de muestra Estación de Servicio Texaco Puerto Gaitán



FUENTE: 29 de Mayo de 2013

Una vez tomada la muestra se procede a diligenciar los respectivos registros técnicos y embalaje de las muestras para ser enviadas al Laboratorio Antek S.A, ubicado en la ciudad de Bogotá, para su posterior análisis.

Fotografía 4. Embalaje de las muestras y diligenciamientos del registro técnico.



FUENTE: 29 de Mayo de 2013 Autoras

Las muestras llegan al laboratorio Antek S.A el día 30 de Mayo, son ingresadas para analizar los siguientes Parámetros Físico- químicos y microbiológicos:

- Temperatura
- pH
- Conductividad
- Nitrógeno Total
- Grasas y Aceites
- Fenoles Totales
- Hidrocarburos Totales
- Coliformes Totales
- Coliformes Fecales
- Meso Filos

Una porción de muestra se lleva al departamento de microbiología del laboratorio Antek S.A, para proceder hacer el cultivo de la Cepa Bacteriana Pseudomona Aeruginosa

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Dentro del proceso de investigación y análisis de la Bioestimulación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán, se realizaron las siguientes actividades:

Factores

Para esta investigación se consideró un factor o variable importante a ser controlado durante la Investigación:

1. Biorremediación

Niveles

Para la Bioestimulación:

1. Se adicionó Agar nutritivo
2. Se adicionó H₂O y se volteaba manualmente (Oxígeno) como control biótico.

Variables de Respuesta

Para la investigación se tuvo en cuenta una variable de respuesta:

1. Hidrocarburos totales.

Variables de Control

Para la investigación se tuvo en cuenta tres (3) variables de control:

1. Presencia de Microorganismos.
2. Características químicas (contenido de nutrientes).
3. Características Físicas (Temperatura, pH, Humedad).

PROCEDIMIENTO

Para este proyecto se realizo el cultivo de la cepa bacteriana a través del método manual con la aza y utilizando los protocolos de esterilización se inocuo de la siguiente manera:

Dentro de la caja de Petri se adiciono 5 gramos del suelo contaminado con hidrocarburos, obtenido anteriormente de la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán ubicado en el municipio del meta y se disolvieron en 250ml de agar nutritivo y posteriormente se adiciona 7 gramos de la Cepa Bacteriana (*Pseudomona Aeruginosa*)

Fotografía 5. Preparación de la Cepa Bacteriana *Pseudomona Aeruginosa*



FUENTE: Autoras

8. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los primeros resultados obtenidos fueron entregados el día 15 de junio, los parámetros físicos químicos y bacteriológicos que se analizaron a la muestra de lodos de la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 5. Tabla de resultados físicos químicos y microbiológicos

Parámetros	Unidades	Suelos Antes del tratamiento preliminar
Temperatura	°C	21
pH	UNIDADES	7,07
Conductividad	µs/cm	0,45
Nitrógeno Total	mg/Kg	81,1
Grasas y Aceites	Ppm	9470 ppm(0.95 %
Fenoles totales	mg/Kg	12,6
Hidrocarburos Totales	Ppm	9210 ppm/ 0.92
Coliformes Totales	NMP/g	50000
Coliformes Totales	NMP/g	4000
Meso Filos	UFC/g	9100000% 30 UFC

Fuente: Laboratorio Antek S.A

El día 15 de junio se realizó la cepa bacteriana con la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*, a partir, de esa fecha se comienza a realizar mediciones cada 7 días, a continuación se describe de forma ordenada los resultados obtenidos en un periodo de 28 días, para poder realizar seguimiento al proceso de Biorremediación y la evaluación obtenida.

Tabla 6. Resultado finales obtenidos durante los 28 días

PARAMETRO	UNIDADES	día 0	día 7	día 14	día 21	día 28
		15 de junio	21 de junio	28 de junio	5 de julio	12 de julio
Temperatura	°C	21	20	19	20	19
pH	unidades	7,07	7,55	7,53	7,22	7,39
Conductividad	µs/cm	0,45	0,47	0,56	0,57	0,55
Nitrógeno Total	mg/Kg	81,1	66,5	52,5	29,4	35,6
Grasas y Aceites	Ppm	9470	7670	6596	4287	5530
Fenoles Totales	mg/Kg	12,6	10,4	8,3	4,7	5,7
Hidrocarburos Totales	Ppm	9210	7740	6680	4370	5680
Coliformes Totales	NMP/g	50000	27500	19700	28000	32000
Coliformes fecales	NMP/g	4000	1500	800	1650	1100
Humedad	%	24,1	23,7	24,7	25	23,1

Fuente: Autoras

De acuerdo con estos parámetros podemos concluir que durante el cultivo se presentaron buenas características, la temperatura se encuentra dentro del rango óptimo 18 y 30°C, que permite la actividad enzimática y intercambio celular (Gómez, S., *et al.*, 2008), el pH se encontró entre 7,07 y 7,55 unidades, este intervalo es adecuado para el crecimiento de bacterias, rango óptimo entre 6,0 y 8,0 unidades (Ríos, R., 2005), la humedad se encuentra entre el orden del 20% - 75% de la capacidad de campo, que es importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula (Gómez, S., *et al.*, 2008).

TEMPERATURA

El metabolismo de los microorganismos, la actividad enzimática y celular dependen de la temperatura, así mismo esta influye en los cambios estructurales y químicos del petróleo.

A bajas temperaturas, la viscosidad de los compuestos de hidrocarburo incrementan y sus componentes tóxicos de bajo peso se reducen, retrasando el proceso de biodegradación, el rango optimo es de 18 a 30°C. (Gómez, S., *et al.*, 2008; Atlas, R., 1996., Levin, M., y Gealt, M., 1997).

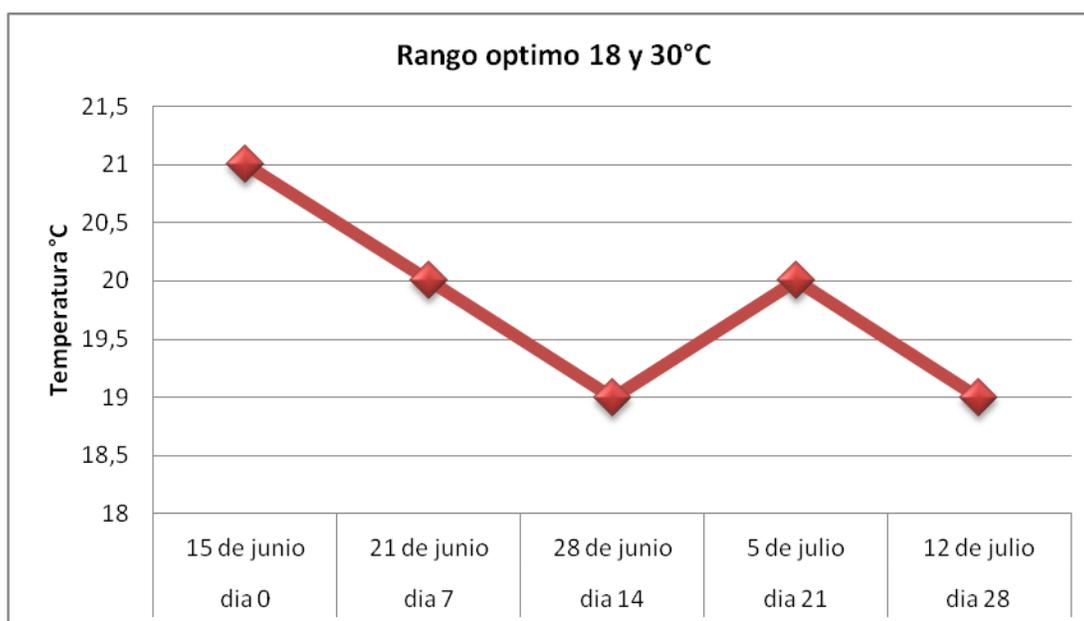


Ilustración 1. Comportamiento Temperatura

Como se puede observar en la grafica en los primero 14 días del cultivo se presento una disminución de temperatura de 2°C, este comportamiento se atribuye a la actividad microbiana, el promedio de la temperatura obtenida durante los 28 días fue de 19,8°C.

HUMEDAD

Los microorganismos toman los nutrientes necesarios para su crecimiento de la fase líquida, el agua es un medio de transporte a través del cual los componentes orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células a menor humedad en el suelo se pueden generar zonas secas con baja actividad microbiana, a mayor humedad se puede inhibir el intercambio de gases y da como resultado zonas anaerobias Los microorganismos toman los nutrientes necesarios para su crecimiento (Si-Zhong, Y., *et al*, 2009, Ruberto, L., *et al*, 2003).

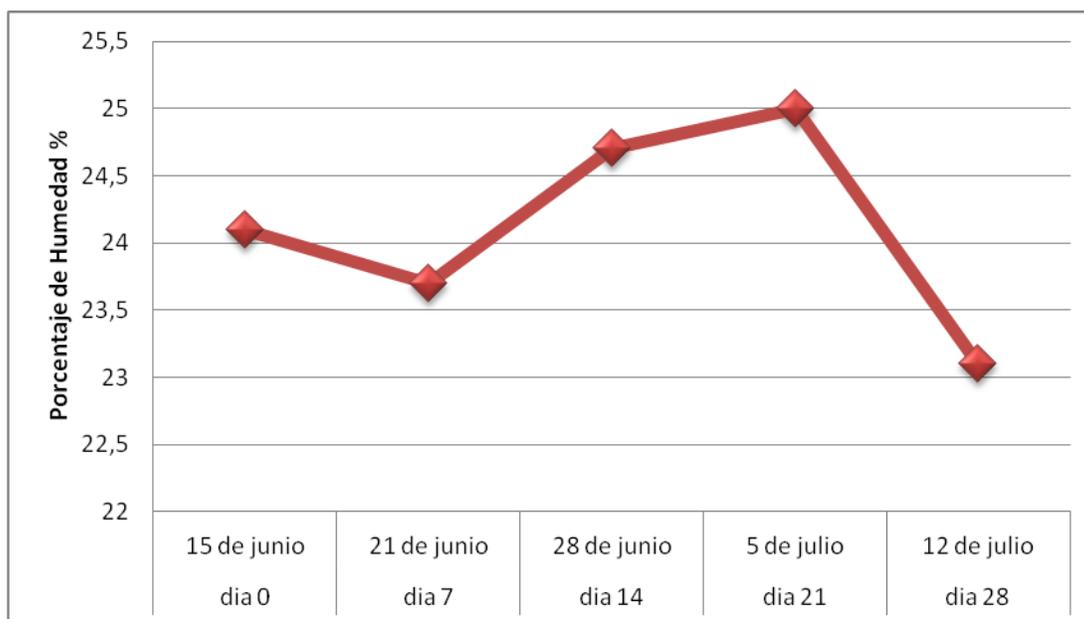


Ilustración 2. Comportamiento de Humedad

Como se puede observar durante la investigación se presentaron fluctuaciones de este parámetro, por la condiciones de temperatura y el sitio en el que se encontraba se trato de mantener la humedad para la toma de nutrientes en el crecimiento microbiano, el porcentaje de humedad durante los 28 días fue de 24,12%.

pH

Este parámetro es importante para la actividad enzimática y para el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el rango óptimo está entre 6 -8 unidades, para los procesos de Biorremediación, Valores de pH inferiores a 6 unidades (ácidos) inhiben el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos, lo mismo pasa con valores mayores de 8 unidades (alcalinos) (Ritter, W., y Scarborough, 1995., Mehrasbi, M., *et al.*, 2003., Vallejo, V., *et al.*, 2005).

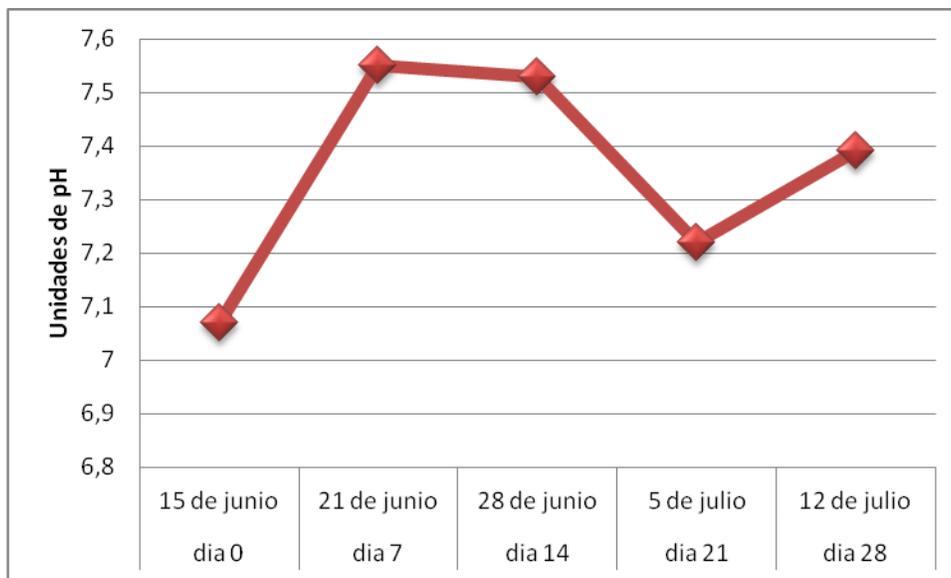


Ilustración 3. Comportamiento pH

Se observa que durante las dos primeras semanas tiene un aumento considerable, luego hace una disminución y vuelve a aumentar, el promedio de pH obtenido durante los 28 días fue de 7,35 unidades, un pH casi neutro, y que se encuentra entre el rango óptimo de biorremediación (6 y 8 unidades de PH).

COLIFORMES

Las bacterias tienen un crecimiento muy rápido y una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminado, lo que incrementa la probabilidad de éxito en la biodegradación del hidrocarburo (Velasco, N., 2004).

Con respecto al resultado final del cultivo, inician con una población de bacterias de 50000 U.F.C/g, llegando a la semana veintiocho a 32000U.F.C/g, para coliformes totales y para coliformes fecales paso de 4000 U.F.C/g, a 1100U.F.C/g, esto indica que los suelos contaba con una buena población bacteria para llevar a cabo el proceso de degradación, también se puede observar que los primeros 14 días los coliformes tienen un proceso de encapsulamiento y debido a las condiciones presentadas en el medio nuevamente realizan su esporulación y reproducción, como se puede observar los coliformes fecales disminuyeron considerablemente esto es debido al efecto biosida de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* sobre estos patógenos que ayudo a su disminución.

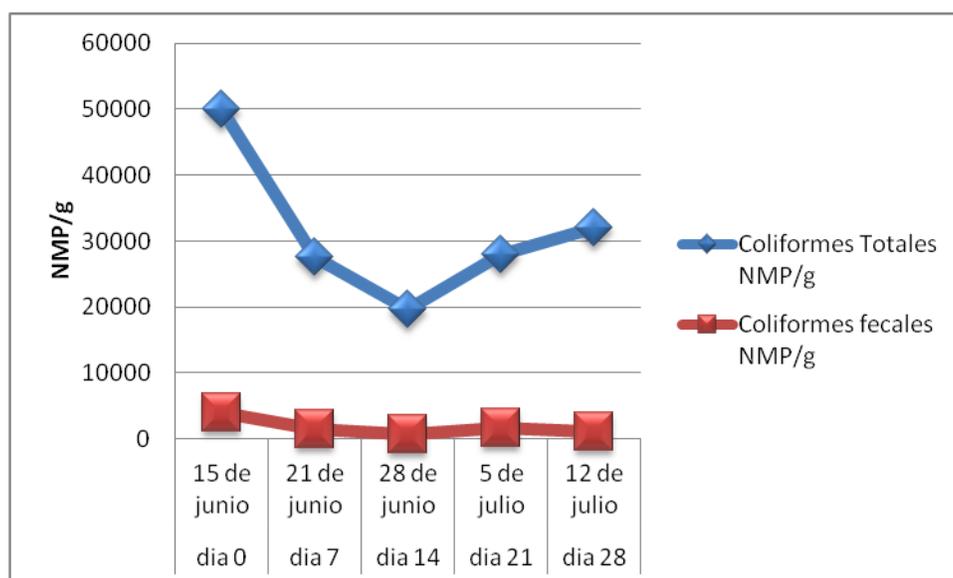


Ilustración 4. Comportamiento de Coliformes Totales y Fecales

GRASAS Y ACEITES E HIDROCARBUROS TOTALES

La biodegradación de hidrocarburos y de otros compuestos orgánicos es realizada con eficiencia variable dependiendo de la estructura del hidrocarburo, la *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de sintetizar ramnolipidos cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento, por tal razón esto solo se puede realizar en la primera fase del proceso de Biorremediación y contribuyendo así con la movilización y solubilización de los contaminantes durante la fase siguiente de mineralización.¹⁷

La versatilidad metabólica del grupo de las *Pseudomonas* se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. Lo confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica (Todar, K., 2000).

Con respecto al comportamiento presentado en los parámetros de Grasas y Aceites e Hidrocarburos totales, donde se determina la *Pseudomonas aeruginosa* se adecuada para la digestión de compuesto orgánicos presentando un nivel de Biorremediación de hidrocarburos totales del 64% y para Grasas y aceites de 42% en un periodo de 28 días, se determina un

¹⁷ Demaneche S, Kay E, Gourbiere F, Simonet P. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67 (6): 2617-2621.

aumento en la 4 medición (día 28) asociado a la disminución de temperatura y humedad en el cultivo, condiciones normales presentadas en el medio de cultivo

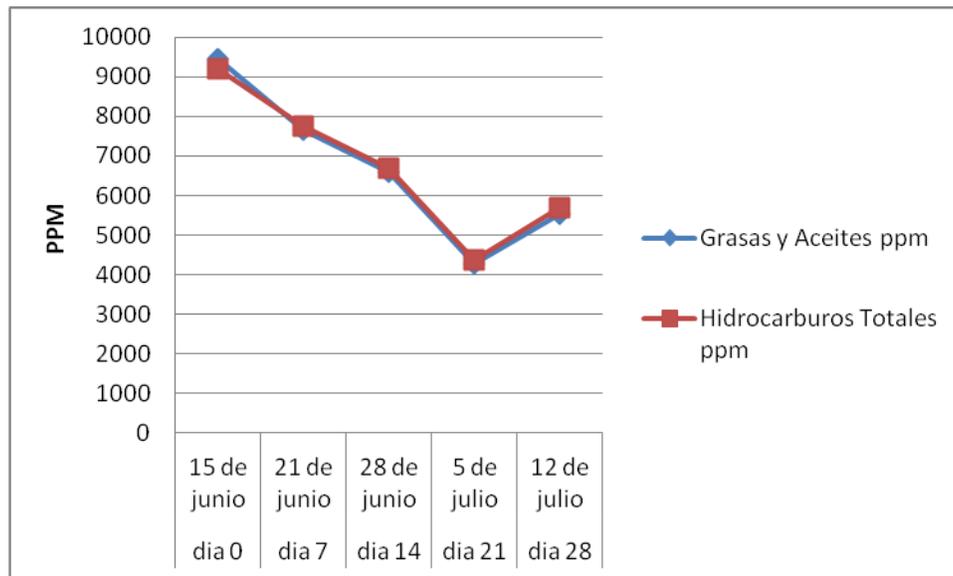


Ilustración 5. Comportamiento de las Grases y Aceites e Hidrocarburos

NITROGENO TOTAL Y FENOLES

También es importante mencionar que el petróleo crudo aporta carbono que sirve como nutriente orgánico y energía a los microorganismos degradadores, pero es deficiente en nutrientes como: nitrógeno, fósforo y hierro los cuales son necesarios para el soporte del crecimiento microbiano. En la degradación del petróleo los microorganismos deben obtener sus nutrientes minerales esenciales del ambiente Muchos ecosistemas están limitados en nutrientes y minerales, y no soportan una biodegradación rápida y extensa de hidrocarburo (Atlas y Bartha 1972).

Durante el periodo de cultivo se puede identificar que se presentó un consumo constante de nitrógeno total necesario para el crecimiento microbiano, con esto se puede identificar un proceso de nitrificación que tuvo el cultivo debido a que este estaba expuesto a condiciones anaerobias, un proceso muy bueno para el buen metabolismo de la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*.

Con respecto a los fenoles indicadores de toxicidad en el suelo el cual estuvo presente en todo el proceso, presentado concentraciones bajas las cuales disminuyeron paulatinamente.

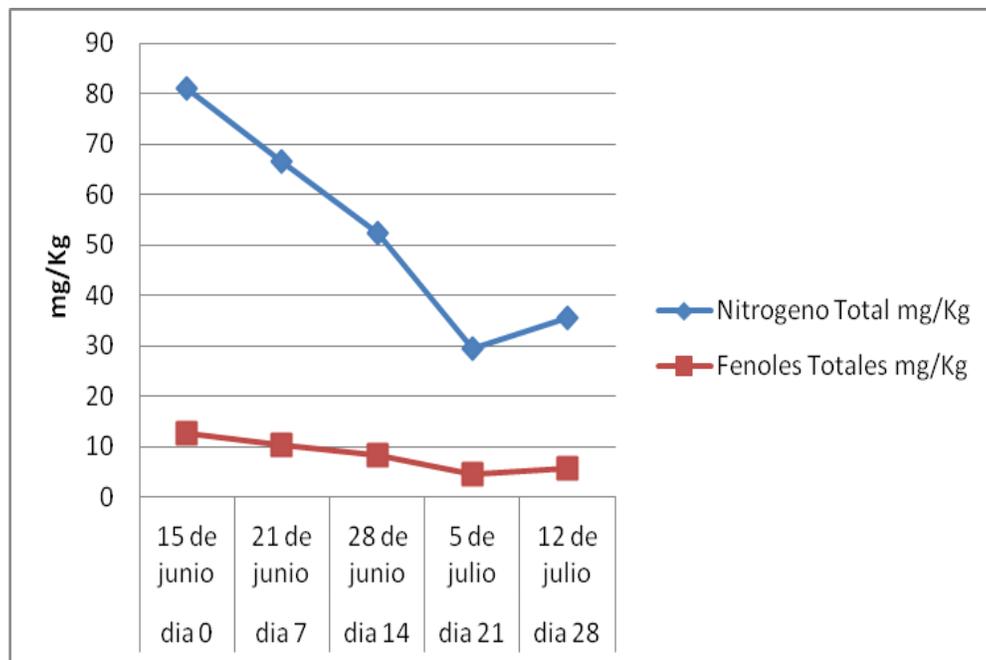


Ilustración 6, Comportamiento del Nitrógeno Total y Fenoles

9. RESULTADOS ALCANZADOS

Con la investigación realizada se pudo verificar que se cumplió con el objetivo general del proyecto el cual era evaluar la efectividad de la Biorremediación en la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos generados en la Estación de Servicio TEXACO Puerto Gaitán, esto teniendo en cuenta que los hidrocarburos iniciales estaban en el orden de 9210 ppm y finalizaron con 5680 ppm. Lo que significa que hubo una disminución del 60.58% de degradación de este parámetro en el término de 28 días o la disminución de 3530 ppm de hidrocarburos.

También se pudo cumplir con los objetivos específicos, debido a que se logró comparar el efecto de la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* en el proceso de biodegradación de hidrocarburos totales en los sedimentos generados por la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán y establecer las tasas de degradación de hidrocarburos totales a través de la Biorremediación con esta Bacteria, de acuerdo a los resultados obtenidos se pudo verificar la alta eficiencia que tuvo la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* en la degradación de este hidrocarburo, lo que nos indica que debido a su metabolismo y acción enzimática es una bacteria que hace parte de los microorganismos hidrocarburo clásticos o petroleolíticos capaces de degradar petróleo fisiológica y metabólicamente, en este caso la fuente de carbono consumida por la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* en el substrato insoluble como un hidrocarburo, facilitó su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes para posteriormente ingerirlo o romperlo en compuestos simples de carbono y oxígeno.

De esta forma podemos disminuir el impacto ambiental Negativo causado por los hidrocarburos totales y fenoles presentes en los lodos contaminados de la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán.

10. CONCLUSIONES

- Se pudo observar una disminución de hidrocarburos de 60.58% o un valor promedio en las últimas mediciones de 5025 ppm, es decir, que paso de 9210 ppm iniciales a 5025 ppm en el termino de 28 días, esto debido al efecto de producción de sustancias biosurfactantes que tiene la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*, y debido a su metabolismo ayudo o brindo una gran eficiencia en la disminución de los hidrocarburos.
- Se demostró que la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* es eficiente en procesos de Biorremediacion de suelos contaminados con Hidrocarburos debido a que presenta una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbón compuestos hidrófobos.
- También se pudo observar que la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* por ser productora de biosurfactantes, ayudan a los procesos de remoción de aceites y productos relacionados.
- Se obtuvo una alternativa de Biorremediación que permite a las estaciones de servicio realizar esta práctica in situ y de esta forma poder disminuir los altos índices de contaminación y reducir costos con en la disposición final de estos lodos, además, que esta práctica de Biorremediación es amigable con el medio ambiente.

11. RECOMENDACIONES

- Para la implementación de esta práctica en la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán, es indispensable asignar un lugar específico para poder realizar el proceso de Biorremediación In situ, esto teniendo en cuenta las características específicas que se adecuen con el funcionamiento de la técnica.
- Para ello es importante capacitar a un operario quien sea la persona encargada de realizar la disposición de los sedimentos contaminados, y con la supervisión de un Ing. Ambiental, realizar la cantidad necesaria de nutrientes y cepa bacteriana como es el caso de la Bacteria *Pseudomonas Aeruginosa*, para el buen desarrollo y eficiencia del tratamiento.
- Es importante antes de realizar una implementación de este proceso realizar una investigación con mayor tiempo de incubación de la cepa bacteriana, que tenga en cuenta la cantidad o peso total que tienen los sedimentos contaminados generados por la estación de servicio Texaco Puerto Gaitán o el área a tratar, para realizar un estudio más detallado del comportamiento de los microorganismos presente en los sedimentos contaminados con hidrocarburos y de esta forma verificar si estos microorganismos pueden tener consecuencias secundarias que puedan interrumpir con el buen desarrollo y eficiencia del tratamiento, las cuales hay que tener en cuenta durante el proceso de Biorremediación.

12. BIBLIOGRAFIA

- Atlas R, Bartha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. Madrid. 2002. 561p.
- Benavides, L. y Quintero, G. 2006. Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Petróleo. Publicación Científica Nova 4: 4.
- Cleves, I.; Sandoval, M. 2001. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados con lodos aceitosos de la industria petrolera (Huilacolombia). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana.
- García, E., Roldán, F., Garzón, L. 2011. Evaluación de la Bioestimulación (Nutrientes) en Suelos Contaminados con Hidrocarburos Utilizando Respirimetría. Acta biol. Colomb., Vol. 16 N. °1, 195- 208.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., y Mantilla, P. 2008. Factores Bióticos y Abióticos que Condicionan la Biorremediación por *Pseudomonas* en Suelos Contaminados por Hidrocarburos. Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad, Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá Colombia.
- Ministerio del Medio Ambiente. 1999. Guía de Manejo Ambiental para Estaciones de Servicio de Combustible. Versión N°1. Santafé de Bogotá, D.C.

- Pardo, J., Perdomo, M., Benavides, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad De La Salle. Universidad de La Salle. Bogotá D.C., Colombia.
- Randy H. Schroeder A, Domínguez V, García L. Potencial de la Biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico de México. Terra. 1999; 17(2): 159-174.
- Restrepo R. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo. 2002.
- Ríos, R. 2005. Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al Tiempo. México D.F.
- Sampieri Hernández Roberto, Collado Fernández Carlos, Baptista Lucio Pilar. 2006. Capítulo 5 Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa. Metodología de la Investigación. México. Mc Graw Hill.
- Siva S, Brett R, Tessa M, Vogeler I, Clothier B, Grant L. Northcott and Don McNaughton. Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. 2004. En: http://www.regional.org/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455_sivakumarans.pdf.

- Schmidt W. Suelos contaminados con hidrocarburos: la Biorremediación como una solución ecológicamente compatible. Cooperación Técnica Alemana (GTZ). 2000. En: www.gtz.org.mx/sitios-contam/articulos/biorremed_Mex2.pdf.
- Standard Methods. 2005. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health association. American water association. Water environmental federation. 21th ed. Washintong D.C.
- Vallejo, V., Salgado, L., y Roldán, F. 2005. Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de TPHs en Suelos Contaminados con Petróleo. Rev. Col. Biotec., 2 (2): 67-78.

ANEXOS

**ANEXOS I: REPORTES DE RESULTADOS DE PARAMETROS
MICROBIOLÓGICOS Y FISICOQUÍMICOS.**

**ANEXOS II: MANUAL DE PROCEDIMIENTO MUESTREO DE
AGUA Y SUELOS**

ANEXOS III: FICHA TECNICA PSEUDOMONA AERUGINOSA.

ANEXOS III: FICHA TECNICA AGAR NUTRITIVO.