

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15
			VERSIÓN	02
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN		FECHA	03/04/2017
			PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): GABRIELA APELLIDOS: MÁRQUEZ CETINA

NOMBRE(S): MISHELL TATIANA APELLIDOS: MARROQUÍN ERAZO

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): PAOLA ANDREA APELLIDOS: ROMÁN HERNÁNDEZ

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE TIBÚ-NORTE DE SANTANDER, CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, UTILIZANDO SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

Se realizaron bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), método de suelo directo (120 horas), para determinar la toxicidad presente en suelos contaminados con hidrocarburos, a partir de cinco tratamientos con diferentes características, se realizaron pruebas de dilución, debido a los altos índices de toxicidad inicialmente. Como resultados, se encontró que el hidrocarburo fue de alto grado de toxicidad, dado que solo en las pruebas de diluciones se logró reducir notablemente la toxicidad; para los tiempos 0, 30 y 60 días, ningún tratamiento se aproximó a estas estimaciones. Sin embargo, algunos tratamientos lograron evidenciar mejoras y reducción de toxicidad aguda y crónica, a su vez, en tratamientos que no se esperaban efectos de toxicidad (Control biótico 1 y 2), hasta el tiempo analizado, la toxicidad aparente no se redujo completamente. Se observó la influencia que ejercen los nutrientes y la materia orgánica, ya que disminuyen la biodisponibilidad y movilidad de hidrocarburos, favoreciendo las variables analizadas (germinación, elongación de hipocótilo e índice de germinación). Esta monografía destaca por ser pionera, ya que el enfoque desarrollado no se ha publicado e implementado dentro de los procesos de tratamiento, o aplicados a los derrames ocurridos o específicamente en la zona de Tibú.

PALABRAS CLAVES: BIOENSAYOS, TRATAMIENTOS, ÍNDICE DE GERMINACIÓN, BIODISPONIBILIDAD, TOXICIDAD AGUDA.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 76 PLANOS: ILUSTRACIONES: CD ROOM:

MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE TIBÚ – NORTE DE SANTANDER,
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, UTILIZANDO SEMILLAS DE LECHUGA
(*Lactuca sativa L.*)

GABRIELA MÁRQUEZ CETINA
MISHELL TATIANA MARROQUÍN ERAZO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER
2020

MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE TIBÚ – NORTE DE SANTANDER,
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, UTILIZANDO SEMILLAS DE LECHUGA
(*Lactuca sativa L.*)

GABRIELA MÁRQUEZ CETINA
MISHELL TATIANA MARROQUÍN ERAZO

Trabajo de grado
Modalidad monografía de investigación para optar por el título de
Ingeniero Biotecnológico

Directora
PAOLA ANDREA ROMAN HERNÁNDEZ
Ingeniera Biotecnológica
Magíster en Dirección de Desarrollo Local

Codirectora
ROMINA ESMERALDA FUENTES DÍAZ
Ingeniera Biotecnológica
Magíster en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER

2020

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 17 DICIEMBRE DE 2020

HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE TIBÚ – NORTE DE SANTANDER, CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, UTILIZANDO SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

MODALIDAD: MONOGRAFIA

JURADO: DORANCÉ BECERRA MORENO
EDWIN JAVIER DUARTE GÓMEZ
JOHN HERMÓGENES SUÁREZ GÉLVEZ

ENTIDAD: UFPS

Director: PAOLA ANDREA ROMAN HERNANDEZ
Codirector: ROMINA ESMERALDA FUENTES DÍAZ

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Gabriela Márquez Cetina	1611239	4.4
Mishell Tatiana Marroquín Erazo	1611250	4.4

OBSERVACIONES: APROBADO.

FIRMA DE LOS JURADOS

Dorance Becerra M.

Edwin Javier Duarte G

John Hermógenes Suárez Gélvez

Dorancé Becerra Moreno

Edwin Javier Duarte Gómez

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular _____



**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

Gabriela Márquez Cetina y Mishell Tatiana Marroquín Erazo, identificadas con la C.C. N.º 1090506260; 1090498192, autores de la tesis y/o trabajo de grado titulado Medición de la toxicidad durante el proceso de biorremediación de suelos provenientes del municipio de Tibú-Norte de Santander, contaminados con hidrocarburos, utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*) presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnólogo; autorizamos a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que **“los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores”**, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Gabriela Márquez Cetina

1090506260

MISHELL MARROQUÍN E.

1090498192

FIRMA Y CÉDULA

Agradecimientos

A Dios, por permitirnos desarrollar y llevar a cabo este proyecto con vitalidad.

A nuestra familia por su constante dedicación y apoyo, velando siempre por nuestro bienestar e impulsándonos a cumplir nuestras metas. Compartimos este gran logro con ustedes.

A las ingenieras Paola Román y Romina Fuentes por su consejo y apoyo a través de la dirección y tutoría de esta investigación, donándonos su valioso tiempo para guiarnos en el cumplimiento eficaz de los objetivos.

Finalmente, a todos nuestros amigos, colegas y aquellas personas que nos brindaron continuamente su apoyo, consejo y conocimiento para enriquecer y cumplir todas las metas y objetivos propuestos.

Contenido

Introducción	13
1. Delimitación del ejercicio de investigación	17
1.1 Planteamiento del problema	17
1.2 Formulación del problema	20
1.3 Justificación	20
1.4 Objetivos	22
1.4.1 Objetivo general	22
1.4.2 Objetivos específicos	22
2. Diseño metodológico	23
2.1 Tipo de investigación	23
2.2 Método de investigación	24
2.2.1. Técnicas de recolección de datos	24
2.2.1.1 Técnicas de análisis	25
2.2.1.2 Instrumentos	25
2.2.1.3 Técnicas para la presentación de datos, tablas y gráficos estadísticos	25
2.2.2 Fuentes de información	26
2.3 Metodología	26
2.3.1. Obtención, control y conservación de las semillas	26
2.3.2. Instalación de los composteros de estudio	26
2.3.3. Análisis del índice de germinación	28
2.3.4. Análisis del índice de germinación- Control negativo (CN)	28
2.3.5. Toma de la muestra en el tiempo establecido	28
2.3.5.1 Evaluación de la toxicidad para la muestra	28
2.3.6. Preparación de diluciones	29

2.3.7. Investigación documental	30
2.4 Estrategia con el medio	30
3. Resultados y Análisis	31
3.1 Examinar la variación de la toxicidad durante el proceso de biorremediación, utilizando como indicador semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa L.</i>)	31
3.1.1 Obtención, control y conservación de las semillas	31
3.1.2 Instalación de los composteros de estudio	32
3.1.3 Análisis del índice de germinación	32
3.1.4 Análisis del índice de germinación-Control negativo (CN)	33
3.1.5. Tiempo de evaluación 0 días	34
3.2 Interpretar la ecotoxicidad de las muestras de suelo contaminado durante el proceso de biorremediación, por medio de indicadores biológicos (<i>Lactuca sativa L.</i>)	36
3.2.1 Análisis de diluciones	36
3.2.2 Tiempo de evaluación 30 días	39
3.2.3 Tiempo de evaluación 60 días	42
3.2.4 Análisis de las variables durante 0, 30 y 60 días	46
3.3 Comparar la implementación de bioensayos en las diferentes muestras de suelo contaminado	47
3.3.1 Investigación documental	48
4. Conclusiones	52
5. Recomendaciones	54
6. Referencias	55
7. Anexos	65

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de proceso para la evaluación de toxicidad de hidrocarburos en suelos empleando <i>Lactuca sativa L.</i>	27
Tabla 2. Preparación de diluciones	30
Tabla 3. Variables de control para el índice de germinación	33
Tabla 4. Interpretación del índice de germinación	35
Tabla 5. Comparación del % de germinación, tiempos 0 y 30 días	40
Tabla 6. Comparación del % de germinación, tiempos 30 y 60 días	45
Tabla 7. Comparación de la elongación de hipocótilos, tiempos 30 y 60 días	45

Lista de figuras

Figura 1. Fuentes hídricas afectadas por el derrame de crudo. Fuente: Google Earth (2019)	
Rutas de derrame y puntos de control operativos por Ecopetrol	20
Figura 2. Semillas seleccionadas para los bioensayos	31
Figura 3. Tratamientos de estudio. De izquierda a derecha; Tratamiento 2 (T2), Tratamiento 1 (T1), Control biótico 1 (CB1), Control biótico 2 (CB2) y Control abiótico (CA) .	32
Figura 4. Prueba de viabilidad y porcentaje de germinación con suelo arcilloso control. De izquierda a derecha se encuentra la muestra R1, R2 y R3	34
Figura 5. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días	34
Figura 6. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días	35
Figura 7. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días	36
Figura 8. Relación del porcentaje de germinación, respecto a las diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación	37
Figura 9. Relación de la longitud de hipocótilo (cm) de los tratamientos analizados, respecto a diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación	38

Figura 10. Relación del índice de germinación (%), respecto a las diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación 39

Figura 11. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días 40

Figura 12. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días 41

Figura 13. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días 442

Figura 14. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días 43

Figura 15. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días 44

Figura 16. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días 45

Figura 17. Índice de germinación para cada tratamiento en el transcurso del proceso de biorremediación (0,30 y 60 días) 46

Lista de anexos

Anexo 1	67
Anexo 2	68
Anexo 3	68
Anexo 4	70
Anexo 5	71
Anexo 6	72
Anexo 7	73
Anexo 8	74
Anexo 9	74
Anexo 10	76

Introducción

Colombia es un país que cuenta con diferentes escenarios, donde se desarrollan nuevos retos para mejorar las condiciones del medio ambiente, esto conlleva a la sensibilización de la problemática generada por un desarrollo sostenible, el cual logre albergar recursos suficientes para las futuras generaciones, ya que en los últimos años, estos se han visto afectados por los focos contaminantes que interfieren con el desarrollo natural del medio ambiente, convirtiéndose en un reto imperativo para analizar, evaluar y generar nuevos proyectos de protección, remediación y prolongación, así como lo propuesto por Vélez Ó. & Londoño A., (2016), a través de su investigación, donde plantean generar una iniciativa para que se establezcan proyectos de investigación e innovación, como resultado de una alianza entre los comités de universidades o empresas, el estado y la sociedad, dado que constituye una oportunidad para que las organizaciones de estos sectores generen soluciones a problemas ambientales y desarrollo sostenible de una manera integral en el país.

Una de las problemáticas con mayor incidencia es la generada por la contaminación con hidrocarburos en suelos, debido a diversas circunstancias; entre estas se encuentran actividades voluntarias, accidentales o atentados por grupos al margen de la ley, en lugares donde las circunstancias dificultan implementar grandes estrategias para mitigar este impacto (Vásquez J., 2016), por ello la biorremediación se convierte en la alternativa de mayor ventaja. Tal como lo señala Ponce D., 2014, ya que este es un proceso dinámico de interacción entre el suelo, el contaminante, la actividad biológica y el clima para inmovilizar, degradar y transformar los constituyentes del contaminante, este proceso se genera a través del metabolismo de diferentes organismos, destacándose las plantas, microorganismos e insectos. Dentro de este estudio se implementó la planta lechuga (*Lactuca sativa L*) como bioindicador, en la medición de toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos obtenidos de Tibú-Norte de Santander, al ser una planta vascular, permite obtener una mayor sensibilidad ante los agentes tóxicos presentes en comparación con otras especies según Pentreath *et al.*, (2015), través de estos resultados se buscó generar una alternativa aplicable en la zona afectada y en otras, donde se presenten problemáticas similares, con el fin de mitigar el impacto tóxico, por medio de una alternativa sostenible que permitirá ser base fundamental en futuros proyectos de investigación en la misma área de estudio.

Como parte de la ejecución, al indagar sobre informes y trabajos que permiten detallar y validar investigaciones con similares propuestas de este estudio, se llevó a cabo una revisión respecto a la contaminación que produce el derrame de petróleo y los impactos medioambientales que esto conlleva, y a su vez, las principales prácticas que permiten esclarecer los impactos toxicológicos generados por el derrame de petróleo. Consecuentemente, se visualizó que existe poca información publicada en el ámbito nacional y local en muestras de suelo contaminado con hidrocarburos. Por consiguiente, se llevó a cabo la descripción de los referentes usados para el desarrollo del presente estudio.

Al evaluar la efectividad de la biorremediación, Chaîneau *et al.*, (2003), evidenciaron que, mediante el establecimiento de condiciones óptimas de biodegradación, se pueden reducir los porcentajes de concentración de hidrocarburos, mediante altas tasas de materia orgánica y arcilla. Por consiguiente, la acción microbiana trabaja directamente sobre la degradación, pero debido a la toxicidad que presentan los suelos, esta acción se puede ver intervenida notoriamente, ya que necesita una constante adición de materia orgánica y nutrientes para sus actividades metabólicas. Con respecto a esto, es correcto afirmar que la sola biodegradación no puede revertir los efectos nocivos sobre el suelo, pero si permite una estimación del impacto toxicológico, dado que no solo afecta el suelo, sino también el ambiente y la salud humana. Referente a los resultados, en las plantas hubo inhibición de la fotosíntesis y realizaron pruebas de bioluminiscencia bacteriana, para determinar el alcance de la toxicidad sobre organismos vivos.

En relación a los fitoindicadores, Rodríguez *et al.*, (2014), en México, precisaron la evaluación de los “Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa L.* en el biomonitoreo de la calidad del agua del río Chalma”. De acuerdo a los resultados, pudieron distinguir tres zonas con afinidad a los componentes fundamentales; como los nutrientes y los índices de toxicidad. En torno a la toxicidad, la parte alta presentó disminución de este parámetro, por lo que, en conjunto con la cantidad de nutrientes, estimularon el desarrollo radicular. La parte media demostró una toxicidad moderada, a causa de que el índice de toxicidad fue el más abreviado. Finalmente, en la parte baja la toxicidad se caracterizó por ser de moderada a baja;

debido al hacinamiento de altas cantidades de compuestos halados por medio de la sucesión de la lixiviación en épocas de lluvia.

Seguidamente en Venezuela, Hernández *et al.*, (2017), llevaron a cabo una investigación sobre “Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales”, argumentando que la toxicidad puede ser variante respecto a las concentraciones de crudo, debido a la composición química. Por ello, realizaron bioensayos a corto plazo en donde las muestras fueron expuestas a suelos contaminados con crecientes concentraciones de crudo y de diferente gravedad API.

Como parte del estudio realizado, evidenciaron que los crudos de menor gravedad API, son menos tóxicos, con esta disminución, las semillas lograron germinar en concentraciones más altas de crudo. De manera contraria, al aumentar la gravedad API, se presentó un menor índice de germinación y por ende mayor incidencia sobre la elongación de la radícula. Finalmente, los resultados mostraron que al aumentar la concentración y gravedad API, disminuyeron los índices de germinación y crecimiento, obteniendo un efecto más tóxico, debido a un mayor contenido de compuestos aromáticos y saturados.

En esta perspectiva, Yáñez S., (2015), desarrolló la “Evaluación fitotóxica de suelos con diferentes porcentajes de hidrocarburo obtenidos de la planta de biorremediación de aseo urbano S.A.S E.S.P, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*). Analizaron el efecto fitotóxico de suelos contaminados con diferentes porcentajes de hidrocarburo, obtenidos de la planta de biorremediación del Parque Ambiental.

Para la recopilación de datos congruentes, los sustratos estudiados fueron sometidos a análisis fisicoquímicos para conocer sus características, tuvieron en cuenta variables como altura de la planta, número de hojas y longitud de raíces (estos dos últimos para el caso de *Lactuca sativa L.*), como indicadores de fitotoxicidad. Los resultados obtenidos a través del tratamiento con suelo biorremediado y compost, fueron mejores sobre el índice de crecimiento, concretamente para la longitud de la raíz y la altura de lechuga. En cuanto al suelo contaminado, los índices de crecimiento fueron bastante deplorables con respecto a la longitud de la raíz y número de hojas de la lechuga.

Según los aspectos obtenidos, evidenciaron que, en la etapa final de biorremediación, el suelo tratado, potenció el crecimiento de las plantas.

Las bases sobre las que se fundamentan estas investigaciones son altamente solemnes, debido a la practicidad y efectividad que la integran. Puesto que, engloba una temática que pocos quieren considerar, debido a la economía que se maneja sobre las investigaciones. También generan consideraciones fundamentales para la metodología e interpretación de datos, debido a las fuentes con las que desarrollaron el cumplimiento de los objetivos.

Paralelamente, estas evidencias permiten distinguir diferentes tipos de evaluación de los peligros ecotoxicológicos, ya que los bioensayos con *Lactuca sativa L.* suscitan respuestas biológicas constituidas por la exposición de semillas a diferentes tipos de compuestos. Debido a las especificaciones y parámetros planteados en las investigaciones anteriormente mencionadas, enrolla gran relevancia que permite establecer relaciones e ideas de cómo se trató y cómo se analizan los problemas generados por estos derrames.

1. Delimitación del ejercicio de investigación

En Colombia, cada año se presentan numerosos daños que afectan el oleoducto que atraviesa nuestro país, específicamente en el oleoducto Caño Limón Coveñas, en Tibú, Norte de Santander, de acuerdo a Ecopetrol (2020), este ha sufrido más de 1.500 atentados terroristas en 33 años, generando el derrame de cerca de 3,7 millones de barriles de crudo en suelos, quebradas y ríos. debido a esta situación, esta investigación surge con la iniciativa de generar una alternativa amigable con el medio ambiente; que permita mitigar el impacto generado en el suelo afectado, implementando como bioindicador en el proceso de biorremediación a la lechuga (*Lactuca sativa* L.).

1.1 Planteamiento del problema

Los derrames de petróleo generan acumulación de hidrocarburos en el suelo, contribuyendo a la contaminación a largo plazo de fuentes hídricas, fauna, la flora, la salud humana y los recursos naturales (Casallas S. & González M., 2020), estos derrames pueden ocurrir debido al rompimiento de oleoductos, accidentes de vehículos que transportan el petróleo en tanques en las carreteras, por derrames de petróleo de los tanques de almacenamiento o por daños a los oleoductos (Chaîneau *et al.*, 2003; Rivera Y. & Dendooven L., 2004). Teniendo en cuenta lo anterior, cabe resaltar que la entidad Ecopetrol, desde sus inicios ha sido víctima de este tipo de ataques, de alrededor de unas 3.000 veces, generando así un estimado de 3,7 millones de barriles de crudo derramados, la magnitud de los daños ha sido gigantesca (Pardo T., 2018). Esto genera afectaciones en mayor medida, cuando no se cumplen o no se asumen las responsabilidades correspondientes frente a estos graves impactos generados por la voladura de oleoductos, debido a que no realizan ningún tipo de investigación, monitoreo o seguimiento, ni actúan para buscar la recuperación de los suelos, fauna y vegetación; así mismo no realizan inventarios de recursos ambientales afectados, ni planes para su recuperación.

El Catatumbo es una región de Norte de Santander que ha enfrentado a través de la historia, conflictos sociales, políticos y económicos que han afectado consecuentemente al medio ambiente y la población, las secuelas generadas por estos conflictos han impactado en el estado benéfico de

los recursos y el medio ambiente, así mismo en la calidad que gozan los habitantes de los diferentes municipios; al conectarse a través del abastecimiento de los diferentes recursos, tales como el recurso hídrico y recurso suelo, que han sido los principalmente afectados en el área. Por ello como lo establece Arenas D., (2018), es vital establecer e implementar planes de contingencia con el fin de prevenir grandes desastres antes de que se presente, postulando métodos compatibles con el medio ambiente y así no generar más daños de los ya causados.

Según Guerrero M., (2016), las causas como remoción de masas, voladuras y ruptura de válvulas clandestinas, han liberado en grandes cantidades hidrocarburos que afectan la optimización de los recursos en sus estados libres, contaminando y alterando su estructura. Al presentarse diferentes y repetitivos eventos a lo largo del tiempo se conoce que en 2017 se llegó a contaminar con 18.000 barriles, el recurso hídrico y consecuentemente el recurso suelo, esta afectación genera cambios drásticos en las condiciones presentes para la macro y microbiota vigente en estos recursos.

El área donde se extrajo la muestra, se encuentra ubicada específicamente en la vereda Campo Seis (Figura 1), hasta el momento de la toma de muestra en el año 2019, se presentaron más de 5 ataques al oleoducto Caño Limón-Coveñas, generando así derrames de crudo; afectando directamente fuentes hídricas como el río Tibú y Tibucito, que alimenta el sitio turístico Pozo Azul (Redacción Nacional, 2019). En base a lo anterior, el panorama de estos sitios se encuentra en estado de emergencia, debido a las constantes suspensiones de agua potable, los lixiviados generados que llegan a fuentes hídricas y la disminución de ecosistemas.

A la contaminación del suelo por petróleo se le atribuye la alteración del crecimiento vegetal (Rivera *et al.*, 2005) y niveles más altos de metales en los sedimentos afectados, especialmente Cr, Cu, Mn, Pb y Zn (Siebe *et al.*, 2005). Cuando el suelo es alterado por diversos elementos, este cambia su riqueza nutricional, sus niveles de estabilidad y su utilidad. Por consiguiente, la contaminación que afecta el suelo perjudica directamente a la población que en él habita.

A menudo, los suelos de agricultura son los que más afectados se ven con este tipo de contaminación. Los compuestos tóxicos inciden arduamente sobre la consistencia y composición

del suelo, desintegrando las cualidades que lo hacen óptimo para el normal desarrollo de diferentes especies; como comunidades microbianas e insectos, en los que el suelo es su hábitat y hasta las plantas están expuestas a estos deterioros; a causa de que la absorción de nutrientes es por medio de la raíz, si no se cuenta con la cantidad y especificidad necesaria de nutrientes, no puede llevar a cabo sus funciones fisiológicas (Lin *et al.*, 2002).

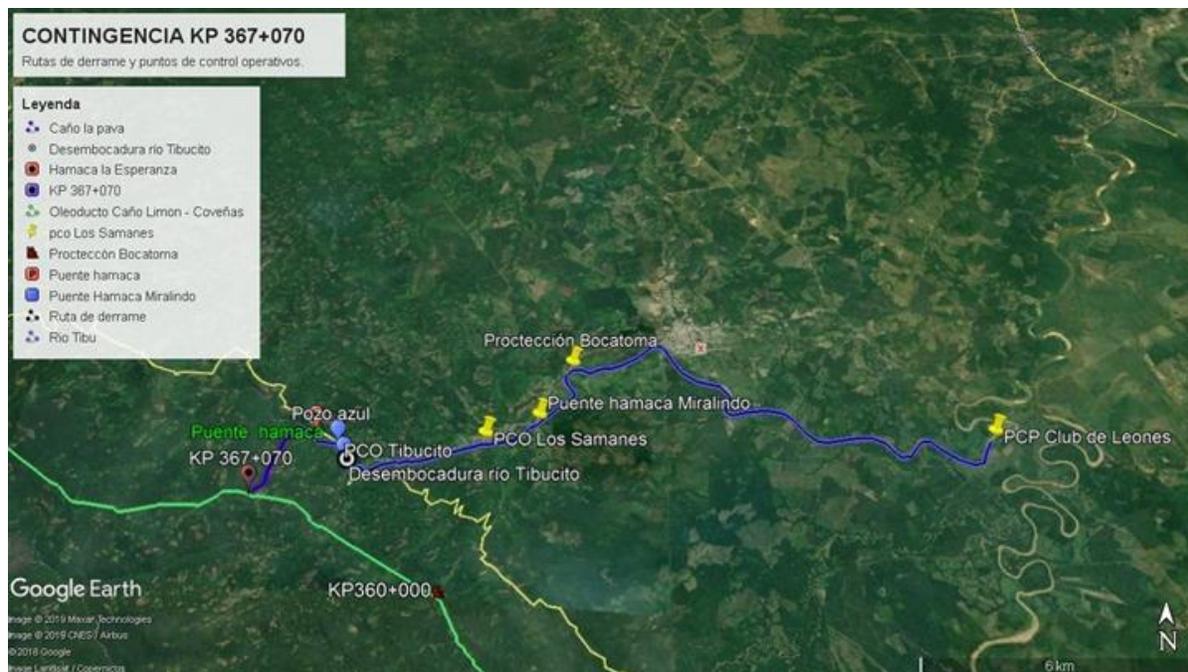


Figura 1. Fuentes hídricas afectadas por el derrame de crudo. Fuente: Google Earth (2019) Rutas de derrame y puntos de control operativos por Ecopetrol.

La fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la evaluación, análisis y descripción de la germinación y desarrollo de algunas plántulas. Debido a la sensibilidad de esta etapa de desarrollo; la estimación de la tolerancia a la contaminación, es clara, ya que puede inhibir gradualmente las funciones metabólicas de las semillas (Hubálek *et al.*, 2007). Paralelamente, los estudios coinciden en que el grado de toxicidad que se puede presentar en las plantas, está relacionado con la complejidad de los compuestos orgánicos. En cada crudo, varía la composición química y a su vez puede generar una gran variedad de efectos sobre los organismos. Al estimar la toxicidad que pueden presentar las especies vegetales por medio de los bioensayos, es pertinente recurrir a métodos de degradación o transformación de estos compuestos tóxicos (Hubálek *et al.*).

Las plantas presentan un sinnúmero de beneficios, que, gracias a su metabolismo y rápida adaptabilidad a condiciones adversas, pueden ser implementadas como fitorremediadoras.

La finalidad del proyecto es el mejoramiento del panorama nacional y a su vez, la mejora del sitio en particular. Este trabajo no solo se enfoca en la estimación de la toxicidad de hidrocarburos a través de las semillas de lechuga, sino en ser un apoyo en lo posible, para respectivos tratamientos que se le puede dar al suelo por medio de la biorremediación.

1.2 Formulación del problema

¿La aplicación de bioensayos con semillas de lechuga permitirá analizar la toxicidad durante el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos?

1.3. Justificación

La región del Catatumbo posee gran riqueza y biodiversidad biológica por ser un remanente de la selva húmeda tropical, dentro de este, habitan muchas especies y seres humanos que se desenvuelven en zonas cercanas al Oleoducto Caño Limón-Coveñas; el cual es de gran importancia para la región. Debido al impacto que genera, se convierte en un medio de atractivo para grupos con problemas sociales y políticos, que buscan justificar sus actos al perjudicar la integridad del oleoducto, generando daños de impacto ambiental a los habitantes y especies cercanas, así lo relaciona Guerrero M., (2018), en su estudio, donde estableció que uno de los fenómenos que afecta en gran proporción la industria de petróleo en Colombia, son las interrupciones de la cadena de suministro por interferencias externas como la voladura de oleoductos en zonas de difícil acceso con la generación de daños ambiental por derrame de crudo sobre suelos y aguas.

Los atentados al Oleoducto Caño Limón-Coveñas han crecido exponencialmente en los últimos años, Méndez C., (2019), en su análisis indica que hasta el 2018 se presentaron 1.500 atentados por parte de grupos armados ilegales, siendo un promedio de 50 atentados por año. Las

consecuencias de estos actos son negativas para el ecosistema, dado que los derrames representan una de las principales causas de contaminación de las corrientes hídricas, ocasionando la mortalidad de especies acuáticas, la contaminación del suelo y mortalidad vegetal (Calao J., 2007). La contaminación hídrica afecta a la población, puesto que no se han implementado procesos de tratamiento de este recurso vital, y consecuentemente las sustancias tóxicas son capaces de penetrar el suelo; generando una inestabilidad de crecimiento y desarrollo para las plantas e igualmente actuando como una sustancia nociva para la microbiota que se desarrolla en él.

Cuando el derrame se produce en el recurso suelo, este tiende a formar una capa que va limitando la porosidad, este fenómeno se debe según Herrero M., (2016), a las propiedades hidrofóbicas de muchos contaminantes orgánicos; tales como la mayoría de los componentes del petróleo, PCBs, PAHs (naftaleno, pireno, fluoreno, entre otros), que tienden a unirse al suelo en su fracción orgánica, limitando el intercambio de gases y nutrientes del suelo. Por consiguiente, afectando directamente la fauna y flora, debido a la ausencia de recursos disponibles, sumando a esto, si ocurren derrames en medios acuáticos, los daños no disminuyen; afectando el intercambio de oxígeno, acumulación de sedimentos e interrupciones en los ciclos fotosintéticos (Corzo M., 2017).

La correcta investigación, ha demostrado que se puede trabajar sobre la eliminación de hidrocarburos, mediante tratamientos biológicos, como la biorremediación cuando los requisitos ambientales son ideales (Pino *et al.*, 2012). Debido a la amenaza que representa la contaminación con hidrocarburos para el medio ambiente, surgió este proyecto de biorremediación con el fin de medir la toxicidad e impacto negativo generado en el suelo a través de la lechuga (*Lactuca sativa L.*) como bioindicador, basados en el mecanismo de acción del mismo; el cual puede desarrollarse gracias a sus semillas vasculares y altos índices de sensibilidad a diferentes tipos de contaminantes (metales, pesticidas y otros compuestos) como lo añade Sobrero M., (2010); por ende, estas características evidencian la trascendencia de los niveles de toxicidad en el suelo y su influencia en las especies vegetales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Analizar la variación de la toxicidad durante el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes del Municipio de Tibú, Norte de Santander.

1.4.2 Objetivos Específicos

Examinar la variación de la toxicidad durante el proceso de biorremediación, utilizando como indicador semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Interpretar la ecotoxicidad de las muestras de suelo contaminado durante el proceso de biorremediación, por medio de indicadores biológicos (*Lactuca sativa* L.).

Comparar la implementación de bioensayos en las diferentes muestras de suelo contaminado.

2. Diseño metodológico

El proyecto que se desarrolló forma parte de un macro proyecto emprendido por el semillero SIBIOAM. Para el desarrollo de este proyecto se analizaron parámetros como porcentaje de germinación, crecimiento de la raíz (radícula) y del tallo (hipocótilo) y el índice de germinación; que permitieron conocer el avance del proceso de biorremediación en las fases de estudio establecidas (0,30 y 60 días). Así mismo una vez registrados los resultados se analizaron con el programa STATGRAPHICS CENTURION XV, mediante un análisis de ANOVA y parte de estos, se compararon con artículos y trabajos investigativos (basados en la implementación de bioensayos con *Lactuca sativa L.*) encontrados a través de las plataformas de investigación de la biblioteca virtual Eduardo Cote Lamus.

2.1 Tipo de investigación

La investigación fue de tipo experimental y descriptiva, teniendo en cuenta que se evaluó la toxicidad de los suelos contaminados con hidrocarburos, a través de bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), con el fin de analizar las condiciones del suelo después de estar sometido al proceso de biorremediación. A nivel teórico, se referenció a Hernández, Fernández y Baptista, (2003), quienes consideran que la investigación experimental se ocupa de la orientación dirigida a los cambios y desarrollos de las ciencias naturales; manipula una o varias variables independientes, ejerciendo el máximo control. Su metodología es generalmente cuantitativa. Emplea muestras representativas, diseño experimental como estrategia de control y metodología cuantitativa para analizar los datos.

Así mismo, se considera descriptiva porque se especificaron los resultados obtenidos a partir de los ensayos de laboratorio durante el proceso de biorremediación. Lo anterior, fundamentado en Hernández, Fernández y Baptista, ya que se efectuó cuando se describieron, en todos sus componentes principales.

Este proyecto integró un macroproyecto del Semillero de Investigación de Biotecnología Ambiental (SIBIOAM), el cual busca generar estrategias de bienestar para el tratamiento de suelos

contaminados con hidrocarburos, por lo tanto, hicieron parte del mismo los proyectos; Evaluación de la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos por bioestimulación, en el municipio de Tibú, Norte de Santander y Caracterización de microorganismos presentes en el proceso de biorremediación como alternativa para la recuperación de suelos del municipio de Tibú, Norte de Santander, contaminados con hidrocarburos.

2.2 Método de investigación

2.2.1 Técnicas de recolección de datos

La evaluación de la toxicidad del suelo se determinó a través de la tolerancia de la planta a los compuestos tóxicos, utilizando el porcentaje de germinación, crecimiento de la raíz (radícula) y del tallo (hipocótilo) como parámetros. Para determinar el porcentaje de germinación se empleó la siguiente ecuación:

$$\%Germinación = \left(\frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas totales}} \right) * 100$$

El ensayo de toxicidad se evaluó a los 0, 30 y 60 días. El montaje se mantuvo en oscuridad y se almacenó en una incubadora de oxitop a una temperatura de 17+/- 2° C (Visser S. & Danielson R., 1995).

El índice de germinación (IG) posee la ventaja integrar parámetros como el número de semillas germinadas y elongación de radícula e hipocótilo, a su vez permite la evaluación de toxicidad baja que afecta el crecimiento del hipocótilo y la toxicidad pesada que afecta la germinación (Celis *et al.*, 2006), a través de la expresión:

$$IG = \frac{G * L}{G_C * L_C} * 100$$

donde, IG es el índice de germinación (%), G es el promedio de las semillas germinadas en la muestra, G_C es el promedio de las semillas germinadas en el control negativo, L es el promedio de longitud del hipocótilo en la muestra (cm), y L_C es el promedio de longitud del hipocótilo en el control negativo (cm).

Para la medición de la longitud de la raíz y el hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa* L. germinadas (considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula), se extrajo la plántula de lechuga de la caja de Petri y se colocó sobre papel milimetrado, cuidadosamente se determinó la longitud de las partes en estudio, tomando la longitud de la raíz como la distancia desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La elongación del hipocótilo se midió desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

2.2.1.1 Técnicas de análisis

Los resultados fueron tabulados, registrados y analizados de forma gráfica y porcentual, además de la descripción de los mismos, basándose en las etapas señaladas.

2.2.1.2 Instrumentos

Para la toma de muestras de los análisis, se realizó un formato de registro con las variables esenciales, mediante la tabulación de los resultados la longitud de hipocótilo y la radícula de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), también se tuvieron en cuenta la cantidad de semillas que germinaron en los tiempos que se establecieron para el análisis, el Anexo 1 es una muestra del formato de registro.

2.2.1.3 Técnicas para la presentación de datos, tablas y gráficos estadísticos

Para la determinación del índice de germinación, porcentaje de germinación, elongación de hipocótilo y radícula, se utilizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial, evaluando cada una de las variables en relación a los diferentes tratamientos y tiempos de evaluación empleados. Los resultados fueron evaluados utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV, mediante un análisis de ANOVA y el test de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza.

2.2.2 Fuentes de información

Para el desarrollo del objetivo en modalidad monografía de investigación se indagaron y analizaron publicaciones y artículos científicos relacionados con el tema de estudio, esto, a través de las diferentes bases de suscripción (Web of Science, Scopus y ScienceDirect) otorgadas por la

Biblioteca Eduardo Cote Lamus (Biblioteca virtual), seleccionando los artículos que abarcaran mayor información descriptiva de los procesos utilizando bioensayos, específicamente los que implementaron como bioindicador la semilla de *Lactuca sativa L.*

2.3 Metodología

Para el cumplimiento eficaz de la misma, se desarrollaron los objetivos 1 y 2 de forma experimental con la modalidad investigación dentro del laboratorio de biotecnología general en la sede Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander y el tercer objetivo se modificó debido a la emergencia sanitaria actual por COVID19 (SARS-CoV-2) a modalidad monografía según Acta No 21, expedida por el Comité curricular de Ingeniería Biotecnológica con el fin de ejecutar el mismo de forma documental (Anexo 2).

2.3.1 Obtención, control y conservación de las semillas

La obtención de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) se realizó a través de semilleros locales, partiendo de características específicas para adquirir un producto de calidad, dentro de estas se encuentran emplear semillas que no hayan sido expuestas a fungicidas o plaguicidas, que presenten baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo y buen poder germinativo. Así mismo, una vez seleccionadas y obtenidas las 200 semillas se conservaron a temperatura ambiente, sin exposición a la luz solar y diversos factores ambientales que generaran contaminación.

2.3.2 Instalación de los composteros de estudio

Para el inicio del proyecto fue necesario tener en cuenta los factores de medición a partir del suelo muestra obtenido, determinándose 5 tratamientos de estudio, los tiempos establecidos para la toma de muestra fueron 0, 30, 60 y 90 días, los cuales se evaluaron por triplicado, para ello fue necesario calcular las condiciones del proceso para cada uno, tomando como referencia que la base cálculo es 1000 g, la relación carbono, nitrógeno y fósforo es; C/N (60) y C/P (800), la humedad 60% cc y materia orgánica al 15% (Fuentes R., 2019). Posteriormente se establecieron los componentes de los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de medición

<i>Compostero a estudiar</i>	<i>Contenido</i>	<i>Nutrientes</i>	<i>Medición</i>
Control Abiótico (CA)	Suelo contaminado + HgCl ₂	Nitrógeno Fosforo	Procesos físicos
Control Biótico 1 (CB ₁)	Suelo nativo		Microorganismos nativos
Control Biótico 2 (CB ₂)	Suelo nativo + Materia orgánica	Nitrógeno Fosforo	
Tratamiento 1 (T ₁)	Suelo contaminado	Nitrógeno Fosforo	Procesos biológicos
Tratamiento 2 (T ₂)	Suelo contaminado + Materia orgánica	Nitrógeno Fosforo	Procesos biológicos con materia orgánica

Evaluación del proceso

Tabla 2. Condiciones de proceso para la evaluación de toxicidad de hidrocarburos en suelos empleando *Lactuca sativa* L.

Parámetro	Condición
Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Cantidad de muestra	5 gramos
Agua de dilución	Agua mineral
Semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Tiempo de incubación	120 h
Aceptabilidad de los resultados	Germinación control negativo (>90%)

Fuente: Biotratamiento y Biorremediación (I sem/19) MSc. Romina Fuentes.

2.3.3 Análisis del índice de germinación

Las semillas usadas durante todo el proceso cumplieron con criterios pertinentes como el porcentaje de germinación, especie y disponibilidad de cantidad para el estudio; una vez obtenidas las semillas se analizó el índice de germinación con el suelo muestra CB₁. Inicialmente, se agregaron 5g de suelo contaminado en la caja Petri y se adicionaron 10 mL de agua mineral hasta

obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se añadieron 20 semillas cuidadosamente, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir el crecimiento de las raíces. El proceso se realizó por triplicado y una vez finalizado se envolvieron las cajas evitando contaminación y pérdida de humedad. Se llevaron a incubación en oscuridad a 22°C durante 120 horas (5 días). Finalizado el periodo de incubación se procedió a la lectura de los resultados obtenidos.

2.3.4 Análisis del índice de germinación- Control negativo (CN)

Debido a los resultados obtenidos en la primera prueba de índice de germinación, fue requerido conocer la causa del problema (semillas o cantidad contaminante en el suelo), para esto se realiza nuevamente la prueba con un suelo nuevo obtenido del municipio de Los Patios del cual ya se conocía una germinación favorable con las semillas, se realizó el mismo procedimiento detallado en el numeral 2.2.3.

2.3.5 Toma de la muestra en el tiempo establecido

Una vez organizados los composteros de estudio se tomó la muestra correspondiente (0 días), para ello se pesó en la balanza analítica 150 g de suelo de cada compostero, los cuales fueron almacenados en bolsas ziploc debidamente rotuladas, se refrigeraron para su conservación y posteriormente realizar su análisis. Este procedimiento se realizó en cada toma de muestra obtenida de acuerdo al tiempo de estudio (0, 30, 60 y 90 días).

2.3.5.1 Evaluación de la toxicidad para la muestra

Una vez desarrollado el procedimiento del numeral 2.2.3 se tomaron los datos pertinentes (número de semillas germinadas, longitud de hipocótilo y radícula) los cuales fueron tabulados en la base de datos para su posterior análisis.

2.3.6 Preparación de diluciones

Esta se basa en evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Se realizaron los cálculos para conocer los gramos necesarios de los diferentes tipos de suelo (suelo control negativo (CN) y suelo de tratamiento) para las diluciones 40%, 60% y 80% (Tabla 3).

Cálculos

Las diluciones se realizaron de acuerdo a una regla de tres simple, dado que los gramos de suelo que se usan son 5, para las diluciones, los gramos (gr) a usar fueron:

$$40\% = \frac{40 * 5 \text{ gr}}{100} = 2 \text{ gr} \quad 60\% = \frac{60 * 5 \text{ gr}}{100} = 3 \text{ gr} \quad 80\% = \frac{80 * 5 \text{ gr}}{100} = 4 \text{ gr}$$

Por lo tanto, las diluciones se establecieron de la siguiente manera:

Tabla 1. *Preparación de diluciones*

Concentración	Muestra
40%	2 gr suelo de tratamiento + 3 gr suelo (CN)
60%	3 gr suelo de tratamiento + 2 gr suelo (CN)
80%	4 gr suelo de tratamiento + 1 gr suelo (CN)

Procedimos a pesar en balanza analítica las cantidades establecidas para cada suelo y se agregaron en una caja Petri homogenizando con agua. Seguidamente, se añadieron las 20 semillas a cada una de las cajas dejando espacio suficiente entre ellas para permitir el crecimiento de las raíces. Luego, se rotularon cada las cajas Petri, ya que el procedimiento se debe realizar por triplicado. Finalmente se llevaron a incubación en a 22° C durante 120 horas (5 días). Finalizado el periodo de incubación se procedio a la lectura de los resultados obtenidos.

2.3.7 Investigación documental

Con el fin de conocer y establecer una relación en los diferentes trabajos, publicaciones e investigaciones relacionadas con la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, en los que implementan como bioindicador *Lactuca sativa L.*, se realizaron diferentes jornadas de investigación, a través de las diferentes bases de suscripción (Web of Science, Scopus y ScienceDirect) otorgadas por la Biblioteca Eduardo Cote Lamus (biblioteca virtual), seleccionando

aquellas que cumplieran con los requisitos de estudio de la monografía actual (bioindicador y recurso contaminado).

2.4 Estrategia con el medio

El trabajo que se desarrolló a través de este proyecto, fue basado en la necesidad que surge debido a la gran contaminación que se presenta en la región de Tibú - Norte de Santander, cuando se generan derrames de hidrocarburos en la zona, por ello, el enfoque esencial de esta investigación fue la búsqueda de una alternativa sostenible, que permitiera disminuir el impacto provocado por estos contaminantes en el suelo y el medio ambiente.

Dentro de la investigación, se incorporó como bioindicador la lechuga (*Lactuca sativa L*) en el proceso de biorremediación, y a través de esta, se obtuvieron resultados promisorios aplicando metodologías versátiles. El análisis de los resultados presentes, permiten proyectar esta metodología como una herramienta de fácil acceso, dado sus procesos operativos y los resultados obtenidos, que permiten mitigar el impacto generado, siendo una alternativa sustentable. Debido a la emergencia sanitaria actual, las fases de investigación no fueron llevadas a término, por ello, este trabajo se convierte en un reto de interés para ser finalizado en sus etapas de estudio, y a su vez, ser propuesto como una alternativa ante las situaciones contaminantes generadas en la región.

3.1.2 Instalación de los composteros de estudio

Se llevó a cabo el respectivo establecimiento de los tratamientos, cada uno con las especificaciones sobre cantidad de suelo contaminado, suelo nativo, tipo de control, bases de cálculo, humedad, materia orgánica, relaciones de C/N y C/P.

Una vez realizados los cálculos pertinentes se preparan los composteros, pesando el suelo muestra y los demás componentes en una balanza analítica para obtener mayor precisión, fueron rotulados cada uno con el fin de identificarlos de acuerdo al tratamiento de estudio y se procedió a ubicarlos en un lugar donde las condiciones ambientales pudieran estar controladas en la medida de lo posible; como exposición al sol, temperatura ambiente y protegido de factores externos que puedan generar contaminación.



Figura 3. Tratamientos de estudio. De izquierda a derecha; Tratamiento 2 (T2), Tratamiento 1 (T1), Control biótico 1 (CB1), Control biótico 2 (CB2) y Control abiótico (CA).

3.1.3 Análisis del índice de germinación

Después del tiempo de incubación se realizó la respectiva lectura, la cual no presentó germinación en ninguna réplica, las semillas no intentaron siquiera brotar. Generando así, dudas sobre las semillas y el suelo, ya que posiblemente el porcentaje de germinación que indica su empaque se podría ver afectado por la conservación y manejo de semillas; en cuanto al suelo, se sospechó que contenía trazas de petróleo debido a la zona de toma de muestra.

3.1.4 Análisis del índice de germinación - Control negativo (CN)

Se realizó una segunda prueba con un suelo que no ha tenido contacto con el petróleo, con el fin de evidenciar si el control biótico contiene trazas de petróleo, debido al grado de germinación. Al realizar la lectura se confirmaron las sospechas sobre el anterior suelo, ya que la cantidad de semillas germinadas fueron considerables.



Figura 4. Prueba de viabilidad y porcentaje de germinación con suelo arcilloso control. De izquierda a derecha se encuentra la muestra R1, R2 y R3.

Para el cálculo del índice de germinación, se tiene en cuenta el promedio de las semillas germinadas y sus respectivas longitudes, a continuación, se especifica la ecuación a utilizar:

$$IG = \frac{G * L}{G_C * L_C} * 100$$

Tabla 3. Variables de control para el índice de germinación.

Control negativo (CN)	
Germinadas	Longitud (cm)
$R_1 = 14$	$R_1 = 3,5143$
$R_2 = 13$	$R_2 = 2,5846$
$R_3 = 17$	$R_3 = 4,1412$
$G = \frac{14 + 13 + 17}{60} = 0,7333$	$L = \frac{3,51 + 2,58 + 4,14}{3}$
$0,7333 \times 100 = 73,33\%$	$= 3,41335 \text{ cm}$

Por lo tanto, la ecuación es:

$$IG = \frac{G * L}{0,7333 * 3,41335} * 100$$

3.1.5 Tiempo de evaluación 0 días

En la Figura 5, se puede apreciar la variación del porcentaje de germinación respecto a cada tratamiento trabajado, en la cual resalta el componente tóxico presente en la mayoría (CA, CB₁, T₁ y T₂), de modo que presentaron una germinación inferior al 20%. A pesar de que el CB₁ (control biótico 1) no presenta crudo, la germinación se vio afectada por la posibilidad de que este suelo contenga trazas de crudo por anteriores exposiciones a derrames, por lo tanto, procedimos a trabajar con un suelo sin antecedentes tóxicos, siendo denominado control negativo para toxicidad (CN).

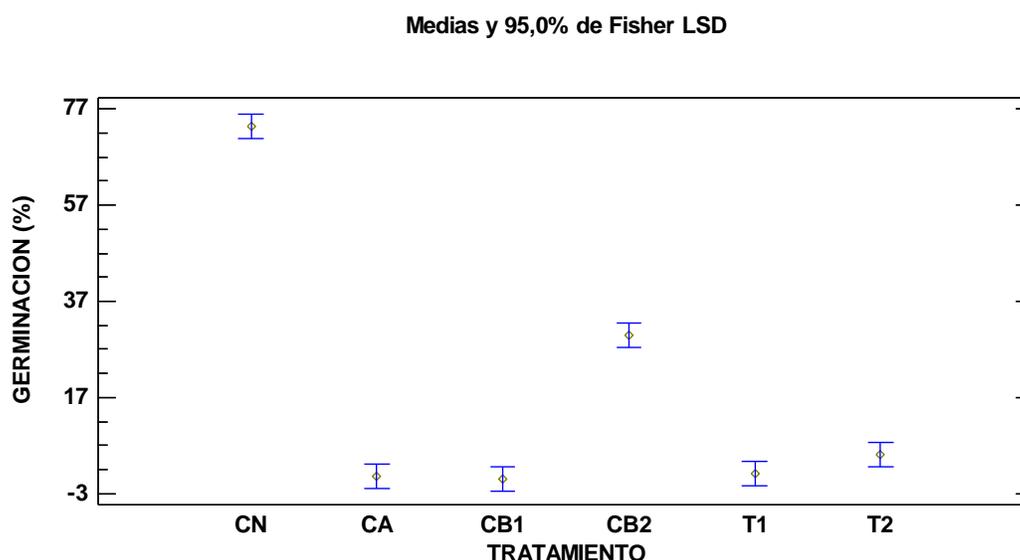


Figura 5. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días.

Teniendo en cuenta la constitución de los tratamientos (Tabla 1), destaca el CB₂ (control biótico 2) al presentar una germinación alta, a pesar de esto, se mantiene <50%, por la posible presencia de componentes tóxicos en la muestra de suelo nativo. A nivel general, durante este análisis resalta un efecto de toxicidad aguda, debido a la muerte del embrión o posibles retrasos en el proceso de germinación, por efecto del suelo contaminado. Seguidamente, la prueba de múltiples rangos señaló la existencia de grupos homogéneos, el más grande conformado por CA, CB₁, T₁ y T₂, que son quienes presentaron menor germinación (Anexo 3).

Respecto a la longitud del hipocotilo en los tratamientos, estos tuvieron ciertas variaciones (Figura 6), pero aún así, siguen manteniéndose dentro de los grupos homogéneos anteriormente

resaltados, lo que indica la sensibilidad a componentes tóxicos para la elongación de radícula e hipocótilo, que es interpretada como toxicidad crónica en el tiempo de evaluación, esto, respecto a los datos obtenidos del tratamiento CN.

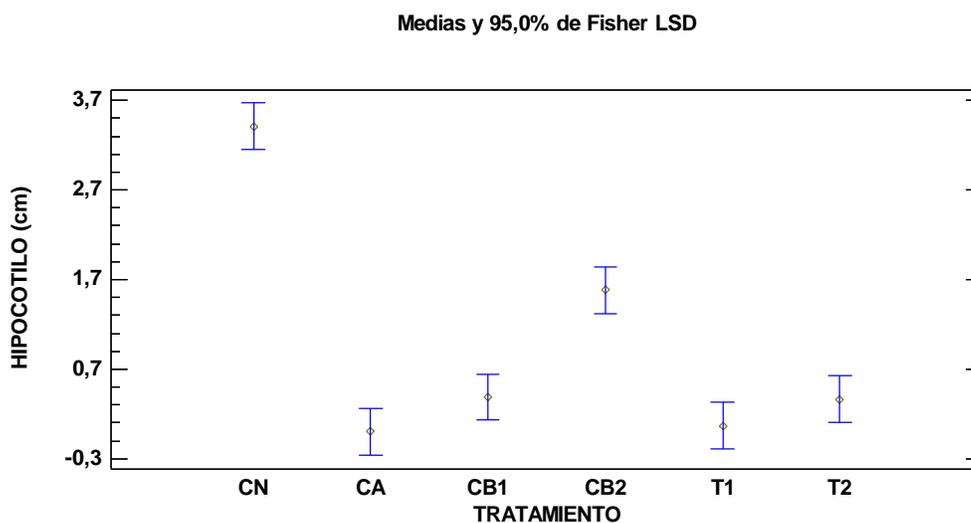


Figura 6. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días.

El índice de germinación permite evaluar de manera integral la toxicidad que afecta el crecimiento de la raíz y la toxicidad que afecta la germinación de la semilla. Por consiguiente, para el análisis de esta variable, nos basamos en los criterios de interpretación del índice de germinación (IG) establecidos por la EPA y los implementados por Zamora y García (2011), que se relacionan a continuación:

Tabla 4. Interpretación del índice de germinación.

IG	Interpretación
$\geq 80\%$	Ausencia de las sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración.
$> 50\% \text{ Y } < 80\%$	Presencia moderada de dichas sustancias.
$\leq 50\%$	Fuerte presencia de sustancias fitotóxicas.

Teniendo en cuenta la Tabla 5, para considerar la existencia de un efecto negativo sobre las plántulas de lechuga, el $IG \leq 50\%$ indicaría una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas.

Consecuentemente, todos los tratamientos en este tiempo, se mantuvieron por debajo de este rango (Figura 7), esclareciendo la toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos procedentes de la vereda Campo Seis, en Tibú - Norte de Santander.

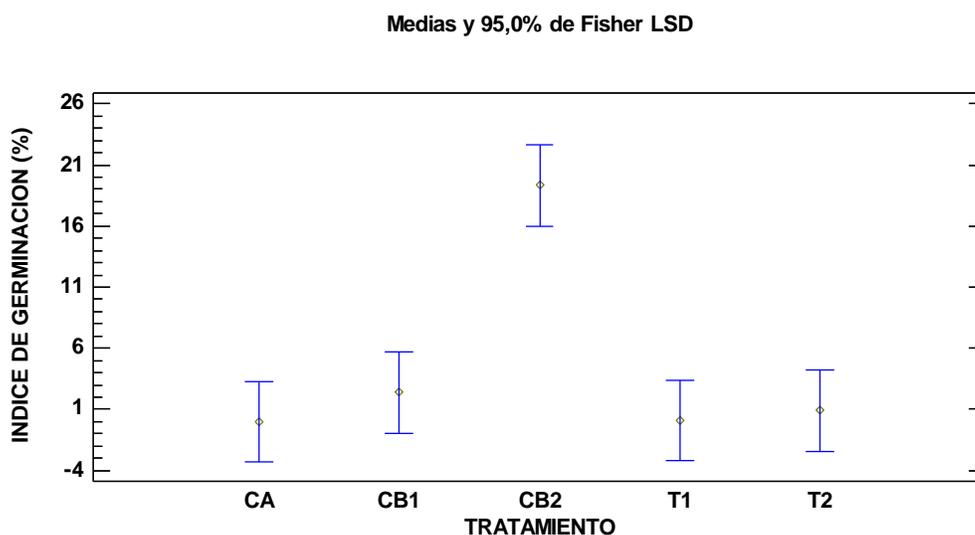


Figura 7. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 0 días.

3.2 Interpretar la ecotoxicidad de las muestras de suelo contaminado durante el proceso de biorremediación, por medio de indicadores biológicos (*Lactuca sativa L.*)

3.2.1 Análisis de diluciones

Debido a la fuerte toxicidad evaluada a través del índice de germinación, durante el tiempo 0 del proceso de biorremediación, se procedió a realizar diluciones de cada tratamiento, para determinar a qué concentración se obtienen los mejores resultados (Sobrero M., & Ronco A., 2004). Respecto al porcentaje de germinación de las diluciones evaluadas (Tabla 3), la dilución del 60% fue el destacado, por lo que en algunos tratamientos los porcentajes fueron >50%, seguidamente la dilución al 40% proporcionó porcentajes de 45-55% de germinación, y finalmente las concentraciones de 80 y 100%, fueron las que más impidieron el crecimiento de las semillas,

llegando a reducir considerablemente el porcentaje en cada tratamiento (Figura 8), debido a que contienen mayor cantidad de suelo contaminado sin tratar.

Estos resultados ratifican que las semillas en todos los tratamientos, toleraron la mayoría de concentraciones establecidas, dado que, la toxicidad aguda solo estuvo presente en las concentraciones menos diluidas y de manera general evidencian la efectividad de la dilución de 60%, que es en la que se reduce notablemente la disponibilidad de componentes tóxicos.

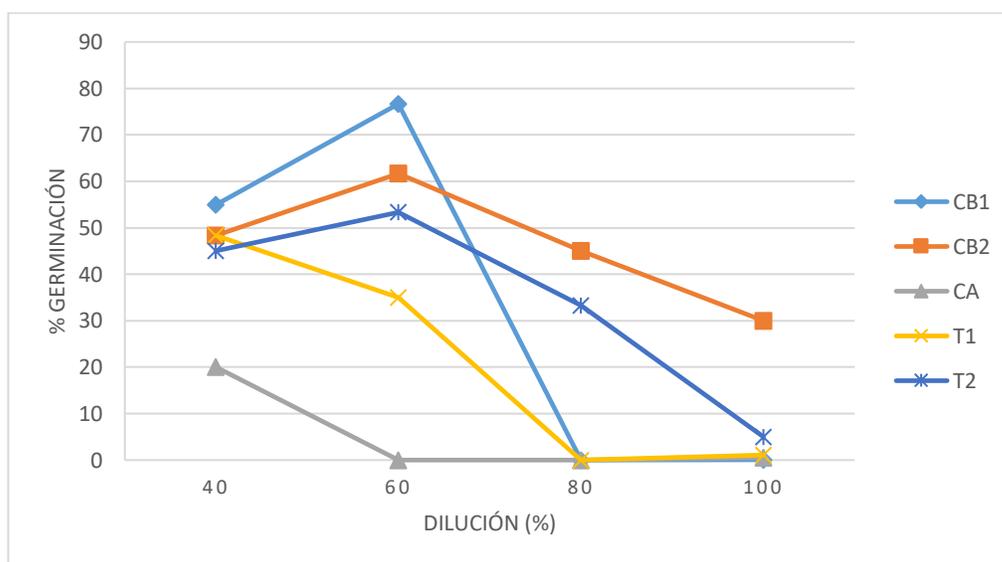


Figura 8. Relación del porcentaje de germinación, respecto a las diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación.

Existe variación y mejoría de la elongación del hipocótilo, por lo que, al diluir la muestra, las concentraciones de toxicidad quedan en un rango nulo y en algunos casos moderado. Las semillas sufren una gran recuperación en cada tratamiento, puesto que en la mayoría de diluciones, alcanzan longitudes superiores a 3 cm (Figura 9). Las diluciones de 100 y 80%, causaron efectos de toxicidad crónica y aguda en las semillas, resaltando que, a mayor dilución, el suelo proporciona mejores condiciones para el desarrollo de las semillas.

En tratamientos como T₂, con solo diluir al 80%, se logra una media de 2,0131 en la longitud, para este caso, las diluciones son directamente proporcionales a la media, puesto que el 40% alcanza una media de 3,57333 (Anexo 4). De manera similar sucede con el T₁, pero este

necesita una dilución al 60%, para que alcance una media de 2,77222 (Anexo 5) y en la próxima dilución aumentar.

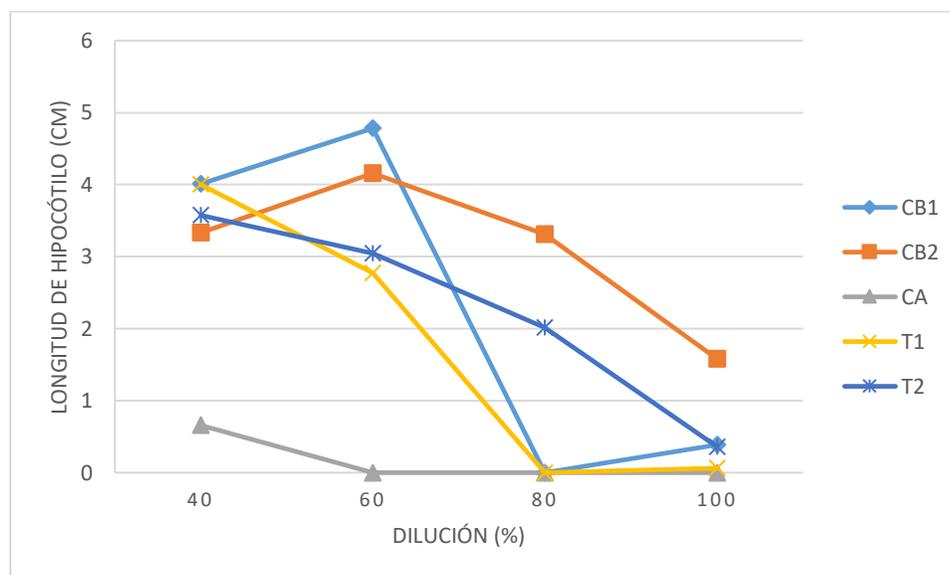


Figura 9. Relación de la longitud de hipocótilo (cm) de los tratamientos analizados, respecto a diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación.

El índice de germinación fue completamente destacable (Figura 10), pues en la mayoría de tratamientos (CB₁, CB₂, T₁ y T₂) hubo porcentajes superiores al 40%. La recuperación y el avance de todos los tratamientos a partir de las diluciones es prometedor; el T₂ con la sola dilución al 80%, presenta un IG de 26,8077% y para la siguiente dilución (60%), aumenta abruptamente hasta un 64,9066%, valores que después de 30 días del proceso de biorremediación no son obtenidos, por lo tanto, la recuperación de suelos y el probable destino final de los mismos, es posible por medio de la implementación eficaz de diluciones.

Para el caso del T₁ estos porcentajes son favorecedores, pues demuestran el potencial reductor de la combinación de suelos para la disminución de toxicidad, dado que con la dilución al 40%, alcanzó una media de 77,2366 para el IG (Anexo 6), llegando a reducir la toxicidad aguda y crónica, característica que puede ser de utilidad al realizar análisis en diferentes aspectos sobre la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos y especies fitorremediadoras. Dicha

aplicación se puede estructurar respecto a la gravedad API de crudos (Lárez L., 2013; Hernández *et al.*, 2017).

Seguidamente, para el caso del CB1, la dilución al 60% es la que presenta la media más alta de los tratamientos analizados: 146,46 (Anexo 7), cabe resaltar que este suelo posiblemente tenga trazas de hidrocarburos de derrames anteriores; lo que permite recalcar el beneficio del uso de diluciones, pues en todos los tratamientos hubo disminución de los efectos de toxicidad crónica y aguda ocasionados por los componentes de los hidrocarburos (Orozco *et al.*, 2014).

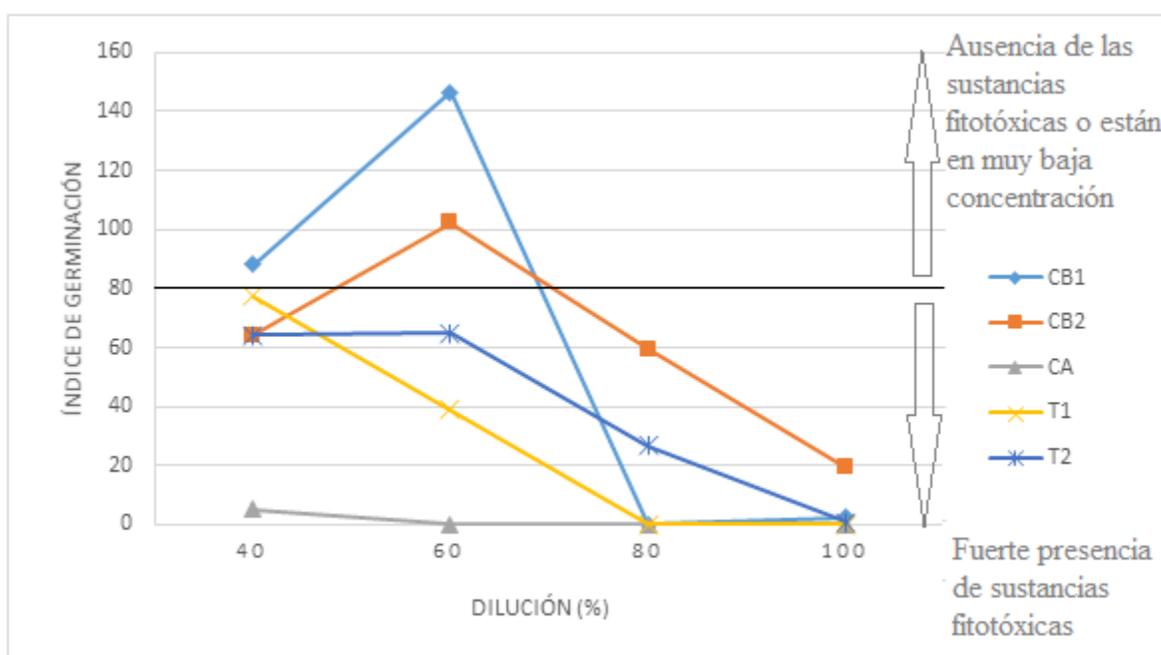


Figura 10. Relación del índice de germinación (%), respecto a las diluciones planteadas (40,60,80 y 100%). En el tiempo de 0 días del proceso de biorremediación.

3.2.2 Tiempo de evaluación 30 días

La germinación durante este tiempo, exhibe un avance en el proceso de biorremediación, específicamente una mejora en el suelo, dado que los rangos para cada tratamiento revelaron mejores porcentajes de germinación (Figura 11), a pesar de esto, los tratamientos siguen exponiendo efectos de toxicidad aguda.

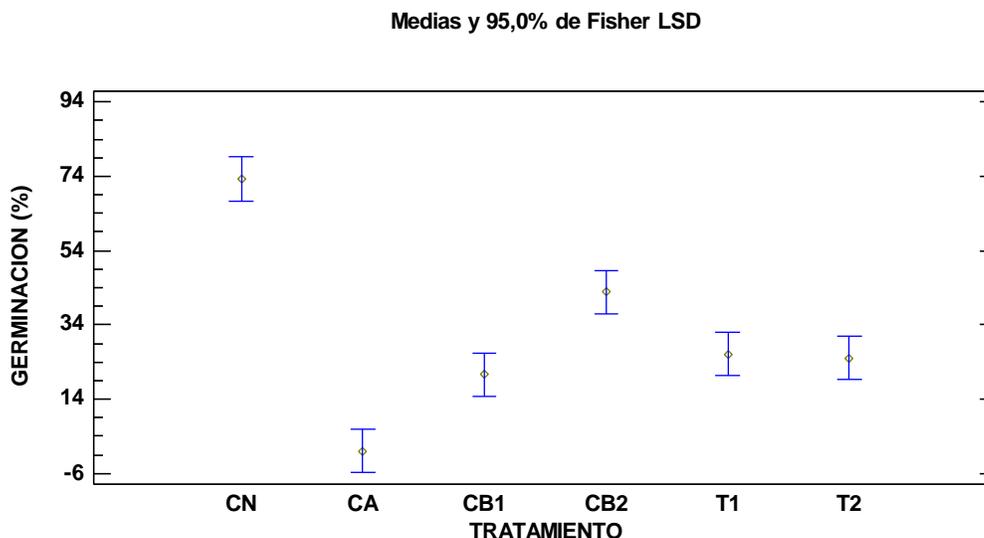


Figura 11. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días.

A causa de la similitud entre T₁ y T₂, no es posible establecer una relación sobre los tratamientos que tienen materia orgánica (CB₂ y T₂), sin embargo, el producto del metabolismo de los microorganismos y microecosistemas probablemente favorecieron el desarrollo de las semillas para este tiempo. No obstante, el efecto letal para este periodo estuvo variante entre los tratamientos, ya que en comparación con los resultados del tiempo 0, la diferencia es notoria (Tabla 6).

Tabla 5. Comparación del % de germinación, tiempos 0 y 30 días.

Porcentaje de germinación						
Tiempo	Control	CB1	CB2	CA	T1	T2
<i>0 días</i>	73,3333	0,06111111	30	0	1,1111	5
<i>30 días</i>	73,3333	20,5556	42,7778	0	26,1111	25

Simultáneamente, se encontró cierto efecto estimulante producto del proceso de biorremediación, respecto a la elongación de hipocótilos (Figura 12), porque de manera general todos, excepto CA (control positivo para toxicidad), están dentro del rango al que pertenece el

tratamiento CN (Anexo 8). En efecto, esto es indicativo de disminución aparente de la toxicidad crónica, caso contrario al observado en la germinación, que presentó toxicidad aguda.

A su vez, la adición de materia orgánica y nutrientes a un suelo que contiene hidrocarburos (T₂), permite que este se comporte de manera similar a un suelo con bajas o nulas concentraciones de hidrocarburos (CB₁); por lo que las semillas lograron una elongación de hipocótilo similar. A pesar de que los valores no son comparables con el control (CN), si se hacen similares a aquellos en los que se sospecha que la concentración de HTP (hidrocarburos totales de petróleo) es más baja, respecto a T₁ y T₂ que contienen cerca de un 17% de HTP.

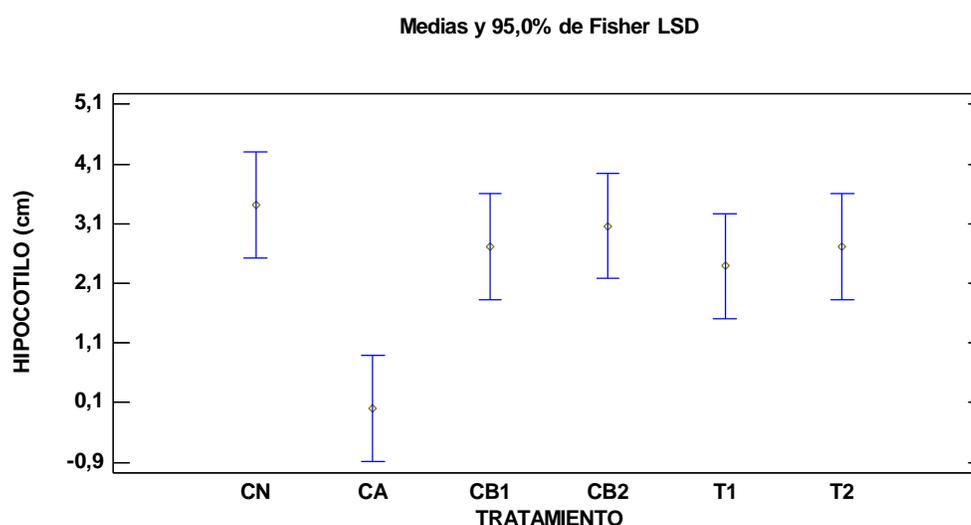


Figura 12. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días.

Mientras que, en los análisis expuestos anteriormente, hubo un grupo homogéneo conformado por CN, CB₁, CB₂, T₁ y T₂, el índice de germinación para cada tratamiento presentó mayor variación. Para el caso de los tratamientos CB₁ y T₂ (Figura 13), estos llegaron a proporcionar porcentajes similares, a pesar de las diferencias existentes sobre sus componentes, soportando la deducción inicial de una mejora del suelo, pues para este tiempo de biorremediación, tanto los factores bióticos como abióticos, pueden reducirse o transformarse para ejercer cambios iónicos sobre los componentes del suelo y el crudo presente (Cuartas D., 2012).

Al enlazar los tratamientos CA y T₁, destaca que el uso de nutrientes puede favorecer el desarrollo de las semillas y a su vez disminuir la toxicidad, dado que las variables evaluadas en CA fueron 0 (%G, H(cm) e IG). Como complemento, el T₁ evidenció una media de 26,1111 en %G y 2,38839 de longitud de hipocótilo, comparado con el T₂ que fue de 25,0 %G y 2,71323 de longitud de hipocótilo; esta semejanza es destacable de igual manera, puesto que se diferencian por el uso de materia orgánica, acentuando los beneficios del uso estos factores. Finalmente, la diferencia entre el IG de T₁ (19,3794) y T₂ (26,7409), no es demasiado grande, lo que permite que sean similares a CB₁ (Figura 14), y a su vez, están clasificados en un grupo homogéneo que arroja el programa StatGraphics (Anexo 9).

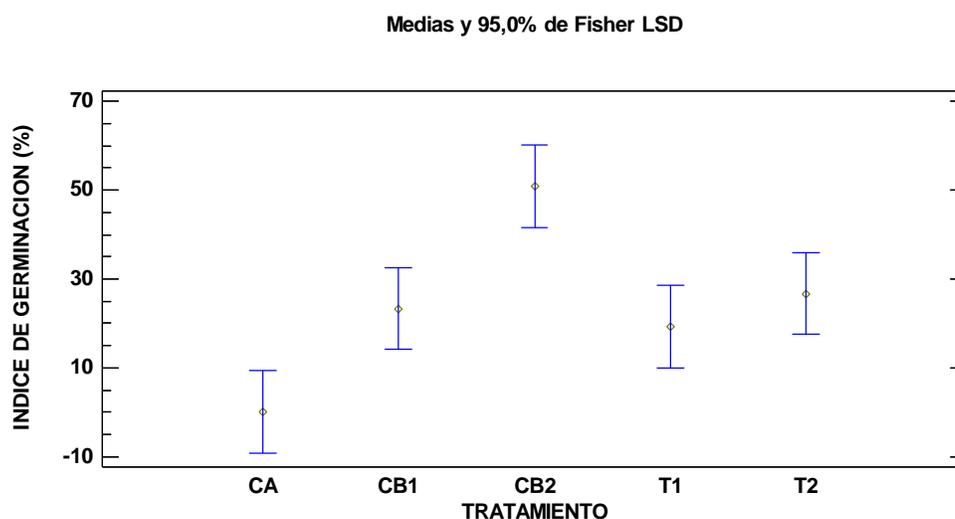


Figura 13. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 30 días.

3.2.3 Tiempo de evaluación 60 días

Debido a la situación actual de emergencia sanitaria por el COVID-19, los tiempos de evaluación se interrumpieron y como resultado solo algunos tratamientos fueron analizados. Por lo tanto, se tienen resultados de 4 de los 5 tratamientos y en el caso del T₂, solo se pudo sembrar las réplicas R₁ y R₂, por la disponibilidad de material en el laboratorio.

El comportamiento de la germinación durante este periodo, no tuvo mayor contraste (Figura 14), ya que en todos los tratamientos se notó un aumento de 0,2% respecto al tiempo anterior, esto

posiblemente debido a moderados aumentos de niveles HTP (hidrocarburos totales de petróleo), lo que inhibe cuantiosamente la germinación elevando la toxicidad aguda (Adams R. & Guzmán F., 2008).

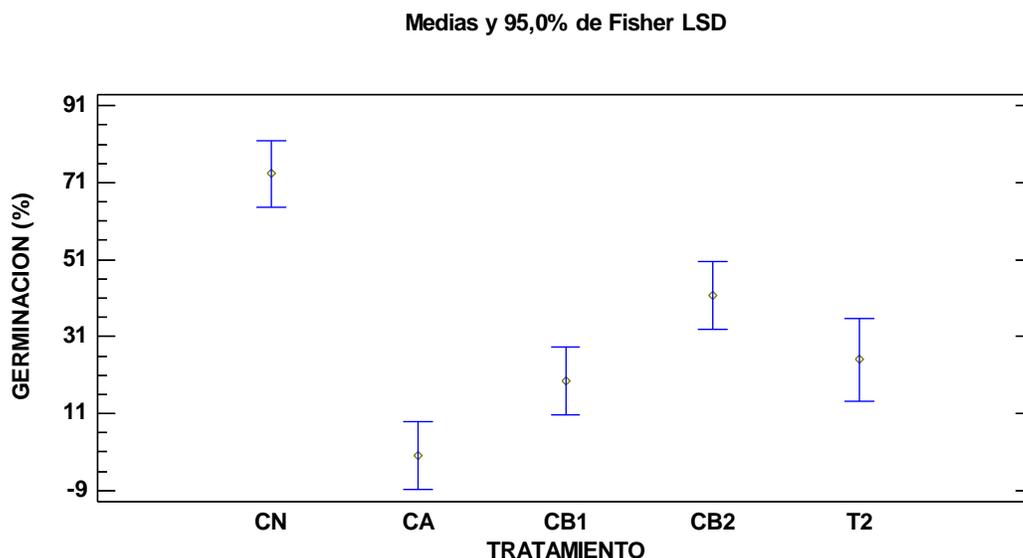


Figura 14. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días.

Varios estudios han confirmado que en periodos de 30 a 60 días, en los que a medida que ocurre la degradación de compuestos, el proceso genera movilización de hidrocarburos, por lo tanto, afecta el contenido de oxígeno y la capacidad de intercambio iónico en el suelo, y a su vez dificulta la absorción de nutrientes por parte de las semillas, generando menores tasas de germinación (Adams R. & Guzmán F., 2008; Gelvés M. & Gualdrón L., 2015; Serrano *et al.*, 2006).

Como resultado de la biodisponibilidad de compuestos de hidrocarburos, sigue habiendo toxicidad aguda, por lo tanto, a pesar de ciertas diferencias entre los tratamientos durante este periodo, los porcentajes de germinación se mantuvieron constantes comparados con el anterior (Tabla 7), aspecto relevante para el proceso de biorremediación, indicando una leve pausa en el proceso, y no un completo retroceso del mismo.

Tabla 6. Comparación del % de germinación, tiempos 30 y 60 días.

Porcentaje de germinación						
Tiempo	Control	CB1	CB2	CA	T1	T2
30 días	73,3333	20,5556	42,7778	0	26,1111	25
60 días	73,3333	19,4444	41,6667	0		25

A diferencia de la germinación, en el caso de la elongación de hipocótilo (Figura 15), se presentaron cambios significativos, puesto que los tratamientos CB₁ y CB₂ estuvieron a la par del CN (Anexo 10), llegando a superarlo para el caso de CB₁ (3,83cm - 4,93cm). En lo que respecta al T₂, sus bajos valores pueden deberse a que son resultados del triplicado de dos muestras y no de tres como en los demás tratamientos, también por el posible aumento de toxicidad durante el proceso de degradación.

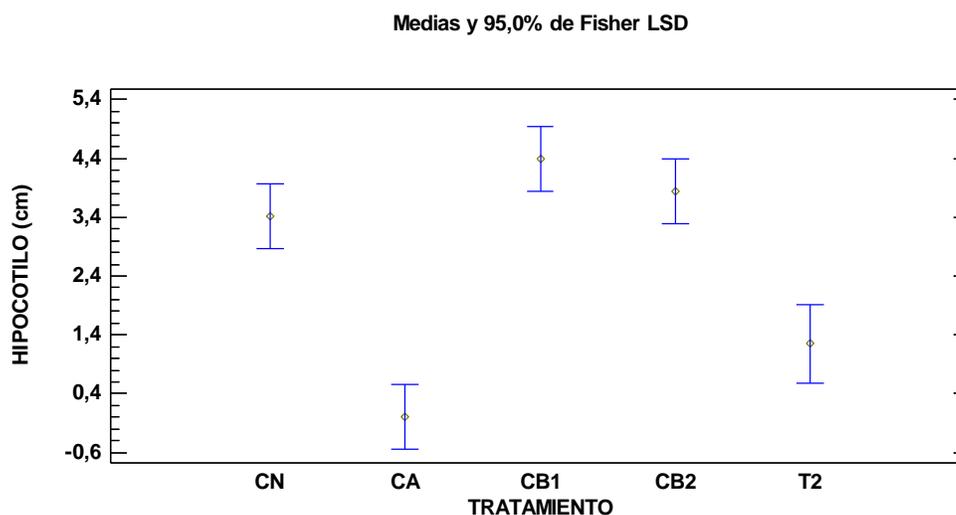


Figura 15. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Hipocótilo (cm) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días.

El leve aumento de la elongación de hipocótilo para cada tratamiento, revela cierta disminución de efectos subletales (Granados *et al.*, 2004), puesto que las semillas que se desarrollaron con toxicidad aguda expuesta en la germinación, alcanzaron mejores longitudes, en comparación con el tiempo de 30 días (Tabla 8).

Tabla 7. Comparación de la elongación de hipocótilos, tiempos 30 y 60 días.

Elongación de hipocótilo						
Tiempo	Control	CB1	CB2	CA	T1	T2
30 días	3,41335	2,71547	3,05903	0	2,38839	2,71323
60 días	3,41335	4,39740	3,84513	0		1,24882

En cuanto al índice de germinación (IG), el cual indica el grado de toxicidad presente en las muestras, aumentó a pesar de las consideraciones antes expuestas (Figura 16), pues este parámetro se basa en los datos individuales de germinación y elongación de hipocótilo, por lo tanto, al haber aumentado en ciertos tratamientos el hipocótilo, el IG, se verá afectado.

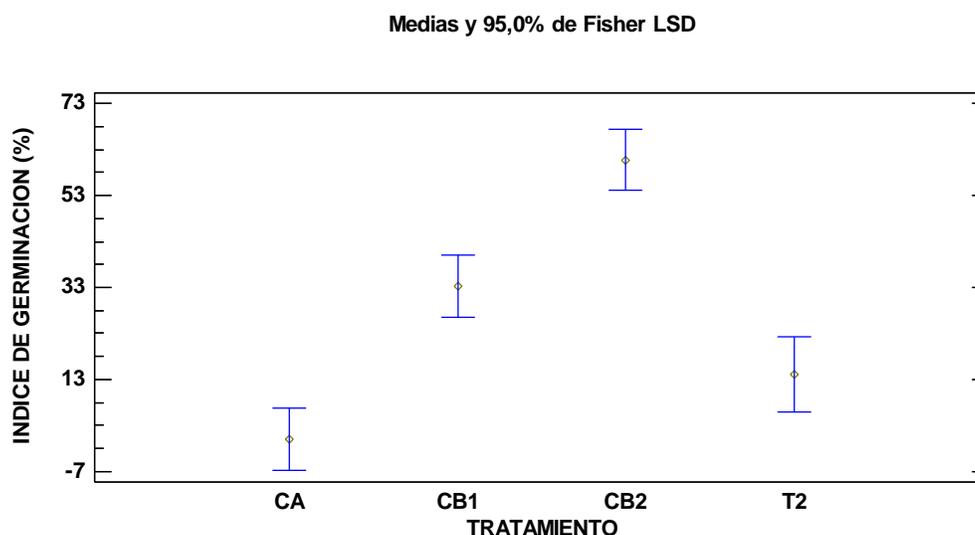


Figura 16. Medias globales con intervalos de confianza del 95,0% de Índice de germinación (%) para los diferentes tratamientos en el tiempo de 60 días.

Asimismo, es destacable el efecto de la materia orgánica que puede exhibir mayor absorción del hidrocarburo, causando un menor efecto tóxico sobre el ecosistema (Varjani *et al.*, 2020), que finalmente permite mayor índice de germinación, siendo representativo CB₂, ya que en este tiempo superó el 50% de IG, señalando la existencia de ligeras cantidades de toxicidad. Al ser un periodo de biorremediación intermedio, los datos recolectados, coinciden con diversos estudios sobre

bioestimulación y bioaumentación para el tratamiento de rios y suelos contaminados con hidrocarburos (Romaniuk *et al.*, 2007), pues a pesar de esta disminución, el proceso de biorremediación continua.

3.2.4 Análisis de las variables durante 0, 30 y 60 días

En el transcurso del proceso de biorremediación (Figura 17), el índice de germinación presentó variabilidad; para el caso de CB₁, pasó de 2,38 a 33,3%, a pesar del aumento, llega a manifestar fitotoxicidad hasta el periodo analizado, por lo tanto, el color que presenta este suelo (Figura 3), no es sinónimo de ausencia de hidrocarburos, puesto que durante el proceso de biorremediación su toxicidad no presentó un IG >80%, lo que confirma las sospechas de la presencia de fracciones solubles de estos metales.

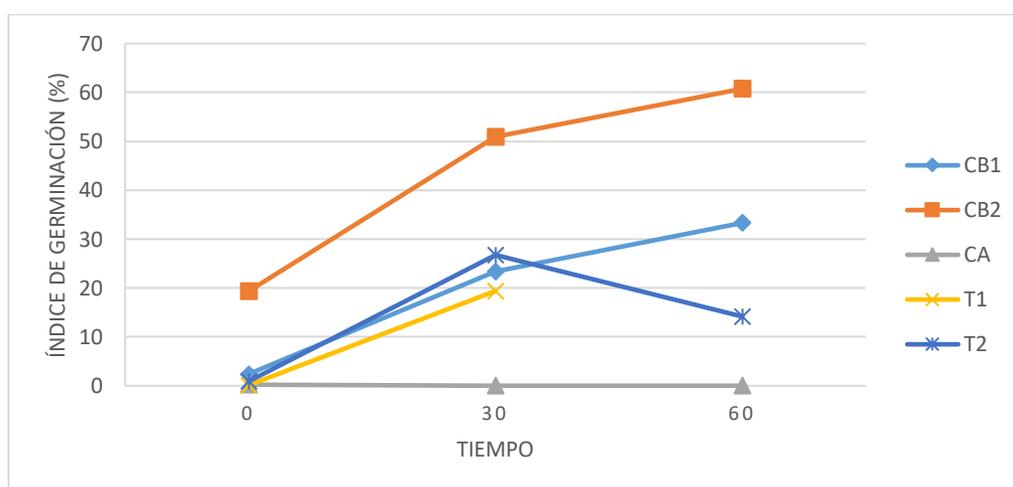


Figura 17. Índice de germinación para cada tratamiento en el transcurso del proceso de biorremediación (0,30 y 60 días).

Seguidamente el tratamiento CB₂, fue el único en el que aumentó de manera estable, presentando un IG de 60,8%, pero no alcanza a superar el umbral de >80%, que es el punto en el que la toxicidad se ha reducido considerablemente. Por lo tanto, la presencia de sustancias fitotóxicas es moderada teniendo en cuenta lo implementado por Zamora y García (2011), ya que probablemente algunas semillas usaron los componentes presentes en el crudo en conjunto con los nutrientes aportados por la materia orgánica, para su posterior desarrollo.

El tratamiento CA, es el control positivo para la toxicidad, por lo que la constante en sus datos (nula germinación, longitud de hipocótilo e índice de germinación), nos permite inferir acerca de la importancia de procesos degradativos, ya que al ser comparado con los tratamientos T₁ y T₂, las variables estudiadas presentaron avances durante el proceso de biorremediación analizado.

En el caso del T₁, este presentó un aumento, el que debido a la disponibilidad de material y tiempos de ejecución, no pudo ser comprobado para el tiempo de 60 días, sin embargo, el aumento de 0 a 30 días, es indicativo de la capacidad degradativa de algunos microorganismos, por lo que este suelo está conformado por crudo y nutrientes. Aunque la biomasa microbiana no pudo ser caracterizada específicamente, los estudios realizados por Botello O. y Correa C. (2020), confirman la presencia de comunidades microbianas.

Respecto al índice de germinación durante el proceso, el T₂ presentó un aumento del 25% en el periodo de 0 a 30 días, para el caso de 60 días, esta variable disminuyó, posiblemente debido a la cantidad de réplicas trabajadas y por factores de degradación de hidrocarburos como lo han mencionado diversos estudios. Sin embargo, el aumento inicial genera validez, sobre los beneficios del proceso de biorremediación para este tipo de tratamiento, ya que está constituido por suelo contaminado con petróleo, nutrientes y materia orgánica, la influencia de estos factores es lo que disminuye la biodisponibilidad y movilidad del hidrocarburo, que finalmente manifiesta una menor toxicidad⁴³.

3.3 Comparar la implementación de bioensayos en las diferentes muestras de suelo contaminado

A continuación, se describen diferentes trabajos e investigaciones realizadas implementando bioensayos, con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), con el fin de comparar los resultados obtenidos en los mismos con el trabajo realizado actual. Esto como cumplimiento del tercer objetivo específico, ante la modificación del presente trabajo investigativo a monografía documental.

3.3.1 Investigación documental

Infante C. y García F., (2012), dieron a conocer los resultados de toxicidad evaluados mediante bioensayos empleando semillas de *Lactuca sativa L*, en diferentes muestras de rípios de perforación impregnadas con crudo extrapesado (10°API) y suelos contaminados a escala de laboratorio, con un crudo mediano (27°API) y uno liviano (32°API) obtenido de Venezuela. Compararon el efecto tóxico de las muestras de suelos contaminadas con crudo antes y después de ser sometidas al proceso de biorremediación. Encontraron toxicidad en las muestras impregnadas con el crudo liviano y mediano, en función al porcentaje de elongación del hipocótilo con respecto al control (suelo sin hidrocarburo) antes del proceso de biorremediación, y al finalizar el proceso se registró una disminución significativa de la toxicidad.

Al hacer una comparación de nuestra investigación y la realizada por Infante y Morales, en algunos aspectos se obtuvieron resultados similares, dado que en nuestra muestra de crudo (de carácter pesado 21,5°API) en su primer análisis (muestra 0 días), es decir, antes del proceso de biorremediación presentó toxicidad en función al porcentaje del índice de germinación y elongación del hipocótilo. En las muestras analizadas en los tiempos de 30 y 60 días, los resultados obtenidos en función a las variables expuestas, fueron favorables ya que el proceso de biorremediación es mayor gracias a los metabolitos producidos.

En Perú, Callupe N., (2018) determinó la toxicidad en los suelos contaminados por hidrocarburos mediante bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*), cebolla (*Allium cepa L*) y rabanito (*Raphanus sativus L*). Realizados los análisis establecidos, determinó que el porcentaje de inhibición respecto a la germinación en las plántulas de lechuga, cebolla y rábano, fue de 77.75%, 56.63% y 97.87% en promedio, revelando la presencia de toxicidad aguda y crónica en el estudio. Por otra parte, la longitud del hipocótilo en el rábano fue de 6,67 cm en promedio, siendo esta la más grande, seguidamente la lechuga 2,75 cm y por último la cebolla 0,97 cm, igualmente sucede con la radícula.

Respecto al trabajo realizado por Callupe, existe similitud a nivel general sobre la germinación presentada en la primera muestra analizada, pues, estos suelos no recibieron ningún tratamiento previo y esto conlleva a enlazar los resultados generados (porcentajes de germinación

menores o iguales al 20%) con la concentración de hidrocarburo, ya que esta influye directamente sobre la muestra. Consecuentemente en esta investigación la elongación del hipocótilo presentó resultados variantes en cada análisis de muestra (30 y 60 días), caso contrario al estudio citado, donde se reflejaron altos rangos de elongación de hipocótilo puesto que las semillas lograron germinar en sus primeros análisis.

Así mismo, Sirit *et al.*, (2008), realizaron la investigación en Venezuela “Comparación de dos métodos de bioensayos para evaluar toxicidad en suelo contaminado con hidrocarburos” evaluando dos métodos de bioensayos basados en la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) para determinar la toxicidad de suelos petrolizados con gasoil a dos niveles de contaminación (5% y 10%). A través de los resultados, encontraron que el gasoil no causó inhibición significativa en la germinación de las semillas y para comprobar que se pueden aplicar en suelos con crudos y no solamente gasoil, realizaron un ensayo similar para suelos contaminados con crudo al 5% en peso, obteniéndose una mayor inhibición del crecimiento, tanto de la radícula como del hipocótilo con el método de suelo directo.

En este trabajo se realizó el método de suelo directo como el ejecutado por Sirit, ya que esta técnica evidencia con mayor énfasis el impacto de suelos contaminados con hidrocarburos sobre los bioindicadores establecidos. Así mismo, se presentó una diferencia en los resultados obtenidos al analizar la elongación del hipocótilo en suelos contaminados con hidrocarburos en esta investigación, en las muestras 30 y 60 días incrementaron los resultados siendo favorables, dado que el proceso de biorremediación influye en estos.

También, Corzo M., (2017), en Bucaramanga realizó el proyecto “Estudio de la remoción de hidrocarburos por *Selenastrum capricornutum* en muestras de lixiviados de suelos contaminados por petróleo”, evaluando el potencial degradador de la microalga *Selenastrum capricornutum* como agente biorremediador de hidrocarburos en muestras de suelos contaminados con petróleo y realizó pruebas de análisis ecotoxicológicos después del tratamiento empleando como bioindicadores *Daphnia magna* y semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). Los resultados obtenidos de los ensayos toxicológicos de *Daphnia magna* demostraron gran reducción en el porcentaje de mortalidad respecto al presentado en pruebas anteriores, ya que este se redujo hasta un 83,3% para las muestras

durante el tratamiento, y a través de las semillas de *Lactuca sativa L* se evidenció un aumento en el porcentaje de germinación del 56% para las muestras durante el tratamiento.

La vinculación de microorganismos y plantas, durante los procesos de biorremediación, es favorecedora, debido a que aumenta considerablemente la biodisponibilidad de compuestos y metabolitos que pueden complementar el proceso fitorremediador de *Lactuca sativa L*. (Petrová *et al.*, 2017), este proceso fue evidenciado en el actual proyecto, en los tiempos de 30 y 60 días, pues en los tratamientos que contenían además de crudo materia orgánica, la germinación resultó favorecida como lo evidencia la Figura 18, de la cual representativos son los tratamientos CB₂ con un 60,8% en el periodo de 0 a 60 días y el T₂ presentó un aumento del 25% en el periodo de 0 a 30 días.

A nivel regional, Gelvés M. & Gualdrón L., (2015), realizaron la “Evaluación fisicoquímica y toxicológica de suelos contaminados con hidrocarburos en proceso de biorremediación en las instalaciones de la empresa aseo urbano S.A.S E.S.P”, la cual se desarrolló a través de la construcción de biopilas. Dentro de la metodología que se estableció se determinó necesario realizar las pruebas fisicoquímicas y pruebas toxicológicas a través de bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*). En los primeros tiempos de evaluación, encontraron altos niveles de toxicidad que afectaron la longitud de hipocótilo e índice germinación. Seguidamente en los tiempos de 30, 60 y 90 días, resaltaron la disminución de germinación, que se ve afectada directamente por el aumento de TPH; como resultado final de la liberación de ácidos orgánicos y compuestos generados durante la degradación de los hidrocarburos presentes en este crudo, por lo que, no todos los compuestos son transformados a formas inertes como el dióxido de carbono y agua, durante el proceso de biodegradación. Finalmente, durante el análisis de 120 días, la mayoría de tratamientos que contienen crudo exhibieron gran disminución, esto debido a la atenuación natural (factores bióticos y abióticos), por acción de la biomasa microbiana autóctona (Kadri T., *et al.*⁴⁷).

Aunque el proceso desarrollado fue interrumpido en sus análisis prácticos debido a la emergencia sanitaria, los resultados presentados en el lapso de 0, 30 y 60 días, presentaron un comportamiento semejante al trabajo realizado por Gelvés, ya que el proceso de biorremediación

llega a una etapa en el que la toxicidad aumenta, pero finalmente disminuye, producto de la degradación de compuestos. Por ello es importante culminar en la medida de las posibilidades con los análisis prácticos, con el fin de indagar si al haberse cumplido a cabalidad los tiempos de estudio, los análisis evidenciarían resultados favorables, como los que fueron presentados en la investigación relacionada; en referencia al proceso de biorremediación y disminución de la toxicidad de los suelos contaminados con hidrocarburos (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Dentro del análisis realizado a los diferentes trabajos investigativos descritos, destaca el uso de bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) debido a su proceso de germinación; ya que interactúa directamente con los componentes presentes en el suelo, lo cual permite obtener un análisis de la influencia de los derrames de hidrocarburos sobre el suelo y estos procesos germinativos (Hernández *et al.*, 2020). A nivel internacional, se han implementado en gran magnitud trabajos e investigaciones, con bioensayos como componente principal, dado que es una opción amigable con el medio ambiente, generando gran cantidad de beneficios, algunos destacados son la mitigación de impactos a bajo costo y restauración de las propiedades del suelo (Megharaj *et al.*, 2014). A escala nacional, los trabajos realizados y publicados son escasos, ya que son implementados en mayor cantidad en otras muestras de estudio, como el aire y agua. A nivel regional hay evidencia de investigaciones que señalan la capacidad de ciertas plantas fitorremediadoras, también hay estudios sobre disposición final de estos suelos contaminados. Por lo tanto, se considera que esta investigación se encuentra dentro de las pioneras, debido al componente ecotoxicológico estudiado, que sirve de ejemplo y base para continuar con la investigación que permita evaluar la toxicidad durante el proceso de biorremediación en un suelo contaminado con hidrocarburos utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*).

4. Conclusiones

Las conclusiones derivadas del proceso de biorremediación y análisis de toxicidad que se llevó a cabo, señalan la aplicación futura de estos medios, ya que este es un procedimiento que no presenta complejidad a nivel operativo para implementarlo y puede llegar a ser de gran ayuda en los ambientes que han sido desestabilizados por los derrames de hidrocarburos.

La toxicidad presente en la muestra recolectada evidencia el grado de contaminación que existe en este territorio, ya que el suelo nativo inicial fue tomado con varios metros de lejanía al suelo que presentaba crudo visible. De modo que la lluvia y escorrentía pueden llevar a su paso contaminantes para el ecosistema que se encuentran en el petróleo, impidiendo el desarrollo de especies biológicas, por tal motivo fue necesario trabajar con suelo de otro origen; exactamente del municipio de Los Patios, Norte de Santander.

La constitución de bioindicadores como la lechuga, permite una clara visualización del grado de contaminación que está presente en el suelo muestra, generando una perspectiva respecto a la problemática contaminante que se puede generar en la zona donde se ocurrió el derrame, ya que esta no es tratada eficazmente y estos residuos llegan a perpetuarse en el ambiente interfiriendo con los ciclos biológicos presentes en el lugar.

La variación del índice de germinación en cada tiempo estudiado, es favorable, ya que estas evidencias engloban mejoras en el proceso de biorremediación. El avance del tratamiento 1 (T_1) (suelo contaminado), durante el análisis es destacable, por lo que este suelo solo contiene crudo y nutrientes, lo que indica que la presencia de microorganismos y nutrientes puede reducir la toxicidad, así como el efecto que tuvo la materia orgánica en el tratamiento 2 (T_2) (suelo contaminado con materia orgánica) que causó efectos estimuladores en las semillas.

Ciertamente en los diferentes trabajos de investigación citados, se halló mayor información a nivel internacional, por lo que han implementado en gran magnitud, los bioensayos como una

opción amigable con el medio ambiente, dado que los resultados obtenidos permiten adquirir una mayor información toxicológica.

A nivel regional y local decisivamente fue escasa la información recopilada. Por lo tanto, esta monografía de investigación destaca por ser pionera, ya que el enfoque desarrollado no se ha publicado dentro de los procesos de tratamiento, aplicados a los derrames ocurridos en el país, y específicamente en la zona de Tibú.

5. Recomendaciones

Por motivos de la pandemia actual a causa del COVID-19, no fue posible analizar las diluciones para los demás tiempos establecidos (30, 60 y 90 días), se recomienda que con las muestras seleccionadas y almacenadas en el semillero SIBIOAM, evaluar la variación y comportamiento de las diluciones en estos tiempos, con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el presente proyecto, como la mejora de las condiciones y disminución de toxicidad. Seguidamente, analizar las muestras faltantes, tales como la réplica faltante de T₂ y todas las del tiempo de 90 días, con el objeto de confirmar o refutar la reducción de toxicidad para ese tiempo, así como la implementación de análisis de hidrocarburos totales de petróleo, para un análisis cuantitativo de proceso de biorremediación.

Se sugiere realizar futuras investigaciones tomando como referencia la metodología y resultados obtenidos en el presente proyecto, como consecuencia de las constantes emergencias ambientales de derrames de hidrocarburos.

Finalmente, implementar como proceso experimental la presente investigación en el lugar de impacto con el fin de evaluar el proceso biorremediador que se genere dentro de la zona afectada.

6. Referencias

Adams R. & Guzmán F., Evaluación del cultivo de la tierra y estabilización químico-biológica para el tratamiento de sedimentos muy contaminados en un ambiente tropical, *International Journal of Environmental Science & Technology*, (2008), 5(2), 169-178. <https://link.springer.com/article/10.1007%2F03326010>

AL-Hawash A., Maytham A., Shue L., Alhujaily A., Abbood H., Zhang X. & Ma F., Principios de degradación microbiana de hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2018, 44 (2), p 71–76, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>

Arenas D., Proceso de biodegradación para el tratamiento de derrames de petróleo por medio de *Pseudomonas sp*, Facultad de Educación Permanente y Avanzada, Fundación Universidad de América, Bogotá D.C, Colombia (2018). <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7130/1/392273-2018-I-GA.pdf>

Biotratamiento y Biorremediación (I sem/19) MSc. Romina Fuentes

Botello O., Correa C., Tesis *Caracterización de microorganismos presentes en el proceso de biorremediación como alternativa para la recuperación de suelos del municipio de Tibú, Norte de Santander, contaminados con hidrocarburos*, Facultad Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia (2020).

Calao J., Caracterización ambiental de la industria petrolera: tecnologías disponibles para la prevención y mitigación de impactos ambientales, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia (2007).
https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2538/15646742_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Callupe N., Determinación de la toxicidad en suelos contaminados por hidrocarburos mediante bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), cebolla (*Allium cepa L.*) y rabanito (*Raphanus sativus L.*), Facultad de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional Agraria La Molina, Tingo María, Perú (2018),
https://web2.unas.edu.pe/sites/default/files/web/archivos/actividades_academicas/pr%C3%A1cticas%20pre%20profesionales.pdf

Casallas S., & González M., Evaluación técnica de la recuperación ambiental del suelo por derrame de petróleo crudo mediante la aplicación de la tecnología Oil Spill Eater II en un pozo de un bloque en el Casanare, Facultad de ingenierías, Fundación universidad de América, Bogotá D.C, Colombia (2020), <https://hdl.handle.net/20.500.11839/7816>

Celis J., Sandoval M., Zagal E., & Briones M., Efecto de la adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) en un suelo patagónico, Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal, (2006), 6(3), p 13-25.
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-27912006000300002&script=sci_arttext&tlng=en

Chaîneau C., Yepremian C., Vidalie F., Ducreux J., & Ballerini D., Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo crudo: evaluaciones de biodegradación, lixiviación y toxicidad, *Contaminación del agua, el aire y el suelo*, (2003), 144: 419-440. <https://doi.org/10.1023/A:1022935600698>

Corzo M., Estudio de la remoción de hidrocarburos por *Selenastrum capricornutum* en muestras de lixiviados de suelos contaminados por petróleo, Facultad de Química Ambiental, Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia, (2017). <http://hdl.handle.net/11634/10319>

Cuartas D., Tesis Doctoral Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia (2012). <https://core.ac.uk/download/pdf/71396871.pdf>

Ecopetrol-Asociación Colombiana de Petróleo; Voladuras: una cruda arma de guerra. *Revista Semana-Semana Sostenibilidad*. Natalia Borrero Morales. <http://especiales.sostenibilidad.semana.com/voladuras-de-oleoductos-en-colombia/index.html>; consultado en noviembre de 2020.

Gelvés M. & Gualdrón L., Tesis Evaluación fisicoquímica y toxicológica de suelos contaminados con hidrocarburos en proceso de biorremediación en las instalaciones de la empresa aseo urbano

S.A.S E.S.P, Facultad Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia (2015).

Granados Y., Ronco A., & Báez M., Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Morales G. (Ed.), (2004), cap. 3 Ensayo de toxicidad aguda (efectos letales y subletales) con *Hydra attenuata*, p 64-71, <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap3.pdf>

Guerrero M., Ruptura de oleoductos por interferencia externa, daño ambiental y sostenibilidad en Colombia, *Revista producción + limpia* (2018) 13, ,2, ,7-13, <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v13n2/1909-0455-pml-13-02-00007.pdf>

Guerrero M., Valoración económica del daño por ruptura de oleoducto. Caso Territorio UWA–Sierra Nevada del Cocuy, Memorias del Congreso Internacional Supply Chain Management en una Economía Global, Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, 2016.

Hernández I., Guitián D., & González V., Toxicidad de suelos contaminados con petróleo pesado sobre plántulas de la palma moriche *Mauritia flexuosa* L. f., *Bioagro*, (2020) 32(2), 117-122, Recuperado a partir de <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2695>

Hernández I., Lárez L., & García, J., Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. *Bioagro*, (2017), 29(2), p73-82. [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/REV29\(2\)/1.%20ms%201632.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/REV29(2)/1.%20ms%201632.pdf)

Hernández, Fernández y Baptista, 2003, Tipos de investigación y diseños de investigación. Disponible en <http://metodologia02.blogspot.com/p/operacionalizacion-de-variables.html>

Herrero M., Tesis Doctoral Comparativa de métodos de descontaminación de suelos afectados por hidrocarburos. Aplicación a la obra del ave de Málaga, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España (2016). http://oa.upm.es/39774/1/MARIA_JOSE_HERRERO_PENA.pdf

Hubálek, T., Vosáňlová, S., Matějů, V. et al. Monitoreo de la ecotoxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos durante la biorremediación: un estudio de caso. *Arch Environ Contam Toxicol* 52, 1–7 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0030-6>

Infante C., & García F., Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L, *Interciencia*, (2012) 37, p782-788, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33925472011>

Kadri T., Rouissi T., Kaur B., Cledon M., Sarma S., & Verma M., Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) por enzimas fúngicas: una revisión, *Journal of Environmental Sciences*, (2017), 51, pp. 52–74, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>

Lárez L., Tesis Estudio sobre la germinación de semillas de *Megathyrsus maximum* ((Jacq) b.k. simon & s.w.l. Jacobs) Y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex a. Rich.) en suelos contaminados con diferentes petróleos crudos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela (2013).
<http://caelum.ucv.ve/bitstream/123456789/9246/1/Tesis%20Luis%20Manuel%20L%C3%A1rez.pdf>

Lin Q., Mendelssohn I., Suidan M., Lee K., & Venosa A., La relación dosis-respuesta entre el fueloil No.2 y el crecimiento de la hierba de marisma, *Spartina alterniflora*, *Boletín de contaminación marina*, (2002), 44 (9), p897-902, [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00118-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00118-2)

Megharaj M., Venkateswarlu K. & Naidu R, Biorremediación, Módulo de referencia en Ciencias Biomédicas, *Encyclopedia of Toxicology*, (2014), p 485-489, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01001-0>

Méndez C., Un crudo relato de Colombia: El impacto social de las voladuras del Oleoducto Caño Limón-Coveñas por parte del ELN (2010-2018), Facultad de ciencias políticas y relaciones internacionales, Pontificia universidad Javeriana, Bogotá D.C, Colombia (2019).

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/50525/UN%20CRUDO%20RELATO%20DE%20COLOMBIA-%20Final%20Entergar.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Orozco M., Gutiérrez M., & Peralta, M., Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *Bouteloua curtipendula* michx torr. en cultivos in vitro, Polibotánica (2014) 38, ,159-172.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200009

Pardo T., 20 de abril 2018, En Colombia se han derramado 3,7 millones de barriles de crudo. Colombia: El Tiempo en: <https://www.eltiempo.com/vida/medio-ambiente/cifras-de-derrames-de-crudo-en-colombia-en-los-ultimos-anos-207664>, consultada en abril de 2019

Pentreath V., González E., Barquín M., Ríos S., & Perales S., Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo, Revista salud ambiental (2015) 15, 1, p13-20, <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/551>

Petrová Š., Rezek J., Soudek P., & Vaněk T., Estudio preliminar de fitorremediación de suelos abandonados contaminados por PAHs, Science of The Total Environment, (2017), p 572–580, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.163>

Pino N., Carvajal S., Gallo A. & Peñuela G., Artículo derivado del proyecto de investigación “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el municipio de Apartadó” realizado entre abril y septiembre de 2010 en Apartadó (Antioquia), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, (2012), http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1909-04552012000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Ponce D., Tesis Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, Departamento ingeniería civil y ambiental, Universidad del BIO-BIO, Concepción, Chile (2014), <http://repobib.ubiobio.cl/jspui/handle/123456789/135>

Redacción Nacional, 24 de abril 2019, Ríos de Norte de Santander en riesgo ante posible contaminación con crudo. Colombia: El Espectador: <https://www.elespectador.com/noticias/nacional/rios-de-norte-de-santander-en-riesgo-ante-posible-contaminacion-con-crudo-articulo-852042>, consultada en abril de 2019

Rivera M., Trujillo A., Miranda de La Cruz M., & Maldonado E., Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas, *Interciencia*, (2005), 30(6), p 15-24. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33910503>

Rivera Y., & Dendooven L., Dinámica del carbono, nitrógeno e hidrocarburos en suelos contaminados con Diesel modificado con biosólidos y maíz, *Chemosphere*, (2004), 54, p. 379-386.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00653-2)

Rodríguez A., Robles C., Ruíz R., López E., Sedeño J., & Rodríguez A., Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitoreo de la calidad del agua del río Chalma, *Revista internacional de contaminación ambiental*, (2014), 30(3), 307-316.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000300007

Romaniuk R., Brandt J., Rios R., & Giuffré, L., Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos, *Ciencia del suelo* (2007) 25, ,2, p139-149,
http://suelos.org.ar/publicaciones/vol_25n2/25_2_romaniuk_139_149.pdf

Serrano A., Gallego M., & Gonzalez J., Evaluación de la atenuación natural de hidrocarburos aromáticos volátiles en suelos agrícolas contaminados con combustible diésel, *Revista contaminación ambiental*, (2006) 144, 1, ,203- 209.

Siebe C., Cram S., Herré A. y Fernández N., Distribución de metales pesados es suelos de la llanura aluvial baja del activo Cinco Presidentes, Tabasco. En A. V. Botello, J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.), *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, (2005), (431-449). Campeche: Universidad Autónoma de Campeche.

https://www.researchgate.net/profile/Maricusa_Agraz/publication/280446298_Golfo_de_Mexico_Contaminacion_e_Impacto_ambiental_Diagnostico_y_Tendencias/links/55b555b208aed621de02dca8/Golfo-de-Mexico-Contaminacion-e-Impacto-ambiental-Diagnostico-y-Tendencias.pdf#page=459

Sirit L., Ehrmann E., & Infante C., Comparación de dos métodos de bioensayos para evaluar toxicidad en suelo contaminado con hidrocarburos, *Revista latino americana de geoquímica orgánica* (2008), 8-11, http://alago.org/alago/docs/ALAGO_2008/V-114.pdf

Sobrero M., & Ronco A., Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Morales G. (Ed.), (2004), cap.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga, p 71-79, <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap4.pdf>

Sobrero M., Tesis Doctoral Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnóstico, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad de la Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina (2010). http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/5246/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Varjani S., Upasani V., & Pandey A., Biorremediación de suelos contaminados con lodos aceitosos empleando una nueva cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y fitotoxicidad de hidrocarburos de

petróleo para la germinación de semillas, *Science of The Total Environment*, (2020) 737, 10, 139766, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139766>

Velásquez J., Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación, *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* (2017) 8, 1, p154-159, <https://doi.org/10.22490/21456453.1846>

Vélez Ó. & Londoño A., De la educación ambiental hacia la configuración de redes de sostenibilidad en Colombia, *Perfiles educativos* (2016) 38, 151, p175-187, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-26982016000100175

Visser S. & Danielson R., Proyecto de biorreactor: Ensayos ecotoxicológicos de desechos contaminados con hidrocarburos y sales tras la biorremediación en un biorreactor, *Asociación Canadiense de Productores de Petróleo (CAPP)*, (1995), Publ, 4. DOI: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/385331>

Yáñez S., Evaluación fitotóxica de suelos con diferentes porcentajes de hidrocarburo obtenidos de la planta de biorremediación de aseo urbano S.A.S. E.S.P. en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) y pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*), Programa de Ingeniería Biotecnológica, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia, (2015).

Zamora E. & García J., Fitotoxicidad aguda de rípios impregnados con fluidos base aceite mineral en condiciones de laboratorio. *Revista Global de Investigación Ambiental* (2011), 7, ,1, 29-36.

7. Anexos

Anexo 1

Fecha: 5-12-19 / 10-12-19												
Tiempo (días)	Longitud Hipocótilo (cm)											
	CNR1			CB1-R1			CB1-R2			CB1-R3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30	5	4,5	6	0			0,3			2,4		3,7
	4,8	2,8	2,5							1,5		1,5
	7	4,5	7,3							0,5		3
	4,5	2	5,5							0,3		2,1
	4	1,3	4									1,5
	5	0,8	2,8									0,3
	2,5	1,4	4,3									
	4,3	4,6	6,7									
	2,3	3,2	3									
	2	2,8	1,3									
	3	3,3	0,6									
	2	1,4	3,7									
	2	1	4,3									
	0,8		4,2									
			6,3									
			5,8									
		2,1										
Total	14	13	17	0	0	0	1	0	0	4	0	6
Prom (cm)	3,5142	2,5846	4,1411	0	0	0	0,3	0	0	1,175	0	2,0166
	3,41335919			0			0,1			1,063888889		

Anexo 2

38005.01.13- 005542

San José de Cúcuta, 03 noviembre de 2020

Estudiante:

Gabriela Márquez Cetina

Mishell Tatiana Marroquín Erazo

Ingeniería Biotecnológica

Universidad Francisco de Paula Santander

Ciudad

Cordial saludo.

El Comité Curricular del Programa Académico de Ingeniería Producción Biotecnológica e Ingeniería Biotecnológica, según Acta No 21, contando con todos los requisitos determinó aprobar el cambio de la modalidad de su trabajo de Grado MONOGRAFIA.

TITULO: “MEDICIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE TIBÚ – NORTE DE SANTANDER, CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, UTILIZANDO SEMILLAS DE LECHUGA (Lactuca sativa L.)”

MODALIDAD: MONOGRAFIA

ESTUDIANTE: Gabriela Márquez Cetina - Código: 1611239

Mishell Tatiana Marroquín Erazo – Código: 1611250

DIRECTOR: Paola Andrea Román Hernández

CODIRECTORA: Romina Esmeralda Fuentes Díaz

ENTIDAD: UFPS

Igualmente reiterar el compromiso del estudiante con la ejecución del anteproyecto. Hacer entrega del informe final al Comité Curricular con la aprobación de la Directora; según las **NORMAS E INSTRUCTIVO PARA LA PRESENTACIÓN DEL PROYECTO DE GRADO-FACUAGRA**, mayor información: www.facuagra-ufps.org –Planes de Estudios IB-Descarga de Archivos.

Atentamente,



Yaneth A. Muñoz Peñaloza

Coordinadora Comité Curricular

Directora Ingeniería Biotecnológica

Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag
Teléfono (057)(7) 5776655 - www.ufps.edu.co
oficinadeprensa@ufps.edu.co San José de Cúcuta - Colombia

Creada mediante decreto 323 de 1970

Anexo 3

Pruebas de Múltiple Rangos para GERMINACIÓN (%) por TRATAMIENTO (0 días)

Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CA	3	0	X
CB1	3	0,0611111	X
T1	3	1,1111	X
T2	3	5,0	X
CB2	3	30,0	X
CN	3	73,3333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CA - CB1		-0,0611111	5,03995
CA - CB2	*	-30,0	5,03995
CA - CN	*	-73,3333	5,03995
CA - T1		-1,1111	5,03995
CA - T2		-5,0	5,03995
CB1 - CB2	*	-29,9389	5,03995
CB1 - CN	*	-73,2722	5,03995
CB1 - T1		-1,04999	5,03995
CB1 - T2		-4,93889	5,03995
CB2 - CN	*	-43,3334	5,03995
CB2 - T1	*	28,8889	5,03995
CB2 - T2	*	25,0	5,03995
CN - T1	*	72,2222	5,03995
CN - T2	*	68,3333	5,03995
T1 - T2		-3,8889	5,03995

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 4

Tabla de Medias para HIPOCÓTILO por DILUCIÓN con intervalos de confianza del 95,0% (0 días)

			<i>Error Est.</i>		
<i>DILUCION</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
40	3	3,57333	0,0588166	3,47743	3,66924
60	3	3,04631	0,0588166	2,9504	3,14221
80	3	2,0131	0,0588166	1,91719	2,109
100	3	0,360741	0,0588166	0,264835	0,456647
Total	12	2,24837			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de HIPOCÓTILO para cada nivel de DILUCIÓN. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Anexo 5

Tabla de Medias para HIPOCÓTILO por DILUCIÓN con intervalos de confianza del 95,0% (0 días)

			<i>Error Est.</i>		
<i>DILUCION</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
40	3	4,0	0,0333333	3,94565	4,05435
60	3	2,77222	0,0333333	2,71787	2,82658
80	3	0	0,0333333	-0,0543532	0,0543532
100	3	0,0666667	0,0333333	0,0123135	0,12102
Total	12	1,70972			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de HIPOCÓTILO para cada nivel de DILUCIÓN. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Anexo 6

Tabla de Medias para IG por DILUCIÓN con intervalos de confianza del 95,0% (T1-0 días)

			<i>Error Est.</i>		
<i>DILUCION</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
40	3	77,2366	0,0443889	77,1643	77,309
60	3	38,7626	0,0443889	38,6902	38,835
80	3	0	0,0443889	-0,0723803	0,0723803
100	3	0,0887777	0,0443889	0,0163975	0,161158
Total	12	29,022			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de IG para cada nivel de DILUCIÓN. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Anexo 7

Tabla de Medias para IG por DILUCIÓN con intervalos de confianza del 95,0% (CB1-0 días)

			<i>Error Est.</i>		
<i>DILUCION</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
40	3	88,0795	1,17511	86,1633	89,9956
60	3	146,46	1,17511	144,544	148,376
80	3	0	1,17511	-1,91613	1,91613
100	3	2,38344	1,17511	0,467305	4,29957
Total	12	59,2307			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de IG para cada nivel de DILUCIÓN. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Puede ver gráficamente los intervalos seleccionando Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Anexo 8

Pruebas de Múltiple Rangos para HIPOCÓTILO (cm) por TRATAMIENTO (30 días)

Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CA	3	0	X
T1	3	2,38839	X
T2	3	2,71323	X
CB1	3	2,71548	X
CB2	3	3,05903	X
CN	3	3,41336	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CA - CB1	*	-2,71548	1,76797
CA - CB2	*	-3,05903	1,76797
CA - CN	*	-3,41336	1,76797
CA - T1	*	-2,38839	1,76797
CA - T2	*	-2,71323	1,76797
CB1 - CB2		-0,34355	1,76797
CB1 - CN		-0,697883	1,76797
CB1 - T1		0,32709	1,76797
CB1 - T2		0,00224868	1,76797
CB2 - CN		-0,354333	1,76797
CB2 - T1		0,67064	1,76797
CB2 - T2		0,345799	1,76797
CN - T1		1,02497	1,76797
CN - T2		0,700132	1,76797
T1 - T2		-0,324841	1,76797

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 9

Pruebas de Múltiple Rangos para INDICE DE GERMINACIÓN (%) por TRATAMIENTO (30 días)

Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CA	3	0	X
T1	3	19,3794	X
CB1	3	23,3565	X
T2	3	26,7409	X
CB2	3	50,8875	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CA - CB1	*	-23,3565	18,586
CA - CB2	*	-50,8875	18,586
CA - T1	*	-19,3794	18,586
CA - T2	*	-26,7409	18,586
CB1 - CB2	*	-27,531	18,586
CB1 - T1		3,97705	18,586
CB1 - T2		-3,38448	18,586
CB2 - T1	*	31,508	18,586
CB2 - T2	*	24,1465	18,586
T1 - T2		-7,36152	18,586

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 10

Pruebas de Múltiple Rangos para HIPOCÓTILO (cm) por TRATAMIENTO (60 días)

Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CA	3	0	X
T2	2	1,24882	X
CN	3	3,41336	X
CB2	3	3,84513	X
CB1	3	4,39741	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CA - CB1	*	-4,39741	1,09627
CA - CB2	*	-3,84513	1,09627
CA - CN	*	-3,41336	1,09627
CA - T2	*	-1,24882	1,22567
CB1 - CB2		0,552278	1,09627
CB1 - CN		0,984048	1,09627
CB1 - T2	*	3,14858	1,22567
CB2 - CN		0,431771	1,09627
CB2 - T2	*	2,59631	1,22567
CN - T2	*	2,16454	1,22567

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.