

Biorremediación de Suelos Contaminados con Aceites Usados de Motor

Bioremediation of Soils Contaminated With Used Motor Oils

L. F. Barrios-Ziolo¹, J. Robayo-Gómez²,
S. Prieto-Cadavid¹, S. A. Cardona-Gallo³

Recibido: 30 de junio de 2015

Aceptado: 14 de agosto de 2015

Resumen

En el presente estudio se analizó el proceso de bioremediación de un suelo contaminado con aceites usados de motor (40000 mg/kg). Se utilizaron como principales tecnologías la Atenuación Natural y la Bioestimulación adicionando nutrientes derivados de fertilizantes inorgánicos (Urea y Tripolifosfato de sodio). La dosis de nutrientes semanal fue determinada con base en relaciones estequiométricas y los requerimientos fisiológicos de la diversidad biológica del suelo. Como tratamiento de control se utilizó una muestra de suelo previamente esterilizado, al cual se adicionó HCl y Benzoato de sodio como agentes inhibidores del crecimiento microbiano. Los agentes inhibidores promovieron el crecimiento de microorganismos con capacidad hidrocarbonoclasta obteniendo la mayor eficiencia de remoción del estudio (26.5% en 12 semanas) seguido del tratamiento de Atenuación Natural y Bioestimulación. El análisis de varianza (ANOVA) de las cinéticas de remoción del contaminante presente en el suelo, indica que no existe diferencia significativa entre el proceso de Atenuación Natural y de Bioestimulación considerando la eficiencia de remoción del aceite usado, crecimiento celular y tasa de respiración del suelo.

-
- 1 Ingeniero Biológico, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
 - 2 Biotecnólogo, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
 - 3 PhD. Profesor Departamento de Geociencias y Medio Ambiente, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. scardona@unal.edu.co

Una prueba de toxicidad aguda utilizando el microorganismo *Eisenia foetida* fue realizada; con base en los resultados obtenidos no se presentó mortalidad de *Eisenia foetida* en ningún tratamiento, excepto en el proceso de Bioestimulación, cuya mortalidad fue del 100% como consecuencia de los niveles de amonio y pH del medio.

Palabras Claves: Biorremediación, Atenuación Natural, Bioestimulación, Respirometría, Aceite usado de motor.

Abstract

In this study it was analyzed the process of bioremediation of soil contaminated with used motor oils (40000 mg/kg), using as main technologies Natural Attenuation and biostimulation, adding nutrients derived from inorganic fertilizers (urea and sodium tripolyphosphate). The weekly dose of nutrients was determined based on stoichiometric ratios and the physiological requirements of soil biodiversity. As a control treatment, a sample of soil was used previously sterilized, HCl and sodium benzoate was added as inhibitors of microbial growth. Inhibiting agents promoted the growth of microorganisms with ability hydrocarbonclastic obtaining maximum efficiency of removal of the study (26.5% at 12 weeks) followed by treatment of Natural attenuation and biostimulation. Analysis of variance (ANOVA) of the kinetics of removal of the contaminant in the ground, indicating no significant difference between the process of natural attenuation and biostimulation considering the removal efficiency of used oil, cell growth and soil respiration rate.

An acute toxicity test using the microorganism *Eisenia foetida* was performed; based on the results obtained not *Eisenia foetida* mortality occurred in any treatment, except in the biostimulation process, the mortality was 100% as a result of ammonium levels and media pH.

Keywords: Bioremediation, natural attenuation, biostimulation, respirometry, used motor oil.

1. Introducción

El suelo es un recurso natural vital que gracias a sus características físicas, químicas y biológicas, permite el crecimiento de la vegetación, la producción de alimentos y el establecimiento de los ecosistemas, influyendo en el desarrollo óptimo de procesos ambientales como el ciclo hidrológico, el ciclo del carbono, el ciclo del nitrógeno, entre otros ^[1]. La contaminación de los suelos representa un problema cada vez más grave que causa su deterioro a escala mundial ^[2]. Entre los contaminantes comúnmente encontrados en el suelo, es posible relacionar desde derivados de hidrocarburos, el petróleo crudo, plaguicidas, pesticidas hasta compuestos metálicos ^[3].

Cada año, entre 800 - 1000 millones de toneladas de contaminantes derivados del petróleo son introducidos al medio ambiente como consecuencia de derrames en la etapa de exploración, explotación, transporte, refinación y almacenamiento. En el grupo de derivados del petróleo, se encuentran los aceites usados de motor, cuya producción mundial oscila es aproximadamente el 2% del crudo total refinado ^{[4][5]}, lo que corresponde a un consumo cercano a 38 millones de toneladas por año ^[6]; estos aceites por litro pueden contaminar hasta un millón de galones de agua dulce ^{[7][8]} con efectos significativos sobre los ecosistemas expuestos.

La composición química de los aceites de motor varía de acuerdo al tipo aditivos utilizados en su formulación (aproximadamente el 20% en peso del producto final, ver Tabla 1), pueden presentar cadenas hidrocarbonadas de más de 15 átomos de carbono, con puntos de ebullición entre 300 y 600 °C ^[9]. Muchos de los compuestos presentes en los aditivos, son conocidos por su alto grado de ecotoxicidad; entre los más utilizados se encuentra el alquil ditiosulfato de zinc, disulfuro de molibdeno, jabones con metales pesados, y compuestos organometálicos ^{[9][10][11][12]}

TABLA 1. PRINCIPALES ADITIVOS EN EL ACEITE LUBRICANTE ^[8].

Agentes de extrema presión	Mejoradores del índice de viscosidad
Agentes lubricantes	Modificadores de emulsión
Antiespumantes	Modificadores de fricción
Depresores	Modificadores de viscosidad
Espesantes	Modificadores químicos
Inhibidores de corrosión	Detergentes y dispersantes
Inhibidores de desgaste	Colorantes
Inhibidores de oxidación	Modificadores físicos

Durante la operación del motor, el aceite se transforma mediante mecanismos de oxidación, nitración, cracking de polímeros, descomposición de sustancias organometálicas, etc., este cambio se atribuye a las altas temperaturas y esfuerzos mecánicos a los que se somete el aceite durante el funcionamiento ^{[9][13]}. El contenido de nitrógeno y azufre en el aceite usado oscila entre 0,05 - 0,18% y 0,22 - 0,55%, respectivamente; puede contener entre 80 y 32.000 µg.g⁻¹ de fósforo y alrededor de 3.500 µg.g⁻¹ de cloro ^{[9][14][15][16]}.

A diferencia del aceite nuevo de motor (ver Tabla 2), el aceite usado contiene altas concentraciones de metales pesados como: Pb, Zn, Ca, Ba y Mg, menores concentraciones de Na, Cu, Al, Cr, Mn, K, Ni, Sn, Si, B y Mo, factor que los hace potencialmente peligrosos para la vida de los organismos [9][14][17][18][19][20].

TABLA 2. CONCENTRACIÓN (MG.G⁻¹) DE METALES PESADOS EN ACEITE DE MOTOR USADO [9]

Metal	Motor gasolina	Motor Diesel	Estaciones de gasolina locales			Promedio	Máx
			a	b	c		
Pb	7500	75	1075	3091,5	3950	7097,0	13885
Zn	1500	1300	265	1128,5	740	1061,0	2500
Cu	17	18	27,5	6,0	40	28,0	56
Cr	21	3	LD	1,0	ND	10,5	24
Ni	LD	LD	8,5	0,6	ND	1,2	5
Cd	ND	ND	0,1	0,5	ND	ND	ND

Raymond et al. [21], a. Mumford et al. [16], b. Vazquez-Duhalt and Greppin [22], c. Becker and Comeford [14].

Cotton et al. [23]. ND, no determinada; LD, debajo del límite de detección.

Otro grupo de compuestos encontrados frecuentemente en el aceite usado de motor, está representado por los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los cuales se reconocen en el mundo por su efecto mutagénico y cancerígeno sobre diversos organismos [9][15]. El contenido de PAHs en el aceite nuevo de motor, es relativamente bajo (ver Tabla 3) [24], aumenta con el tiempo de funcionamiento del motor; hasta alcanzar una concentración 670 veces mayor que la inicial [9][25].

Una vez el aceite es adicionado al suelo, altera las características fisicoquímicas y biológicas del medio, entre estas el contenido de materia orgánica, densidad aparente, porosidad, permeabilidad, tasa de respiración y relación C:N, debido a la alta hidrofobicidad de los hidrocarburos [26].

TABLA 3. CONTENIDO DE PAH EN LOS DIFERENTES ACEITES DE MOTOR. [8]

PAH	Concentración (µg.g-1)		
	A	B	C
Antraceno	0,002 - 0,030	1,6 - 10,8	0,5 - 4,4
Benzo[α]pireno	0,008 - 0,266	5,2 - 35,1	0,7 - 11,9
Benzo[e]pireno	0,030 - 0,402	6,4 - 48,9	1,3 - 10,7
Benzo[ghi]perileno	0,010 - 0,139	4,4 - 85,2	2,1 - 16,0
Benzo[fluoranteno]	0,013 - 0,234	5,7 - 44,3	1,8 - 16,8
Trifenilo + criseno	0,182 - 11,9	8,7 - 74,0	5,1 - 42,8
Coroneno	0,001 - 0,016	2,8 - 29,4	0,1 - 6,4
Fluoranteno	0,008 - 2,750	3,4 - 109,0	1,3 - 58,9
Indeno (1,2,3-cd) pireno	0,001 - 0,020	2,1 - 12,5	0,8 - 9,0
Perileno	0,007 - 0,224	1,9 - 10,0	0,4 - 2,7
Pireno	0,039 - 6,530	5,7 - 326,0	1,4 - 78,0

A - Aceite de motor nuevo, B - Aceite de motor usado (vehículo gasolina)

y C - Aceite de motor usado (vehículo diesel).

En el mundo se avanza en el desarrollo e implementación de tecnologías ambientalmente sostenibles y de bajo costo para el control de la contaminación; como es el caso de la **Biorremediación** [27], la cual permite disminuir los efectos adversos ocasionados por estos contaminantes sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos, mientras se reduce la concentración de los mismos en el medio afín. Los procesos de biorremediación se dividen en tres clases. (1) **Atenuación natural**, donde se reduce la concentración del contaminante por la acción de los microorganismos nativos del suelo. (2) **Bioestimulación**, en la cual se adicionan nutrientes (N y P) además de un aceptor final de electrones (p.e oxígeno) para mejorar la eficiencia del metabolismo microbiano y acelerar la biodegradación del contaminante [28]. Finalmente, (3) la **Bioaugmentación** involucra la adición de microorganismos al medio para incrementar la eficiencia de remoción del contaminante [28 - 32].

La eficiencia de las tecnologías de Atenuación Natural y Bioestimulación, ha sido evaluada en el tratamiento de suelos contaminados con derivados del petróleo, aceites minerales y compuestos orgánicos policíclicos [33], [34],

en el caso del diesel, se han obtenido porcentajes de remoción del 36.86 y 50.99%, respectivamente, durante 4 meses de tratamiento [35], [36]. La eficiencia de remoción de hidrocarburos en suelo es afectada por las características fisicoquímicas de los nutrientes adicionados al medio (fuente de N y P), es así como en el tratamiento de suelos contaminados con aceites minerales, se obtienen porcentajes de remoción cercanos al 54% durante 360 días, utilizando sales inorgánicas simples (p.e NH_4NO_3 y K_2HPO_4), la eficiencia se reduce al 20% con la adición derivados de fertilizantes inorgánicos (p.e Urea). La hidrólisis de la urea produce altas concentraciones de amoníaco en el medio, lo cual incrementa el pH entre 7.4 y 8.7 unidades, inhibiendo el desarrollo de poblaciones microbianas [36 - 38].

Entre los métodos implementados para el seguimiento de los procesos de Biorremediación, se desataca el uso de técnicas respirométricas que aunque no se ha explotado a fondo, ofrecen una serie de ventajas que son difíciles de obtener por otros medios [39], [40]. La respirometría cuantifica el uso total de oxígeno en la fase de adaptación de los microorganismos, de degradación del hidrocarburo y de decaimiento celular, relacionando estequiométricamente el CO_2 producido con el O_2 consumido en cada fase [40], [41], estos resultados pueden ser utilizados para determinar la eficiencia del tratamiento [42].

La calidad y salud del suelo contaminado con derivados de hidrocarburos, puede ser evaluada mediante el uso de microorganismos del suelo (p.e Lombrices) [43], [44]. Se han desarrollado protocolos estandarizados [45] que utilizan la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como bioindicador. *E. foetida* es susceptible a cambios en las condiciones óptimas de crecimiento (pH 5-8, temperatura entre 20-25°C y contenido de amonio <500 mg/kg_{ss}), esto último permite determinar los efectos agudos (mortalidad de individuos) que produce el contaminante en el suelo [46 - 48].

En la presente investigación se evaluó la eficiencia de remoción de hidrocarburos totales de petróleo asociados al aceite usado de motor en suelo, mediante la implementación de un proceso de atenuación natural y de bioestimulación. Los rendimientos de ambos procesos fueron analizados a partir de un protocolo de tratabilidad a escala de laboratorio, comparados estadísticamente utilizando el análisis de varianza (ANOVA).

Se determinó la cinética de crecimiento de los consorcios microbianos presentes en el suelo contaminado, a partir del aislamiento de microorganismos con capacidad hidrocarbonoclasta (exclusivamente Bacterias). Se realizó una tinción de Gram de los principales morfotipos de bacterias considerando el número de individuos por gramo de suelo en cada tratamiento evaluado.

El seguimiento de la degradación del hidrocarburo fue realizado a través de la estimación de la tasa de respiración del suelo (Respirometría) considerando la totalidad de la diversidad microbiana existente (respiración de hongos y bacterias), adicionalmente se realizó la prueba de espectroscopía infrarroja para evaluar la eficiencia de remoción de los hidrocarburos totales de petróleo. Finalmente, se evaluó el grado de toxicidad inicial y final de los tratamientos realizados mediante la implementación de la prueba de toxicidad aguda sobre el organismo *Eisenia foetida*.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestreo

Se preparó una muestra de la capa orgánica del suelo (entre 10 y 20 cm de profundidad) extraída de un predio de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Agronomía, conforme a los lineamientos establecidos por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) para la toma de muestras compuestas de suelos. El terreno seleccionado para la extracción de la capa orgánica, cumplió con las siguientes características: No haber estado expuesto previamente a contaminación con ninguna clase de hidrocarburo y ser de uso exclusivamente pastoril.

La muestra de suelo compuesta, fue secada y posteriormente tamizada hasta alcanzar tamaños de partícula entre 2 y 2.36 mm (tamices Pinzuar), lo anterior con el fin de garantizar una distribución más homogénea del hidrocarburo en el suelo. Adicionalmente, se realizó una caracterización fisicoquímica inicial de la matriz sólida (ver Tabla 4).

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO EMPLEADO EN EL MONTAJE EXPERIMENTAL.

Parámetro	Unidad	Valor
Arena	%	44
Limo	%	36
Arcilla	%	20
Densidad real	g cm ⁻³	2,67
Densidad aparente	g cm ⁻³	1,31
Porosidad	%	50,9
Humedad	%	22,9
pH	U de pH	6,3
Materia orgánica	%	3,7
Ca	cmolc kg ⁻¹	14,7
K	cmolc kg ⁻¹	3,7
Mg	cmolc kg ⁻¹	1,09
CICE		19,5
P Total	mg kg ⁻¹	165
N-NO ₃ ⁻	mg kg ⁻¹	23
N-NH ₄ ⁺	mg kg ⁻¹	15
UFC	UFC g ⁻¹	4,30 *10 ⁷

** Unidades de concentración en base seca

Antes de ser adicionado al suelo, el aceite usado de motor (no volátil), fue esterilizado en una autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² de presión durante 4 horas. Se implementaron tres (3) tratamientos: Control negativo (A), Atenuación natural (B) y Bioestimulación (C). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en bandejas de experimentación de 2 Kg de suelo.

El montaje de la experimentación a escala de laboratorio, consistió en la adición de 80 g de aceite usado de motor a los 2Kg de suelo de cada bandeja.

2.2 Tratamiento A (Control negativo)

Antes de agregar el aceite usado, se esterilizaron 6 Kg de suelo en una autoclave operando a una temperatura de 121°C y 1.5 Kg/cm² de presión durante 4 horas. Se distribuyeron uniformemente en las 3 réplicas del tratamiento A, luego se adicionaron 10 gramos de Benzoato de Sodio a cada bandeja.

2.3 Tratamiento C (Bioestimulación)

Como principales nutrientes para la estimulación del proceso degradativo (tratamiento C), se utilizó como fuente de Nitrógeno y Fósforo, urea y tripolifosfato de sodio, respectivamente. La dosificación fue realizada de conformidad con el cálculo estequiométrico presentado por Cookson (1995) [49]. La fórmula química base de la referencia de aceite de motor utilizado en la investigación fue: $C_{19}H_{40}$, para la cual se obtuvo la relación estequiométrica presentada en la Ecuación 1.



La cantidad de urea en solución, se transforma en amonio de acuerdo a la siguiente expresión:



El suministro de Fósforo elemental (P) corresponde a la sexta parte del Nitrógeno (N) adicionado al sistema. Teniendo en cuenta la pureza de la urea y del tripolifosfato, 46 y 94%, se proyectó la cantidad de nutrientes máxima que debe ser suministrada para llevar a cabo el proceso de bioestimulación, esta dosificación se presenta en la tabla 5.

TABLA 5. DOSIFICACIÓN DE NUTRIENTES UTILIZADA POR CADA 100 GRAMOS DE ACEITE USADO PRESENTE EN EL SUELO.

$C_{19}H_{40}$	Urea	$Na_5P_3O_{10}$	$NaHCO_3$
100	84,56	28,84	109

** Unidades en gramos

Para disminuir el riesgo de inhibición del proceso degradativo como consecuencia de la acumulación de amonio y cambios del pH en el medio, se determinó la tasa de suministro de nutrientes por semana, asumiendo un coeficiente promedio de transformación biológica de hidrocarburos en suelo, K, con un valor aproximado de $0,25 \text{ semanas}^{-1}$. El valor anterior indica para el caso de cinéticas de primer orden, que el contaminante remanente se degrada un 25% cada semana; de esta manera se realizó una dosificación de N y

P para la cantidad de aceite degradado para la semana correspondiente. La cantidad de N y P para los siete (7) días, se dividió en tres fracciones, adicionadas al medio respectivo los días lunes, miércoles y viernes.

2.4 Seguimiento del experimento

Durante el desarrollo de la investigación se realizó un control de la humedad del suelo, manteniéndola por debajo del 25% (en peso seco), a la vez se realizó un seguimiento del pH, concentración de nitrato y amonio en los medios (factores determinantes en la proliferación microbiana). Se adicionó HCl 2M al tratamiento de control (A) para inhibir el crecimiento de las bacterias durante las primeras 7 semanas.

Con el objetivo de evaluar la degradación del aceite usado y el crecimiento microbiano en cada uno de los tratamientos implementados, se utilizaron tres (3) metodologías: Medición de la respiración del suelo (Respirometría), Espectroscopía Infrarroja y Recuento de Microorganismos Heterótrofos. El seguimiento fue realizado durante 12 semanas.

2.4.1 Medición de la respiración del suelo

La medición de la respiración del suelo fue desarrollada mediante la aplicación del protocolo propuesto por Isermeyer (1952) [50], con algunas modificaciones. De cada una de las réplicas pertenecientes a los tratamientos evaluados, se tomaron 30 g de suelo ajustando la humedad en un 21% (en peso seco); una muestra de suelo “limpio” fue utilizada como blanco para estimar el CO₂ producido bajo condiciones normales (sin contaminación) además del presente en el ambiente. Las muestras de suelo fueron dispuestas en Beakers, los cuales se instalaron por separado en el fondo de una jarra de plástico de 1 litro. Se adicionaron 25 ml de solución de NaOH (0.25 M) en el fondo de la jarra, como se muestra en la figura 1; las jarras se cerraron inmediatamente con vinipel y tapa de plástico. Luego de dos días de incubación, se tomó la solución resultante de la jarra y se le adicionaron 5 ml de BaCl₂ (0.5 M), utilizando fenoltaleína como indicador se realizó una titulación con HCl (0.25M).

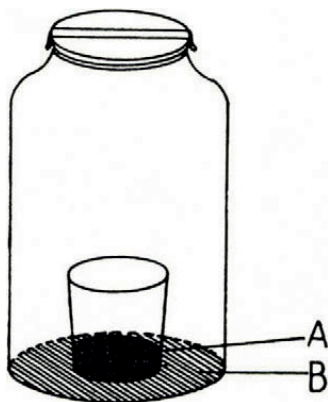
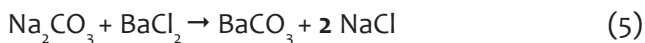
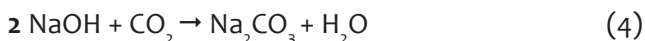


FIGURA 1. ESTIMACIÓN DE LA RESPIRACIÓN DEL SUELO EN JARRAS CERRADAS;
(A) MUESTRA DEL SUELO; (B) SOLUCIÓN DE NaOH.

Los miligramos de CO₂ producidos fueron calculados utilizando las relaciones estequiométricas presentadas a continuación.



El CO₂ asociado a la biodegradación del aceite usado, se determinó mediante la diferencia entre los miligramos de CO₂ producidos por gramo de suelo seco de cada tratamiento y el blanco.

2.4.2 Análisis de espectroscopia infrarroja

Se tomó un gramo de suelo de cada tratamiento perteneciente a las semanas 1, 4 y 12; estas muestras fueron analizadas utilizando espectroscopia IR en el equipo Spectrum Two TM (Perkin – Elmer), siguiendo los protocolo de conservación, manipulación y preparación de muestras exhibido por el Laboratorio de Química Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

2.4.3 Recuento de microorganismos heterótrofos

Para la siembra de microorganismos heterótrofos hidrocarbonoclastas (Bacterias) se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (Difco TM), al cual se le adicionó 1% V/V de aceite usado. Se realizaron diluciones seriadas en tubos

de vidrio que contenían 9 ml de solución Buffer. Para realizar la dilución 10^{-1} , se dispuso 1 gramo de suelo de cada tratamiento en el primer tubo de ensayo; se agitó en un Vortex durante 1 min. Luego se tomó 1 ml de la solución resultante y se adicionó a otro tubo con solución tampón. El procedimiento anterior fue repetido hasta alcanzar la dilución 10^{-9} . Las cajas de Petri se dejaron en incubación a temperatura ambiente (20°C) durante 7 días, lo cual garantiza el crecimiento de bacterias.

El recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo seco, se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\frac{UFC}{g \text{ Base seca}} = \frac{NC \times FH}{FD \times V \times P} \quad (7)$$

Dónde:

NC: Número de colonias por placa

FD: Factor de dilución

V: Volumen de inóculo

FH: Factor de corrección de humedad ($1-(\% \text{humedad}/100)$)

2.5 Análisis estadístico.

Para la determinación de diferencias significativas entre las medias de los tratamientos evaluados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

2.6 Prueba de Toxicidad Aguda sobre *Eisenia foetida*.

El procedimiento se basó en el protocolo de Wilson, J y colaboradores ^[47] en el cual se mezclaron 200g de suelo de cada tratamiento con 50g del mismo sin contaminar en un frasco de vidrio. El experimento tuvo dos controles: un control positivo **C+** que consistió en suelo contaminado en una concentración de (40000 ppm) y un control negativo **C-**, consistente en suelo sin contaminar. Además del tratamiento de bioestimulación B; suelo resultante de tratamiento por bioestimulación y AN; suelo luego de tres meses de tratamiento por atenuación natural.

Para cada tratamiento se realizaron 4 réplicas para un total de 16 unidades experimentales. La humedad inicial se ajustó alrededor del 70%, se midieron parámetros como cantidad de amonio, nitratos y el pH de cada tratamiento al inicio y al final de la prueba de toxicidad. En cada contenedor de vidrio de 500 ml se depositaron 10 lombrices con el clitelio bien desarrollado, lavadas,

y secadas. El experimento se mantuvo a una temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, y con una exposición a la luz de manera continua (400-800 lux), para garantizar que las lombrices se encontraran dentro del recipiente, evitando la salida de los organismos a la superficie ^[51]. La variable a medir fue la tasa de mortalidad y para ello se debió realizar un conteo de las lombrices que sobrevivieron en cada contenedor, cada tres días durante 14 días.

3. Resultados y Discusión

3.1 Respiración del suelo

Como consecuencia de la degradación biológica aerobia de los aceites usados presentes en el suelo, se produce una cantidad significativa de CO_2 , cuya evolución se muestra en la figura 2.

De conformidad con los resultados observados, se alcanzaron tasas de producción de CO_2 de 0,0268 y 0,0221 $\text{mg CO}_2/\text{g}$ suelo seco/día para el proceso de Atenuación Natural y Bioestimulación, respectivamente; el Control Negativo utilizado, presentó una velocidad de producción de 0,0273 $\text{mg CO}_2/\text{g}$ suelo seco/día, una magnitud mayor que los demás tratamientos, lo cual tiene implicaciones bioquímicas relacionadas con la capacidad de adaptación de los microorganismos en el suelo contaminado luego de la acción del agente biocida (HCl y Benzoato de sodio).

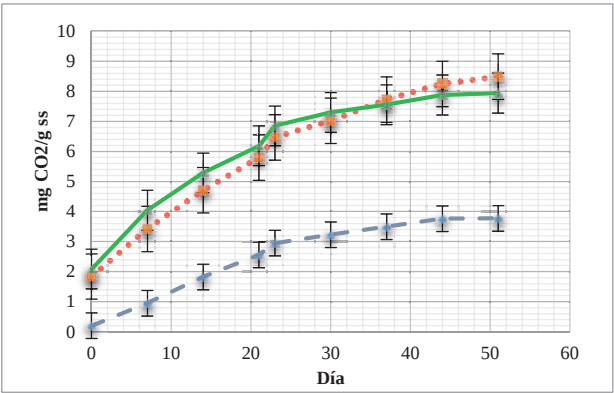


FIGURA 2. EVOLUCIÓN DEL CO_2 ACUMULADO

Tratamiento A (Control), Tratamiento B (Atenuación Natural),
Tratamiento C (Bioestimulación); ss, suelo seco

La producción máxima de CO_2 se obtuvo a los 42 días de tratamiento, siendo mayor en el proceso de Atenuación Natural (7,94 mg CO_2 /g suelo seco) y menor en el Control (3,77 mg CO_2 /g suelo seco), lo cual es el resultado de la acción del biocida. De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 6), no existen diferencias significativas en la degradación del aceite usado de motor al comparar el proceso de Atenuación Natural y de Bioestimulación para las condiciones experimentales formuladas y considerando la evolución diaria del CO_2 acumulado. Siendo $F(0.024)$ menor al valor crítico (4.49) con una significancia del 95%, se acepta la hipótesis nula ($\mu(B) = \mu(C)$), lo cual indica que la producción media de CO_2 es equivalente en el tratamiento B y C.

Con base en la prueba de hipótesis, existen diferencias significativas en la producción de CO_2 de los tratamientos B y C, respecto al tratamiento A, esto último es justificado por el efecto que produce la adición de HCl (2M) y Benzoato de Sodio sobre el tratamiento A, durante la etapa de inhibición del crecimiento microbiano.

TABLA 6. ANÁLISIS DE VARIANZA (RESPIROMETRÍA)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio (μ)	Varianza
Control (A)	9	22.75	2.53	1.63
Atenuación (B)	9	53.71	5.97	5.14
Bioestimulación (C)	9	55.12	6.12	3.96
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
$\mu(A) = \mu(B)$	53.251	15.713	<0.001	4.49
$\mu(A) = \mu(C)$	58.201	20.816	<0.002	4.49
$\mu(B) = \mu(C)$	0.110	0.024	0.878	4.49

3.2 Espectroscopía infrarroja

Los resultados obtenidos luego de medición de espectros de las muestras de suelo correspondientes a los tratamientos A, B y C para las semanas 1, 4 y 12, son presentados a continuación.

Como punto de control para la determinación del avance del proceso degradativo en cada tratamiento, se seleccionó el abscisado correspondien-

te a longitud de onda de 1000 cm^{-1} en las curvas espectrales obtenidas. La reducción de la concentración del contaminante en el suelo (aceite usado de motor), determinado mediante el análisis espectral inicial, fue evaluada teniendo en cuenta el aumento que se produce en el pico transmitancia de la abscisa 1000 cm^{-1} para la semana correspondiente como consecuencia del metabolismo microbiano y la degradación del contaminante.

3.2.1 Evolución de espectros del Tratamiento A (Control)

En las figuras 3, 4 y 5, se muestra el comportamiento del espectro del compuesto base definido en el suelo contaminado correspondiente al tratamiento de Control.

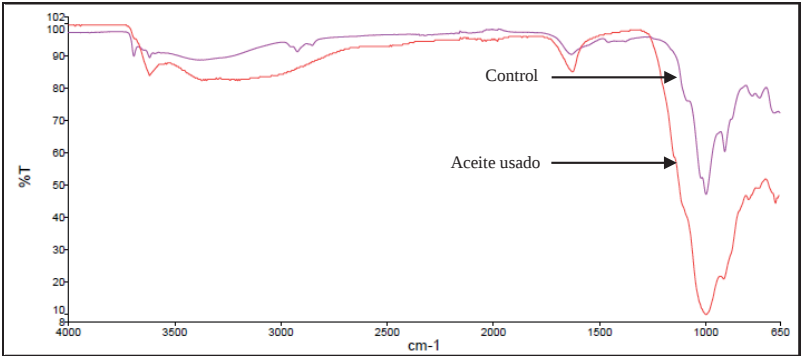


FIGURA 3. ESPECTRO SEMANA 1: TRATAMIENTO DE CONTROL

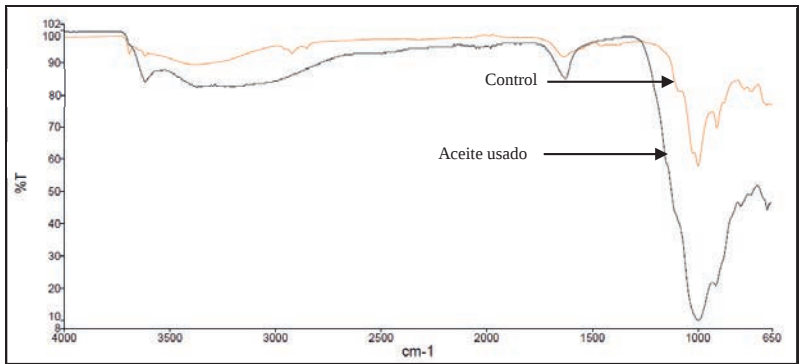


FIGURA 4. ESPECTRO SEMANA 4: TRATAMIENTO DE CONTROL

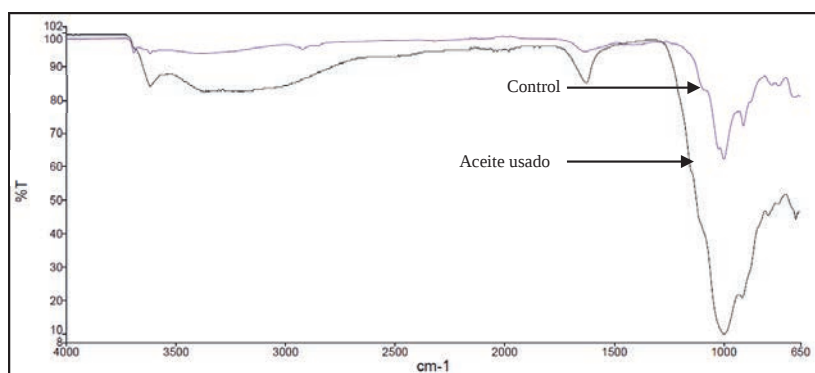


FIGURA 5. ESPECTRO SEMANA 12: TRATAMIENTO DE CONTROL

La semana 1, presentó una transmitancia del 49,8% para el punto de control respectivo (abscisa 1000 cm^{-1}), este valor aumentó para la semana 4 al 58,3%, y finalmente alcanzó un valor del 63% para la semana 12, lo cual indica un porcentaje de remoción del 26,5% para el contaminante luego de la semana 12.

3.2.2 Evolución de espectros del Tratamiento B (Atenuación Natural).

La evolución del espectro correspondiente al Tratamiento de Atenuación Natural, es presentada en las figuras 6, 7 y 8. De acuerdo con los resultados obtenidos la transmitancia en el punto de control se incrementó desde un valor del 60% (semana 1) hasta alcanzar un máximo del 72% para la semana 12, lo cual establece un porcentaje de remoción del contaminante cercano al 20%.

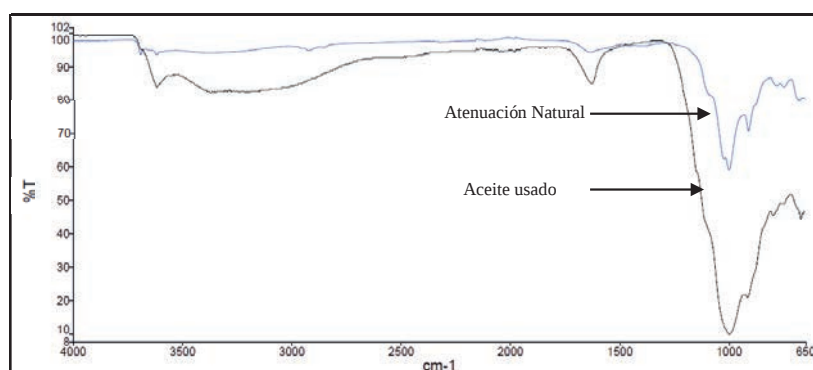


FIGURA 6. ESPECTRO SEMANA 1: TRATAMIENTO DE ATENUACIÓN NATURAL

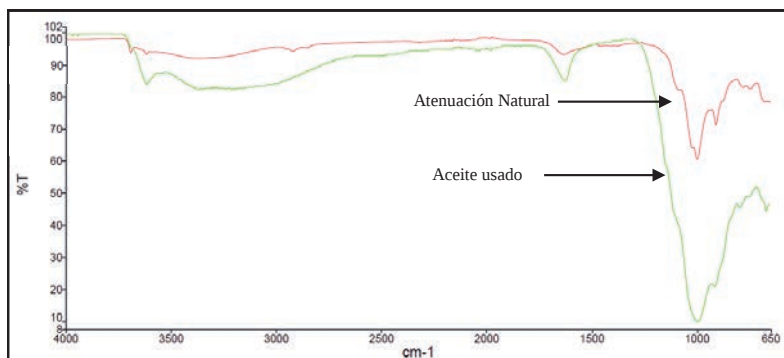


FIGURA 7. ESPECTRO SEMANA 4: TRATAMIENTO DE ATENUACIÓN NATURAL

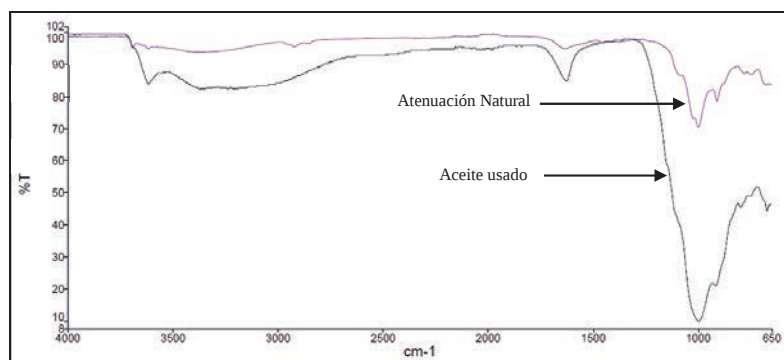


FIGURA 8. ESPECTRO SEMANA 12: TRATAMIENTO DE ATENUACIÓN NATURAL

3.2.3 Evolución de espectros del Tratamiento C (Bioestimulación)

En las figuras 9, 10 y 11, se presenta el comportamiento espectral de la muestra de suelo correspondiente al Tratamiento de Bioestimulación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, entre la semana 1 y 12, se alcanzó un porcentaje de remoción del contaminante cercano al 10%. En general, el proceso de adición de agentes inhibidores del crecimiento celular puede contribuir con el aumento de la capacidad de adaptación de los microorganismos que utilizan el aceite usado como sustrato, lo cual explica el aumento del porcentaje de remoción del contaminante en el tratamiento A, ya que adicionalmente no se produjo una reacción química potencial entre los biocidas y el aceite usado de volatilidad nula (bajo las condiciones de experimentación aplicadas).

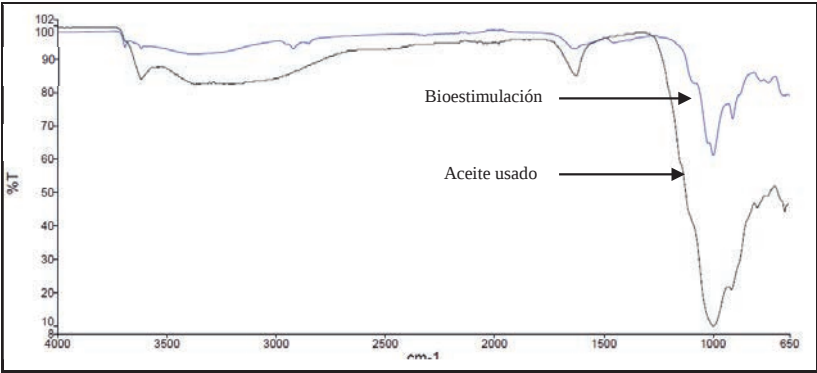


FIGURA 9. ESPECTRO SEMANA 1: TRATAMIENTO DE BIOESTIMULACIÓN

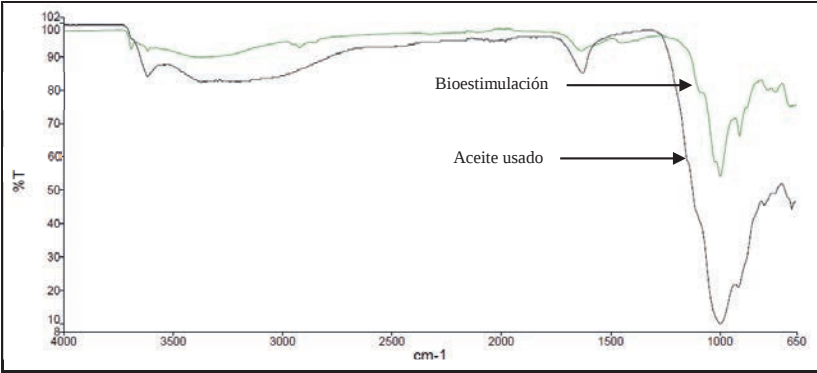


FIGURA 10. ESPECTRO SEMANA 4: TRATAMIENTO DE BIOESTIMULACIÓN

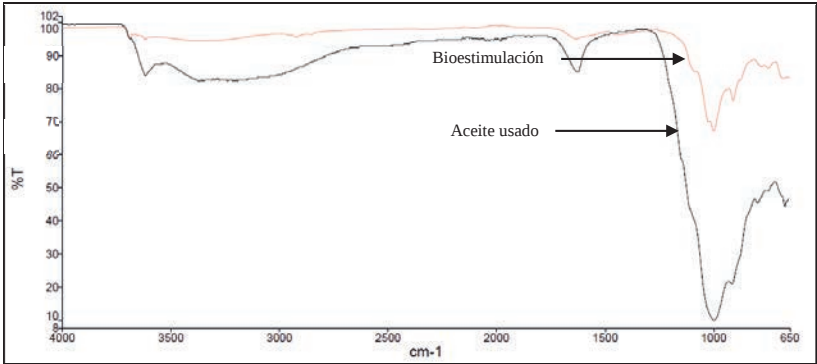


FIGURA 11. ESPECTRO SEMANA 12: TRATAMIENTO DE BIOESTIMULACIÓN

En el caso del proceso de Bioestimulación y de Atenuación Natural, los resultados del análisis espectral indican que este último presentó una eficiencia de remoción dos veces mayor al primero, esto en términos generales es un indicador del alto potencial de la implementación de la atenuación natural para la depuración y control de suelos contaminados con aceites usados, ya que no se requiere el suministro de nutrientes.

Al considerar el tratamiento de Bioestimulación, la eficiencia de remoción de hidrocarburos obtenida ($< 10\%$), es congruente con el valor máximo ($< 54\%$) reportado en la literatura para procesos de biorremediación que adicionan nutrientes derivados de fertilizantes inorgánico, como la urea.

3.3 Recuento de microorganismos heterótrofos

En la figura 12 se presentan los resultados del crecimiento de microorganismos heterótrofos. Los primeros 7 días de tratamiento se obtuvieron densidades microbianas del orden de 2.14×10^9 , 2.76×10^{10} y 5.30×10^{10} , para el Control, el proceso de Atenuación Natural y Bioestimulación, respectivamente. El menor valor (Tratamiento de Control), estuvo influenciado por la adición de HCl durante el inicio de la experimentación, no obstante a diferencia de los demás tratamientos, el control aumentó la densidad microbiana hasta alcanzar un valor de 2.78×10^9 , mientras que en el proceso de Atenuación Natural y de Bioestimulación, disminuyó la cantidad de microorganismos viables a 2.99×10^9 y 1.56×10^{10} , respectivamente.

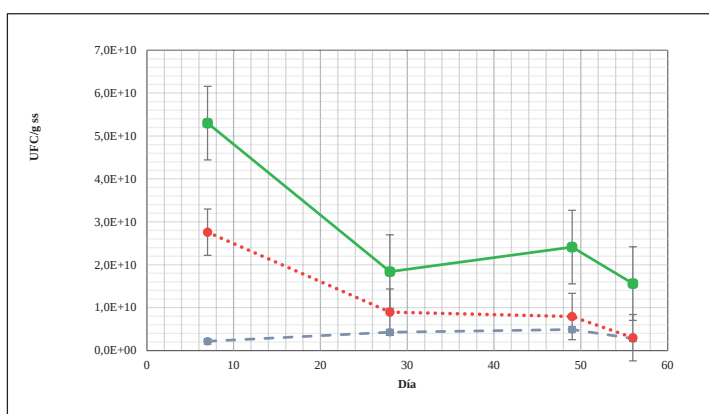


FIGURA 12. RECuento DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS
 Tratamiento A (Control), Tratamiento B (Atenuación Natural),
 Tratamiento C (Bioestimulación); ss, suelo seco

La disminución de la densidad microbiana (bacterias hidrocarbonoclastas) en el proceso de Atenuación Natural y Bioestimulación, podría estar asociada al aumento de la fase de adaptación y de las tasas de decaimiento celular de los microorganismos expuestos al aceite usado, el cual produce cambios a nivel fisiológico acelerando la muerte de muchos organismos. Por su parte el Control Negativo, incrementó sustancialmente su densidad como consecuencia de la selección natural influenciada por la adición del biocida, esto explica adicionalmente el máximo valor obtenido en términos de eficiencia de remoción del aceite usado. Realizando una regresión logarítmica de la curva de crecimiento microbiano del Tratamiento de Control, se obtuvo una tasa máxima de crecimiento microbiano $0,058 \text{ semanas}^{-1}$, lo cual indica que por semana la densidad media de microorganismos crece un 5,8%.

TABLA 7. ANÁLISIS DE VARIANZA (RECuento DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio (μ)	Varianza
Control (A)	4	1.43E+10	3.58E+09	1.56E+18
Atenuación (B)	4	4.75E+10	1.19E+10	1.17E+20
Bioestimulación (C)	4	1.11E+11	2.78E+10	2.95E+20
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
$\mu(A) = \mu(B)$	1.37E+20	2.323	0.178	5.987
$\mu(A) = \mu(C)$	1.17E+21	7.889	0.031	5.987
$\mu(B) = \mu(C)$	5.06E+20	2.456	0.168	5.987

A partir del análisis estadístico efectuado para la estimación de la variación entre tratamientos aplicados (Tabla 7), no se presenta diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento celular del tratamiento de bioestimulación y la atenuación natural, lo cual es congruente con los resultados de respiración del suelo (Respirometría).

3.4 Prueba de Toxicidad Aguda sobre *Eisenia foetida*

Previo al montaje de la prueba de toxicidad se realizó una caracterización fisicoquímica de las muestras de suelos correspondientes a cada tratamiento

realizado, estos resultados junto con los valores de mortalidad de individuos *E. foetida*, son presentados en la Tabla 8.

TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA (RECuento DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS)

Tratamiento	pH	Amonio (mg/kg _{ss})	Nitrato (mg/kg _{ss})	Mortalidad (%)
Control (-)	6.50	15	23	0
Control (+)	6.80	103.37	14.98	0
Atenuación natural	6.27	12.49	15.65	0
Bioestimulación	8.82	525	52.62	100

Con base en los resultados de la prueba de toxicidad, la mortalidad del 0% (<10%) de los individuos presentes en el suelo sin contaminar - Control Negativo, indica que la prueba fue valida ^[52], por consiguiente se puede establecer los siguientes análisis:

- La concentración de 40000 ppm (Control Positivo), no es tóxica para el organismo *E. foetida*, esto es congruente con los estudios realizados por Maike & Filser (2007) y Ameh et al (2011) ^[53], ^[54].
- Tanto el tratamiento Control Negativo, Positivo y Atenuación Natural presentaron una mortalidad del 0%, cuyas características fisicoquímicas se encontraron en las condiciones óptimas de desarrollo de *Eisenia foetida*. No se observaron cambios de color de los organismos, ni presencia superficial del fluido celómico
- La toxicidad de la prueba de Bioestimulación fue ocasionada por el contenido de amonio y valor de Ph, dado a que exceden las condiciones óptimas para el crecimiento del organismo (pH 5-8 y contenido de amonio <500 mg/kg_{ss}).

Esto último se evaluó realizando diferentes diluciones del tratamiento de Bioestimulación, utilizando suelo no contaminado. La dilución 1/10 estuvo en el rango de valores más cercano al desarrollo óptimo de la lombriz roja californiana (*E. foetida*), con un pH de 6.01, contenido de nitrato de 374.25 mg/kg_{ss} y de amonio de 156 mg/L mg/kg_{ss} se obtuvo una mortalidad del 0%.

Vale la pena indicar que esta investigación no se consideró la toxicidad asociada a la presencia de metales pesados presentes en el aceite usado de motor. Los estudios de toxicidad aguda realizados sobre *E. foetida*, demuestran como el exceso de nutrientes puede afectar el ciclo biológico de diferentes especies de organismos en el suelo, ocasionando mayores impactos adversos sobre los ecosistema que el contaminante objetivo.

3.5 Tinción de Gram

Una vez realizado el cultivo en placas, se observó el crecimiento de 5 (cinco) morfotipos reiterativos durante la etapa experimental. Los morfotipos fueron caracterizados a partir de la tinción de Gram.

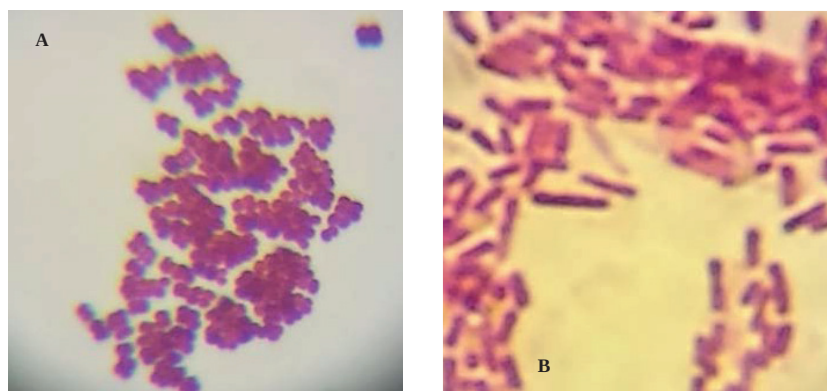


FIGURA 12. A. COCOS GRAM NEGATIVOS, B. BACILOS GRAM NEGATIVOS

De acuerdo con los resultados, en el consorcio microbiano existente, se identifican Cocos y Bacilos Gram negativos, flora con un alto potencial de degradación de hidrocarburos totales de petróleo.

4. Conclusión

Como principales tratamientos para el control de la contaminación asociada a aceites usados de motor en el suelo, se implementó la Atenuación Natural y la Bioestimulación como principales tecnologías de biorremediación. A partir del análisis respirométrico y de organismos heterótrofos hidrocarbonoclastas, se determinó con una significancia del 95%, que la actividad

biológica y de respiración celular ambos tratamientos fueron equivalentes, lo cual en términos económicos (suministro de nutrientes) favorece la implementación del primero en la escala piloto y comercial.

La adición del agente biocida (HCl y Benzoato de sodio) y la esterilización previa del suelo contaminado, influyó en la capacidad de adaptación y selección natural de los microorganismos hidrocarbonoclastas en el tratamiento de control (A), obteniendo mayores tasas de respiración y de crecimiento celular, en el orden de 0.0273 mg CO₂/g suelo seco/día y 0.058 semanas⁻¹, respectivamente. El tratamiento de control en consecuencia, presentó la máxima eficiencia de remoción de hidrocarburos 26.5%, seguido del tratamiento de Atenuación Natural (20%) y de Bioestimulación (10%) durante 12 semanas de tratamiento. La eficiencia de remoción del aceite usado del tratamiento de Bioestimulación fue inferior al valor máximo reportado para procesos de biorremediación que adicionan fertilizantes como fuente de nutrientes.

Los procesos de Atenuación Natural y Bioestimulación, alcanzaron tasas de producción de CO₂ de 0,0268 y 0,0221 mg CO₂/g suelo seco/día, no obstante a diferencia del tratamiento de Control, la densidad de bacterias en cada medio disminuyó en función del tiempo de experimentación, lo cual fue atribuido a la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio contaminado ya que el suelo no fue esterilizado.

A partir de la realización de pruebas de toxicidad sobre el organismo *Eisenia foetida* se determinó el grado de ecotoxicidad del aceite usado de motor. La prueba fue negativa para 40000 ppm del contaminante en el suelo (0% de mortalidad), lo cual es congruente con la información reportada en la literatura.

El pH y la concentración final de amonio en el tratamiento de Bioestimulación (8.82 y 525 mg/Kg_{ss}) produjo la mortalidad de los organismos utilizados en la prueba de toxicidad (*E. foetida*) debido a que se excedieron las condiciones óptimas para el desarrollo de los individuos. Esto último es un indicador de como el exceso de nutrientes puede ocasionar un desequilibrio en los ecosistemas.

5. Agradecimientos

Los autores agradecemos al Programa Jóvenes Investigadores de Colciencias (entidad que financió la investigación mediante la convocatoria 617), a la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por el apoyo a iniciación de jóvenes investigadores; al Laboratorio de Hidráulica y al Ingeniero Luis Fernando Ospina Herrera.

6. Bibliografía

- [1] C. Trasar-Cepeda, M. C. Leirós, and F. Gil-Sotres, Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 32, no. 6, pp. 747–755, Jun. 2000.
- [2] P. van Beelen and A. K. Fleuren-Kemilä, Influence of pH on the toxic effects of zinc, cadmium, and pentachlorophenol on pure cultures of soil microorganisms, *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 16, no. 2, pp. 146–153, 1997.
- [3] E. da C. dos Santos, I. S. Silva, T. H. N. Simões, K. C. M. Simioni, V. M. Oliveira, M. J. Grossman, and L. R. Durrant, Correlation of soil microbial community responses to contamination with crude oil with and without chromium and copper, *Int. Biodegrad. Biodegrad.*, vol. 70, pp. 104–110, May 2012.
- [4] T.H. Maugh, Rerefined oil; an option that saves oil, minimizes pollution, *Science*, vol. 193, pp. 1108–1110, 1976.
- [5] R.G. Stewart, J.L. Helm, The lubricant market in the 1980s. US and the free world (AM-80-25), *Natl. Pet. Refin. Assoc.*, 1980.
- [7] USEPA, Recycling Used Oil: What Can You Do? 1996.
- [6] Organisation Mondiale de la Santé, Quelques dérivés du pétrole, *Critères d'hygiène de l'environnement*, vol. 20, pp. 68–111, 1980.
- [8] Y. M. Luo, "Trends in soil environmental pollution and the prevention-controlling-remediation strategies in China," *Env. Pollut Control*, vol. 31, no. 12, pp. 27–31, 2009.
- [9] R. Vazquez-Duhalt, Environmental impact of used motor oil, *Sci. Total Environ.*, vol. 79, no. 1, pp. 1–23, Feb. 1989.
- [10] A. Schilling, Motor Oils and Engine Lubrication, Scientific Publications, Sci. Publ. GB Ltd BrosleyScientific Publ. GB Ltd Brosley, 1968.
- [11] J.A. O'Brien. Lubricating oil additives, in *ASLE Handbook Series of Lubrication*, Am. Soc. Lubr. Eng., vol. 1.

- [12] G.P. Wood, How crankcase oil additives function, *J Inst Pet.*, vol. 55, pp. 194–204, 1969.
- [13] North Atlantic Treaty Organization, NATO/CCMS pilot study of disposal of hazardous waste, Project Thermal Treatment (NATO/CCMS-118). Brussels, Belgium, 1981.
- [14] D.A. Becker and J.J. Comeford, Recycled oil program phase I: test procedures for recycled oil used as burner fuel. NBS Tech. Note, No. 1130, National Bureau of Standards, shington, DC, U.S.A., 1980.
- [15] F.O. Cotton, M.L. Whisman, J.W. Goetzinger and J.W. Reynolds, Analysis of 30 used motor oils, *Hydrocarb. Process*, pp. 131–140, Sep. 1977.
- [16] J.L. Mumford, G.E. Hatch, R.E. Hall, M.A. Jackson, R.G. Merrill and d. Lewtas, Toxicity of particles emitted from combustion of waste crankcase oil; in vitro and in vivo studies, *Fundam Appl Toxicol*, vol. 7, pp. 522–535, 1976.
- [17] A. Schilling, *Automotive Engine Lubrication*, Sci. Publ. GB Ltd, 1972.
- [18] J.T. Tanacredi, Petroleum hydrocarbons from effluents: detection in marine environment, *J Water Pollut Control Fed*, vol. 49, pp. 216–226, 1977.
- [19] U.S. Environmental Agency, Waste lube oils pose disposal dilemma, *Env. Sci Technol*, vol. 6, pp. 25–26, 1972.
- [20] W. Bentele. The use of radionuclides for cavitation, wear and oil consumption measurements in engine construction, *Kerntechnik*, vol. 14, pp. 584–590, 1972.
- [21] R.L. Raymond, J.O. Hudson and V.W. Jamison, Oil degradation in soil. *Appl Env. Microbiol*, vol. 31, pp. 522–535, 1976.
- [22] R. Vazquez-Duhalt and H. Greppin, Biodegradation of used motor oil by bacteria promotes the solubilization of heavy metals, *Sci. Total Environ.*, vol. 52, no. 1–2, pp. 109–121, Jun. 1986.
- [23] L. Ai, C. Zhang, F. Liao, Y. Wang, M. Li, L. Meng, and J. Jiang, Removal of methylene blue from aqueous solution with magnetite loaded multi-wall carbon nanotube: Kinetic, isotherm and mechanism analysis, *J. Hazard. Mater.*, vol. 198, pp. 282–290, Diciembre 2011.
- [24] J.D. Walker and R.R. Colwell, Microbial petroleum degradation; uses of mixed hydrocarbon substrate, *Appl Microb.*, vol. 27, pp. 1053–1060, 1974.
- [25] D. J. Hoffman, W. C. Eastin Jr., and M. L. Gay, Embryotoxic and biochemical effects of waste crankcase oil on birds' eggs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 63, no. 2, pp. 230–241, Abril 1982.

- [26] Y. Liang, X. Zhang, J. Wang, G, Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China, *J Hazard Mater*, pp. 371–378, 2012.
- [27] Al-Daher, R., El-Nawawy, A., Al-Awadhi, N., “Evaluation of on-site bioremediation of oil-contaminated soil through composting soil piles, Final Report, KISR4625,” *Kuwait Inst. Sci. Res.*, pp. 175–180, 1995.
- [28] Núñez, T., “Obtención, caracterización y aplicación de un product bacteriano para la Biorremediación de derrames de hidrocarburos” Tesis Doctoral, Universidad de la Habana, 2003.
- [29] K. Sang-Jin, J. H. Sohn, D. S. Sim, K. K. Kwon, and T. H. Kim, “The Effects of Bioremediation on the Oil Degradation in Oil Polluted Environments,” in *New Developments in Marine Biotechnology*, Y. L. Gal and H. O. Halvorson, Eds. Springer US, 1998, pp. 181–188.
- [30] M. Alexander, *Biodegradation and Bioremediation*, Second Edition, 2 edition. San Diego: Academic Press, 1999.
- [31] S. Neralla, A. L. Wright, and R. W. Weaver, “Microbial inoculants and fertilization for bioremediation of oil in wetlands,” 1995.
- [32] S.-C. Choi, K.K. Kwon, J.H. Sohn, S.-J. Kim, “Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms,” *J Microbiol Biotechnol*, vol. 12, pp. 431–436, 2002.
- [33] F. A. Uraizee, A. D. Venosa, and M. T. Suidan, “A Model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components,” *Biodegradation*, vol. 8, no. 5, pp. 287–296, Sep. 1997.
- [34] B. J. Reid, C. J. A. MacLeod, P. H. Lee, A. W. J. Morriss, J. D. Stokes, and K. T. Semple, “A simple ^{14}C -respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 196, no. 2, pp. 141–146, 2001.
- [35] O. M. Arrieta, A. P Rivera, L. Arias, B. A. Rojano, O. Ruiz and S. A. Cardona. “Bioremediation of soil with diesel,” *Revista Gestión y Ambiente.*, vol. 15, no. 1, pp. 27–40, 2012.
- [36] J. Havlin, *Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management*. Pearson Prentice Hall, 2005.
- [37] J. Sabaté, M. Viñas, and A. M. Solanas, “Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 54, no. 1, pp. 19–25, Jul. 2004.

- [38] V. Vallejo, L. Salgado, and F. Roldán, "Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 7, no. 2, pp. 67–78, 2005.
- [39] A. Graves, C. Lang, M. Leavitt, "Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water," *Appl Biochem Biotechnol*, pp. 813–826, 1991.
- [40] A. M. A. Fiúza and M. C. C. Vila, "An insight into soil bioremediation through respirometry," *Environ. Int.*, vol. 31, no. 2, pp. 179–183, Feb. 2005.
- [41] T. J. Aspray, D. J. C. Carvalho, and J. C. Philp, "Application of soil slurry respirometry to optimise and subsequently monitor ex situ bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 60, no. 4, pp. 279–284, 2007.
- [42] E. Agudelo, "Un método de gestión ambiental para el tratamiento y la disposición final de un residuo peligroso. Caso: "Tierra Fuller contaminada con aceite dieléctrico", Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- [43] M. Rätty and V. Huhta, "Earthworm communities in birch stands with different origin in central Finland," *Pedobiología*, vol. 48, no. 3, pp. 283–291, May 2004.
- [44] Rapal Uruguay, "Lombriz de tierra, agricultura y agrotóxicos." Sep-2010.
- [45] Organisation for economic cooperation and development, "Draft guideline for the testing of chemicals: earthworm reproduction test (*Eisenia foetida/andrei*)." 2000.
- [46] G. Ávila, H. Gaete, M. Morales, and A. Neaman, "Reproduction of *Eisenia foetida* in agricultural soils from mining areas contaminated with copper and arsenic," *Pesqui. Agropecuária Bras.*, vol. 42, no. 3, pp. 435–441, Mar. 2007.
- [47] J. J. Wilson, J. F. Hatcher, and J. S. Goudey, "Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation," *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità*, vol. 38, no. 2, pp. 143–147, 2002.
- [48] F. H. J. Campesinos, M. R. G. Conde, V. S. Fajardo, F. P. Delgado, and S. P. Aguirre, *MANUAL CRÍA DE LA LOMBRIZ DE TIERRA: una alternativa ecológica y rentable*. Editorial San Pablo, 2005.
- [49] Cookson, J. *Bioremediation Engineering*. Edi. Mc Graw Hill. U.S.A. 1995.
- [50] K. A. Nannipieri, Ed., "5 - Estimation of microbial activities," in *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, London: Academic Press, 1995, pp. 193–270.
- [51] *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, 2008.

- [52] MC Cuevas, R Ferrera, A. Roldán, R. Rodríguez, “Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*,” en *Pruebas en suelos*. Méjico. Pp 211-224.2008.
- [53] M. Schaefer and F. Juliane, “The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 36, no. 1, pp. 53–62, May 2007.
- [54] A. O. Ameh, I.A.I. Mohammed-Dabo, I. Sani ,J. Baba C. Ameh, D.Azienge, and Y. Tanimu, “Earthworm survival in used engine oil contaminated soil spiked with manure,” *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol.5, pp. 923–929, 2011.