

Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación- bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna

Evaluation of natural attenuation, bioventing, bioaugmentation and bioaugmentation-bioventing techniques, for the biodegradation of diesel in a sandy soil, through column experiments

Recibido para evaluación: 26 de diciembre de 2012
Aceptación: 4 de abril de 2013
Recibido versión final: 15 de mayo de 2013

Angélica María Muskus Morales¹
Claudia Santoyo Muñoz²
Luijesmarth Silvia Plata Quintero³

RESUMEN

El presente estudio fue desarrollado dentro del convenio de cooperación institucional realizado entre la Universidad Pontificia Bolivariana, Seccional Bucaramanga y el Instituto Colombiano de Petróleos – ICP, con el fin de dar solución a una problemática que se presenta en las zonas de manejo de hidrocarburos, donde se evidencian suelos arenosos contaminados con diésel hasta concentraciones del 6% y a una profundidad máxima de 80 cm. Para el desarrollo metodológico se contaminó un suelo artificialmente con diésel para evaluar las técnicas de Bioventing, Atenuación Natural, Bioaumentación y Bioventing-Bioaumentación, utilizando montajes en columnas. Se definieron los parámetros de diseño y seguimiento como dimensiones de las columnas, caudal de entrada, concentración de diésel, oxígeno disuelto y crecimiento bacteriano; para la bioaumentación se inoculó el suelo con un consorcio bacteriano producido por el ICP. Se realizaron los montajes experimentales por triplicado y se controló el proceso durante cuatro meses. Los resultados obtenidos mostraron que en la técnica de Bioventing se obtuvieron porcentajes de remoción de diésel hasta del 97%. Con la técnica de Bioventing-Bioaumentación se alcanzaron porcentajes de remoción hasta del 75% y con las técnicas de Atenuación Natural y Bioaumentación, los porcentajes de remoción no superaron el 48%. El estudio mostró que el consorcio bacteriano utilizado y evaluado mediante las técnicas de Bioaumentación y Bioventing-Bioaumentación, no potenció la eficiencia de los procesos de biorremediación del suelo arenoso contaminado con diésel.

Palabras claves: Atenuación Natural, Bioaumentación, Bioestimulación, Biorremediación, Bioventing, Diésel, Suelos Contaminados, Consorcio Microbiano, Experimentos en Columna.

ABSTRACT

The present study was developed within an inter-institutional agreement between the Universidad Pontificia Bolivariana, UPB-BBGA and the Colombian Petroleum Institute-ICP, in order to provide a solution to an environmental problem that occurs in areas where hydrocarbons are handled and where sandy soils have been found to be contaminated with diesel fuel with concentrations up to 6% at a maximum depth of 80 cm. For this study, the soil samples were artificially contaminated with diesel fuel in order to evaluate Natural Attenuation, Bioventing, Bioaugmentation and Bioaugmentation-Bioventing soil remediation techniques through the use of column experiments. The design parameters, column dimensions, inflow, diesel concentration, dissolved oxygen, bacterial growth, and monitoring were defined. Bioaugmentation was performed inoculating a bacterial consortium produced by the ICP. The experimental setup was assembled in triplicate and was monitored through a period of four months. The experimental results showed that Bioventing technique was the most effective, reaching up to 97% diesel removal from the contaminated soil; with the Bioaugmentation- Bioventing, diesel fuel removal percentage was 75%, and the Natural Attenuation and Bioaugmentation techniques resulted in diesel fuel removal percentages not greater than 48%. This study showed that the microbial consortium evaluated and provided by the Colombian Petroleum Institute proved to be not efficient for potentializing bioremediation processes of sandy soils contaminated with diesel fuel.

Keywords: Natural Attenuation, Bioaugmentation, Biostimulation, Bioremediation, Bioventing, Diesel, Contaminated Soils, Microbial Consortium, Soil Column Experiments.

1. Msc. Ciencias de la Ingeniería.
Docente Investigadora Tiempo Completo de la Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad Pontificia Bolivariana.
angelica.muskus@upb.edu.co

2. Especialista en Microbiología Ambiental.
Docente Investigadora Tiempo Completo del Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Pontificia Bolivariana.
claudia.santoyo@upb.edu.co

3. Estudiante Ingeniería Ambiental.
Estudiante de Ingeniería Ambiental. Universidad Pontificia Bolivariana.
luijes_694@hotmail.com

Universidad Pontificia Bolivariana.
Seccional Bucaramanga.
Grupo de Investigación en
Ingeniería Sanitaria y Ambiental
– GINSA

1. INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo ha sido una actividad económica significativa en nuestro país; sin embargo, la exploración en busca del petróleo, sus procesos de almacenamiento, transporte y refinación, han generado impactos en la dinámica de los ecosistemas y en el suelo en particular, ocasionando cambios en sus características físicas, químicas y biológicas. Consciente de esta situación, el Instituto Colombiano del Petróleo-ICP y la Universidad Pontificia Bolivariana, Seccional Bucaramanga, establecieron un convenio de cooperación institucional para el desarrollo de investigaciones que propendan por la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, como el diésel. Este es de mucho interés ambiental debido a que su producción masiva, y su uso como combustible, es una fuente común de contaminación de la superficie del suelo y el subsuelo, a través de fugas de tanques de almacenamiento subterráneos y tuberías. Su presencia en el medio natural genera preocupación debido a su toxicidad, su composición fisicoquímica y su punto de ignición, aunque el impacto ocasionado por un derrame de diésel en el suelo depende de múltiples factores como son las características y tipo de suelo, la temperatura, la vegetación, la profundidad de los niveles freáticos o la ubicación de fuentes de agua, entre otros;

El diésel es una mezcla de hidrocarburos saturados como parafinas y cicloparrafinas y sólo un 4% de poliaromáticos como BTEX, Naftalenos y Alquilbencenos (Heath, J.S., K Koblis, S.L. Sager & Day, C, 1993). El diésel no es totalmente biodegradable; su biodegradabilidad depende de la estructura química de sus compuestos orgánicos, de la biodisponibilidad y de la presencia de oxígeno en el medio. Los microorganismos son capaces de absorber e incorporar los hidrocarburos como el diésel, mediante tres mecanismos; por absorción del hidrocarburo disuelto en la fase acuosa del suelo (Bouchez, M., Blanchet, D & Vandecasteele, J.P, 1996, Mulder *et al.*, 1998), por consumo a través del contacto directo entre la célula y las finas gotas del hidrocarburo (Stelmack PL., Gray MR & Pickard MA, 1999; Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V & Vandecasteele, JP, 2001) y por incorporación de la sustancia en forma de micelas formadas por un biosurfactante sintetizado por el microorganismo (Goswami P & Singh HD, 1991; Shreve GS, Inguva S, Gunnam S, 1995). Despues de incorporado el diésel en el interior celular, la biotransformación se puede llevar a cabo bajo condiciones oxigénicas o anoxigénicas. En general la degradación oxigénica de los hidrocarburos alifáticos saturados presentes en el diésel se da a partir de diferentes mecanismos, como son la oxidación terminal, diterminal y subterminal. El mecanismo de degradación principal de los alcanos es la oxidación terminal, en la cual uno de los grupos metilo terminales es oxidado por acción de la enzima alcano-monoxygenasa a alcoholes de cadena larga; el alcohol es nuevamente oxidado por la enzima deshidrogenasa a aldehído y a ácidos grasos, los cuales son degradados a través de la b-Oxidación a Acetyl CoA. (Das & Chandran, 2010).

Para los isoalcanos, alquenos y alquinos, la biodegradación oxigénica se lleva a cabo al igual que para los alcanos, a través de la oxidación terminal, diterminal y subterminal, pero la degradación es significativamente inferior a la que se produce con los alcanos (KORA, 2008). La biodegradación aerobia de los cicloalcanos, conocidos como naftenos, cicloparrafinas o hidrocarburos alicíclicos ha sido poco estudiada y se ha planteado que se lleva a cabo posiblemente a través de reacciones de cometabolismo o sinergismo (KORA, 2008). Para los hidrocarburos aromáticos como el benceno, el primer paso en la degradación es la oxidación o la hidroxilación a través de la acción enzimática de la dioxigenasa, formando como producto un Diol, el cual es convertido a catecol a través de la enzima dehidrogenasa. Esta ruta de degradación también es aplicable a otros hidrocarburos aromáticos (KORA, 2008). Cuando el oxígeno no se encuentra disponible, la degradación se lleva a cabo en condiciones anaerobias y son utilizados como aceptores de electrones sustancias como el nitrato, óxido de hierro, óxido de manganeso y sulfato (Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Wilson, J.T & Newell, C, 1999).

Se han aislado varias cepas de microorganismos anaerobios alcano-oxidantes (Aeckersberg, F.; Rainey, F., Widdel, F, 1998; Rueter *et al*, 1994), especializados en biotransformar alcanos de cadena larga (entre C₁ y C₂₀) o de cadena media (entre C₆ y C₁₆) utilizando ya sea el sulfato o el nitrato como acceptor de electrones. La degradación anaerobia de compuestos aromáticos es posible a través de tres vías diferentes como son por formación de la Benzoil-CoA; por formación de resorcinol y a través de la formación de floroglucinol (Evans, WC & Fuchs, G, 1988; Schink, B., Brune, A & Schnell, S, 1996; Fuchs, G., *et al.*, 1994; Heider, J & Fuchs, G., 1997; Schink, B., Philipp, B & Müller, J., 2000). Entre los microorganismos identificados con capacidad de biodegradar diésel están, *Pseudomonas*

spp., *Xanthomonas* spp., *Acinetobacter junii*, *Actinomyces* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Arthrobacter* spp., *Bacillus pumilus*, *Micrococcus* spp., *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas resinovorans*, *Exiguobacterium* spp., *Pseudomonas fluorescens*. (Bento, F., Camargo, F., Okeke, B & Frankenberger, W, 2003; Alisi C., et al, 2009).

Teniendo en cuenta el potencial de biodegradación del diésel anteriormente descrito, la aplicación de técnicas de biorremediación representa una alternativa eficiente, económica, versátil y ambientalmente amigable (Margesin, R & Schinner, F, 2001), para la descontaminación de suelos. La biorremediación se encuentra definida como el uso de microorganismos para la degradación de contaminantes (Atlas, RM & Bartha, R, 1998), lo que permite la restauración de ambientes impactados debido a la biodiversidad biológica presente en el suelo y la adaptabilidad de los microorganismos en degradar o transformar diferentes tipos de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. Para la aplicación de tecnologías de biorremediación es necesario realizar el estudio y control de las características presentes en el medio contaminado; de esta forma se puede lograr la activación de los potenciales de biodegradación de los contaminantes por medio de la estimulación o incluso por el ajuste de algunas condiciones como pH, temperatura y la adición de aceptores de electrones, entre otros. Dentro de las técnicas de biorremediación más económicas se encuentran la Atenuación Natural, Bioventing, Bioestimulación y Bioaumentación, (Skipper, H.D, 1999).

La Bioaumentación se entiende como la introducción de especies de microorganismos que ayuden a la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo. La unión de estos sistemas de múltiples microorganismos conforman lo que se conoce como consorcio microbiano y representa un acercamiento a los modelos naturales (Ledin M, 2005), pero con microorganismos especializados en la biodegradación de compuestos como el diésel. Sin embargo, numerosos estudios muestran que los factores bióticos y abióticos influyen en la adaptación de la microbiota introducida y por lo tanto influye significativamente en el proceso de biorremediación (Gernty, H., Rensing, C & Pepper, I, 2004). En la técnica de Bioventing se realiza una aireación forzada al suelo contaminado, potencializando la biodegradación oxigénica (Huesemann M.H. & Truex M.J, 1996; Brinkmann, U., & Reineke, W, 1992). La Atenuación Natural es definida por la USEPA (1996), como el uso de procesos naturales para contener la propagación de la contaminación por derrames químicos y reducir la concentración y la carga contaminante en sitios afectados. Dentro de estos procesos naturales se incluyen la degradación biológica, la volatilización, la dispersión, la dilución, la degradación radioactiva y la sorción de los contaminantes en la materia orgánica y minerales de arcilla del suelo (Mulligan, CN & Yong & RN, 2004). La bioestimulación es la introducción de nutrientes y sustancias químicas que estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos del suelo para mejorar el proceso biológico de remediación (Bento, F et al., 2005). Diversos estudios han comprobado que la biorremediación de diésel puede ser inducida por medio de la estimulación de los microorganismos autóctonos, la adición de nutrientes y oxígeno en el suelo (Seklemova, E., Pavlova & Kovacheva, K, 2001) o a través de la inoculación de un consorcio microbiano en el suelo (Richard, JY & Vogel, T.M, 1999; Barathi, S & Vasudevan, N, 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar cuatro diferentes alternativas como son la Atenuación Natural, el Bioventing, la Bioaumentación y Bioventing-Bioaumentación, para la remediación de un suelo arenoso contaminado artificialmente con diésel en experimentos en columna.

2. METODOLOGÍA

Las condiciones experimentales desarrolladas se basaron en el interés particular manifestado por el ICP, en estudiar alternativas de biorremediación para suelos arenosos contaminados con diésel, en los cuales la contaminación se encuentra ubicada a una profundidad máxima de 80 cm (Zona No Saturada del Suelo), con concentraciones que varían hasta un máximo de un 6%. Los procesos de biorremediación se evaluaron en experimentos en columna que permitió el control de variables que afectan los procesos de degradación del diésel. Para el desarrollo metodológico se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

2.1 Diseño de las columnas

Para el diseño de las columnas se tomó como referencia la Norma Técnica Alemana DIN V 19736 que recomienda: (1) relación altura- diámetro, la cual no debe ser inferior a 3, garantizando tiempos de retención que permitan mejorar los procesos de biodegradación; (2) forma cilíndrica de las

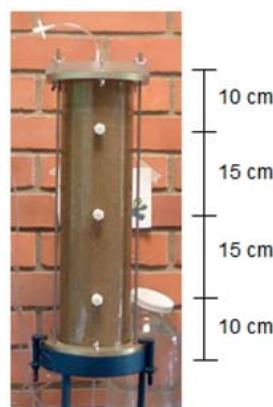
columnas, ya que impide la formación de zonas muertas por flujo de agua y la adhesión del hidrocarburo en los vértices de las uniones; (3) debido a que el material de la columna se encontrará en contacto permanente con la muestra de suelo así como también con el caudal infiltrado se recomienda la utilización de un material poco poroso para el diseño como es el acrílico; (4) la circulación del agua debe ser de forma ascendente y a un caudal bajo que no permita el arrastre del contaminante hacia la parte superior de la columna y debe realizarse desde la base hacia la parte superior, de manera que se simulen eventos de precipitación en el sistema. La columna se diseñó con una altura de 50.8 cm; un diámetro interno de 12.08 cm, obteniendo una relación de 4.2; un diámetro externo de 13.33 cm y un volumen de 6 l. Cada columna posee tres puertos equidistantes entre sí para la adición de aire, como se muestra en la figura 1.

2.2 Características de las muestras de suelo contaminado

Se tomó una muestra de 10 Kg de suelo arenoso de los predios de la Universidad Pontificia Bolivariana y se contaminó artificialmente por aspersión al 2,5% en peso con diésel de petróleo, teniendo en cuenta las necesidades de evaluación de la contaminación.

Figura 1. Diseño de la Columna.

Fuente: Las autoras.



Después de contaminar el suelo se determinaron las características fisicoquímicas, como textura, humedad gravimétrica, densidad real y pH; los análisis se realizaron en el laboratorio de suelos de la Universidad Pontificia Bolivariana y mostraron un suelo de textura arenosa (>90%), con una humedad del 11%, de densidad real de 2,20 g/ml, con un pH determinado en agua de 7.3 y determinado en KCl de 6.2. Posteriormente se realizó la activación del consorcio bacteriano y se inoculó el suelo, según las indicaciones presentadas en la ficha técnica del producto; finalmente se realizó el armado y llenado de cada columna.

2.3 Diseño Experimental

Para evaluar el proceso de biorremediación de suelo contaminado con diésel de petróleo, se tuvieron en cuenta cuatro condiciones diferentes que permitieron analizar las posibles alternativas presentadas en los procesos de biodegradación. La primera condición correspondió al tratamiento de Atenuación Natural que se utilizó como control, donde se tuvo suelo contaminado e inyección de agua. En la condición dos se realizó un tratamiento de Bioventing, donde se tuvo el suelo contaminado con inyección de agua y adición de oxígeno introduciendo aire a la columna por medio de una bomba, marca RESUN- modelo AC-9904, con regulador de caudal y cuatro salidas. Este proceso se realizó continuamente a través de los puertos equidistantes de la columna, para evitar una menor interferencia con el flujo de agua. En la tercera condición se aplicó la combinación de las técnicas Bioventing y Bioaumentación y se tuvo suelo contaminado e inoculado con un consorcio microbiano suministrado y producido por el Instituto Colombiano del Petróleo, constituido por cepas bacterianas preseleccionadas, no modificadas genéticamente según la ficha técnica del producto; además se inyectó agua y se adicionó oxígeno al sistema. En la cuarta condición se realizó solo tratamiento con bioaumentación, en donde se tuvo suelo contaminado e inoculado con el consorcio bacteriano.

El montaje se realizó por triplicado para obtener datos estadísticos confiables analizando un total de doce (12) columnas. Cada columna correspondía a un sistema abierto en paralelo en el

cual no se recirculó el agua adicionada. A través de una bomba peristáltica MF 07519-25 se inyectó constantemente un caudal de agua de 0,1 LPS que simulara condiciones de infiltración natural por efecto de la lluvia sin producir arrastre del contaminante. La figura 2 muestra el montaje final de las columnas en las cuatro condiciones diferentes.



Figura 2. Montaje Final del Sistema de Biorremediación.
Fuente: Los autores

2.4 Puesta en marcha y control del proceso

Se realizó una prueba de trazador con una solución salina del 1% que permitió determinar las condiciones de empaquetamiento de la columna y la porosidad efectiva. Con la porosidad efectiva determinada mediante la prueba del trazador, se calculó la velocidad efectiva dentro de la columna y se estableció el tiempo que tardó una gota de agua en atravesar el medio poroso (suelo arenoso), lo cual correspondió a 14 días lo que equivale a un Volumen de Poro Intercambiable (VPI). Con base en estos cálculos se determinó el VPI en términos de tiempo experimental así: Mes 1=2.5 VPI; Mes 2=5.07 VPI; Mes 3=7.07 VPI; Mes 4=10VPI.

El proceso se controló por un periodo de cuatro meses de la siguiente manera:

Etapa de arranque: Se determinó el contenido bacteriano en suelo contaminado y no contaminado, se controló el caudal de entrada de agua y el oxígeno disuelto en cada columna.

Etapa de desarrollo: El proceso se controló por un periodo de 4 meses, tomando muestras del agua de salida de la columna para la determinación de la concentración de diésel, contenido bacteriano, caudal de entrada y oxígeno disuelto.

Etapa final: Despues de los cuatro meses de monitoreo, se desmontaron las columnas y se determinó la concentración de diésel en el suelo y el contenido bacteriano en las tres zonas de las columnas (zona baja, zona media y zona alta).

Los métodos para el análisis de las muestras fueron: técnica de vertido en placa y determinación de las Unidades Formadoras de Colonias para el conteo bacteriano (FERNÁNDE, L., 2006); determinación de grasas y aceites Standart Methods 5522 D, para la determinación de diésel en agua y suelo, Medición de oxígeno disuelto en agua con el equipo Tipo Hqd Portable Meter Modelo HQ40d con una sonde de Oxígeno LDO10101.

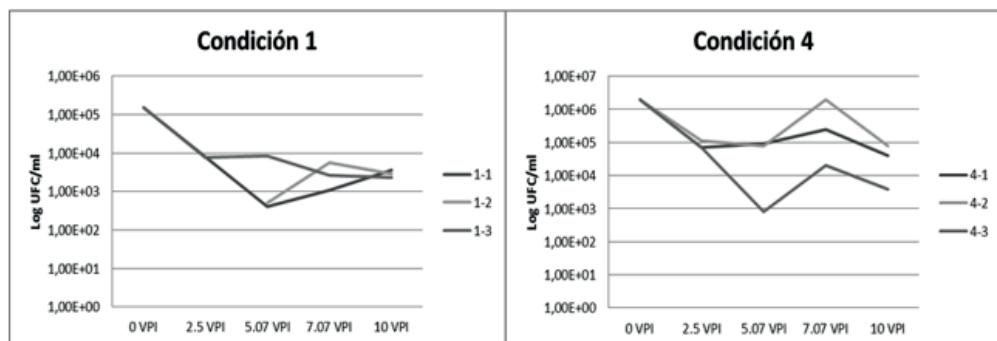
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El análisis de los resultados obtenidos de la medición del volumen de agua de salida de cada una de las columnas evaluadas mostró fluctuaciones en los primeros días, lo que correspondió a una fase de estabilización y ajuste de los elementos que constituyan el sistema. Aproximadamente a los 40 días de operación se observó que el caudal se mantuvo en un rango entre 0.1 y 0.15 ml/min, coincidiendo con el caudal establecido previamente. Sin embargo, la determinación del coeficiente de variación del volumen de agua evidenció que no hay homogeneidad de los datos y por lo tanto cada

columna trabajó en condiciones diferentes de caudal. La concentración de oxígeno varió en la fase de estabilización del sistema en las cuatro condiciones. En la condición 1 y 4, donde el oxígeno fue aportado en cada columna por el agua de infiltración, se determinó una variación de concentración entre 0.22 mg/l y 5.5 mg/l. En la condición 2 y 3, donde la concentración de oxígeno fue aportada tanto por el agua de infiltración como por la inyección artificial de aire, la concentración varió entre 7 mg/l y 8 mg/l.

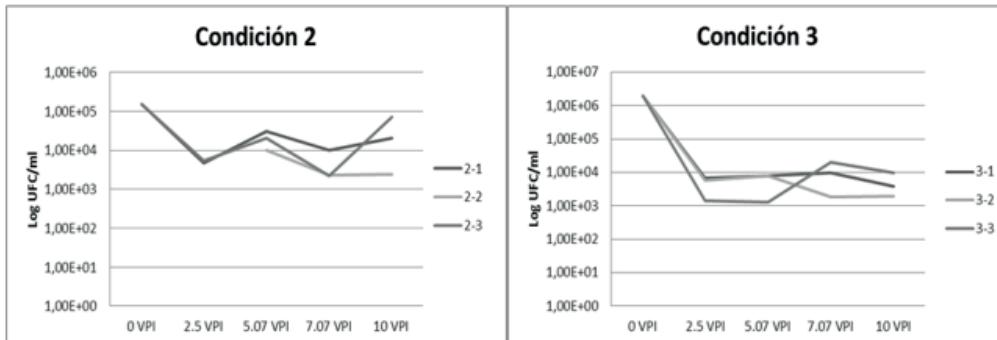
Los resultados obtenidos del seguimiento bacteriano al elutriado de las columnas, reflejó el alto impacto del diésel sobre los microorganismos en todas las alternativas de remediación utilizadas. En las técnicas de Atenuación Natural y Bioaumentación se observó un descenso de la población microbiana en el primer mes de muestreo y una recuperación gradual pero mínima en los meses subsiguientes, como se observa en la gráfica 1. En la condición 4 (Bioaumentación) se presentó disminución de los microorganismos al final del monitoreo.

Gráfica 1. Crecimiento microbiano en el elutriado. Atenuación natural (Condición 1) y Bioaumentación (Condición 4)



En las técnicas de Bioventing y Bioaumentación-Bioventing se observa igualmente un descenso en la población microbiana inicial y posteriormente una leve y lenta recuperación gradual debido a la estimulación del crecimiento de bacterias aerobias con el oxígeno presente en el caudal de aireación, como se observa en la gráfica 2.

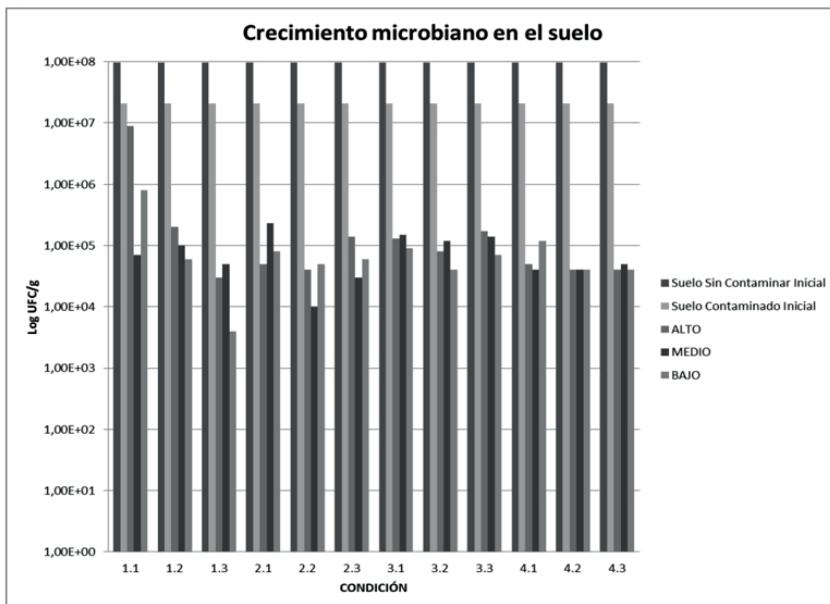
Gráfica 2. Crecimiento microbiano en el elutriado. Bioventing (Condición 2) y Bioaumentación-Bioventing (Condición 3)



La cuantificación de la población bacteriana en el suelo se realizó al iniciar y finalizar la fase experimental y en esta última en tres zonas de la columna. De los resultados se pudo observar una reducción significativa y drástica de la población bacteriana del suelo contaminado con respecto al suelo sin contaminar y se evidenció que los microorganismos no presentaron una recuperación importante a través del tiempo en ninguna de las tres zonas de la columna muestreadas. Sin embargo, en cada una de las columnas se observó un mayor crecimiento en el área superior y aunque este no fue significativo, si se evidenció que la técnica en la que se produjo una mejor recuperación microbiana fue la de atenuación natural seguido por el de Bioaumentación- Bioventing, Bioventing y finalmente Bioaumentación. La gráfica 3 muestra los resultados obtenidos del análisis bacteriano en suelo.

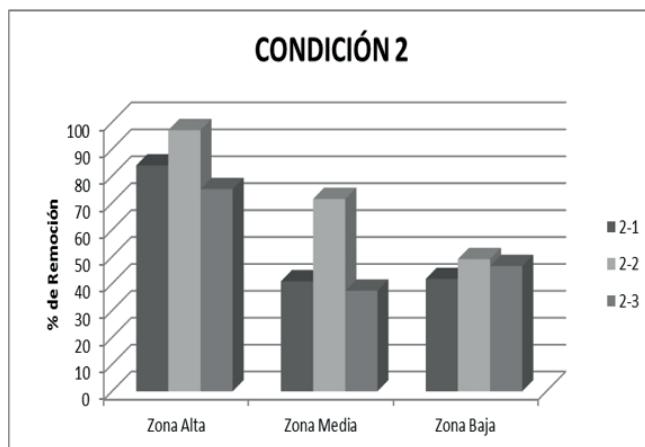
Los análisis de la concentración de diésel en el elutriado mostraron en todas las columnas una variación en las concentraciones de diésel durante los meses de seguimiento del ensayo; esto fue debido a las dificultades presentadas para la estabilización del flujo de entrada y salida en las columnas y al consecuente arrastre y transporte de diésel desde el interior de las mismas. Sin

embargo, comparando las concentraciones obtenidas mensualmente en cada uno de los tratamientos y observando los valores finales de grasas y aceites en cada una de las columnas, se pudo determinar que el tratamiento que presentó mejor resultado fue el de Bioventing, seguido por el de Bioaumentación- Bioventing, Bioaumentación y Atenuación Natural.



Gráfica 3. Conteo bacteriano en suelo al inicio y al final del proceso.

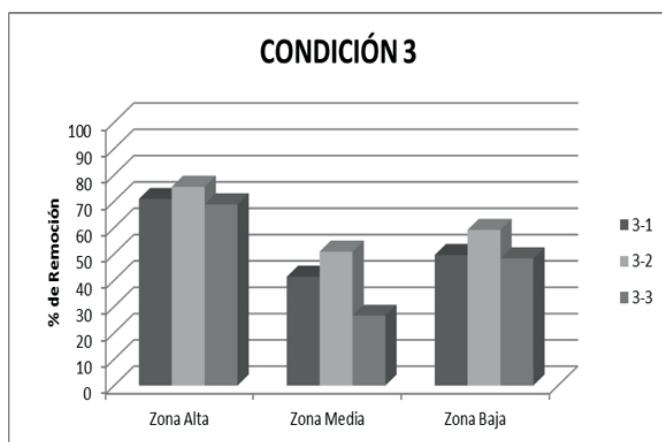
De acuerdo a los resultados de los análisis de las concentraciones finales de diésel en el suelo, realizadas en tres zonas de cada columna (zona alta, zona media y zona baja), mostraron que en todos los casos se obtuvieron mayores remociones en la zona alta de la columna. También se pudo observar que la mayor remoción de diésel se presentó en el suelo tratado por Bioventing, seguido por la Bioaumentación – Bioventing, Bioaumentación y por último la de Atenuación Natural. De igual manera se pueden analizar los porcentajes de remoción de diésel en el suelo teniendo en cuenta cada uno de los tratamientos aplicados, obteniéndose los mejores resultados de remoción en la técnica de Bioventing con porcentajes de eliminación del diésel entre el 75% y el 97% en la parte alta de la columna y entre el 50% y el 30% en las zonas medias y bajas, como se observa en la gráfica 4. Debido a lo anterior, se puede establecer que en esta técnica la adición de oxígeno favoreció el crecimiento de las bacterias aerobias que utilizaron el diésel como fuente de carbono, promoviendo una degradación biológica, evidenciada en el crecimiento microbiano, y una degradación por oxidación química, debida a la presencia de oxígeno a lo largo de toda la columna.



Gráfica 4. Remoción de diésel en Suelo: Bioventing (Condición 2)

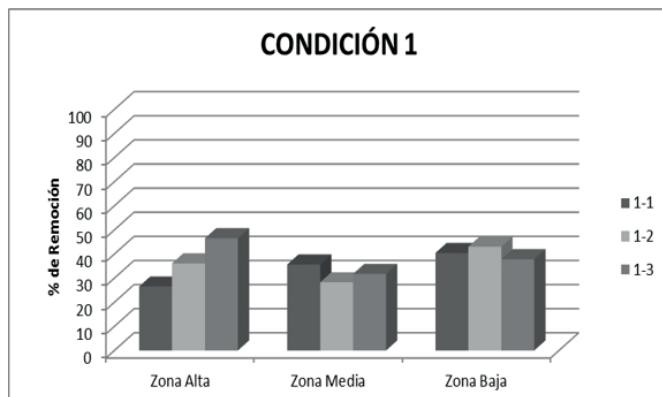
Analizando la técnica de Bioaumentación- Bioventing se observan porcentajes de remoción en la parte alta de la columna entre el 65% y el 75% y en las zonas media y baja entre el 60% y el 25%, como se muestra en la gráfica 5. En esta técnica se puede establecer que la disminución en la concentración de diésel se debe más a la oxidación química, debido a la influencia de la aireación constante en la columna y a los fenómenos de transporte y arrastre del contaminante por acción del caudal de infiltración que por la biodegradación, ya que el crecimiento microbiano no fue significativo.

Gráfica 5. Remoción de diésel en Suelo: Bioaumentación-Bioventing (Condición 3)



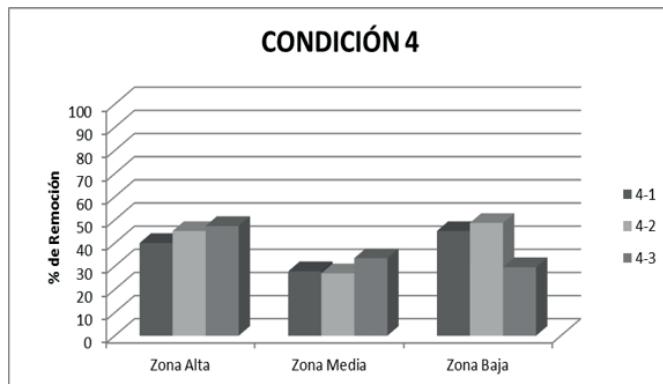
La gráfica 6 muestra que las eficiencias de remoción en la técnica de Atenuación Natural, fueron homogéneas en todas las zonas de la columna evaluadas y se encontraron remociones entre el 26% y 47%. Analizando los resultados anteriores, se puede establecer que no se produjo ningún proceso de degradación biológica porque no hubo crecimiento de microorganismos, pero si hubo una escasa degradación por procesos de oxidación química, puesto que se presentó oxígeno aportado por el caudal de entrada; además también se deben tener en cuenta los posibles fenómenos de transporte y arrastre del contaminante por parte del caudal de infiltración.

Gráfica 6. Remoción de diésel en Suelo: Atenuación natural (Condición 1)



Finalmente, en la técnica de Bioaumentación también se obtuvo un comportamiento similar en las tres zonas de la columna estudiadas, obteniéndose los valores más bajos de remoción de todas las técnicas analizadas de entre el 20% y el 48%, como se observa en la gráfica 7. Con los resultados anteriores se puede establecer que la adición del consorcio bacteriano no produjo una degradación significativa, debido a que no hubo un crecimiento de microorganismos durante todo el tiempo del experimento; sin embargo sí ocurrió una leve degradación por oxidación química, la cual se evidencia en los valores de la concentración de oxígeno aportado por el agua de entrada.

Contrastando los datos anteriores con el descenso en la concentración de diésel en el suelo y el aumento en la concentración de diésel determinada en el agua, se estableció que fue causado por fenómenos de transporte y arrastre del contaminante por acción del agua de infiltración, mas no por su degradación.



Gráfica 7. Remoción de Diésel en Suelo: Bioaumentación (Condición 4)

CONCLUSIONES

- La evaluación del consorcio microbiano inoculado en un suelo arenoso contaminado artificialmente con diésel, mostró que no realizó una biodegradación significativa del contaminante en ninguna de las dos técnicas analizadas (Bioventing-Bioaumentación y Bioaumentación), infiriendo que las relaciones bióticas entre los microorganismos autóctonos, como la competencia, influyeron en el crecimiento y en consecuencia en el porcentaje de remoción de diésel.
- La técnica de Bioventing, con aireación a flujo constante, constituyó el mejor proceso de biorremediación para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, ya que las características del sustrato permitieron una rápida distribución y desplazamiento del oxidante, lo que favoreció la oxidación química y biológica del contaminante y estimuló el crecimiento de la microbiota oxigénica autóctona del suelo, la cual utiliza como fuente de carbono el diésel.
- Los porcentajes de remoción en la zona alta de las columnas correspondientes a las técnicas con suministro continuo de aire, Bioventing y Bioaumentación - Bioventing, resultaron ser los más altos entre las tres zonas analizadas, lo cual indica que el oxígeno se almacenó principalmente en la parte superior de la columna, debido a su fácil desplazamiento y transporte desde los puertos inferiores hacia arriba, favorecido por la textura arenosa del suelo.
- Debido a la dificultad en el control de la concentración de oxígeno y caudal del agua de entrada al sistema, las tres columnas de cada condición operaron como sistemas independientes y por lo tanto no es recomendable evaluar las técnicas de biorremediación a escala de laboratorio utilizando réplicas de cada condición.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Universidad Pontificia Bolivariana, seccional Bucaramanga y al Instituto Colombiano de Petróleos - ICP por su apoyo técnico y económico que permitió la realización del presente trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aeckersberg, F.; Rainey, F., Widdel, F. 1998. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology*, vol. 170. pp. 361-369.
- Alisi, C. et al. 2009. Bioremediation of Diesel Oil in a co-contaminated Soil by Bioaugmentation with a Microbial Formula Tailored with Native Strains selected for Heavy Metals Resistance. *Science of Total Environment*, vol. 407. pp. 3024 – 3032.

- APHA, AWWA, WPCF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. U. S. A. 19^a ED.
- Atlas, RM & Bartha, R. 1998. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. (4^a Ed). California: Benjamin Cummings.
- Barathi, S & Vasudevan, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* fluorescence isolated from a petroleum contaminated soil. *Environmental International*, vol. 26(5), pp. 413–416.
- BMBF- Förderschwerpunkt "Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierte Grundwässer und Böden "(KORA). 2008) Themenverbund 1: Raffinerien, Tanklager, Kraftstoffe/Mineralöl, MTBE. Tübingen: Universität Tübingen.
- Bento, F., Camargo, F., Okeke, B & Frankenberger, W. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian journal of Microbiology*, vol.34 (1), pp. 65-68.
- Bouchez, M., Blanchet, D & Vandecasteele, J.P. 1996. The microbial fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds, *Applied. Microbiology and Biotechnology*, vol 45(4), pp. 556–561.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V & Vandecasteele, JP. 2001. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology*, vol 147(9). pp. 2537-43.
- Brinkmann, U., & Reineke, W. 1992. Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of meta-pathway. *FEMS Microbiology Letters*, vol 96. pp. 81-88.
- Das, N & Chandran, P. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, vol. 2011. 1-13
- DIN V 19736 1998. Ableitung von Konzentrationen organischer Stoffe im Bodenwasser. Normenausschuß Wasserwesen (NAW).- DIN: Deutsches Institut für Normung e.V. (Ref.Nr. DIN V 19736:1998-10).
- Evans, WC & Fuchs, G. 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annual Review of Microbiology*, vol. 42. pp. 289-317
- Fernández, L. 2006 et al. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Fuchs, G., et al. 1994. Biochemistry of Microbial Degradation. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Gentry, H., Rensing, C & Pepper, I. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical reviews in environmental science and technology*, No.34. pp. 447-494.
- Goswami P & Singh HD. 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 37(1). pp. 1–11.
- Heath, J.S., K Koblis, S.L. Sager & Day, C. 1993. Hydrocarbon Contaminated Soils. Volumen III. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Heider, J & FUCHS, G. 1997 Anaerobic metabolism of aromatic compounds, *European Journal of Biochemistry.*, vol. 243 (3). pp. 577–596.
- Huesemann M.H. & Truex M.J. 1996. The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* vol 51. pp. 93-113
- Ledin M. 2000. Accumulation of metal by microorganisms—processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*. vol 51. pp. 1-4. 1-31.
- Margesin, R & Schinner, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil- Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 67 (7). pp. 3127–3133.

- Mulder H., Breure AM., Andel JGV., Grotenhuis JTC & Rulkens WH. 1998. Influence of thermodynamic conditions on naphthalene dissolution and subsequent biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 57 (1). pp. 45–154.
- Mulligan, CN & Yong & RN. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environmental International*, vol 30. pp. 587-601.
- Reuter P., et al. 1994 Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate reducing bacteria. *Nature* vol. 372. pp. 455-458.
- Richard, JY & Vogel, T.M. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration and Biodegradation* vol 44. pp. 93–100.
- Schink, B., Brune, A & Schnell, S. 1996, Microbial Degradation of Natural Compounds. Weinheim: VCH.
- Schink, B., Philipp, B & Müller, J. 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften*, vol 87 (1). pp. 12–23.
- Seklemova, E., Pavlova & Kovacheva, K. 2001. Biostimulationbased bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, vol 12. pp. 311–316.
- Skipper, H.D. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Shreve GS, Inguva S, Gunnam S. 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Marine Biotechnology*, vol 4(4). pp. 331–337.
- Stelmack PL., Gray MR & Pickard MA. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactant. *Applied Environmental Microbiology*, vol 65 (1). pp. 163–168
- U.S. Environmental Protection Agency 1996. Guía del Ciudadano. Atenuación Natural. U.S government printing office: Cincinnati: National Center for Environmental Publications and Information.
- Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Wilson, J.T & Newell, C. 1999. Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface. New York: John Wiley & Sons, Inc.

