

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN  
DURANTE EL TRATAMIENTO DE LODOS ACEITOSOS PESADOS**

Trabajo de grado

Presentado por

**CINTHYA MAYERLY RONDÓN AFANADOR**

Presentado como requisito para optar al título de

**MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Fabio Roldán, Ph.D**

Director

Bogotá D.C., Colombia

2021

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1949**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN  
DURANTE EL TRATAMIENTO DE LODOS ACEITOSOS PESADOS**

**CINTHYA MAYERLY RONDÓN AFANADOR**

APROBADO:

---

**Fabio Roldan, Ph.D**  
Director

---

**Claudia Rivera, Ph.D**  
Jurado

---

**David Gómez, Ph.D**  
Jurado

---

**Santiago Cardona, Ph.D**  
Jurado

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN  
DURANTE EL TRATAMIENTO DE LODOS ACEITOSOS PESADOS**

**CINTHYA MAYERLY RONDÓN AFANADOR**

APROBADO:



---

**Fabio Roldan, Ph.D**  
Director



---

**Claudia Rivera, Ph.D**  
Jurado



---

**David Gómez, Ph.D**  
Jurado



---

**Santiago Cardona, Ph.D**  
Jurado

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN  
DURANTE EL TRATAMIENTO DE LODOS ACEITOSOS PESADOS**

**CINTHYA MAYERLY RONDÓN AFANADOR**

APROBADO:

---

**Jhon Jairo Sutachan, Ph.D**  
Director de Posgrado  
Facultad de Ciencias

---

**Alba Alicia Trespalcios, Ph.D**  
Decana  
Facultad de Ciencias

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN  
DURANTE EL TRATAMIENTO DE LODOS ACEITOSOS PESADOS**

**CINTHYA MAYERLY RONDÓN AFANADOR**

APROBADO:

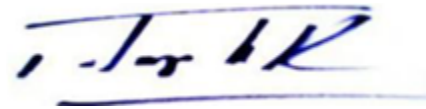


---

**Jhon Jairo Sutachan, Ph.D**

Director de Posgrado

Facultad de Ciencias



---

**Alba Alicia Trespalcios, Ph.D**

Decana

Facultad de Ciencias

**Bogotá. Agosto de 2021**

## DEDICATORIA

A mis padres, Luis Eduardo y Cinthya

A mi hermana, Estefania

A mi novio Jose...

...Gracias por su amor y apoyo incondicional en este camino

A Tommy y Zoe, por ser luz para mi vida

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme en cada decisión de mi vida.

A mi familia, Luis Eduardo, Cinthya, Estefania y Jose, gracias por su apoyo incondicional en esta aventura. A pesar de las dificultades, encontré en ustedes un refugio sincero y amoroso que me dio la fuerza para seguir adelante. A Tommy y Zoe, porque son mi razón más poderosa para sonreír.

A mi tutor, el Dr. Fabio Roldan. Gracias por todas sus enseñanzas, paciencia y confianza durante este proceso. Valoro enormemente cada uno de los aprendizajes adquiridos durante este tiempo, los cuales me permitieron forjar mi carrera profesional y personal.

Al Dr. Ziv Arbeli, por aportar un punto de vista diferente para el análisis de resultados.

A todos los que contribuyeron con su trabajo en el desarrollo del proyecto

A mis compañeros de USBA, gracias por hacer del laboratorio un sitio ameno de trabajo. Especialmente a Hernán, Gustavo, Camila, Cindy y Victoria por su ayuda y amistad sincera.

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), ATP Ingeniería SAS y Minciencias por financiar el proyecto de investigación y darle el escenario para que esto fuera posible.



## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Petróleo .....	5
2.2. Lodos aceitosos.....	6
2.2.1. Lodos aceitosos pesados.....	6
2.2.2. Impacto ambiental.....	7
2.3. Tratamiento de lodos aceitosos.....	9
2.3.1. Recuperación de aceite.....	9
2.3.2. Disposición final .....	10
2.4. Estrategias de biorremediación .....	13
2.4.1. Bioestimulación .....	13
2.4.2. Bioaumentación.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general .....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. METODOLOGÍA.....	17
4.1. Químicos y reactivos .....	17
4.2. Muestreo y caracterización de los lodos aceitosos pesados .....	17
4.3. Métodos analíticos.....	18
4.3.1. Extracción de los TPH.....	18
4.3.2. Cuantificación de los TPH por gravimetría .....	18
4.3.3. Cuantificación de los TPH por GC-FID.....	18
4.4. Determinación de la concentración inicial de lodos aceitosos pesados a emplear en los experimentos de biodegradación .....	19
4.5. Experimentos de bioestimulación para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	20
4.5.1. Evaluación de diferentes materiales de aporte y nutrientes .....	20
4.5.2. Evaluación de la adición de surfactantes .....	21
4.5.3. Evaluación de diferentes concentraciones de TPH.....	23

4.5.4.	Evaluación de diferentes lodos aceitosos .....	23
4.5.5.	Monitoreo y ajuste del pH durante la degradación de los lodos aceitosos.....	23
4.6.	Experimentos de bioaumentación para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	26
4.6.1.	Evaluación del efecto de la adición de consorcios bacterianos.....	28
4.6.2.	Evaluación del efecto de la adición de consorcios de bacterias y hongos 29	
4.6.3.	Evaluación del efecto de la adición de un producto bacteriano comercial .....	30
4.7.	Análisis estadístico .....	32
4.8.	Permiso Acceso a Recursos Genéticos.....	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
5.1.	Caracterización de los lodos aceitosos pesados .....	33
5.2.	Determinación de la concentración inicial de lodos aceitosos pesados a emplear en los experimentos de biorremediación .....	35
5.3.	Experimentos de bioestimulación para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	37
5.3.1.	Efecto de la adición de mezclas de materiales de aporte y nutrientes 37	
5.3.2.	Efecto de la adición del surfactante Tween 80 .....	40
5.3.3.	Efecto de la concentración de lodos aceitosos pesados .....	41
5.3.4.	Efecto del origen de los lodos aceitosos en la degradación .....	42
5.3.5.	Ajuste del pH durante la degradación de los lodos aceitosos .....	46
5.4.	Discusión de los resultados de bioestimulación .....	47
5.5.	Experimentos de bioaumentación para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	51
5.5.1.	Efecto de la adición de consorcios bacterianos .....	51
5.5.2.	Efecto de la adición de consorcios de bacterias y hongos .....	52
5.5.3.	Efecto de la adición del cultivo comercial Biotiger™ .....	53
5.6.	Discusión de los resultados de bioaumentación .....	54
6.	CONCLUSIONES .....	57
7.	RECOMENDACIONES.....	58

8. REFERENCIAS .....59

9. ANEXOS.....71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de los lodos aceitosos.....	8
<b>Tabla 2.</b> Materiales de aporte utilizados para la biodegradación de HCs.....	14
<b>Tabla 3.</b> Factores fisicoquímicos para la degradación de los HCs.....	14
<b>Tabla 4.</b> Coordenadas de la planta El Recreo.....	17
<b>Tabla 5.</b> Composición de las mezclas de materiales de aporte evaluadas en el primer ensayo.....	21
<b>Tabla 6.</b> Composición de las mezclas de materiales de aporte y nutrientes para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	22
<b>Tabla 7.</b> Composición de los tratamientos con diferentes concentraciones de Tween 80 para la degradación de los lodos aceitosos pesados.....	22
<b>Tabla 8.</b> Composición de los tratamientos evaluados a 60,000 y 100,000 mg TPH kg <sup>-1</sup> <sub>ps</sub> .....	25
<b>Tabla 9.</b> Composición de los tratamientos evaluados en el ensayo para monitorear el pH.....	25
<b>Tabla 10.</b> Trabajos de grado de pregrado de bioaumentación realizados en el marco del proyecto investigación.....	27
<b>Tabla 11.</b> Tratamientos de bioaumentación con consorcios bacterianos.....	28
<b>Tabla 12.</b> Tratamientos de bioaumentación con consorcios de bacterias y hongos.....	29
<b>Tabla 13.</b> Composición de los tratamientos de bioaumentación empleando Biotiger™ y consorcio de bacterias y hongos.....	30
<b>Tabla 14.</b> Concentración de TPH de los diferentes lotes de lodos aceitosos pesados utilizados en los ensayos de biodegradación.....	33
<b>Tabla 15.</b> Composición de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos de dos lotes de lodos aceitosos pesados.....	34
<b>Tabla 16.</b> Fracciones SARA de los lodos aceitosos provenientes de Meta, Arauca, Huila y Putumayo.....	35
<b>Tabla 17.</b> Metales medidos en los lodos aceitosos pesados.....	35
<b>Tabla 18.</b> Degradación de los TPH presentes en los lodos aceitosos empleando bioestimulación y bioaumentación.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tratamiento de los lodos aceitosos.....	9
<b>Figura 2.</b> Efecto de la concentración de lodos aceitosos pesados en el consumo de O <sub>2</sub> . Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....	37
<b>Figura 3.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados en el primer ensayo con cuatro mezclas de materiales de aporte y nutrientes.....	38
<b>Figura 4.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados en el segundo ensayo con siete mezclas de materiales de aporte y nutrientes. ....	39
<b>Figura 5.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados con mezclas de materiales de aporte, nutrientes y surfactante.....	41
<b>Figura 6.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados a diferentes concentraciones de TPH.....	42
<b>Figura 7.</b> Degradación de lodos aceitosos provenientes de diferentes departamentos de Colombia. ....	45
<b>Figura 8.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados durante el monitoreo del pH .....	47
<b>Figura 9.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados por consorcios de bacterias. ....	52
<b>Figura 10.</b> Degradación de los lodos aceitosos pesados por consorcios de bacterias y hongos.....	53
<b>Figura 11.</b> Efecto de la adición del Biotiger™ en la degradación de los lodos aceitosos pesados. ....	54

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Respirómetros empleados para los ensayos de respirometría .....	71
<b>Anexo 2.</b> Identificación de las bacterias utilizadas en los ensayos de bioaumentación.....	71
<b>Anexo 3.</b> Composición del medio Bushnell Hass (BH).....	72
<b>Anexo 4.</b> Composición del medio R2A.....	72

## RESUMEN

Los lodos aceitosos son un residuo proveniente de la industria petrolera compuesto por una mezcla de arena, agua, metales y un alto contenido de hidrocarburos (HCs). Los lodos aceitosos utilizados en este estudio se originaron a partir de petróleo crudo pesado de la cuenca de los Llanos Orientales, el cual se caracteriza por su alta viscosidad y baja gravedad API. Estos lodos fueron sometidos a un proceso de centrifugación a altas temperaturas (100 – 110°C) para recuperar aceite de interés comercial, dando como resultado una fracción sólida la cual fue denominada como “lodos aceitosos pesados”.

La biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) se evaluó en microcosmos (n=3) utilizando estrategias de biorremediación, que incluyeron: bioestimulación con diferentes materiales de aporte (p.e., suelo, aserrín, cascarilla de arroz, césped, raquis, biosólidos), nutrientes, adición de un surfactante (Tween 80) y bioaumentación con diferentes consorcios microbianos. Las bacterias y hongos utilizados en los ensayos de bioaumentación fueron aislados y seleccionados en trabajos previos realizados en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA).

Durante los ensayos, se evaluaron altas concentraciones (30,000 – 100,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) de TPH mezclando primero los lodos aceitosos pesados con agua (1:1) para facilitar su homogenización con las mezclas de materiales de aporte. La degradación de los lodos aceitosos pesados se evaluó durante un tiempo ≤ 240 d y en cada muestreo se determinó la concentración de TPH por gravimetría (método EPA 9071B) o por cromatografía de gases (MADEP).

Se observó una baja degradación (2 – 58%) de los lodos aceitosos pesados en los experimentos de bioestimulación. Es importante mencionar que no se presentaron diferencias significativas en la degradación de los TPH entre las diferentes mezclas de materiales de aporte evaluadas en los experimentos. Además, la adición del surfactante Tween 80 no mejoró la biodegradación (0 – 35%) de los lodos aceitosos pesados a los 240 d del ensayo. Teniendo en cuenta que las aproximaciones utilizadas en los ensayos de bioestimulación no aceleraron la degradación de los TPH, se decidió evaluar la bioaumentación utilizando consorcios microbianos y el producto comercial Biotiger™. En estos ensayos, se evidenció una degradación entre el 13 – 58% a los 60 d. Sin embargo, no se observó que la adición de los diferentes consorcios microbianos, favoreciera la degradación de TPH con respecto a la bioestimulación. Los resultados sugieren que los lodos aceitosos pesados son de difícil degradación mediante las estrategias de biorremediación utilizadas, posiblemente por la presencia de fracciones pesadas (resinas y asfaltenos), las altas concentraciones de TPH o el corto periodo de tiempo evaluado.

## ABSTRACT

Oily sludge is a residue from the oil industry composed of a mixture of sand, water, metals, and a high content of hydrocarbons (HCs) with environmental interest. The oily sludge used in this study comes from the heavy oily sludge extracted at the Llanos Orientales basin, which is characterized by its high viscosity and low API gravity. These sludges were subjected to a centrifugation process at high temperatures (100 - 110 °C) to recover any commercially available oil, resulting in a highly viscous solid fraction (called heavy oily sludge).

Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) was evaluated in microcosm (n=3) using bioremediation strategies, which included: biostimulation with different bulking agents (i.e., soil, sawdust, rice husk, grass, raquis, biosolids), nutrients, addition of a surfactant (Tween 80) and bioaugmentation with different microbial consortia. The bacteria and fungi used in the bioaugmentation tests were isolated and selected in previous works carried out at the Environmental Biotechnology and Sanitation Unit (USBA).

During the tests, high concentrations (30,000 – 100,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) of TPH were evaluated by first mixing the heavy oily sludge with water (1:1) to improve homogenization with the bulking agents. The degradation of heavy oily sludge was evaluated for a time ≤ 240 d and on each sampling event, the TPH concentration was determined using gravimetry (EPA 9071B) or by gas chromatography (MADEP EPH).

Low degradation (2 – 58%) of heavy oily sludge was observed in the biostimulation experiments. It is important to mention that there were no significant differences between the different mixtures of bulking agents evaluated in the experiments. Furthermore, the addition of the surfactant Tween 80 did not improve the biodegradation (0 – 35%) of heavy oil sludge at 240 d of the test. Given that the approach used in the biostimulation assays did not improve the degradation of TPH, it was decided to evaluate bioaugmentation using a microbial consortia and Biotiger™, a commercial bioaugmentation product. In these tests, degradation between 13 – 58% was evidenced at 60 d. However, degradation obtained was not higher than of biostimulation. The results suggest that heavy oily sludge is difficult to break down through the bioremediation strategies tested, possibly due to the presence of heavy fractions (resins and asphalt), the high concentrations of TPH or the short period of time evaluated.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los lodos aceitosos son el principal residuo generado durante la extracción, transporte, almacenamiento y refinación del petróleo crudo. Generalmente, estos residuos están compuestos de agua (15 – 50%), hidrocarburos (HCs) (30 – 80%), sólidos (5 – 40%) y metales (Zn, Pb, Cu, Ni, Cr, Fe). La composición fisicoquímica de los lodos varía según el tipo de crudo (p.e., ligero o pesado), su origen, el proceso de refinación empleado y cualquier proceso fisicoquímico utilizado para reprocesar los lodos aceitosos. La cantidad de lodos aceitosos generada varía entre 0.2 – 0.5% p/p de crudo procesado (Hu *et al.*, 2013).

En Colombia, las actividades de extracción de crudo y gas son las que generan mayor cantidad de residuos peligrosos. En el 2018, se reportó la generación de 351,800 toneladas de residuos provenientes de la extracción y refinación del petróleo crudo (IDEAM, 2018). Según el IDEAM (2018), las mezclas y emulsiones de aceite y agua o de HCs y agua, representa el 55% del total de residuos generados en el país.

Debido al gran volumen de lodos aceitosos generados a nivel mundial y la presencia de sustancias tóxicas como el benceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) y metales, en los últimos años se han implementado diferentes estrategias para el adecuado tratamiento y disposición final de estos residuos con el objetivo de minimizar sus efectos negativos en la salud humana y el ambiente.

A causa de esta problemática, se han empleado métodos fisicoquímicos y biológicos para su tratamiento, entre los cuales, la biorremediación con microorganismos destaca por ser una alternativa rentable y sostenible que se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de sitios contaminados con HCs y para el tratamiento de lodos aceitosos a escala de laboratorio y campo (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que cuando los lodos aceitosos provienen de crudo pesado, estos residuos pueden ser aún más peligrosos debido al contenido de fracciones pesadas (resinas y asfaltenos) que dificultan su biodegradación. Aunque las estrategias de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación) han sido ampliamente utilizadas para la degradación de los lodos aceitosos, poco se ha evaluado la biodegradación de los lodos aceitosos pesados. En este sentido, el término lodos aceitosos pesados describe la fracción sólida resultante de la centrifugación a altas temperaturas (100 – 110°C) de los lodos aceitosos provenientes de crudo pesado (gravedad API < 20°).

Teniendo esto en cuenta, en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana se ha trabajado durante los últimos años en la biodegradación de los lodos aceitosos pesados en el marco del proyecto “Tratamiento de lodos aceitosos de la industria petrolera empleando biopilas” co-

financiado por la empresa ATP Ingeniería SAS y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Minciencias).

El presente trabajo se centró en evaluar diferentes estrategias de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación) en condiciones de laboratorio, para determinar cuál es la mejor aproximación para degradar los lodos aceitosos pesados y así poder implementar un futuro tratamiento en campo. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la bioestimulación y bioaumentación durante la degradación de los lodos aceitosos pesados a altas concentraciones ( $30,000 - 100,000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) utilizando microcosmos con materiales de aporte, nutrientes, surfactantes y microorganismos degradadores de HCs (bacterias, hongos y el producto comercial Biotiger™). Para esto, en los microcosmos se mezcló primero los lodos aceitosos pesados con agua para facilitar la homogenización con los tratamientos. Los microcosmos se incubaron bajo condiciones de oscuridad a temperatura constante sin agitación. La degradación de los HCs presentes en los lodos aceitosos pesados se monitoreó durante un tiempo  $\leq 240$  d empleando gravimetría (EPA 9071B) o por cromatografía de gases (MADEP).

Los resultados y discusión del presente trabajo fueron presentados en 4 secciones principalmente: 1) caracterización de los lodos aceitosos pesados, 2) determinación de la concentración de lodos aceitosos pesados a utilizar en los experimentos de biodegradación, 3) el bloque de resultados de los experimentos de bioestimulación seguido de la respectiva discusión y finalmente, 4) el bloque de resultados de los experimentos de bioaumentación seguido de la discusión de los hallazgos obtenidos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Petróleo

El petróleo se forma naturalmente por la acción de factores físicos y químicos, específicamente la temperatura y presión, sobre la biomasa de organismos antiguos. A medida que los organismos mueren, los restos se depositan en el fondo del mar y se combinan con arena y sedimentos formando rocas sedimentarias (Robinson, 2007; J. Speight, 2019). A través del tiempo, los procesos físicos, químicos y biológicos transforman la materia orgánica en un fluido (petróleo) compuesto principalmente de hidrocarburos (HCs) (Robinson, 2007). Estos HCs pueden ser clasificados en 3 clases: parafinas, naftenos y aromáticos (modelo PNA) (Ahmad *et al.*, 2011; Riazi, 2005). Las parafinas son cadenas lineales o ramificadas de HCs saturados (enlaces sencillos), mientras que los naftenos tienen HCs saturados con uno o más anillos (cicloalcanos) unidos por cadenas de parafinas (Riazi, 2005; Robinson, 2007). Los HCs aromáticos se caracterizan por tener en sus estructuras uno o más anillos de HCs insaturados (dobles y triples enlaces) unidos por parafinas o naftenos (Riazi, 2005; Robinson, 2007). El modelo SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) también es ampliamente utilizado para describir la composición del petróleo (Ahmad *et al.*, 2011). Dentro de la fracción de HCs saturados se encuentran los compuestos lineales, ramificados y cíclicos con enlaces sencillos (Rudyk, 2018). La fracción de aromáticos agrupa a los HCs que contienen en su estructura uno o más anillos aromáticos (S. Chang & Robinson, 2017). Las resinas y asfaltenos consisten en agregados de anillos aromáticos unidos por parafinas, de mayor peso molecular, polaridad y contenido de heteroátomos (N, S, O) que los HCs aromáticos (Leon & Kumar, 2005; Shaw *et al.*, 2017). Sin embargo, durante el fraccionamiento las resinas son solubles en pentano mientras que los asfaltenos son insolubles en alcanos de bajo peso molecular (p.e., pentano o heptano) (S. Chang & Robinson, 2017).

Según su origen geográfico, biomasa y procesos de formación, la composición de cada crudo es diferente y generalmente se clasifican en ligero, medio y pesado, según su gravedad API (J. G. Speight & El-Gendy, 2018). La gravedad API es una medida de la densidad de diferentes crudos desarrollada por el Instituto Estadounidense del Petróleo (API, por sus siglas en inglés) (Robinson, 2007). A través de este parámetro se puede determinar cuan ligero o pesado es el crudo con respecto al agua. El crudo ligero o convencional se caracteriza por presentar valores de gravedad API  $> 30^\circ$ , tiene una alta permeabilidad y movilidad en el yacimiento y puede ser recuperado a través de técnicas primarias y secundarias (J. Speight, 2019; J. G. Speight & El-Gendy, 2018). De forma similar, el crudo medio tiene una alta permeabilidad y también puede ser recuperado mediante técnicas primarias y secundarias. Sin embargo, la gravedad API de este tipo de crudo se encuentra entre  $20 - 30^\circ$  (J. Speight, 2019; J. G. Speight & El-Gendy, 2018). Por último, el crudo pesado tiene una baja gravedad API ( $10 - 20^\circ$ ), mayor viscosidad, alto contenido de

asfaltenos y la recuperación se realiza utilizando técnicas secundarias y terciarias (Leon & Kumar, 2005; J. Speight, 2019; J. G. Speight & El-Gendy, 2018).

## **2.2. Lodos aceitosos**

Los lodos aceitosos son residuos generados en las diferentes etapas de extracción, almacenamiento, transporte y refinación del petróleo. La composición de los lodos aceitosos varía según el tipo de crudo (p.e., ligero o pesado), la etapa de procesamiento del petróleo (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013) y además, de cualquier proceso fisicoquímico utilizado para el preprocesamiento de los lodos.

Generalmente, los lodos aceitosos se caracterizan por su color marrón oscuro o negro, apariencia pastosa y su alta viscosidad (Da Silva *et al.*, 2012; Teng *et al.*, 2018). Los lodos aceitosos comúnmente tienen un pH neutro (6.5 – 7.5), un alto contenido de hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) (5 – 86% p/p), agua (30 – 85% p/p), sólidos o sedimentos (4 – 46% p/p) y metales (p.e., Zn, Pb, Cu, Ni, Cr, V, Hg) (Hu *et al.*, 2013; Jasmine & Mukherji, 2015; Kriipsalu & Nammari, 2010). Las fracciones predominantes de HCs son los saturados y aromáticos, con un contenido de 40 – 60% y 25 – 40% p/p respectivamente, mientras que las resinas se encuentran entre 7 – 22% p/p y los asfaltenos entre el 8 – 15% p/p (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013; Roldán-Carrillo *et al.*, 2012). En la Tabla 1 se resume la composición fisicoquímica de los lodos aceitosos reportados en la literatura.

Por otra parte, en Colombia, la extracción de petróleo crudo y las actividades de apoyo para la extracción de petróleo y gas natural, representan el 33 y 18% de la generación total de residuos peligrosos (IDEAM, 2018). Por tal razón, los generadores de los residuos deben asumir su gestión (aprovechamiento o tratamiento) y adecuada disposición final. A pesar de esto, de las 351,800 ton de residuos provenientes de la industria petrolera únicamente el 47% ha recibido algún tipo de manejo (IDEAM, 2018), lo que representa una grave problemática ambiental. En nuestro conocimiento, no existe reporte de las cantidades y la composición de los lodos aceitosos generados en Colombia.

### **2.2.1. Lodos aceitosos pesados**

En este estudio, se utilizó el término lodos aceitosos pesados para describir los sólidos resultantes del proceso de centrifugación, utilizado para recuperar HCs de valor comercial de lodos aceitosos provenientes de crudo pesado, el cual es extraído principalmente de la cuenca de los Llanos Orientales en Colombia. Esta cuenta sedimentaria produce el 73% del petróleo a nivel nacional con la participación de campos petroleros de gran importancia como: Rubiales, Castilla, Castilla Norte, Quifa y Chichimene (UPME, 2013), los cuales se caracterizan por su baja gravedad API (12.9, 12.1, 12.1, 13.9 y 18.4, respetivamente) (Malagón, 2016).

### 2.2.2. Impacto ambiental

En diferentes países, los lodos aceitosos son considerados residuos peligrosos por el alto contenido de compuestos carcinogénicos, mutagénicos y tóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) y metales pesados (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013, 2020). Debido a su viscosidad, los lodos aceitosos pueden adsorberse a los minerales del suelo afectando sus características fisicoquímicas (p.e., capacidad de retención de agua), nutricionales y bióticas como la germinación de plantas (Hu *et al.*, 2013). Una vez liberados en el ambiente, los HCs presentes en los lodos aceitosos pueden migrar a través del suelo y contaminar aguas subterráneas y superficiales causando graves pérdidas en la biodiversidad (Hu *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Composición de los lodos aceitosos

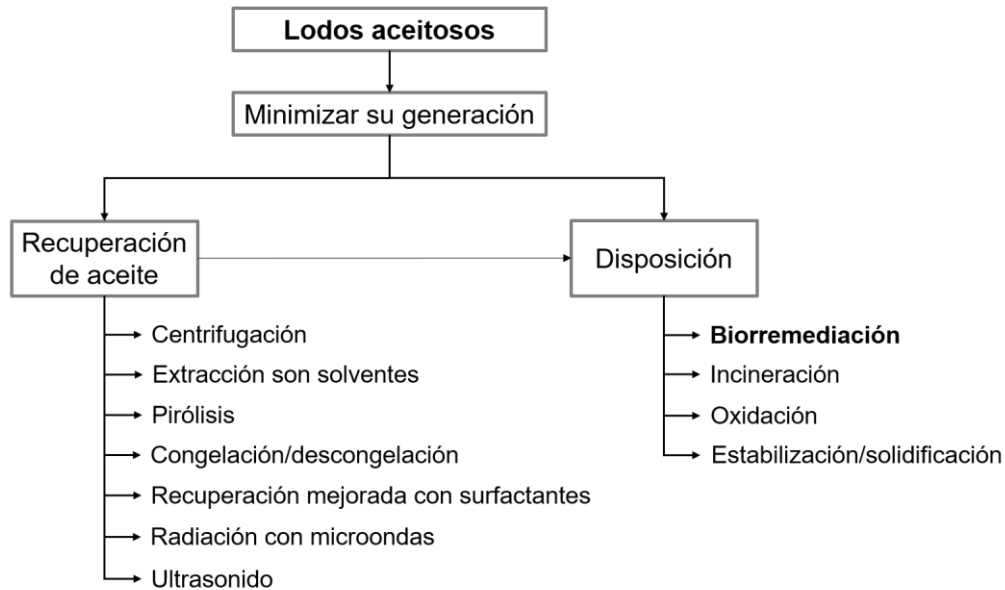
Referencias	Origen	pH	TPH (mg kg <sup>-1</sup> )	Humedad (%)	Saturados (%)	Aromáticos (%)	Resinas (%)	Asfaltenos (%)
(Milne <i>et al.</i> , 1998)	Canadá	–	300,000	30	36	31	18	6
(Marin <i>et al.</i> , 2006)	España	7.8	281,000	–	–	–	–	–
(M. J. Ayotamuno <i>et al.</i> , 2007)	Nigeria	5.8	69,372	20.5	–	–	–	–
(Kriipsalu <i>et al.</i> , 2007)	Suecia	8.0	130,000	–	–	–	–	–
(Fountoulakis <i>et al.</i> , 2009)	Grecia	7.5	203.8	–	–	–	–	–
(J. M. Ayotamuno <i>et al.</i> , 2010)	Nigeria	5.4	98,032	5.2	–	–	–	–
(Kriipsalu & Nammari, 2010)	Suecia	7.3	160,000	–	–	–	–	–
(Roldán-Carrillo <i>et al.</i> , 2012)	México	7.8	334,700	73.9	46	47	6	2
(X. Wang <i>et al.</i> , 2012)	China	8.0	175,000	16	–	–	–	–
(Koolivand <i>et al.</i> , 2013)	Irán	6.9	104	6.1	–	–	–	–
(Atagana, 2014)	Sudáfrica	–	300,592	–	–	–	–	–
(Cerqueira <i>et al.</i> , 2014)	Brasil	–	480,000	–	–	–	–	–
(Asgari <i>et al.</i> , 2017)	Irán	1.4	521,120	10.6	–	–	–	–
(Roy <i>et al.</i> , 2018)	India	7.1	143,800	27.1	–	–	–	–
(Duan <i>et al.</i> , 2019)	China	–	652,100	22.7	39	30	18	9
(Jasmine & Mukherji, 2019)	India	–	99,000	–	–	–	–	–
(Poorsoleiman <i>et al.</i> , 2020)	Irán	6.1	255,050	27.6	–	–	–	–
(Mora <i>et al.</i> , 2020)	-	7.8	–	8.2	–	–	–	–
(Abtahi <i>et al.</i> , 2020)	Irán	6.1	255,050	27.6	–	–	–	–
(Aguelmous <i>et al.</i> , 2020)	Marruecos	8.1	470,000	–	–	–	–	–
(Ke <i>et al.</i> , 2021)	China	8.3	221,300	17.8	43	21	30*	–
(Jerez <i>et al.</i> , 2021)	España	7.4	262,000	–	–	–	–	–

– Sin información

\* Valor de las fracciones de resinas y asfaltenos

### 2.3. Tratamiento de lodos aceitosos

El tratamiento de los lodos aceitosos abarca el uso de diferentes enfoques (Figura 1): 1) minimizar la cantidad de residuos generados en las diferentes etapas del procesamiento del petróleo; 2) recuperar y reutilizar los HCs de valor comercial presentes en los lodos; y 3) disponer los residuos después del tratamiento para reducir la contaminación por HCs y metales a niveles regulatorios y así, prevenir la migración de los contaminantes al suelo, aguas superficiales y aguas subterráneas (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Tratamiento de los lodos aceitosos. Adaptado de Hu y colaboradores (2013).

#### 2.3.1. Recuperación de aceite

La recuperación de aceite a partir de los lodos aceitosos se puede realizar cuando el contenido de HCs en los lodos es  $> 10\%$  en peso (Duan *et al.*, 2019) y el contenido de sólidos es  $< 30\%$  (Johnson & Affam, 2019), beneficiando económicamente a las industrias petroleras o a quien realiza el tratamiento. Según la composición del aceite recuperado, este puede ser utilizado como combustible para los diferentes equipos de producción y refinación del petróleo (Duan *et al.*, 2019). Durante este proceso de recuperación se alteran las características fisicoquímicas de los lodos, reduciendo así, su volumen y la concentración de los contaminantes (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013).

Entre los métodos fisicoquímicos más utilizados se encuentra la extracción con solventes, centrifugación, pirólisis, tratamiento de congelación/descongelación y el método electrocinético (Figura 1) (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013; Johnson & Affam, 2019).

### 2.3.2. Disposición final

Los tratamientos de los lodos aceitosos para su disposición final pueden realizarse mediante métodos fisicoquímicos como la incineración, estabilización/solidificación y oxidación (Figura 1) (Hu *et al.*, 2013). En cuanto a los métodos biológicos, la biorremediación se basa en la capacidad de los microorganismos u organismos vivos para degradar o transformar los HCs en compuestos más simples y menos tóxicos (EPA, 2001; J. G. Speight, 2020). Las tecnologías de biorremediación más utilizadas son los biorreactores, biolabranza, biopilas y compostaje (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013).

#### 2.3.2.1. Tratamientos fisicoquímicos

##### 2.3.2.1.1. Incineración

Durante la incineración los lodos aceitosos son sometidos a altas temperaturas en un proceso de combustión que requiere exceso de aire y combustibles fósiles auxiliares (Hu *et al.*, 2013). Generalmente, la temperatura de combustión es  $> 1000^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de residencia de los lodos puede ser de minutos a un par de días (Hu *et al.*, 2013, 2020). Es un tratamiento rápido, efectivo en la remoción de los HCs donde se obtiene energía que puede ser utilizada como fuente de calor (Hu *et al.*, 2013). Sin embargo, es costoso y los subproductos (cenizas, agua) generados requieren un tratamiento adicional (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013). Otra desventaja de este método es que, los incineradores deben contar con sistemas de limpieza de gases de combustión de alta tecnología, para prevenir la contaminación atmosférica por PAHs de bajo peso molecular (p.e., benceno y tolueno) (Chen *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013).

##### 2.3.2.1.2. Estabilización/solidificación

Durante este tratamiento, los lodos aceitosos son encapsulados en una matriz sólida estable que permite mantener los contaminantes en formas menos solubles y menos tóxicas (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). Para la encapsulación, se utilizan agentes solidificantes como el cemento Portland o mezclas de cemento y carbón activado (Hu *et al.*, 2013; Johnson & Affam, 2019). Las ventajas más importantes son: bajo costo, alta eficiencia de encapsulación de los HCs ( $> 90\%$ ) y además, permite la inmovilización los metales pesados presentes en los lodos (Hu *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, para la implementación de este tratamiento, se debe realizar un preprocesamiento de los lodos para reducir su contenido de humedad (Hu *et al.*, 2013). Además, a diferencia de la incineración, no se obtiene energía reciclable y los hidrocarburos no son eliminados o transformados, lo que implica un pasivo ambiental (Hu *et al.*, 2013).

##### 2.3.2.1.3. Oxidación

En la oxidación, se utilizan agentes químicos que favorecen la oxidación de los compuestos orgánicos en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  o en compuestos fácilmente biodegradables



(Hu *et al.*, 2013; Johnson & Affam, 2019). Los agentes químicos más utilizados para el tratamiento de los lodos aceitosos son el reactivo Fenton, permanganato, ozono, persulfato y radiación ultrasónica (Hu *et al.*, 2013). Cuando estos reactivos, entran en contacto con los lodos, se generan radicales libres como el hidroxilo (OH), el cual reacciona con compuestos orgánicos como los PAHs (Hu *et al.*, 2013). Si bien este tratamiento permite una remoción de los HCs > 90% en un corto periodo de tiempo (1 – 2 d), la implementación a gran escala requiere de una elevada cantidad de reactivos químicos, lo cual incrementa considerablemente los costos del tratamiento y además, se pueden formar subproductos debido a la oxidación incompleta de los HCs (Hu *et al.*, 2013; Johnson & Affam, 2019).

#### 2.3.2.2. Tratamiento biológico

La biorremediación se basa en el proceso biológico realizado por los microorganismos para metabolizar los contaminantes en compuestos inocuos (J. G. Speight, 2020). La finalidad de la biodegradación es lograr la mineralización del contaminante en compuestos inorgánicos como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (EPA, 2001; Hurst & Crawford, 2002). Algunas de las tecnologías de biorremediación más utilizadas para el tratamiento de los lodos aceitosos son los biorreactores, biolabranza, biopilas y compostaje.

##### 2.3.2.2.1. Biorreactores

En los biorreactores, los lodos aceitosos se mezclan con agua (5 – 50% p/v) para formar una fase semisólida que permita la solubilización de los contaminantes (Hu *et al.*, 2013). Este tratamiento favorece el contacto entre los HCs, nutrientes, microorganismos y oxígeno, convirtiéndolo en un método eficaz y rápido para la transformación y mineralización de los contaminantes (Hu *et al.*, 2013). La agitación se puede realizar de forma mecánica o por inyección continua de aire, los microorganismos se pueden adicionar inmovilizados o libres y además, se pueden controlar una o más condiciones operativas (p.e., temperatura, humedad, pH, emisiones atmosféricas) y finalmente, se puede ajustar otros parámetros que favorezcan la biodegradación como nutrientes y surfactantes (Da Silva *et al.*, 2012). Este tratamiento es más costoso que los métodos *in situ* (p.e., biolabranza) ya que requiere el transporte de los lodos aceitosos y suministro de energía continuo. Sumado a esto, es importante tener en cuenta los costos de construcción y operación del biorreactor (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). A pesar de las desventajas, el uso de biorreactores a escala de laboratorio y campo para el tratamiento de los lodos ha sido reportado por varios autores con un éxito del 50 – 90% en la reducción de los HCs (Abtahi *et al.*, 2020; M. J. Ayotamuno *et al.*, 2007; Koolivand *et al.*, 2017)

##### 2.3.2.2.2. Biolabranza

La biolabranza consiste en adicionar lodos aceitosos a una capa de suelo orgánico para estimular la degradación microbiana por medio de la aireación y adición de nutrientes (principalmente carbono, nitrógeno y fósforo) (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et*

*al.*, 2013). Generalmente, la aireación y mezcla de los lodos aceitosos con el suelo se realiza por medio de arado. Además, se controlan parámetros como la humedad, pH y tasa de aplicación del lodo para mejorar la eficiencia del tratamiento. Si bien la reducción de los HCs corresponde principalmente a la acción de los microorganismos, mecanismos fisicoquímicos como la volatilización y fotodegradación, también contribuyen a la degradación de los lodos (Da Silva *et al.*, 2012). Este tratamiento es relativamente sencillo de implementar, económico y con un bajo consumo de energía. Además, permite tratar un gran volumen de lodos, alcanzando bajas concentraciones de hidrocarburos en periodos de tiempo prolongados (6 meses – 2 años) (Hu *et al.*, 2013). Sin embargo, se requiere de grandes extensiones de tierra para su implementación y un sistema de recolección de lixiviados para evitar la contaminación de aguas subterráneas debido a la migración de HCs y metales pesados (Hu *et al.*, 2013).

#### 2.3.2.2.3. Biopilas

El tratamiento por biopilas es similar a la biolabranza, pero la mezcla de lodos aceitosos y suelo se dispone en pilas o hileras de 2 a 4 m de altura (Hu *et al.*, 2013). De igual manera, se pueden adicionar nutrientes y materiales de aporte (p.e., aserrín, astillas de madera, paja) y ajustar parámetros como la humedad y aireación para mejorar la biodegradación de los HCs (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). Generalmente, las biopilas se construyen sobre una superficie impermeable para reducir los lixiviados y además, requieren de una menor área con respecto a la biolabranza. Debido a esta última característica, las biopilas pueden ser implementadas bajo techo o pueden ser cubiertas con plástico, reduciendo la emisión de gases y facilitando su implementación en zonas con condiciones climáticas extremas (p.e., regiones con alta precipitación) en cortos periodos de tiempo (6 – 12 meses) (Da Silva *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013).

#### 2.3.2.2.4. Compostaje

El compostaje es un tratamiento similar a las biopilas que se caracteriza por el alto contenido de materia orgánica procedente de materiales de aporte como el estiércol o residuos de comida (Aguelmous *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013). El compostaje se realiza en dos etapas, la primera es una fase termófila que se caracteriza por el aumento de la temperatura (> 60°C) debido al calor generado por la actividad microbiana y la degradación de HCs de bajo peso molecular, mientras que en la segunda fase, denominada como maduración, se degradan los compuestos más pesados (Aguelmous *et al.*, 2019). Si bien el proceso de compostaje puede ser realizado en pilas o hileras, este tratamiento también ha sido implementado en reactores, lo que facilita el monitoreo de la aireación, humedad, nutrientes y temperatura (Aguelmous *et al.*, 2019). Por medio de este tratamiento, se ha observado una alta degradación (> 50%) de los HCs presentes en los lodos aceitosos (Asgari *et al.*, 2017; Kriipsalu & Nammari, 2010; Ouyang *et al.*, 2005).

## 2.4. Estrategias de biorremediación

La biorremediación de sitios contaminados con HCs se puede implementar usando tres estrategias: atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación. Sin embargo, en la biorremediación de los lodos aceitosos no se utiliza la atenuación natural y generalmente se contemplan las dos últimas estrategias.

### 2.4.1. Bioestimulación

La bioestimulación consiste en identificar y suministrar el factor limitante de la biodegradación de los HCs. Mediante esta estrategia se modifican las condiciones del ambiente para estimular el metabolismo microbiano y aumentar la tasa de degradación del contaminante. Los parámetros que pueden ser adicionados o modificados para estimular los microorganismos degradadores nativos son: nutrientes (N, P), aceptor final de electrones, solubilidad y parámetros fisicoquímicos (p.e., temperatura, pH, humedad).

Debido al origen natural del petróleo, durante siglos los microorganismos que han estado en contacto con este fluido, tienen la capacidad de utilizar los HCs como fuente de carbono y energía. Teniendo en cuenta que los HCs son ricos en carbono, generalmente nutrientes como el nitrógeno y fósforo suelen ser los factores limitantes de la degradación. Estos nutrientes pueden ser adicionados utilizando fertilizantes orgánicos o inorgánicos para mejorar la biodegradación de los HCs presentes en los lodos aceitosos o en suelos contaminados con petróleo (Cerqueira *et al.*, 2014; Tahhan *et al.*, 2011). Por lo tanto, es necesario determinar la frecuencia de aplicación, concentración y tipo de nutrientes a emplear durante la bioestimulación.

Otro factor que afecta la biodegradación de los HCs, es la disponibilidad de aceptores terminales de electrones (ATE) (p.e.,  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $Mn^{4+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_2$ ) necesarios para la respiración microbiana y generación de energía. Las condiciones aeróbicas han sido utilizadas para la biodegradación de los HCs debido a su efectividad en cortos periodos de tiempo. Bajo condiciones aerobias, el  $O_2$  es utilizado como ATE para el crecimiento microbiano y la degradación de los HCs, obteniéndose un mayor rendimiento energético. Los HCs son activados mediante la adición de uno o dos átomos de oxígeno por enzimas monooxigenasas o dioxigenasas, respectivamente, las cuales están implicadas en la degradación de las fracciones saturadas y aromáticas (Prince & Walters, 2016). El  $O_2$  puede ser suministrado a los tratamientos de biorremediación a través de aireaciones activas (p.e., inyección de aire, arado), pasivas, incorporando materiales de aporte que favorezcan la porosidad y difusión de aire o compuestos generadores de  $O_2$  (p.e., aire).

El material de aporte (sustratos agrícolas) mejora la porosidad, aireación, y capacidad de retención de agua del sistema, también proporciona nutrientes (C, N, P) y una alta carga microbiana (p.e., estiércol, biosólidos, compost) (Dörr de Quadros *et al.*, 2016; Hoang *et al.*, 2021; X. Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016).

Estas características hacen al material de aporte una opción económica y de fácil acceso para el tratamiento biológico de los HCs presentes en los lodos aceitosos y suelos contaminados con petróleo (Hoang *et al.*, 2021). Algunos materiales de aporte utilizados para la degradación de HCs en la literatura son: aserrín o residuos de madera, compost, tallos de algodón, estiércol (Tabla 2).

**Tabla 2.** Materiales de aporte utilizados para la biodegradación de HCs

Material de aporte	Referencias
Compost	(Gomez & Sartaj, 2013; Trejo-Hernández <i>et al.</i> , 2007)
Bagazo de caña de azúcar	(Trejo-Hernández <i>et al.</i> , 2007)
Residuos de madera	(Huang <i>et al.</i> , 2019; Marin <i>et al.</i> , 2006)
Tallos de algodón	(X. Wang <i>et al.</i> , 2012)
Suelo	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2014; Dörr de Quadros <i>et al.</i> , 2016)
Residuos de jardín	(Fountoulakis <i>et al.</i> , 2009)
Estiércol	(Asgari <i>et al.</i> , 2017; Ouyang <i>et al.</i> , 2005)
Paja o cascarilla de arroz	(Lladó <i>et al.</i> , 2012)(Huang <i>et al.</i> , 2019)

La biodisponibilidad de los HCs se puede mejorar mediante la adición de surfactantes, los cuales pueden ser de origen sintético o biológico (Jardak *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019). Los surfactantes son moléculas anfipáticas que poseen un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico, que incrementan la solubilidad del contaminante haciéndolo más disponible para los microorganismos (Jardak *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019; Mulligan, 2009). Estos compuestos han sido utilizados ampliamente para mejorar la degradación de los HCs presentes en los lodos aceitosos (Cameotra & Singh, 2008; Jasmine & Mukherji, 2019).

Finalmente, factores fisicoquímicos como la temperatura, humedad y pH pueden ser modificados para mejorar la biorremediación de los contaminantes (Kumar *et al.*, 2019). Generalmente, se estima que los rangos óptimos para la biodegradación de los HCs en el suelo son: temperatura de 30 – 40°C, pH de 6 – 8 y humedad de 40 – 70% (Tabla 3) (Kumar *et al.*, 2019).

**Tabla 3.** Factores fisicoquímicos para la degradación de los HCs

Factor	Rango óptimo	Referencias
Temperatura	30 – 40°C	(Ke <i>et al.</i> , 2021; Kumar <i>et al.</i> , 2019)
pH	6 – 8	(M. J. Ayotamuno <i>et al.</i> , 2007; Poorsoleiman <i>et al.</i> , 2020)
Humedad	40 – 70%	(Kumar <i>et al.</i> , 2019; Tran <i>et al.</i> , 2021)
C:N:P	100:10:1 (0.5)	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2019)

#### 2.4.2. Bioaumentación

La estrategia de bioaumentación generalmente se implementa junto con la bioestimulación para aumentar las tasas de degradación del contaminante. Durante la bioaumentación, se inoculan microorganismos degradadores (cepas puras o

consorcios) al sitio contaminado (Kumar *et al.*, 2019; Singer *et al.*, 2005). Estos microorganismos (nativos, externos o modificados genéticamente) son seleccionados con base en su efectividad para degradar el contaminante, adaptarse a diversas condiciones ambientales, por su rápido crecimiento y facilidad de cultivo (Singer *et al.*, 2005). La bioaumentación es una opción a considerar cuando: 1) los recuentos de microorganismos degradadores en el sitio contaminado son bajos, 2) el contaminante es xenobiótico, es decir, compuestos antropogénicos que no se producen de forma natural y 3) se requiere de un metabolismo específico para su degradación.

Para el aislamiento de microorganismos degradadores de los lodos aceitosos generalmente se realizan cultivos de enriquecimiento en un medio mínimo de sales con lodos como única fuente de carbono y energía (Cerqueira *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Obi *et al.*, 2016). Posteriormente, las cepas son seleccionadas con base en el crecimiento (Ma *et al.*, 2015), detección de genes específicos (p.e., catecol-2,3-dioxigenasa) (Obi *et al.*, 2016), actividad respiratoria o ensayos de biodegradación en medio líquido y sólido (Cerqueira *et al.*, 2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la bioestimulación y bioaumentación durante el tratamiento de lodos aceitosos pesados bajo condiciones de laboratorio.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar las condiciones de bioestimulación que favorecen la degradación de lodos aceitosos pesados.
- Evaluar la bioaumentación empleando consorcios de bacterias y hongos durante la degradación de lodos aceitosos pesados.
- Comparar la degradación de lodos aceitosos provenientes de diferentes departamentos de Colombia.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Químicos y reactivos

Para la extracción de los HCs se utilizó diclorometano grado HPLC (Scharlau, España) y acetona grado reactivo (Merck, Alemania). Para la selección de microorganismos degradadores se utilizaron algunos PAHs (fenantreno, antraceno, naftaleno y pireno) grado reactivo (Sigma-Aldrich, USA). Para los análisis cromatográficos se utilizaron estándares analíticos (99%) de HCs alifáticos y aromáticos (AccuStandard, USA). Los lodos aceitosos pesados utilizados en los ensayos fueron proporcionados por la empresa ATP Ingeniería SAS.

### 4.2. Muestreo y caracterización de los lodos aceitosos pesados

Durante el transcurso de este estudio, 7 lotes de lodos aceitosos pesados se colectaron de la planta de tratamiento El Recreo de la empresa ATP Ingeniería SAS, la cual se encuentra ubicada en el municipio de San Carlos de Guaroa en el departamento del Meta, Colombia (Tabla 4). Los lodos aceitosos, provenientes de petróleo crudo pesado, son recibidos por la empresa ATP y almacenados en piscinas. Posteriormente, son sometidos a un proceso de centrifugación a altas temperaturas (100 – 110°C) para recuperar aceites de valor comercial. El agua que se recupera de este proceso será tratada en la unidad de tratamiento de aguas de la planta El Recreo. La fracción “sólida” resultante de este tratamiento fisicoquímico fue denominada lodos aceitosos pesados, los cuales fueron utilizados en el presente estudio.

**Tabla 4.** Coordenadas de la planta El Recreo

	Latitud	Longitud
Noreste	3°52'53.30' N	73°21'26.93' O
Noroeste	3°52'59.11' N	73°21'50.73' O
Sureste	3°52'49.60' N	73°21'30.06' O
Suroeste	3°52'49.00' N	73°21'52.61' O

La cuantificación de los HCs presentes en cada uno de los lotes (n=3) de los lodos aceitosos pesados se realizó utilizando el método gravimétrico 9071B (EPA, 1998) y el método para la determinación de hidrocarburos extraíbles del petróleo MADEP (Massachusetts Department of Environmental Protection) (MADEP, 2004) usando la técnica de cromatografía de gases acoplada a un detector de llama ionizante (GC-FID). Asimismo, el análisis SARA a 2 lotes (n=2) de lodos aceitosos pesados fue realizado por el laboratorio analítico externo Proasem S.A con base en los métodos estándares D6560 (ASTM, 2013) y D2007 (ASTM, 2008). En este análisis, el extracto de HCs de los lodos aceitosos pesados fue diluido con n-pentano para precipitar los asfaltenos. Posteriormente, la muestra fue cargada en una columna de cromatografía con gel de sílice para separar la fracción de HCs saturados,

aromáticos y resinas utilizando como solventes hexano, tolueno y metanol, respectivamente. Por otra parte, la concentración de metales (As, Cd, Cr, Hg, Ag, Ni, Pb y Zn) de 3 lotes (n=2) de lodos aceitosos pesados fue determinada por el laboratorio externo Chemilab mediante digestión ácida y absorción atómica según los métodos 3050B (EPA, 1996) y 7000B (EPA, 2007). Finalmente, el contenido de humedad de cada uno de los 7 lotes (n=3) de lodos aceitosos pesados se determinó por pérdida de peso secando las muestras en horno a 105°C durante 24 h (ASTM, 2019a).

### 4.3. Métodos analíticos

#### 4.3.1. Extracción de los TPH

La extracción de TPH asistida por microondas (MARS 6; CEM) (USA) se realizó de acuerdo con el método 3546 (EPA, 2007) y se ajustó según las recomendaciones técnicas del fabricante. Se utilizó una mezcla (1:1) de acetona y diclorometano como solvente de extracción (30 mL). La extracción se realizó a 150°C durante 15 min a una potencia entre 100 – 300 W. Posteriormente, el extracto de TPH se pasó a través de un filtro cuantitativo grado 40 (18.5 cm Ø) (Whatman; GE Healthcare) (USA) y se transfirió a un vaso de evaporación.

#### 4.3.2. Cuantificación de los TPH por gravimetría

Para la determinación gravimétrica de TPH se utilizó el método 9071B (EPA, 1998). Se utilizaron viales de vidrio de 60 mL (27.5 x 140 mm) (Merck, Alemania) a los cuales se les registró el peso inicial. El extracto de las muestras fue colocado en los viales y posteriormente, el solvente fue evaporado a 55°C durante 3 h en el evaporador RapidVap Vertex (Labconco Corporation, USA) con flujo de N<sub>2</sub> a 15 psi. Posteriormente, los viales fueron colocados en la campana de desecación durante 30 min para enfriar y mantenerlos sin la humedad. Finalmente, se registró el peso final de los viales y se calculó la concentración de TPH según la Ecuación 1.

$$TPH (mg kg^{-1}) = \left( \frac{\text{ganancia de peso del vial (mg)}}{\text{peso de la muestra (kg)}} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

**Donde** TPH → Hidrocarburos totales del petróleo (mg kg<sup>-1</sup>)

La concentración de TPH se informó sobre la base del peso seco, dividiendo el resultado por la fracción de peso seco.

#### 4.3.3. Cuantificación de los TPH por GC-FID

La determinación de los TPH por cromatografía de gases (GC) se realizó según el método MADEP (MADEP, 2004) con un GC (2014; Shimadzu) (Japón) acoplado a un detector de llama ionizante (FID). La separación fue realizada en una columna HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Agilent; USA) usando He como gas de arrastre



(1.86 mL min<sup>-1</sup>). Las condiciones utilizadas fueron: temperatura del puerto de inyección, 285°C; temperatura del detector, 320°C; volumen de inyección, 1 µL; con un split de 20:1. La temperatura del horno se sometió a una rampa: iniciando a 100°C durante 1 min y luego aumentando a 160°C a 8°C min<sup>-1</sup>, se aumentó a 290°C a 20°C min<sup>-1</sup>, se mantuvo durante 13 min, aumentó hasta 310°C a 10°C min<sup>-1</sup> sin mantenimiento, para un tiempo total de corrida de 30 min.

#### 4.4. Determinación de la concentración inicial de lodos aceitosos pesados a emplear en los experimentos de biodegradación

La técnica de respirometría permite monitorear la actividad microbiana para determinar si los contaminantes ejercen un efecto inhibitorio en los microorganismos. Además, la cuantificación del consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> permite medir de forma indirecta la biodegradación de los HCs. Esta técnica fue utilizada para determinar la concentración inicial de los lodos aceitosos pesados que podía ser empleada en los experimentos de biorremediación.

Para este ensayo se utilizó una mezcla de material de aporte no estéril conformada por suelo y aserrín (3:1 p/p) (C1) con diferentes concentraciones de lodos aceitosos pesados (60,000; 100,000; 150,000 y 200,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>). Para esto, se utilizaron respirómetros WTW (500 mL) (Youtility; Duran®) con un contenedor para 6 mL de NaOH (1 N) (Lamy *et al.*, 2013), y un cabezal OxiTop® (Anexo 1). Los respirómetros se incubaron (BD 115; Binder) (Alemania) en oscuridad a 30°C durante 10 d. El consumo de O<sub>2</sub> (mg kg<sup>-1</sup>) se determinó según la ley de los gases ideales (Ecuación 2) ya que en este sistema se utiliza un volumen conocido y temperatura constante que genera una presión negativa (Komilis *et al.*, 2010). Los datos de O<sub>2</sub> almacenados en los cabezales fueron transferidos al computador mediante el controlador OxiTop® OC 110.

$$\Delta p(O_2) = \frac{BOD}{\frac{M(O_2)}{R} * \left( \frac{V_t - V_l}{V_l} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right)} \quad (\text{Ec. 2})$$

<b>Donde</b>	BOD	Demanda biológica de oxígeno (mg L <sup>-1</sup> ). Dato medido por el cabezal OxiTop®.
	M (O <sub>2</sub> )	Masa molar del oxígeno (32,000 mg mol <sup>-1</sup> )
	R	Constante de los gases (83.144 L mbar mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
	T <sub>m</sub>	Temperatura del ensayo (K)
	T <sub>0</sub>	Temperatura de referencia (273.15 K)
	V <sub>t</sub>	Volumen de la botella (mL)
	V <sub>l</sub>	Volumen de la muestra (mL)
	α	Coefficiente de adsorción de Bunsen (0.03103)
	Δp (O <sub>2</sub> )	Diferencia de presión parcial (mbar)

#### **4.5. Experimentos de bioestimulación para la degradación de los lodos aceitosos pesados**

La adición de materiales de aporte, nutrientes (N, P) y surfactantes en la estimulación de los microorganismos degradadores, se evaluó en microcosmos bajo condiciones de laboratorio. Para esto, se utilizaron recipientes de vidrio (250 mL) que contenían 5 g de mezcla de material de aporte y lodos aceitosos pesados. Se determinó la concentración inicial de TPH de cada lote de lodos aceitosos pesados por gravimetría. Con estos datos se calculó la cantidad de muestra que se depositó en cada microcosmo según la concentración de TPH establecida para cada experimento.

El monitoreo de los TPH se realizó periódicamente sacrificando y analizando la unidad experimental completa. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado ( $n=3$ ), mezclando primero los lodos aceitosos pesados con agua (1:1 p/v) para facilitar su homogenización con el material de aporte y se incubaron a 30°C en oscuridad. Semanalmente, los microcosmos se mezclaron con un bajalenguas para facilitar la aireación por volteo y favorecer el metabolismo aerobio. De igual forma, en cada volteo se adicionó agua destilada para mantener el contenido de humedad (40 – 60%) a lo largo de los ensayos.

##### 4.5.1. Evaluación de diferentes materiales de aporte y nutrientes

Inicialmente, se evaluó el efecto de cuatro mezclas de materiales de aporte (Tabla 5) en la degradación de los lodos aceitosos pesados. Estos materiales de aporte fueron adicionados con el objetivo de aportar microorganismos nativos, nutrientes y mejorar la transferencia de tratamientos en los montajes. Los materiales de aporte utilizados en este ensayo fueron: suelo, cascarilla de arroz, estiércol de cerdo y raquis finamente picado (< 1 cm). El raquis es un residuo resultante de la trituración del racimo vacío de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) (S. H. Chang, 2014), y se encuentra de forma abundante en las cercanías de la planta de tratamiento El Recreo. Algunos de estos materiales de aporte han sido reportados previamente en la literatura para estimular la biodegradación de los lodos aceitosos (J. M. Ayotamuno *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2006).

Los lodos aceitosos pesados (lote 1) a 50,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub> se incorporaron a las mezclas de materiales de aporte (A1, A2, A3, A4) (Tabla 5). Para tratar de reducir la variación en la concentración inicial de TPH, cada microcosmo fue preparado individualmente con la cantidad de lodos aceitosos pesados y el material de aporte establecido por tratamiento. Los muestreos fueron realizados a los 0, 20, 40, 60, 90 y 120 d sacrificando 3 unidades experimentales de cada tratamiento en cada evento de muestreo. Los TPH se determinaron por gravimetría empleando el método 9071B (EPA, 1998).

**Tabla 5.** Composición de las mezclas de materiales de aporte evaluadas en el primer ensayo

Mezclas	Lodos (g)	Material de aporte (g)			
		Suelo	Raquis	Cascarilla de arroz	Estiércol de cerdo
A1	0.5	0.44	4.06	–	–
A2		0.44	2.03	–	2.03
A3		0.44	–	4.06	–
A4		0.44	–	2.03	2.03

Cada microcosmos contenía 5.0 g (n=3).

Posteriormente, se evaluaron siete mezclas de materiales de aporte (Tabla 6). Los materiales de aporte que se utilizaron fueron: suelo, abono orgánico, cascarilla de arroz, aserrín, césped, raquis, melaza, estiércol vacuno y biosólidos. Estos últimos fueron colectados del tratamiento primario de las aguas residuales de la planta El Salitre, Bogotá. Cada mezcla se homogenizó con los lodos aceitosos pesados (lote 1) a  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ . Los muestreos se realizaron a los 0, 40, 90 y 160 d sacrificando 3 unidades experimentales de cada tratamiento en cada evento de muestreo. Los TPH se determinaron por gravimetría empleando el método 9071B (EPA, 1998).

#### 4.5.2. Evaluación de la adición de surfactantes

Una vez evaluadas las diferentes mezclas de materiales de aporte y nutrientes, se evaluó el efecto del surfactante Tween 80 (Merck, Alemania) sobre la degradación de los HCs presentes en los lodos aceitosos pesados. Este surfactante no iónico fue seleccionado por ser económico y de menor toxicidad para los microorganismos que los surfactantes aniónicos y catiónicos (Cheng *et al.*, 2017). Cada mezcla de materiales de aporte (B2, B5, C1) se homogenizó con lodos aceitosos pesados (lote 2) a  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  (Tabla 7). Estas mezclas fueron seleccionadas por sus características contrastantes: 1) la mezcla B2 tiene una variedad de materiales de aporte que proporcionan un alto contenido de carbono orgánico, 2) la mezcla B5 está conformada por sub-productos agrícolas de bajo costo disponibles en el departamento de Meta y 3) la mezcla C1 tiene únicamente dos materiales de aporte con bajo contenido de carbono orgánico. El surfactante Tween 80 fue evaluado a dos concentraciones diferentes (0.5 y 1.0% v/p) en los tratamientos. Los muestreos se realizaron a los 0, 60 y 240 d sacrificando 3 unidades experimentales de cada tratamiento en cada evento de muestreo. Los TPH se determinaron por cromatografía empleando el método MADEP (MADEP, 2004).

**Tabla 6.** Composición de las mezclas de materiales de aporte y nutrientes para la degradación de los lodos aceitosos pesados

Mezclas	Lodos (g)	Materiales de aporte (g)								
		Suelo	Abono orgánico	Aserrín	Césped	Estiércol vacuno	Raquis	Cascarilla de arroz	Biosólidos	Melaza
B1		0.4	0.4	0.3	0.6	0.8	–	–	0.8	0.05
B2		0.4	0.4	0.3	0.3	1.0	–	–	1.0	0.05
B3		0.4	0.4	–	0.3	1.0	0.2	–	1.0	0.05
B4*	1.7	1.3	–	–	–	–	1.0	0.5	–	0.5
B5*		1.3	–	–	–	0.5	–	0.5	–	0.5
B6*		1.3	–	0.5	–	0.5	0.5	0.5	–	–
B7*		2.3	0.5	–	–	–	–	0.5	–	–

\*Adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a una relación C:N:P de 100:10:1.

La melaza se adicionó en solución.

Cada microcosmo contenía 5.0 g (n=3).

**Tabla 7.** Composición de los tratamientos con diferentes concentraciones de Tween 80 para la degradación de los lodos aceitosos pesados

Mezclas	Lodos (g)	Materiales de aporte (g)							
		Suelo	Abono orgánico	Aserrín	Césped	Estiércol vacuno	Cascarilla de arroz	Biosólidos	Melaza
B2		0.33	0.33	0.25	0.49	0.85	–	0.85	0.05
B5*	1.9	1.6	–	–	–	0.85	0.65	–	0.5
C1*		2.33	–	0.77	–	–	–	–	–

\*Adición de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a una relación C:N:P de 100:10:1.

La melaza se adicionó en solución.

Cada microcosmos contenía 5.0 g (n=3).

#### 4.5.3. Evaluación de diferentes concentraciones de TPH

A pesar de que a  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  se obtuvo el mayor consumo de  $\text{O}_2$  durante el ensayo de respirometría, no se observó una alta degradación de los lodos aceitosos pesados. Por tal razón, se decidió comparar la degradación de los lodos aceitosos pesados (lote 3) a dos concentraciones de TPH ( $60,000$  y  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ ). La concentración menor ( $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ ) ha sido reportada en ensayos de biodegradación de lodos aceitosos (Cerqueira *et al.*, 2014; Dörr de Quadros *et al.*, 2016). Para este ensayo, se utilizaron las mezclas de materiales de aporte (B2, B5, C1) empleadas en el numeral 4.5.2 (Tabla 8). Los muestreos se realizaron a los 0, 40 y 130 d sacrificando 3 unidades experimentales de cada tratamiento en cada evento de muestreo. Los TPH se determinaron por gravimetría empleando el método 9071B (EPA, 1998).

#### 4.5.4. Evaluación de diferentes lodos aceitosos

Se evaluó la biodegradación de diferentes lodos aceitosos de Colombia provenientes de los departamentos del Meta (lote 4), Putumayo, Huila y Arauca, con el objetivo de establecer la relación entre el origen de los lodos aceitosos y la biodegradación. Para esto, se utilizaron dos mezclas de materiales de aporte contrastantes (B2 y C1). La mezcla B2 por su variedad de materiales de aporte puede proporcionar un alto contenido de carbono orgánico mientras que la mezcla C1 tiene materiales de aporte de bajo costo (suelo y aserrín) que proporcionan un bajo contenido de carbono. Los lodos aceitosos pesados a  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  fueron homogenizados con las mezclas de materiales de aporte (B2 y C1). Se realizaron cinco eventos de muestreo (0, 30, 60, 90 y 120 d) para la determinación de los TPH por cromatografía empleando el método MADEP (MADEP, 2004). En cada evento de muestreo se sacrificaron 3 unidades experimentales de cada tratamiento. La caracterización de las fracciones SARA ( $n=2$ ) de cada una de las muestras de lodos aceitosos fue realizada por el laboratorio analítico externo Proasem S.A de acuerdo con los métodos D6560 y D2007.

#### 4.5.5. Monitoreo y ajuste del pH durante la degradación de los lodos aceitosos

Finalmente, después de evaluar la bioestimulación con materiales de aporte, nutrientes y surfactantes, se determinó si el pH podía afectar la degradación de los lodos aceitosos pesados.

Para monitorear el efecto del pH en la degradación de los lodos aceitosos pesados (lote 5), se utilizaron tres mezclas de materiales de aporte (B2, C1, D1) (Tabla 9). Las mezclas B2 y C1 fueron previamente evaluadas en el numeral 4.5.4. Además, se utilizó una nueva mezcla de materiales de aporte (D1) que contiene bagazo de caña de azúcar, la cual fue evaluada en trabajos de grado de pregrado realizados previamente en USBA (Galvis, 2019).

Cada mezcla de materiales de aporte con lodos aceitosos pesados se preparó a  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ . A diferencia de los ensayos anteriores, en este experimento, los microcosmos se realizaron en bandejas de aluminio ( $29.8 \times 23.8 \times 6.5 \text{ cm}$ ) con 900

g de mezcla. Para cada mezcla de materiales de aporte se realizó un control (n=3) sin adición de cal. Semanalmente los microcosmos fueron homogenizados con rastrillos para jardín de 15.24 cm (Truper®; México) para favorecer la aireación.

Durante el experimento se realizaron cinco eventos de muestreo (0, 15, 30, 60 y 90 d) para la determinación de los TPH por cromatografía empleando el método MADEP (MADEP, 2004). De cada tratamiento (n=3) se tomaron tres muestras compuestas (1 g) de diferentes puntos de cada microcosmo para el análisis de los TPH. Adicionalmente, en cada evento de muestreo se tomaron tres muestras compuestas (2 g) de cada tratamiento (n=3) para la determinación del pH. Para esto, se utilizó el método modificado D4972 (ASTM, 2019b) mezclando 2 g de muestra con 20 mL de agua tipo I. Posteriormente, las muestras se agitaron (200 rpm) durante 15 min y centrifugaron (10,000 rpm x 10 min) para evitar interferencias debido por la alta viscosidad de los lodos aceitosos pesados. Después de 1 h de reposo, el pH se midió en el sobrenadante utilizando una sonda multiparámetro (HI 9829; Hanna Instruments) (Italia). De acuerdo a los datos de pH obtenidos durante el ensayo, se adicionó cal (CaO) (Cales de Colombia S.A) (Colombia) a los microcosmos para mantener el pH en ~7.0.

**Tabla 8.** Composición de los tratamientos evaluados a 60,000 y 100,000 mg TPH kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>

Mezclas	Concentración (mg TPH kg <sup>-1</sup> <sub>ps</sub> )	Material de aporte (g)							
		Suelo	Abono orgánico	Aserrín	Césped	Estiércol vacuno	Cascarilla de arroz	Biosólidos	Melaza
B2	100,000	0.47	0.47	0.35	0.7	1.22	–	1.22	0.05
B5		2.29	–	–	–	1.21	0.94	–	0.5
C1		3.33	–	1.11	–	–	–	–	–
B2	60,000	0.50	0.50	0.37	0.74	1.29	–	1.29	0.05
B5		2.41	–	–	–	1.28	1.00	–	0.5
C1		3.52	–	1.17	–	–	–	–	–

La melaza se adicionó en solución.

Cada microcosmo contenía 5.0 g (n=3).

**Tabla 9.** Composición de los tratamientos evaluados en el ensayo para monitorear el pH

Mezclas	Lodos (g)	Enmiendas (g)							
		Suelo	Abono orgánico	Aserrín	Césped	Estiércol vacuno	Cascarilla de arroz	Biosólidos	Bagazo de caña de azúcar
B2	650	567	567	432	838	1,473	–	1,473	–
C1		4,010	–	1,340	–	–	–	–	–
D1		4,010	–	–	–	–	670	–	670

Cada microcosmo contenía 900 g (n=3).

#### **4.6. Experimentos de bioaumentación para la degradación de los lodos aceitosos pesados**

En la bioaumentación se inoculan microorganismos degradadores (nativos o externos) al sitio contaminado para mejorar la degradación del contaminante. Generalmente, la bioaumentación está acompañada de un proceso de bioestimulación (p.e., nutrientes) que proporciona los factores limitantes de la biodegradación.

Como se mencionó anteriormente, este trabajo de grado se desarrolló dentro del proyecto “Tratamiento de lodos aceitosos de la industria petrolera empleando biopilas” realizado por USBA y co-financiado por ATP Ingeniería SAS y Minciencias. Durante el desarrollo de este proyecto se realizaron diferentes trabajos de grado para evaluar la bioaumentación con bacterias y hongos potencialmente degradadores de HCs (Anexo 2).

En el presente estudio, se recopiló la información de dos trabajos de pregrado realizados en el proyecto (Tabla 10) (Galvis, 2019; Moscoso, 2018). Se analizaron los datos de cada uno de estos ensayos para determinar el efecto de la bioaumentación con bacterias y hongos en la degradación de los TPH presentes en los lodos aceitosos pesados.

Finalmente para completar esta sección, se realizó un tercer experimento adicional a los ensayos realizados por Moscoso (2018) y Galvis (2019) en el que se evaluó el efecto de la bioaumentación con el producto bacteriano comercial Biotiger™ (Tabla 13).



**Tabla 10.** Trabajos de grado de pregrado de bioaumentación realizados en el marco del proyecto investigación

Referencia	Título	Diseño experimental	Resultados
Moscoso (2018)	Evaluación de la bioaumentación empleando consorcios bacterianos en la degradación de borras aceitosas provenientes de la industria petrolera	<p>Mezcla de material de aporte C1 (suelo y aserrín).</p> <p>Tres tratamientos de bioaumentación con bacterias:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivo de enriquecimiento</li> <li>2. Consorcio de bacterias aisladas de lodos aceitosos pesados</li> <li>3. Consorcio de bacterias del cepario de USBA</li> </ol>	No se observaron diferencias en la degradación (%) de los TPH entre los tratamientos de bioaumentación con bacterias respecto a la bioestimulación
Galvis (2019)	Evaluación de la bioaumentación empleando consorcios de hongos y bacterias en la degradación de borras aceitosas	<p>Mezcla de material de aporte D1 (suelo, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar).</p> <p>Cinco tratamientos de bioaumentación con bacterias y hongos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivo de enriquecimiento</li> <li>2. Consorcio de bacterias</li> <li>3. Consorcio de hongos</li> <li>4. Consorcio del cultivo de enriquecimiento y hongos</li> <li>5. Consorcio de bacterias y hongos</li> </ol>	La inoculación del cultivo de enriquecimiento presentó la mayor degradación (67%) de los TPH a los 60 d del estudio. Esta degradación significativamente diferente a los demás tratamientos evaluados

#### 4.6.1. Evaluación del efecto de la adición de consorcios bacterianos

La degradación de los lodos aceitosos pesados empleando tres consorcios de bacterias fue evaluada por Moscoso (2018). Los consorcios bacterianos (E1, E2 y E3) fueron adicionados a la mezcla de material de aporte C1 (Tabla 11), la cual fue evaluada en algunos de los ensayos descritos en el numeral 4.5. Los microcosmos (n=3) se realizaron en bandejas de aluminio (15 x 7 x 7 cm), las cuales contenían lodos aceitosos pesados (lote 6) y la mezcla C1 a 50,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>. Se adicionaron sales inorgánicas (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a todos los tratamientos para mantener una proporción C:N:P de 100:10:1 ampliamente utilizada en la literatura para la degradación de HCs (Cerqueira *et al.*, 2014; De-Qing *et al.*, 2007; Kriipsalu *et al.*, 2007; Leys *et al.*, 2005; Obbard *et al.*, 2004; Roldán-Martín *et al.*, 2007; X. Wang *et al.*, 2012).

En cada evento de muestreo (0, 30 y 60 d) se colectaron tres muestras compuestas (1 g) de cada microcosmo para la determinación de los TPH por cromatografía empleando el método MADEP (MADEP, 2004). Semanalmente, los microcosmos fueron mezclados con un bajalenguas para favorecer la aireación.

**Tabla 11.** Tratamientos de bioaumentación con consorcios bacterianos

Mezcla	Tratamientos	Consorcios
Suelo (77 g) Aserrín (26 g) Lodos (27 g)	C1	Sin adición de bacterias
	E1	Cultivo de enriquecimiento
	E2	Bacterias del cepario de USBA (cepas: 96, 102, 107, 111, 116)
	E3	Bacterias aisladas de cultivos de enriquecimiento (cepas: 27, 201, 203, 400, 407)

Cada microcosmo contenía 130 g (n=3).

##### 4.6.1.1. Preparación de los inóculos

Para el inóculo E1, Moscoso (2018) realizó cultivos de enriquecimiento en medio Bushnell Hass (BH) (100 mL) (Anexo 3) con 2.5 g de lodos aceitosos pesados como inóculo y única fuente carbono. Los cultivos de enriquecimientos se incubaron a 30°C y agitación constante (150 rpm) durante 6 meses. Cada 15 d, se transfirió una alícuota (20 mL) a 80 mL de BH fresco con 2.5 g de lodos aceitosos pesados. Después de los 6 meses, el inóculo E1 fue una alícuota de 35 mL de un cultivo de enriquecimiento.

Los inóculos (E2 y E3) se prepararon cultivando las cepas, mantenidas bajo presión de selección con diésel, en caldo nutritivo (50 mL) a 150 rpm y 30°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, la biomasa de cada cepa fue colectada por centrifugación (10,000 rpm x 10 min), lavada con solución salina (0.85% p/v) y transferida a un recipiente estéril, en el cual se realizó la mezcla en volúmenes iguales de todas las cepas para obtener el inóculo (35 mL) a una concentración estimada de 3 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de acuerdo con el patrón No. 1 de McFarland.

#### 4.6.2. Evaluación del efecto de la adición de consorcios de bacterias y hongos

Teniendo en cuenta la versatilidad enzimática de los hongos y su capacidad para degradar HCs aromáticos de estructura compleja, Galvis (2019) evaluó la degradación de los lodos aceitosos pesados empleando consorcios de bacterias y hongos. Para estimular el crecimiento de los hongos, se utilizó la mezcla D1 que contiene bagazo de caña de azúcar (Dong *et al.*, 2013; Zafra *et al.*, 2017) y nutrientes (C:N:P de 100:10:1) (Tabla 12). Los lodos aceitosos pesados (lote 6) se homogenizaron con la mezcla D1 a 40,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>. Se adicionaron sales inorgánicas (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a todos los tratamientos para mantener una proporción C:N:P de 100:10:1 (Cerqueira *et al.*, 2014; De-Qing *et al.*, 2007; Kriipsalu *et al.*, 2007; Leys *et al.*, 2005; Obbard *et al.*, 2004; Roldán-Martín *et al.*, 2007; X. Wang *et al.*, 2012). En este ensayo, se realizó un muestreo compuesto (1 g) a los 0, 30 y 60 d para determinar los TPH por cromatografía empleando el método MADEP (MADEP, 2004).

**Tabla 12.** Tratamientos de bioaumentación con consorcios de bacterias y hongos

Mezcla	Tratamientos	Consortios
Suelo (40 g) Cascarilla de arroz (20 g) Bagazo de caña (20 g) Lodos (40 g)	D1	Sin adición de inóculo
	F1	Cultivo de enriquecimiento
	F2	Cepas bacterias: 96, 111, 116, 27, 305, 309, 401, 407
	F3	Cepas hongos: 36, 39, 54, 100 y 110
	F4	Mezcla F1 y F3
	F5	Mezcla F2 y F3

Cada microcosmo contenía 120 g (n=3).

##### 4.6.2.1. Preparación de los inóculos

Los inóculos F1 y F2 (10 mL) se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 4.6.1.1. Para el inóculo F3, se inocularon 15 discos (1 cm Ø) de agar papa dextrosa (PDA), con crecimiento activo del hongo, en 100 mL de caldo PD. Los cultivos se incubaron durante 15 d a 25°C y 120 rpm. La biomasa de cada hongo se colectó por centrifugación (10,000 rpm x 10 min) a temperatura ambiente (~22°C), se lavó con agua destilada estéril y se mezclaron en volúmenes iguales en una licuadora de laboratorio esterilizada (luz UV) (Ćilerdžić *et al.*, 2016).

Para el tratamiento F4, el inóculo se obtuvo combinando 5 mL del consorcio de hongos (F3) y 5 mL del cultivo de enriquecimiento (F1), mientras que para el tratamiento F5 el inóculo fue una mezcla de 5 mL del consorcio de hongos (F3) y 5 mL del consorcio bacteriano (F2).

#### 4.6.3. Evaluación del efecto de la adición de un producto bacteriano comercial

Finalmente, se evaluó el uso del producto comercial Biotiger™, desarrollado en el *River National Laboratory* del Departamento de Energía de los Estados Unidos, en la degradación de los lodos aceitosos pesados. Este producto está conformado por 12 bacterias aerobias capaces de metabolizar HCs, tolerar condiciones extremas (p.e., pH y temperatura) y toxicidad por metales pesados. Estas bacterias fueron aisladas de lodos aceitosos de una refinería de petróleo en Polonia (Brigmon *et al.*, 2016). De igual forma, se evaluó un consorcio de bacterias (27, 96, 111, 116, 305, 309, 401, 407) y hongos (36, 39, 54, 100) según los resultados obtenidos por Moscoso (2018) y Galvis (2019).

En este estudio, se utilizaron nuevas mezclas (G1, G2, G3, G4) con una mayor variedad de materiales de aporte (Tabla 13) para evaluar de forma simultánea la bioestimulación. Los Tratamientos de bioaumentación (H1 e I1) fueron inoculados con el consorcio mixto de bacterias y hongos y el producto Biotiger™, respectivamente (Tabla 13). La bioaumentación se realizó a los 0 y 60 d del ensayo para mantener altos recuentos de microorganismos degradadores de HCs durante el ensayo.

Se utilizaron recipientes de vidrio (250 mL) que contenían 5 g de mezcla de material de aporte y lodos aceitosos pesados (lote 7) a una concentración de 30,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>. El monitoreo de la concentración de TPH se realizó periódicamente (0, 30, 90 y 130 d) analizando la unidad experimental completa. Los TPH se determinaron por cromatografía usando el método MADEP (MADEP, 2004).

**Tabla 13.** Composición de los tratamientos de bioaumentación empleando Biotiger™ y consorcio de bacterias y hongos

Mezclas	G1	G2	G3	H1	G4	I1
Suelo	0.41	2.60	2.36	2.36	–	–
Cascarilla de arroz	0.07	–	0.08	0.08	1.62	1.62
Compost de raquis	0.49	–	0.11	0.11	0.02	0.02
Raquis	–	–	0.06	0.06	0.02	0.02
Aserrín	–	–	0.05	0.05	0.06	0.06
Forraje de maíz	–	–	0.05	0.05	0.97	0.97
Abono orgánico	g	0.41	–	–	–	–
Césped	0.15	–	–	–	–	–
Estiércol vacuno	1.11	–	–	–	–	–
Gallinaza	–	0.10	–	–	–	–
Melaza	0.06	–	–	–	–	–
Lodos	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Consortio de bacterias y hongos	μL	–	–	–	5.0	–
Producto Biotiger™	–	–	–	–	–	5.0

Cada microcosmo contenía 5.0 g (n=3).

#### 4.6.3.1. Preparación de los inóculos

- Tratamiento H1

Se seleccionaron 8 bacterias (27, 96, 111, 116, 305, 309, 401 y 407) degradadoras de HCs (Anexo 2), las cuales fueron previamente evaluadas en el marco del proyecto “Tratamiento de lodos aceitosos de la industria petrolera empleando biopilas”. Las cepas 27, 96, 111 y 116 presentaron el mayor crecimiento ( $DO_{600nm}$ ) en medio BH con naftaleno, antraceno, tolueno y diésel en el equipo Bioscreen C, mientras que las cepas 305, 309, 401 y 407 formaron zonas claras alrededor de las colonias (halos de degradación) en agar BH suplementado con pireno, fenantreno o antraceno.

Para este tratamiento de bioaumentación (H1), se realizó un consorcio de 8 bacterias y 1 cultivo de enriquecimiento realizado previamente por Moscoso (2018). Para realizar el consorcio cada bacteria se sembró en agar nutritivo para recuperar la mayor cantidad de biomasa. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la biomasa de cada cepa fue inoculada en un Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de caldo R2A (Anexo 4) y se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Posteriormente, la biomasa fue recuperada por centrifugación (10,000 rpm x 10 min), lavada tres veces con solución salina (0.85% p/v) y resuspendida en 2 mL de solución salina.

La biomasa de las 8 cepas y del cultivo de enriquecimiento se mezcló en un único recipiente y se ajustó a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> según el estándar No. 1 de McFarland y también, se ajustó a una  $DO_{600nm}$  de 1.5. Este inóculo de bacterias (5 µL) fue adicionado a las unidades experimentales al inicio del ensayo.

Para la segunda inoculación a los 60 d, se realizó un consorcio conformado por 4 hongos (36, 39, 54 y 100) y 1 cultivo de enriquecimiento. Para esto, se inocularon 5 discos (1 cm Ø) de agar papa dextrosa (PDA), con crecimiento activo del hongo, en caldo PD (20 mL). Los cultivos se incubaron en agitación (150 rpm) a 22°C durante 15 d. Transcurrido este periodo de tiempo, se recuperó la biomasa por centrifugación (10,000 rpm x 10 min), lavada tres veces y resuspendida en 2 mL de agua destilada estéril. Finalmente, la biomasa de los hongos y el cultivo de enriquecimiento se mezclaron en volúmenes iguales en una licuadora de laboratorio esterilizada (luz UV). Este inóculo (5 µL) fue adicionado a las unidades experimentales correspondientes a los 60 d del ensayo.

- Tratamiento I1

El producto Biotiger™ en caldo R2A fue enviado por el Dr. Robin Brigmon del *River National Laboratory* en un tubo Falcon de 50 mL a la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) y una vez recibido, fue conservado en glicerol (20% v/v) a -20°C por Moreno (2019).

Para la reactivación del cultivo, por recomendación del Dr. Brigmon, se descongeló el criovial y se realizó la siembra de 200 µL en 20 mL de caldo R2A. Este cultivo fue incubado en agitación (150 rpm) durante 24 h a 30°C. Al finalizar este periodo, la

biomasa se colectó por centrifugación (10,000 rpm x 10 min), se lavó tres veces con solución salina y se ajustó a una  $DO_{600nm}$  de 1.5.

Este procedimiento fue utilizado para producir el inóculo del tratamiento de bioaugmentación (I1) utilizado a los 0 y 60 d del ensayo.

#### **4.7. Análisis estadístico**

Se analizó la homogeneidad de varianzas con una prueba de Levene y la normalidad de los datos con una prueba Shapiro-wilk. Posteriormente, se realizó un análisis ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas y una prueba Tukey-Kramer para realizar la comparación entre tratamientos al final de cada experimento con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ). Este análisis estadístico se realizó utilizando SPSS v.22 (IBM Corp., Armonk, NY).

#### **4.8. Permiso Acceso a Recursos Genéticos**

Este trabajo fue realizado bajo del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 212 del 19 de julio de 2018, Otrosí No. 5 del 14 de agosto de 2019 (Resolución No. 1264).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización de los lodos aceitosos pesados

Durante el desarrollo de los experimentos de biodegradación, se utilizaron 7 lotes de lodos aceitosos pesados enviados por la empresa ATP Ingeniería. La concentración de TPH (n=3) de cada uno de los lotes fue determinada por gravimetría y GC-FID (Tabla 14). Se observaron diferencias en la concentración de TPH entre los lotes de lodos aceitosos pesados que fueron desde 193,530 a 1'889,170 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub> por gravimetría y 86,650 a 221,110 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub> por GC-FID. Una posible causa de las diferencias entre las concentraciones de TPH son los diversos orígenes y múltiples fuentes de generación de los lodos aceitosos (extracción, almacenamiento, transporte y refinación). Sin embargo, el contenido de TPH presente en los diferentes lotes de lodos aceitosos pesados fue similar a lo reportado en varios estudios (Jasmine & Mukherji, 2015; Jerez *et al.*, 2021; Koolivand *et al.*, 2017; Roldán-Carrillo *et al.*, 2012; X. Wang *et al.*, 2012).

La diferencia en la concentración de TPH entre los métodos de gravimetría y MADEP puede ser atribuida a la forma como son determinados los HCs en cada método. Mientras que por gravimetría se cuantifican todas las fracciones de HCs (ligeras y pesadas) presentes en los lodos aceitosos en el método de MADEP únicamente se determinan los HCs entre el C<sub>9</sub> – C<sub>36</sub>, lo cual excluye a los HCs más pesados. Los resultados sugieren que los TPH están dados por el método analítico que se utilice, ya que, el método de extracción fue el mismo en ambos casos. Es importante mencionar que, para determinar la biodegradación de los lodos aceitosos, en la literatura se ha reportado el uso de diferentes métodos analíticos como: gravimetría (Vasudevan & Rajaram, 2001), GC-FID (Cerqueira *et al.*, 2014; Kriipsalu & Nammari, 2010), GC-MS (Jerez *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2019) y SARA (Liu *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que no hay un método analítico de uso común para la cuantificación de la concentración de HCs durante los ensayos de biodegradación de los lodos aceitosos, lo cual dificulta la comparación de los porcentajes de degradación de los TPH.

**Tabla 14.** Concentración de TPH de los diferentes lotes de lodos aceitosos pesados utilizados en los ensayos de biodegradación

Lotes	Gravimetric			GC-FID		
	Método 9071B			Método MADEP		
	TPH (mg kg <sup>-1</sup> <sub>ps</sub> )	CV (%) <sup>a</sup>		TPH (mg kg <sup>-1</sup> <sub>ps</sub> )	CV (%) <sup>a</sup>	
1	265,439 (27,608)	10.4	–	–	–	–
2	176,733 (30,394)	17.2	115,292 (8,983)	7.8		
3	1'889,170 (379,250)	31.9	–	–	–	–
4	123,130 (25,820)	21.0	86,645 (12,499)	14.4		
5	292,228 (20,340)	6.9	221,107 (7,208)	7.3		
6	193,527 (15,530)	8.0	121,854 (7,015)	5.8		
7	202,600 (11,190)	5.5	99,562 (27,530)	27.7		

n=3

Los datos se presentan como la media (desviación estándar)

<sup>a</sup> CV: Coeficiente de variación

El análisis SARA fue realizado a 2 lotes de lodos aceitosos pesados (Tabla 15). En el lote 5 se encontró que las fracciones predominantes fueron los HCs saturados y las resinas (31.9% p/p), seguido de los HCs aromáticos (23.1% p/p) y en menor concentración los asfaltenos (13.2% p/p). En estos lodos aceitosos pesados, las resinas y asfaltenos estuvieron en los valores altos del rango de concentración (31.9 y 13.2%, respectivamente) (Hu *et al.*, 2013). Estas características limitan la biodegradación de los lodos aceitosos ya que estas fracciones de alto peso molecular son hidrofóbicas, recalcitrantes y responsables de la alta viscosidad del petróleo (Leon & Kumar, 2005; J. G. Speight & El-Gendy, 2018). Sumado a esto, las resinas y asfaltenos tienen estructuras complejas con diversos anillos aromáticos unidos por cadenas alifáticas o metales (como V, Ni, Fe, S), que afectan la disponibilidad para los microorganismos (Pineda-Flores & Mesta-Howard, 2001). En cuanto al lote 7, los HCs saturados se encontraron en mayor proporción (55.8% p/p), seguido de los aromáticos (21.6% p/p) y en menor concentración las resinas y asfaltenos (15.5 y 7.2% p/p, respectivamente) (Tabla 15). La fracción de HCs saturados, los cuales son de fácil degradación debido a sus estructuras sencillas, estuvo en el rango de concentración reportado por Hu y colaboradores (2013). De igual forma, las resinas en el lote 7 se encontraron en rango de concentración reportado (7 – 22.4% p/p) para los lodos aceitosos mientras que los HCs aromáticos y los asfaltenos estuvieron por debajo del rango de concentración (Hu *et al.*, 2013).

**Tabla 15.** Composición de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos de dos lotes de lodos aceitosos pesados

Fracciones de hidrocarburos		Lote 5 <sup>a</sup>	Lote 7 <sup>a</sup>
Saturados		31.9 (9.7)	55.8 (3.3)
Aromáticos		23.1 (8.4)	21.6 (3.6)
Resinas	% <sub>obs</sub>	31.9 (0.8)	15.5 (2.6)
Asfaltenos		13.2 (0.4)	7.2 (3.0)

<sup>a</sup> n=2

Los datos se presentan como la media (desviación estándar)

Al comparar las fracciones SARA de diferentes lodos aceitosos de Colombia, se encontró que los lodos aceitosos de Arauca presentaron el mayor contenido de HCs saturados (86% p/p) (Tabla 16), fracción de fácil biodegradación. Además, el contenido de las fracciones de HCs aromáticos, resinas y asfaltenos fue < 10% p/p. Por otra parte, en los lodos aceitosos del Meta y Putumayo se encontró un alto contenido de asfaltenos (10 y 12% p/p, respectivamente) (Tabla 16), los cuales se caracterizan por sus estructuras complejas, baja solubilidad y difícil degradación. En cuanto a los lodos aceitosos de Huila, se encontró que las fracciones de HCs predominantes son las resinas y saturados (43 y 38% p/p, respectivamente) (Tabla 16).



**Tabla 16.** Fracciones SARA de los lodos aceitosos provenientes de Meta, Arauca, Huila y Putumayo

Fracciones	Meta <sup>a</sup>	Arauca <sup>b</sup>	Huila <sup>b</sup>	Putumayo <sup>b</sup>
Saturados	43.8 (15.0)	86.4 (1.5)	38.4 (1.6)	45.7 (12.9)
Aromáticos	22.3 (5.4)	3.6 (1.1)	11.4 (2.3)	19.7 (0.6)
Resinas	23.7 (9.6)	7.9 (2.8)	43.5 (1.0)	22.2 (8.8)
Asfaltenos	10.2 (3.9)	2.2 (0.2)	6.7 (0.3)	12.6 (3.5)

Los datos se presentan como la media (desviación estándar)

<sup>a</sup> n=4

<sup>b</sup> n=2

Por otra parte, el Zn (1,086 mg kg<sup>-1</sup>) fue el metal más abundante de los lodos aceitosos pesados, seguido del S, Cd, As y Hg (Tabla 17). Las concentraciones de los metales (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Ag y Pb) estuvieron por debajo de los límites establecidos en la norma Louisiana 29B, la cual es utilizada en Colombia para autorizar la disposición final de los residuos petroleros que han sido previamente tratados. Sumado a lo anterior, las concentraciones de metales de los lodos aceitosos pesados fueron bajas con respecto a los otros estudios (Asgari *et al.*, 2017; Heidarzadeh *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2015; Koolivand *et al.*, 2017). Por lo tanto, la concentración de metales no fue considerado como un factor limitante en la biodegradación de los TPH.

**Tabla 17.** Metales medidos en los lodos aceitosos pesados

Metales	Presente estudio	Louisiana 29B
Arsénico	0.32 (0.37)	10
Azufre	5.69 (1.37)	–
Cadmio	0.67 (0.21)	10
Cromo	< 20	500
Mercurio	0.14 (0.27)	10
Niquel	< 40	–
Plata	< 10	200
Plomo	< 0.2	500
Zinc	1,086 (246)	500

Los datos presentados corresponden a 3 lotes de lodos aceitosos pesados (n=2)

La desviación estándar se presenta en paréntesis.

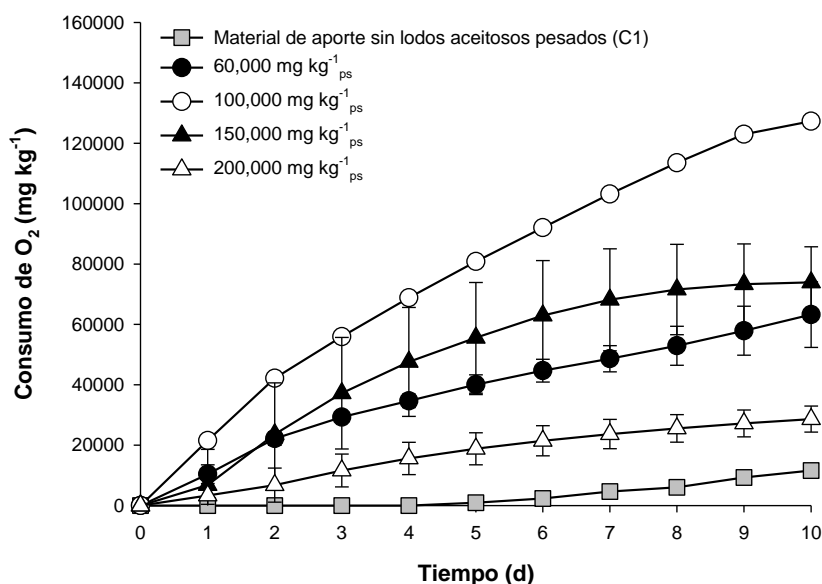
## 5.2. Determinación de la concentración inicial de lodos aceitosos pesados a emplear en los experimentos de biorremediación

Se cuantificó el consumo de O<sub>2</sub> en presencia de diferentes concentraciones de lodos aceitosos pesados (60,000, 100,000, 150,000 y 200,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) para determinar la concentración adecuada a emplear en los experimentos de biodegradación. Para esto, se utilizó la mezcla de material de aporte C1 (suelo y aserrín) durante un periodo de 10 d. Este tiempo fue seleccionado con base en estudios previos realizados en USBA (Ahumada & Gómez, 2009; García *et al.*, 2011).

Inicialmente la mezcla de material de aporte sin lodos aceitosos no mostró un consumo de O<sub>2</sub> durante los primeros 4 d; sin embargo, alcanzó el consumo máximo a los 10 d con un valor de  $11,602 \pm 2,128 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 2). Este consumo mínimo de O<sub>2</sub> puede ser atribuido a un bajo metabolismo de los microorganismos o por la incorporación de esta molécula en reacciones químicas.

El mayor consumo de O<sub>2</sub> ( $120,000 \pm 10,300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) al final del ensayo se observó con  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  de lodos aceitosos pesados (Figura 2). Por otra parte, en las concentraciones más altas de  $150,000$  y  $200,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  se observó un menor consumo de O<sub>2</sub>, lo cual puede ser atribuido a un efecto tóxico de los HCs sobre la actividad microbiana. A la menor concentración de  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  el consumo de O<sub>2</sub> incrementó durante los 10 d del ensayo y no se observó una fase estacionaria en el consumo de O<sub>2</sub>.

Por medio de la técnica de respirometría se cuantificó el consumo de O<sub>2</sub> como medida indirecta de la biodegradación de los HCs y, además, se determinó el efecto de los lodos aceitosos pesados en el metabolismo microbiano. Se observó que la presencia de los lodos aceitosos pesados aumentó el consumo de O<sub>2</sub> lo cual indica que probablemente el metabolismo microbiano fue favorecido por el carbono presente en estos residuos. El consumo de O<sub>2</sub> fue menor en las concentraciones más altas de TPH ( $150,000$  y  $200,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ ), lo cual puede estar relacionado con una inhibición de la respiración microbiana debido a un efecto tóxico de los lodos aceitosos pesados. Teniendo en cuenta lo anterior, la concentración de TPH de  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  fue utilizada para la mayoría de experimentos de biodegradación de los lodos aceitosos pesados. De hecho, esta es la concentración de TPH recomendada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento en biopilas (EPA, 1994). Sin embargo, debido a la baja degradación de los lodos aceitosos pesados, en algunos experimentos se evaluaron concentraciones de TPH menores ( $\leq 60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ ). Numerosos estudios han reportado altos porcentajes de degradación (50 – 80%) de los lodos aceitosos a concentraciones bajas de TPH ( $15,000$  –  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ ) (Abtahi *et al.*, 2020; Cerqueira *et al.*, 2014; Dörr de Quadros *et al.*, 2016; Kriipsalu & Nammari, 2010; Parhamfar *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el trabajo realizado por Ke y colaboradores (2021) se reportó una mayor eficiencia en la remoción de los TPH (96%) a una concentración inicial de  $25,000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Por el contrario, a una concentración inicial de  $200,000 \text{ mg kg}^{-1}$  la degradación de los TPH fue del 30% a los 84 d (Ke *et al.*, 2021).



**Figura 2.** Efecto de la concentración de lodos aceitosos pesados en el consumo de O<sub>2</sub>. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

### 5.3. Experimentos de bioestimulación para la degradación de los lodos aceitosos pesados

En los diferentes experimentos de biodegradación de los lodos aceitosos pesados se observó una alta variabilidad en la concentración de TPH al inicio de los ensayos y durante los eventos de muestreo. Esta alta variación pudo ser causada por la heterogeneidad y baja solubilidad de los lodos aceitosos pesados, errores de operario y la variabilidad analítica durante la extracción y cuantificación de los TPH por gravimetría y MADEP.

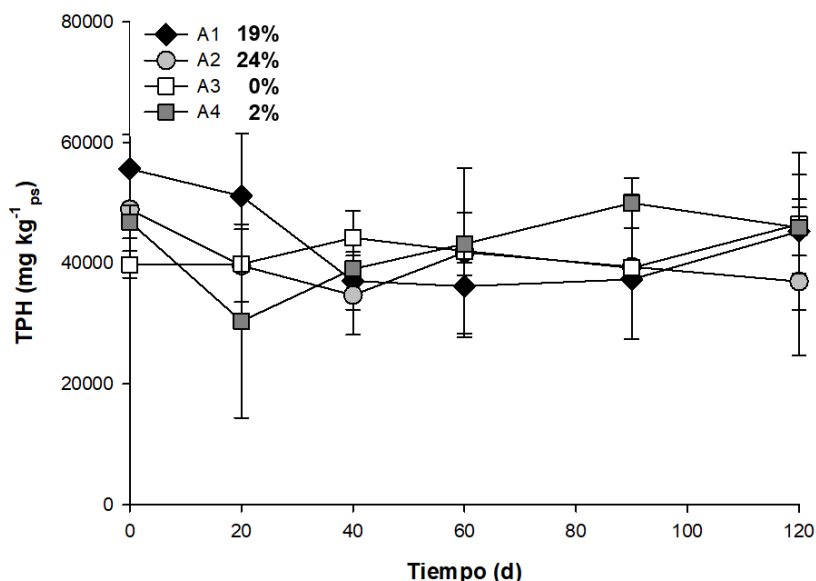
A continuación, se presentan los resultados de los experimentos de bioestimulación y posteriormente la discusión del bloque de resultados.

#### 5.3.1. Efecto de la adición de mezclas de materiales de aporte y nutrientes

En todas las mezclas se evidenció una alta variabilidad en la concentración de TPH a pesar de los esfuerzos de homogenización y muestreo (Figura 3). Al inicio del ensayo, la concentración de TPH varió entre 39,800 y 55,670 mg kg<sup>-1</sup>ps debido a que los lodos aceitosos pesados no son una matriz homogénea, lo que dificultó la obtención de la concentración inicial teórica (50,000 mg kg<sup>-1</sup>ps).

La mayor degradación de los lodos aceitosos pesados se presentó con las mezclas A1 y A2 a los 120 d. Interesantemente, estas mezclas (A1 y A2) contenían raquis como agente esponjante. En el caso de la mezcla A2 (raquis y estiércol de cerdo), los TPH disminuyeron de 48,900 a 37,000 mg kg<sup>-1</sup>ps en 120 d, obteniéndose la mayor degradación (24%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas mezclas al final del ensayo. La menor biodegradación de los lodos

aceitosos pesados se observó en la mezcla de material de aporte A4 que contenía cascarilla de arroz como material de aporte. Por otra parte, en la mezcla de material de aporte A3 no se observó degradación de los lodos aceitosos a los 120 d del ensayo (Figura 3).



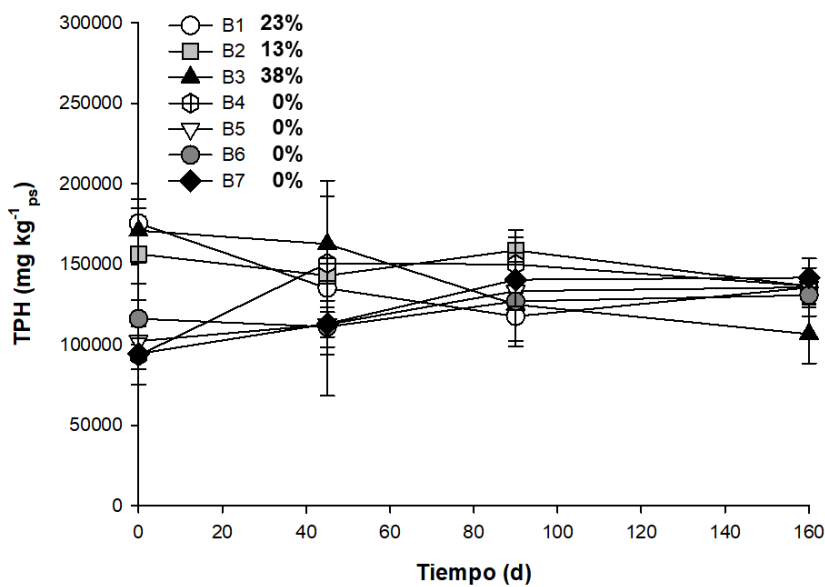
**Figura 3.** Degradación de los lodos aceitosos pesados en el primer ensayo con cuatro mezclas de materiales de aporte y nutrientes. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. A1: suelo y raquis; A2: suelo, raquis y estiércol de cerdo; A3: suelo y cascarilla de arroz; A4: suelo, cascarilla de arroz y estiércol de cerdo.

Teniendo en cuenta la baja degradación de los lodos aceitosos pesados obtenida en el ensayo anterior, se decidió evaluar un mayor número de mezclas de materiales de aporte y nutrientes. La concentración inicial de los TPH fue altamente variable (93,300 – 170,960 mg kg<sup>-1</sup>ps), probablemente debido a interferencias en la determinación analítica a causa de la materia orgánica presente en algunas mezclas de materiales de aporte (p.e., B1, B2, B3) (Figura 4). Además, es importante mencionar que la mayoría de sustratos seleccionados como materiales de aporte (p.e., raquis) contienen aceites de origen vegetal o animal que pueden ser recuperados durante la extracción con diclorometano y acetona. Estas fluctuaciones en los valores de TPH puede ser consecuencia de la liberación de compuestos del material de aporte que serán cuantificados como TPH, por procesos de adsorción y desorción de los HCs a la materia orgánica o por las diferentes tasas de degradación de los TPH (Kriipsalu *et al.*, 2007).

Bajo las condiciones de este ensayo, se observó una baja degradación de los lodos aceitosos pesados (0 – 38%) a los 160 d. La mezcla B3 (suelo, abono orgánico, césped, estiércol vacuno, raquis, biosólidos y melaza) presentó la mayor

degradación (38%) de los TPH al final del experimento, con una reducción de la concentración de 170,960 a 106,650 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>. En contraste, las mezclas con materiales de aporte disponibles en el departamento del Meta (B4 – B7), no presentaron degradación de los lodos aceitosos durante los 160 d. Estas mezclas (B4 – B7) tenían en común la presencia de suelo y cascarilla de arroz como materiales de aporte.

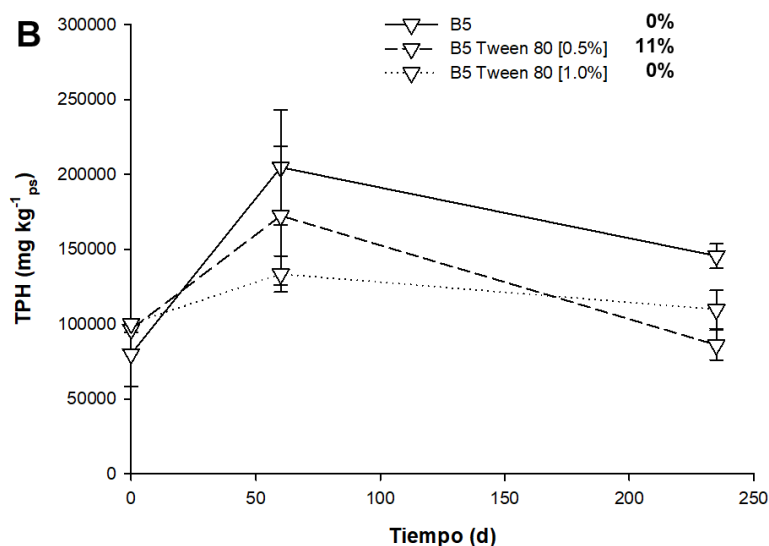
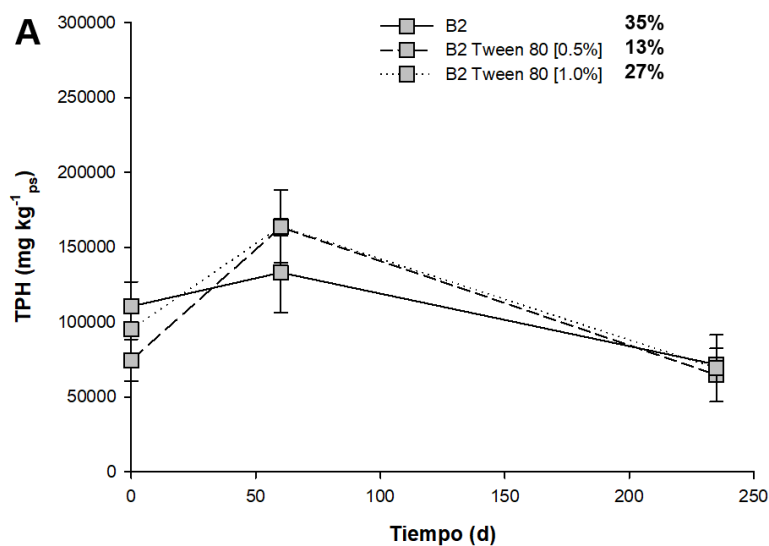
Para continuar con los siguientes ensayos de degradación de los lodos aceitosos pesados se seleccionaron dos mezclas de materiales de aporte contrastantes (B2 y B5). La mezcla B2 (suelo, abono orgánico, aserrín, césped, estiércol vacuno, biosólidos y melaza) contiene una amplia variedad de materiales de aporte que pueden proporcionar un alto contenido de carbono orgánico que favorezca el cometabolismo de los HCs. En cuanto a la mezcla B5 (suelo, estiércol vacuno, cascarilla de arroz, melaza y nutrientes inorgánicos), está compuesta por materiales de aporte, subproductos agrícolas de bajo costo, de fácil acceso a la planta El Recreo. Adicionalmente, se propuso evaluar la mezcla (C1) compuesta de suelo, aserrín y nutrientes inorgánicos con bajo contenido de carbono orgánico.

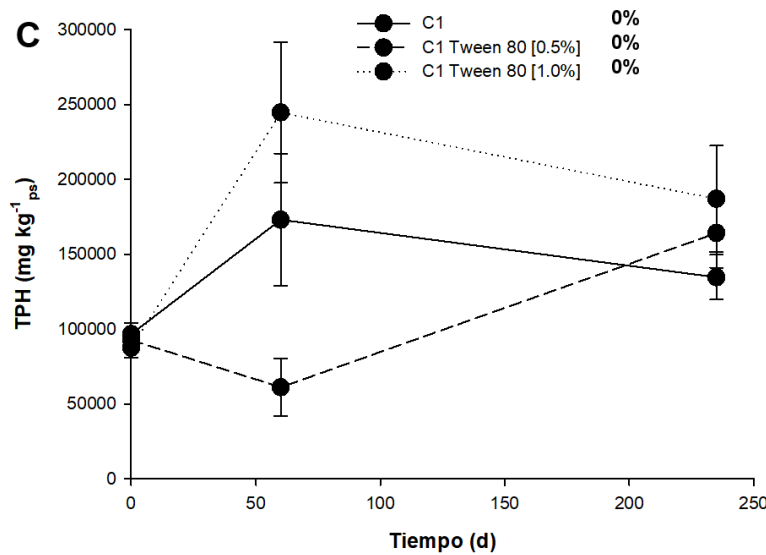


**Figura 4.** Degradación de los lodos aceitosos pesados en el segundo ensayo con siete mezclas de materiales de aporte y nutrientes. La degradación de los TPH (%) se presenta al lado de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. B1: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; B2: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; B3: suelo, abono, césped, estiércol, raquis, biosólidos y melaza; B4: suelo, raquis, cascarilla de arroz, melaza y nutrientes; B5: suelo, estiércol, cascarilla de arroz, melaza y nutrientes; B6: suelo, aserrín, estiércol, raquis, cascarilla de arroz y nutrientes; B7: suelo, abono, cascarilla de arroz y nutrientes.

### 5.3.2. Efecto de la adición del surfactante Tween 80

Para mejorar la biodisponibilidad de los HCs presentes en los lodos aceitosos pesados, se evaluó el efecto del surfactante Tween 80 utilizando tres mezclas de materiales de aporte (B2, B5, C1). No se observó que la adición del surfactante mejorará la biodegradación de los TPH, incluso la mayor disminución de la concentración se presentó en la mezcla B2 (35%) sin adición de Tween 80 a los 240 d (Figura 5A). Interesantemente, esta mezcla mostró una degradación del 13 y 27% con la adición de Tween 80 (0.5 y 1.0%, respectivamente) (Figura 5B y Figura 5C). En el segundo muestreo (60 d) se presentó un aumento abrupto en la concentración de TPH de todas las mezclas evaluadas, lo cual puede ser atribuido a la degradación de moléculas complejas que enriquecen los HCs entre el rango C<sub>9</sub> a C<sub>36</sub> del método MADEP. En cuanto a la mezcla C1, no se observó degradación de los lodos aceitosos pesado bajo ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 5).



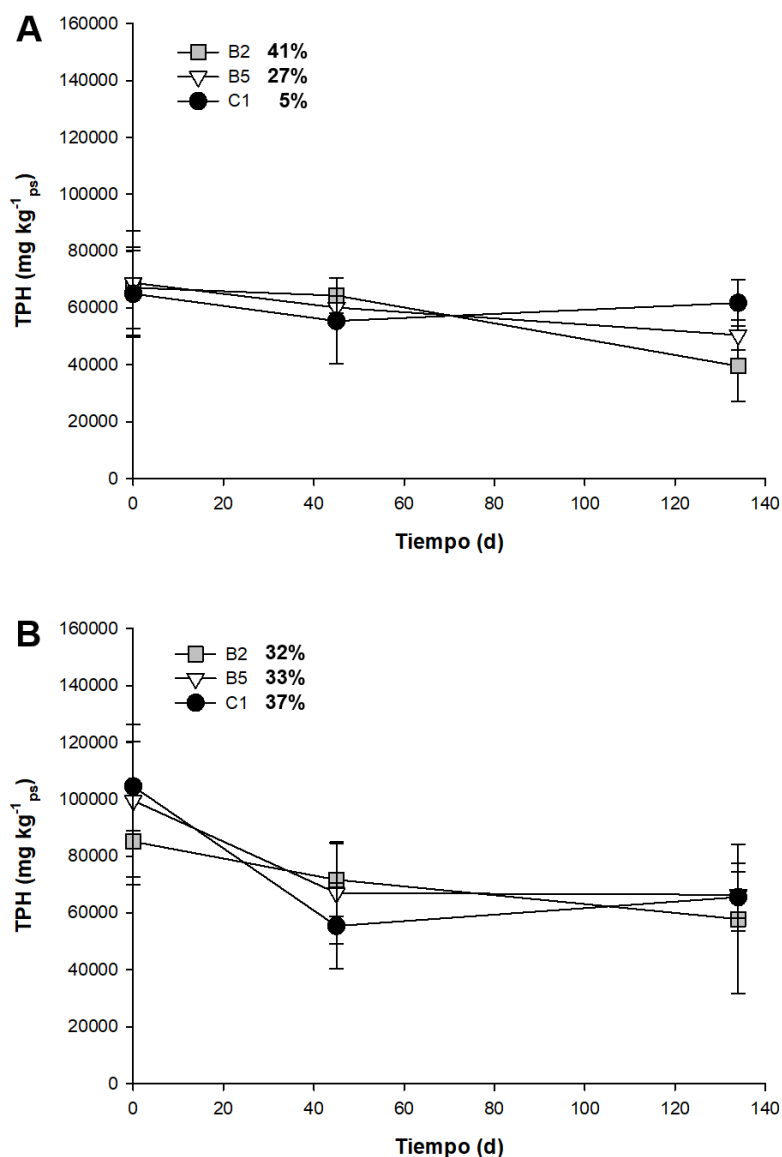


**Figura 5.** Degradación de los lodos aceitosos pesados con mezclas de materiales de aporte, nutrientes y surfactante. **A)** mezcla B2, **B)** mezcla B5 y **C)** mezcla C1. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. B2: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; B5: suelo, estiércol, cascarilla de arroz y melaza; C1: suelo, aserrín y nutrientes.

### 5.3.3. Efecto de la concentración de lodos aceitosos pesados

Una vez evaluadas las diferentes aproximaciones de bioestimulación (mezclas de material de aporte, nutrientes y surfactante), se decidió comparar la degradación de dos concentraciones de lodos aceitosos pesados (60,000 y 100,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) contrastantes usando las mezclas de materiales de aporte seleccionadas (B2, B5, C1).

En cuanto a la menor concentración de lodos aceitosos pesados (60,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>), la biodegradación varió entre el 5 y 41% según la mezcla de material de aporte (Figura 6A). La mayor degradación de los TPH se presentó en la mezcla B2 (41%) a los 130 d del ensayo, con una reducción de la concentración de 60,000 a 39,500 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>. En contraste, la mezcla C1 presentó la menor degradación de los TPH con un porcentaje de 5% al final del experimento. Para la concentración mayor (100,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>), la biodegradación de los TPH en todas las mezclas se encontró entre el 32 y 37% después de 130 d (Figura 6B). La mayor degradación (37%) de los lodos aceitosos pesados a la concentración de 100,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub> se observó en la mezcla C1. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al final del experimento.



**Figura 6.** Degradación de los lodos aceitosos pesados a diferentes concentraciones de TPH. **A)**  $60,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ , **B)**  $100,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ . La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. B2: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; B5: suelo, estiércol, cascarilla de arroz y melaza; C1: suelo, aserrín y nutrientes.

#### 5.3.4. Efecto del origen de los lodos aceitosos en la degradación

Los lodos aceitosos pesados del Meta presentaron una baja degradación (2%) en la mezcla de material de aporte B2, con una disminución de la concentración de TPH del  $64,140$  a  $62,880 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$  (Figura 7A). Esta degradación de los lodos aceitosos pesados fue consistente con lo observado en los experimentos anteriores, posiblemente por el alto contenido de resinas (23.7%) y asfaltenos (10.2%) (Tabla



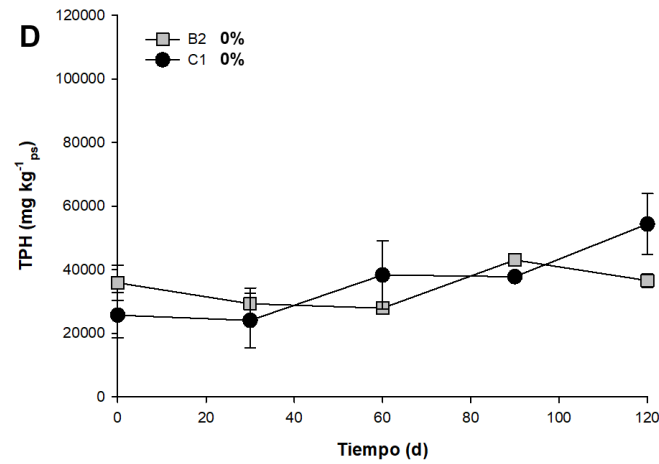
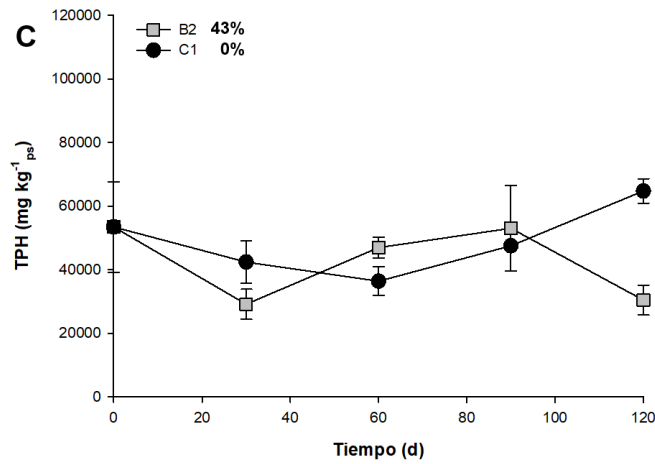
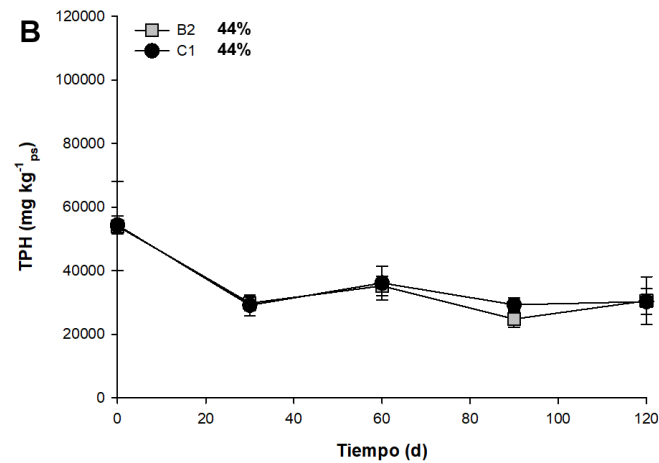
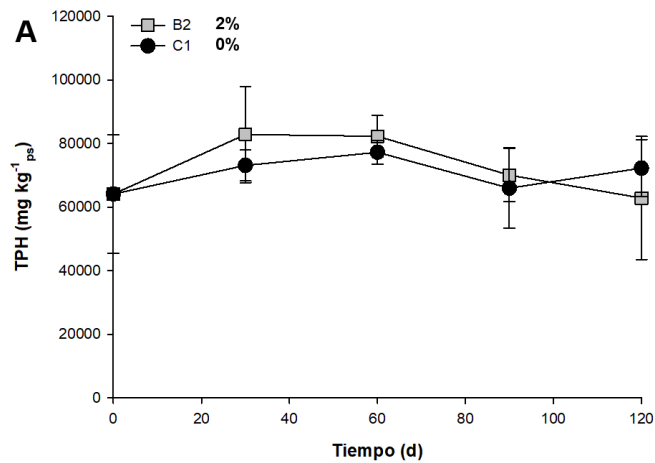
16). Este alto contenido de las fracciones más pesadas y de difícil degradación en los lodos del Meta, puede ser atribuido al origen del crudo pesado disponible en esta región y al preprocesamiento (centrifugación) realizado por la empresa ATP. En este departamento se encuentran importantes campos petroleros de crudo pesado como Chichimene, Castilla y Rubiales que se caracterizan por su baja gravedad API (18.4, 12.1, 12.9, respectivamente). Además de lo anterior, la fracción sólida resultante de la centrifugación puede tener HCs de mayor peso molecular concentrados debido a que se retira el agua y el aceite que se recupera posiblemente tiene HCs livianos.

De los 4 lodos aceitosos evaluados, los lodos aceitosos provenientes de Arauca presentaron una degradación del 44% en ambas mezclas de materiales de aporte (B2 y C1) a los 120 d (Figura 7B). La degradación de los lodos aceitosos de Arauca se observó principalmente durante los primeros 30 d. Estos resultados, sumados al hecho de que los HCs saturados son los más abundantes (86.4%) (Tabla 16) en estos lodos, sugieren que la composición de los HCs influyen en la degradación de los lodos aceitosos pesados. Si bien, los HCs saturados son de fácil degradación debido a sus enlaces sencillos y estructuras simples, posiblemente no se observó una degradación mayor de los lodos aceitosos de Arauca debido a la distribución de estos HCs, predominando posiblemente alifáticos de cadena larga o cicloparafinas. Otra posible razón por la cual se observó una degradación constante en este tipo de lodos puede estar relacionada con el tipo de crudo presente en el departamento de Arauca. En esta región se encuentra el campo petrolero Caño Limón, del cual se extrae crudo medio con una gravedad API de 28.6 (Malagón, 2016).

Por otra parte, los lodos aceitosos provenientes de Huila presentaron una degradación del 43% en la mezcla de material de aporte B2, con una disminución de la concentración de TPH del 53,420 a 30,420 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub> a los 120 d (Figura 7C). Sin embargo, con la mezcla de material de aporte C1 no se observó degradación de los lodos aceitosos de Huila (Figura 7C). Interesantemente, estos lodos presentaron un alto contenido de resinas (43.5%) según el análisis SARA (Tabla 16). Si bien esta fracción es considerada como recalcitrante a la biodegradación se ha descrito que alteraciones químicas e isotópicas en las resinas pueden hacerlas susceptibles a la degradación por parte de los microorganismos (Liao *et al.*, 2009). Este alto contenido de resinas puede estar relacionado con el hecho de que en el departamento de Huila se producen crudos medios a pesados (Malagón, 2016).

Finalmente, no se observó degradación de los lodos aceitosos de Putumayo en ninguna de las mezclas de material de aporte evaluadas (B2 y C1) (Figura 7D). A diferencia de los ensayos con lodos aceitosos de Meta, Arauca y Huila, se observó que la concentración inicial de TPH fue inferior (35,870 y 25,670 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) a la concentración teórica calculada para este experimento (60,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>). Es probable que la diferencia en la concentración inicial de TPH de los tratamientos se deba a un error en la cuantificación de los TPH de los lodos aceitosos de Putumayo. En cuanto a las fracciones SARA, las resinas y asfaltenos estuvieron en el rango de concentración alta (22.2 y 12.6%, respectivamente) reportado para los lodos aceitosos (Hu *et al.*, 2013). A diferencia de los lodos aceitosos de Meta y Huila, el

contenido de HCs saturados fue mayor (45.7%) debido posiblemente al tipo de crudo (medio) que se extrae en este departamento (Malagón, 2016).

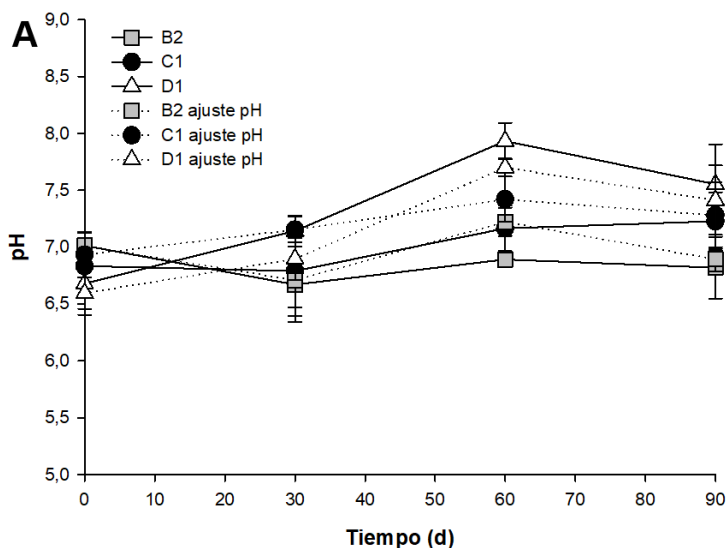


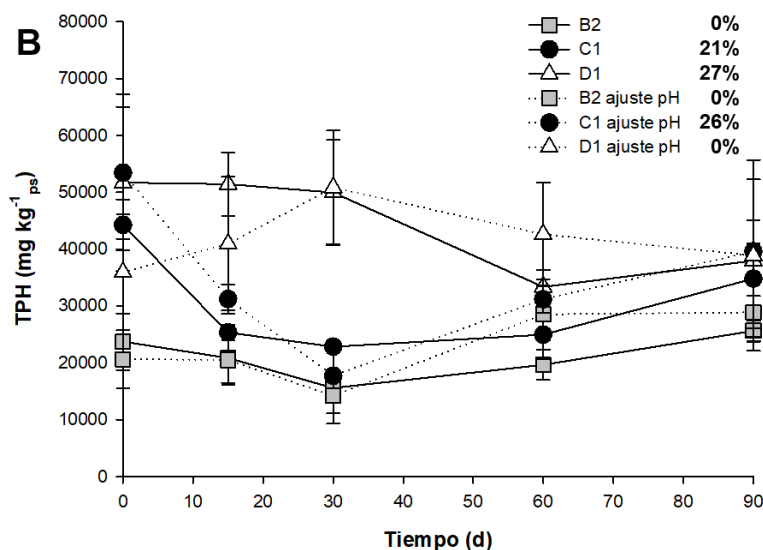
**Figura 7.** Degradación de lodos aceitosos provenientes de diferentes departamentos de Colombia. **A)** Meta, **B)** Arauca, **C)** Huila y **D)** Putumayo. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. B2: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; C1: suelo, aserrín y nutrientes.

### 5.3.5. Ajuste del pH durante la degradación de los lodos aceitosos

Una vez realizadas las diferentes aproximaciones de bioestimulación, se realizó el monitoreo del pH durante la degradación de los lodos aceitosos pesados. Al inicio y al final del experimento, los valores de pH oscilaron entre 6.59 a 7.01 y 6.82 a 7.55, respectivamente. A los 15 d del ensayo, se adicionó cal (CaO) a las mezclas B2 (1.0 g), C1 (1.0 g) y D1 (0.1 g) con ajuste de pH para mantener este parámetro en ~ 7.0 (Figura 8A). Las fluctuaciones de pH en la mezcla B2 y C1 durante el experimento estuvieron en un rango bajo (6.67 – 7.22 y 6.84 – 7.42, respectivamente), lo que sugiere que no se presentaron cambios extremos de pH bajo las condiciones evaluadas. En cuanto a la mezcla D1, el pH aumentó desde 6.64 a 7.82 a los 60 d y posteriormente, en el último evento de muestreo (90 d) disminuyó 7.48.

En este experimento, se observó una alta variabilidad en la concentración inicial de TPH de los tratamientos (Figura 8B). Esto pudo ser causado por la naturaleza del contaminante (NAPL del inglés *non-aqueous phase liquid*) que favorece la formación de “bolsillos de contaminación” en las mezclas de materiales de aporte y al tipo de muestreo (compuesto). Se obtuvo una baja degradación de los lodos aceitosos pesados que varió entre 0 – 27% a los 120 d del ensayo. Con la mezcla de material de aporte C1 se observó degradación de los TPH en el control (21%) y en el tratamiento con ajuste de pH (26%) al final del experimento. En el caso de la mezcla de material de aporte D1, la degradación de los TPH (27%) se presentó únicamente en el control. Por el contrario, no se observó degradación de los TPH en el control y el tratamiento con ajuste de pH de la mezcla de material de aporte B2 (Figura 8B). Interesantemente, en esta mezcla (B2) la concentración inicial de TPH fue baja (~ 22,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>) con respecto a la concentración teórica planteada para este ensayo (60,000 mg kg<sup>-1</sup><sub>ps</sub>).





**Figura 8.** Degradación de los lodos aceitosos pesados durante el monitoreo del pH. **A)** pH y **B)** concentración de TPH. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada mezcla de material de aporte. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. B2: suelo, abono, aserrín, césped, estiércol, biosólidos y melaza; C1: suelo, aserrín y nutrientes; D1: suelo, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar.

#### 5.4. Discusión de los resultados de bioestimulación

La estrategia de bioestimulación fue utilizada para acelerar la degradación de los lodos aceitosos pesados bajo las condiciones descritas en el numeral 4.5. En todos los experimentos de bioestimulación se observó una alta variabilidad en la concentración de TPH, lo cual es atribuido a la naturaleza y heterogeneidad de los lodos aceitosos pesados. Otra posible razón es la complejidad del proceso de mezcla entre los lodos aceitosos pesados y el material de aporte, ya que físicamente los lodos aceitosos son una emulsión estable en agua de difícil homogenización y baja solubilidad (Hu *et al.*, 2013), afectando negativamente la distribución de los HCs en el material de aporte.

En el presente estudio, las primeras aproximaciones de bioestimulación empleando mezclas de materiales de aporte y diferentes concentraciones iniciales de TPH (Figura 3 y Figura 4), mostraron una baja degradación de los TPH (38%). En el mejor de nuestro conocimiento, algunas de las mezclas de materiales de aporte no han sido evaluadas previamente en la literatura. En contraste, estudios previos han reportado una alta biodegradación de lodos aceitosos (sin ningún preprocesamiento) a concentraciones similares de TPH (50,000 – 100,000 mg kg<sup>-1</sup>) (Asgari *et al.*, 2017; Dörr de Quadros *et al.*, 2016; X. Wang *et al.*, 2012). Por ejemplo, Wang y colaboradores (2012) encontraron que el uso de tallos de algodón como material de aporte favoreció la biodegradación de los TPH (50%) a una concentración inicial de 58,000 mg kg<sup>-1</sup> en un periodo de 220 d. Posteriormente,

Cerqueira y colaboradores (2014) reportaron que la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y suelo (material de aporte) favoreció la remoción de los TPH (77 – 79%) presentes en los lodos aceitosos (60,000 mg kg<sup>-1</sup>) a los 90 d. De forma similar, Dörr de Quadros y colaboradores (2016) reportaron una disminución de los HCs alifáticos y aromáticos (30 – 100%) a la misma concentración inicial de TPH (60,000 mg kg<sup>-1</sup>) y empleando un tratamiento de bioestimulación con suelo y nutrientes. Interesantemente, en estos últimos reportes se utilizó suelo proveniente de celdas de biolabranza, las cuales recibieron lodos aceitosos durante 30 años, que contribuyen con la presencia y diversidad de microorganismos degradadores nativos, tolerantes a los lodos aceitosos y relevantes para el proceso de biodegradación (Cerqueira *et al.*, 2014; Dörr de Quadros *et al.*, 2016). Por otro lado, Asgari y colaboradores (2017) observaron que la bioestimulación con compost favoreció la degradación de los TPH en un 72% a los 70 d, con una concentración inicial de 104,000 mg kg<sup>-1</sup>. Aunque en este estudio se evaluaron concentraciones de TPH similares, es importante mencionar que los lodos aceitosos pesados presentaron un alto contenido de resinas y asfaltenos que lo hacen más recalcitrante a la biodegradación (Hernández-López *et al.*, 2015; Leon & Kumar, 2005). De hecho, en otros estudios de biodegradación de los lodos aceitosos con concentraciones de TPH más altas (> 170,000 mg kg<sup>-1</sup>) y materiales de aporte como estiércol y residuos de jardín, la remoción de los TPH después de 360 d ha variado entre el 58 – 93% (Tabla 18) (Aguelmous *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2010).

Con respecto a los estudios de bioestimulación en la degradación de los lodos aceitosos (Tabla 18), la degradación obtenida en esta investigación fue menor a lo reportado por otros autores que utilizaron material de aporte para mejorar la porosidad, estructura y aireación de los tratamientos y así, favorecer la utilización de los lodos aceitosos como fuente de carbono por parte de los microorganismos degradadores nativos. Además, en este estudio se incluyó el uso de materiales de aporte con alta carga microbiana (p.e., estiércol y biosólidos) para evitar bajos recuentos de microorganismos heterótrofos y degradadores de HCs. Sin embargo, es importante mencionar que los lodos aceitosos utilizados en otros estudios provienen de países con reservas de crudo ligero o medio (p.e., Iran, Suecia, Marruecos) con gravedad API > 25.

Las diferencias en la biodegradación de los lodos aceitosos reportados en la literatura con respecto a las encontradas en el presente estudio pueden ser atribuidas a: 1) el origen geográfico (fracciones SARA distintas) y la etapa de procesamiento del petróleo del cual provienen los lodos, 2) toxicidad por altas concentraciones de TPH y 3) al método analítico utilizado para determinar los TPH.

**Tabla 18.** Degradación de los TPH presentes en los lodos aceitosos empleando bioestimulación y bioaumentación

Tratamiento	TPH inicial (mg kg <sup>-1</sup> )	Degradación (%)	Tiempo (d)	Referencia
<b>Bioestimulación</b>				
Compost de residuos de cocina	13,000	74	370	(Kriipsalu <i>et al.</i> , 2007)
Compost con residuos de jardín	15,000	69	370	(Kriipsalu & Nammari, 2010)
Estiércol con paja de arroz	240,500	58	360	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Gallinaza y aserrín	64,500	47	84	(J. M. Ayotamuno <i>et al.</i> , 2010)
Tallos de algodón	58,000	50	220	(X. Wang <i>et al.</i> , 2012)
Suelo y adición de sales inorgánicas	60,000	77	90	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2014)
Suelo y adición de sales inorgánicas	60,000	30 -100	90	(Dörr de Quadros <i>et al.</i> , 2016)
Compost y adición de sales inorgánicas	104,000	72	70	(Asgari <i>et al.</i> , 2017)
Residuos de jardín (césped y hojas)	170,600	94	360	(Aguelmous <i>et al.</i> , 2020)
<b>Bioaumentación</b>				
Nutrientes y adición de un consorcio bacteriano	143,800	75	120	(Roy <i>et al.</i> , 2018)
Compost comercial e inoculación de bacterias	20,000	61 - 89	112	(Parhamfar <i>et al.</i> , 2020)
Compost comercial y adición de un consorcio bacteriano	20,000	84	84	(Abtahi <i>et al.</i> , 2020)
Compost e inoculación de una bacteria	20,000	82	112	(Poorsoleiman <i>et al.</i> , 2020)
Compost, inoculación de un consorcio bacteriano y lombrices de tierra	20,000	85	84	(Koolivand <i>et al.</i> , 2020)

La tabla se organizó de acuerdo con la estrategia de biorremediación y el año de publicación.

Por otra parte, la mezcla de materiales de aporte B2, con alto contenido orgánico, presentó una degradación consistente de los TPH en los diferentes experimentos de bioestimulación (Figura 4 – Figura 7). Esto sugiere que un alto contenido de materia orgánica sostiene el crecimiento de los microorganismos y contribuye con la relación de nutrientes (p.e., nitrógeno) y los procesos de cometabolismo de los HCs. La mezcla B2 con materiales de aporte fácilmente biodegradables (p.e., aserrín, césped) y posiblemente, con fuentes de materia orgánica, fue utilizada para simular un tratamiento de compostaje. Numerosos estudios de biorremediación de lodos aceitosos han evaluado el compostaje, especialmente en reactores, como una tecnología eficiente para la remoción de los TPH (Abtahi *et al.*, 2020; Asgari *et al.*, 2017; Atagana, 2014; J. M. Ayotamuno *et al.*, 2010; Vasudevan & Rajaram, 2001). Sin embargo, se ha reportado que mezclas con una relación > 1:10 entre los lodos aceitosos y material de aporte, reduce la eficiencia de degradación de los TPH (Asgari *et al.*, 2017). Con respecto a esto, en el presente estudio la relación de lodos aceitosos pesados y los materiales de aporte se mantuvo por debajo de 1:8 para evitar que el material de aporte interfiriera con la degradación de los compuestos orgánicos y los HCs.

En algunos experimentos se observó que la mayor biodegradación de los TPH se presentó durante los primeros 30 d (Figura 6B, Figura 7B, Figura 10). Este resultado es interesante debido a que otros autores han reportados que durante este periodo de tiempo ocurre la biodegradación de los HCs sencillos, específicamente alifáticos saturados, los cuales son utilizados como fuente de carbono y energía por los microorganismos para su crecimiento (Aguelmous *et al.*, 2019; Asgari *et al.*, 2017). Después de esta etapa de rápida degradación, la disminución de los TPH se ralentiza debido a la presencia de HCs de mayor peso molecular y complejidad estructural (Asgari *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, sería interesante evaluar en futuros trabajos no solo la biodegradación de los TPH sino también el comportamiento de las fracciones SARA durante la biorremediación de los lodos aceitosos pesados.

Posteriormente, para mejorar la biodisponibilidad de los HCs presentes en los lodos aceitosos pesados se adicionó un surfactante comercial a las mezclas de materiales de aporte. Sin embargo, no se observó una biodegradación significativa (27%) con respecto al control sin Tween 80 (35%) (Figura 5). De forma similar, Trejos (2017) encontró que la adición de Tween 80 no mejoró significativamente la remoción de los TPH de un suelo contaminado con petróleo con respecto a la bioestimulación con nutrientes. A pesar de estos, los resultados contrastan con estudios previos donde se ha obtenido una disminución significativa de los TPH (29 – 56%) presentes en suelos contaminados en un corto periodo de tiempo cuando se adicionaron surfactantes (Tween 80, ramnolípidos y dodecil sulfato de sodio) en experimentos de biodegradación en cultivos líquidos y de microcosmos (De La Cueva *et al.*, 2016; Khayati & Barati, 2017; Rong *et al.*, 2021; R. Xu *et al.*, 2018). La absorción del Tween 80 al suelo parece ser la principal causa asociada a una reducción de la efectividad del surfactante ya que se ha demostrado que no tiene efectos tóxicos para los microorganismos (Cheng *et al.*, 2017).



Finalmente, se monitoreó y controló el pH durante un experimento de bioestimulación para establecer si este parámetro fisicoquímico estaba afectando el metabolismo microbiano. Sin embargo, no se observaron cambios extremos en el pH en las mezclas de materiales de aporte evaluadas (Figura 8), manteniéndose en un rango neutro (6.5 – 7.8) óptimo para el crecimiento de los microorganismos (M. J. Ayotamuno *et al.*, 2007; Poorsoleiman *et al.*, 2020). De forma similar, M. J. Ayotamuno y colaboradores (2007) reportaron que durante el periodo de biorremediación de los lodos aceitosos (42 d) empleando biorreactores, el pH aumentó de 6.5 – 6.8 hasta 7.7 – 7.8 indicando que los nutrientes y el O<sub>2</sub> no se encontraron en exceso. La baja degradación de los lodos aceitosos pesados ( $\leq 27\%$ ) en este ensayo (Figura 8) puede estar relacionada con el hecho de que el pH no disminuyó durante los 120 d del ensayo, lo cual sugiere que no se produjeron ácidos orgánicos como resultado de la descomposición de los HCs (Alotaibi *et al.*, 2018).

Según los resultados de degradación de los TPH y pH observados en este estudio, este parámetro fisicoquímico no fue considerado como un factor limitante en la biodegradación de los lodos aceitosos pesados.

## **5.5. Experimentos de bioaumentación para la degradación de los lodos aceitosos pesados**

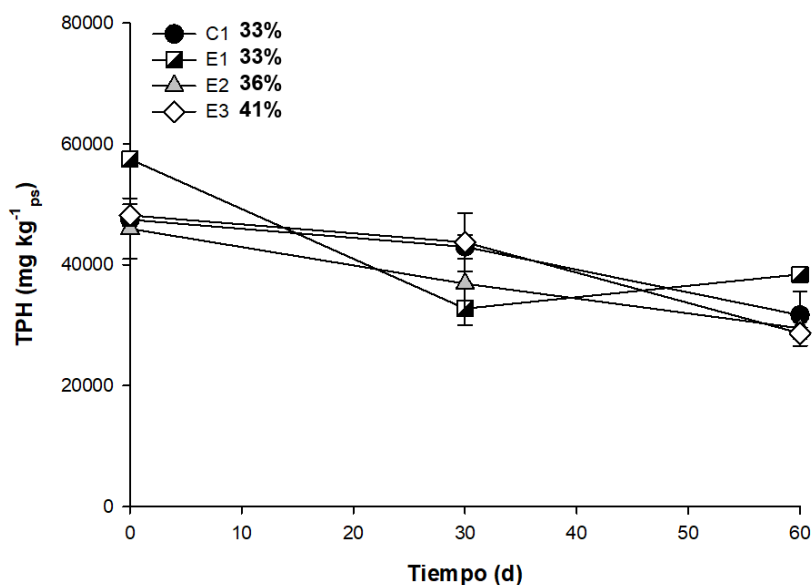
Después de las diferentes aproximaciones de bioestimulación (material de aporte, nutrientes, surfactante, pH y diferentes concentraciones de TPH) empleadas para acelerar la degradación de los lodos aceitosos pesados, se evaluó la capacidad de consorcios de bacterias y hongos degradadores de HCs y el producto comercial Biotiger™ para mejorar la biorremediación.

Al igual que en el numeral 5.3, se realizará la presentación de los resultados de los experimentos de bioaumentación y posteriormente, la discusión de los hallazgos obtenidos.

### **5.5.1. Efecto de la adición de consorcios bacterianos**

Debido a la baja degradación de los lodos aceitosos pesados en los ensayos de bioestimulación, Moscoso (2018) evaluó la estrategia de bioaumentación durante 60 d utilizando tres consorcios bacterianos. En este trabajo de grado, se recopilaron y revisaron los datos de TPH obtenidos en este ensayo. La biodegradación de los lodos aceitosos pesados varió entre el 33 y 41% según el tratamiento (Figura 9). La mayor degradación (41%) se presentó en el tratamiento de bioaumentación con el consorcio de bacterias (E3) previamente aisladas y seleccionadas (Anexo 2) en el marco del proyecto “Tratamiento de lodos aceitosos de la industria petrolera empleando biopilas”. En cuanto a la degradación de los TPH con los demás tratamientos de bioaumentación (E1 y E2), esta fue del 33 y 36%, respectivamente. Sin embargo, la bioaumentación con los diferentes consorcios bacterianos (E1, E2, E3), no mejoró significativamente la degradación de los lodos aceitosos pesados con respecto al control de bioestimulación (C1) (Figura 9). Interesantemente, esta

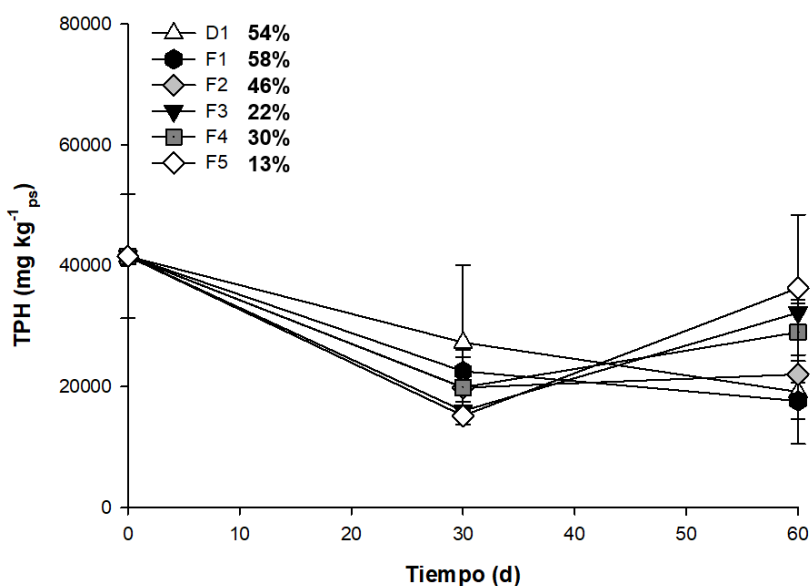
mezcla de bioestimulación (C1) mostró una degradación similar solo en un ensayo previo (Figura 6B).



**Figura 9.** Degradación de los lodos aceitosos pesados por consorcios de bacterias. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de seis réplicas.

### 5.5.2. Efecto de la adición de consorcios de bacterias y hongos

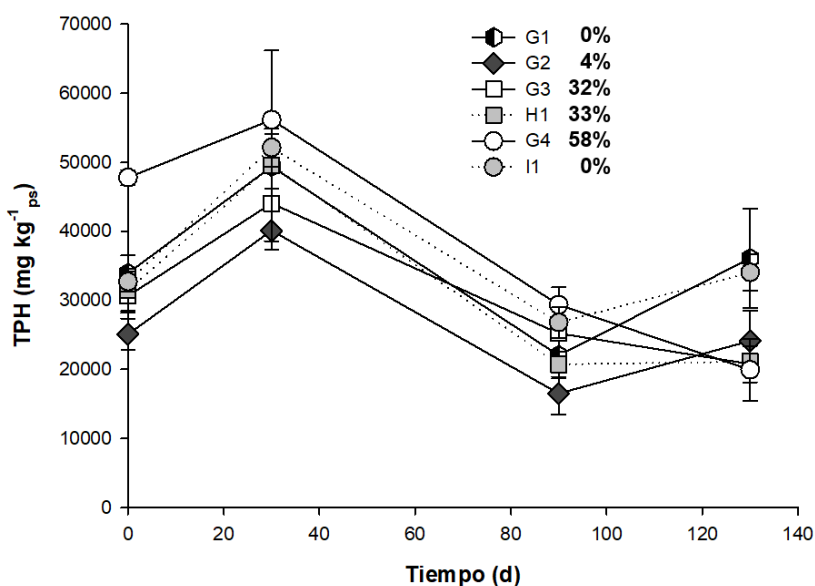
Debido a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, Galvis (2019) evaluó la bioaumentación utilizando consorcios de bacterias y hongos durante 60 d. A  $40,000 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{ps}}$ , la biodegradación de los lodos aceitosos pesados varió entre 13 y 58% según el tratamiento (Figura 10). La mayor degradación de los TPH (58%) se observó en el tratamiento F1 a los 60 d del ensayo. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento F1 y el control de bioestimulación (D1), lo que indica que ninguno de los tratamientos de bioaumentación mejoró significativamente la degradación de los lodos aceitosos pesados. Al igual que en otros ensayos, se observó una alta variabilidad en la concentración de TPH durante el experimento, debido posiblemente a la heterogeneidad y naturaleza de los lodos aceitosos pesados.



**Figura 10.** Degradación de los lodos aceitosos pesados por consorcios de bacterias y hongos. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de seis réplicas.

### 5.5.3. Efecto de la adición del cultivo comercial Biotiger™

Finalmente, se evaluó la bioaumentación de los lodos aceitosos pesados utilizando un producto comercial patentado (Biotiger™) (I1) y un consorcio de bacterias y hongos (H1). La mayor degradación de los lodos aceitosos pesados se presentó en el tratamiento de bioestimulación G4 (58%), el cual contenía la mezcla de materiales de aporte utilizada para el tratamiento I1 que fue inoculado con el producto Biotiger™. A pesar de los reportes de efectividad en la degradación de HCs de este consorcio patentado de 12 bacterias, en este ensayo no se observó degradación a los 130 d (Figura 11). Interesantemente, la mezcla G4 está conformada básicamente por cascarilla de arroz, sustrato que posiblemente estaba interfiriendo con la degradación de los TPH en otras mezclas evaluadas. Por otra parte, el tratamiento de bioaumentación con bacterias y hongos (H1), previamente seleccionados en el proyecto macro, presentó una degradación de los TPH del 33% al final del ensayo. Sin embargo, respecto a su control de bioestimulación (G3), la degradación de los lodos aceitosos pesados no fue significativa. En cuanto a los tratamientos de bioestimulación G1 y G2 la degradación de los TPH fue  $\leq 4\%$  a los 130 d (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la adición del Biotiger™ en la degradación de los lodos aceitosos pesados. La degradación (%) de los TPH se presenta al lado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

## 5.6. Discusión de los resultados de bioaumentación

Para mejorar la degradación de los lodos aceitosos obtenida por bioestimulación, se ha utilizado exitosamente la bioaumentación, especialmente con bacterias (Masy *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2018; N. Xu *et al.*, 2013). En el presente estudio, la adición del cultivo de enriquecimiento (F1) mejoró la degradación de los HCs presentes en los lodos aceitosos pesados en un 58% a los 60 d del ensayo (Figura 10). A pesar de la alta biodegradación obtenida en este tratamiento (F1), este resultado no fue consistente con lo obtenido en el tratamiento E1 evaluado en el primer ensayo de bioaumentación (Figura 9), lo que implica que la inoculación de consorcios de microorganismos degradadores no siempre mejora la degradación de los lodos aceitosos pesados con respecto a la bioestimulación. En un estudio realizado por Koolivand y colaboradores (2020) utilizando compost como material de aporte y un consorcio de bacterias, se obtuvo una degradación de los TPH ( $20,000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) del 81% a los 84 d. Así mismo, Abtahi y colaboradores (2020) encontraron que la inoculación de un consorcio de bacterias aumentó la degradación de los lodos aceitosos ( $20,000 \text{ mg TPH kg}^{-1}$ ) en un 84% con respecto al tratamiento de bioestimulación con material de aporte (compost) (36%) al final del ensayo (84 d). Sumado a lo anterior, se reportó que la bioaumentación con bacterias (consorcio de 8 cepas de *Bacillus* sp.) mejora significativamente la degradación de los TPH (75%) con respecto a la bioestimulación con adición de nutrientes (N, P) a los 120 d (Roy *et al.*, 2018). Sin embargo, es importante mencionar que en el estudio de Roy y colaboradores (2018) la degradación de los lodos aceitosos se obtuvo a una concentración inicial de TPH mayor ( $143,800 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a la utilizada en el presente trabajo y sin adición de ningún material de aporte. En contraste a nuestro

estudio, en el trabajo de Roy y colaboradores (2018) los lodos aceitosos que se utilizaron provenían de una refinería en Mumbai (India), donde el petróleo crudo es de tipo medio o ligero ya que tiene una gravedad API de 25 a 32 (Mahto & Kumar, 2013; Mandal *et al.*, 2019). Como se ha mencionado anteriormente, el origen de los lodos aceitosos es un factor que afecta la degradación de los TPH por parte de los microorganismos. Similar a nuestros resultados, Ma y colaboradores (2016) reportaron degradación de los TPH (39,600 mg kg<sup>-1</sup>) del 56% a los 90 d en biopilas, con adición de aserrín como material de aporte y un consorcio de 2 bacterias degradadoras de HCs. Interesantemente, en otros estudios se ha reportado que la adición de bacterias no ha mejorado significativamente la degradación de los lodos aceitosos con respecto a la bioestimulación con nutrientes (Cerqueira *et al.*, 2014).

De las bacterias aisladas en el marco del proyecto, se seleccionaron 10 cepas en función de su crecimiento en presencia de algunos HCs (naftaleno, antraceno y diésel) y por su capacidad para formar halos transparentes alrededor de las colonias en medio sólido con PAHs (fenantreno, antraceno y pireno) (Anexo 2). La mayoría de bacterias seleccionadas tienen la capacidad de crecer en diésel, lo cual indica que posiblemente utilizan los HCs fácilmente degradables (alcanos) como fuente de carbono y energía. Se ha reportado que en sistemas como la biolabranza con material de aporte (compost y lodos) la remoción de los TPH de bajo peso molecular (alifáticos de cadena lineal) presentes en el diésel fue > 78% a los 175 d (S. Y. Wang *et al.*, 2016). La mayoría de las bacterias utilizadas en los experimentos de bioaumentación fueron *Pseudomonas* (4), *Stenotrophomonas* (2) y *Sphingobium* (2), las cuales han sido previamente descritas en estudios de biodegradación con lodos aceitosos (Dörr de Quadros *et al.*, 2016; S. Wang *et al.*, 2016; Zafra *et al.*, 2014). Dörr de Quadros y colaboradores (2016) reportaron que las familias *Pseudomonadaceae* y *Shingomonadaceae* se encontraron en mayor abundancia en los tratamientos de bioestimulación con aireación mecánica, ajuste de pH y humedad. Estas familias bacterianas han sido descritas como degradadoras de HCs alifáticos y aromáticos (Sarkar *et al.*, 2017), compuestos de mayor abundancia en los lodos aceitosos. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Cerqueira y colaboradores (2011) reportaron que la cepa *Stenotrophomonas acidaminiphila* fue capaz de degradar en un 92 y 33% (40 d) las fracciones de HCs saturados y aromáticos de los lodos aceitosos, respectivamente. De forma similar, Sarkar y colaboradores (2017) encontraron que el 46% de las bacterias aisladas de los lodos aceitosos pertenecían al género *Pseudomonas*, lo cual fue atribuido a su amplia capacidad metabólica para crecer bajo condiciones de pH (3 – 9), temperatura (5 – 40°C) y salinidad extrema. Sin embargo, estas cepas de *Pseudomonas* mostraron preferencia por los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y no utilizaron los PAHs como fuente de carbono (Sarkar *et al.*, 2017). Estos resultados contrastan con el crecimiento de las cepas 13, 26 y 27 en antraceno (50 y 250 mg L<sup>-1</sup>) (Buitrago & Torres, 2016) y la formación de halo alrededor de las colonias de la cepa 305 en fenantreno y pireno (250 mg L<sup>-1</sup>) (Benavides & Calvo, 2017), todas identificadas como *Pseudomonas* en el marco del proyecto “Tratamiento de lodos aceitosos de la industria petrolera empleando biopilas” (Anexo 2).

Si bien en muchos estudios se ha reportado el aislamiento de bacterias a partir de cultivos de enriquecimiento con lodos aceitosos para su posterior uso en la bioaumentación (Cerqueira *et al.*, 2011), poco se ha informado sobre la recuperación de hongos a partir de este residuo. El uso de hongos resulta ser una estrategia prometedora debido a su amplia capacidad enzimática e inespecífica que facilita la ruptura de estructuras complejas y sustratos recalcitrantes (Vasco *et al.*, 2011). Además, su capacidad para crecer durante la implementación de la bioestimulación y ser utilizados en consorcios mixtos con bacterias, ha sido documentada y podría contribuir con la degradación de los TPH y PAHs (Vasco *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2019).

Sin embargo, en nuestro estudio no se observó que los consorcios bacterianos mejoraran significativamente la degradación de los TPH con respecto a la bioestimulación. Esto se puede deber a que, en los estudios reportados, se evaluó primero la degradación de los lodos aceitosos en medio líquido por cada una de las bacterias aisladas, para conformar un consorcio capaz de mineralizar los TPH (Ke *et al.*, 2021). También pueden estar relacionado con las interacciones bacterianas de tipo competitivo entre los microorganismos nativos (lodos aceitosos pesados y material de aporte) y los microorganismos externos (consorcio) por la fuente de carbono. Teniendo en cuenta que los lodos aceitosos son una mezcla compleja de HCs, los consorcios de microorganismos utilizados para la bioaumentación deben tener un amplio rango de capacidades enzimáticas y metabólicas que favorezcan la degradación de las diferentes fracciones de HCs (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos). En este sentido, sería interesante evaluar en futuros trabajos los cambios (degradación o enriquecimiento) de cada una de las fracciones de HCs y así, establecer la eficiencia de remoción de los HCs por parte de los microorganismos.

Por otra parte, la adición del producto Biotiger™ (I1) no mejoró la degradación de los lodos aceitosos pesados durante los 130 d del ensayo (Figura 11). Si bien, es un consorcio de 12 bacterias adaptadas a condiciones desfavorables y extremas características de los lodos aceitosos, es posible que las interacciones competitivas (fuente de carbono o nutrientes) entre los microorganismos nativos y las bacterias presentes en el Biotiger™ inhibiera totalmente la degradación de los TPH. Aún más, en el control de bioestimulación (G4) del tratamiento de Biotiger™ se observó una degradación del 58%, lo que sugiere que esta mezcla de material de aporte no solo mejoró la porosidad y estructura del tratamiento, sino que también favoreció el crecimiento y metabolismo activo de microorganismos degradadores nativos. Sin embargo, según lo reportado en otros estudios (Brigmon *et al.*, 2016; Moreno, 2019), el uso de este producto para la degradación de los lodos aceitosos pesados puede ser prometedor si se identifica que factor está limitando la biodegradación.

## 6. CONCLUSIONES

Los lodos aceitosos pesados obtenidos después de la centrifugación de lodos aceitosos provenientes de crudo pesado fueron parcialmente degradados (~58%) empleando las estrategias de bioestimulación y bioaumentación. La biodegradación de los lodos aceitosos pesados se observó con la disminución de los picos de los cromatogramas, en el aumento del consumo de O<sub>2</sub> de los tratamientos con lodos y en los porcentajes de biodegradación que variaron entre 2 – 58% en los diferentes experimentos. A pesar de la adición de materiales de aporte y nutrientes, el surfactante Tween 80, el ajuste del pH y la inoculación de consorcios de bacterias, hongos y el producto Biotiger™, la biodegradación de los lodos aceitosos pesados pudo ser limitado por: la naturaleza del contaminante, acumulación de fracciones recalcitrantes (resinas y asfaltenos) y subproductos, las altas concentraciones de TPH evaluadas o los cortos periodos de tiempo de los ensayos de biodegradación (≤ 240 d).

Bajo las aproximaciones de bioestimulación evaluadas (mezclas de materiales de aporte, nutrientes, surfactantes y ajuste del pH) y las condiciones empleadas, no se logró alcanzar una degradación > 58% de los lodos aceitosos pesados, lo cual fue insuficiente para alcanzar los niveles exigidos (< 1%<sub>ops</sub>) por regulación en Colombia para la disposición final de estos residuos. La mezcla de material de aporte B2, la cual contenía una variedad de sustratos orgánicos, mostró una degradación consistente de los TPH en los diferentes experimentos. Por otra parte, llama la atención que la adición de consorcios de bacterias y hongos y el producto Biotiger™ no permitió alcanzar mayores degradaciones de los lodos aceitosos pesados con respecto a la bioestimulación.

Con respecto a los lodos aceitosos de Arauca, se evidenció que el alto contenido de resinas y asfaltenos de los lodos aceitosos pesados, provenientes del Meta, tienen un efecto negativo (reflejado en los porcentajes de degradación de los TPH) en los microorganismos con capacidad para degradar los HCs. Lo anterior, sugiere que para los lodos aceitosos pesados, es necesario realizar un pre-tratamiento fisicoquímico seguido del tratamiento biológico.

## 7. RECOMENDACIONES

Análisis fisicoquímicos más amplios y detallados ayudarían a establecer qué tratamiento realizar para la degradación de los lodos aceitosos pesados a niveles regulatorios para Colombia. En este sentido, la determinación de biomarcadores (p.e., pristano) en los lodos aceitosos permitiría establecer indicadores de biodegradación.

Concentrar los esfuerzos en la evaluación de una variable detalladamente para evitar la complejidad en la interpretación de los resultados.

Monitorear el comportamiento de las fracciones de HCs (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) durante la degradación de los lodos aceitosos pesados bajo condiciones de laboratorio.

Evaluar la toxicidad de los lodos aceitosos pesados durante los ensayos de biorremediación para establecer si las concentraciones de TPH inhiben el metabolismo microbiano durante la degradación de los lodos aceitosos pesados.

Ensayos que combinen un pre-tratamiento fisicoquímico (p.e., oxidación química) para mejorar la eliminación de los HCs y así reducir la toxicidad de los lodos aceitosos pesados antes del tratamiento biológico.

Ensayos de biodegradación de los lodos aceitosos pesados empleando biorreactores para poder controlar continuamente los factores fisicoquímicos que pueden limitar la degradación de los HCs. Si bien, esta tecnología de biorremediación implica altos costos de operación, ha mostrado altos porcentajes de degradación de los TPH.



## 8. REFERENCIAS

- Abtahi, H., Parhamfar, M., Saeedi, R., Villaseñor, J., Sartaj, M., Kumar, V., Coulon, F., Parhamfar, M., Didehdar, M., Hamed seifi, & Koolivand, A. (2020). Effect of competition between petroleum-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms on the efficiency of petroleum sludge bioremediation: Field application of mineral-based culture in the composting process. *Journal of Environmental Management*, 258, 110013. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110013>
- Aguelmous, A., El Fels, L., Souabi, S., Zamama, M., & Hafidi, M. (2019). The fate of total petroleum hydrocarbons during oily sludge composting: a critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09509-w>
- Aguelmous, A., Zegzouti, Y., Khadra, A., El Fels, L., Souabi, S., & Hafidi, M. (2020). Landfilling and composting efficiency to reduce genotoxic effect of petroleum sludge. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101047. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101047>
- Ahmad, M. I., Zhang, N., & Jobson, M. (2011). Molecular components-based representation of petroleum fractions. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(4), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.07.016>
- Ahumada, M., & Gómez, R. (2009). Evaluación y elección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría [Pontificia Universidad Javeriana]. In *Journal of Human Development*. [http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/development/the-world-economy\\_9789264022621-en#.WQjA\\_1Xyu70%23page3%0Ahttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1191273%0Ahttps://greatergood.berkeley.edu/images/application\\_uploads/Diener-Subje](http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/development/the-world-economy_9789264022621-en#.WQjA_1Xyu70%23page3%0Ahttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1191273%0Ahttps://greatergood.berkeley.edu/images/application_uploads/Diener-Subje)
- Alotaibi, H. S., Usman, A. R., Abduljabbar, A. S., Ok, Y. S., Al-Faraj, A. I., Sallam, A. S., & Al-Wabel, M. I. (2018). Carbon mineralization and biochemical effects of short-term wheat straw in crude oil contaminated sandy soil. *Applied Geochemistry*, 88, 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2017.02.017>
- Asgari, A., Nabizadeh, R., Mahvi, A. H., Nasser, S., Dehghani, M. H., Nazmara, S., & Yaghmaeian, K. (2017). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons from acidic sludge produced by re-refinery industries of waste oil using in-vessel composting. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 15, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40201-017-0267-1>
- ASTM. (2008). D2007 - 19 Standard Test Method for Characteristic Groups in Rubber Extender and Processing Oils and Other Petroleum-Derived Oils by the Clay-Gel Absorption Chromatographic Method. In *ASTM International*.

ASTM. (2013). D6560 - 17 Standard Test Method for Determination of Asphaltenes (Heptane Insolubles) in Crude and Petroleum Products. In *ASTM International*.

ASTM. (2019a). D2216 - 19 Standard Test Method for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass. In *ASTM International*.

ASTM. (2019b). Standard Test Methods for pH of Soils. In *ASTM International*.

Atagana, H. I. (2014). Managing physicochemical parameters in compost systems to enhance degradation of petroleum wastes from a sludge dam. *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 857–865. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.12257>

Ayotamuno, J. M., Kogbara, R. B., Agele, E. A., & Agoro, O. S. (2010). Composting and phytoremediation treatment of petroleum sludge. *Soil and Sediment Contamination*, 19, 686–695. <https://doi.org/10.1080/15320383.2010.515627>

Ayotamuno, M. J., Okparanma, R. N., Nweneka, E. K., Ogaji, S. O. T., & Probert, S. D. (2007). Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. *Applied Energy*, 84(9), 936–943. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2007.02.007>

Benavides, M., & Calvo, M. (2017). *Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) a partir de lodos aceitosos de la industria petrolera*. Pontificia Universidad Javeriana.

Brigmon, R. L., Berry, C. J., Wade, A., & Simpson, W. (2016). Bioprocessing-Based Approach for Bitumen/Water/Fines Separation and Hydrocarbon Recovery from Oil Sands Tailings. *Soil and Sediment Contamination*, 25(3), 241–255. <https://doi.org/10.1080/15320383.2015.1020408>

Buitrago, N., & Torres, L. (2016). *Tamizaje de bacterias degradadoras de hidrocarburos presentes en lodos aceitosos para bioaumentación en biopilas*. Pontificia Universidad Javeriana.

Cameotra, S. S., & Singh, P. (2008). Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.11.009>

Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Vainstein, M. H., Camargo, F. A. O., Peralba, M. do C. R., & Bento, F. M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23), 11003–11010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.074>

Cerqueira, V. S., Peralba, M. do C. R., Camargo, F. A. O., & Bento, F. M. (2014). Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 95, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.015>

Chang, S. H. (2014). An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production. *Biomass and Bioenergy*, 62, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.002>

Chang, S., & Robinson, P. R. (2017). *Springer Handbook of Petroleum Technology*. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49347-3>

Chen, J. C., Huang, J. S., Chen, C. M., & Guo, J. S. (2008). Emission characteristics of PAHs, benzene and phenol group hydrocarbons in O2/RFG waste incineration processes. *Fuel*, 87(12), 2787–2797. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.02.012>

Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Yang, C., Lai, C., Zhang, C., & Liu, Y. (2017). Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soils contaminated with hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 314, 98–113. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.135>

Ćilerdžić, J., Stajić, M., & Vukojević, J. (2016). Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.024>

Da Silva, L. J., Alves, F. C., & De França, F. P. (2012). A review of the technological solutions for the treatment of oily sludges from petroleum refineries. *Waste Management and Research*, 30, 1016–1030. <https://doi.org/10.1177/0734242X12448517>

De-Qing, S., Jian, Z., Zhao-Long, G., Jian, D., Tian-Li, W., Murygina, V., & Kalyuzhnyi, S. (2007). Bioremediation of oil sludge in Shengli oilfield. *Water, Air, and Soil Pollution*, 185(1–4), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9440-y>

De La Cueva, S. C., Rodríguez, C. H., Cruz, N. O. S., Contreras, J. A. R., & Miranda, J. L. (2016). Changes in Bacterial Populations during Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2789-z>

Dong, X. Q., Yang, J. S., Zhu, N., Wang, E. T., & Yuan, H. L. (2013). Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 131, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.182>

Dörr de Quadros, P., Cerqueira, V. S., Cazarolli, J. C., Peralba, M. do C. R., Camargo, F. A. O., Giongo, A., & Bento, F. M. (2016). Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 115, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.018>

Duan, M., Li, C., Wang, X., Fang, S., Xiong, Y., & Shi, P. (2019). Solid separation from the heavy oil sludge produced from Liaohe Oilfield. *Journal of Petroleum*

*Science and Engineering*, 172(September 2018), 1112–1119.  
<https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.09.019>

EPA. (1994). *How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A guide for corrective action plan reviewers*.

EPA. (1996). *3050B Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils*.

EPA. (1998). *9071B n-Hexane Extractable Material (HEM) for Sludge, Sediment and Solid Samples*.

EPA. (2001). *Use of Bioremediation at Use of Bioremediation at Superfund Sites*.

EPA. (2007a). *3546 Microwave Extraction*.

EPA. (2007b). *7000B Flame Atomic Absorption Spectrophotometry*.

Fountoulakis, M. S., Terzakis, S., Georgaki, E., Drakopoulou, S., Sabathianakis, I., Kouzoulakis, M., & Manios, T. (2009). Oil refinery sludge and green waste simulated windrow composting. *Biodegradation*, 20, 177–189. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9211-5>

Galvis, V. (2019). *Evaluación de la bioaumentación empleando consorcios de hongos y bacterias en la degradación de borras aceitosas*. Pontificia Universidad Javeriana.

García, E., Roldán, F., & Garzón, L. (2011). Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta Biologica Colombiana*, 16(1), 195–208.

Gomez, F., & Sartaj, M. (2013). Field scale ex-situ bioremediation of petroleum contaminated soil under cold climate conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.08.003>

Heidarzadeh, N., Gitipour, S., & Abdoli, M. A. (2010). Characterization of oily sludge from a Tehran oil refinery. *Waste Management and Research*, 28, 921–927. <https://doi.org/10.1177/0734242X09345794>

Hernández-López, E. L., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Microbial and Enzymatic Biotransformations of Asphaltenes. *Petroleum Science and Technology*, 33, 1017–1029. <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1014960>

Hoang, S. A., Sarkar, B., Seshadri, B., Lamb, D., Wijesekara, H., Vithanage, M., Liyanage, C., Kolivabandara, P. A., Rinklebe, J., Lam, S. S., Vinu, A., Wang, H., Kirkham, M. B., & Bolan, N. S. (2021). Mitigation of petroleum-hydrocarbon-contaminated hazardous soils using organic amendments: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 416(March), 125702.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125702>

Hu, G., Feng, H., He, P., Li, J., Hewage, K., & Sadiq, R. (2020). Comparative life-cycle assessment of traditional and emerging oily sludge treatment approaches. *Journal of Cleaner Production*, 251, 119594. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119594>

Hu, G., Li, J., & Hou, H. (2015). A combination of solvent extraction and freeze thaw for oil recovery from petroleum refinery wastewater treatment pond sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 832–840. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.028>

Hu, G., Li, J., & Zeng, G. (2013). Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 470–490. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>

Huang, Y., Pan, H., Wang, Q., Ge, Y., Liu, W., & Christie, P. (2019). Enrichment of the soil microbial community in the bioremediation of a petroleum-contaminated soil amended with rice straw or sawdust. *Chemosphere*, 224, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.148>

Hurst, C. J., & Crawford, R. L. (2002). Methods for Determining Biodegradability. In *Manual of environmental microbiology*. ASM Press. <https://books.google.com.co/books?id=PQlpAQAAMAAJ>

IDEAM. (2018). *Informe Nacional De Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia*. <http://www.ideam.gov.co/documents/51310/1929967/Informe+Nacional+de+generacion+y+manejo+de+residuos+y+desechos+peligrosos.pdf/158efdc8-e8dc-4775-b377-6f2239b36d21?version=1.0>

Jahromi, H., Fazelipour, M. H., Ayatollahi, S., & Niazi, A. (2014). Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel*, 117, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.085>

Jardak, K., Drogui, P., & Daghrir, R. (2016). Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3195–3216. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5803-x>

Jasmine, J., & Mukherji, S. (2015). Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia. *Journal of Environmental Management*, 149, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.007>

Jasmine, J., & Mukherji, S. (2019). Impact of bioremediation strategies on slurry phase treatment of aged oily sludge from a refinery. *Journal of Environmental Management*, 246, 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.029>

Jerez, S., Ventura, M., Molina, R., Pariente, M. I., Martínez, F., & Melero, J. A. (2021). Comprehensive characterization of an oily sludge from a petrol refinery: A step forward for its valorization within the circular economy strategy. *Journal of Environmental Management*, 285, 112124. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112124>

Johnson, O. A., & Affam, A. C. (2019). Petroleum sludge treatment and disposal: A review. *Korean Society of Environmental Engineers*, 24, 191–201. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.134>

Ke, C. Y., Qin, F. L., Yang, Z. G., Sha, J., Sun, W. J., Hui, J. F., Zhang, Q. Z., & Zhang, X. L. (2021). Bioremediation of oily sludge by solid complex bacterial agent with a combined two-step process. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111673. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111673>

Khayati, G., & Barati, M. (2017). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Optimization Strategy Using Taguchi Design of Experimental (DOE) Methodology. *Environmental Processes*, 4, 451–461. <https://doi.org/10.1007/s40710-017-0244-9>

Komilis, D. P., Vrohidou, A. E. K., & Voudrias, E. A. (2010). Kinetics of aerobic bioremediation of a diesel-contaminated sandy soil: Effect of nitrogen addition. *Water, Air, and Soil Pollution*, 208, 193–208. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0159-9>

Koolivand, A., Naddafi, K., Nabizadeh, R., Nasser, S., Jafari, A. J., Yunesian, M., Yaghmaeian, K., & Nazmara, S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons of bottom sludge from crude oil storage tanks by in-vessel composting. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95(1). <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.753073>

Koolivand, A., Rajaei, M. S., Ghanadzadeh, M. J., Saeedi, R., Abtahi, H., & Godini, K. (2017). Bioremediation of storage tank bottom sludge by using a two-stage composting system: Effect of mixing ratio and nutrients addition. *Bioresour. Technology*, 235, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.100>

Koolivand, A., Saeedi, R., Coulon, F., Kumar, V., Villaseñor, J., Asghari, F., & Hesampoor, F. (2020). Bioremediation of petroleum hydrocarbons by vermicomposting process bioaugmented with indigenous bacterial consortium isolated from petroleum oily sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110645. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110645>

Kriipsalu, M., Marques, M., Nammari, D. R., & Hogland, W. (2007). Bio-treatment of oily sludge: The contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 148, 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.017>

Kriipsalu, M., & Nammari, D. (2010). Monitoring of biopile composting of oily sludge. *Waste Management and Research*, 28, 395–403. <https://doi.org/10.1177/0734242X09337749>

Kumar, V., Kumar, M., & Prasad, R. (2019). Microbial action on hydrocarbons. In *Microbial Action on Hydrocarbons*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5>

Lamy, E., Tran, T. C., Mottelet, S., Pauss, A., & Schoefs, O. (2013). Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 83, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.015>

Leon, V., & Kumar, M. (2005). Biological upgrading of heavy crude oil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 471–481. <https://doi.org/10.1007/BF02932281>

Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., & Springael, D. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 726–736. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1766-4>

Liao, Y., Geng, A., & Huang, H. (2009). The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin. *Organic Geochemistry*, 40(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.12.006>

Liu, W., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z., & Ma, L. Q. (2010). Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental Geochemistry and Health*, 32, 23–29. <https://doi.org/10.1007/s10653-009-9262-5>

Lladó, S., Solanas, A. M., de Lapuente, J., Borràs, M., & Viñas, M. (2012). A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435–436, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.032>

Ma, J., Yan, G., Ma, W., Cheng, C., Wang, Q., & Guo, S. (2015). Isolation and Characterization of Oil-Degrading Microorganisms for Bench-Scale Evaluations of Autochthonous Bioaugmentation for Soil Remediation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2491-6>

Ma, J., Yang, Y., Dai, X., Chen, Y., Deng, H., Zhou, H., Guo, S., & Yan, G. (2016). Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. *Chemosphere*, 150, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.123>

Malagón, J. (2016). La competitividad del sector de hidrocarburos en las diferentes regiones de Colombia. In *Cuadernos Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD)*.

Marin, A., Moreno, L., Herna, T., & Garcı, C. (2006). Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17, 251–261. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-5020-2>

Masy, T., Demanèche, S., Tromme, O., Thonart, P., Jacques, P., Hiligsmann, S., & Vogel, T. M. (2016). Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.016>

Milne, B. J., Baheri, H. R., & Hill, G. A. (1998). Composting of a heavy oil refinery sludge. *Environmental Progress*, 17, 24–27. <https://doi.org/10.1002/ep.670170115>

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., & Lal, B. (2001). In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Current Microbiology*, 43, 328–335. <https://doi.org/10.1007/s002840010311>

Mora, V. C., Morelli, I. S., & Rosso, J. A. (2020). Co-treatment of an oily sludge and aged contaminated soil: permanganate oxidation followed by bioremediation. *Journal of Environmental Management*, 261(January). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110169>

Moreno, A. C. (2019). *Evaluación del efecto de la bioaumentación con Biotiger™ en la degradación de borras aceitosas provenientes del departamento del Meta*.

Moscoso, L. (2018). *Evaluación de la bioaumentación empleando consorcios bacterianos en la degradación de borras aceitosas provenientes de la industria petrolera*. Pontificia Universidad Javeriana.

Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.005>

Obbard, J. P., Ng, K. L., & Xu, R. (2004). Bioremediation of petroleum contaminated beach sediments: Use of crude palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 157(1–4), 149–161. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000038884.24326.88>

Obi, L. U., Atagana, H. I., & Adeleke, R. A. (2016). Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *SpringerPlus*, 5, 1946. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3617-z>

Ouyang, W., Liu, H., Murygina, V., Yu, Y., Xiu, Z., & Kalyuzhnyi, S. (2005). Comparison of bioaugmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China. *Process Biochemistry*, 40, 3763–3768. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.004>



Parhamfar, M., Abtahi, H., Godini, K., Saeedi, R., Sartaj, M., Villaseñor, J., Coulon, F., Kumar, V., Soltanighias, T., Ghaznavi-Rad, E., & Koolivand, A. (2020). Biodegradation of heavy oily sludge by a two-step inoculation composting process using synergistic effect of indigenous isolated bacteria. *Process Biochemistry*, *91*, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.014>

Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A. M. (2001). Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *43*(3), 143–150.

Poorsoleiman, M. S., Hosseini, S. A., Etmnan, A., Abtahi, H., & Koolivand, A. (2020). Effect of two-step bioaugmentation of an indigenous bacterial strain isolated from oily waste sludge on petroleum hydrocarbons biodegradation: Scaling-up from a liquid mineral medium to a two-stage composting process. *Environmental Technology and Innovation*, *17*, 100558. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100558>

Prince, R. C., & Walters, C. C. (2016). Biodegradation of Oil Hydrocarbons and its Implications for Source Identification. In *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification: Second Edition* (Second Edi, pp. 869–916). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809659-8.00019-X>

Riazi, M. R. (2005). *Characterization and Properties of Petroleum Fractions* (First).

Robinson, P. R. (2007). Petroleum Processing Overview. In *Practical Advances in Petroleum Processing* (pp. 1–78).

Roldán-Carrillo, T., Castorena-Cortés, G., Zapata-Peñasco, I., Reyes-Avila, J., & Olguín-Lora, P. (2012). Aerobic biodegradation of sludge with high hydrocarbon content generated by a Mexican natural gas processing facility. *Journal of Environmental Management*, *95*, S93–S98. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.04.014>

Roldán-Martín, A., Calva-Calva, G., Rojas-Avelizapa, N., Díaz-Cervantes, M. D., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Solid culture amended with small amounts of raw coffee beans for the removal of petroleum hydrocarbon from weathered contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *60*(1), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.10.008>

Rong, L., Zheng, X., Oba, B. T., Shen, C., Wang, X., Wang, H., Luo, Q., & Sun, L. (2021). Activating soil microbial community using bacillus and rhamnolipid to remove TPH contacted soil. *Chemosphere*, *275*, 130062. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130062>

Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., & Sarkar, J. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, *253*, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.004>

Rudyk, S. (2018). Relationships between SARA fractions of conventional oil, heavy oil, natural bitumen and residues. *Fuel*, 216(December 2017), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.001>

Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, 242, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.010>

Shaw, J. M., Satyro, M. A., & Yarranton, H. W. (2017). Phase Behavior and Properties of Heavy Oils. In C. S. Hsu & P. R. Robinson (Eds.), *Springer Handbook of Petroleum Technology* (pp. 273–318). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3_8)

Singer, A. C., Van Der Gast, C. J., & Thompson, I. P. (2005). Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends in Biotechnology*, 23(2), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.12.012>

Speight, J. (2019). Heavy Oil, Extra Heavy Oil, and Tar Sand Bitumen. In *Heavy Oil Recovery and Upgrading* (pp. 3–47). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813025-4.00001-5>

Speight, J. G. (2020). Hydrocarbons in the environment. In *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes* (Issue i, pp. 651–704). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809923-0.00015-1>

Speight, J. G., & El-Gendy, N. S. (2018). Bio-upgrading Heavy Crude Oil. In *Introduction to Petroleum Biotechnology*.

Tahhan, R. A., Ammari, T. G., Goussous, S. J., & Al-Shdaifat, H. I. (2011). Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.007>

Teng, Q., Lin, H., Zeng, M., Xie, Y., & Zhang, D. (2018). Study on two-step process of petroleum substances recovery from oily sludge. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 208(1).

Tran, H. T., Lin, C., Bui, X. T., Ngo, H. H., Cheruiyot, N. K., Hoang, H. G., & Vu, C. T. (2021). Aerobic composting remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Current and future perspectives. *Science of the Total Environment*, 753, 142250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142250>

Trejo-Hernández, M. R., Ortiz, A., Okoh, A. I., Morales, D., & Quintero, R. (2007). Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. *Chemosphere*, 68, 848–855.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.023>

Trejos, M. (2017). *Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo*. Universidad Nacional de Colombia.

UPME. (2013). *Cadena del Petroleo*.

Vasco, M. F., Cepero, M. C., Restrepo, S., & Vives-Florez, M. J. (2011). Recovery of mitosporic fungi actively growing in soils after bacterial bioremediation of oily sludge and their potential for removing recalcitrant hydrocarbons. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.014>

Vasudevan, N., & Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, 26(5–6), 409–411. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00020-4)

Wang, S., Wang, X., Zhang, C., Li, F., & Guo, G. (2016). Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 106, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.014>

Wang, S. Y., Kuo, Y. C., Hong, A., Chang, Y. M., & Kao, C. M. (2016). Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere*, 164, 558–567. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.128>

Wang, X., Wang, Q., Wang, S., Li, F., & Guo, G. (2012). Effect of biostimulation on community level physiological profiles of microorganisms in field-scale biopiles composed of aged oil sludge. *Bioresource Technology*, 111, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.158>

Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., & Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 107, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>

Xu, N., Bao, M., Sun, P., & Li, Y. (2013). Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Bioresource Technology*, 149, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.024>

Xu, R., Zhang, Z., Wang, L., Yin, N., & Zhan, X. (2018). Surfactant-enhanced biodegradation of crude oil by mixed bacterial consortium in contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 14437–14446. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1604-3>

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-

Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.038>

Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. D. C., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1826-4>

Zhou, H., Huang, X., Bu, K., Wen, F., Zhang, D., & Zhang, C. (2019). Fungal proliferation and hydrocarbon removal during biostimulation of oily sludge with high total petroleum hydrocarbon. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26, 33192–33201. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06432-z>

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Respirómetros empleados para los ensayos de respirometría



### Anexo 2. Identificación de las bacterias utilizadas en los ensayos de bioaumentación

Origen	Código	Identificación	Selección
Lodos aceitosos pesados	13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mayor crecimiento (DO <sub>600nm</sub> ) en medio BH con antraceno, naftaleno o diésel
	26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	96	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	102	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	
Cepario USBA	107	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922*	Mayor crecimiento (DO <sub>600nm</sub> ) en medio BH con antraceno, naftaleno o diésel
	111	<i>Pseudomonas putida</i>	
	116	<i>Favimonas oryzihabitans</i>	
	155	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
Lodos aceitosos pesados	305	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Halos de degradación en agar BH con antraceno, fenantreno o pireno
	309	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	
	201	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	203	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	400	No identificada	
	401	<i>Sphingobium ummariense</i>	
407	<i>Sphingobium ummariense</i>		

**Anexo 3.** Composición del medio Bushnell Hass (BH)

<b>Composición</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
MgSO <sub>4</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
HN <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0
FeCl <sub>2</sub>	0.05

**Anexo 4.** Composición del medio R2A

<b>Composición</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
Caseína hidrolizada	0.5
Extracto de levadura	0.5
Proteosa peptona	0.5
Glucosa	0.5
Almidón soluble	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
Piruvato de sodio	0.3
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.049