

An aerial photograph of a flooded landscape. The water is a murky brown color, and there are patches of green vegetation, possibly mangroves or marshland, scattered throughout. The background shows a line of trees and hills under a cloudy sky.

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD CATABÓLICA
COMO INDICADOR BIOLÓGICO EN SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, EN
YARACAL - ESTADO FALCÓN, VENEZUELA**

Emelys Hurtado Blanco



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD CATABÓLICA COMO
INDICADOR BIOLÓGICO EN SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS, EN YARACAL - ESTADO FALCÓN,
VENEZUELA**

Trabajo Especial de Grado como requisito parcial para optar al título de
Licenciada en Química

Elaborado por: Emelys Hurtado

Tutor: Dr. Arnaldo Armado

Valencia, Junio 2016

Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología



Departamento de Química
Valencia - Venezuela

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Los abajo firmantes, Miembros del Jurado designado por el Consejo de Departamento, del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, hacemos constar que hemos revisado, evaluado y aprobado el siguiente Trabajo Especial de Grado:

***“EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD CATABÓLICA COMO INDICADOR
BIOLÓGICO EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, EN
YARACAL-ESTADO FALCÓN, VENEZUELA”.***

Presentado por la Bachiller: Emelys Hurtado.

C.I.: 18.774.938.

En Valencia, a los 15 días del mes de Junio del 2016.

Prof. Arnaldo Armado
(Tutor)



Prof. Juan Carlos Pereira
(Jurado)

Prof. Encarnación Fuentes
(Jurado)

DEDICATORIA

A Mis Padres

Zenaída Y Carlos

*A Mi Abuela Carmen Y Mi Hermano Engels Vladimír
(aunque no estén Físicamente, siempre estarán en
mí Corazón y mis Recuerdos)*

*A Mis Hermanitos Ernesto Daniel Y La Pequeña
Mílena del Carmen.*

“Nunca te Desprendas de tus Sueños, pues si ellos mueren tu Vida será, como un Pájaro con un ala rota, no podrás Volar. Aferrarse a un Sueño es Hacerlo Realidad y tener Paciencia es Verlo Cumplirse. Todo lo que puede Concebir y Creer la Mente del Hombre, Puede Lograrlo su Mano. Los Triunfos Nacen cuando nos Atrevemos a Comenzar.”



Ciencia, Investigación, Conocimiento, es lo que Marca el Inicio del Avance o Desarrollo Tecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Cuando se tiene Fe Indestructible, Perseverancia Infinita, disciplina y dedicación, suceden cosas que para muchos parecen imposibles. Con Satisfacción hoy doy Gracias:

A la Divina Presencia, porque para la Ciencia aún hay cosas que son inexplicables, Ser de Luz, Espíritu de Guía, que Siempre va delante de mí haciendo Fácil, Seguro y Triunfante mi Camino.

A la Universidad de Carabobo, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología y al Departamento de Química, Institución que fue la casa de estudio que permitió mi Crecimiento Profesional.

A mi Madre Zenaída Blanco, mi Templo, mi Fortaleza, mi Luz, el Ser que ha inundado de Amor mi existencia dándome la Fuerza, Esperanza y Apoyo durante las largas horas que demandó esta investigación y trabajo.

A mi Padre Carlos Hurtado, porque no interesan las faltas realizadas, sino el valor humano para cambiar, Gracias, porque en éste Camino, cuando te necesite, me apoyaste y me has confirmado que lo seguirás haciendo incondicionalmente.

A mi Hermano Engels Vladimír, te has marchado físicamente pero siempre permanecerás en mis recuerdos, un día me dijiste que no estarías en mi Acto de Grado, sé que estarás en Alma, Gracias porque siempre Creíste en mí.

A mi Hermanito Ernesto Daniel, el que enriquece mi Vida, poniendo un Granito de Locura cada día y llenándola con una Creatividad sin Límites.

A mi Tutor Dr. Arnaldo Armado, Amigo, Profesor, Maestro, Gracias por los Conocimientos Impartidos, enseñados con Paciencia, por ser la Guía para aprender sobre Bioquímica y la Ciencia de los Suelos, por su Entrega, y Cooperación durante el avance de la Tesis.

A los miembros del jurado evaluador, Prof. Juan Pereira y Prof. Eucandis Fuentes, por sus acertadas correcciones para lograr un producto final mejorado.

A la Lic. Ana Yelíza Armas y a las Técnicas de los laboratorios de Físicoquímica Beatriz Moy, Química Orgánica Lesbia Martínez y Química General y Analítica Dioleidy González, por la dotación de parte de los reactivos necesarios para llevar a cabo esta Investigación, Gracias por enseñarme con Paciencia y Dedicación, Mujeres Dignas de Admirar.

Al Centro de Investigaciones para el Ambiente, Biología y Química, de la Universidad de Carabobo, lugar que fue mi segunda casa, en el periodo transcurrido efectuando este estudio.

Al Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburos y Derivados, de la Universidad de Carabobo, por el tiempo que pase en él realizando parte de mi Investigación, a Gabriel Cordero por brindarme Apoyo en ésta área.

Al Prof. Mario Palacios, del Departamento de Biología, por su colaboración en el momento en el que la necesite.

A Toda la Familia González Ojeda, Sra. Nora, Sr. Cipriano, Gracias por Siempre prestarme su Apoyo Incondicional a lo largo de este camino, por hacerme Sentir Bienvenida en su Casa.

A todas las Personas, que de una u otra manera hicieron posible la realización de ésta Investigación.

MUCHAS GRACIAS...



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD CATABÓLICA COMO INDICADOR BIOLÓGICO EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, EN YARACAL - ESTADO FALCÓN, VENEZUELA

Autor: Emelys Hurtado

Tutor: Dr. Arnaldo Armado

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo, evaluar la diversidad catabólica como indicador biológico de la calidad, en suelos contaminados con hidrocarburos, ubicado en la zona de Yaracal-Estado Falcón, Venezuela. Para ello, se empleó la técnica de respiración inducida por sustrato (RIS). Se estudió un total de 10 muestras (5 contaminadas con crudo y 5 controles), las cuales fueron caracterizadas determinando los parámetros fisicoquímicos: textura, pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, contenido de humedad, retención hídrica y carbono orgánico total. Luego, se cuantificó la materia orgánica extraída por solvente en las muestras contaminadas y en los controles, así como también, el porcentaje de hidrocarburos totales del petróleo presente en las muestras contaminadas, empleando el método de extracción Soxhlet. Las muestras fueron incubadas con 29 sustratos carbonados que incluían carbohidratos, polímeros, aminas, amidas, alcoholes, aminoácidos y ácidos carboxílicos. En las muestras contaminadas con crudo se evidenció una disminución significativa en algunos parámetros fisicoquímicos tales como: pH, capacidad de intercambio

catiónico, humedad y retención hídrica. Además, se obtuvo una amplia diversidad catabólica, observándose mayor potencial de degradación para ácidos carboxílicos y menor para carbohidratos. También, los perfiles de respuesta de las comunidades microbianas, mostraron que el suelo contaminado presenta mayor respiración que los controles en los 29 sustratos carbonados, que fueron analizados con cada una de las muestras. El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el Análisis por Componentes Principales (ACP) y correlacionados a través del coeficiente lineal de Pearson. Se obtuvieron dos componentes, que describen el sistema satisfactoriamente, con un 82,357% de variabilidad en la data original.

Palabras Claves: Respiración inducida por sustrato, muestras contaminadas, crudo, hidrocarburos, sustratos carbonados.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



EVALUATION OF THE CATABOLIC DIVERSITY AS BIOLOGIC INDICATOR IN CONTAMINATED SOIL WITH HYDROCARBONS, IN YARACAL – FALCON STATE, VENEZUELA

Author: Emelys Hurtado

Tutor: Dr. Arnaldo Armado

ABSTRACT

This research had as objective, evaluate the catabolic diversity as biologic indicator of the quality, in soils contaminated with hydrocarbons, located in the zone of Yaracal-Falcon state, Venezuela. Therefore, was used the technique of substrate induced respiration (SIR). Ten samples (5 contaminated with crude and 5 controls) were studied, which were characterized determining the physicochemical parameters: texture, pH, electrical conductivity, cation exchange capacity, humidity content, hydric retention and total organic carbon. Then, was quantified the organic matter extracted by solvent in the contaminated samples and in the controls, as well as, the percentage of total petroleum hydrocarbons present, using the Soxhlet extraction method. The samples were incubated with 29 carbonates substrates that included carbohydrates, polymers, amines, amides, alcohols, aminoacids and carboxylic acids. Samples contaminated with crude showed a significant decrease in some physicochemical parameters such as: pH, cation exchange capacity, humidity and hydric retention. In addition, obtained a wide diversity of catabolic, observing a bigger potential of degradation for

carboxylic acids and less for carbohydrates. Besides, the response profiles in microbial communities showed that the contaminated soil present bigger respiration than the controls, with the 29 carbonates substrates that were analyzed in every single sample. Statistical data processing was performed using the Principal Component Analysis (PCA) and correlated through the Pearson linear coefficient. Two components were obtained that describe the system successfully, with a 82,357% of variability in the original data.

Keywords: Substrate induced respiration, contaminated samples, crude, hydrocarbons, carbonates substrates.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág.
Resumen	VII
Abstract	IX
Introducción	1
CAPÍTULO I. Formulación del Problema	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Objetivos de la investigación	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3. Justificación	5
CAPÍTULO II. Marco Teórico	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Bases Teóricas	13
2.2.1. Suelo	13
2.2.2. Propiedades físicas del suelo	13
2.2.3. Constantes de humedad del suelo	17
2.2.4. Propiedades químicas del suelo	17
2.2.5. Calidad del suelo	22
2.2.6. Indicadores de la calidad	24
2.2.7. Indicadores biológicos	24
2.2.8. Contaminación del suelo	25
2.2.9. Tipos de contaminación	25
2.2.10. Contaminación del suelo por petróleo	22
2.2.11. Respiración del suelo	27
2.2.12. Microbiología del suelo y biomasa microbiana	28
2.2.13. Respiración inducida por sustrato (RIS)	29
CAPÍTULO III. Marco Metodológico	31
3.1. Muestreo y preparación de las muestras	31
3.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo	36
3.2.1. Determinación de pH	36
3.2.2. Determinación de conductividad eléctrica	36
3.2.3. Determinación del contenido de humedad	36
3.2.4. Determinación de retención de humedad	36
3.2.5. Determinación de materia orgánica	37
3.2.6. Determinación de capacidad de intercambio catiónico	37

3.2.7.	Determinación de textura	38
3.3.	Determinación de la cantidad de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)	38
3.4.	Determinación de la diversidad catabólica	41
3.5.	Determinación de los perfiles de respuesta (RIS)	43
3.6.	Análisis Estadístico por Componentes Principales	44
CAPÍTULO IV. Análisis de Resultados		45
4.1.	Parámetros fisicoquímicos	45
4.2.	Extracción de materia orgánica y determinación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo	50
4.3.	Evaluación de la respuesta de las comunidades microbianas del suelo ante diversos compuestos orgánicos	53
4.4.	Determinación de los perfiles de respuesta por el método de Respiración Inducida por Sustrato	59
4.5.	Análisis estadístico de los datos	76
CAPÍTULO V. Conclusiones y Recomendaciones		85
5.1.	Conclusiones	85
5.2.	Recomendaciones	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		87
APÉNDICE		99

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Triángulo de las clases texturales del suelo.	15
Figura 2. Vista satelital de la zona estudiada.	32
Figura 3. Imagen de la zona estudiada del suelo control	35
Figura 4. Imagen de la zona estudiada del suelo contaminado	35
Figura 5. Equipo de extracción Soxhlet.	39
Figura 6. Rotoevaporador.	40
Figura 7. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado glucosa (carbohidratos).	60
Figura 8. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado sacarosa (carbohidratos).	61
Figura 9. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado galactosa (carbohidratos).	61
Figura 10. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado lactosa (carbohidratos).	62
Figura 11. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado almidón (polímeros).	62
Figura 12. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado celulosa microcristalina (polímeros).	63
Figura 13. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado dextrina (polímeros).	63
Figura 14. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado difenilamina (aminas).	64
Figura 15. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado úrea (amidas).	64
Figura 16. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado trietanolamina (aminas).	65
Figura 17. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado etanol (alcoholes).	65
Figura 18. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado tris (hidroximetil)aminometano (alcoholes).	66
Figura 19. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado butanol (alcoholes).	66

Figura 20.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado metanol (alcoholes).	67
Figura 21.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado etilenglicol (alcoholes).	67
Figura 22.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado triptófano (aminoácidos).	68
Figura 23.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado arginina (aminoácidos).	68
Figura 24.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado fenilalanina (aminoácidos).	69
Figura 25.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado glicina (aminoácidos).	69
Figura 26.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado histidina (aminoácidos).	70
Figura 27.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado tirosina (aminoácidos).	70
Figura 28.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido cítrico hidratado (ácidos carboxílicos).	71
Figura 29.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido oxálico dihidratado (ácidos carboxílicos).	71
Figura 30.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido ascórbico (ácidos carboxílicos).	72
Figura 31.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido acético (ácidos carboxílicos).	72
Figura 32.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido ftálico (ácidos carboxílicos).	73
Figura 33.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido salicílico (ácidos carboxílicos).	73
Figura 34.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido fumárico (ácidos carboxílicos).	74
Figura 35.	Perfil de respuesta de respiración inducida por el	74

	sustrato carbonado tartrato sódico de potasio (ácidos carboxílicos).	
Figura 36.	Correlación de las variables analizadas con el componente 1.	80
Figura 37.	Comportamiento de los componentes 1 y 2, obtenidos en el Análisis por Componentes Principales.	81
Figura 38.	Estructuras químicas de los carbohidratos.	134
Figura 39.	Estructuras químicas de las aminas y amidas.	134
Figura 40.	Estructuras químicas de los polímeros.	135
Figura 41.	Estructuras químicas de los alcoholes.	136
Figura 42.	Estructuras químicas de los aminoácidos.	137
Figura 43.	Estructuras químicas de los ácidos carboxílicos.	138
Figura 44.	Estructura química del Tartrato Sódico de Potasio.	138

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pág.
Tabla 1. Fracciones granulométricas del suelo.	14
Tabla 2. Clasificación del Suelo de acuerdo a su contenido de materia orgánica.	18
Tabla 3. Calidad edáfica del suelo de acuerdo a la relación C/N.	19
Tabla 4. Clasificación del suelo de acuerdo al pH.	21
Tabla 5. Pozo de origen y características de los crudos del petróleo.	27
Tabla 6. Reportes meteorológicos en la zona estudiada, el día jueves con fecha del 21 de mayo del año 2015	33
Tabla 7. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.	34
Tabla 8. Sustratos para la aplicación del Método de RIS.	43
Tabla 9. Composición porcentual y clase textural del suelo estudiado.	46
Tabla 10. Valores obtenidos de las propiedades fisicoquímicas en los suelos provenientes de Yaracal.	46
Tabla 11. Intervalos obtenidos de las propiedades fisicoquímicas en las muestras control y contaminadas con crudo y el valor recomendado de acuerdo a la referencia bibliográfica.	47
Tabla 12. Comparación de algunos parámetros fisicoquímicos realizados en este estudio, con estudios anteriores, en suelos contaminados con crudo.	48
Tabla 13. Materia orgánica evaluada por Soxhlet y calcinación y la composición de hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	51
Tabla 14. Comparación de las composiciones de hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados con crudo, con los reportados en otra investigación.	52
Tabla 15. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los carbohidratos.	53
Tabla 16. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los polímeros.	54
Tabla 17. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para las aminas y amidas.	54
Tabla 18. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los alcoholes.	55
Tabla 19. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los aminoácidos.	55
Tabla 20. Concentraciones de CO ₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los ácidos carboxílicos.	56
Tabla 21. Intervalos de CO ₂ para cada grupo de sustratos entre	57

	las muestras contaminadas con crudo y los controles.	
Tabla 22.	Comparación de los intervalos de CO ₂ obtenidos en este estudio, con valores reportados en otras investigaciones.	58
Tabla 23.	Análisis por componentes principales de los datos.	77
Tabla 24.	Valores obtenidos de los componentes 1 y 2 para las variables pertenecientes a los sustratos.	78
Tabla 25.	Valores obtenidos de los componentes 1 y 2 para las variables pertenecientes a los parámetros fisicoquímicos.	79
Tabla 26.	Coefficiente lineal de Pearson para las variables seleccionadas.	83
Tabla 27.	Datos para la determinación de pH y la conductividad eléctrica.	99
Tabla 28.	Datos para la determinación del contenido de humedad.	100
Tabla 29.	Datos para la determinación de la retención hídrica.	101
Tabla 30.	Datos para la determinación de la materia orgánica del suelo por calcinación y el carbono orgánico total.	102
Tabla 31.	Datos para la determinación de la clase textural del suelo.	103
Tabla 32.	Datos para la determinación de la materia orgánica por el método de Soxhlet y el contenido de HTP.	104
Tabla 33.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la glucosa.	105
Tabla 34.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la sacarosa.	106
Tabla 35.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la galactosa.	107
Tabla 36.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la lactosa.	108
Tabla 37.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del almidón.	109
Tabla 38.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la celulosa microcristalina.	110
Tabla 39.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la dextrina.	111
Tabla 40.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la difenilamina.	112
Tabla 41.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la úrea.	113
Tabla 42.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la trietanolamina.	114

Tabla 43.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del etanol.	115
Tabla 44.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del tris(hidroximetil)aminometano.	116
Tabla 45.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del butanol.	117
Tabla 46.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del metanol.	118
Tabla 47.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del etilenglicol.	119
Tabla 48.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del triptófano.	120
Tabla 49.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la arginina.	121
Tabla 50.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la fenilalanina.	122
Tabla 51.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la glicina.	123
Tabla 52.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la histidina.	124
Tabla 53.	Datos para la determinación de la respiración microbiana de la tirosina.	125
Tabla 54.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido cítrico hidratado.	126
Tabla 55.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido oxálico dihidratado.	127
Tabla 56.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido ascórbico.	128
Tabla 57.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido acético.	129
Tabla 58.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido ftálico.	130
Tabla 59.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido salicílico.	131
Tabla 60.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Ácido fumárico.	132
Tabla 61.	Datos para la determinación de la respiración microbiana del Tartrato sódico de potasio.	133

INTRODUCCIÓN

Venezuela es un país poseedor de las mayores reservas probadas de crudo pesado del mundo, y de las mayores reservas de crudo liviano en todo el hemisferio occidental (Díaz, 2006). Esto permitió la explotación y exportación de un recurso natural no renovable como lo es, el petróleo. Según la real academia de la lengua española, el petróleo es un *“líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos, que se extrae de lechos geológicos continentales o marítimos. Mediante diversas operaciones de destilación y refino se obtienen de él distintos productos utilizables con fines energéticos o industriales, como la gasolina, la nafta, el queroseno, el gasóleo, etc.”* Para extraer el petróleo del suelo, se perforan los pozos, que luego es trasladado, para ser procesado y almacenado. Éste tipo de actividad ocasionan la contaminación de la superficie terrestre que se filtran hacia el suelo y subsuelo alterando y afectando la funcionalidad del ecosistema debido a los niveles de toxicidad del crudo (Díaz, 2006; Noguera, 2010). Siendo esto una degradación química que provoca pérdida parcial o total de la productividad del suelo (Brissio, 2005; Noguera, 2010).

Un suelo contaminado es aquel que ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias, las cuales originan alteraciones importantes en las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo (Fernández et al, 2008; Noguera, 2010). Uno de los componentes más importantes del suelo, que se ven afectados por la contaminación, son los microorganismos dada su alta abundancia, su alta diversidad aparente, y la multiplicidad de funciones metabólicas implicadas en procesos ecosistémicos que incluyen: ciclos biogeoquímicos, la transformación y mineralización de materia orgánica y la degradación de compuestos xenobióticos (Yanine, 2010). Por consiguiente, los microorganismos se relacionan con la comunidad de la rizosfera, porque la misma, consiste en una microflora (bacterias, hongos y algas) y una mesofauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros), dada esta estrecha relación, los microorganismos han sido postulados como indicadores en la calidad del suelo (Yanine, 2010). De allí que, si los niveles de contaminación son altos afectará también a los microorganismos y al medio ambiente en general. Por lo tanto, la contaminación por derrames de petróleo varía en su valor original debido a la

cantidad y tipo de hidrocarburos derramados. Por lo cual, es de interés común para la humanidad el estudio de las ventajas y desventajas del petróleo con respecto al medio ambiente, a fin de encontrar alternativas factibles para solucionar los problemas ambientales generados por los procesos de la industria moderna (Díaz, 2006).

En éste estudio se evaluó la diversidad catabólica como bioindicador en suelos impactados por derrames de petróleo, en muestras provenientes de la localidad del Mene de San Lorenzo, en la población de Yaracal, estado Falcón, donde se encuentran pozos petroleros que antiguamente fueron zona de explotación.

CAPÍTULO I: FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del Problema

El mejoramiento de la calidad de los suelos venezolanos, es de interés para científicos e investigadores ambientalistas dedicados a la edafología. Esto se debe a que, el suelo es la porción de la corteza terrestre donde se desarrolla la vida, forma una capa muy delgada, y al contener los elementos químicos necesarios para la fotosíntesis y servir de sustrato al que fijarse las plantas, es una porción del medio físico de gran importancia (Gold *et al.*, 1998). Es por ello que, las diversas actividades humanas en el uso del suelo, tales como la agricultura, ganadería, construcciones urbanas, junto con las grandes obras públicas como: autopistas, carreteras, vías ferroviarias, industrias petroleras, conllevan en muchas ocasiones a la destrucción de tierras fértiles y contribuyen al incremento de suelos agotados e improductivos, que con el tiempo, generan contaminación edáfica o la degradación de los suelos. Un suelo se puede degradar al acumularse en él, sustancias a unos niveles de concentración tales que repercuten negativamente en la productividad de los suelos, ya que se vuelven tóxicas para los organismos de éste (Porta *et al.*, 2008).

Uno de los factores contaminantes más importantes lo constituye el petróleo, causando daños irreversibles al suelo, a pesar de ser la principal fuente de energía utilizada por el hombre hoy día. El oro negro es el resultado de la actividad continuada durante millones de años de un cierto tipo de bacterias, capaces de vivir y realizar las oportunas fermentaciones anaeróbicas. De éste líquido viscoso de color oscuro, se obtienen sustancias compuestas de hidrocarburos y también gran cantidad de productos derivados del petróleo (Gold *et al.*, 1998).

Es por ello que, la localidad del Mene de San Lorenzo ha sido de total preocupación, ya que ésta zona presenta contaminación generada por derrames de crudo mediano, provenientes de pozos petroleros que antiguamente fueron explotados, éste tipo de contaminación conlleva a un cambio en las características físicas, químicas y biológicas del suelo. Además, de poner en riesgo la salud humana, la vida animal, las plantas, pero principalmente a las poblaciones de microorganismos, los cuales

representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Zamora *et al.*, 2010). Resulta claro entonces que, las cifras actuales de contaminación y la baja calidad edáfica crean la necesidad de indagar técnicas y métodos para mejorar la afectación del suelo estudiado en la población de Yaracal.

Por lo anteriormente mencionado, la actividad microbiológica representa un bioindicador que determina el estado de salud de un suelo contaminado, y por ende la calidad del mismo. Éste parámetro biológico presenta numerosas ventajas frente al empleo de indicadores físico-químicos, entre las que destacan su mayor sensibilidad, carácter integrador, y su alta velocidad de respuesta (Elliott, 1997). De allí que, se evaluó la diversidad catabólica como indicador biológico, de suelos afectados por hidrocarburos, ubicados en la localidad del Mene de San Lorenzo, en la población de Yaracal, estado Falcón.

1.2. Objetivos de la Investigación

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la diversidad catabólica como indicador biológico de suelos contaminados con hidrocarburos, ubicados en la localidad del Mene de San Lorenzo, Yaracal, estado Falcón.

1.2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Determinar parámetros físicos (retención de humedad, contenido de humedad y textura) y químicos (pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico y carbono orgánico total) en las muestras de suelo a estudiar.
- ❖ Cuantificar el contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en las muestras contaminadas.

- ❖ Evaluar la respuesta de las comunidades microbianas del suelo ante diversos compuestos orgánicos, mediante la aplicación de la técnica de respiración inducida por sustrato (RIS) en muestras contaminadas y no contaminadas con petróleo.
- ❖ Determinar los perfiles de respuesta de la técnica de respiración inducida por sustrato para cada muestra.
- ❖ Analizar estadísticamente los perfiles de la respiración inducida por sustrato (RIS) obtenidos en presencia o ausencia de suelos contaminados con petróleo.

1.3. Justificación

La falta de información derivada del escaso conocimiento acerca de la totalidad de los microorganismos presentes en el suelo, conlleva a un desconocimiento de la base productiva de la mayoría de la biomasa mundial (Yanine, 2010). La cual sin duda está basada en las interacciones microbianas, en algunos casos los microorganismos constituyen las únicas formas de vida en ambientes extremos y conforman las primeras poblaciones colonizadoras en ambientes intervenidos severamente por el hombre o por eventos naturales de gran magnitud. Es claro que sin la presencia de microorganismos en el suelo, el ciclaje de nutrientes se interrumpiría y llegaría al punto en que los reservorios naturales de estos elementos se agotarían (Yanine, 2010).

Este impacto podría reflejarse en la desaparición de poblaciones de macroorganismos dependientes de esos reservorios, puede ser entonces que la extinción de algunas poblaciones de plantas o animales, que son atribuidas a la explotación agrícola intensiva, sea en realidad un evento posterior al impacto generado en las comunidades microbianas, muchas veces originadas por los derrames de crudo, la cual es una de las principales fuentes de contaminación de suelos ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos, porque el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a todos los seres vivos y al ecosistema en general (Zamora *et al.*, 2010).

Con respecto a lo anterior, evaluar la diversidad catabólica como bioindicador en suelos contaminados por derrames de petróleo, representa un enfoque de cambios en el uso que se le daría a los suelos porque se tendría una medida valorable en cuanto a la calidad edáfica se refiere, además de tener una base para proveer mejoras futuras, lo cual es beneficioso, no sólo para la humanidad en general, sino también por la recuperación de tierras fértiles que trabajos posteriores podrían realizar.

En la localidad del Mene de San Lorenzo, ubicada en la población de Yaracal, estado Falcón, existieron 82 pozos que fueron explotados hace más de 85 años. Las extracciones de crudo cesaron en el año 1937, a partir de allí, 67 pozos fueron cementados y saneados; sin embargo, hasta el año 2014, existieron 15 pozos abandonados que emanaban crudo de manera natural, lo que trajo como consecuencia la contaminación del suelo (Barrios y Polychroniadis, 2008; Noguera y Armado, 2010). Para el año 2015, momento en el que se realizó el muestreo, los pozos se encontraban cementados, pero se observó un claro cambio de color en el suelo y el olor a hidrocarburos era diferenciable con otras zonas del lugar. Por tal motivo, en éste estudio se evaluó la diversidad catabólica utilizando diferencias entre la respiración inducida por sustrato (RIS) como respuesta de las comunidades microbianas ante compuestos orgánicos, en muestras que se tomaron en pozos petroleros inactivos y en zonas aledañas a los pozos, de la localidad anteriormente mencionada.

La presente investigación se justifica, ya que como fin, pretendió dar a conocer una medida de la calidad del suelo contaminado con petróleo, por esto, puede servir como base para otras investigaciones donde requieran mejorar y recuperar suelos contaminados con hidrocarburos y en un futuro darle un uso productivo.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Evaluación de metales en suelos contaminados por derrames de crudo en Yaracal, estado Falcón, Venezuela (Noguera y Armado, 2010). Evaluaron los contenidos de manganeso (Mn), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), cobalto (Co), zinc (Zn), hierro (Fe) y molibdeno (Mo) en suelos contaminados con petróleo, provenientes de la localidad del Mene de San Lorenzo, Yaracal, estado Falcón. También determinaron su relación con el nivel de contaminante presente, además analizaron si el contenido en metales se encuentra dentro de valores permisibles según las normativas ambientales. Realizaron el estudio seleccionando 10 muestras (5 de suelos contaminados con petróleo y 5 controles de suelos aledaños a los pozos), las cuales fueron sometidas a digestión ácida para determinar las concentraciones de los metales mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama, empleando como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco para cada metal en particular. También cuantificaron la materia orgánica extraíble por solvente presente en el suelo, mediante una extracción Soxhlet basándose en el método EPA 3540 (1996), utilizando como solvente extractor una mezcla cloroformo-metanol (7:3), y por diferencia obtuvieron la cantidad de materia orgánica asociada al petróleo. Estimaron la correlación lineal entre las variables utilizando el coeficiente de correlación ordinal de Spearman (rs), el cual asume como hipótesis nula, probar la no correlación de las variables, según Miller y Miller (2002).

Los resultados indicaron que, la materia orgánica extraída por Soxhlet no presentó diferencias importantes con la materia orgánica determinada por oxidación vía húmeda; ambos métodos presentaron valores reproducibles. Así como también, según las caracterizaciones fisicoquímicas que obtuvieron, generalizaron que la CIC y la retención de humedad disminuyen en suelos contaminados, mientras que, el porcentaje de carbono orgánico aumenta.

Concluyeron, que los niveles de cadmio (Cd) rebasaron los límites permisibles para el esparcimiento en suelos, según la Gaceta Oficial (1998). También los umbrales de contaminación propuestos para elementos trazas

en la comunidad Andaluza, presentaron en general mayores valores en las muestras contaminadas con hidrocarburos. Adicionalmente, los contenidos de cromo (Cr) y níquel (Ni) en algunas muestras indicaron una posible toxicidad, ya que se encontraron fuera de los límites permisibles según las normativas ambientales.

Estudio de la Actividad Microbiológica y Biomasa Microbiana en Suelos Impactados con Petróleo, ubicados en Yaracal estado Falcón (Guerrero, 2010). Estudió la actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos impactados con petróleo, ubicados en Yaracal estado Falcón. Empleó el método de incubaciones estáticas siguiendo el desprendimiento de CO_2 por la actividad de los microorganismos del suelo para determinar la actividad microbiológica (respiración basal). Utilizó los métodos de respiración inducida por sustrato (RIS) y extracción-fumigación (FE), para la biomasa microbiana y adicionalmente determinó el coeficiente metabólico $q\text{CO}_2\text{RIS}$ y $q\text{CO}_2\text{FE}$. El estudio lo realizó con muestras de 4 pozos petroleros ubicados en la zona del Mene de San Lorenzo, con muestras contaminadas y no contaminadas con crudo proveniente de los pozos.

La respiración basal fue determinada durante 40 días de incubación, obteniendo valores que van desde 6,5 a 38 $\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{kgS}^{-1}\text{día}^{-1}$ para las muestras contaminadas, y de 11,3 a 32 $\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{kgS}^{-1}\text{día}^{-1}$ en las muestras control. En dos de los pozos estudiados obtuvo una inhibición de la respiración debido a la presencia del petróleo, mientras que en los otros dos pozos aumentó la mineralización de carbono en las muestras contaminadas respecto al control. En cuanto a la biomasa microbiana por FE, obtuvo valores que variaron desde 48 a 138 $\mu\text{g C}_{\text{mic}} \cdot \text{gS}^{-1}$ para los suelos contaminados con hidrocarburos, y en los suelos control valores entre 211 y 640 $\mu\text{g C}_{\text{mic}} \cdot \text{gS}^{-1}$. En la biomasa microbiana, por el método de RIS, los resultados obtenidos para los suelos contaminados estuvieron entre 160 y 207 $\mu\text{g C}_{\text{mic}} \cdot \text{gS}^{-1}$ y observó que la biomasa microbiana disminuyó en las muestras contaminadas con petróleo en ambos métodos, mientras que el coeficiente metabólico aumentó, lo que indicó que hubo mayor estrés microbiano en las muestras contaminadas con hidrocarburo. La correlación de los parámetros fisicoquímicos con el contenido de hidrocarburos del petróleo, la realizó utilizando el coeficiente lineal de Pearson, y obtuvo una

correlación significativa ($p < 0,05$) con la biomasa microbiana (FE) y el qCO_2RIS , lo que implicó que a medida que aumentó la concentración de HTP, aumenta la BM FE y hay mayor estrés microbiano por lo que qCO_2RIS aumenta. Concluyó que los parámetros bioquímicos de los suelos estudiados, se ven afectados por la presencia del petróleo.

Diversidad Microbiológica de Bacterias y Hongos en Suelos Impactados con Petróleo Provenientes de Yaracal, Estado Falcón, Venezuela (Oropeza, 2010). El objetivo de éste trabajo fue estudiar la diversidad de microorganismos existentes en suelos con presencia y ausencia del petróleo como contaminante, provenientes del Mene de San Lorenzo, Yaracal, estado Falcón, Venezuela. El estudio lo realizó tomando 4 muestras de pozos donde se observó la emanación de petróleo, y a una distancia de 30 m seleccionó muestras control. El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) la realizó en placas utilizando agar LB como medio de crecimiento, complementado con Ciprofloxacina® para inhibir el crecimiento de bacterias y con Fluconazol® para inhibir el crecimiento de hongos. Para los microorganismos fijadores de nitrógeno utilizó medio Burk's con agar-agar como gelificante.

Encontró que el petróleo afectó de manera diversa a las comunidades de microorganismos en los suelos estudiados, observando en las muestras contaminadas con petróleo una disminución de dichas comunidades comparadas con las no contaminadas. Asimismo, encontró 28 colonias bacterianas representativas con un 60% de Bacilos Gram-positivos y 40% de Cocos Gram-positivos para las muestras contaminadas. En el caso de los hongos aisló 17 colonias e identificó dos géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Para los microorganismos fijadores de nitrógeno encontró 10 colonias con un 44,44% de Bacilos Gram-positivos, 33,33% de Cocos Gram-positivos y 22,22% de Cocos Gram-negativos en las muestras control, mientras que en las muestras contaminadas sólo encontró una colonia de Cocos Gram-negativos. Observó que los organismos fijadores de nitrógeno se correlacionaron con las bacterias. Demostró que bajo una determinada concentración de petróleo, algunas familias microbianas pueden adaptarse al agente perturbador y que muchas otras no. Llegó a la conclusión de que las

bacterias Gram-negativas y los hongos fueron más sensibles a la presencia del contaminante que las bacterias Gram-positivas.

Estudio de Actividades Enzimáticas Involucradas en el Ciclo del Nitrógeno en Suelos Impactados con Petróleo ubicados en Yaracal-Estado Falcón (Suárez, 2010). Determinó los efectos del petróleo sobre la actividad enzimática de la ureasa, proteasa y desaminasa, en suelos impactados con petróleo, ubicados en Yaracal-Estado Falcón. La actividad de las enzimas presentaron correlaciones significativamente ($p > 0,05$) negativas con relación a la cantidad de contaminación, lo que indicó que el contaminante afecta directa o indirectamente la actividad de esas enzimas, permitiendo que puedan ser utilizadas como bioindicadores en un estudio de remediación de dicho suelo. Por otra parte, todas las actividades que estudió, presentaron correlación con la humedad relativa y la capacidad de retención de humedad, ya que la disponibilidad de agua afecta a la velocidad de reacción donde actúan estas enzimas.

Asimismo, la actividad ureásica se correlacionó positivamente con la cantidad de amonio y nitrato, ya que estos son productos de la hidrólisis de la urea y la nitrificación del amonio, respectivamente. El pH se correlacionó positivamente con el porcentaje de inhibición, pues la enzima pierde su propiedad catalítica a causa de cambios bruscos de esta propiedad. También correlacionó la actividad proteásica con el contenido de nitrato, ya que se relaciona con la liberación de aminoácidos que luego por degradación oxidativa producen nitrato. Concluyó que las actividades enzimáticas estudiadas presentaron correlaciones entre sí, porque al estar involucradas en el ciclo del nitrógeno, la disminución o incremento de alguna de ellas determina la disponibilidad de los sustratos sobre los que deben actuar las otras.

Diversidad Catabólica como Bioindicador de la Calidad en Suelos ubicados en el sector el Ereigüe, San Joaquín, Estado Carabobo (Linares, 2011). Para ello aplicó la técnica de respiración inducida por sustrato (RIS), mediante un método fisiológico desarrollado por Degens y Harrys (1997), para evaluar la diversidad funcional de los organismos del

suelo usando patrones de sustratos, como bioindicador de la calidad del suelo. Evaluó la diversidad catabólica del suelo que perteneció a un vertedero ubicado en el sector el Ereigüe, San Joaquín, Estado Carabobo. Verificó la variación de la actividad microbiológica que presenta, medida en función del desprendimiento de dióxido de carbono proveniente de la respiración de los microorganismos, para determinar las respuestas que produce el suelo en un estado contaminado como no contaminado.

El estudio lo realizó con 20 muestras (10 de suelos, 8 de rellenos y 2 controles) las cuales fueron tratadas con 32 sustratos que incluían una gama de ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas, amidas, aminoácidos, polímeros y carbohidratos. Obtuvo una amplia diversidad catabólica, observando mayor potencial de degradación para ácidos carboxílicos y menor para carbohidratos. Los perfiles de respuesta de RIS para los 32 sustratos que usó, mostraron que el suelo contaminado presenta mayor respiración que el relleno, en todas las muestras. Concluyó que ello se debe a que los microorganismos de éste suelo poseen muy poca fuente de nutrientes, por lo que, al ser impactados con los sustratos orgánicos, los degradaron en gran medida.

Procesó los datos mediante el Análisis por Componentes Principales (ACP), para obtener el menor número de combinaciones lineales para las 20 muestras (suelo, relleno, y controles). Obtuvo dos componentes que describieron el sistema satisfactoriamente, con un 88,03% de variabilidad de la data original. Además observó una mayor correlación de la RIS con la humedad relativa, ya que éste último, es uno de los factores más importantes que regula la actividad y composición de la comunidad biótica del suelo.

Actividad y Diversidad funcional de las comunidades microbianas edáficas en función del tipo de pasto y su manejo en el parque natural de Gorbeia (Anza *et al.*, 2014). Evaluaron el efecto del tipo de manejo de pasto, llevado a cabo en diferentes hábitats pascícolas, sobre las características físico-químicas del suelo, y la actividad y diversidad funcional de sus comunidades microbianas. Para ello analizaron sus perfiles fisiológicos en microplacas ECO-BiologTM y FF-BiologTM, que aportan información de la diversidad catabólica/funcional de las comunidades edáficas de bacterias y hongos respectivamente. El área de estudio fue el

entorno del parque natural de Gorbeia, ubicado en la divisoria de aguas Cántabro-Mediterránea, entre los territorios históricos de Alava y Bizkaia.

El muestreo lo realizaron en época de verano en un plazo de 2 meses, y tomaron muestras en tres tipos de hábitats: helechales, pastos de montaña y pastos de fondo de valle, asentados tanto sobre suelo calizo como sobre suelo silíceo, resultando 6 combinaciones hábitat por suelo. En los pastos de fondo de valle tomaron muestras en pastos destinados a la producción de heno, en pastos de diente y en mixtos (3 combinaciones de manejo por suelo). De cada combinación de tratamientos, tomaron 4 muestras de suelo (réplicas) en zonas espacialmente diferenciadas, compuestas cada una por 10 submuestras (cercanas entre sí). La caracterización físico-química la realizaron según los métodos estandarizados (MAPA, 1994), para la determinación de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad de las bacterias edáficas. Para ello utilizaron las microplacas Biolog EcoPlates™, las cuales contienen 3 repeticiones de 31 fuentes de carbono potencialmente asimilables por las bacterias. Del mismo modo, utilizaron las microplacas Biolog FF-Plates™ para el análisis de la comunidad fúngica, las cuales comprenden una única replica por placa con 95 sustratos de carbono diferentes. El número de sustratos utilizados (NSU) lo determinaron contando el número de pocillos con una absorbancia superior a 0,25, que sería el equivalente a la riqueza de especies.

Procesaron los datos con el programa estadístico CANOCO 5.0, para determinar la influencia de las variables físico-químicas sobre las biológicas. Realizaron un análisis de redundancia (RDA), para evaluar las posibles interacciones entre el material parental y el tipo de hábitat. Realizaron dos análisis de redundancia parcial (p-RDA) con el manejo realizado en los pastos de fondo de valle. Además, calcularon el porcentaje de variabilidad que explica cada variable explicativa. Concluyeron que la actividad y diversidad funcional de hongos fue mayor en suelos ácidos. Por su parte, la actividad y diversidad bacteriana, estuvo positivamente correlacionada con los niveles de nutrientes en el suelo. La mayor diversidad catabólica y actividad fúngica la observaron en los helechales, mientras que los valores de bacterias disminuyeron en el hábitat pascícola. A pesar del poco valor forrajero, los helechales mostraron tener un valor real considerable en términos de conservación de la biodiversidad microbiana.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Suelo

Existen diferentes conceptos de suelo, lo cual depende de las características de usos del mismo y del punto de estudio que se le dé, si se considera el suelo en su conjunto como un sistema disperso, constituido por tres fases (sólida, líquida y gaseosa), se pueden distinguir en él, cuatro grandes componentes: materia mineral, materia orgánica, agua y aire, íntimamente ligados, mezclados entre sí, y originando un medio ideal para el crecimiento de las plantas (García *et al.*, 2003). El suelo edafológicamente, es la parte superficial de la corteza terrestre, en contacto con la atmósfera y sometida a la acción de la erosión (mecánica y química) de los animales y de las plantas, lo que produce la alteración y disgregación de las rocas (Gold *et al.*, 1998). El suelo desde el punto de vista hidrológico, es un depósito o almacén de agua cuya capacidad para retenerla y contenerla depende de sus propiedades físicas (Vargas *et al.*, 2004).

2.2.2. Propiedades Físicas del Suelo

Son aquellas que reflejan la manera en que el suelo acepta, retiene y transmite agua a las plantas, así como las limitaciones que se pueden encontrar en el crecimiento de las raíces, la infiltración o el movimiento del agua dentro del perfil y que además estén relacionadas con el arreglo de las partículas y los poros (Jaramillo, 2002). Algunas propiedades físicas del suelo son:

Textura: Es la propiedad y composición física de un suelo, establece las cantidades relativas en que se encuentran las partículas de diámetro menor a 2 mm en el suelo. Estas partículas son llamadas separados y se agrupan por tamaño en tres clases: arena, limo y arcilla, es decir, se refiere al porcentaje con que se presentan los diversos materiales constitutivos de un suelo. La clasificación internacional de estos con respecto a su tamaño se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Fracciones granulométricas del suelo.

Fracción granulométrica	Diámetro de partícula
Arena	Entre 0,02 y 0,2 mm
Limo	Entre 0,002 y 0,02 mm
Arcilla	Menor de 0,002 mm

Fuente: Sagardoy y Mandolesi (2004)

La determinación de la textura se realiza a través de dos métodos: al tacto y del hidrómetro. El **método al tacto**, el cual toma en cuenta ciertas propiedades en el suelo tales como: la sensación que se produce al frotar la muestra entre los dedos, la facilidad de formar cintas y bolas con la muestra y la firmeza de ellas, así como la adhesividad o pegajosidad de la muestra al ser sometida a compresión entre los dedos y posteriormente al ser liberada esta compresión (Jaramillo, 2002).

El **método del hidrómetro** o de **Bouyoucos por sedimentación**, basado en la ley de Stokes, la cual establece calcular la velocidad de caída de las partículas en función de su densidad, de su tamaño, de su viscosidad y densidad del líquido. Dado que es casi imposible que una muestra de suelo esté constituida por un solo tamaño de partículas, se han estandarizado grupos texturales basados en diferentes combinaciones de arcilla, limo y arena (Jaramillo, 2002).

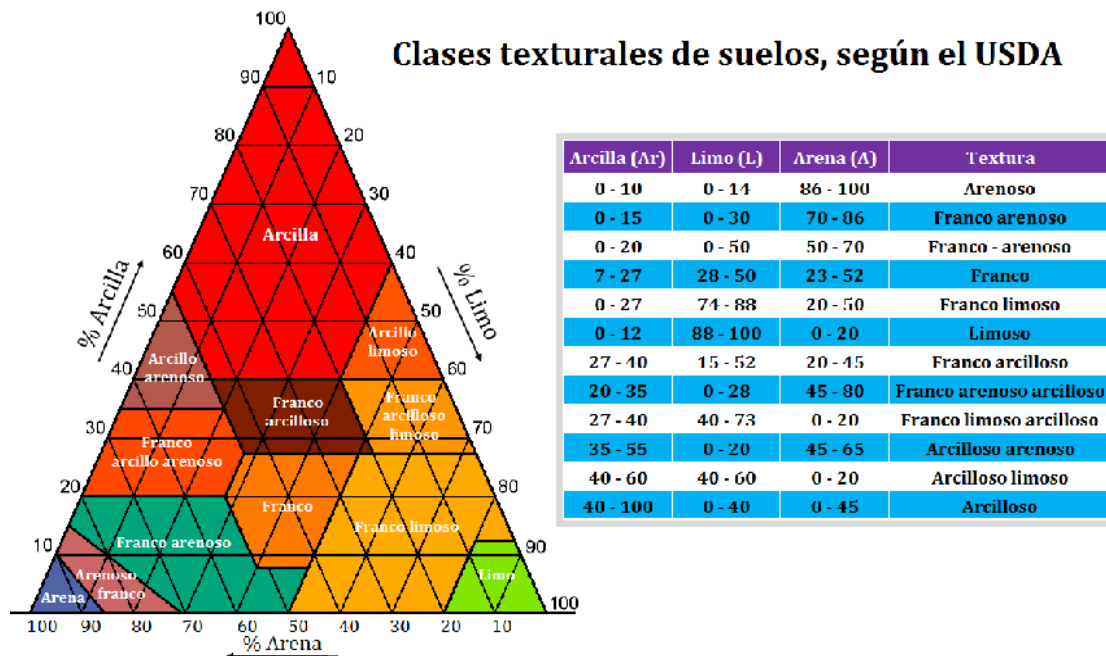


Figura 1. Triángulo de las clases texturales del suelo. Fuente: García (2005).

Estructura del Suelo: Se refiere al arreglo de las partículas del suelo con respecto a las tres dimensiones del espacio, a su forma de unión y a sus aglutinantes, lo cual permite conocer la continuidad del suelo en cuestión, los espacios y huecos que posee, que son los conductos para el agua y el aire, necesarios para el desarrollo de las plantas (Gold *et al.*, 1998).

Densidad Real o Peso Específico Real: Peso de las partículas sólidas del suelo, relacionado con el volumen que ocupan, sin tener en cuenta su organización. Naturalmente su cifra es próxima a $2,6 \text{ g/cm}^3$ (Gold *et al.*, 1998).

Densidad Aparente o Peso Específico Aparente: Es la relación entre el peso de un volumen de tierra tomado en un suelo seco y el peso del mismo volumen de agua. Este concepto tiene en cuenta la textura, estructura y compactación del suelo (Pineda *et al.*, 2004).

Porosidad: Es el porcentaje del volumen que ocupan los huecos o espacios vacíos del suelo, (llenos de aire o agua) en relación con el volumen total (Ferreiro, 2003).

Permeabilidad: Se define como la velocidad de filtración de un suelo para el agua, cuando el gradiente hidráulico es la unidad (Ferreiro, 2003).

Humedad del Suelo: El arreglo físico edáfico y la distribución de tamaños de poros y agregados intervienen en el comportamiento de la humedad en el suelo, además del aporte del agua de lluvia o de riego y la empleada en la evotranspiración. La humedad es uno de los factores más importantes que regula la actividad y composición de la comunidad biótica de un suelo. La humedad afecta directamente a los microorganismos determinando el trabajo que debe realizar un organismo para mantener un nivel adecuado de agua en su protoplasma. La humedad también afecta la cantidad de aire que disponen los organismos del suelo, puesto que el agua y el aire ocupan competitivamente los poros del suelo. Si el agua se incrementa en un suelo disminuye el contenido de aire del mismo y viceversa. En general, cuando se incrementa el contenido de humedad en un suelo seco, se aumenta la proliferación de los organismos en el mismo (Sagardoy y Mandolesi, 2004).

Para determinar la humedad de una muestra representativa de suelo, se toma una muestra de peso conocido y se lleva a sequedad en el horno por un lapso de 24 horas, la diferencia de peso indica el contenido de humedad presente en la muestra, se puede observar en la ecuación 1 (Jaramillo, 2002):

$$W \% = \frac{Psh - Pss}{Pss} * 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Dónde: W = Porcentaje de humedad (%), Psh = Peso del suelo húmedo (g), y Pss = Peso del suelo seco (g)

2.2.3. Constantes de Humedad del Suelo

Capacidad de Campo: Es el contenido de humedad con que queda el suelo luego de que sus macroporos han drenado completamente, se llega a esta condición de humedad luego de dejar drenar el suelo saturado, entre 48 y 72 horas, el agua en esta condición esta retenida a tensiones comprendidas entre -0,1 y -0,3 atm (Jaramillo, 2002).

Punto de Marchitez Permanente: Contenido de humedad del suelo al cual la planta se marchita irreversiblemente, el agua del suelo en este punto esta retenida a -15 atm, aproximadamente (Jaramillo, 2002).

Coeficiente Higroscópico: Contenido de humedad que retiene el suelo cuando se seca al aire, esta humedad es retenida a una tensión de -30 atm, aproximadamente (Jaramillo, 2002).

Agua Aprovechable del Suelo: Es la humedad que presenta el suelo retenida entre el punto de marchitez permanente y la capacidad de campo. Se determina el contenido de agua en las muestras de suelo (humedad relativa) por diferencia de peso (método gravimétrico), así como también la retención de humedad de las mismas (capacidad de campo), (Jaramillo, 2002).

2.2.4. Propiedades Químicas del Suelo

Se refieren a las condiciones que afectan las relaciones suelo-planta, la calidad del agua, la capacidad amortiguadora del suelo, la disponibilidad de agua y nutrimentos para las plantas y microorganismos (SQI, 1996). Entre algunas propiedades químicas se pueden mencionar: materia orgánica, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico y pH o reacción del suelo (Jaramillo, 2002).

Materia Orgánica: Es un parámetro relacionado directamente con la calidad edáfica. Los residuos orgánicos sin descomponer están formados por: hidratos de carbono simples y complejos, compuestos nitrogenados, lípidos, ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, málico, malónico, succínico), polímeros y compuestos fenólicos (ligninas, taninos, entre otros.) y elementos minerales. Todos estos residuos sufren una serie de transformaciones mediante reacciones químicas y microbiológicas, que permite su degradación a sus componentes iniciales, la acumulación de dichos componentes en la superficie del suelo da como resultado la formación de la materia orgánica (Meléndez, 2003). La principal fuente de la materia orgánica son los residuos vegetales, los cuales aportan energía y alimento a los organismos del suelo, al mismo tiempo que son la materia prima para la formación de los coloides orgánicos (humus) que se acumulan en el suelo (García *et al.*, 2003).

Según su contenido de materia orgánica, los suelos pueden clasificarse como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación del suelo de acuerdo a su contenido de materia orgánica.

% MO	Clasificación del Suelo
0-2	Muy deficiente en MO
2-4	Deficiente en MO
4-6	Contenido normal de MO
6-8	Contenido apreciable en MO
8-10	Humífero
>10	Muy Humífero

Fuente: Bandick y Dick (1999)

El contenido de materia orgánica interviene en la estructura del horizonte, ayuda a formar los complejos arcillo-húmicos del suelo, mejora la capacidad de infiltración del agua en suelos arcillosos, aumenta la capacidad de retención en los suelos arenosos y determina la disponibilidad de nutrientes, influyendo por tanto positivamente en la productividad del suelo (Bandick y Dick, 1999).

Los compuestos húmicos generalmente representan entre 50-85% de la materia orgánica total del suelo, para fines prácticos, la MF (materia orgánica fresca) y la MNH (materia orgánica no húmica) se consideran como un solo grupo de materiales (Bandick y Dick, 1999; Suárez, 2010).

El conocimiento de la dinámica de la materia orgánica del suelo (MOS) es esencial para entender el flujo del carbono (C) y nitrógeno (N) en el suelo (Chang *et al.*, 1995). Estudios empíricos y modelos de simulación sugieren que las diferencias en cantidad y calidad de los aportes orgánicos al suelo producen las diferencias en el tamaño de los componentes de la MOS y las tasas de mineralización de C y N (Matus y Maire, 2000). De acuerdo a la cantidad de carbono, nitrógeno y de otros nutrientes disponibles, se cataloga un suelo como fértil. Un suelo fértil es aquel que contiene los elementos nutritivos que las plantas necesitan para su alimentación, estos alimentos los adquiere el suelo enriqueciéndolos con materia orgánica. Un suelo pobre o carente de materia orgánica es un suelo estéril y por lo tanto es improductivo (Argüelles, 2006).

Relación Carbono – Nitrógeno: Es un parámetro que evalúa la calidad de los restos orgánicos del suelo. Esta relación determina el grado de mineralización de la materia orgánica que existe en el suelo, así como el tipo de humus que se halla en él. Cuanto menor sea el valor de la relación mayor será el grado de mineralización de la materia orgánica, y por tanto, la calidad edáfica será mayor (Bandick y Dick, 1999; Suárez 2010). Tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Calidad edáfica del suelo de acuerdo a la relación C/N.

C/N	Calidad edáfica
<8	Muy buena
8-12	Buena
12-15	Mediana
15-20	Deficiente
20-30	Mala
>30	Muy mala

Fuente: Bandick y Dick (1999)

Los microorganismos necesitan el carbono como fuente energética (oxidan el C y lo devuelven a la atmosfera en forma de CO₂) y el nitrógeno, el cual incorporan a su protoplasma. Tanto el C, como el N son tomados de restos vegetales. En los restos vegetales, el C es aproximadamente el 60%, siendo menor el porcentaje de N, el cual es motivo de competencia entre microorganismos y las raíces de las plantas (Crosara, 2008).

C/N = 100 (alta): La actividad biológica es limitada, debido a que el contenido de N es poco.

C/N = 20: El suelo es capaz de soportar una intensa actividad microbiana, debido a que los restos contienen suficiente N (Crosara, 2008).

Conductividad Eléctrica (CE): La salinidad del suelo se refiere a la cantidad de sales en el suelo y puede ser estimada por la medición de la conductividad eléctrica (CE) de una solución extraída del suelo. La conductividad se define como la capacidad de una sustancia de conducir la corriente eléctrica, suele estar referenciada a 25°C y el valor obtenido debe corregirse en función de la temperatura. Los valores de conductividad eléctrica son indicadores de la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo para ser adsorbidos por el sistema de raíces de la planta (Ho *et al.*, 1997). Cuando el suelo es alterado por algún agente externo, la conductividad del suelo se incrementa con el tiempo, debido a la penetración de los frentes ácido y alcalino, así como por la solubilización de las especies iónicas ya sea como resultado de los cambios de pH (Acar y Alshawabkeh, 1996) o por un aumento de temperatura (Ho *et al.*, 1997).

Capacidad de Intercambio Catiónico: Todos los suelos presentan cargas negativas en la superficie de sus coloides (Evans, 1989), estas son neutralizadas según el principio de electro-neutralidad por una cantidad equivalente de cationes presentes en la solución de suelo, los cuales pueden quedar adsorbidos (Silva, 2004). Este tipo de atracción electrostática es llamada adsorción no específica, ya que no existe dependencia de configuración electrónica con el grupo funcional de la superficie coloidal del suelo, formando complejos llamados esfera externa (Sposito, 1989). La cantidad de iones que pueden ser adsorbidos de forma intercambiable en el

suelo se denomina capacidad de intercambio catiónico, así un suelo con una capacidad de intercambio catiónico (CIC) alta, posee más sitios de intercambio en la fracción coloidal del suelo (Sposito, 1989).

Determinación de pH: La contribución del pH a la calidad intrínseca del suelo viene dada por su influencia en los procesos de humificación y mineralización a través de los microorganismos existentes. Además puede inducir toxicidades, al hacer asimilables sustancias perjudiciales para las plantas e interviene en los procesos de difusión y floculación del complejo adsorbente (Bandick y Dick, 1999).

La clasificación del suelo según los valores de pH se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación del suelo de acuerdo al pH.

pH	Clasificación del suelo
<4	Extremadamente ácido
4-4,7	Muy fuertemente ácido
4,8-5,5	Fuertemente ácido
5,6-6,5	Moderadamente ácido
6,6-7,3	Neutro
7,4-8	Moderadamente básico
8,1-8,5	Fuertemente básico
>8,5	Extremadamente básico

Fuente: Bandick y Dick (1999)

El pH del suelo está influenciado por la composición de los cationes de intercambio, composición y concentración de sales solubles y la presencia o ausencia de yeso y carbonatos de metales alcalinotérreos (Bandick y Dick, 1999). Cuando los iones Na^+ en la solución del suelo se presentan como sales neutras (es decir como Cl^- o SO_4^{2-}), el pH es cercano a la neutralidad. Cuando el anión acompañante es carbonato ácido o carbonato, resulta un pH entre 8,5 y 11. Suelos cuyo pH es inferior a 7,5 casi nunca contenían carbonatos de metales alcalinotérreos, y si el pH es menor que 7 el suelo

seguramente contendrá una porción de hidrogeno de intercambio. El pH del suelo se mide potencialmente en el sobrenadante de una suspensión de una mezcla de suelo-agua (generalmente en porciones que varían de 1:1, 1:2.5, 1:5 o 1:10) y en una solución iónica que habitualmente es KCl 1 M o CaCl_2 0.01 M (Bravo, 2000).

En el caso de las soluciones iónicas, se produce un reemplazo de los hidrogeniones del complejo de cambio del suelo por el catión de la solución, lo que provoca un incremento de la concentración de hidrogeniones y como consecuencia una disminución del valor del pH, que suele estar alrededor de una unidad en relación al medido en agua (García, 2005). Cuando el suelo está saturado, no es posible la liberación de hidrogeniones, por lo que ambos valores de pH deberían coincidir. No obstante se produce una disminución similar, en este caso el potasio añadido se intercambia por el calcio del complejo, que al ser una base más débil, y por lo tanto menos disociada, provoca un empobrecimiento en oxidrilos que tiene un efecto semejante al incremento en hidrogeniones que producían en el caso anterior. Las mediciones de pH en las soluciones salinas, enmascaran los efectos de la variabilidad del contenido de sales en el suelo, lo que garantiza una medida más real. Este valor no está afectado por las fluctuaciones climáticas, ya que se compensan con las variaciones que se producen en el complejo de cambio, no se trata de un valor real de pH del suelo. Por esta razón a este valor se conoce como “real” en contraposición al medido con agua que se conoce como “actual” (García, 2005). La diferencia de pH entre los extractos con el agua y con las soluciones salinas se conoce con el nombre de efecto salino y se representan con el símbolo delta-pH. De este modo: delta-pH es igual al pH del suelo en solución salina menos pH del suelo en agua (Faithfull, 2005).

Así los valores de delta-pH son positivos para los suelos con una carga neta positiva, y negativos para suelos con carga neta negativa, siendo la magnitud proporcional a la carga (Faithfull, 2005).

2.2.5. Calidad del Suelo

La calidad edáfica es la capacidad del suelo para funcionar como un sistema vital dentro de los límites de la tierra y ecosistemas, para sostener la

productividad biológica, promover la calidad ambiental y mantener la salud de plantas, animales y humanos (Yanine, 2010).

La calidad debe interpretarse como la utilidad del suelo para un propósito específico en una escala amplia de tiempo (Carter *et al.*, 1997). El estado de las propiedades dinámicas del suelo, como contenido de materia orgánica, diversidad de organismos, o productos microbianos en un tiempo particular, constituye la salud del suelo (Rosmig *et al.*, 1995).

La calidad del suelo, ha sido percibida de muchas formas desde que este concepto se popularizo en décadas anteriores (Karlen *et al.*, 1994). La calidad del suelo es un instrumento que sirve para comprender la utilidad y salud de este recurso, a pesar de su importancia, la ciencia del suelo no ha avanzado lo suficiente para definir claramente lo que se entiende por calidad (Karlen *et al.*, 1994).

El término calidad del suelo se empezó a acotar al reconocer las funciones del suelo:

1. Promover la productividad del sistema sin perder sus propiedades físicas, químicas y biológicas (productividad biológica sostenible).
2. Atenuar contaminantes ambientales y patógenos (calidad ambiental).
3. Favorecer la salud de plantas, animales y humanos (Karlen *et al.*, 1994).

Al desarrollar este concepto, también se ha considerado que el suelo es el sustrato básico para las plantas, capta, retiene y emite agua, y es un filtro ambiental efectivo (Parr *et al.*, 1992). En consecuencia, este concepto refleja la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites del ecosistema del cual forma parte y con el que interactúa (Parr *et al.*, 1992).

Para Gregorich *et al* (1994), la calidad del suelo es una medida de su capacidad para funcionar adecuadamente con relación a un uso específico. Arshad y Coen (1992); Guerrero (2010), le dieron a este concepto una connotación más ecológica, la definieron como su capacidad para aceptar, almacenar y reciclar agua, minerales y energía para la producción de cultivos, preservando un ambiente sano.

Las definiciones más recientes de calidad del suelo se basan en la multifuncionalidad del suelo y no solo en un uso específico, concepto que

aun continua evolucionando (Singer y Ewing, 2000). Estas definiciones fueron sintetizadas por el comité para la salud del suelo de la Soil Science Society of America (Karlen *et al.*, 1994) como la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, sostener la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua, y sostener la salud humana y el hábitat.

2.2.6. Indicadores de calidad

Arshad y Coen (1992); Luyando (2014), consideran necesario un establecimiento único de criterios generales para evaluar la calidad del suelo y sus cambios, en el cual los indicadores no podrían ser un grupo seleccionado para cada situación particular, sino que deben ser los mismos en todos los casos con el propósito de facilitar y hacer válidas las comparaciones a nivel nacional e internacional.

Por otro lado, se muestra una segunda posición mostrada por (Epelde *et al.*, 2008; Luyando, 2014) estando a favor de que, en la evaluación de la calidad del suelo, no se debe determinar un grupo único de indicadores básicos, ya que cada circunstancia dentro del paisaje biofísico responde a condiciones particulares.

2.2.7. Indicadores Biológicos

La determinación de parámetros bioquímicos en el estudio de los suelos, día a día es considerada de gran importancia ya que son esenciales para que el estudio realice sus funciones de manera correcta (Luyando, 2014), su medida da idea de la actividad metabólica del suelo y sirve de ayuda para entender la funcionalidad del mismo. Un ejemplo de la importancia de la determinación de estos parámetros ha sido el estudio del aporte de diferentes tipos de enmiendas orgánicas a los suelos, ya que se considera que ayudan a conocer el efecto de dichos materiales orgánicos provocaran en el suelo sobre los procesos metabólicos y su actividad microbiana en particular (Araujo *et al.*, 2006; Luyando, 2014).

Los indicadores biológicos son: materia orgánica, respiración del suelo, carbono de la biomasa microbiana, actividad enzimática (Araujo *et al.*, 2006).

2.2.8. Contaminación del Suelo

La contaminación del suelo consiste en la introducción de elementos extraños o la existencia de un nivel inusual de uno propio o que, por sí mismo o por su efecto sobre los restantes componentes, genera un efecto nocivo para los organismos del suelo, sus consumidores, o es susceptible de transmitirse a otros sistemas (Martínez *et al.*, 2005). Existen efectos desfavorables, cuando ocurre la contaminación del suelo:

1. Disminuye su capacidad de autodepuración, ya que su ciclo biogeoquímico y su función de biofiltro ha superado la capacidad de aceptación de algún elemento extraño.
2. Alteración de la composición química del suelo, lo que trae como consecuencia un suelo no productivo para cultivos.
3. Contaminación de aguas superficiales y freáticas por procesos de transferencia.
4. Problemas de salubridad para la población vecina del suelo afectado.
5. La disminución de microorganismos en el suelo debido a su alteración química (Porta *et al.*, 1994).

2.2.9. Tipos de Contaminación

Un agente contaminante se encuentra siempre en concentraciones mayores de las habituales, lo que causa anomalías en el desarrollo de algunos organismos. La contaminación puede tener dos puntos de origen: los geogénicos que provienen de la roca madre de donde se formó el suelo, de la actividad volcánica o del lixiviado de mineralizaciones; y los antropogénicos que se refieren a los que se producen por residuos peligrosos, actividades industriales, agrícolas, mineras entre otros, y los residuos sólidos urbanos (Galán y Romero, 2008). Los contaminantes antropogénicos se pueden clasificar en dos tipos:

La contaminación local o puntual: (lugares o emplazamientos contaminados) viene dada en zonas que rodean a la fuente de contaminación, en las que existe una relación directa con el origen de la contaminación. Va unida generalmente a la minería, las instalaciones industriales los vertederos y otras instalaciones, tanto en funcionamiento como tras su cierre. Dichas prácticas pueden suponer un riesgo tanto para el suelo como para el agua (Martínez *et al.*, 2005).

La contaminación difusa: está causada generalmente por el transporte de sustancias contaminantes, tanto solubles como particuladas, a lo largo de amplias zonas con frecuencia alejadas de la fuente de origen. Pueden ser metales pesados, sustancias acidificantes, sobrecarga de nutrientes (eutrofización), explotación y transportación petrolera, entre otros (Martínez *et al.*, 2005).

2.2.10. Contaminación del Suelo por Petróleo

Uno de los más importantes procesos antropogénicos que a nivel mundial es causante de la contaminación del suelo, es la explotación petrolera, en nuestra sociedad el petróleo y sus derivados son imprescindibles como fuente de energía y para la fabricación de múltiples productos de la industria química, farmacéutica, alimenticia, entre otros. El impacto ambiental del crudo, abarca desde el proceso que conlleva la explotación petrolera: tala de bosques para la construcción de plataformas y caminos de acceso para los pozos de producción, desechos y lodos entre otros. Así como también la alteración de no solo el suelo, sino la vegetación y los recursos hídricos cercanos a la zona afectada. Se ha determinado que los hidrocarburos del petróleo pueden ejercer un efecto tóxico directo disolviendo el tejido de las plantas, disminuyendo el crecimiento de las mismas debido a la exclusión del aire del suelo o por el agotamiento del oxígeno debido al incremento de la actividad microbiana. A su vez puede haber interferencia con la relación agua-suelo-planta, y toxicidad por el azufre y exceso de manganeso producido durante la descomposición de los hidrocarburos (TPHCWG, 1998).

La composición de un crudo varía según la localización, se denomina **crudo parafínico o ligero** cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (n-alcanos y alcanos ramificados), y **crudo asfáltico o pesado**

si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C30-C45) y HAPs. La composición elemental del petróleo presenta predominancia de los compuestos tipo hidrocarburos: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y metales como el Níquel y el Vanadio, al entrar en contacto con la superficie del suelo, el petróleo altera las propiedades físicas y químicas del mismo, además de aumentar la concentración de trazas (TPHCWG, 1998). En la Tabla 5, se observa el tipo de crudo presente en algunos países:

Tabla 5. Pozo de origen y características de los crudos del petróleo.

Pozo de origen	Tipo de crudo
Pennsylvania	Parafínico
Irán	Parafínico
Irak	Parafínico
Rumanía	Parafínico
México	Parafínico
Bakú	Asfáltico
Venezuela	Asfáltico
Texas	Intermedio
Oklahoma	Intermedio

Fuente: TPHCWG (1998)

2.2.11. Respiración del Suelo

El carbono entra en los ecosistemas terrestres a través de un único proceso, la fotosíntesis, pero se devuelve a través de una variedad de procesos, denominados colectivamente como la respiración (Vargas *et al.*, 2004).

La respiración edáfica es un proceso ecológico que se reconoce como la principal fuente de flujo de C (Vargas *et al.*, 2004; Linares, 2011) procedente de la superficie del suelo y uno de los componentes cruciales dentro del ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres (Stotzky, 1965). También puede ser definida como la disminución de las concentraciones de oxígeno en el suelo por el consumo realizado por la actividad biológica y al

mismo tiempo el aumento de las concentraciones de CO₂ debido a la respiración (García, 2005).

En este proceso participan microorganismos como bacterias, hongos, algas y protozoos que ayudan a la descomposición de la materia orgánica del suelo y macroorganismos como lombrices de tierra, nematodos e insectos (Schinner *et al.*, 1996; García *et al.*, 2003). De la respiración total que tiene lugar en los suelos, entre un 20 y un 40% se debe a las raíces, mientras que el resto tiene origen microbiano que da lugar a la producción de CO₂ (García, 2005). Además, la respiración edáfica comprende un proceso clave dentro del ecosistema, ya que tiene una gran relación con los sistemas de productividad y fertilidad del suelo (García *et al.*, 2003).

La respiración depende de muchos factores como la dinámica de la raíz, ciclos nutrientes, temperatura, humedad del suelo, calidad y cantidad del sustrato (Buschmann, 2000), la concentración de oxígeno, la biodisponibilidad de carbono, pH (Krebs, 2003), así como también de los usos de la tierra, cobertura vegetal, mineralogía y prácticas de manejo (García *et al.*, 2003).

2.2.12. Microbiología del Suelo y Biomasa Microbiana

El suelo puede considerarse un organismo vivo que está en constante interacción con los microorganismos y las plantas con el propósito de lograr el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Gold *et al.*, 1998). Según García *et al* (2003), la evaluación de la calidad del suelo se debe basar en parámetros como la biomasa y la actividad microbiana del suelo, los cuales son de determinación sencilla tanto en el laboratorio como en el campo. La biomasa microbiana se define como la parte viva de la materia orgánica del suelo, está compuesta por los microorganismos de aproximadamente $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ y constituye de 1 a 5% de la materia orgánica del suelo (Yanine, 2010).

La biomasa microbiana es medida por el CO₂ respirado y se determina para dar una indicación de la respuesta de la microbiota del suelo al manejo, cambio ambiental, alteración del sitio, contaminación y fertilidad del suelo (Kandeler *et al.*, 1994). La biomasa microbiana se mide en unidades de mg de carbono por kg de suelo, su importancia está asociada con la fertilidad del

suelo, los ciclos biogeoquímicos, la descomposición de adiciones naturales o sintéticas y la formación estructural y estabilización física de los agregados (Yanine, 2010). Los ciclos de la mayoría de los elementos son impulsados en parte o totalmente por la cantidad y la actividad de los organismos que asimilan los compuestos minerales o descomponen la materia orgánica (Oropeza, 2010). Además conduce a la liberación de los nutrientes disponibles para las plantas y son de importancia crucial en los ciclos biogeoquímicos (Oropeza, 2010).

Existen factores intrínsecos y extrínsecos que constituyen un indicador de la dinámica del suelo y de condiciones físicas y químicas que permitan el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos y de su acción sobre los sustratos orgánicos (Linares, 2011).

Para conocer la biomasa y la actividad microbiana del suelo existen métodos biogeoquímicos y fisiológicos, los más utilizados son: respiración por sustrato inducido, respiración, fumigación incubación y la fumigación-extracción (García *et al.*, 2003).

2.2.13. Respiración Inducida por Sustrato (RIS)

Es un método que estima la cantidad de carbono retenido en microorganismos heterótrofos a través de la medición y de la respiración inicial después de la adición de un sustrato disponible (Anderson y Domsch, 1978). Este método permite conocer la biomasa microbiana del suelo mediante la estimulación de la respiración como respuesta de los microorganismos del suelo a la aplicación de glucosa como sustrato (Anderson y Domsch, 1978; García *et al.*, 2003)

El principio detrás del RIS es la medición de la “máxima respuesta inicial respiratoria” de la muestra de suelo después de su modificación con glucosa; esta respiración máxima inicial es proporcional a la cantidad de carbono presente en la muestra de suelo (Kandeler *et al.*, 1994). La concentración óptima de glucosa para lograr la máxima respiración inicial debe determinarse y aplicarse para cada tipo de suelo para que el método se estandarice (Kandeler *et al.*, 1994). Según García *et al* (2003), la cantidad de CO₂ adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido, la cantidad

de NaOH inicialmente presente menos la cantidad remanente al final del periodo de incubación, se utiliza para computar la cantidad de CO₂ retenido por los microorganismos del suelo, que entra en la solución y reacciona con el NaOH.

El método propuesto por Degens y Harrys (1997) se aplica de la misma forma, pero además de la glucosa, se emplea, una serie de compuestos orgánicos como sustrato. Las concentraciones óptimas de estos sustratos fueron determinadas con 12 compuestos seleccionados de una serie de aminoácidos, ácidos carboxílicos, polímeros y carbohidratos. Aplicaron la RIS a cuatro suelos distintos empleando concentraciones diferentes de estos 12 sustratos, obteniendo una respuesta máxima para las siguientes concentraciones 15 mM para los aminoácidos, aminas y amidas; 60 mM para alcoholes, 15 mM para compuestos aromáticos, 75 mM para carbohidratos, 190 mM para ácidos carboxílicos y 30 mM para los polímeros. Con estos parámetros, aplicaron la RIS a cinco suelos distintos para 83 sustratos seleccionados, de los cuales 36 proporcionaron las mayores diferencias de RIS de acuerdo al análisis estadístico.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Muestreo y Preparación de las Muestras

Una muestra de suelo se define como aquella cantidad de tierra compuesta por varias porciones de igual tamaño (submuestras), obtenidas de diversos puntos del área que se desea estudiar y mezcladas de forma homogénea (Rodríguez, 1993). Una muestra representativa es aquella que mejor refleja las condiciones de fertilidad de un área específica. Para que exista representatividad, la muestra de suelo debe estar compuesta de varias submuestras de igual tamaño. El número de submuestras por muestra está dado por la variabilidad que presenta el nutriente más móvil dentro de los que se desea analizar. Estudios realizados señalan que esa variabilidad se compensa con 20 o 25 submuestras por unidad de muestreo (Rodríguez, 1993).

El primer paso para proceder al muestreo es subdividir el área en unidades de suelos homogéneos (cartografía). En esta subdivisión se debe considerar el tipo de suelo, topografía, vegetación e historia del manejo previo. Una vez realizada la división se toma una muestra compuesta al azar, este es el esquema de muestreo al azar estratificado. El muestreo por área de referencia es un tipo de muestreo al azar estratificado, donde se involucra una pequeña área considerada representativa del campo y se toman muestras al azar, este procedimiento reduce costos y minimiza los problemas de muestreo asociados a áreas extensas, siempre y cuando la selección del área de muestreo sea adecuada (Rodríguez, 1993). Un método muy usado es el muestreo sistemático o de grilla. En este las muestras se toman a intervalos regulares en todas las direcciones. Este tipo de muestreo aumenta considerablemente la exactitud en los análisis de suelos y provee información valiosa de la variabilidad del campo. Por ser el método más costoso, a veces su utilización no es rentable (Roberts y Henry, 2000).

En este trabajo, se realizó una investigación de campo-cuantitativa, el tipo de muestreo que se empleó fue al azar estratificado, el cual consiste en dividir el campo en subunidades dentro de las cuales se tomaron al azar muestras compuestas del terreno. Este esquema permite una mayor precisión ya que mediante la combinación de las muestras compuestas se

tiene en cuenta la variabilidad existente en la composición del suelo en estudio, sin aumentar sustancialmente los costos.

Las muestras de suelo fueron tomadas en pozos inactivos de explotación petrolera, en la localidad del Mene de San Lorenzo, en la población de Yaracal, estado Falcón. En un lugar situado al norte del tramo occidental de la cordillera de la costa en la región noroccidental de Venezuela, entre los 10°18'; 12°11'46" de latitud Norte y 68°18'; 71°21' de longitud Oeste. La zona presenta una temperatura promedio mensual de 28.7°C, con precipitaciones escasas, con medias anuales de 800-1200 mm (Fernández *et al.*, 2008).



Figura 2. Vista satelital de la zona estudiada. Fuente: Google Earth.

Se recolectaron diez muestras de suelo, utilizando un barreno y en bolsas de polietileno, aproximadamente 6 kg por muestra, a una profundidad entre 5-15 cm. Se tomaron cinco muestras de suelos contaminados con petróleo, pertenecientes a cinco pozos de los que fueron cementados

recientemente y cinco muestras de suelos controles aledaños a los pozos con una distancia aproximada de 50 m. Se identificaron como P1, P2, P3, P4 y P5 las muestras contaminadas con hidrocarburos, y como C1, C2, C3, C4 y C5 a las muestras controles pertenecientes a cada pozo. Es importante destacar que este muestreo se realizó en condiciones de sequía el día 21 del mes de mayo del año 2015 (ver Tabla 6).

Tabla 6. Reportes meteorológicos en la zona estudiada, el día jueves con fecha del 21 de mayo del año 2015.

Temperatura (°C)	31-36
Humedad (%)	75
Viento (mph)	12
Precipitaciones (mm)	Ninguna
Índice UV	Extremo

Fuente: INAMEH (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología)

Una vez recolectadas las muestras, todas se dividieron; 4 kg de cada muestra, para la determinación del parámetro biológico, y los 2 kg restantes por muestra, para las caracterizaciones fisicoquímicas. La parte del suelo que fue para determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, conductividad eléctrica, contenido de humedad, retención de humedad, textura, carbono orgánico total y capacidad de intercambio catiónico), en las muestras contaminadas y no contaminadas con petróleo, se secó a temperatura ambiente por un período de 72 horas, luego se realizó una molienda con un mortero y se pasaron por un tamiz de 2 mm de porosidad y se almacenaron en recipientes de vidrio con tapa a temperatura ambiente (Noguera y Armado, 2010; Linares, 2011).

La otra parte fue para determinar el parámetro biológico (diversidad catabólica), para lo que se almacenaron a 4°C, entre las 24 y 48 horas después de su recolección, luego se extendieron sobre un plástico limpio y seco donde se retiraron piedras, hojas, tallos y raíces, seguidamente se pasaron por un tamiz de 2 mm de porosidad y se almacenaron en recipientes con tapa a 20°C para su análisis (Linares, 2011).

La ubicación de cada una de las muestras se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.

Muestra	Elevación (m)	Norte	Oeste
P1	33.883	11° 0´ 910´´	68° 29´ 857´´
C1	51.259	11° 0´ 889´´	68° 29´ 852´´
P2	55.775	11° 0´ 903´´	68° 29´ 852´´
C2	66.773	11° 0´ 921´´	68° 29´ 852´´
P3	49.631	11° 0´ 927´´	68° 29´ 852´´
C3	47.162	11° 0´ 915´´	68° 29´ 852´´
P4	50.227	11° 0´ 870´´	68° 29´ 852´´
C4	51.600	11° 0´ 859´´	68° 29´ 852´´
P5	51.550	11° 0´ 845´´	68° 29´ 892´´
C5	54.126	11° 0´ 841´´	68° 29´ 841´´

Fuente: Noguera (2010)

En el terreno estudiado no se evidenció la presencia de macroorganismos, por lo cual es un suelo poco fértil y de baja calidad, no presentó vegetación fresca, ni árboles autóctonos u ornamentales. En ésta zona sólo se observó vegetación de paja seca, en un ecosistema xerófilo. Por presentar un ambiente árido, no pueden producirse árboles frondosos en el terreno muestreado, por lo que éste suelo presenta una gran amplitud térmica diaria, está expuesto a las altas temperaturas diurnas, a las bajas temperaturas nocturnas y a las precipitaciones, haciendo que sus minerales se pierdan por lavado y lixiviación. En las figuras 3 y 4 se aprecia la zona en estudio del suelo control (libre de contaminación) y del suelo contaminado respectivamente.



Figura 3. Imagen de la zona estudiada del suelo control.



Figura 4. Imagen de la zona estudiada del suelo contaminado.

3.2. Caracterización Fisicoquímica del Suelo

Para cada uno de los parámetros físicos, químicos y el parámetro biológico se analizaron las muestras contaminadas con hidrocarburos y las muestras controles por triplicado.

3.2.1. Determinación de pH

Se determinó el pH a un extracto 1:2 suelo-agua, de la siguiente manera: se pesaron 3 g de suelo, y se adicionaron 6 mL de agua destilada, en un tubo de ensayo de plástico estéril y se cerró herméticamente. Se puso en agitación por un período de 1 hora en el agitador orbital, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se trasvasó el sobrenadante a otro tubo de ensayo, y se midió el pH a los extractos empleando un pHmetro digital marca Digimed modelo DM23 (Olate, 1979).

3.2.2. Determinación de Conductividad Eléctrica

Con las mismas muestras que se usaron para la determinación del pH, se determinó la conductividad eléctrica empleando un conductímetro digital marca Accumet Basic modelo AB30 (Jackson, 1970).

3.2.3. Determinación del Contenido de Humedad

En un crisol se pesaron 10 g de suelo, se llevó a la estufa a 105°C por un período de 24 horas, transcurrido el tiempo, se colocó la muestra en un desecador durante 5 minutos, se pesó nuevamente la muestra contenida en el recipiente (Jackson, 1970). Las muestras se guardaron para la determinación de la materia orgánica por la técnica de calcinación.

3.2.4. Determinación de Retención de Humedad

En un embudo de plástico estéril se pesaron 15 g de muestra de suelo, se adicionó agua destilada hasta que se filtró la primera gota y se dejó drenar

por 6 horas; el resultado se obtuvo por diferencia de peso, mediante la técnica de gravimetría (Jackson, 1970).

3.2.5. Determinación de Materia Orgánica

Se tomaron los crisoles con las muestras usadas para la determinación del contenido de humedad, y se llevaron a la mufla a 400°C por un período de 20 horas; transcurrido el tiempo, se esperó que la mufla disminuyera su temperatura, alrededor de 20 horas más, se colocaron las muestras en un desecador durante 5 minutos, y se pesaron (Jackson, 1970).

La determinación del carbono orgánico se realizó dividiendo entre el factor convencional de Vammelen, mediante la ecuación 2 (Jaramillo, 2002), que se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{\%COT = (\%MO)}{1,724} \quad (\text{ec. 2})$$

Dónde: %MO=materia orgánica (%) y %COT=carbono orgánico total (%).

3.2.6. Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

Se pesaron 5 g de suelo seco (3 réplicas por muestras) y se agregaron 25 mL de acetato de amonio 1 N a pH 7; se agitaron los frascos en un agitador orbital por 30 minutos, y luego se dejaron las muestras en reposo por 30 minutos más; se filtró el sobrenadante y se redisolvió el suelo precipitado en dos porciones de 10 mL de etanol al 95% v/v se recogió el filtrado y se guardó para la determinación de calcio y magnesio (Schollenberger y Simón, 1945).

Al precipitado inicial y sólido remanente, en papel de filtro, se agregaron 50 mL de solución de NaCl al 10% m/v y se dejó en reposo toda la noche; transcurrido el tiempo, se filtró el suelo con dos porciones de 10 mL de agua destilada, se recogió el agua de lavado junto con el sobrenadante, se le adicionó a ésta solución (aguas de lavado y sobrenadante), 10 mL de formaldehído al 40% v/v, se agregaron 2 gotas de fenolftaleína y se tituló con

una solución estandarizada de NaOH 0,1 M; se reportó el volumen gastado de solución de NaOH 0,1 M para cada muestra. También se titularon con la solución de NaOH 0,1 M blancos contentivos de 50 mL de NaCl al 10% m/v, 10 mL de formaldehído al 40% v/v y 20 mL de agua destilada (3 réplicas) (Schollenberger y Simón, 1945).

Para la determinación de Ca^{+2} y Mg^{+2} (total); se tomaron alícuotas de 20 mL del filtrado, se le agregaron 2 mL de buffer amoniacal a pH 10; se añadió una pizca de negro de eriocromo T y luego se procedió a titular con EDTA 0,03 M estandarizado. El viraje es de púrpura a azul (Anderson, 1982).

Para la determinación del Ca^{+2} ; se tomaron alícuotas de 10 mL del filtrado inicial y se agregaron gotas de NaOH 6 M para llegar a pH 12, se agitó y se añadió 2 gotas del indicador ácido calconcarbónico, luego se valoró la solución con EDTA 0,03 M estandarizado. El viraje es de púrpura a azul (Anderson, 1982).

3.2.7. Determinación de Textura

Se colocaron 10 mL de suelo seco en un cilindro graduado de 50 mL, posteriormente se adicionaron hasta aforar una solución dispersante (40 g de pirofosfato de sodio y 10 g de bicarbonato de sodio en 1 L de agua destilada) con un pH entre 8 y 9, y luego se agitó vigorosamente durante 3 minutos; se dejó sedimentar y se marcó la altura de sedimento al transcurrir 60 segundos y luego al transcurrir 10 minutos (Llitjos y Molera, 1995).

3.3. Determinación de la Cantidad de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)

La determinación de la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo presentes en el suelo, se realizó mediante una extracción Soxhlet (Method 3540 Soxhlet Extraction; EPA, 1996) la cual consistió en pesar 10 g de suelo en un papel de filtro previamente pesado, la muestra se amarró con pabilo, y se colocó en el tubo extractor del equipo. Luego se agregaron 150 mL del solvente extractor (cloroformo-metanol, 7:3) en un balón de destilación, el

cual se puso sobre una manta que contiene un reóstato para regular la temperatura.

El equipo Soxhlet actúa bajo un sistema de conductos comunicantes entre el balón y el tubo extractor. El tubo extractor va acoplado al balón y a un condensador en el tope que recibe los vapores del solvente extractor, permitiendo que condense y pase a través del cartucho, extrayendo los hidrocarburos presentes en el suelo. Los hidrocarburos y el solvente extractor son recogidos en el balón una vez que la muestra se inunda, llega al tope del sistema comunicante y finalmente baja hacia el balón; éste proceso se le denomina sifonada y se repite varias veces hasta obtener un líquido en el tubo extractor igual al color original del solvente o muy parecido. Una vez terminado el proceso de extracción se retira el cartucho de la muestra de suelo contenida en el tubo extractor y se coloca en la estufa a 105°C durante una hora; transcurrido el tiempo se coloca el cartucho en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y luego se pesa y se reporta.

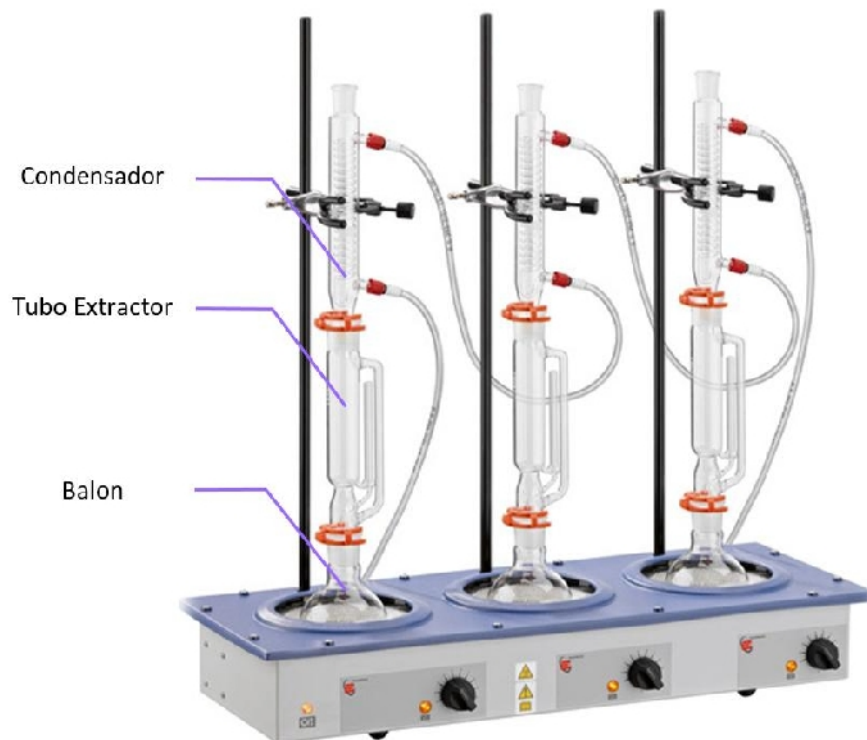


Figura 5. Equipo de extracción Soxhlet. Fuente: Vargas *et al* (2004).

Por éste método se obtuvo la materia orgánica presente en el suelo, se realizó éste procedimiento para las muestras de suelo contaminadas y no contaminadas con crudo, y por diferencia se obtiene la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo. El valor del porcentaje de materia orgánica de tipo de hidrocarburos (%HTP), se determinó por la diferencia entre el porcentaje de la materia orgánica contenida en las muestras contaminadas menos el porcentaje de materia orgánica contenida en las muestras controles, como se muestra en la ecuación 3:

$$\%HTP = \%MOE(pozos) - \%MOE(control) \text{ (ec. 3)}$$

El solvente extractor (cloroformo-metanol) se recuperó empleando un rotoevaporador marca LABCONCO a temperaturas programadas de 45 a 60°C.



Figura 6. Rotoevaporador. Fuente: Vargas *et al* (2004).

3.4. Determinación de la Diversidad Catabólica

La respiración inducida por sustrato (RIS) fue determinada mediante la cuantificación del CO_2 desprendido por la actividad de los microorganismos del suelo, durante un período de tiempo establecido a condiciones controladas de humedad y temperatura en el laboratorio (método de incubaciones estáticas; Stotzky, 1965), mediante el procedimiento descrito por Anderson y Domsch (1978), modificado por Degens y Harrys (1997) y citado por (Linares, 2011), que se explica detalladamente, a continuación.

En 36 recipientes de vidrio limpios, estériles y secos, se pesaron 20 g de suelo (son 10 muestras por triplicado), se humedecieron las muestras de 50 a 60% de su capacidad de campo, y se añadieron 1,5 mL de sustrato (solución preparada); se cerraron herméticamente cada uno de los recipientes y se incubaron por 2 horas para activar la respiración microbiana; transcurrido el tiempo, se introdujo a cada frasco un vial con 20 mL de NaOH 0,1 M, (destapado y en forma suspendida), y se incubaron los frascos por un período de 4 horas. Inmediatamente, se realizó un tratamiento control sin sustrato, colocándose 3 frascos de vidrio, esterilizados y secos, solo con el vial contentivo de NaOH, y otros 3 frascos, como blancos, únicamente con sustrato y el vial con NaOH, sin suelo.

De forma paralela a la incubación, se preparó una solución de HCl 0,05 M, una de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M y una solución de fenolftaleína; se estandarizó la solución de HCl pesando de 0,04-0,05 g de NaHCO_3 en tres fioles, se disolvió cada una de esas tres muestras en aproximadamente 50 mL de agua destilada y se añadieron 2 gotas de naranja de metilo y se tituló con el HCl a estandarizar, hasta el punto final que se observa mediante el cambio de color que pasa de amarillo a salmón.

Una vez transcurridas las 4 horas de incubación, se retiraron los 36 viales de los recipientes de vidrio y se cerraron rápidamente; luego se tomaron alícuotas de 10 mL del NaOH contenido en cada vial y se transfirieron a fioles, a las que se añadieron 5 mL del $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (anteriormente preparado para precipitar los carbonatos), y una gota de fenolftaleína (la solución se torna fucsia). Seguidamente, se tituló el exceso de NaOH con el HCl 0,05 M (estandarizado), hasta que la solución en la fiola pase de fucsia a rosa pálido (antes de que llegue a incoloro). Finalmente se anotó el consumo de HCl en todas las titulaciones, luego se desechó el suelo

contaminado con crudo de los recipientes de vidrio en bolsas de polietileno, el suelo libre de contaminación se agregó al medio ambiente y el NaOH que quedo en los viales se añadió a un recipiente de plástico de desecho.

La evolución de CO₂ se calcula mediante la ecuación 4 (García *et al.*, 2003):

$$\frac{mg\ C-CO_2}{100gs*h} = \frac{VB-VM * N_{HCl} * 6 * 100}{h * EW} \quad (\text{ec. 4})$$

Dónde:

VB= Volumen de HCl consumidos para titular el blanco

VM= Volumen de HCl consumidos para titular la muestra

N_{HCl}= Concentración Normal del ácido clorhídrico

EW= Peso del suelo seco (g)

h=Tiempo de incubación (4 horas)

El carbono de la biomasa microbiana se puede determinar empleando la relación planteada por Anderson y Domsch (1978), que se observa en la ecuación 5:

$$\frac{mg\ C-CO_2}{100g*h} = \frac{20,6mgC-biomasa}{100g} \quad (\text{ec. 5})$$

En la Tabla 8, se pueden apreciar los sustratos carbonados que se incubaron en la aplicación del método de respiración inducida por sustrato (RIS).

Tabla 8. Sustratos para la aplicación del método de RIS.

Grupo de Sustratos	Compuestos
Carbohidratos (75 mM)	Glucosa
	Galactosa
	Sacarosa
	Lactosa
	Dextrina
Polímeros (30 mM)	Celulosa Microcristalina
	Almidón
	Úrea
Aminas y Amidas (15 mM)	Difenilamina
	Trietanolamina
	Etanol
Alcoholes (60 mM)	Tris(hidroximetil)aminometano
	Butanol
	Metanol
	Etilenglicol
	Triptófano
Aminoácidos (15 mM)	Arginina
	Fenilalanina
	Glicina
	Histidina
	Tirosina
	Ácido Cítrico Hidratado
	Ácido Oxálico Dihidratado
Ácidos Carboxílicos (190 mM)	Ácido Ascórbico
	Ácido Acético
	Ácido Ftálico
	Ácido Salicílico
	Ácido Fumárico
	Tartrato Sódico de Potasio

Fuente: Linares (2011)

3.5. Determinación de los Perfiles de Respuesta (RIS)

Se obtuvieron los perfiles de respuesta al graficar la concentración de CO₂ que proviene de la respiración de los microorganismos (mg CO₂/kgss*h) con respecto a cada una de las muestras (contaminadas y controles), para los sustratos carbonados usados (Degens y Harrys, 1997).

3.6. Análisis Estadístico por Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, además serán independientes entre sí. Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (habrá, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones). Esto no siempre es fácil, y será de vital importancia el conocimiento que el experto tenga sobre la materia de investigación (Salafranca *et al.*, 2005; Linares, 2011).

El manejo estadístico de los datos obtenidos en ésta investigación, se realizó mediante un Análisis por Componentes Principales (ACP); a partir de las variables correspondientes a cada uno de los sustratos utilizados, así como también para los parámetros fisicoquímicos, a través del programa estadístico Past, versión III. Mediante el análisis del coeficiente lineal de Pearson, que se aplicó con el uso del programa Past III, se establecieron correlaciones múltiples entre los parámetros fisicoquímicos y el contenido de hidrocarburos totales del petróleo, la materia orgánica extraída por Soxhlet, materia orgánica por la técnica de calcinación y carbono orgánico total.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Parámetros Fisicoquímicos

La zona estudiada ubicada en el Mene de San Lorenzo, tiene un tipo de suelo Inceptisol según el sistema USDA (con base en SSS, 1999) (Noguera y Armado, 2010), ya que contiene componentes en un estadio de meteorización bajo (incipiente): carbonato cálcico o yeso. Éste tipo de suelo, por lo general, presenta una textura franco arenosa debido a la presencia de un mayor porcentaje de arena en su composición (Zetina *et al.*, 2005); lo cual queda comprobado con el análisis realizado que presentó una clase textural franco arenosa tanto para las muestras control como para las contaminadas con petróleo (ver Tabla 9). Además, coincide con el estudio realizado por Oropeza (2010), en la misma zona, a pesar de que se utilizaron metodologías distintas. En este trabajo se determinó la textura por el método de sedimentación reportado por Llitjos y Molera (1995), mientras que Oropeza (2010) usó el método al tacto citado por Jaramillo (2002). Noguera y Armado (2010), también reportan una textura franco arenosa en la zona de Yaracal.

Estos suelos, por su contenido de arena 43-85%, son incapaces de almacenar agua suficiente como para permitir un crecimiento adecuado de plantas, perdiendo grandes cantidades de minerales nutrientes por lixiviación hacia el subsuelo (Jaramillo, 2002). Es por ello que, el terreno presentó poca vegetación (ver Figura 3). Aunque las “Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos” (Gaceta Oficial, 1998), establecen que *“para la práctica de la técnica de biotratamiento sobre el suelo arable, el área de disposición final debe estar conformada por suelos de textura franca, o franco arenoso, o franco limosa, o franco arcillosa, o ser acondicionada artificialmente”*. Es decir, que éste suelo puede someterse a un tratamiento de recuperación y volver a su antiguo uso agrícola y ganadero.

Tabla 9. Composición porcentual y clase textural del suelo estudiado.

Textura	Composiciones (%)	Clase Textural	Tipo de Suelo
Arena	77,982±0,009		
Limo	17,990±0,050	Franco-Arenosa	Inceptisol
Arcilla	4,028±0,008		

Los parámetros fisicoquímicos, producto de las caracterizaciones tanto del suelo contaminado como de los controles, se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores obtenidos de las propiedades fisicoquímicas en los suelos provenientes de Yaracal.

Muestras	pH 1:2 H ₂ O	CE (mS/cm)	Contenido de Humedad (%)	COT (%)*	CIC (cmol/kg ss)	Retención de Humedad (%)	HTP (%)
C1	5,00±0,20	0,269±0,009	8,60±0,10	3,00±0,10	121,10±0,30	50,0±0,7	N/A
P1	3,76±0,03	0,610±0,010	2,80±0,80	6,40±0,50	18,77±0,03	8,0±1,0	2,51±0,03
C2	6,02±0,01	0,236±0,007	7,81±0,03	2,92±0,02	32,60±0,03	49,4±0,4	N/A
P2	4,30±0,10	1,150±0,040	5,90±0,20	5,50±0,20	9,38±0,04	6,0±1,0	2,83±0,02
C3	5,53±0,07	0,160±0,020	5,90±0,10	3,80±0,10	154,90±0,30	48,7±0,9	N/A
P3	4,78±0,08	1,140±0,020	4,01±0,04	5,11±0,04	24,90±0,30	8,0±2,0	4,78±0,05
C4	6,10±0,20	0,120±0,010	7,74±0,06	3,93±0,06	83,70±0,10	50,9±0,2	N/A
P4	4,47±0,03	0,662±0,001	3,90±0,10	8,10±0,10	24,15±0,20	6,0±1,0	2,18±0,02
C5	5,36±0,07	0,230±0,020	5,40±0,10	3,60±0,10	85,30±0,06	46,2±0,8	N/A
P5	4,20±0,10	0,277±0,002	2,80±0,50	5,80±0,20	23,42±0,08	9,0±2,0	4,02±0,04

CE= Conductividad Eléctrica, CIC= Capacidad de Intercambio Catiónico, COT= Carbono Orgánico Total
N/A= No Aplica. * Se estimó por la formula %COT= %MO/1,724.

Debido a la gran cantidad de datos, para tener una visión condensada de los resultados; en la Tabla 11 se pueden observar los intervalos obtenidos

de las propiedades fisicoquímicas, para las muestras control y contaminadas con hidrocarburos.

Tabla 11. Intervalos obtenidos de las propiedades fisicoquímicas en las muestras control y contaminadas con crudo y el valor recomendado de acuerdo a la referencia bibliográfica.

Parámetros	Muestras Control	Muestras Contaminadas	Valor Recomendado	Referencia Bibliográfica
pH	5,0-6,1	3,76-4,78	6,2-6,5	Beltrán y Vela (2006)
CE (mS/cm)	0,12-0,269	0,277-1,15	< 1,2 (no salinos)	Boulding (1994)
H (%)	5,4-8,6	2,8-5,9	-	-
RH (%)	46,2-50,9	6-9	-	-
CIC (cmol/kg)	32,6-154,9	9,38-24,9	>25	García (2005)
COT (%)	2,92-3,93	5,11-8,1	>2	Loveland y Webb (2003)

En cuanto al pH, las muestras contaminadas con hidrocarburos, están entre 3,76-4,78, valores que van de extremadamente a muy fuertemente ácidos, mientras que en las muestras controles los intervalos se ubican dentro de 5,0-6,1, y van de fuertemente a moderadamente ácidos (ver Tabla 4). Agronómicamente, el pH óptimo está entre 6,2 y 6,5 para obtener la disponibilidad de los elementos esenciales del suelo y desarrollo de cultivo (Beltrán y Vela 2006). Por ende, éste suelo no es apropiado para el desarrollo de cultivo. Se evidencia que las muestras contaminadas con petróleo tienen un pH menor que los controles (ver Tabla 11). Las disminuciones de pH se deben a la formación de ácidos débiles a partir de CO₂ y el H₂O, producto de la mineralización de la materia orgánica por acción de los microorganismos. El ácido se disocia según la siguiente reacción:



La producción de iones H^+ , cada vez que las bacterias realizan la metabolización de los hidrocarburos, disminuye el pH del suelo, dado que hay alta concentración de iones H^+ (Beltrán y Vela, 2006). En estudios anteriores realizados en la zona de Yaracal, Fernández *et al* (2008) en su investigación, obtuvieron un pH de 4,54 para un suelo contaminado con crudo (ver Tabla 12). Suárez (2010), en su estudio, obtuvo para un suelo impactado con hidrocarburo un intervalo de pH que va de 4,3-5,3 analizando tres pozos petroleros y en los suelos control de 4,7-6,7. Queda demostrado entonces, que la disminución del pH se debe a la contaminación con crudo mediano, proveniente de derrames de pozos abandonados, que afectaron a éstos suelos antiguamente.

Con respecto a la conductividad eléctrica, se encontraron valores ubicados en el intervalo de 0,120-0,269 mS/cm para los controles y 0,277-1,150 mS/cm en las muestras contaminadas. Se observan que las muestras contaminadas con crudo, tienen valores superiores a los controles (ver Tabla 11). Esto ocurre por la formación de agua alrededor de los yacimientos petroleros, la cual es producto de las formaciones geológicas de dicho yacimiento, estas aguas presentan grandes cantidades de sales disueltas que tienden a alterar la salinidad de los suelos (Zavala *et al.*, 2005; Noguera y Armado, 2010). Armado (2011), reporta que suelos con valores menores en la conductividad eléctrica a 1 mS/cm se consideran con una baja salinidad, a su vez Boulding (1994), indica que suelos con valores menores de 1,2 mS/cm son considerados no salinos. Por ende, éste suelo se clasifica como no salino, es decir, la presencia del petróleo no afecta la salinidad del suelo.

Tabla 12. Comparación de algunos parámetros fisicoquímicos realizados en este estudio, con estudios anteriores, en suelos contaminados con crudo.

Parámetros	Este Estudio	Noguera y Armado, 2010	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Textura	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso
pH	3,76-4,78	4,3-7,3	4,54
MOE (%)	9,48-12	12-18	9,39
COT (%)	5,11-8,1	8,8-13,3	5,45
CE (mS/cm)	0,277-1,15	0,086-0,563	0,08

MOE= Materia Orgánica, COT= Carbono Orgánico Total, CE= Conductividad Eléctrica.

Los resultados del análisis del contenido de humedad para todas las muestras reporta valores que van de 2,8-8,6% (ver Tabla 10). Éstos resultados son bajos al compararlos con Noguera y Armado (2010) que van de 4-12%. El contenido de humedad depende de las condiciones climáticas al momento de la realización del muestreo, la zona presenta una temperatura promedio mensual de 28,7°C, con precipitaciones escasas, con medias anuales de 800-1200 mm (Fernández *et al.*, 2008). Las muestras fueron recolectadas en el mes de mayo del año 2015, en condiciones de sequía, según el reporte meteorológico del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH) (ver Tabla 6). Además, las diferencias en los resultados entre una muestra y otra, posiblemente, se deban a que hubo muestras tomadas bajo sombra y otras bajo sol.

Los valores de capacidad de retención de humedad (capacidad de campo) obtenidos para las muestras contaminadas con petróleo 6-9% son menores, que para las muestras controles 46,2-50,9% (ver Tabla 11). Ya que los hidrocarburos, por su baja o nula polaridad, cubren la superficie del suelo, interrumpiendo la interacción electrostática entre la superficie de las partículas del suelo y del agua, reduciendo así su capacidad de campo (Adams *et al.*, 2008; Noguera y Armado, 2010). Armado (2011), sostiene que la capacidad de retención de humedad, es una propiedad física que depende básicamente de la composición del suelo o de su clase textural; en éste caso, los suelos son franco arenosos, es decir que pueden contener componentes de meteorización bajo, reduciendo la capacidad del suelo a humectarse.

En el caso de la capacidad de intercambio catiónico, los resultados muestran la misma tendencia que tiene la capacidad de retención de humedad a reducir sus valores en presencia del crudo, obteniéndose valores de 32,6-154,9 cmol/kg y 9,38-24,90 cmol/kg, para los controles y suelos contaminados, respectivamente (ver Tabla 11). Esto se debe a la adsorción del petróleo en la superficie del suelo, ya que interfiere con los sitios de intercambio catiónico (Karimi *et al.*, 1996). Vera *et al* (2000); Armado (2011) indican que valores mayores a 25 cmol/kg de capacidad de intercambio catiónico tienen una buena retención catiónica. Los resultados obtenidos para los suelos libres de contaminación con hidrocarburos siempre fueron mayores a 25 cmol/kg, por lo tanto, presentan una buena retención catiónica.

Las muestras contaminadas con hidrocarburos resultaron tener un mayor porcentaje de carbono orgánico total 5,11-8,10%, que las muestras no contaminadas 2,92-3,93% (ver Tabla 11), esto concuerda con los resultados obtenidos por Noguera y Armado (2010), los cuales varían entre 8,8-13,3% para las muestras impactadas y 1,6-7,3% para los controles. Fernández *et al* (2008) reporta valores para un suelo contaminado con crudo de 5,45% (ver Tabla 12). El contenido de carbono orgánico en el suelo se incrementa debido a la oxidación de los hidrocarburos (Martínez y López, 2001; Noguera y Armado, 2010). Se ha reportado el umbral de 2% de carbono orgánico para suelos agrícolas, como un valor por debajo del cual pueden originarse pérdidas importantes de calidad del suelo (Loveland y Webb, 2003; Zerpa, 2012), es decir, que por debajo de éste valor la estabilidad estructural disminuye mucho. Los valores obtenidos siempre estuvieron por encima del 2% de carbono orgánico total, por lo tanto, se puede deducir que no hay pérdidas importantes de calidad del suelo.

4.2. Extracción de Materia Orgánica y Determinación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo

Se realizó el método de extracción de Soxhlet, para obtener la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo que tiene una muestra contaminada y la materia orgánica presente en el suelo. Además, también se determinó la materia orgánica del suelo por la técnica de calcinación, con el fin de comparar ambos métodos.

En la Tabla 13 se pueden apreciar los resultados obtenidos de materia orgánica para los dos métodos, así como también el resultado del contenido de crudo presente en las muestras contaminadas.

Tabla 13. Materia orgánica evaluada por Soxhlet y calcinación y la composición de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

Muestras	MOE (%)	MO (%)	HTP (%)
C1	7,50±0,80	5,4±0,4	N/A
P1	10,02±0,06	11,0±0,6	2,51±0,03
C2	7,35±0,09	5,0±0,1	N/A
P2	10,20±0,90	9,4±0,7	2,83±0,02
C3	7,20±0,70	6,6±0,4	N/A
P3	12,00±1,00	8,8±0,9	4,78±0,05
C4	7,30±0,20	7,0±1,0	N/A
P4	9,48±0,02	13,9±0,6	2,18±0,02
C5	6,90±0,02	6,2±0,5	N/A
P5	10,90±0,90	9,9±0,2	4,02±0,04

MOE= Materia Orgánica determinada por Soxhlet, MO= Materia Orgánica determinada por Calcinación, N/A= No Aplica.

Las muestras contaminadas con petróleo resultaron con un porcentaje entre 9,48-12,00% de materia orgánica mayor que los controles 6,9-7,5% con la técnica de Soxhlet, y por la técnica de calcinación se obtuvo 8,8-13,9% para las contaminadas y 5,0-7,0% para los controles (ver Tabla 13). Esto coincide con los resultados obtenidos por Guerrero (2010), quién comparó el método de Soxhlet y el método de Walkley – Black para la obtención de materia orgánica, a pesar de que en ésta investigación se usó el método de calcinación. Se evidencia que en las muestras contaminadas se presentan valores superiores que las muestras controles, ya que, el contenido de materia orgánica del suelo contaminado es la suma de material biogénico (el cual proviene de la descomposición de vegetales y animales) y petrogénico (Brissio, 2005; Noguera y Armado, 2010). Fernández *et al* (2008) reportaron un valor de 9,39% de materia orgánica para un suelo contaminado con crudo (ver Tabla 12), y Guerrero (2010) en su investigación en la misma zona, obtuvo valores que van de 16,90-17,12% para muestras contaminadas y 4,1-12,3% en los controles, ambos usaron el método de Soxhlet. Para suelos Venezolanos sin contaminación, Armado (2011) reportó valores que van entre 1,5516-6,7236%, y Araujo *et al* (2006) de 1,05%, utilizando ambos el método de Walkley – Black. Se observa entonces la variabilidad existente en el contenido de materia orgánica en suelos de Venezuela. Sin embargo, los

resultados obtenidos en éste estudio se encuentran dentro del intervalo de los que trabajaron con el suelo contaminado con hidrocarburos. Se puede concluir que, aunque los principios de los métodos para la determinación de la materia orgánica del suelo son distintos, no existen diferencias significativas en los resultados con un 95% de confianza.

Tabla 14. Comparación de las composiciones de hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados con crudo, con los reportados en otra investigación.

Muestras	HTP (%)	
	Este Estudio	Noguera y Armado, 2010
P1	2,51±0,03	7,6±0,3
P2	2,83±0,02	7,0±1,0
P3	4,78±0,05	14,0±2,0
P4	2,18±0,02	5,0±2,0
P5	4,02±0,04	6,2±0,8

Al observar la Tabla 14, se evidencia que el estudio referenciado posee un contenido de hidrocarburos totales mayor que ésta investigación. Esto probablemente se debe a que para el año 2010, cuando fue realizado el muestreo por Noguera y Armado, aún existían 15 pozos petroleros de la zona de Yaracal que emanaban crudo de manera natural. En el año 2014, éstos pozos fueron pavimentados, y para el momento en que se realizó éste muestreo, en el año 2015, se tomaron muestras en los alrededores de cinco pozos petroleros cementados, y no de los pozos directamente, como lo realizaron Noguera y Armado en el 2010. Fernández *et al* (2008), en la misma zona obtuvieron un porcentaje de HTP de 9,8%, también un valor mayor a ésta investigación. Como los pozos se encontraban “saneados” al momento del muestreo se justifican las disminuciones observadas en el contenido de hidrocarburos totales del petróleo, a pesar del saneamiento, las muestras presentaron cierta contaminación con crudo.

4.3. Evaluación de la Respuesta de las Comunidades Microbianas del Suelo ante Diversos Compuestos Orgánicos

En ésta investigación, se aplicó un método fisiológico desarrollado por Degens y Harrys (1997), para evaluar la diversidad catabólica de las comunidades microbianas del suelo. El método utiliza las diferencias entre la respiración inducida por sustrato (RIS), medida en función del desprendimiento de dióxido de carbono, como respuesta de las comunidades microbianas ante compuestos orgánicos simples para cuantificar la diversidad catabólica.

Las concentraciones de CO₂ desprendido por la degradación de los 29 sustratos orgánicos usados, por los microorganismos presentes en el suelo, se muestran en las Tablas de la 15 a la 20.

Tabla 15. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los carbohidratos.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)			
	Galactosa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa
P1	143,0±3,0	91,2±0,5	87,4±0,9	82,0±3,0
C1	96,0±6,0	80,4±0,2	76,5±0,6	71,8±0,6
P2	148,0±7,0	112,6±0,3	106,0±1,0	83,0±0,4
C2	131,0±3,0	98,5±0,6	91,0±4,0	75,6±0,6
P3	168,0±4,0	125,0±3,0	119,6±0,6	120,0±3,0
C3	99,0±4,0	105,0±3,0	87,0±4,0	74,0±2,0
P4	139,0±4,0	108,0±4,0	116,0±1,0	97,0±2,0
C4	107,0±2,0	91,1±0,8	94,4±0,5	87,0±5,0
P5	152,2±0,7	104,0±2,0	110,0±2,0	86,7±0,9
C5	129,0±3,0	86,9±0,5	89,0±2,0	75,0±2,0

Tabla 16. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los polímeros.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)		
	Almidón	Celulosa	Dextrina
P1	154,9±0,4	164,9±0,5	134,6±0,4
C1	100,1±0,6	145,2±0,8	124,7±0,7
P2	182,0±5,0	194,0±3,0	142,0±2,0
C2	129,0±6,0	177,0±3,0	135,2±0,8
P3	242,0±6,0	205,6±0,6	133,0±2,0
C3	131,0±4,0	181,0±5,0	110,0±2,0
P4	196,0±5,0	195,0±4,0	137,0±3,0
C4	169,4±0,9	177,0±4,0	116,0±7,0
P5	220,0±2,0	186,0±3,0	124,0±1,0
C5	160,0±4,0	172,0±6,0	113,3±0,3

Tabla 17. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para las aminas y amida.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)		
	Difenilamina	Urea	Trietanolamina
P1	119,2±0,7	201,0±2,0	129,4±0,4
C1	107,9±0,6	194,0±1,0	121,0±2,0
P2	134,0±2,0	203,0±3,0	132,0±3,0
C2	121,9±0,7	197,0±2,0	124,0±1,0
P3	146,7±0,4	250,0±2,0	160,8±0,5
C3	119,0±7,0	201,0±2,0	126,9±0,6
P4	133,0±0,7	209,0±0,6	130,0±1,0
C4	123,0±0,3	200,0±2,0	122,8±0,3
P5	130,1±0,4	205,0±1,0	137,0±3,0
C5	118,9±0,7	195,0±4,0	126,9±0,6

Tabla 18. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los alcoholes.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)				
	Etanol	Tris-Base	Butanol	Metanol	Etilenglicol
P1	121,0±2,0	180±3	270,5±0,8	218,0±2,0	160,0±0,4
C1	110,0±2,0	152±5	262,8±0,7	186,7±0,5	144,8±0,4
P2	174,0±3,0	189±3	285,0±4,0	217,0±2,0	162,6±0,5
C2	138,0±4,0	166±2	279,0±3,0	195,0±5,0	157,1±0,4
P3	203,0±4,0	213±4	289,7±0,8	300,0±4,0	193,0±3,0
C3	138,0±4,0	154±5	267,0±5,0	200,0±2,0	170,0±1,0
P4	166,0±3,0	184±2	282,0±2,0	231,0±2,0	172,0±1,0
C4	127,7±0,7	148±4	275,2±0,8	213,0±5,0	160,0±1,0
P5	152,0±3,0	208±5	270,2±0,7	244,0±4,0	178,8±0,5
C5	142,0±2,0	179±3	263,0±2,0	205,0±5,0	167,0±3,0

Tabla 19. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los aminoácidos.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)					
	Triptófano	Arginina	Fenilalanina	Glicina	Histidina	Tirosina
P1	173,0±4,0	325,0±3,0	266,0±3,0	138,0±2,0	160,0±1,0	195±1
C1	163,0±2,0	308,0±3,0	256,0±1,0	130,0±2,0	146,4±0,7	184±3
P2	203,0±2,0	317,4±0,9	266,0±2,0	148,1±0,4	164,0±1,0	203±2
C2	171,5±0,5	308,0±3,0	259,0±1,0	141,8±0,8	157,1±0,4	185±2
P3	202,0±4,0	330,0±3,0	292,9±0,7	166,0±4,0	184,0±3,0	222±4
C3	173,0±2,0	315,2±0,9	270,0±3,0	139,4±0,9	154,9±0,8	184±4
P4	203,3±0,6	318,0±1,0	272,0±2,0	151,0±3,0	168,0±3,0	200±4
C4	172,0±1,0	312,0±1,0	266,0±2,0	140,0±3,0	159,0±2,0	189±3
P5	208,0±3,0	309,0±3,0	277,0±5,0	153,7±0,8	175,0±1,0	200±1
C5	166,0±2,0	294,0±3,0	264,0±3,0	142,5±0,4	164,0±2,0	185±1

Tabla 20. Concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración inducida por sustratos para los ácidos carboxílicos.

Muestras	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)			
	Ácido Cítrico	Ácido Oxálico	Ácido Ascórbico	Ácido Acético
P1	728±2	673±2	727,0±3,0	724,0±4,0
C1	720±3	657±2	690,0±2,0	710,0±3,0
P2	751±2	688±2	735,0±8,0	733,0±4,0
C2	742±2	677±2	689,0±3,0	720,0±4,0
P3	800±4	705±2	764,0±11,0	787,0±10,0
C3	727±4	675±3	709,0±3,0	709,0±7,0
P4	738±2	672±2	756,0±4,0	731,0±7,0
C4	723±7	664±2	701,0±4,0	716,5±0,5
P5	746±2	673±3	719,0±7,0	729,0±2,0
C5	710±3	666±2	698,1±0,6	712,3±0,5
	Ácido Ftálico	Ácido Salicílico	Ácido Fumárico	TSP
P1	483,2±0,2	491±1	455±3	238,0±3,0
C1	448,0±1,0	487±1	445±4	200,0±3,0
P2	561,0±5,0	544±3	487±3	261,6±0,7
C2	456,0±5,0	498±4	473±3	227,8±0,6
P3	596,0±2,0	550±3	562±2	284,3±0,8
C3	478,0±5,0	489±6	449±1	228,0±1,0
P4	568,0±2,0	521±1	497±1	257,0±3,0
C4	501,0±4,0	500±2	436±1	237,0±4,0
P5	580,0±2,0	503±1	457±1	243,0±2,0
C5	485,0±7,0	492±4	447±1	226,0±3,0

TSP= Tartrato Sódico de Potasio.

En cada una de las Tablas anteriores, se puede observar que los resultados de respiración microbiana son mayores en el pozo 3 (P3). El pozo 1 (P1) presenta las menores respuestas de las comunidades microbianas ante los diversos sustratos orgánicos usados, con respecto a cada uno de los pozos estudiados. El control 1 (C1) presenta los resultados más bajos de respiración microbiana entre todas las muestras analizadas. Esto ocurre con

la mayoría de los sustratos carbonados adicionados al suelo afectado por hidrocarburos del petróleo.

En la Tabla 21 se muestra un resumen de los resultados con los intervalos de concentración de CO₂, producto de la respiración microbiana entre las muestras contaminadas con crudo y las muestras controles para cada grupo de sustratos.

Tabla 21. Intervalos de CO₂ para cada grupo de sustratos entre las muestras contaminadas con crudo y los controles.

Grupo de Sustratos	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)	
	Muestras Control	Muestras Contaminadas
Carbohidratos	71,8-131,0	82,0-152,2
Polímeros	100,1-181,0	124,0-242,0
Aminas y Amidas	107,9-201,0	119,2-250,0
Alcoholes	110,0-279,0	121,0-300,0
Aminoácidos	130,0-315,2	138,0-330,0
Ácidos Carboxílicos	200,0-742,0	238,0-800,0

Como se puede ver, en la Tabla 21, se evidencia la variación de la actividad microbiológica que presenta el suelo contaminado y no contaminado, observándose mayores respuestas de las comunidades microbianas en las muestras contaminadas que en los controles. Además se observa el orden en que se llevó a cabo la degradación del crudo por los microorganismos. Es importante señalar que, ciertas cepas de algunos microorganismos son capaces de utilizar el petróleo como fuente de carbono y energía, ya que estos compuestos contienen carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno y oxígeno, que son los elementos necesarios para el desarrollo de cualquier organismo (Pineda *et al.*, 2004).

Las respuestas que produce el suelo en un estado contaminado como no contaminado, que presentaron los grupos de sustratos, se llevó a cabo de la siguiente manera:

Carbohidratos < Polímeros < Aminas y Amidas < Alcoholes < Aminoácidos
< Ácidos carboxílicos

El motivo por el cual los carbohidratos presentan las menores respuestas, se debe a que los azúcares son componentes fijos del metabolismo de los microorganismos del suelo y por tanto, su degradación catabólica es fija (Anderson, 1982). Ahora bien, el hecho de que los ácidos carboxílicos sean los sustratos que se degraden más fácilmente, se debe a que en ellos ocurre una descarboxilación oxidativa, consecuencia de su degradación (oxidación). El grupo carboxilo es eliminado de la molécula de ácido, formando un grupo acetilo y liberando CO₂. Este proceso ocurre con frecuencia en sistemas biológicos, siendo un ejemplo de ello, la descarboxilación del piruvato en el ciclo de Krebs (Linares, 2011).

El orden en que ocurrió la degradación por parte de los microorganismos coincide con la investigación realizada por Degens y Harrys (1997) y Linares (2011) (ver Tabla 22). Aunque se presenta variación en los valores, probablemente, debido a que los suelos en estudio son distintos. Degens y Harrys (1997) realizaron su investigación con cinco suelos diferentes, tres de pastizales, uno cultivado y uno boscoso, mientras que Linares (2011) trabajó con un suelo que perteneció a un vertedero, a su vez éste estudio se realizó en un suelo contaminado con crudo mediano.

Tabla 22. Comparación de los intervalos de CO₂, obtenidos en este estudio, con valores reportados en otras investigaciones.

Grupo de Sustratos	Respiración (mgCO ₂ /kg*h)		
	Degens y Harrys, 1997	Linares, 2011	Este Estudio
Carbohidratos	80-160	70-250	71,8-152,2
Polímeros	140-170	120-250	100,1-242,0
Aminas y Amidas	150-185	120-300	107,9-250,0
Alcoholes	155-215	120-350	110,0-300,0
Aminoácidos	155-230	140-600	130,0-330,0
Ácidos Carboxílicos	160-2135	250-1600	200,0-800,0

La principal ventaja de este método es su rapidez además tiene un bajo coeficiente de variación, y puede ser aplicado a suelos de bajo pH como fueron los de esta investigación (García *et al.*, 2003). También resultó ser bastante sensible a las modificaciones realizadas con cada sustrato, ya que se obtuvo una estimación efectiva de la capacidad de respuesta directa de las comunidades microbianas. Está reportado que menos del 1% de los microorganismos en los suelos pueden ser cultivados en placas de agar, lo cual no representaría una medida apreciable de la diversidad de las comunidades microbianas (Anderson y Domsch, 1978; Linares, 2011).

Por ende, queda demostrado, que en el suelo contaminado con hidrocarburos, ubicado en Yaracal - Estado Falcón, existe diversidad catabólica, ya que los sustratos orgánicos fueron degradados, posiblemente de acuerdo a su necesidad de incorporación al metabolismo celular. Por otra parte, Oropeza (2010) en su investigación presume que en la zona del Mene de San Lorenzo, algunos microorganismos probablemente se adaptaron ante la presencia del petróleo en su ambiente, infiriendo la posibilidad de que hayan degradado los hidrocarburos, para convertirlos en compuestos orgánicos, pertenecientes al metabolismo de éstos organismos o en materia orgánica humificada del suelo, producto de la biodegradación. De acuerdo a Linares (2011), a medida que las muestras presentan mayores respuestas de respiración microbiana, los sustratos carbonados se degradan más fácilmente.

Con base a la conclusión de Oropeza (2010), y la comparación de los resultados que se obtuvieron en ésta investigación con la de Linares (2011), se puede inferir que los suelos de la localidad del Mene de San Lorenzo, en el estado Falcón, presentan diversidad metabólica.

4.4. Determinación de los Perfiles de Respuesta por el Método de Respiración Inducida por Sustrato

Normalmente, los microorganismos presentes en el suelo se encuentran en estado latente, en consecuencia, su nivel de respiración es bajo, sin embargo, como se utilizó el método RIS, su respiración se vio estimulada mediante la adición de un sustrato orgánico fácilmente degradable. Estos sustratos debían ser compatibles con los requerimientos metabólicos de la

mayor parte de la microflora del suelo, así como también, ser solubles en agua, a fin de que pudieran distribuirse bien en todos los microhábitats. Además, deben tener una estructura compleja para no ser degradado por las enzimas libres o unidas a los coloides del suelo y no ser tóxicos (Anderson y Domsch, 1978). Cabe destacar que se utilizó una gama de patrones de sustratos, tales como: carbohidratos, polímeros, aminas, amidas, alcoholes, aminoácidos y ácidos carboxílicos, donde se incluían compuestos que no eran solubles en agua, además de otros tóxicos. En contraste, se ha demostrado que esta técnica es efectiva para evaluar los cambios de la diversidad de comunidades microbianas en la rizosfera de suelos contaminados con petróleo, alterados con distintos tipos de materiales (Degens y Harrys, 1997).

Los perfiles de respuestas obtenidos por el método RIS, para cada sustrato carbonado adicionado al suelo en la investigación, se pueden apreciar en las figuras de la 7 a la 35.

Muestras	Glucosa (mgCO ₂ /kg*h)
P1	91,2
C1	80,4
P2	112,6
C2	98,5
P3	125
C3	105
P4	108
C4	91,1
P5	104
C5	86,9

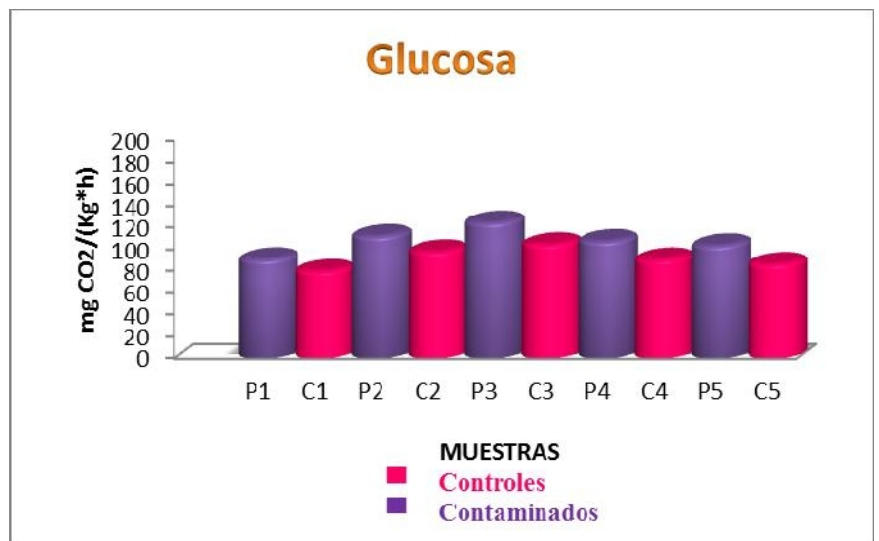


Figura 7. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado glucosa (carbohidratos).

Muestras	Sacarosa (mgCO ₂ /kg*h)
P1	87,4
C1	76,5
P2	106
C2	91
P3	119,6
C3	87
P4	116
C4	94,4
P5	110
C5	89



Figura 8. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado sacarosa (carbohidratos).

Muestras	Galactosa (mgCO ₂ /kg*h)
P1	143
C1	96
P2	148
C2	131
P3	168
C3	99
P4	139
C4	107
P5	152,2
C5	129

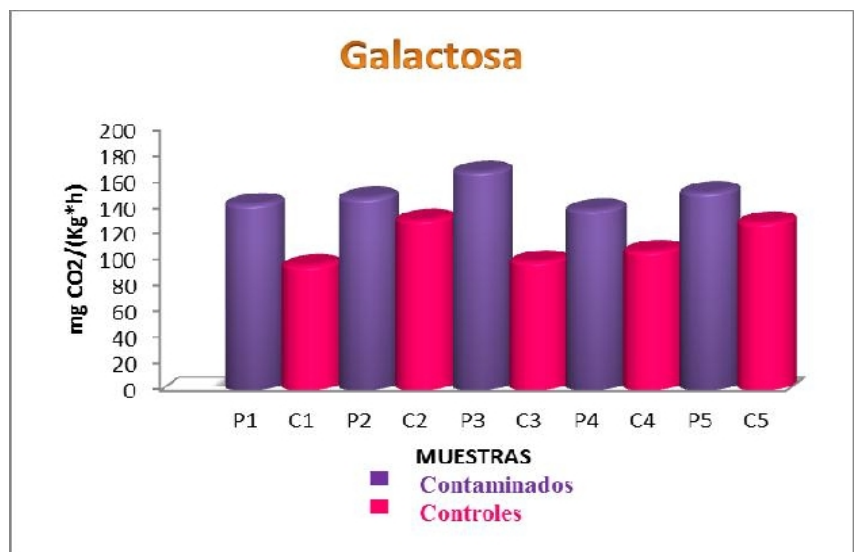


Figura 9. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado galactosa (carbohidratos).

Muestras	Lactosa (mgCO ₂ /kg*h)
P1	82
C1	71,8
P2	83,0
C2	75,6
P3	120
C3	74
P4	97
C4	87
P5	86,7
C5	75



Figura 10. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado lactosa (carbohidratos).

Muestras	Almidón (mgCO ₂ /kg*h)
P1	154,9
C1	100,1
P2	182
C2	129
P3	242
C3	131
P4	196
C4	169,4
P5	220
C5	160



Figura 11. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado almidón (polímeros).

Muestras	Celulosa (mgCO ₂ /kg*h)
P1	164,9
C1	145,2
P2	194
C2	177
P3	205,6
C3	181
P4	195
C4	177
P5	186
C5	172

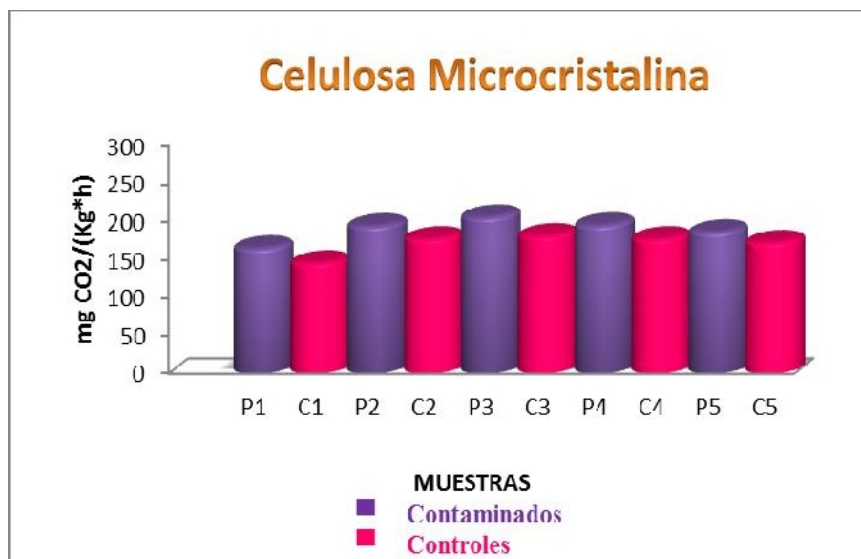


Figura 12. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado celulosa microcristalina (polímeros).

Muestras	Dextrina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	134,6
C1	124,7
P2	142
C2	135,2
P3	133
C3	110
P4	137
C4	116
P5	124
C5	113,3



Figura 13. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado dextrina (polímeros).

Muestras	Difenilamina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	119,2
C1	107,9
P2	134
C2	121,9
P3	146,7
C3	119
P4	133,0
C4	123,0
P5	130,1
C5	118,9

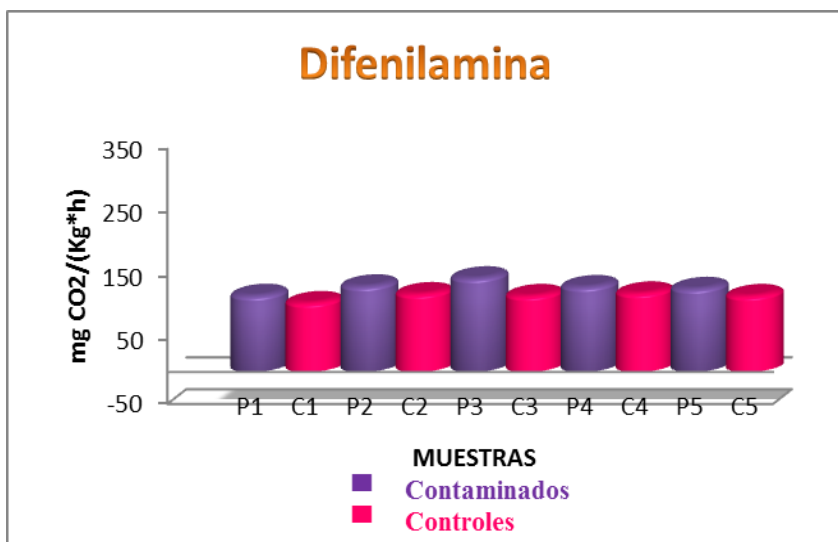


Figura 14. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado difenilamina (aminas).

Muestras	Urea (mgCO ₂ /kg*h)
P1	201
C1	194
P2	203
C2	197
P3	250
C3	201
P4	209,0
C4	200
P5	205
C5	195



Figura 15. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado úrea (amidas).

Muestras	Trietanolamina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	129,4
C1	121
P2	132
C2	124
P3	160,8
C3	126,9
P4	130
C4	122,8
P5	137
C5	126,9



Figura 16. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado trietanolamina (aminas).

Muestras	Etanol (mgCO ₂ /kg*h)
P1	121
C1	110
P2	174
C2	138
P3	203
C3	138
P4	166
C4	127,7
P5	152
C5	142



Figura 17. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado etanol (alcoholes).

Muestras	Tris-Base (mgCO ₂ /kg*h)
P1	180
C1	152
P2	189
C2	166
P3	213
C3	154
P4	184
C4	148
P5	208
C5	179



Figura 18. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado tris(hidroximetil)aminometano (alcoholes).

Muestras	Butanol (mgCO ₂ /kg*h)
P1	270,5
C1	262,8
P2	285
C2	279
P3	289,7
C3	267
P4	282
C4	275,2
P5	270,2
C5	263



Figura 19. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado butanol (alcoholes).

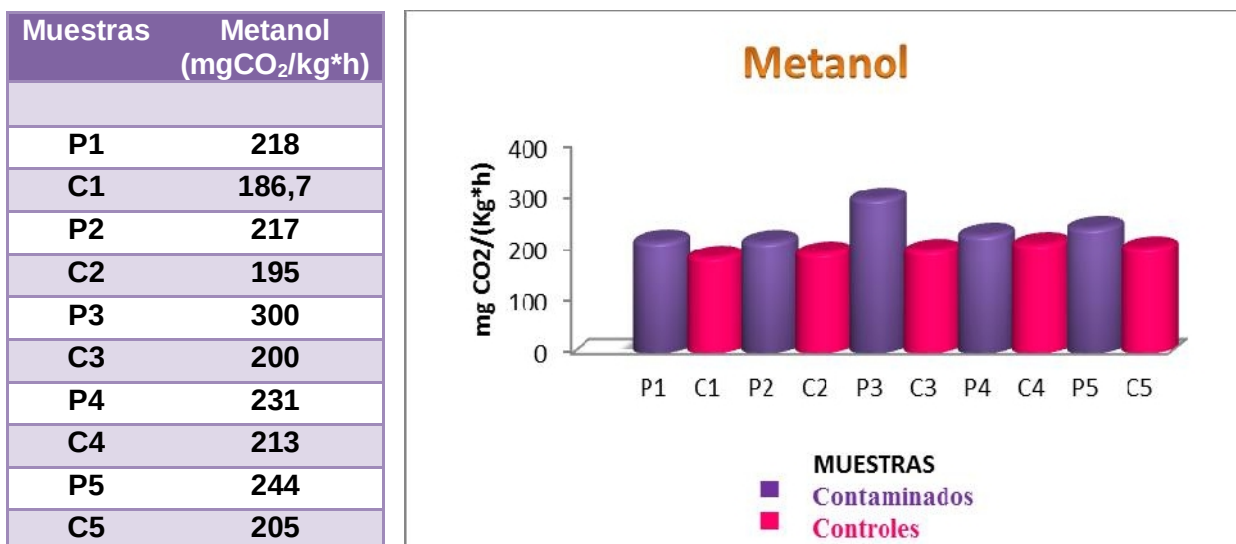


Figura 20. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado metanol (alcoholes).

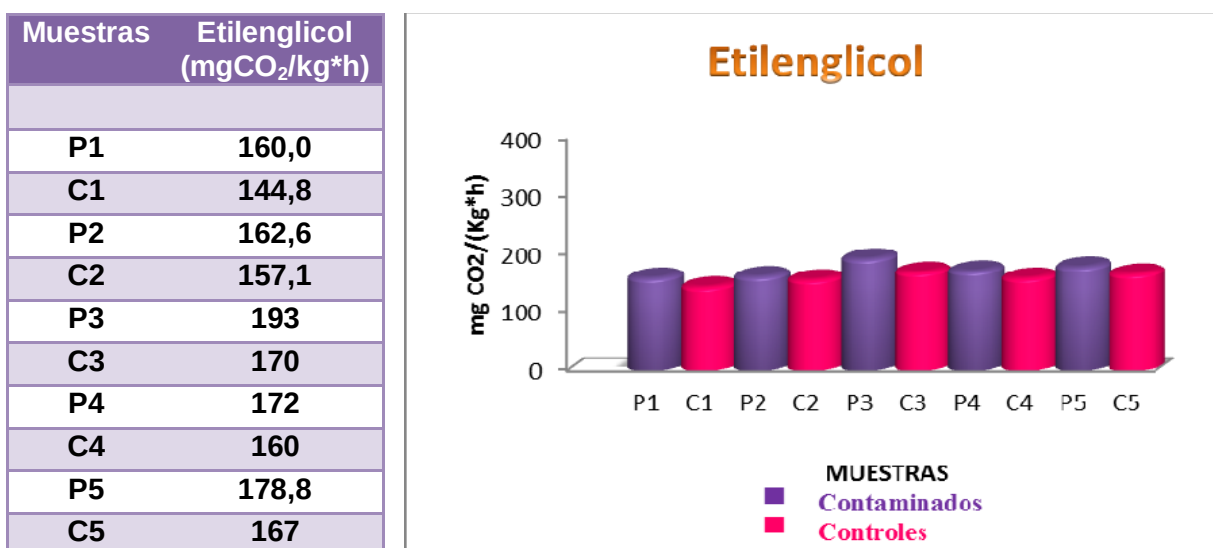


Figura 21. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado etilenglicol (alcoholes).

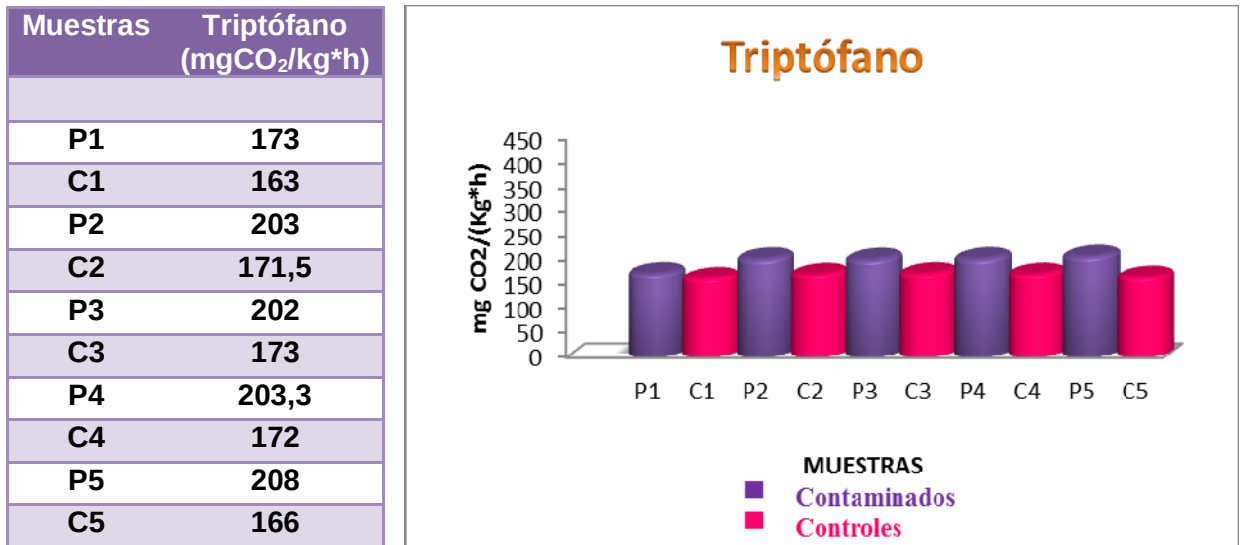


Figura 22. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado triptófano (aminoácidos).

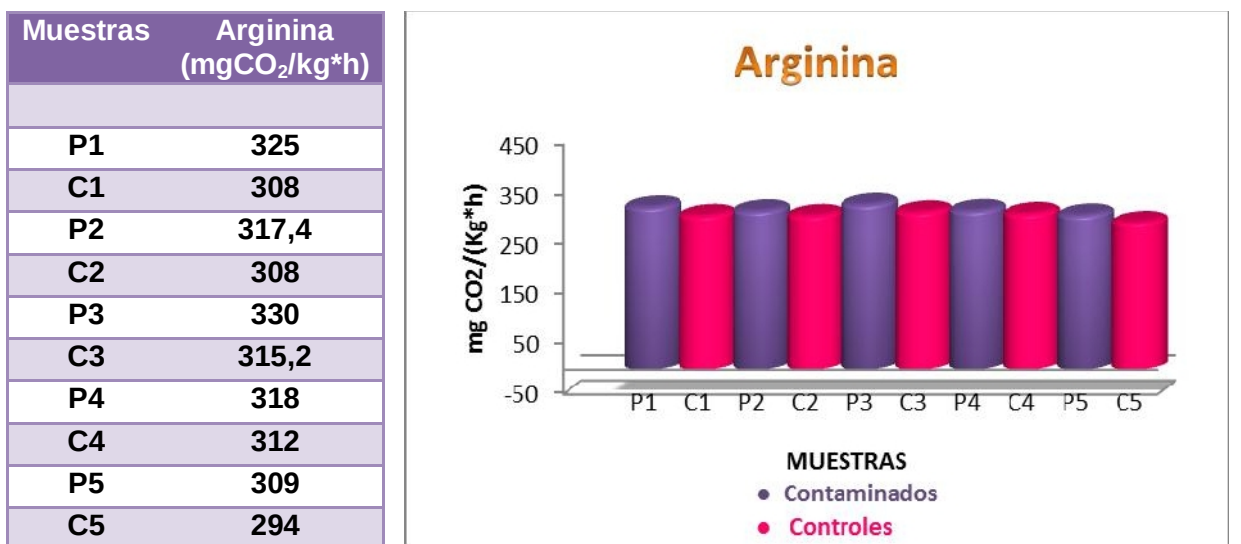


Figura 23. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado arginina (aminoácidos).

Muestras	Fenilalanina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	266
C1	256
P2	266
C2	259
P3	292,9
C3	270
P4	272
C4	266
P5	277
C5	264

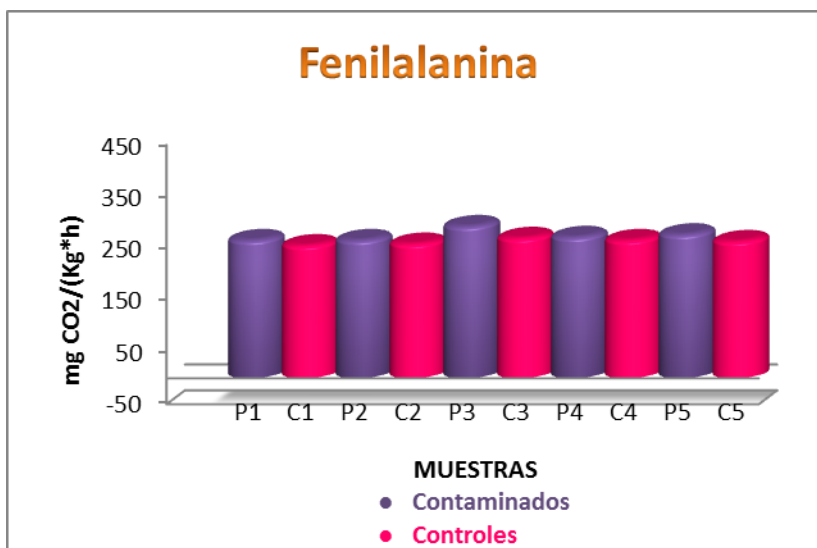


Figura 24. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado fenilalanina (aminoácidos).

Muestras	Glicina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	138
C1	130
P2	148,1
C2	141,8
P3	166
C3	139,4
P4	151
C4	140
P5	153,7
C5	142,5

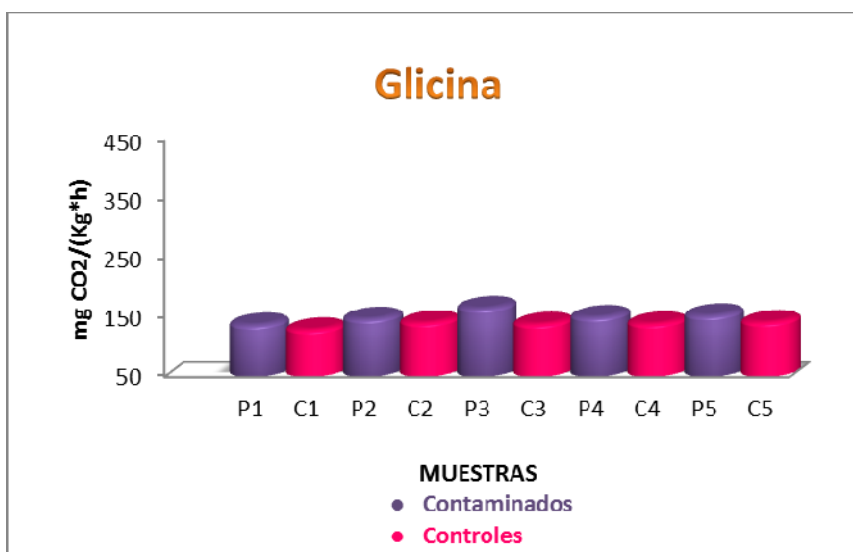


Figura 25. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado glicina (aminoácidos).

Muestras	Histidina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	160
C1	146,4
P2	164
C2	157,1
P3	184
C3	154,9
P4	168
C4	159
P5	175
C5	164



Figura 26. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado histidina (aminoácidos).

Muestras	Tirosina (mgCO ₂ /kg*h)
P1	195
C1	184
P2	203
C2	185
P3	222
C3	184
P4	200
C4	189
P5	200
C5	185



Figura 27. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado tirosina (aminoácidos).

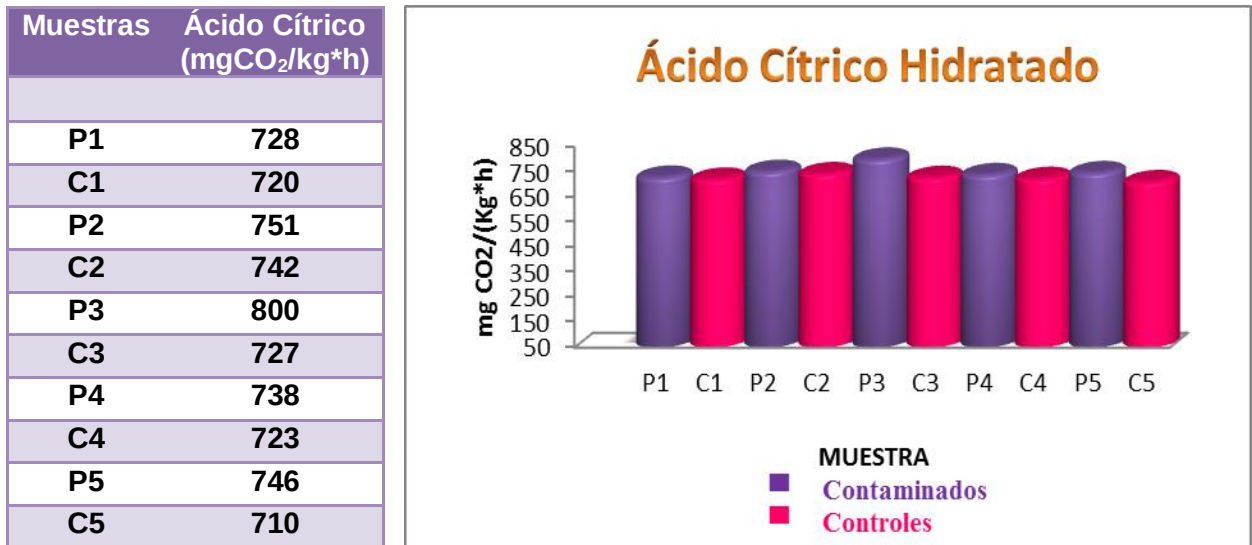


Figura 28. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido cítrico hidratado (ácidos carboxílicos).

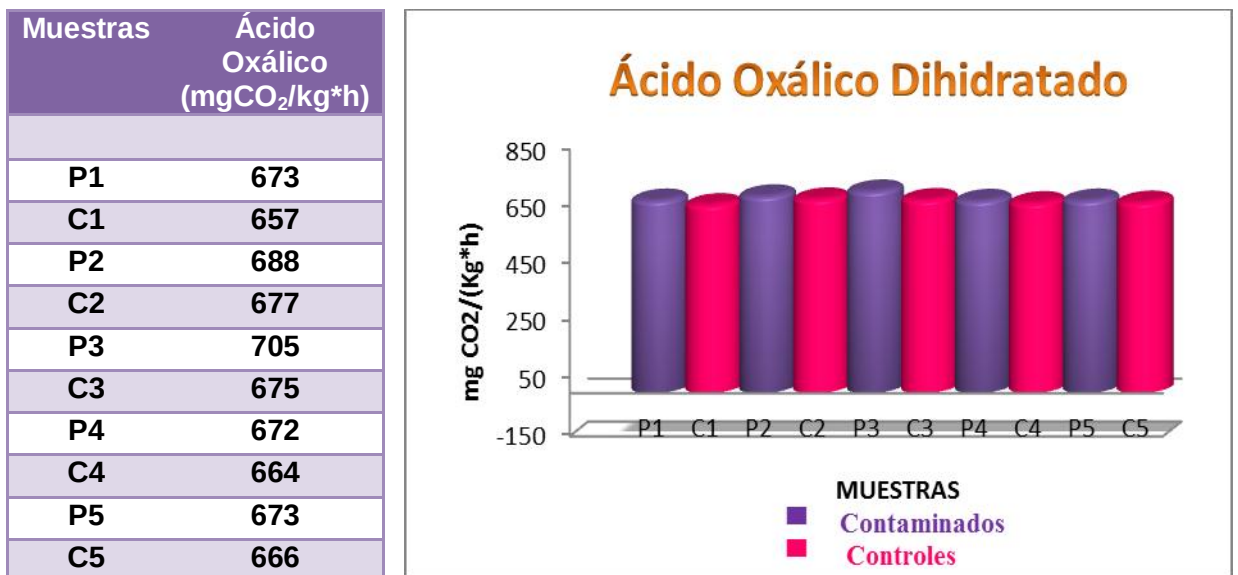


Figura 29. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido oxálico dihidratado (ácidos carboxílicos).

Muestras	Ácido Ascórbico (mgCO ₂ /kg*h)
P1	727
C1	690
P2	735
C2	689
P3	764
C3	709
P4	756
C4	701
P5	719
C5	698,1



Figura 30. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido ascórbico (ácidos carboxílicos).

Muestras	Ácido Acético (mgCO ₂ /kg*h)
P1	724
C1	710
P2	733
C2	720
P3	787
C3	709
P4	731
C4	716,5
P5	729
C5	712,3



Figura 31. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido acético (ácidos carboxílicos).

Muestras	Ácido Ftálico (mgCO ₂ /kg*h)
P1	483,2
C1	448
P2	561
C2	456
P3	596
C3	478
P4	568
C4	501
P5	580
C5	485



Figura 32. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido ftálico (ácidos carboxílicos).

Muestras	Ácido Salicílico (mgCO ₂ /kg*h)
P1	491
C1	487
P2	544
C2	498
P3	550
C3	489
P4	521
C4	500
P5	503
C5	492



Figura 33. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido salicílico (ácidos carboxílicos).

Muestras	Ácido Fumárico (mgCO ₂ /kg*h)
P1	455
C1	445
P2	487
C2	473
P3	562
C3	449
P4	497
C4	436
P5	457
C5	447



Figura 34. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado ácido fumárico (ácidos carboxílicos).

Muestras	TSP (mgCO ₂ /kg*h)
P1	238
C1	200
P2	261,6
C2	227,8
P3	284,3
C3	228
P4	257
C4	237
P5	243
C5	226

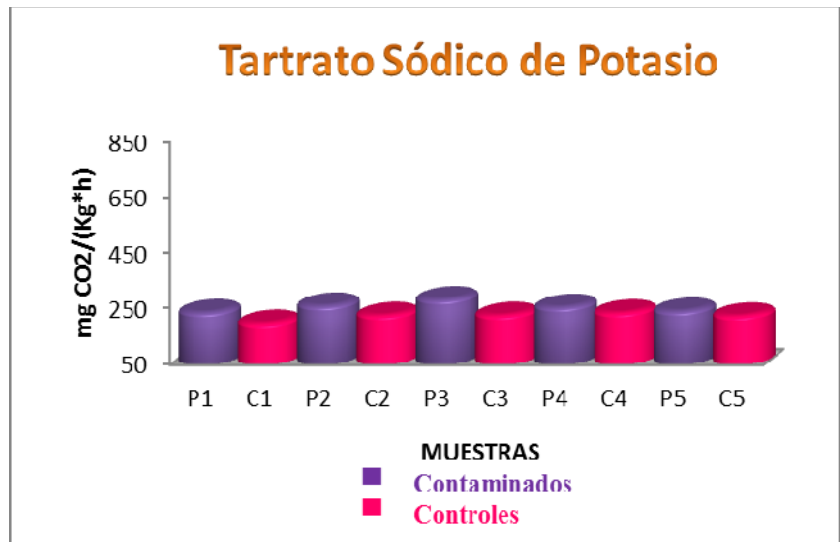


Figura 35. Perfil de respuesta de respiración inducida por el sustrato carbonado tartrato sódico de potasio (ácidos carboxílicos).

En las figuras anteriores, se muestran los perfiles de respuesta de RIS para cada muestra estudiada; se evidencia que las muestras contaminadas (color morado), reflejaron una mayor respiración microbiana que los controles (color fucsia), esto se observa con cada uno de los sustratos carbonados adicionados al suelo. Esto ocurre, debido, a que las muestras que presentan elementos tóxicos, tienen una mayor cantidad de organismos degradadores de hidrocarburos (Messarch y Nies, 1997; Guerrero, 2010). También, se puede observar a través de los gráficos, que el pozo 3 (P3) tiene una mayor población de microorganismos capaces de degradar al contaminante, lo cual se corrobora ya que éste pozo presentó un contenido superior de hidrocarburos totales del petróleo con respecto a los otros pozos analizados. Existen investigadores que han obtenido resultados mayores en los controles, que en las muestras contaminadas con petróleo, ésta disminución posiblemente represente la muerte de los microorganismos que no son resistentes y/o degradadores del hidrocarburo (Guerrero, 2010). Las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados, tienden a estar dominados por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente, siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer, en este sentido el contaminante “desbalancea”, más que toxifica, las comunidades ecológicas del suelo (Oropeza, 2010). Por lo general, en los suelos contaminados con hidrocarburos, se encuentra la bacteria *Pseudomona* la cual puede crecer a una temperatura que varía de 4-22°C, es una bacteria propia del suelo, y algunos linajes de esta especie han sido considerados como potencial para aplicaciones biotecnológicas (Nelson *et al.*, 2002; Oropeza, 2010).

Los suelos contaminados con petróleo, sufren un efecto tóxico directo ejercido por los hidrocarburos. Esto disuelve el tejido de las plantas, disminuyendo su crecimiento, debido a la exclusión del aire o por el agotamiento del oxígeno, que ocurre por el incremento de la actividad microbiana. A su vez, puede haber interferencia con la relación agua - suelo – planta, y toxicidad por el azufre y exceso de manganeso producido durante la descomposición de los hidrocarburos (TPHCWG, 1998). Es importante acotar que, no todos los efectos del crudo sobre el suelo son nocivos. Plice (1948), encontró que el crudo agregado a un suelo arenoso en proporción de 0,75% p/p, estimulaba el crecimiento de soya; además, observó que con un incremento de 4% p/p de hidrocarburos las mismas

plantas morían. Guerrero (2010), en suelos ubicados en Yaracal, obtuvo valores superiores de biomasa microbiana en las muestras controles que en las muestras contaminadas por crudo, probablemente debido al contenido de hidrocarburos totales de petróleo; lo que representó un efecto nocivo para el suelo. A diferencia de ésta investigación, que reflejó un contenido menor de HTP, ya que al momento del muestreo los pozos se encontraban cementados, por ello, hubo una disminución en éste contenido, mejorando los perfiles de respuestas de las comunidades microbianas del suelo ante los diversos compuestos orgánicos usados.

4.5. Análisis Estadístico de los Datos

En este estudio se realizó un Análisis por Componentes Principales usando una matriz de correlaciones, con el programa estadístico Past III, para todas las variables analizadas en la investigación. El propósito de este análisis es obtener el menor número de combinaciones lineales para todas las muestras (contaminadas con hidrocarburos y controles), que contengan variabilidad en la data. Se obtuvieron dos componentes que describen el sistema satisfactoriamente con un 82,357% de variabilidad en la data original.

Como se puede observar en la Tabla 23, el componente 1 y el componente 2, presentan los máximos autovalores, los cuales contienen la varianza significativa de toda la data, los otros componentes, no representan contribución en la data, es por ello que, no son tomados en cuenta.

Tabla 23. Análisis por componentes principales de los datos.

Componentes	Autovalor	Varianza Individual (%)	Varianza Acumulativa (%)
1	27,5756	72,5670	72,5670
2	3,7201	9,7898	82,3568
3	2,3149	6,0919	88,4487
4	1,4959	3,9367	92,3854
5	1,1842	3,1163	95,5017
6	0,5776	1,5201	97,0218
7	0,5032	1,3242	98,3460
8	0,3856	1,0147	99,3607
9	0,2428	0,6390	99,9997

En las Tablas 24 y 25 se muestran los valores obtenidos de los componentes 1 y 2, para los sustratos y los parámetros fisicoquímicos respectivamente. En negrita están los valores que pertenecen a cada componente. Los datos para ubicar cada variable con un componente en específico, deben tener un valor absoluto mayor que 0,65 para el análisis estadístico empleado.

Tabla 24. Valores obtenidos de los componentes 1 y 2 para las variables pertenecientes a los sustratos.

Variables	CP 1	CP 2
Etanol	0,91496	0,25427
Tris-Base	0,87344	-0,17383
Butanol	0,8012	0,17897
Metanol	0,92807	0,18003
Etilenglicol	0,83515	0,25069
Galactosa	0,88198	-0,1909
Glucosa	0,88787	0,23395
Sacarosa	0,92754	-0,0012496
Lactosa	0,89778	0,22027
Almidón	0,91274	-0,0025246
Celulosa	0,85672	0,20883
Dextrina	0,54377*	-0,39347*
Difenilamina	0,96353	0,16397
Urea	0,86037	0,38601
Trietanolamina	0,90098	0,27436
Triptófano	0,87139	-0,21178
Arginina	0,66979	-0,076885
Fenilalanina	0,87721	0,25256
Glicina	0,94497	0,20136
Histidina	0,9153	0,090985
Tirosina	0,97397	0,040439
Ácido Cítrico	0,88377	0,32623
Ácido Oxálico	0,85293	0,31733
Ácido Ascórbico	0,91659	-0,17085
Ácido Acético	0,9141	0,27438
Ácido Ftálico	0,92008	-0,08905
Ácido Salicílico	0,87407	0,15441
Ácido Fumárico	0,87754	0,27613
TSP	0,9582	0,075518

Los valores marcados con (*) corresponden a la variable Dextrina, no aporta variabilidad con ningún componente.

En la Tabla 24, se observa que casi todos los sustratos analizados, se encuentran delimitados por el valor del componente 1, excepto la dextrina, ya que no aporta variabilidad con ninguno de los dos componentes, es decir, no tiene correlación significativa con respecto a las otras variables.

Tabla 25. Valores obtenidos de los componentes 1 y 2 para las variables pertenecientes a los parámetros fisicoquímicos.

Variables	CP 1	CP 2
CIC (cmol/kg)	-0,72211	0,41322
HTP (%)	0,91838	-0,23523
pH	-0,50955	0,76183*
CE (mS/cm)	0,81234	-0,10326
Humedad (%)	-0,66586	0,50989
MOE (%)	0,91027	-0,25883
MO (%)	0,62956	-0,66399*
COT (%)	0,63959	-0,66427*
RH (%)	-0,83516	0,54046

Los valores marcados con (*) corresponden a las variables que pertenecen al componente 2.

En la Tabla 25, se muestra que las variables pH, materia orgánica por calcinación y carbono orgánico total, pertenecen al componente 2. El resto de las variables, capacidad de intercambio catiónico, hidrocarburos totales del petróleo, conductividad eléctrica, materia orgánica por el método de Soxhlet y el contenido de humedad pertenecen al componente 1. Se evidencia entonces, que la mayoría de las variables analizadas en la investigación, están delimitadas por el componente 1.

En la Figura 36, se observa la correlación que tuvo cada variable analizada con el componente 1, de acuerdo a un diagrama interpretativo realizado con el programa estadístico Past III. La Figura 36 explica, si una variable tiene correlación positiva o negativa con el componente 1. Al observar el gráfico, la capacidad de intercambio catiónico, pH, contenido y retención hídrica tienen correlación negativa con el componente 1. Mientras que todos los sustratos analizados, para la obtención de los perfiles de

respuesta tienen correlación positiva con éste componente, al igual que, la conductividad eléctrica, el contenido de hidrocarburos totales del petróleo, carbono orgánico total, materia orgánica por el método de Soxhlet y por calcinación. Es decir, existe correlación directa significativa, entre los sustratos carbonados y los parámetros fisicoquímicos anteriormente mencionados; por lo cual se infiere que posiblemente, el contenido de hidrocarburos del petróleo no representa un efecto nocivo en el suelo de la localidad del Mene de San Lorenzo.

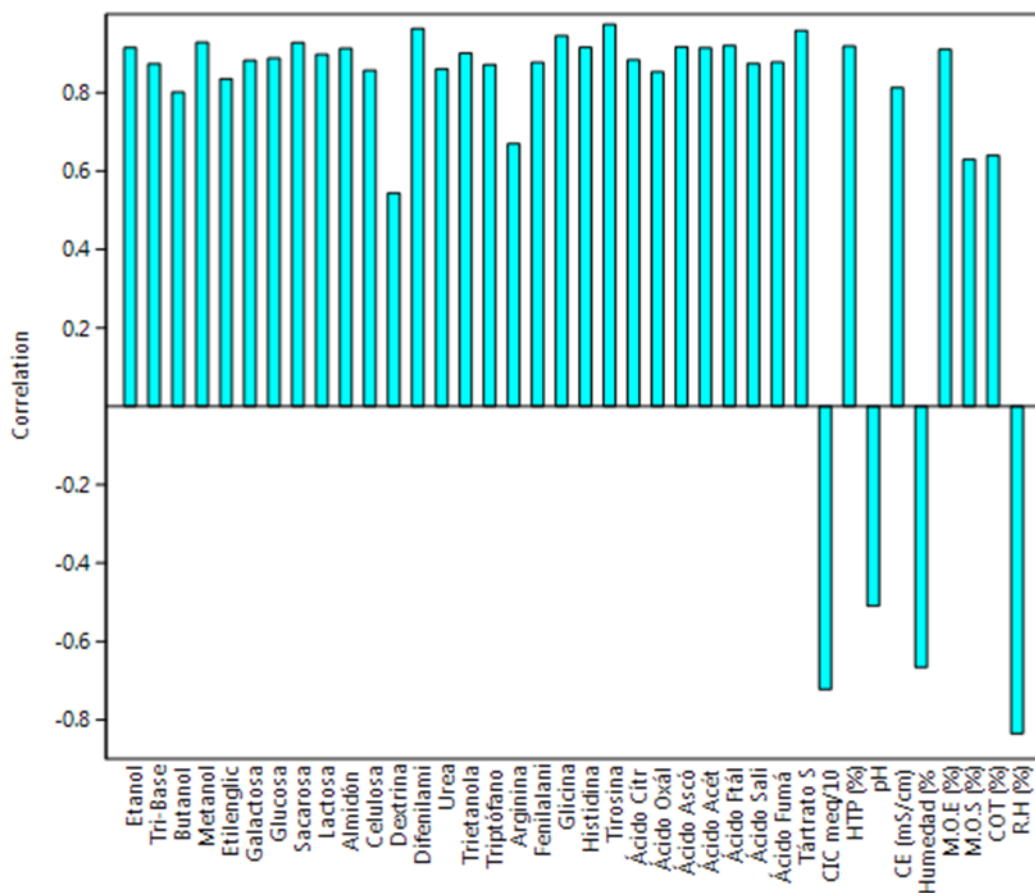


Figura 36. Correlación de las variables analizadas con el componente 1.

En la Figura 37, se muestra el comportamiento que tienen los dos componentes con cada una de las variables.

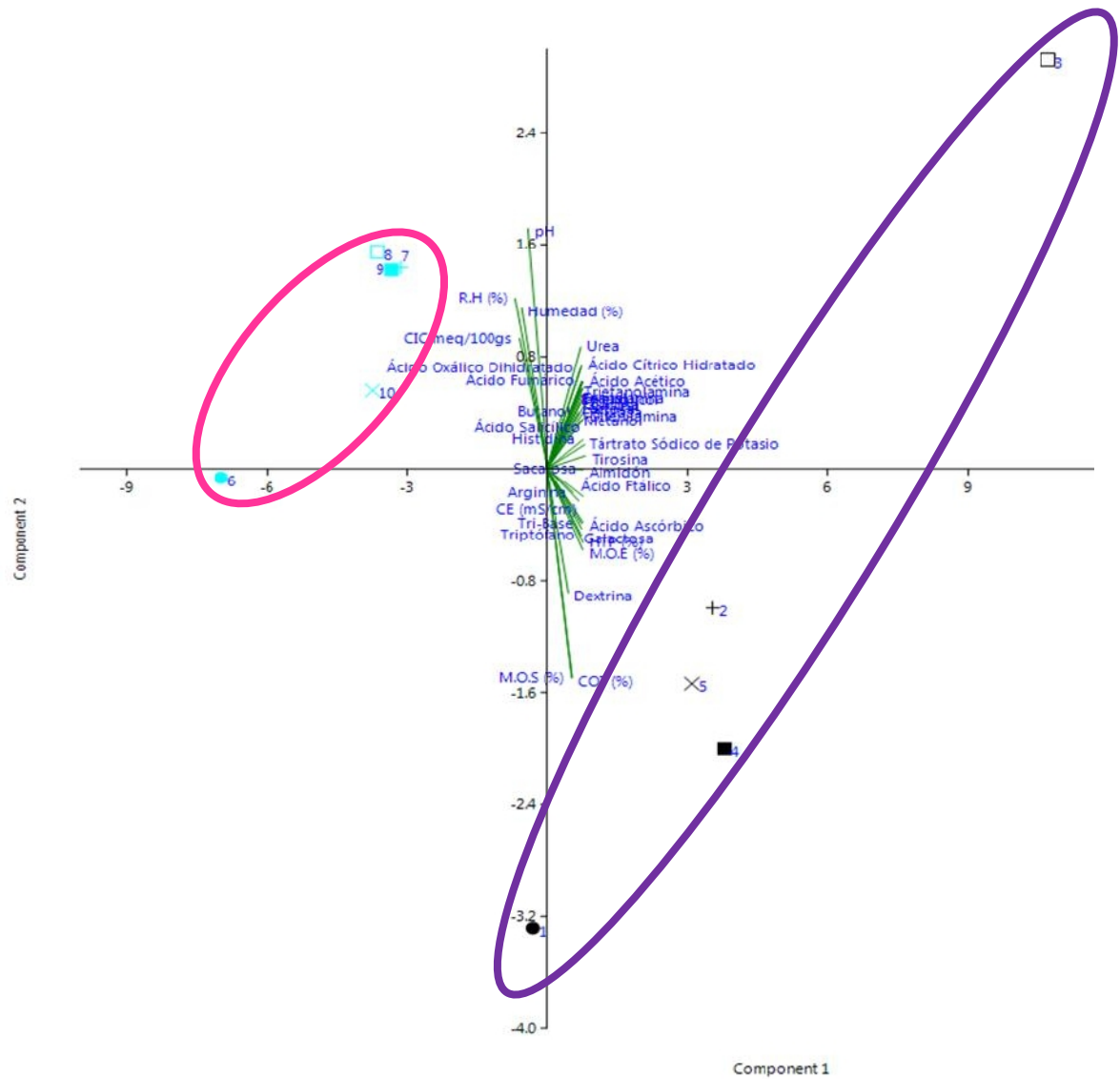


Figura 37. Comportamiento de los componentes 1 y 2, obtenidos en el Análisis por Componentes Principales.

En la Figura 37, las muestras contaminadas con hidrocarburos están marcadas en negro, englobadas en color morado, y van enumeradas, donde P1 corresponde a 1, P2 al número 2, y así continuamente con las otras muestras, con respecto a los controles, están marcadas en azul agua, englobadas en color fucsia, donde al C1 le pertenece el 6, al C2 le corresponde el 7, al C3 el 8, y así sucesivamente hasta llegar al 10. El componente 1, se denota en el eje de las "X" (horizontal), y el componente 2 en el eje de las "Y" (vertical). En la Figura 37 se muestra un comportamiento diferente, entre las muestras controles y las muestras contaminadas con petróleo, ya que en el lado izquierdo se concentran los controles y en el lado derecho de la gráfica las muestras contaminadas con crudo, lo cual corrobora los resultados obtenidos en los perfiles de respuesta de RIS e indica que son suelos cuya diversidad microbiana es distinta. La muestra P3=3 es la que está más alejada entre las contaminadas, pero también se denota que la muestra C3=8, está por encima pero del otro lado del gráfico, es por ello que, ese es el control correspondiente a ese pozo, el mismo caso se puede ver para el P1=1 y el C1=6, ambas son las más bajas en el gráfico. La variabilidad entre P1 y P3 se debe a la cantidad de hidrocarburos de petróleo que existe en cada pozo, el P3 tiene el mayor contenido de HTP, exactamente 4,78%, mientras que el P1 es uno de los que menor contenido tiene 2,51%, una diferencia de casi el doble.

Las muestras P1, P2, P3, P4 y P5, representan el foco principal de contaminación del terreno estudiado. Estos suelos tienen un pH extremadamente bajo, la retención hídrica y su contenido de humedad también son muy bajos, estos parámetros son unos de los más importantes porque regulan la actividad y composición de la comunidad biótica del suelo, determinando el trabajo que debe realizar un organismo para mantener un nivel adecuado de agua y aire (Sagardoy y Mandolesi, 2004; Linares, 2011); por esto, se observó que todas las muestras contaminadas con hidrocarburos presentan un comportamiento similar en el gráfico.

Se puede corroborar al observar la Figura 37 que las muestras C1, C2, C3, C4 y C5, presentan un comportamiento distinto a las muestras contaminadas, pero similar entre ellas, ya que estas muestras se encontraban libres de contaminación.

Luego se realizó una correlación de los parámetros fisicoquímicos estudiados, con el contenido de hidrocarburos totales del petróleo, y el carbono orgánico total, así como también, con la materia orgánica extraída por Soxhlet y determinada por calcinación, a través de la determinación del coeficiente lineal de Pearson, al 95% de confianza, con el programa Past III. La correlación de Pearson se puede apreciar en la Tabla 26, las variables tienen correlación significativa si tienen un valor absoluto de 0,55 para el análisis estadístico empleado.

Tabla 26. Coeficiente Lineal de Pearson para las Variables Seleccionadas.

	CIC cmol/Kg	HTP (%)	pH	CE mS/cm	H (%)	MOE (%)	MO (%)	COT (%)	RH (%)
CIC cmol/Kg									
HTP (%)	-0,734								
pH	0,569*	-0,731							
CE (mS/cm)	-0,654	0,74*	-0,57						
H (%)	0,595*	-0,768	0,76*	-0,405					
MOE (%)	-0,747	0,98*	-0,75	0,778*	-0,736				
MO (%)	-0,634	0,64*	-0,74	0,5130	-0,774	0,659*			
COT (%)	-0,650	0,65*	-0,75	0,5203	-0,786	0,667*	0,999*		
RH (%)	0,813*	-0,908	0,86*	-0,775	0,818*	-0,918	-0,862	-0,871	

H= Contenido de Humedad, los valores con (*) tienen correlación positiva.

Como se puede observar en la Tabla 26, la capacidad de intercambio catiónico se correlaciona positivamente con el pH, la retención hídrica y el contenido de humedad, y negativamente con la conductividad eléctrica, contenido de hidrocarburos totales del petróleo, materia orgánica y carbono orgánico total. Esto indica que a medida que aumenta CIC, la CE, el HTP, MO, MOE y COT disminuyen, pero la RH, contenido de humedad y pH aumentan significativamente. También se observa que el contenido de humedad se correlaciona directamente con la retención hídrica y negativamente con la MOE, MO y COT. Además, la conductividad eléctrica

se correlaciona positivamente con la materia orgánica evaluada con el método de Soxhlet, e indirectamente con la retención hídrica.

El contenido de hidrocarburos totales del petróleo se correlaciona de forma directa con la CE, MOE, MO y COT, e indirectamente con el pH, H, RH; lo que quiere decir que a medida que aumenta el % HTP, también aumenta la CE, MO, MOE, COT y disminuyen significativamente el pH, el contenido y la retención de humedad. El pH se correlaciona positivamente con el contenido y la retención hídrica, son directamente proporcionales, si una de estas variables disminuyen las otras también reducen sus valores, a diferencia de la CE, MOE, MO y COT que aumentan sus valores ya que éstas variables se correlacionan negativamente con el pH.

La materia orgánica evaluada por Soxhlet se correlaciona positivamente con la materia orgánica determinada por calcinación y con el carbono orgánico total, y negativamente con la retención hídrica. Además la MO tuvo una correlación directa con el COT y negativamente con la retención de humedad. Mientras que el COT se correlaciona indirectamente con la RH.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- ❖ Los suelos que están ubicados en la zona del Mene de San Lorenzo, en Yaracal – Estado Falcón, presentan diversidad catabólica ya que los sustratos orgánicos fueron degradados.
- ❖ Los carbohidratos son los sustratos que presentan las menores respuestas de respiración, debido a que los azúcares son componentes fijos de los microorganismos del suelo, y por lo tanto su degradación catabólica es fija.
- ❖ Los ácidos carboxílicos, son los sustratos que se degradan más fácilmente, debido a que ocurre una descarboxilación oxidativa. Este proceso ocurre con frecuencia en sistemas biológicos.
- ❖ Los perfiles de respuesta de la respiración inducida por sustrato, mostraron que el suelo contaminado presentó mayores respuestas de respiración microbiana que los controles, con todos los sustratos carbonados adicionados a los suelos.
- ❖ El método fisiológico resultó ser bastante sensible a las modificaciones realizadas con cada sustrato, ya que se obtuvo una estimación efectiva de la capacidad de respuesta directa de las comunidades microbianas.
- ❖ Mediante el análisis de componentes principales, se obtuvieron dos componentes que describen el sistema satisfactoriamente con un 82,357% de variabilidad en la data original.
- ❖ La materia orgánica evaluada por Soxhlet presentó una correlación positiva con la materia orgánica determinada por calcinación, esto sugiere que las técnicas empleadas arrojan valores reproducibles.

- ❖ Las muestras contaminadas con crudo presentaron una disminución significativa en algunos parámetros fisicoquímicos tales como: pH, capacidad de intercambio catiónico, contenido de humedad y retención hídrica.
- ❖ Destaca la correlación significativa directa entre todos los sustratos carbonados usados, con el contenido de hidrocarburos totales del petróleo, conductividad eléctrica, materia orgánica evaluada por Soxhlet, materia orgánica determinada por calcinación y el carbono orgánico total; lo que sugiere que el crudo mediano en los suelos de la población de Yaracal, probablemente, no representa un efecto nocivo; corroborándose que se podría realizar algún tipo de mejora y recuperación de éstos suelos contaminados con hidrocarburos.

5.2. Recomendaciones

- ❖ Se sugiere, realizar un estudio con cultivos de especies vegetales para determinar el rendimiento de micronutrientes en el suelo en ambientes de contaminación, ya que es necesario considerar el efecto que tienen los hidrocarburos sobre la disponibilidad de micronutrientes para las plantas.
- ❖ Es aconsejable continuar la investigación de la diversidad microbiana de los suelos contaminados con crudo, mediante otras técnicas microbiológicas, tanto clásicas como moleculares, para obtener información más concreta al respecto.
- ❖ Se exhorta, plantear estudios de los suelos contaminados con petróleo, con muestreos periódicos en diferentes épocas del año, y determinar los distintos aspectos y características del suelo (físicas, químicas, biológicas y microbiológicas), para así obtener información más completa, y de esta forma corroborar los resultados obtenidos en este trabajo, para que puedan extrapolarse a mejores técnicas de manejo de los suelos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ **Acar, Y. B. and Alshawabkeh, A. N.** (1996). Electrokinetic remediaton 1. Pilot scalet test with Pb-spiked kaolinite. *J. Geotech. Eng.* 122:173-185.
- ❖ **Adams, R. H., Zabala, C. J. y Morales, G. F.** (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelos del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación. *Revista Interciencia.* 33:483-489.
- ❖ **Anderson, J. P.** (1982). Soil Respiration. In: Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. (A.L. Page, R H. Miller and D.R. Keeney eds.) Soil Science Society of America Number 9. SSSA, Madison, Wisconsin, USA, 831-871 pp.
- ❖ **Anderson, J. P. and Domsch, K. H.** (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10:215-221.
- ❖ **Anza, M., Mijangos, I., Urrutia, G., Epelde, L. y Garbisu, C.** (2014). Actividad y diversidad funcional de las comunidades microbianas edáficas en función del tipo de pasto y su manejo en el parque natural de Gorbeia. Documento en línea disponible en: <http://www.pastoscantabria2014.es/textos/comunidades/be10.pdf> (Consultado el 22 de enero del 2015).
- ❖ **Araujo, I., Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Ángulo, N., Morillo, G.** (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *INCI.* 31:268-275.
- ❖ **Argüelles, L.** (2006). Propiedades Químicas Del Suelo. Documento en línea disponible en: <http://html.monografias.com/propiedades-quimicas-del-suelo.html#>. (Consultado el 15 de Marzo del 2015).

- ❖ **Armado, A.** (2011). Parámetros Fisicoquímicos y Bioquímicos como Indicadores de la Actividad Microbiológica en Suelos Cacaoteros del Occidente de Venezuela. Tesis Doctoral en Biotecnología de los Microorganismos. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Mérida, Venezuela. 44-71 pp.
- ❖ **Arshad, M. and Coen, G.** (1992). Characterization of soil quality: physical and chemical criteria. *American J. of Alternative Agriculture*. 26:221-229.
- ❖ **Bandick, A. K. and Dick, R. P.** (1999). Field management effect on soil enzymes activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1471-1479.
- ❖ **Barrios, L. y Polychroniadis, C.** (2008). T.E.G. Evaluación del proceso de biorremediación de un suelo en la degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos empleando Bioestimulación. Laboratorio de PHD del Departamento de Química. Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería UC. Valencia, Venezuela. 43-59 pp.
- ❖ **Beltrán, P. O. I. y Vela, C. G.** (2006). Suelos contaminados con hidrocarburos y su efecto en la formación de agregados del suelo en la venta, Tabasco. Laboratorio de Edafología del Departamento El Hombre y su Ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco. *Calzada del hueso 1100. C. P. 04960*. Xochimilco, México. 3-6 pp.
- ❖ **Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M. C., and Wood, M.** (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating áreas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1785-1792.
- ❖ **Boulding, T. R.** (1994). Description and sampling of contaminated soils: A field manual. Lewis Publisher. 2nd ed. Bloomington. Indiana, USA. 3-65, 70 pp.

- ❖ **Bravo, S.** (2000). Aspectos Básicos de Química de Suelos. Ediciones de la Universidad Ezequiel Zamora, Colección Ciencia y Tecnología. Barinas, Venezuela. 45-59 pp.
- ❖ **Brissio, P. A.** (2005). Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera. Tesis de Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén, Argentina. 22 pp.
- ❖ **Buschmann, N.** (2000). Factores bióticos y abióticos control de la respiración del suelo en las tasas de Picea abies stands. *Biología del Suelo y Bioquímica*. 32:1625-1635.
- ❖ **Carter, M., Gregorich, E., Anderson, D., Doran, J., Janzen, H., and Pierce, F.** (1997). Concepts of soil quality and their significance. *En soil quality for crop production and ecosystem health*. 27:1237-1259.
- ❖ **Chang, S. X., Preston, C. M., and Weetman, G. F.** (1995). Soil microbial biomass and microbial and microbial and mineralizable N in a clear-cut chronosequence on northern Vancouver Island, British Columbia. *Canadian J. Forest Research*. 25:1595-1607.
- ❖ **Crosara, A.** (2008). Clase 3 MOS. Universidad de la República de Uruguay, Facultad de Ciencias. Disponible en línea <http://www.edafología.fcien.edu.uy/archivos/clase%203%20MOS.ppt> (Consultado el 22 de noviembre del 2014).
- ❖ **Degens, B. and Harrys, J.** (1997). Development of a Physiological Approach to Measuring the Catabolic Diversity of Soil Microbial Communities. Department of Environmental Sciences, University of East London, Romford Road, London, U.K, 15-25 pp.
- ❖ **Díaz, A.** (2006). Propuesta para uso de la Fitorremediación para la recuperación de áreas contaminadas por actividades petroleras, con especies vegetales existentes en el estado Monagas. Universidad Nacional Experimental de Guayana. Documento disponible en línea:

http://www.cidar.uneg.edu.ve/DB/bcuneg/EDOCS/TESIS/TESIS_POS_TGRADO/ESPECIALIZACIONES/TGETDD53O782006Antonio%20Diaz.pdf (Consultado el 17 de noviembre del 2014).

- ❖ **Elliott, E. T.** (1997). Rationale for developing bioindicators of soil health. En: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological Indicators of soil health*, CAB International. New York, USA, 49-57 pp.
- ❖ **Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Burrutia, O., and Garbisu, C.** (2008). Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology*, 39:299-310.
- ❖ **Evans, L. J.** (1989). Chemistry of metal retention by Soils. *Environmental Science and Technology*. 27:1046-1056.
- ❖ **Faithfull, N. T.** (2005). Métodos de análisis químico agrícola. *Manual práctico*. Ed. Acribia. España, 84, 91-114 pp.
- ❖ **Fernández, C., Llobregat, M., Jiménez, B., Altomare, V., Labrador, H.** (2008). Biodegradación de asfalto y resinas por microorganismos presentes en suelo contaminado con hidrocarburo. *Revista de la Facultad de Ingeniería UCV*. Caracas, Venezuela. 23:7-15.
- ❖ **Ferreiro, A.** (2003). Estructura, Propiedades y Comportamiento del Cuerpo Suelo. Catedra de Edafología. Facultad de Ciencias Agrarias. Bogota, Colombia. Capítulo XII. 103-105 pp.
- ❖ **Gaceta Oficial.** (1998). Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos. Decreto 2635. Gaceta Oficial Extraordinaria N° 5245 de la República de Venezuela. Imprenta Nacional. Caracas, Venezuela.
- ❖ **Galán, H. E y Romero, B. A.** (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Revista de la sociedad española de mineralogía*. Madrid, España, 10:48-60.

- ❖ **García, C., Hernández, T., Gil, F., Trasar, C.** (2003). Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. 311-343 pp.
- ❖ **García, A.** (2005). Propiedades del suelo. Propiedades fisicoquímicas. Reacción del Suelo. Edafología. Ciencias Ambientales. Universidad de Extremadura, facultad de ciencias, área de edafología y química agrícola. Documento en línea disponible en: <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL5PFQReaccion.htm> (Consultado el 10 de septiembre del 2014).
- ❖ **Gold, G., Cuerda, J., Font, J., Fullá, J.** (1998). Enciclopedia Autodidactica Océano grupo editorial S. A., Barcelona, España. 6:1441-1482.
- ❖ **Gregorich, E., Carter, M., Angers, D., Monreal, C., and Ellert, B.** (1994). Towards a minimum data set to asses soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian J. of Soil Science*. 2:436-487.
- ❖ **Guerrero, G.** (2010). T.E.G. Estudio de la actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos impactados con petróleo, ubicados en Yaracal estado Falcón. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 19-21 pp.
- ❖ **Ho, S. V., Athmer, C. J., Sheridan, P. W., and Shapiro, A. P.** (1997). Scale-up aspects of the LasagnaTM process for in situ soil decontamination. *J. Hazar. Mater.* 55:39-60.
- ❖ **INAMEH, (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología).** (2015). Documento en línea disponible en: <http://www.inameh.gob.ve/web/> (Consultado el 14 de junio del 2016).
- ❖ **Jackson, M. L.** (1970). Análisis químico de suelos. 2^a Ed. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 662-663 pp.

- ❖ **Jaramillo, D.** (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. 6-28 pp.
- ❖ **Kandeler, E., Gerfield E., and Soborick, M.** (1994). Microbial biomass, N mineralization and the activities of various enzymes in relation to nitrate leaching and root distribution in a slurry-amended glassland. *Biology and fertility of soil*. 18:7-12.
- ❖ **Karimi, S. L., Pickard, M. A., Gray, M. R.** (1996). Reactions of polinuclear aromatics hydrocarbons in soils. *Environ. Sci. Technol.* 30:1145-1151.
- ❖ **Karlen, D., Wollenhaupt, N., Erbach, D., Berry, E., Swan, J., Each, N., and Jordahl, J.** (1994). Crop residue effects on soil quality following 10-years of no-till corn. *Soil Tillage Research*. New York, USA. 3:43-65.
- ❖ **Krebs, L.** (2003). Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Barcelona, España. 28-33 pp.
- ❖ **Larousse** (2012). Diccionario enciclopédico el Pequeño Larousse Ilustrado Ediciones Larousse, S. A. de C. V., México D.F, México. 947 pp.
- ❖ **Linares, D.** (2011). T.E.G. Diversidad Catabólica como Bioindicador de la Calidad en Suelos ubicados en el sector el Ereigüe, San Joaquín, estado Carabobo. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 10-60 pp.
- ❖ **Llitjos, A. y Molera** (1995). Estudio de cuatro adaptaciones escolares de método de observación y determinación de la textura del suelo. *Revista de la asociación española para la enseñanza de las ciencias de la tierra*. 3:35-39.

- ❖ **Loveland, P. y Webb, J.** (2003). Is there a critical level of organic matter in the agricultural soils of temperate regions: review. *Soil Till.* 70:1-18.
- ❖ **Luyando, L.** (2014). T.E.G. Evaluación de indicadores de calidad en respuesta a la aplicación de lodos papeleros como enmienda orgánica en suelos agrícolas. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 12-23 pp.
- ❖ **MAPA** (1994). Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riego. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 27 pp.
- ❖ **Martínez, M. V. E. y López, S. F.** (2001). Efectos de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. Universidad Autónoma Chapingo. *Revista Terra Latinoamericana*. Chapingo, México. 19:9-17.
- ❖ **Martínez, S.M J., Pérez, S. C., Tudela, M. L., Molina, R. J., Linares, M. P., Navarro, H. C., Vidal, O. J., Barberán, M. R., Mantilla, W., Tovar, F. P. J., Solano, M. A. M., Marimón, S. J., Agudo, J. I., Hernández, P. C.** (2005). Desertificación: Monitorización mediante indicadores de degradación química. Programa de iniciativa comunitaria INTERREG IIIB ESPACIO MEDOCC. Proyecto Desernet. Acción piloto Región de Murcia. Ed. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Murcia, España. 12-32 pp.
- ❖ **Matus, F. J. y Maire, G. C. R.** (2000). Relación entre la materia orgánica del suelo, textura del suelo y tasas de mineralización de carbono y nitrógeno. *Agric. Téc.* 60:112-12.
- ❖ **Meléndez, G.** (2003). Taller, Abonos Orgánicos “El proyecto NOS del CATIE/GTZ”. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica y la Cámara de Insumos Agropecuarios No Sintéticos. San José, Costa Rica. 3-12 pp.

- ❖ **Messarch, M. B. and Nies, L.** (1997). Modification of heterothropic plate counts for assessing the biorremediation potential of petroleum-contaminated soils. *Environ. Technol.* 18:639-646.
- ❖ **Método EPA 3540 C.** (1996). Soxhlet Extraction Revision 3. New York, USA. 12-14 pp.
- ❖ **Miller, N. J. y Miller, J. C.** (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. 4ta Edición. Prentice Hall. Madrid, España. 296 pp.
- ❖ **Nelson, K., Weinel, C., Paulsen, I., Dodson, R., Hilbert, H. y Holmes, M.** (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* New York, USA. 4:799-808.
- ❖ **Noguera, S.** (2010). T.E.G. Evaluación de metales en suelos contaminados por derrames de crudo en Yaracal, estado Falcón. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 1-61 pp.
- ❖ **Noguera, S. y Armado, A.** (2010). Evaluación de metales en suelos contaminados por derrames de crudo en Yaracal, estado Falcón, Venezuela. Documento en línea disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/32217/1/ac553.pdf> (Consultado el 17 de Noviembre del 2014).
- ❖ **Olarte, L.** (1979). Métodos analíticos de laboratorio de suelos. Instituto geográfico "Agustin Codazzi" 4^a Ed. Olarte, L. Editor. Bogota, Colombia. 662-663 pp.
- ❖ **Oropeza, J.** (2010). T.E.G. Diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con petróleo, provenientes de Yaracal, estado Falcón Venezuela. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 14-16 pp.

- ❖ **Parr, J., Papendick, R., Hornick, S., and Meyer, R.** (1992). Soil quality: attributes and relationships to alternative and sustainable agriculture. *American J. of Alternative Agriculture*. 2:168-180.
- ❖ **Pineda-Flores, G., Arguello, G., Lira-Galeana, C., Mesta-Howard, A.** (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation*. 15:145-151.
- ❖ **Plice, M. J.** (1948). Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Sociedad Americana de Ciencias del Suelo. Proc.* 14:413-416.
- ❖ **Porta, J., López, A. M., Roquero, C.** (1994). Degradación de suelos y calidad ambiental. En: *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 807, 263-265 pp.
- ❖ **Porta, J., López, M., Poch, R.** (2008). Introducción a la Edafología. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 263-285 pp.
- ❖ **Roberts, T. L. y Henry, J. L.** (2000). El muestreo de suelos: los beneficios de un buen trabajo. *Informaciones Agronómicas del cono Sur*. Buenos Aires, Argentina. 5-12 pp.
- ❖ **Rodríguez, O. J.** (1993). Métodos de muestreo. Casos prácticos. *Manual de la Universidad de Málaga, CIS*. Málaga, España. 16-27 pp.
- ❖ **Rosmig, D., Garlynd, M., Harris, R., and McSweeney, K.** (1995). How farmers assess soil health and quality. *J. Soil Water Conservation*. Indiana, USA. 20-26 pp.
- ❖ **Sagardoy, M., Mandolesi, M.** (2004). *Biología del suelo*. Universidad Nacional de Sur (UNS), Departamento de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. 22-26 pp.
- ❖ **Salafranca, L., Sierra, V., Núñez, M., Solanas, E. y Leiva, D.** (2005). Análisis estadístico mediante aplicaciones informáticas: SPSS,

Statgraphics, minitab y excel. Ediciones de la Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 59 pp.

- ❖ **Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., and Margesin, R. (1996).** Methods in Soil Biology. Springer-Vellag, Berlin Heidelberg, Alemania. 32-35 pp.
- ❖ **Schollenberger, C. J. and Simón, R. H. (1945).** Determination of Exchange capacity and exchangeable bases in soil-Amonium acetate method. *Soil sci.* 59:13-24.
- ❖ **Silva, C. (2004).** Adsorção competitiva de cadmio, cobre, níquel, e zinco em solos. Tesis Mestre em Agronomía, área de concentração: solos e nutrição de plantas. Piracicaba. São Paulo, Brasil. 77-79 pp.
- ❖ **Singer, M. and Ewing, S. (2000).** Soil Quality. En Handbook of Soil Science. (ed. Sumner, M. E.). CRC Press. Florida, USA. 15-18 pp.
- ❖ **SOIL SURVEY STAFF (SSS). (1999).** Soil Taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2a. Ed. Agriculture Handbook Nº 436. Soil Survey Staff. Washington, USA. 869 pp.
- ❖ **Sposito, G. (1989).** The chemistry of soils. Oxford University. New York., USA. 277 pp.
- ❖ **SQI- Soil Quality Institute. (1996).** Indicators for Soil Quality Evaluation. USDA Natural Resources Conservation Service. Prepared by the National Soil Survey Center in cooperation with The Soil Quality Institute, NRCS, USDA, and the National Soil Tilth Laboratory, Agricultural Research Service. USA. 32-38 pp.
- ❖ **Stotzky, G. (1965).** Microbial respiration. En: methods of soil analysis. Part 2 (Black, C.; Evans, D.; Ensminger, L.; White, J. and Clark, F., editores). American Society of agronomy, Madison, USA. 1550-1572 pp.

- ❖ **Suárez, Z.** (2010). T.E.G. Estudio de actividades enzimáticas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelos impactados con petróleo ubicados en Yaracal estado Falcón. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 37-39 pp.
- ❖ **TPH Criteria Working Group (TPHCWG).** (1998). Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series. Amherst Scientific Publisher, Amherst, Massachussets. USA. 1:2-5.
- ❖ **Vargas, G. A., Cuéllar, R. R., Dussán, J.** (2004). Biorremediación de residuos del petróleo. Documento en línea disponible en: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Biorremediacion.pdf> (Consultado el 17 de Noviembre del 2014).
- ❖ **Vera, M., Rosales, H. y Ureña, N.** (2000). Caracterización físico-química de suelos cacaoteros de la zona sur del lago de Maracaibo. *Rev. Geog. Ven.* Maracaibo, Venezuela. 41:257-270.
- ❖ **Walkley, A. and Black, I.** (1934). An examination of the Degtjaeff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:29-38.
- ❖ **Yanine, H. F.** (2010). Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja. Documento en línea disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2526/1/186260.2010.pdf> (Consultado el 28 de febrero del 2015).
- ❖ **Zamora, A., Ramos, J., Arias, M.** (2010). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. Documento disponible: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s131633612012000100002&script=sci_arttext (Consultado el 29 de noviembre del 2014).

- ❖ **Zavala, C. J., Gavi, R. R., Adams, S. H., Ferrera, C. D., Palma, L. D., Vaquera, H. Y. y Domínguez, E. J.** (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el activo cinco presidentes. *Revista Terra*. Tabasco, México. 23:293-302.
- ❖ **Zerpa, J.** (2012). T.E.G. Estudio de los Parámetros de Humificación en Suelos Contaminados con Residuos Sólidos Urbanos. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas. Departamento de Química, FACYT-UC. Valencia, Venezuela. 34-42 pp.
- ❖ **Zetina, L. R., Trinidad, S. A., Oropeza, M. J. L., Volke, H. V., Landois, P. L. L.** (2005). Relación bases intercambiables-Rendimiento de maíz en un cambisol dístrico con labranza, encalado y abono verde. *Revista Terra Latinoamericana*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 23:389-397.

APÉNDICE

Tabla 27. Datos para la determinación del pH y la conductividad eléctrica.

Muestras	Ph 1:2 agua	pH (Prom)	pH (Devest)	CE (mS/cm)	CE (Prom)	CE (Devest)
C1 (1)	5,15	5,015	0,1909188	0,2623	0,26875	0,00912
C1 (2)	4,88			0,2752		
C2 (1)	6,01	6,020	0,0141421	0,2315	0,2363	0,00671
C2 (2)	6,03			0,2410		
C3 (1)	5,58	5,530	0,0707106	0,1745	0,1619	0,01781
C3 (2)	5,48			0,1493		
C4 (1)	6,03	6,140	0,1555634	0,1127	0,1230	0,01456
C4 (2)	6,25			0,1333		
C5 (1)	5,41	5,360	0,0707106	0,2157	0,2304	0,02078
C5 (2)	5,31			0,2451		
P1 (1)	3,78	3,755	0,0353553	0,5994	0,6100	0,01499
P1 (2)	3,73			0,6206		
P2 (1)	4,39	4,290	0,1414213	1,1842	1,1531	0,04398
P2 (2)	4,19			1,1220		
P3 (1)	4,72	4,780	0,0848528	1,1541	1,13955	0,02057
P3 (2)	4,84			1,1250		
P4 (1)	4,49	4,470	0,0282842	0,6608	0,6616	0,00113
P4 (2)	4,45			0,6624		
P5 (1)	4,25	4,150	0,1414213	0,2754	0,2769	0,00212
P5 (2)	4,05			0,2784		

CE= Conductividad Eléctrica, Devest= Desviación Estándar, Prom= Promedio.

Tabla 28. Datos para la determinación del contenido de humedad.

Muestras	Masa Suelo (g)	Masa del Crisol (g)	Masa (g) 24h en Estufa	Masa (g) Agua Retenida	H (%)	H (%) (Prom)
C1	10,0348	32,1137	41,2932	0,8553	8,5233387	8,61912655
	10,0219	107,2179	116,3664	0,8734	8,7149143	
C2	10,0728	39,6701	48,9547	0,7882	7,8250337	7,80588185
	10,0286	16,6093	25,8570	0,7809	7,7867299	
C3	10,0715	36,0933	45,5597	0,6051	6,0080425	5,92164996
	10,0047	20,5231	29,9440	0,5838	5,8352574	
C4	10,0838	33,0123	42,3113	0,7848	7,7827803	7,73911610
	10,0306	30,5657	39,8244	0,7719	7,6954519	
C5	10,0859	32,0883	41,6185	0,5557	5,5096719	5,41300469
	10,0652	44,3762	53,9063	0,5351	5,3163374	
P1	10,0324	43,4839	53,2911	0,2252	2,2447270	2,79894518
	9,2957	101,269	110,253	0,3117	3,3531632	
P2	10,0297	93,2043	102,661	0,573	5,7130322	5,88866167
	10,0325	103,0883	112,5124	0,6084	6,0642910	
P3	10,0837	93,9377	103,6134	0,408	4,0461338	4,01484358
	10,0689	90,3544	100,0222	0,4011	3,9835533	
P4	10,0323	46,3739	56,0222	0,384	3,8276367	3,91619644
	10,0081	47,3002	56,9075	0,4008	4,0047561	
P5	10,0387	92,4465	102,1705	0,3147	3,1348680	2,76241699
	10,0378	16,6083	26,4062	0,2399	2,3899659	

H= Contenido de Humedad.

Tabla 29. Datos para la determinación de la retención hídrica.

Muestras	Masa Suelo (g)	Masa del Embudo Vacío (g)	Embudo Lleno (g)	Masa (g) Agua Retenida	RH (%)	RH (%) (Prom)	RH (Devest)
	15,2700	8,9277	25,6929	1,4952	9,79		
P1	15,1063	9,1905	25,7749	1,4781	9,78	7,9894390	3,1155542
	15,5832	9,0870	25,3546	0,6844	4,39		
	15,0084	9,1995	31,8029	7,5950	50,60		
C1	15,119	9,1627	31,7317	7,4500	49,28	49,972659	0,6669732
	15,3074	9,1522	32,119	7,6594	50,04		
	15,1917	9,1545	25,4837	1,1375	7,49		
P2	15,1676	9,1216	25,2093	0,9201	6,07	6,2646462	1,1368445
	15,2555	9,1274	25,1823	0,7994	5,24		
	15,6103	9,1715	32,5476	7,7658	49,75		
C2	15,0333	9,2250	31,7159	7,4576	49,61	49,429560	0,4352797
	15,4391	9,1367	32,1307	7,5549	48,93		
	15,2986	9,0356	25,2988	0,9646	6,31		
P3	15,2791	9,0412	25,8641	1,5438	10,10	8,0029286	1,9312669
	15,2481	9,1918	25,5987	1,1588	7,60		
	15,4147	9,1528	32,1804	7,6129	49,39		
C3	15,5848	9,2601	32,2794	7,4345	47,70	48,697239	0,8819917
	15,0187	9,1045	31,4825	7,3593	49,00		
	15,5514	9,0604	25,0924	0,4806	3,09		
P4	15,1784	9,0780	25,4238	1,1674	7,69	6,6458674	3,1650358
	15,1507	9,1200	25,6579	1,3872	9,16		
	15,261	9,0731	32,1284	7,7943	51,07		
C4	15,4545	9,1344	32,4628	7,8739	50,95	50,907409	0,1900958
	15,2002	9,1586	32,0653	7,7065	50,70		
	15,0236	9,175	25,7648	1,5662	10,42		
P5	15,2029	9,1293	25,3678	1,0356	6,81	9,0883199	1,9814295
	15,1224	9,1423	25,7812	1,5165	10,03		
	15,4656	9,1392	31,6417	7,0369	45,50		
C5	15,232	9,105	31,344	7,0070	46,00	46,181153	0,7859687
	15,1941	9,1723	31,5139	7,1475	47,04		

RH= Retención de Humedad.

Tabla 30. Datos para la determinación de la materia orgánica del suelo por calcinación y el carbono orgánico total.

Muestras	Masa del Suelo (g)	Masa (g) luego 24h Estufa	Masa (g) luego 20h Mufla	MOS (%)	MOS (%) (Prom)	COT* (%)
C1	10,0348	41,2932	40,7801	5,11320604	5,3933904	3,1284167
	10,0219	116,3664	115,7978	5,67357487		
C2	10,0728	48,9547	48,4587	4,92415217	5,0262425	2,9154539
	10,0286	25,8570	25,3427	5,12833296		
C3	10,0715	45,5597	44,9262	6,29002631	6,5803985	3,8169364
	10,0047	29,9440	29,2566	6,87077073		
C4	10,0838	42,3113	41,7121	5,94220432	6,7769562	3,9309491
	10,0306	39,8244	39,0609	7,61170817		
C5	10,0859	41,6185	40,9508	6,62013305	6,2409571	3,6200447
	10,0652	53,9063	53,3163	5,86178118		
P1	10,0324	53,2911	52,1382	11,4917666	11,044031	6,4060510
	9,2957	110,253	109,268	10,5962972		
P2	10,0297	102,661	101,6645	9,93549159	9,4427021	5,4772054
	10,0325	112,5124	111,6145	8,94991278		
P3	10,0837	103,6134	102,6632	9,42312841	8,8118134	5,1112607
	10,0689	100,0222	99,1965	8,20049856		
P4	10,0323	56,0222	54,5833	14,3426731	13,884898	8,0538854
	10,0081	56,9075	55,5637	13,4271240		
P5	10,0387	102,1705	101,1858	9,80903901	9,9394873	5,7653638
	10,0378	26,4062	25,3954	10,0699356		

(*) Se estimó a través de la formula $\%COT = \%MOS / 1,724$.

Tabla 31. Datos para la determinación de la clase textural del suelo.

Muestras	Volumen 60 s (mL)	Sedimentado 10 min (mL)	H (arena) 60 s	H (limo) 10 min	T (Arena) 60 s	T (Limo) 10 min
C1	39	19	39	19	50,011489	7,8616352
	39	19				
C2	38	18	40	20	51,293835	8,27540549
	42	22				
C3	42	28	42	25	53,858527	10,3442568
	42	22				
C4	40	23	39	24	50,011489	9,93048659
	38	25				
C5	37	34	40	33	51,293835	13,6544190
	43	32				
P1	37	24	40	26	51,293835	10,7580271
	43	28				
P2	37	30	38	33	48,729143	13,6544190
	39	36				
P3	43	25	43	28,5	55,140873	11,7924528
	43	32				
P4	39	23	39	25	50,011489	10,3442568
	39	27				
P5	41	26	41	27	52,576181	11,1717974
	41	28				

Se Resolvió por la Ley de Stokes: $V = K \cdot r^2$, $T = H/V$ y con el Triángulo de las clases texturales, V = Velocidad de Sedimentación (cm/s^2), r = Radio de la partícula sedimentada, T = Tiempo de sedimentación, H = Altura.

Tomando en cuenta los siguientes diámetros y la constante a 25°C:			
d(mm) Arena=	0,088	d(mm) Limo=	0,02
K=	40280	a T= 25°C	

Tabla 32. Datos para la determinación de la materia orgánica por el método de Soxhlet y el contenido de hidrocarburos totales del petróleo.

Muestras	Masa Suelo (g)	Masa papel (g)	Masa Inicial (g)	Masa Final (g)	* Factor Humedad (g)	Masa Suelo Seco (g)	MOE (%)	MOE (%) (Prom)	HTP (%)
C1	10,3851	1,8798	12,2649	11,6075	0,08523	9,49994	6,9200	7,5085	N/A
	10,1509	1,8895	12,0404	11,2901	0,08714	9,26625	8,0971		
C2	10,2081	1,8966	12,1047	11,4191	0,07825	9,40931	7,2863	7,3520	N/A
	10,2351	1,8902	12,1253	11,4252	0,07786	9,43812	7,4177		
C3	10,2599	1,8538	12,1137	11,4654	0,06008	9,64348	6,7226	7,1947	N/A
	10,2044	1,8774	12,0818	11,3451	0,05835	9,60894	7,6668		
C4	10,6005	1,8938	12,4943	11,7944	0,07782	9,77548	7,1597	7,2996	N/A
	10,3699	1,8234	12,1933	11,4812	0,07695	9,57188	7,4394		
C5	10,4196	1,8223	12,2419	11,5219	0,05509	9,84551	7,3129	6,9177	N/A
	10,8231	1,8684	12,6915	12,0231	0,05316	10,24771	6,5224		
P1	10,1308	1,7995	11,9303	10,9345	0,02244	9,90339	10,0551	10,0154	2,50684
	10,2674	1,7899	12,0573	11,0674	0,03353	9,92311	9,9757		
P2	10,4874	1,9048	12,3922	11,2713	0,05713	9,88825	11,3356	10,1815	2,82946
	10,3467	1,8372	12,1839	11,3065	0,06064	9,71924	9,0274		
P3	10,3284	1,9094	12,2378	10,9541	0,04046	9,91050	12,9529	11,9758	4,78109
	10,2958	1,7749	12,0707	10,9834	0,03983	9,88565	10,9987		
P4	10,2807	1,8893	12,1700	11,2312	0,03827	9,88719	9,4951	9,4775	2,17787
	10,7631	1,7658	12,5289	11,5515	0,04004	10,33205	9,4598		
P5	10,4214	1,7969	12,2183	11,0291	0,03134	10,09470	11,7804	10,9391	4,02140
	10,3577	1,8489	12,2066	11,1857	0,02390	10,11015	10,0977		

Factor Humedad= Contenido de Humedad/100. (*) A partir de los datos de la Tabla 26.

(%) HTP= (%)MOE(Pozo) – (%)MOE(Control). N/A= No Aplica.

Masa Suelo Seco= (Masa Suelo-(Masa Suelo*Factor Humedad)).

Tabla 33. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la glucosa.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,4	18,9
	2	20,5	18,9
	3	20,4	18,9
P1	1	20,4	18,6
	2	20,4	18,6
	3	20,6	18,6
C2	1	20,4	18,4
	2	20,4	18,4
	3	20,6	18,4
P2	1	20,5	18,0
	2	20,6	18,0
	3	20,6	18,0
C3	1	20,7	18,1
	2	20,3	18,3
	3	20,3	18,3
P3	1	20,5	17,6
	2	20,7	17,6
	3	20,7	17,7
C4	1	20,4	18,6
	2	20,4	18,6
	3	20,7	18,6
P4	1	20,5	18,2
	2	20,5	18,2
	3	20,5	18,0
C5	1	20,7	18,7
	2	20,7	18,7
	3	20,5	18,7
P5	1	20,4	18,3
	2	20,4	18,2
	3	20,4	18,3
B		Prom=	21,1

B= Blanco. Prom= Promedio de los tres análisis de los blancos.

Tabla 34. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la sacarosa.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,4	20,4
	2	20,4	20,4
	3	20,7	20,4
P1	1	20,5	20,1
	2	20,7	20,1
	3	20,3	20,1
C2	1	20,5	20
	2	20,8	20,1
	3	20,5	19,9
P2	1	20,5	19,6
	2	20,7	19,6
	3	20,2	19,6
C3	1	20,4	20,2
	2	20,4	20,0
	3	20,4	20,2
P3	1	20,6	19,2
	2	20,5	19,2
	3	20,7	19,2
C4	1	20,5	19,9
	2	20,7	19,9
	3	20,5	19,9
P4	1	20,5	19,3
	2	20,8	19,3
	3	20,4	19,3
C5	1	20,5	20,1
	2	20,5	20,0
	3	20,5	20,1
P5	1	20,7	19,4
	2	20,7	19,4
	3	20,8	19,5
B		Prom=	22,5

Tabla 35. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la galactosa.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,6	20,9
	2	20,5	20,8
	3	20,4	20,6
P1	1	20,6	19,4
	2	20,7	19,4
	3	20,8	19,5
C2	1	20,5	19,7
	2	20,6	19,8
	3	20,8	19,8
P2	1	20,3	19,2
	2	20,5	19,3
	3	20,7	19,5
C3	1	20,5	20,8
	2	20,4	20,7
	3	20,3	20,6
P3	1	20,4	18,7
	2	20,5	18,8
	3	20,5	18,9
C4	1	20,6	20,4
	2	20,5	20,5
	3	20,4	20,5
P4	1	20,5	19,7
	2	20,5	19,6
	3	20,4	19,5
C5	1	20,4	19,8
	2	20,5	19,9
	3	20,7	19,9
P5	1	20,7	19,2
	2	20,6	19,2
	3	20,5	19,2
B		Prom=	23,4

Tabla 36. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la lactosa.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,9	19,8
	2	20,9	19,8
	3	20,6	19,8
P1	1	20,5	19,5
	2	20,8	19,6
	3	20,7	19,5
C2	1	20,7	19,7
	2	20,6	19,7
	3	20,9	19,7
P2	1	20,8	19,5
	2	20,7	19,5
	3	20,6	19,5
C3	1	20,7	19,8
	2	20,7	19,7
	3	20,9	19,7
P3	1	20,5	18,4
	2	20,9	18,5
	3	20,6	18,5
C4	1	20,6	19,3
	2	20,9	19,3
	3	20,4	19,6
P4	1	20,6	19,2
	2	20,5	19,1
	3	20,5	19,1
C5	1	20,7	19,7
	2	20,6	19,7
	3	20,4	19,8
P5	1	20,5	19,4
	2	20,9	19,4
	3	20,6	19,4
B		Prom=	21,8

Tabla 37. Datos para la determinación de la respiración microbiana del almidón.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,5	22,5
	2	20,7	22,5
	3	20,7	22,5
P1	1	20,6	21,0
	2	20,5	21,0
	3	20,6	21,0
C2	1	20,6	21,9
	2	20,7	21,6
	3	20,7	21,6
P2	1	20,6	20,4
	2	20,8	20,1
	3	20,8	20,1
C3	1	20,5	21,8
	2	20,5	21,6
	3	20,7	21,6
P3	1	20,9	18,3
	2	20,9	18,6
	3	20,8	18,6
C4	1	20,7	20,6
	2	20,5	20,6
	3	20,5	20,6
P4	1	20,7	20,0
	2	20,9	19,7
	3	20,9	19,7
C5	1	20,9	20,9
	2	20,5	20,8
	3	20,5	20,8
P5	1	20,5	19,2
	2	20,8	19,2
	3	20,8	19,1
B		Prom=	25,27

Tabla 38. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la celulosa microcristalina.

Muestras de Suelo	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,5	19,8
	2	20,5	19,8
	3	20,7	19,8
P1	1	20,4	19,3
	2	20,3	19,3
	3	20,4	19,3
C2	1	20,4	19,0
	2	20,4	19,0
	3	20,7	18,8
P2	1	20,6	18,4
	2	20,6	18,4
	3	20,7	18,5
C3	1	20,3	18,8
	2	20,3	18,8
	3	20,4	19,0
P3	1	20,3	18,2
	2	20,3	18,2
	3	20,4	18,2
C4	1	20,4	18,9
	2	20,4	18,9
	3	20,7	19,0
P4	1	20,5	18,5
	2	20,5	18,5
	3	20,6	18,3
C5	1	20,4	19,0
	2	20,4	19,0
	3	20,4	19,3
P5	1	20,6	18,7
	2	20,6	18,7
	3	20,5	18,6
B		Prom=	23,8

Tabla 39. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la dextrina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,3	18,7
	2	20,3	18,7
	3	20,5	18,7
P1	1	20,5	18,4
	2	20,5	18,4
	3	20,6	18,4
C2	1	20,5	18,4
	2	20,5	18,4
	3	20,3	18,4
P2	1	20,7	18,2
	2	20,7	18,2
	3	20,3	18,2
C3	1	20,5	19,1
	2	20,5	19,1
	3	20,5	19,0
P3	1	20,4	18,5
	2	20,4	18,5
	3	20,5	18,4
C4	1	20,6	19,0
	2	20,6	19,0
	3	20,4	18,7
P4	1	20,4	18,3
	2	20,4	18,3
	3	20,7	18,4
C5	1	20,4	19,0
	2	20,4	19,0
	3	20,5	19,0
P5	1	20,3	18,7
	2	20,3	18,7
	3	20,7	18,7
B		Prom=	22,1

Tabla 40. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la difenilamina.

Muestras de Suelo	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,9	17,9
	2	20,7	17,9
	3	20,7	17,9
P1	1	20,8	17,6
	2	20,6	17,6
	3	20,6	17,6
C2	1	20,7	17,5
	2	20,9	17,5
	3	20,9	17,5
P2	1	20,8	17,1
	2	20,7	17,2
	3	20,7	17,2
C3	1	20,5	17,4
	2	20,8	17,7
	3	20,8	17,7
P3	1	20,9	16,8
	2	20,8	16,8
	3	20,9	16,8
C4	1	20,6	17,5
	2	20,7	17,5
	3	20,6	17,5
P4	1	20,9	17,2
	2	20,7	17,2
	3	20,7	17,2
C5	1	20,6	17,6
	2	20,8	17,6
	3	20,8	17,6
P5	1	20,7	17,3
	2	20,6	17,3
	3	20,7	17,3
B		Prom=	20,9

Tabla 41. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la úrea.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,5	19,8
	2	20,4	19,8
	3	20,3	19,8
P1	1	20,5	19,6
	2	20,5	19,6
	3	20,2	19,6
C2	1	20,4	19,7
	2	20,4	19,7
	3	20,7	19,7
P2	1	20,5	19,5
	2	20,3	19,5
	3	20,6	19,6
C3	1	20,7	19,6
	2	20,2	19,6
	3	20,4	19,6
P3	1	20,5	18,2
	2	20,6	18,2
	3	20,5	18,3
C4	1	20,6	19,6
	2	20,3	19,7
	3	20,3	19,6
P4	1	20,3	19,4
	2	20,4	19,4
	3	20,4	19,4
C5	1	20,7	19,8
	2	20,2	19,7
	3	20,3	19,8
P5	1	20,5	19,5
	2	20,5	19,5
	3	20,3	19,5
B		Prom=	25,1

Tabla 42. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la trietanolamina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,6	18,9
	2	20,7	19,0
	3	20,8	18,9
P1	1	20,8	18,7
	2	20,7	18,7
	3	20,8	18,7
C2	1	20,3	18,9
	2	20,6	18,9
	3	20,7	18,9
P2	1	20,7	18,6
	2	20,6	18,6
	3	20,8	18,7
C3	1	20,7	18,8
	2	20,6	18,8
	3	20,5	18,8
P3	1	20,4	17,9
	2	20,5	17,9
	3	20,4	17,9
C4	1	20,7	18,9
	2	20,6	18,9
	3	20,7	18,9
P4	1	20,8	18,7
	2	20,5	18,7
	3	20,6	18,7
C5	1	20,5	18,8
	2	20,6	18,8
	3	20,7	18,8
P5	1	20,7	18,6
	2	20,5	18,5
	3	20,6	18,5
B		Prom=	22,3

Tabla 43. Datos para la determinación de la respiración microbiana del etanol.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,2	21,2
	2	20,2	21,3
	3	20,2	21,2
P1	1	20,8	20,9
	2	20,6	20,8
	3	20,8	20,8
C2	1	20,2	20,4
	2	20,3	20,4
	3	20,8	20,5
P2	1	20,4	19,5
	2	20,6	19,3
	3	20,7	19,4
C3	1	20,7	20,5
	2	20,6	20,3
	3	20,3	20,4
P3	1	20,2	18,6
	2	20,6	18,7
	3	20,5	18,6
C4	1	20,4	20,7
	2	20,6	20,7
	3	20,4	20,7
P4	1	20,7	19,7
	2	20,6	19,6
	3	20,4	19,6
C5	1	20,2	20,3
	2	20,5	20,3
	3	20,7	20,3
P5	1	20,6	20,1
	2	20,3	20,0
	3	20,5	20,0
B		Prom=	24,2

Tabla 44. Datos para la determinación de la respiración microbiana del tris(hidroximetil)aminometano.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,3	20,5
	2	20,3	20,5
	3	20,4	20,7
P1	1	20,2	19,8
	2	20,2	19,8
	3	20,3	19,9
C2	1	20,4	20,2
	2	20,4	20,2
	3	20,4	20,1
P2	1	20,5	19,6
	2	20,3	19,5
	3	20,3	19,5
C3	1	20,3	20,6
	2	20,3	20,6
	3	20,5	20,3
P3	1	20,4	18,8
	2	20,4	18,8
	3	20,8	18,9
C4	1	20,5	20,7
	2	20,5	20,7
	3	20,5	20,5
P4	1	20,4	19,7
	2	20,4	19,7
	3	20,4	19,6
C5	1	20,4	19,9
	2	20,2	19,8
	3	20,2	19,8
P5	1	20,7	19,1
	2	20,2	19,0
	3	20,2	19,0
B		Prom=	24,7

Tabla 45. Datos para la determinación de la respiración microbiana del butanol.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,4	18,1
	2	20,4	18,1
	3	20,3	18,1
P1	1	20,3	17,9
	2	20,3	17,9
	3	20,4	17,9
C2	1	20,5	17,6
	2	20,8	17,6
	3	20,3	17,6
P2	1	20,5	17,5
	2	20,8	17,4
	3	20,3	17,4
C3	1	20,6	17,9
	2	20,7	18
	3	20,5	17,8
P3	1	20,5	17,3
	2	20,5	17,3
	3	20,6	17,3
C4	1	20,5	17,7
	2	20,5	17,7
	3	20,6	17,7
P4	1	20,5	17,5
	2	20,5	17,5
	3	20,8	17,5
C5	1	20,5	18
	2	20,5	18,1
	3	20,8	17,9
P5	1	20,6	17,8
	2	20,6	17,8
	3	20,7	17,8
B		Prom=	25,27

Tabla 46. Datos para la determinación de la respiración microbiana del metanol.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,5	20,2
	2	20,6	20,2
	3	20,5	20,2
P1	1	20,8	19,3
	2	20,8	19,3
	3	20,5	19,3
C2	1	20,5	19,9
	2	20,5	19,9
	3	20,6	20,1
P2	1	20,5	19,4
	2	20,5	19,4
	3	20,2	19,4
C3	1	20,6	19,9
	2	20,6	19,8
	3	20,5	19,8
P3	1	20,3	17,3
	2	20,3	17,1
	3	20,4	17,1
C4	1	20,3	19,7
	2	20,3	19,5
	3	20,4	19,4
P4	1	20,3	19
	2	20,3	19,1
	3	20,2	19,1
C5	1	20,7	19,8
	2	20,7	19,6
	3	20,5	19,6
P5	1	20,5	18,7
	2	20,5	18,7
	3	20,5	18,5
B		Prom=	25,33

Tabla 47. Datos para la determinación de la respiración microbiana del etilenglicol.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,7	19,2
	2	20,6	19,2
	3	20,6	19,2
P1	1	20,6	18,8
	2	20,5	18,8
	3	20,5	18,8
C2	1	20,5	18,9
	2	20,4	18,9
	3	20,4	18,9
P2	1	20,6	18,7
	2	20,7	18,7
	3	20,7	18,7
C3	1	20,5	18,5
	2	20,7	18,5
	3	20,7	18,5
P3	1	20,4	18,0
	2	20,3	17,9
	3	20,3	17,9
C4	1	20,7	18,8
	2	20,4	18,8
	3	20,5	18,8
P4	1	20,6	18,5
	2	20,3	18,5
	3	20,3	18,5
C5	1	20,5	18,7
	2	20,4	18,6
	3	20,4	18,6
P5	1	20,4	18,3
	2	20,5	18,3
	3	20,5	18,3
B		Prom=	23,2

Tabla 48. Datos para la determinación de la respiración microbiana del triptófano.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,3	20,6
	2	20,3	20,7
	3	20,3	20,7
P1	1	20,2	20,3
	2	20,6	20,4
	3	20,6	20,4
C2	1	20,5	20,4
	2	20,4	20,4
	3	20,5	20,4
P2	1	20,5	19,5
	2	20,5	19,6
	3	20,5	19,5
C3	1	20,4	20,4
	2	20,4	20,3
	3	20,4	20,4
P3	1	20,8	19,6
	2	20,8	19,4
	3	20,8	19,4
C4	1	20,7	20,3
	2	20,3	20,4
	3	20,5	20,4
P4	1	20,6	19,5
	2	20,5	19,5
	3	20,6	19,5
C5	1	20,8	20,5
	2	20,4	20,6
	3	20,4	20,5
P5	1	20,5	19,3
	2	20,8	19,4
	3	20,8	19,3
B		Prom=	25,1

Tabla 49. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la arginina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,2	18,7
	2	20,3	18,8
	3	20,1	18,8
P1	1	20,4	18,3
	2	20,1	18,3
	3	20,1	18,3
C2	1	20,3	18,8
	2	20,5	18,6
	3	20,5	18,6
P2	1	20,4	18,4
	2	20,5	18,4
	3	20,5	18,4
C3	1	20,1	18,6
	2	20,2	18,6
	3	20,1	18,6
P3	1	20,4	18,0
	2	20,5	18,1
	3	20,4	18,1
C4	1	20,3	18,6
	2	20,4	18,6
	3	20,3	18,6
P4	1	20,6	18,3
	2	20,5	18,4
	3	20,5	18,4
C5	1	20,4	19,0
	2	20,3	19,1
	3	20,3	19,2
P5	1	20,3	18,8
	2	20,2	18,7
	3	20,2	18,7
B		Prom=	27,1

Tabla 50. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la fenilalanina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,5	18,9
	2	20,5	18,9
	3	20,3	18,9
P1	1	20,5	18,7
	2	20,4	18,6
	3	20,4	18,6
C2	1	20,5	18,8
	2	20,5	18,8
	3	20,3	18,8
P2	1	20,3	18,6
	2	20,6	18,6
	3	20,5	18,6
C3	1	20,7	18,5
	2	20,6	18,4
	3	20,7	18,4
P3	1	20,7	17,8
	2	20,6	17,8
	3	20,4	17,9
C4	1	20,6	18,6
	2	20,3	18,6
	3	20,5	18,6
P4	1	20,6	18,4
	2	20,7	18,4
	3	20,4	18,4
C5	1	20,4	18,6
	2	20,6	18,7
	3	20,4	18,7
P5	1	20,3	18,5
	2	20,4	18,2
	3	20,6	18,3
B		Prom=	25,9

Tabla 51. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la glicina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,4	20,0
	2	20,5	20,0
	3	20,4	20,1
P1	1	20,5	19,8
	2	20,8	19,8
	3	20,3	19,8
C2	1	20,6	19,7
	2	20,4	19,7
	3	20,6	19,7
P2	1	20,7	19,5
	2	20,6	19,5
	3	20,7	19,5
C3	1	20,5	19,8
	2	20,3	19,8
	3	20,8	19,7
P3	1	20,5	18,9
	2	20,3	19,1
	3	20,7	19,1
C4	1	20,5	19,7
	2	20,5	19,7
	3	20,7	19,8
P4	1	20,5	19,4
	2	20,7	19,5
	3	20,7	19,4
C5	1	20,5	19,7
	2	20,4	19,7
	3	20,4	19,7
P5	1	20,5	19,4
	2	20,3	19,4
	3	20,4	19,4
B		Prom=	23,6

Tabla 52. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la histidina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,3	20,2
	2	20,4	20,2
	3	20,5	20,2
P1	1	20,4	19,8
	2	20,7	19,8
	3	20,5	19,8
C2	1	20,5	19,9
	2	20,4	19,9
	3	20,4	19,9
P2	1	20,6	19,7
	2	20,4	19,7
	3	20,3	19,7
C3	1	20,6	19,9
	2	20,3	20,0
	3	20,3	20,0
P3	1	20,4	19,1
	2	20,3	19,2
	3	20,7	19,2
C4	1	20,4	19,8
	2	20,5	19,9
	3	20,6	19,8
P4	1	20,6	19,6
	2	20,7	19,6
	3	20,5	19,5
C5	1	20,3	19,8
	2	20,5	19,7
	3	20,7	19,6
P5	1	20,3	19,4
	2	20,4	19,4
	3	20,6	19,4
B		Prom=	24,2

Tabla 53. Datos para la determinación de la respiración microbiana de la tirosina.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,8	18,3
	2	20,6	18,5
	3	20,7	18,4
P1	1	20,8	18,1
	2	20,6	18,1
	3	20,6	18,1
C2	1	20,6	18,4
	2	20,8	18,4
	3	20,7	18,3
P2	1	20,8	17,8
	2	20,6	17,9
	3	20,8	17,9
C3	1	20,7	18,5
	2	20,6	18,3
	3	20,7	18,4
P3	1	20,4	17,5
	2	20,8	17,2
	3	20,7	17,4
C4	1	20,6	18,2
	2	20,5	18,3
	3	20,4	18,4
P4	1	20,7	18,0
	2	20,4	17,9
	3	20,8	18,0
C5	1	20,4	18,4
	2	20,6	18,4
	3	20,6	18,4
P5	1	20,6	18,0
	2	20,4	18,0
	3	20,6	18,0
B		Prom=	23,5

Tabla 54. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido cítrico hidratado.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,0	19,6
	2	20,0	19,6
	3	20,0	19,7
P1	1	20,1	19,4
	2	20,2	19,3
	3	20,1	19,3
C2	1	20,2	19,0
	2	20,1	19,0
	3	20,2	19,0
P2	1	20,3	18,7
	2	20,1	18,8
	3	20,3	18,7
C3	1	20,2	19,3
	2	20,1	19,3
	3	20,3	19,3
P3	1	20,1	17,7
	2	20,3	17,7
	3	20,0	17,8
C4	1	20,4	19,3
	2	20,5	19,3
	3	20,1	19,3
P4	1	20,3	19,0
	2	20,2	19,0
	3	20,3	19,0
C5	1	20,6	19,4
	2	20,6	19,4
	3	20,6	19,3
P5	1	20,5	18,6
	2	20,5	18,6
	3	20,6	18,6
B		Prom=	35,63

Tabla 55. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido oxálico dihidratado.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,6	18,4
	2	20,5	18,4
	3	20,5	18,4
P1	1	20,4	18,1
	2	20,5	18,1
	3	20,5	18,1
C2	1	20,3	18,1
	2	20,3	18,1
	3	20,3	18,2
P2	1	20,4	17,8
	2	20,5	17,7
	3	20,6	17,7
C3	1	20,3	18,2
	2	20,3	18,2
	3	20,3	18,1
P3	1	20,6	17,3
	2	20,5	17,3
	3	20,5	17,3
C4	1	20,7	18,1
	2	20,8	18,1
	3	20,7	18,1
P4	1	20,8	17,9
	2	20,7	17,9
	3	20,8	17,9
C5	1	20,5	18,2
	2	20,6	18,2
	3	20,5	18,2
P5	1	20,5	18
	2	20,6	18
	3	20,7	18
B		Prom=	33,4

Tabla 56. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido ascórbico.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,4	19,8
	2	20,5	19,8
	3	20,5	19,8
P1	1	20,7	18,8
	2	20,7	18,7
	3	20,7	18,8
C2	1	20,6	19,7
	2	20,6	19,8
	3	20,6	19,7
P2	1	20,7	18,8
	2	20,4	18,8
	3	20,5	18,6
C3	1	20,6	19,3
	2	20,6	19,2
	3	20,6	19,3
P3	1	20,8	18,1
	2	20,2	18,1
	3	20,5	18,1
C4	1	20,4	19,5
	2	20,4	19,6
	3	20,4	19,7
P4	1	20,4	18,3
	2	20,6	18,3
	3	20,5	18,2
C5	1	20,6	19,5
	2	20,5	19,6
	3	20,5	19,6
P5	1	20,4	19
	2	20,5	19,2
	3	20,5	19,2
B		Prom=	35,5

Tabla 57. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido acético.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,2	19,8
	2	20,2	19,9
	3	20,2	19,9
P1	1	20,4	19,5
	2	20,2	19,5
	3	20,2	19,5
C2	1	20,1	19,6
	2	20,3	19,6
	3	20,3	19,6
P2	1	20,5	19,2
	2	20,3	19,2
	3	20,3	19,2
C3	1	20,4	19,9
	2	20,2	19,8
	3	20,2	19,8
P3	1	20,3	18,3
	2	20,1	18,1
	3	20,1	18,1
C4	1	20,2	19,7
	2	20,1	19,8
	3	20,1	19,8
P4	1	20,1	19,3
	2	20,3	19,4
	3	20,3	19,4
C5	1	20,1	19,9
	2	20,2	19,8
	3	20,2	19,8
P5	1	20,3	19,4
	2	20,2	19,4
	3	20,2	19,4
B		Prom=	35,8

Tabla 58. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido ftálico.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,2	22,0
	2	20,1	22,1
	3	20,1	22,1
P1	1	20,1	21,3
	2	20,3	21,2
	3	20,3	21,2
C2	1	20,2	22,0
	2	20,2	21,8
	3	20,2	21,8
P2	1	20,1	19,7
	2	20,1	19,5
	3	20,1	19,5
C3	1	20,4	21,4
	2	20,2	21,3
	3	20,2	21,3
P3	1	20,1	18,8
	2	20,0	18,8
	3	20,1	18,8
C4	1	20,1	20,8
	2	20,2	20,9
	3	20,2	20,9
P4	1	20,2	19,4
	2	20,1	19,4
	3	20,1	19,4
C5	1	20,1	21,1
	2	20,1	21,4
	3	20,1	21,3
P5	1	20,1	19,1
	2	20,2	19,1
	3	20,2	19,1
B		Prom=	32,1

Tabla 59. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido salicílico.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,3	18,8
	2	20,3	18,8
	3	20,4	18,8
P1	1	20,5	18,6
	2	20,5	18,6
	3	20,6	18,6
C2	1	20,5	18,5
	2	20,5	18,5
	3	20,4	18,4
P2	1	20,6	17,3
	2	20,6	17,3
	3	20,8	17,3
C3	1	20,6	18,7
	2	20,6	18,7
	3	20,5	18,5
P3	1	20,4	17,3
	2	20,4	17,3
	3	20,6	17,3
C4	1	20,4	18,5
	2	20,4	18,5
	3	20,6	18,3
P4	1	20,4	18,0
	2	20,3	18,0
	3	20,4	18,0
C5	1	20,4	18,6
	2	20,4	18,6
	3	20,7	18,6
P5	1	20,6	18,3
	2	20,6	18,3
	3	20,5	18,3
B		Prom=	29,8

Tabla 60. Datos para la determinación de la respiración microbiana del ácido fumárico.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,1	20,5
	2	20,1	20,5
	3	20,4	20,5
P1	1	20,3	20,2
	2	20,3	20,2
	3	20,5	20,2
C2	1	20,3	19,8
	2	20,3	19,9
	3	20,1	19,9
P2	1	20,4	19,5
	2	20,4	19,5
	3	20,2	19,5
C3	1	20,4	20,3
	2	20,4	20,3
	3	20,5	20,3
P3	1	20,2	17,9
	2	20,1	17,9
	3	20,2	17,9
C4	1	20,6	20,5
	2	20,7	20,5
	3	20,6	20,5
P4	1	20,3	19,3
	2	20,2	19,3
	3	20,3	19,3
C5	1	20,3	20,4
	2	20,4	20,4
	3	20,3	20,4
P5	1	20,5	20,1
	2	20,5	20,1
	3	20,4	20,1
B		Prom=	30,5

Tabla 61. Datos para la determinación de la respiración microbiana del tartrato sódico de potasio.

Muestras	Nº de Muestras	Masa del Suelo (g)	Volumen de HCl (mL)
C1	1	20,6	20,9
	2	20,6	21,0
	3	20,5	20,9
P1	1	20,3	20,1
	2	20,3	20,1
	3	20,7	20,1
C2	1	20,5	20,3
	2	20,6	20,3
	3	20,5	20,3
P2	1	20,6	19,5
	2	20,6	19,5
	3	20,7	19,5
C3	1	20,6	20,3
	2	20,6	20,3
	3	20,4	20,3
P3	1	20,6	19,0
	2	20,5	19,0
	3	20,6	19,0
C4	1	20,5	20,2
	2	20,5	20,0
	3	20,5	20,1
P4	1	20,6	19,7
	2	20,6	19,6
	3	20,5	19,6
C5	1	20,6	20,4
	2	20,6	20,3
	3	20,5	20,3
P5	1	20,6	19,9
	2	20,6	20
	3	20,3	20
B		Prom=	25,5

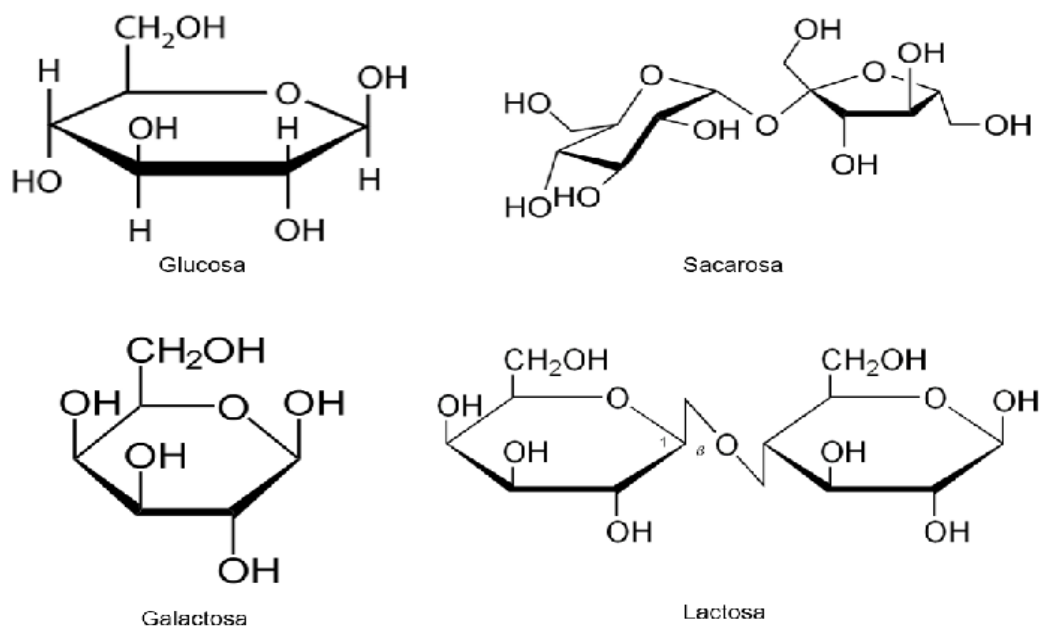


Figura 38. Estructuras químicas de los carbohidratos.

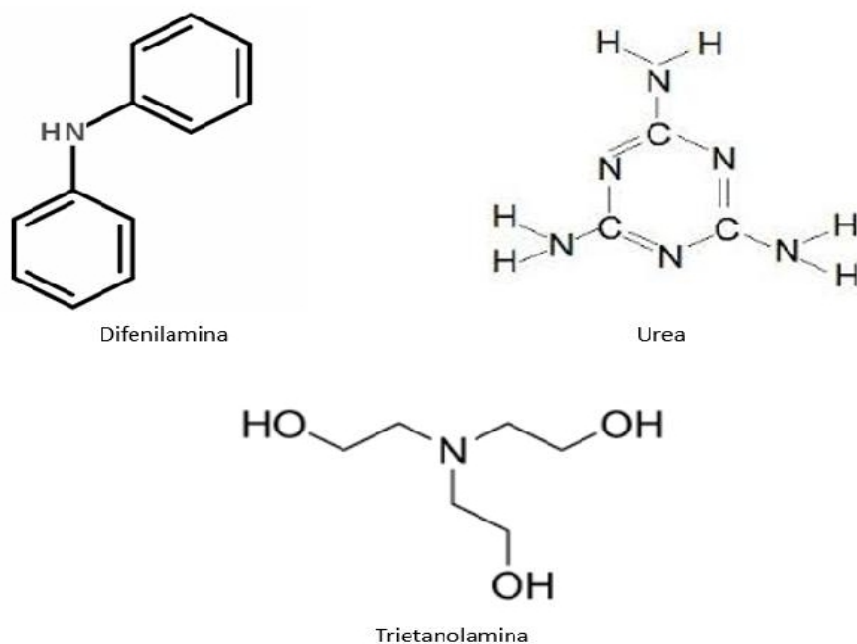
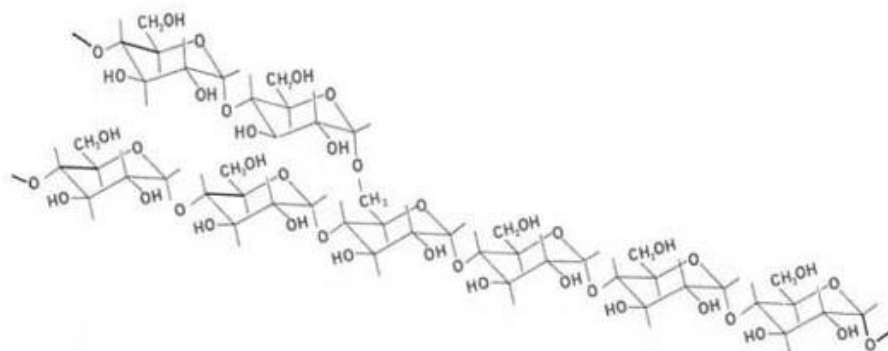
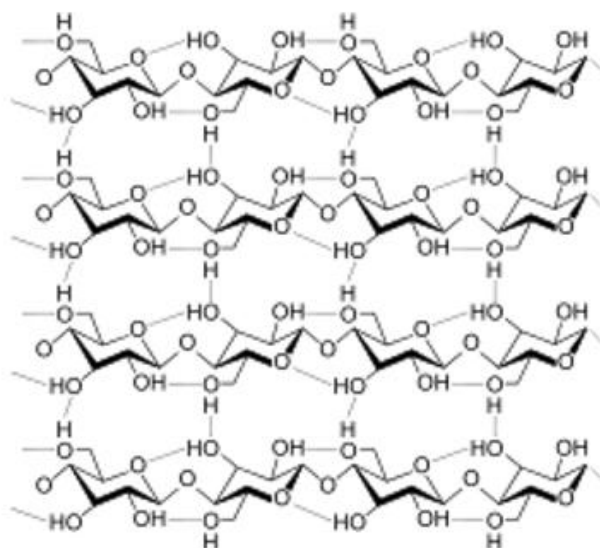


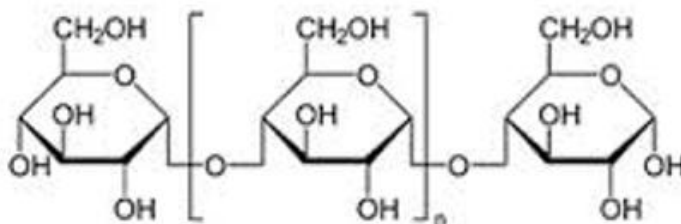
Figura 39. Estructuras químicas de las aminas y amidas.



Almidón

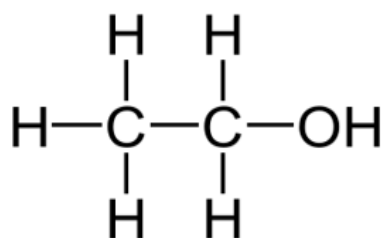


Celulosa

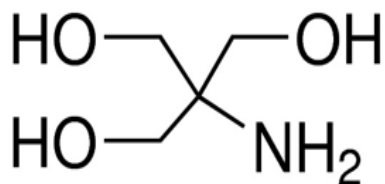


Dextrina

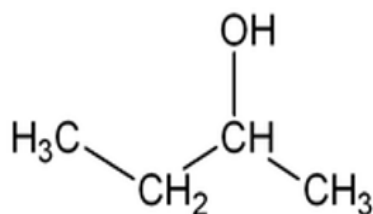
Figura 40. Estructuras químicas de los polímeros.



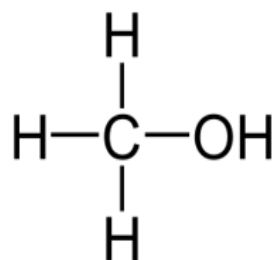
Etanol



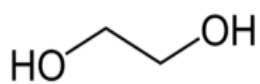
Tris (Hidroximetil) Aminometano



Butanol



Metanol



Etilenglicol

Figura 41. Estructuras químicas de los alcoholes.

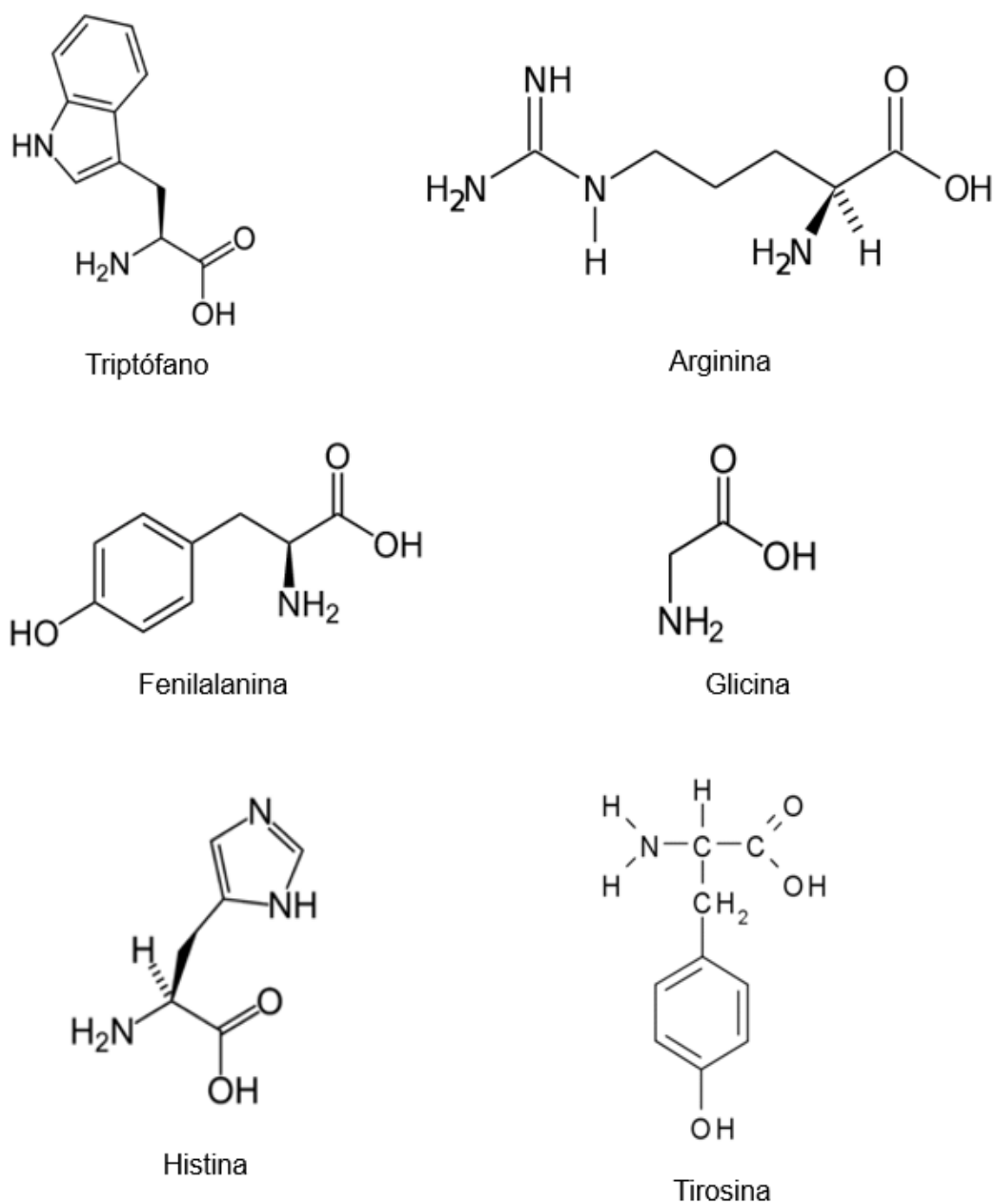


Figura 42. Estructuras químicas de los aminoácidos.

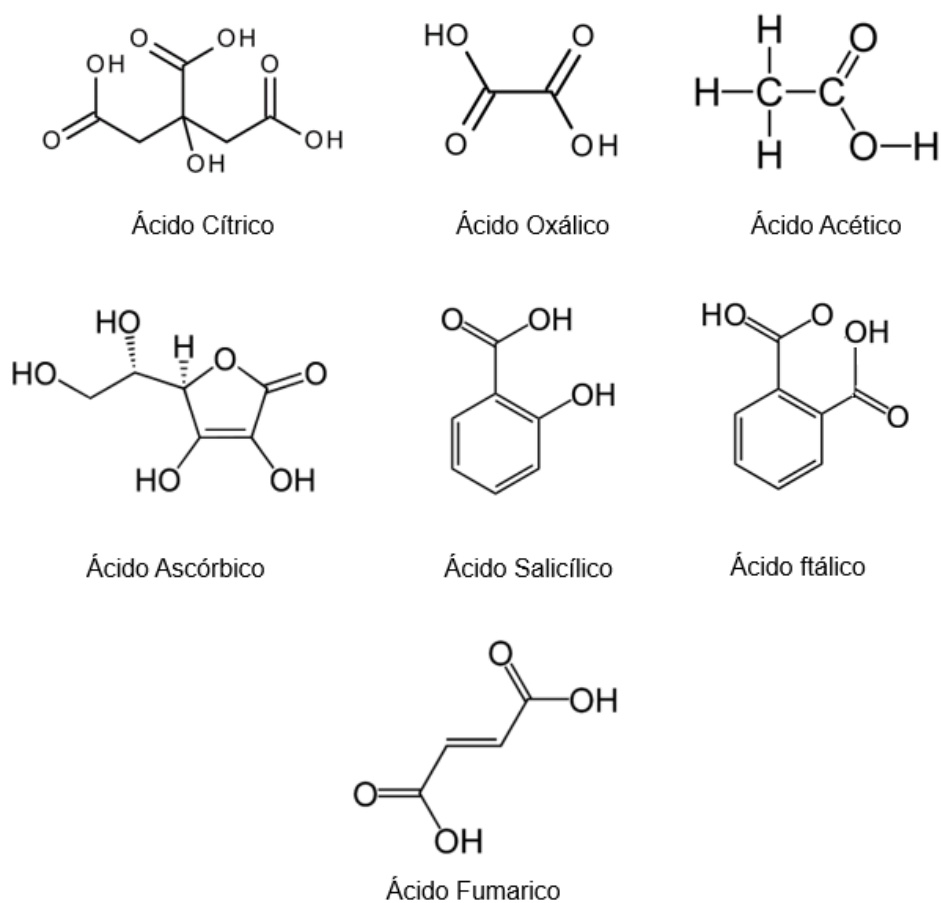


Figura 43. Estructuras químicas de los ácidos carboxílicos.

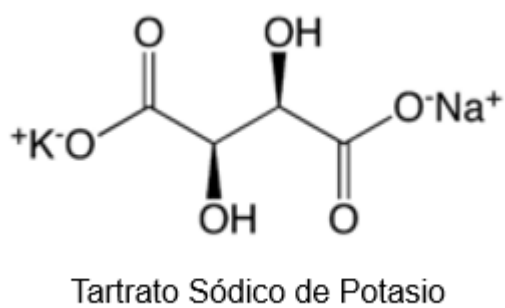


Figura 44. Estructura química del Tartrato Sódico de Potasio.