



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO PRESENTE
EN UN SUELO PROVENIENTE DE LA FAJA PETROLÍFERA DEL
ORINOCO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE
BIORREMEDIACIÓN Y LOMBRICULTURA**

Lic. Celeste Fernández (MSc)

Tutor académico

Lic. Henry Labrador (Dr)

Co-tutor académico

Ing. Leonardo Méndez

Tutor industrial

Autores:

Br. Bastidas Henry

C.I v-16.101.948

Br. Sien, Bonnie

C.I v-16.130.139

Valencia, abril de 2008



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado para estudiar el trabajo especial de grado titulado: **“EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO PRESENTE EN UN SUELO PROVENIENTE DE LA FAJA PETROLÍFERA DEL ORINOCO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN Y LOMBRICULTURA”**, realizado por los bachilleres Bastidas M. Henry R., CI v-16.101.948 y Sien M. Bonnie, CI v- 16.130.139, hacemos constar que hemos revisado y aprobado dicho trabajo y que no nos hacemos responsables de su contenido pero lo encontramos correcto en su forma y presentación.

Prof(a): Celeste Fernández

Presidente

Prof(a): Olga Martínez

Jurado

Prof: Henry Labrador

Jurado

Valencia, abril de 2008



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA



VEREDICTO

Nosotros los miembros del jurado calificador: Prof(a): Celeste Fernández (MSc), Prof(a): Olga Martínez y Prof: Henry Labrador, hacemos constar que el trabajo especial de grado titulado: **“EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO PRESENTE EN UN SUELO PROVENIENTE DE LA FAJA PETROLÍFERA DEL ORINOCO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN Y LOMBRICULTURA”**, realizado por los bachilleres Bastidas M. Henry R., CI v-16.101.948 y Sien M. Bonnie, CI v- 16.130.139, ha obtenido:

VEINTE PUNTOS (20) CON MENCIÓN HONORÍFICA

Valencia, abril de 2008

DEDICATORIA

A nuestros padres y hermanos que fueron la motivación principal para la ejecución de este trabajo.

Henry y Bonnie

AGRADECIMIENTOS

A Dios enormemente por todo!...

A mi mamá, la señora Carmen Jayaira Martínez de Bastidas ejemplo de compromiso, trabajo y entusiasmo y a mi papá el señor Anulfo Rafael Bastidas ejemplo de sabiduría y constancia. Gracias por el apoyo, esmero, sacrificio, dedicación, amor y bendiciones que me han ofrecido siempre.

A mis hermanos Roberto, Rodolfo e Ysmeller, por estar siempre pendientes de mí manifestándome su ayuda y apoyo incondicional en todo momento. Así como al resto de mi familia por brindarme constantemente su plena confianza.

Al Laboratorio de Química General, muy especialmente a los Prof. Neudis Subero, Nereida Sánchez, Yadira Martínez y Alfredo Castillo, por todas las enseñanzas y conocimientos impartidos, así como también a Edith y a Loida por todo el apoyo y la ayuda prestada.

Al Laboratorio de Química Analítica, de manera muy especial a las Prof. Doris Briceño, Maribel Moreno y Olga Martínez por los conocimientos, enseñanzas, experiencia y la ayuda ofrecida siempre, así como también a Luicelvy por toda la confianza y el apoyo brindado.

A todos los amigos, a Dalber (curso), Gusmary, Geral, María, Vicente, Tina, Joa, Mayrubis, Jessyca y a la Señora Damaris Rojas por adoptarme y ser mi segunda mamá... así como a mi compañera de tesis Eisenia por todas las atenciones, cuidado, ayuda y apoyo prestado en el desarrollo de este trabajo.

Gracias también a Paola que aunque no esté, siempre esta presente en mi corazón y en mis pensamientos.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma me ayudaron en la realización de este trabajo...

Muchas gracias!...

AGRADECIMIENTOS

Las primeras líneas de este agradecimiento se las quiero dedicar a un ser cuyo amor es infinito y no tiene límite, y que siempre ha llegado al corazón de quienes siempre más lo han necesitado y ese eres tu mi Dios. Te estoy eternamente agradecida porque nunca me abandonaste, porque siempre me enseñaste que existe un camino de luz y claridad, por darme las fuerzas y la paciencia necesaria para llegar a la meta. Y yo lo único que te quiero pedir es que sigas junto a mí y nunca me abandones.

A mis padres que aunque hoy por hoy ya no están conmigo, se que desde donde están nunca me desampararon y son mis ángeles guardianes.

A tí mamá gracias por ser tan única, porque gracias a tu educación, tus ideales y tus valores, me ayudaste a enfrentar las cosas dura que tiene la vida. Todavía recuerdo tus ultimas palabras "Cuidate mucho hija porque mañana no estaré aquí para cuidarte y sobre todo estudia mucho porque eso es lo máspreciado que te quedará"; la verdad es que estas palabras nunca las he olvidado y las llevare por todos los días de mi existencia conmigo, y solo espero que desde donde estés te sientas muy feliz y orgullosa de ver que el sueño en común que siempre hemos tenido tu y yo, hoy se esta haciendo realidad. Espero no haberte defraudado y haberlo hecho bien. Quisiera seguir escribiendo todos los agradecimientos que tengo para tí pero de hacerlo creo que nunca terminaría porque tu eres y te mereces más que estas pocas líneas que te estoy dedicando, y lo digo así porque tu para mí eres lo máximo.

A mi papá porque siempre me apoyo en mis estudios y porque a pesar de todas las cosas que te pasaron siempre me diste el mejor ejemplo y concepto de la vida.

A mis vecinos que son una molleja de familia gracias por todo el apoyo que me han dado y espero que lo sigan haciendo.

A Mana te agradezco muchísimo por todo lo que me haz cuidado, regañado, etc.... Gracias, gracias, gracias...

A mi Palita bella yo creo que no me va a alcanzar la vida para agradecer todo lo bella persona que haz sido conmigo! De verdad que gracias por todo el apoyo que me haz dado y por ser una súper hermana y sobre todo por ser toda una inspiración y ejemplo a seguir. Te quiero mucho...

A La Rata de Nando por ser tan lindo conmigo y por siempre apoyarme en mis cosas!! Pero sabes que? Bañate... Jejeje...

A ti Yaniris gracias por las palabras y los consejos que alguna vez me diste para que no dejará mi carrera, y al igual que la palita tu para mí eres toda una inspiración.

Y al resto de la familia (Facho, José, Yesenia, Yoel, Marisabel, Sabrina, etc)..... Muchas gracias.

Y a mis súper amigos (Frاندina, Papi papi, Mamí mamá, Davenio, Magda, Rodrigo, Emily y familia, Tony, María de los Angeles, Marluy, Jeny, Jhony, Kevin, Rafael, Daniel, Vanessa y familia, Luis Miguel, Ángel (mi gordo lindo), Indira, Sahel, Sikiu, y Yacsi que son mis lindas kache, Hugo Hernández, Reimer Romero, Dayana, Mi beto) gracias por regalarme su honestidad, sinceridad y por recordarme todos los días lo bonito de la amistad y de la bendición de tenerlos a ustedes. Me disculpo si en la lista que nombre me faltó gente, pero les digo algo "Quizás me haya olvidado colocarlos en esta lista, pero de lo que si estoy segura es que están siempre en mi corazón. Los quiero a todos.

Y para finalizar porque sino mi Foétido me va a matar.... Te dedico este párrafo a tí mi Henry. Gracias por enseñarme "que hoy podemos ser mejor que el ayer y mañana mejor que hoy". Gracias por tenerme tanta paciencia, por compartir tantos momentos gratos. Y sabes yo te defino a tí con estas palabras que son: Excelencia, constancia, dedicación, admiración y etc.....Espero que en un futuro muy pero muy cercano la vida me de la oportunidad de volver compartir y emprender un nuevo proyecto de trabajo contigo. Y te digo algo de volver a nacer y estudiar deseo que tú seas mi compañero de tesis otra vez. Te quiere mucho tu Eisenia.

De verdad que estas dos páginas se quedaron cortas con respecto a la gran cantidad de personas especiales que me faltó por agradecer así que GRACIAS a todos...

Queremos además agradecer:

A la Prof. Celeste Fernández por ser una madre y amiga incondicional, por el apoyo que en todo momento nos brindó. Simplemente queremos decirle que su sencillez y humildad es base de todos los éxitos que hoy obtiene. Muchas gracias...

Al Prof. Henry Labrador gracias por compartir con nosotros su amistad, conocimientos, por ser nuestro padre guía en este proyecto, por siempre haber estado pendiente de todas las cosas que estuvimos realizando. Y sobre todo por darnos siempre su infinito apoyo. Y sabe que? Fue para nosotros un gran honor y privilegio el haber trabajado con usted... Esperamos que el trabajo que hemos realizado haya cubierto todas sus expectativas.

Al Ing. Leonardo Méndez gracias por compartir este tema de tesis con nosotros, ya que gracias a usted hemos adquirido nuevos conocimientos en el área de la ingeniería química.

Al Sr. Luis García quien es el técnico de la unidad de Lombricultura del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay. Gracias por toda la ayuda ofrecida.

A la Prof Vanessa Altomare muchísimas gracias por todo los materiales y reactivos que nos facilitó, ya que gracias a ellos logramos realizar gran parte de nuestros experimentos, así como también al asistente del Laboratorio de Química Orgánica Mario Rossi.

A la Unidad de Microbiología Ambiental muchísimas gracias por toda la ayuda prestada al Dr. Luis Medina y a su equipo de trabajo Noja y Fernando.

A la Facultad de Ciencias Y Tecnología y su gente (Sr. Víctor Pérez, Prof. Daniel, señoras del Dpto de limpieza) muchísimas gracias por el apoyo y por prestarnos sus instalaciones los cuales hicieron este proyecto realidad.

De las personas que nombramos de la lista de FACYT nos faltó nombrar a alguien. Pero sabes porque no te quisimos colocar en esa lista? Porque pensamos que te mereces todo un párrafo dedicado exclusivamente para ti y esa eres tú nuestra pequeña saltamonte, Yuri Navas. Gracias por ser tan buena amiga, por compartir todos tus conocimientos con nosotros y porque gran parte de este proyecto es una realidad gracias a ti. Te estamos eternamente agradecidos.

A FONACYT gracias por la sílice gel que nos aportaron de no ser por ello no hubiésemos terminado nuestras cromatografías de columnas a tiempo.

Finalmente para terminar queremos agradecer a todos aquellos que en algún momento nos brindaron alguna ayuda y colocaron su granito de arena para que el proyecto se realizara con mucho éxito. MUCHAS GRACIAS...

 ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
Introducción-----	1
CAPÍTULO I: Planteamiento del problema -----	2
1.1 Descripción del problema-----	3
1.2 Formulación del problema-----	5
1.2.1 Situación actual-----	5
1.2.2 Situación deseada-----	6
1.3 Objetivos-----	6
1.3.1 Objetivo general-----	6
1.3.2 Objetivos específicos-----	6
1.4 Justificación-----	7
1.5 Limitaciones-----	8
CAPÍTULO II: Marco teórico -----	9
2.1 Antecedentes-----	10
2.2 Bases teóricas-----	17
2.2.1 El suelo-----	17
2.2.1.1 Estructura y componentes del suelo-----	17
2.2.1.1.1 El componente sólido-----	17
2.2.1.1.2 La fase líquida-----	18
2.2.1.1.3 La fase gaseosa-----	18
2.2.1.2 Horizontes del suelo-----	18
2.2.1.2.1 Horizonte A-----	18
2.2.1.2.2 Horizonte B-----	18
2.2.1.2.3 Horizonte C-----	19
2.2.1.2.4 Horizonte D u horizonte R-----	19
2.2.1.3 Enmiendas del suelo-----	19
2.2.1.3.1 Cal viva-----	20
2.2.1.3.2 Cal apagada-----	20
2.2.1.3.3 Cal agrícola-----	20
2.2.1.3.4 Cal dolomítica-----	20
2.2.1.4 Textura del suelo-----	20
2.2.1.4.1 Arenoso-----	21
2.2.1.4.2 Arcilloso-----	21
2.2.1.4.3 Limoso-----	21
2.2.2 Composición del crudo de petróleo-----	21

2.2.2.1 Composición general-----	21
2.2.2.2 Principales tipos de petróleo crudo-----	22
2.2.2.2.1 Petróleos asfálticos-----	22
2.2.2.2.2 Petróleos parafínicos-----	22
2.2.2.2.3 Petróleos mixtos-----	23
2.2.2.3 Composición por familias de hidrocarburos-----	23
2.2.2.4 Parafinas volátiles-----	24
2.2.2.5 Parafinas no volátiles-----	24
2.2.2.6 Naftenos-----	25
2.2.2.7 Olefinas-----	25
2.2.2.8 Hidrocarburos aromáticos-----	25
2.2.2.8.1 Hidrocarburos monoaromáticos-----	26
2.2.2.8.2 Hidrocarburos poliaromáticos-----	26
2.2.2.9 Resinas y asfaltenos-----	26
2.2.3 Contaminación por hidrocarburos de petróleo-----	28
2.2.4 Biorremediación de desechos de petróleo-----	28
2.2.4.1 Bioestimulación-----	29
2.2.4.2 Bioaireación-----	29
2.2.4.3 Bioaugmentación-----	29
2.2.4.4 Compostaje-----	29
2.2.4.5 Fitorremediación-----	29
2.2.4.6 Landfarming-----	29
2.2.5 Organismos bacterianos-----	30
2.2.5.1 Estructura de una célula bacteriana-----	30
2.2.5.2 Curvas de crecimiento bacteriano-----	31
2.2.5.2.1 Fase de latencia-----	32
2.2.5.2.2 Fase de crecimiento logarítmico-----	32
2.2.5.2.3 Fase estacionaria-----	32
2.2.5.2.4 Fase endógena o de muerte-----	32
2.2.6 Tratamiento biológico de suelos contaminados con petróleo---	32
2.2.6.1 Parámetros microbiológicos-----	33
2.2.6.1.1 Fuentes de energía y de sustrato-----	33
2.2.6.1.2 Procesos enzimáticos-----	34
2.2.6.1.3 Biodegradabilidad del sustrato-----	35
2.2.6.1.4 Inhibición y toxicidad-----	35
2.2.6.1.5 Población microbiana-----	35
2.2.6.2 Parámetros técnicos-----	35
2.2.6.2.1 Aceptor electrónico-----	36

2.2.6.2.2 Humedad-----	36
2.2.6.2.3 Temperatura-----	36
2.2.6.2.4 Potencial de acidez-----	37
2.2.6.2.5 Nutrientes-----	37
2.2.7 Lombricultura-----	38
2.2.7.1 Epigeas-----	38
2.2.7.2 Endógeas-----	38
2.2.7.3 Anécicas-----	38
2.2.8 Tipos de lombrices-----	38
2.2.8.1 Roja californiana-----	38
2.2.8.2 Roja africana-----	38
2.2.9 La lombriz roja californiana-----	39
2.2.9.1 Clasificación zoológica-----	39
2.2.9.2 Características morfológicas-----	40
2.2.9.3 Aparato reproductor-----	42
2.2.9.3.1 Reproducción-----	43
2.2.10 El sustrato o estiércol-----	44
2.2.10.1 Humedad-----	45
2.2.10.2 Temperatura-----	45
2.2.10.3 Potencial de acidez-----	45
2.2.11 Tipos de sustratos-----	46
2.2.11.1 Estiércol equino-----	46
2.2.11.2 Estiércol de vaca-----	46
2.2.11.3 Estiércol de ternero-----	46
2.2.11.4 Estiércol de ovino-----	47
2.2.11.5 Estiércol de porcino-----	47
2.2.11.6 Estiércol de conejo-----	47
2.2.12 Características y propiedades del lombrihumus-----	47
2.2.12.1 Características del lombrihumus-----	47
2.2.12.2 Propiedades del lombrihumus-----	48
2.2.12.2.1 Propiedades químicas-----	48
2.2.12.2.2 Propiedades físicas-----	48
2.2.12.3 Importancia económica-----	49
2.2.13 Extracción de hidrocarburos totales de petróleo-----	49
2.2.14 Diseño de experimentos-----	50
2.2.14.1 Etapas del diseño de experimentos-----	50
2.2.14.2 Principios básicos del diseño de experimentos-----	51
2.2.14.3 Diseños para compra dos o más tratamientos-----	51

2.2.14.4 Análisis estadístico-----	52
2.2.14.4.1 Supuesto de normalidad-----	52
2.2.14.4.2 Supuesto de homogeneidad de varianzas-----	52
2.2.14.4.3 Supuesto de aleatoriedad-----	53
2.2.14.5 Comparación de medias-----	53
2.2.15 Análisis económico-----	54
2.2.15.1 Relación costo-beneficio-----	54
2.2.15.2 Estimaciones de costos-beneficios-----	55
2.2.15.3 Determinación de la viabilidad del proyecto-----	55
2.2.15.3.1 Retorno de inversión-----	55
2.2.15.3.2 Valor actual-----	56
CAPÍTULO III: Marco metodológico-----	57
3.1 Tipo de investigación-----	58
3.2 Determinación de las variables a monitorear durante el proceso-----	58
3.2.1 Selección de las variables-----	59
3.2.2 Diagrama causa-efecto-----	59
3.2.3 Matriz de selección-----	63
3.3 Determinación de las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso---	65
3.4 Obtención, caracterización y preparación del suelo-----	65
3.4.1 Obtención del suelo-----	65
3.4.2 Caracterización del suelo-----	66
3.4.3 Encalado del suelo-----	67
3.4.3.1 Determinación de la capacidad de saturación-----	67
3.4.3.2 Determinación de la densidad del suelo-----	68
3.4.3.3 Determinación de la cantidad de cal a añadir-----	69
3.4.3.4 Proceso de encalado del suelo-----	69
3.4.3.4 .1Medición del potencial de acidez-----	70
3.5 Obtención del petróleo crudo-----	71
3.6 Adaptación y supervivencia de la lombriz Eisenia foétida-----	72
3.6.1 Obtención de los especímenes de Eisenia foétida-----	72
3.6.2 Preparación de los biorreactores de prueba-----	73
3.6.3 Adición del sustrato-----	74
3.6.4 Inoculación de las lombrices-----	76
3.6.5 Conteo de macroorganismos-----	76
3.7 Caracterización del crudo Merey-----	77
3.7.1 Obtención de la fracción asfaltenos-----	77
3.7.2 Obtención de los maltenos-----	78
3.7.2.1 Obtención de la fracción saturada-----	80

3.7.2.2 Obtención de la fracción aromática-----	80
3.7.2.3 Obtención de la fracción resinas-----	80
3.8 Aplicación de las técnicas de biorremediación-----	82
3.8.1 Preparación del suelo contaminado-----	82
3.8.2 Determinación de los macroelementos en los biorreactores-----	83
3.8.3 Montaje de las unidades experimentales-----	85
3.8.4 Determinación de los HTP-----	89
3.8.5 Precipitación de asfaltenos-----	93
3.8.6 Fraccionamiento de maltenos-----	97
3.8.7 Análisis cromatográfico a la fracción saturada-----	99
3.8.8 Determinación del potencial de acidez-----	100
3.8.9 Determinación de la humedad relativa-----	101
3.8.10 Determinación de la carga bacteriana mesófila-----	103
3.8.11 Determinación de espectros de RMN-1H-----	103
3.9 Análisis estadístico-----	104
3.9.1 Inserción de los datos en el programa estadístico-----	104
3.9.2 Realización del análisis de varianza-----	105
3.9.3 Verificación de los supuestos del modelo-----	107
3.9.4 Comparación efectiva de los tratamientos-----	107
3.10 Análisis económico-----	108
CAPÍTULO IV. Análisis y discusión de resultados-----	110
4.1 Variables a monitorear durante el proceso de biorremediación-----	111
4.2 Caracterización y preparación del suelo-----	116
4.2.1 Análisis de la textura del suelo-----	116
4.2.2 Análisis de los macroelementos presentes en el suelo-----	117
4.2.3 Análisis de los factores abióticos de importancia en el suelo-----	119
4.2.4 Análisis del proceso de enclado del suelo-----	122
4.3 Determinación de la supervivencia y desarrollo de la Eisenia foétida-----	124
4.4 Caracterización del petróleo crudo-----	126
4.4.1 Fraccionamiento de asfaltenos-----	126
4.4.1.1 Análisis de espectros de RMN-1H de asfaltenos-----	126
4.4.2 Fraccionamiento de maltenos-----	127
4.4.2.1 Análisis de cromatogramas de fracción saturada-----	129
4.4.2.2 Análisis de RMN-1H de resinas-----	130
4.5 Evaluación y seguimiento de las técnicas de biorremediación aplicadas-----	132
4.5.1 Análisis de la caracterización de los agentes bioestimulantes-----	132
4.5.2 Análisis de las condiciones iniciales de nutrientes-----	133
4.5.3 Análisis de HTP y carga bacteriana-----	135

Índice general

4.5.3.1 Suelo patrón(atenuación natural)-----	137
4.5.3.2 Tratamiento con estiércol equino-----	138
4.5.3.3 Tratamiento con humus líquido-----	139
4.5.3.4 Tratamiento con macroorganismos de Eisenia foétida--	141
4.5.4 Análisis de las fracciones SARA-----	144
4.5.4.1 Análisis de hidrocarburos saturados-----	144
4.5.4.1 Análisis cromatográfico de tratamientos-----	145
4.5.4.2 Análisis de hidrocarburos aromáticos-----	147
4.5.4.3 Análisis de resinas-----	149
4.5.4.4 Análisis de asfaltenos-----	153
4.5.5 Análisis del potencial de acidez-----	159
4.5.6 Análisis de otros factores abióticos-----	160
4.5.6.1 Humedad relativa-----	160
4.5.6.2 Temperatura-----	161
4.5.6.3 Aireación-----	161
4.6 Análisis estadístico-----	161
4.7 Análisis económico-----	169
CONCLUSIONES -----	171
RECOMENDACIONES -----	173
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	174
APÉNDICES -----	180
APÉNDICE A: Cálculos típicos-----	180
APÉNDICE B: Tablas de datos y resultados-----	192
APÉNDICE C: Métodos instrumentales de análisis-----	205
APÉNDICE D: Análisis estadístico-----	212
APÉNDICE E: Análisis económico-----	216
APÉNDICE F: Normativa ambiental-----	227

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
2.1	Principales compuestos constituyentes para cada fracción del petróleo crudo-	22
2.2	Principales constituyentes de las parafinas no volátiles en la fracción de saturados del crudo-----	24
2.3	Valores aceptables de los diversos factores bióticos y abióticos necesarios para la aplicación de las técnicas de biorrecuperación-----	30
2.4	Fuentes primarias de carbono y energía para diversas clases de micro organismos-----	34
2.5	Rangos de temperatura óptimos para el desarrollo de diversos géneros de bacterias-----	37
2.6	Clasificación zoológica de la lombriz roja californiana (Eisenia foétida)-----	40
3.1	Valores de ponderado experto asignados a cada factor de interés y ponderación relativa de acuerdo a las ventajas que ofrezca-----	64
3.2	Condiciones establecidas para la realización de las cromatografías de gases a la fracción saturada del crudo merey-----	99
3.3	Especificaciones de la columna capilar empleada en la realización de la cromatografía de gases a la fracción saturada del crudo merey-----	100
3.4	Codificaciones utilizadas para la introducción de las variables de salida a ser analizadas por el programa Statistix 8.0-----	105
4.1	Matriz de selección empleada para escoger las variables a monitorear durante el proceso de degradación del crudo presente en el suelo-----	114
4.2	Condiciones ambientales óptimas para la biorremediación de los hidrocarburos-----	115
4.3	Análisis textural del suelo virgen empleado en el proceso de biorremediación-	116
4.4	Análisis de los macroelementos y materia orgánica presente del suelo virgen empleado en el proceso de biorremediación-----	118
4.5	Análisis de los factores abióticos de interés en el suelo virgen empleado en el proceso de biorremediación-----	119
4.6	Composición de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) del petróleo crudo empleado en el proceso de biorremediación-----	129
4.7	Caracterización del estiércol equino a emplear como bioestimulante en el proceso de biorremediación-----	132
4.8	Caracterización del humus líquido a emplear como bioestimulante en el proceso de biorremediación-----	133
4.9	Relación de nutrientes presentes en los diversos tratamientos al inicio de la experimentación-----	134

Índice de tablas

4.10	Comparación de los valores de significancia calculada y predefinida para las diversas variables de salida determinadas-----	163
4.11	Parámetros de eficiencia del diseño en bloques completos al azar para cada variable de salida determinada-----	165
4.12	Valores de la significancia calculada en la verificación del supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk-----	167
4.13	Costos relativos de los bioestimulantes empleados en los tratamientos durante el proceso de degradación-----	169
4.14	Relación costo-beneficio y tiempo de recuperación de la inversión para las alternativas evaluadas-----	170
B.1.1	Determinación de la capacidad de saturación del suelo virgen-----	193
B.1.2	Determinación de la densidad aparente del suelo virgen-----	193
B.1.3	Evaluación del potencial de acidez en el suelo luego del proceso de encalado con CaCO_3 -----	
-	-	194
B.1.4	Conteo de macroorganismos vivos (<i>Eisenia foétida</i>) en los biorreactores a pre-escala-----	194
B.1.5	Determinación de la masa de asfaltenos presentes en la caracterización del crudo merey-----	195
B.1.6	Caracterización de cada una de las fracciones de crudo mediante la aplicación de la prueba de SARA a la solución de maltenos obtenida a partir del crudo merey-----	195
B.1.7	Determinación de los hidrocarburos totales de petróleo de las muestras de suelo en cada biorreactor para el primer tiempo muestral-----	196
B.1.8	Masa total de máltenos y asfaltenos obtenidos después del proceso de filtración para la caracterización de las diversas fracciones de crudo a analizar a partir de las muestras de suelo en cada biorreactor para el primer tiempo muestral-----	197
B.1.9	Caracterización de cada una de las fracciones de crudo mediante la aplicación de la prueba de SARA a la solución de maltenos obtenida a partir de las muestras de suelo en cada biorreactor para el primer tiempo muestral-----	198
B.1.10	Determinación del potencial de acidez y humedad relativa en cada biorreactor para el primer tiempo muestral-----	199
B.1.11	Unidades formadoras de colonias de las muestras de suelo en cada biorreactor para el primer tiempo muestral-----	200
B.2.1	Hidrocarburos totales de petróleo para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	200
B.2.2	Porcentaje de degradación para cada tratamiento en los respectivos tiempos	201

Índice de tablas

muestrales-----	
B.2.3 Conteo de unidades formadoras de colonias (carga bacteriana mesófila) para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	201
B.2.4 Potencial de acidez para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	202
B.2.5 Humedad relativa para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	202
B.2.6 Fracción de hidrocarburos saturados para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	203
B.2.7 Fracción de hidrocarburos aromáticos para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	203
B.2.8 Fracción de resinas para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	204
B.2.9 Fracción de asfaltenos para cada tratamiento en los respectivos tiempos muestrales-----	204
E.1 Costos relativos asociados al montaje de los biorreactores-----	218
E.2 Costos relativos asociados a la adquisición de los agentes bioestimulantes-----	218
E.3 Costos asociados a la caracterización inicial del suelo virgen-----	219
E.4 Costos asociados a la caracterización inicial de los agentes bioestimulantes-----	220
E.5 Costos asociados con la caracterización del crudo y acondicionamiento del suelo para el proceso de degradación-----	221
E.6 Costos relativos asociados con el seguimiento de las diversas variables estudiadas en el proceso de biorremediación-----	221
E.7 Costos totales asociados a la aplicación de los diversos tratamientos de biorremediación-----	223
E.8 Costos netos de cada tratamiento tomando en cuenta el valor del biorreactor de control-----	223
E.9 Análisis costo/beneficio para cada tratamiento aplicado-----	224
E.10 Tiempo de recuperación de la inversión para el tratamiento con estiércol equino-----	226
F.1 Anexo D. (Concentraciones máximas permisibles en lixiviados)-----	230

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Etapas del proceso de biorremediación de suelos contaminados con crudos a partir de técnicas biológicas-----	5
2.1	Perfil del suelo dividido en sus respectivos horizontes-----	19
2.2	Estructura molecular de los principales compuestos constituyentes en las fracciones del petróleo crudo-----	23
2.3	Fenómeno de agregación de asfaltenos-----	27
2.4	Estructura de la célula bacteriana-----	31
2.5	Curva de crecimiento bacteriano-----	32
2.6	Proceso de oxido reducción de una molécula de etano mediante el empleo de bacterias con metabolismo oxidativo y reductivo-----	33
2.7	Aspecto físico de los macroorganismos de Eisenia foétida-----	39
2.8	Estructura interna de la lombriz roja californiana (Eisenia foétida)-----	42
2.9	Órganos reproductores de la lombriz roja californiana (Eisenia foétida)-----	43
2.10	Lombriz roja (<i>Eisenia foétida</i>) en el momento de la copulación-----	44
3.1	Diagrama causa- efecto para la determinación de las diversas variables a monitorear durante el seguimiento del proceso de biorremediación-----	62
3.2	Puntos muestreados en el rodal del módulo MPE – 3. SINOVENSA, Edo. Monagas-----	66
3.3	Determinación de la capacidad de saturación del suelo-----	68
3.4	Proceso de encalado del suelo virgen-----	70
3.5	Determinación del potencial de acidez al suelo encalado-----	71
3.6	Áreas de la faja petrolífera del Orinoco: Boyacá (Machete), Junín (Zuata), Ayacucho (Hamaca), Carabobo (Cerro Negro)-----	71
3.7	Vista aérea del lugar de captación del petróleo crudo en la faja petrolífera del Orinoco. Imagen a 214 pies de altura-----	72
3.8	Vista de las instalaciones de la unidad de Lombricultura del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay-----	73
3.9	Preparación de los biorreactores de prueba-----	73
3.10	Biorreactores de prueba a pre-escala-----	74
3.11	Sustrato o estiércol equino listo para ser usado como agente bioestimulador--	75
3.12	Adición de agua al sustrato o estiércol en los biorreactores a pre-escala-----	75
3.13	Inoculación de las lombrices de tierra Eisenia foétida en los biorreactores a pre-escala con el estiércol-----	76

Índice de figuras

3.14	Procedimiento a seguir para la obtención de la fracción de asfaltenos presente en el crudo-----	79
3.15	Procedimiento a seguir para la obtención de la fracción de saturados, aromáticos y resinas presente en el crudo-----	82
3.16	Preparación del suelo contaminado-----	83
3.17	Disposición de las muestras de suelo contaminado y estiércol equino para su posterior traslado-----	83
3.18	Condiciones físicas iniciales de los biorreactores para el día del montaje experimental (tiempo muestral cero días)-----	87
3.19	Método de muestreo para obtener una muestra compuesta en cada biorreactor-----	88
3.20	Disposición final de las muestras y de los biorreactores-----	89
3.21	Proceso de elaboración de la “hallaca” para el montaje Soxhlet-----	89
3.22	Montaje del equipo de extracción Soxhlet-----	90
3.23	Operación del equipo de extracción Soxhlet-----	90
3.24	Rota evaporador empleado para la recuperación de solventes-----	91
3.25	Tratamiento del hidrocarburo extraído-----	91
3.26	Procedimiento a seguir para la obtención de los hidrocarburos totales de petróleo-----	93
3.27	Obtención de asfaltenos-----	94
3.28	Proceso de raspado de asfaltenos del papel de filtro-----	94
3.29	Tratamiento de los asfaltenos con ultrasonido-----	95
3.30	Proceso de pesada de los asfaltenos obtenidos-----	95
3.31	Proceso de secado de los asfaltenos-----	96
3.32	Envasado de los asfaltenos para su posterior análisis-----	96
3.33	Elución de las diversas fracciones en la cromatografía de columna-----	97
3.34	Elución de la fracción de compuestos aromáticos dentro de la columna-----	98
3.35	Diversas coloraciones de las fracciones extraídas-----	98
3.36	Cromatógrafo de gases modelo VARIAN 3800-----	99
3.37	Determinación del potencial de acidez de las muestras de suelo-----	101
3.38	Determinación de humedad de la muestra de suelo-----	102
3.39	Determinación de humedad de la muestra de suelo (continuación)-----	102
3.40	Manejo de los datos de la variable de respuesta-----	104
3.41	Secuencia de comandos a seguir para la realización de el análisis de varianza con dos criterios de clasificación en el programa Statistix 8.0-----	106
3.42	Secuencia de comandos a seguir para la realización de la verificación de los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas en un diseño en bloques completos al azar empleando el software Statistix 8.0-----	107

Índice de figuras

3.43	Secuencia de comandos a seguir para la realización de las pruebas de comparación de Tukey HSD y Dunnett-----	108
4.1	Diagrama causa-efecto con los factores más influyentes para la selección de las variables a monitorear durante el proceso de biorremediación-----	111
4.2	Triángulo textural-----	117
4.3	Expresión gráfica de los cambios que ocurren en los sitios de intercambio cuando el suelo es sometido a procesos de meteorización-----	120
4.4	Ilustración del efecto del aluminio intercambiable como fuente de acidez en los suelos-----	121
4.5	Reacción del carbonato de calcio sobre los intersticios del suelo para la corrección de acidez por aluminio-----	124
4.6	Espectro de resonancia magnética nuclear para el asfalteno del crudo Merey-	127
4.7	Cromatograma para la fracción saturada del crudo Merey-----	130
4.8	Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas del crudo Merey---	131
4.9	Disminución de los hidrocarburos totales de petróleo en cada una de los tratamientos aplicados-----	135
4.10	Evolución de la carga bacteriana mesófila para cada una de los tratamientos aplicados-----	136
4.11	Porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales de petróleo en cada una de los tratamientos aplicados-----	137
4.12	Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento control (atenuación natural)-----	137
4.13	Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con estiércol equino-----	138
4.14	Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con humus líquido-----	139
4.15	Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con los macroorganismos de Eisenia foétida-----	141
4.16	Conteo de especímenes de Eisenia foétida presentes en los biorreactores durante el proceso de degradación-----	142
4.17	Condiciones físicas de los biorreactores a los veintidós días de tratamiento----	143
4.18	Porcentaje de fracciones de hidrocarburos saturados presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación-----	144
4.19	Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con estiércol equino	145
4.20	Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con los macroorganismos de Eisenia foétida-----	146
4.21	Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con humus líquido---	147
4.22	Porcentaje de fracciones de hidrocarburos aromáticos presentes en el suelo	

Índice de figuras

	durante el proceso de biorremediación-----	148
4.23	Porcentaje de fracciones de resinas presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación-----	149
4.24	Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento control al último día de la experimentación-----	150
4.25	Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento con estiércol equino al último día de la experimentación---	151
4.26	Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento con humus líquido al último día de la experimentación----	152
4.27	Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento Eisenia foétida al último día de la experimentación-----	153
4.28	Porcentaje de fracciones de asfaltenos presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación-----	154
4.29	Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento control al último día de la experimentación-----	155
4.30	Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con estiércol equino al último día de la experimentación	156
4.31	Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con humus líquido al último día de la experimentación -----	157
4.32	Aspecto físico de los asfaltenos obtenidos al finalizar los tratamientos -----	157
4.33	Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con Eisenia foétida al último día de la experimentación-----	158
4.34	Potencial de acidez del suelo durante el proceso de biorremediación-----	159
4.35	Humedad relativa presente en el suelo durante el proceso de biorremediación-----	160
4.36	Diseño experimental para hallar el valor promedio de cierta variable de salida en los biorreactores-----	162
C.1	Elución de dos fracciones distintas a través de la columna cromatográfica-----	206
C.2	Conformación básica de un equipo de cromatografía de gases-----	207
C.3	Orientación de los Espines nucleares al aplicar un campo magnético-----	209
C.4	Variación de la energía entre los estados de espín α y β a medida que aumenta la fuerza del campo magnético aplicado-----	209
C.5	Desplazamiento químico de las estructuras de los principales protones que aparecen en un espectro de RMN-1H-----	211

Índice de figuras

D.1.1	Resultados del análisis de varianza para los hidrocarburos totales de petróleo	213
D.1.2	Resultados de la prueba de Tukey para los hidrocarburos totales de petróleo--	213
D.1.3	Resultados de la prueba de Dunnett para los hidrocarburos totales de petróleo-----	214
D.1.4	Aplicación de la prueba de Shapiro - Willk para los hidrocarburos totales de petróleo-----	214
D.1.5	Verificación del supuesto de homogeneidad mediante el gráfico de residuos por valores fijos de hidrocarburos totales de petróleo-----	215
E.1	Evaluación de costos para cada tiempo muestral durante la aplicación de cada el biotratamiento-----	222
E.2	Evaluación de costos-beneficios para cada tiempo muestral durante la aplicación del biotratamiento-----	225

INTRODUCCIÓN

En Venezuela la industria petrolera genera una gran cantidad de desechos con altos contenidos de hidrocarburos, los cuales requieren una adecuada deposición. En el suelo el petróleo crudo representa un riesgo para el aire, las aguas subterráneas, la calidad del suelo, la flora y la fauna. La biorremediación o biotratamiento permite la recuperación de suelos contaminados, mediante el empleo de microorganismos autóctonos los cuales llevan a cabo la degradación del hidrocarburo, empleándolo como fuente de energía en procesos oxidativos y reductivos bajo ciertas condiciones especiales. (Schaefer M., *et al.* 2007)

El montaje de los biorreactores correspondió a la aplicación de tres tratamientos con distintos agentes bioestimulantes en un suelo contaminado con petróleo crudo, lo cual involucra la preparación del suelo (encalado), la caracterización del crudo y el seguimiento de las variables determinadas a lo largo de los tiempos muestrales establecidos en la experimentación para cada tratamiento.

Este trabajo esta estructurado en cuatro capítulos. En el capítulo I, se muestra el planteamiento del problema, la situación actual, lo que se quiere lograr con la investigación, y los objetivos para llevarla a cabo, así como sus principales limitaciones. En el capítulo II se exponen los antecedentes y las bases teóricas que sirven de sustento para la investigación. En el capítulo III, se detalla la metodología empleada para desarrollar cada uno de los objetivos y en el capítulo IV se presentan el análisis de los resultados obtenidos. Finalmente se señalan las conclusiones y las recomendaciones a las que se llegaron con el logro de los objetivos propuestos.

El interés en los últimos años que ha desencadenado la contaminación de suelos contaminados con crudo, se debe principalmente al establecimiento de normas internacionales que sugieren un nivel de limpieza del suelo, razón por la cual se recurre a procesos de biorremediación por tener un bajo impacto ambiental, ser efectivos y muy económicos.

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el proceso de degradación del crudo presente en un suelo proveniente de la faja petrolífera del Orinoco mediante la implementación de técnicas de biorremediación y lombricultura. Razón por la cual primeramente se establecieron las variables a monitorear durante el proceso, seguido de una evaluación a pre-escala de la sobrevivencia del agente bioestimulador (lombrices rojas californianas *Eisenia foétida*) con una posterior caracterización del crudo a degradar en la aplicación de las diversas técnicas.

Se manejaron básicamente tres tipos de tratamientos con tres agentes bioestimulantes distintos: estiércol equino, humus líquido y macroorganismos de *Eisenia foétida*, los cuales fueron aplicados a una muestra de suelo que fue contaminada con la finalidad de simular las condiciones que se dan en el campo.

Las variables que se monitorearon durante el proceso fueron: hidrocarburos totales de petróleo (HTP), caracterización de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), porcentaje de humedad relativa (%H_R), potencial de acidez (pH), conteo de aerobios mesófilos (UFC/g), cromatografía de gases saturados (CG-S) y espectros de RMN-1H a resinas y asfaltenos. Los resultados fueron evaluados empleando el software Statistix 8.0 para determinar si hubo diferencia significativa entre los tratamientos aplicados. Se realizó un análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar, realizando además las comparaciones de las medias mediante la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett para confrontar los tratamientos aplicados en función del tratamiento control (atenuación natural).

Se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos con los macroorganismos de *Eisenia foétida* y estiércol equino para las variables estudiadas ($p < 0,05$), de un $(54,48 \pm 0,02)$ % de degradación de los HTP y un máximo de carga bacteriana de $(2,30 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g.; mientras que para el tratamiento con humus líquido no se registraron diferencias significativas en la prueba de Dunnett. Se determinó la sobrevivencia de los especímenes de *Eisenia foétida* en medianas concentraciones de crudo en el suelo, además de un alto porcentaje de degradación de hidrocarburos saturados y resinas; mientras que las fracciones de aromáticos y asfaltenos no variaron de forma significativa.

Se recomienda aplicar la técnica de biorremediación mediante la incorporación de los macroorganismos de *Eisenia foétida* como bioestimulantes en función de la efectividad en la remoción de contaminantes que posee ya que el análisis económico reflejó un mismo costo para todos los tratamientos. Además, se recomienda realizar los espectros de RMN-1H con un solvente deuterizado y expandir un poco más el tiempo del proceso de biorremediación para estudiar la posible reproducción de las lombrices en el suelo contaminado.

Palabras clave: Biorremediación, estiércol equino, humus líquido, *Eisenia foétida*, petróleo crudo.



A. CÁLCULOS TÍPICOS

En este apéndice se reflejan todos los cálculos típicos que se requieren para el cumplimiento de cada objetivo desarrollado en el presente estudio.

APÉNDICE A: Cálculos típicos

A.1 Cálculo de la densidad aparente del suelo virgen

Para la estimación de este parámetro se toma en consideración los datos reflejados en la tabla B.1.2, y haciendo uso de la ecuación (III-1):

$$\rho_s = \frac{M_{Bs} - M_{Bv}}{V_s}$$

Donde:

ρ_s : Densidad aparente del suelo (kg/mL)

M_{Bv} : Masa del vaso de precipitado vacío (kg)

M_{Bs} : Masa del vaso de precipitado con el suelo seco (kg)

V_s : Volumen del nivel de suelo en el vaso de precipitado (mL)

Sustituyendo los datos obtenidos en el primer ensayo, se tiene:

$$\rho_s = \frac{0,1633 \text{ kg} - 0,0974 \text{ kg}}{50\text{mL}} = 0,001318 \frac{\text{kg}}{\text{mL}} = 1,318 \frac{\text{ton}}{\text{m}^3}$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición, se tiene:

$$\Delta\rho_s = \left(\left| \frac{\Delta M_{Bs}}{M_{Bs}} \right| + \left| \frac{\Delta M_{Bv}}{M_{Bv}} \right| + \left| \frac{\Delta V_s}{V_s} \right| \right) \times \rho_s$$

Donde:

$\Delta\rho_s$: Incertidumbre asociada a la densidad aparente (kg/mL)

ΔM_{Bs} : Incertidumbre de la masa del vaso de precipitado lleno (kg)

ΔM_{Bv} : Incertidumbre de la masa del vaso de precipitado vacío (kg)

ΔV_s : Incertidumbre del volumen del nivel del suelo en el vaso de precipitado (mL)

APÉNDICE A: Cálculos típicos

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\rho_s = \left(\left| \frac{0,0001 \text{ kg}}{0,1633 \text{ kg}} \right| + \left| \frac{0,0001}{0,0974 \text{ kg}} \right| + \left| \frac{5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right| \right) \times 0,001318 \frac{\text{kg}}{\text{mL}} = 2,0 \times 10^{-6} \frac{\text{kg}}{\text{mL}} = 0,002 \frac{\text{ton}}{\text{m}^3}$$

Finalmente el valor de la densidad puede ser expresado como:

$$\rho_s = (1,318 \pm 0,002) \frac{\text{ton}}{\text{m}^3}$$

A.2 Cálculo de la cantidad de cal necesaria para corregir el grado de acidez del suelo

Para la estimación de este parámetro se hace uso de la ecuación (III-2):

$$M_{\text{CaCO}_3} = \frac{M_s \times [\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}] \times \text{Fe}}{\rho_s \times P_s}$$

Donde:

M_{CaCO_3} : Masa de carbonato de calcio a adicionar (kg)

M_s : Masa de suelo a encalar (kg)

$[\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}]$: Cantidad de aluminio intercambiable presente en el suelo (meq $\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}$ /100g de suelo)

ρ_s : Densidad aparente del suelo (ton/m^3)

P_s : Profundidad a la que fue tomada el suelo (m)

Fe: Factor empírico; $\left(\text{Fe} = 1,65 \times 10^{-4} \frac{\text{ton} \times \text{ha} \times 100 \text{ g de suelo}}{\text{ha} \times \text{m}^2 \times \text{meq Al}_{\text{INT}}^{3+}} \right)$

Sustituyendo los datos obtenidos en le primer ensayo, se tiene:

APÉNDICE A: Cálculos típicos

$$M_{\text{CaCO}_3} = \frac{15\text{kg} \times 7,710 \frac{\text{meqAl}_{\text{INT}}^{3+}}{100 \text{ g de suelo}} \times 1,65 \times 10^{-4} \frac{\text{ton} \times \text{ha} \times 100 \text{ g de suelo}}{\text{ha} \times \text{m}^2 \times \text{meqAl}_{\text{INT}}^{3+}}}{1,318 \frac{\text{ton}}{\text{m}^3} \times 0,15 \text{ m}}$$

$$M_{\text{CaCO}_3} = 0,096521 \text{ kg}$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición, despreciando el error del factor empírico se tiene:

$$\Delta M_{\text{CaCO}_3} = \left(\left| \frac{\Delta M_S}{M_S} \right| + \left| \frac{\Delta [\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}]}{[\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}]} \right| + \left| \frac{\Delta \rho_S}{\rho_S} \right| + \left| \frac{\Delta P_S}{P_S} \right| \right) \times M_{\text{CaCO}_3}$$

Donde:

ΔM_{CaCO_3} : Incertidumbre asociada a la masa de cal a añadir (g)

ΔM_S : Incertidumbre de la masa del suelo a encalar (g)

$\Delta [\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}]$: Incertidumbre de la concentración de aluminio intercambiables en el suelo ácido (meq $\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}$ /100g de suelo)

ΔP_S : Incertidumbre de la profundidad a la que fue tomada la muestra de suelo (m)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta M_{\text{CaCO}_3} = \left(\left| \frac{0,0001 \text{ kg}}{15\text{kg}} \right| + \left| \frac{0,001 \frac{\text{meqAl}_{\text{INT}}^{3+}}{100 \text{ g de suelo}}}{7,710 \frac{\text{meqAl}_{\text{INT}}^{3+}}{100 \text{ g de suelo}}} \right| + \left| \frac{0,002 \frac{\text{ton}}{\text{m}^3}}{1,318 \frac{\text{ton}}{\text{m}^3}} \right| + \left| \frac{0,01\text{m}}{0,15\text{m}} \right| \right) \times 0,096521\text{kg}$$

$$\Delta M_{\text{CaCO}_3} = 0,00002 \text{ kg}$$

Finalmente el valor de la masa de cal a añadir es de:

$$M_{\text{CaCO}_3} = (96,52 \pm 0,02) \text{ g}$$

APÉNDICE A: Cálculos típicos

A.3 Cálculo del porcentaje de la fracción saturada presente en el crudo

Haciendo unos de la ecuación III-3, y de los datos de la tabla B.1.5:

$$\% \text{ Asf} = \frac{\text{MPF}_{(A)} - \text{MPF}}{M_C} \times 100$$

Donde:

% Asf: Porcentaje de asfaltenos en el crudo (%)

$\text{MPF}_{(A)}$: Masa del papel de filtro con los asfaltenos recolectados (g)

MPF: Masa del papel de filtro (g)

M_C : Masa inicial del crudo a fraccionar (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\% \text{ Asf} = \frac{1,5650\text{g} - 1,1350\text{g}}{10,0000\text{g}} \times 100 = 4,265 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\% \text{ Asf} = \left(\left| \frac{\Delta\text{MPF}_{(A)}}{\text{MPF}_{(A)}} \right| + \left| \frac{\Delta\text{MPF}}{\text{MPF}} \right| + \left| \frac{\Delta M_C}{M_C} \right| \right) \times \% \text{ Asf}$$

Donde:

$\Delta\% \text{ Asf}$: Incertidumbre del porcentaje de asfaltenos en el crudo (%)

$\Delta\text{MPF}_{(A)}$: Incertidumbre de la masa del papel de filtro con los asfaltenos recolectados (g)

ΔMPF : Incertidumbre de la masa del papel de filtro (g)

ΔM_C : Incertidumbre de la masa inicial del crudo a fraccionar (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

APÉNDICE A: Cálculos típicos

$$\Delta\% \text{ Asf} = \left(\left| \frac{0,0001\text{g}}{1,5650\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{1,1350\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{10,0000\text{g}} \right| \right) \times 4,265 \% = 0,8 \%$$

Finalmente el valor de la masa de la fracción asfaltenos del crudo es:

$$\% \text{ Asf} = (4,3 \pm 0,8) \%$$

A.4 Cálculo del porcentaje de la fracción saturada presente en el crudo

Haciendo unos de la ecuación III-4, y de los datos de la tabla B.1.6:

$$\% \text{ Sat} = \frac{\left(1 - \frac{\% \text{ Asf}}{100}\right) \times (M_{\text{Sat}} - M_{\text{Bv}})}{M_{\text{T}}} \times 100$$

Donde:

% Sat: Porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo (%)

M_{Sat} : Masa del balón lleno con la fracción saturada después de la rota evaporación (g)

M_{Bv} : Masa del balón vacío antes de la rota evaporación (g)

M_{T} : Masa de maltenos tomada para realizar la elución en la columna (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\% \text{ Sat} = \frac{\left(1 - \frac{4,30\%}{100}\right) \times (119,3220 \text{ g} - 118,8200 \text{ g})}{1,6131 \text{ g}} \times 100 = 29,7820 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\% \text{ Sat} = \left(\left| \frac{\Delta\% \text{ Asf}}{\% \text{ Asf}} \right| + \left| \frac{\Delta M_{\text{Sat}}}{M_{\text{Sat}}} \right| + \left| \frac{\Delta M_{\text{Bv}}}{M_{\text{Bv}}} \right| + \left| \frac{\Delta M_{\text{T}}}{M_{\text{T}}} \right| \right) \times \% \text{ Sat}$$

Donde:

APÉNDICE A: Cálculos típicos

$\Delta\% \text{ Sat}$: Incertidumbre asociada al porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo (%)

ΔM_{Sat} : Incertidumbre de la masa del balón lleno con la fracción saturada después de la rota evaporación (g)

ΔM_{BV} : Incertidumbre de la masa del balón vacío antes de la rota evaporación (g)

ΔM_{T} : Incertidumbre de la masa de maltenos tomada para realizar la elución en la columna (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\% \text{ Sat} = \left(\left| \frac{0,02\%}{4,30\%} \right| + \left| \frac{0,0001 \text{ g}}{119,3220 \text{ g}} \right| + \left| \frac{0,0001 \text{ g}}{118,8200 \text{ g}} \right| + \left| \frac{0,0001 \text{ g}}{1,6131 \text{ g}} \right| \right) \times 29,7820 \% = 0,79\%$$

Finalmente el valor del porcentaje de la fracción saturada del crudo es:

$$\% \text{ Sat} = (29,9 \pm 0,8) \%$$

A.5 Cálculo del porcentaje del porcentaje de una macroelemento en un biorreactor

Este cálculo está referido a la determinación del porcentaje de nitrógeno inicial en los biorreactores con estiércol equino, cuya caracterización se muestra en la tabla 4.7, mediante la ecuación (III-8):

$$\%M_E = \frac{\frac{M_S \times \%M_{ES}}{100} + \frac{M_B \times \%M_{EB}}{100}}{M_S + M_B} \times 100$$

Donde:

$\%M_E$: Porcentaje del macro elemento en el biorreactor (%)

$\%M_{ES}$: Porcentaje del macro elemento presente en el suelo (%)

$\%M_{EB}$: Porcentaje del macro elemento presente en el bioestimulante (%)

M_B : Masa del bioestimulante agregada al biorreactor (g)

M_S : Masa de suelo agregada en el biorreactor (g)

APÉNDICE A: Cálculos típicos

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\%M_E = \frac{\frac{1,5000\text{kg} \times 0,022 \%}{100} + \frac{0,3500\text{kg} \times 0,14 \%}{100}}{1,500 \text{ kg} + 0,3500 \text{ kg}} \times 100 = 0,04056 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\%M_E = \left(\left| \frac{\Delta M_S}{M_S} \right| + \left| \frac{\Delta\%M_{ES}}{\%M_{ES}} \right| + \left| \frac{\Delta M_B}{M_B} \right| + \left| \frac{\Delta\%M_{EB}}{\%M_{EB}} \right| \right) \times \%M_E$$

Donde:

$\Delta\%M_E$: Incertidumbre asociada al porcentaje del macro elemento en el biorreactor (%)

$\Delta\%M_{ES}$: Incertidumbre del porcentaje del macro elemento presente en el suelo (%)

$\Delta\%M_{EB}$: Incertidumbre del porcentaje del macro elemento presente en el bioestimulante (%)

ΔM_B : Incertidumbre de la masa del bioestimulante agregada al biorreactor (g)

ΔM_S : Incertidumbre de la masa de suelo agregada en el biorreactor (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\%M_E = \left(\left| \frac{0,0001 \text{ kg}}{1,5000\text{kg}} \right| + \left| \frac{0,001\%}{0,022 \%} \right| + \left| \frac{0,0001 \text{ kg}}{0,3500\text{kg}} \right| + \left| \frac{0,01 \%}{0,14 \%} \right| \right) \times 0,04056 \% = 0,001\%$$

Finalmente el valor del porcentaje de nitrógeno en el biorreactor con estiércol equino corresponde a:

$$\%M_E = (0,041 \pm 0,001) \%$$

A.6 Cálculo del porcentaje del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo

APÉNDICE A: Cálculos típicos

Para este cálculo se toma como ejemplo los valores reportados en la tabla B.1.7 para el biorreactor N° 01, y el análisis se realiza por medio de la ecuación III-9:

$$\% \text{ HTP} = \frac{M_{FV} - M_{Fc}}{M_S} \times 100$$

Donde:

% HTP: Porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo (%)

M_{FV} : Masa de la fiola vacía (g)

M_{Fc} : Masa de la fiola con el hidrocarburo extraído (g)

M_S : Masa de suelo recolectada (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\% \text{ HTP} = \frac{124,7960\text{g} - 127,6010\text{g}}{50,2584 \text{ g}} \times 100 = 5,58265 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\% \text{ HTP} = \left(\left| \frac{\Delta M_{FV}}{M_{FV}} \right| + \left| \frac{\Delta M_{Fc}}{M_{Fc}} \right| + \left| \frac{\Delta M_S}{M_S} \right| \right) \times \% \text{ HTP}$$

Donde:

$\Delta\% \text{ HTP}$: Incertidumbre asociada al porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo (%)

ΔM_{FV} : Incertidumbre de la masa de la fiola vacía (g)

ΔM_{Fc} : Incertidumbre de la masa de la fiola con el hidrocarburo extraído (g)

ΔM_S : Incertidumbre de la masa de suelo recolectada (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\% \text{ HTP} = \left(\left| \frac{0,0001\text{g}}{124,7960\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{127,6010\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{50,2584 \text{ g}} \right| \right) \times 5,58265 \% = 0,02 \%$$

APÉNDICE A: Cálculos típicos

Finalmente el valor del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo viene expresado por:

$$\% \text{ HTP} = (5,58 \pm 0,02) \%$$

A.7 Cálculo del porcentaje del porcentaje de degradación del crudo presente en suelo durante el proceso de degradación

Para el cálculo de esta variable se utilizan los datos reportados en la tabla B.2.2 para el biorreactor N° 01 al tiempo muestral correspondiente a los veintidós días, mediante el uso de la ecuación III-10:

$$\%D_t = \left(1 - \frac{(\text{HTP})_0}{(\text{HTP})_t}\right) \times 100$$

Donde:

$\%D_t$: Porcentaje de degradación de hidrocarburos (%)

$(\text{HTP})_0$: Hidrocarburos totales de petróleo al inicio de tratamiento (%)

$(\text{HTP})_t$: Hidrocarburos totales de petróleo a un tiempo (t) del tratamiento (%)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\%D_t = \left(1 - \frac{5,58\%}{5,10\%}\right) \times 100 = 8,502312 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\%D_t = \left(\left|\frac{\Delta(\text{HTP})_0}{(\text{HTP})_0}\right| + \left|\frac{\Delta(\text{HTP})_t}{(\text{HTP})_t}\right|\right) \times \%D_t$$

Donde:

APÉNDICE A: Cálculos típicos

$\Delta\%D_t$: Incertidumbre asociada al porcentaje de degradación de hidrocarburos (%)

$\Delta(\text{HTP})_0$: Incertidumbre de los hidrocarburos totales de petróleo al inicio de tratamiento (%)

$\Delta(\text{HTP})_t$: Incertidumbre de los hidrocarburos totales de petróleo a un tiempo (t) del tratamiento (%)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\%D_t = \left(\left| \frac{0,01\%}{5,58\%} \right| + \left| \frac{0,01\%}{5,10\%} \right| \right) \times 8,502312\% = 0,01925\%$$

Finalmente el valor del porcentaje de degradación hidrocarburos totales de petróleo para el biorreactor N° 01 al final del tratamiento viene expresado por:

$$\%D_t = (8,50 \pm 0,02)\%$$

A.8 Cálculo del porcentaje de humedad relativa en los biorreactores

Para la realización de este cálculo se tomó como ejemplo los datos reportados en la tabla B.1.10, para el biorreactor N° 01, según la ecuación (III-11):

$$\%H_R = \frac{PM_H - PM_S}{PM_S - P_C} \times 100$$

$\%H_R$: Porcentaje de humedad relativa del suelo (%)

PM_H : Masa de la muestra húmeda de suelo en la cápsula (g)

PM_S : Masa de la muestra seca de suelo en la cápsula (g)

P_C : Masa de la cápsula de Petri vacía (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

APÉNDICE A: Cálculos típicos

$$\%H_R = \frac{52,2367\text{g} - 51,2984\text{g}}{51,2984\text{g} - 32,4742\text{g}} \times 100 = 4,980123 \%$$

Ahora bien, empleando el método de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre asociada a la medición:

$$\Delta\%H_R = \left(\left| \frac{\Delta PM_H}{PM_H} \right| + \left| \frac{\Delta PM_S}{PM_S} \right| + \left| \frac{\Delta P_C}{P_C} \right| \right) \times \%H_R$$

Donde:

$\Delta\%H_R$: Incertidumbre asociada al porcentaje de humedad relativa del suelo (%)

ΔPM_H : Incertidumbre de la masa de la muestra húmeda de suelo en la cápsula (g)

ΔPM_S : Incertidumbre de la masa de la muestra seca de suelo en la cápsula (g)

ΔP_C : Incertidumbre de la masa de la cápsula de Petri vacía (g)

Sustituyendo los datos en la expresión anterior, se tiene:

$$\Delta\%H_R = \left(\left| \frac{0,0001\text{g}}{52,2367\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{51,2984\text{g}} \right| + \left| \frac{0,0001\text{g}}{32,4742\text{g}} \right| \right) \times 4,980123 \% = 0,01\%$$

Finalmente el valor del porcentaje de humedad relativa en el reactor viene dado por:

$$\%H_R = (4,98 \pm 0,01) \%$$



B. TABLAS DE DATOS Y RESULTADOS

En este apéndice se reflejan todos los datos numéricos que fueron recabados durante la realización de experimentos así como también se muestran los resultados obtenidos de forma tabulada.

APÉNDICE B: Tablas de datos y resultados
B.1 TABLAS DE DATOS

TABLA B.1.1
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SATURACIÓN
DEL SUELO VIRGEN

Ensayo	Masa de suelo tomada ($M_s \pm 0,001$)kg	Volumen de agua añadido ($V_{\text{agua}} \pm 0,05$)mL
01	200,056	15,40
02	199,236	15,90
03	200,012	15,10

Presión ambiente: (716,56 \pm 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (29,5 \pm 0,5) °C

TABLA B.1.2
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD APARENTE
DEL SUELO VIRGEN

Ensayo	Masa del vaso de precipitado vacío ($M_v \pm 0,001$)kg	Masa del vaso de precipitado con el suelo seco ($M_s \pm 0,001$)kg	Volumen del nivel de suelo en el vaso de precipitado ($V_{\text{nivel}} \pm 5$)mL
01	0,0974	0,1633	50
02	0,0926	0,1539	50
03	0,0951	0,1602	50

Presión ambiente: (716,36 \pm 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (28,5 \pm 0,5) °C

TABLA B.1.3
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE ACIDEZ EN EL SUELO LUEGO
DEL PROCESO DE ENCALADO CON CaCO₃

Fecha (dd/mm/aaaa)	Potencial de acidez (pH ± 0,1)adim			
	pH ₁	pH ₂	pH ₃	Promedio
24/09/2007	7,2	7,3	7,4	7,3
25/09/2007	7,1	7,2	7,2	7,2
26/09/2007	7,3	7,0	7,2	7,2
27/09/2007	7,2	7,2	7,2	7,2
01/10/2007	7,1	7,2	7,0	7,1

Presión ambiente: (716,86 ± 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (29,4 ± 0,5) °C

TABLA B.1.4
CONTEO DE MACROORGANISMOS VIVOS (EISENIA FOÉTIDA) EN
LOS BIORREACTORES A PRE-ESCALA

Fecha (dd/mm/aaaa)	Hora (hh/mm)	Conteo de macroorganismos vivos (C ± 1)macroorganismos		
		Alto impacto	Medio impacto	Bajo impacto
2/10/2007	11:00 am	12	12	12
9/10/2007	10:30 am	12	12	12
16/10/2007	2:00 pm	12	12	12

Presión ambiente: (716,59 ± 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (28,05 ± 0,5) °C

APÉNDICE B: Tablas de datos y resultados

TABLA B.1.5

DETERMINACIÓN DE LA MASA DE ASFALTENOS PRESENTES EN LA CARACTERIZACIÓN DEL CRUDO MEREY

Masa del papel de filtro ($m_{PF} \pm 0,0001$) g	Masa del papel de filtro con los asfaltenos ($m_{PFA} \pm 0,0001$) g	Masa total de asfaltenos obtenidos ($M_{TOTAL} \pm 0,0001$) g
1,1350	1,5650	0,4300

Presión ambiente: (716,86 ± 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (28,8 ± 0,5) °C

TABLA B.1.6

CARACTERIZACIÓN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE CRUDO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE SARA A LA SOLUCIÓN DE MALTENOS OBTENIDA A PARTIR DEL CRUDO MEREY

Masa de solución de maltenos tomada ($m_{sol} \pm 0,0001$) g	Prueba de SARA								
	Saturados			Aromáticos			Resinas		
	($m_{sat} \pm 0,0001$) g			($M_{aro} \pm 0,0001$) g			($M_{res} \pm 0,0001$) g		
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de saturados	Balón vacío	Balón lleno	Masa de aromáticos	Balón vacío	Balón lleno	Masa de resinas
1,6131	118,8200	119,3220	0,5020	89,6010	90,1550	0,5540	89,6010	90,1280	0,5270
1,5771	118,8200	119,3250	0,5050	89,6010	90,1560	0,5550	89,6010	90,1289	0,5279
1,2565	118,8200	119,3240	0,5040	89,6010	90,1540	0,5530	89,6010	90,1236	0,5226

Presión ambiente: (716,86 ± 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (28,8 ± 0,5) °C

TABLA B.1.7
DETERMINACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO DE LAS MUESTRAS DE SUELO
EN CADA BIORREACTOR PARA EL PRIMER TIEMPO MUESTRAL

Biorreactor Nº	Masa				Hidrocarburos totales de petróleo (HTP ± 0,02)%
	De suelo recolectada (M _{REC} ± 0,0001) g	De la fiola vacía (M _{VAC} ± 0,0001) g	De la fiola llena después de la evaporación (M _{LL} ± 0,0001) g	Del hidrocarburo extraído (M _{HTP} ± 0,001) g	
01	50,2584	124,7960	127,6010	2,8050	5,58
02	50,0118	127,8180	130,5030	2,6850	5,37
03	50,2502	103,8980	106,6250	2,7270	5,43
04	50,1010	125,4160	128,0860	2,6700	5,33
05	50,2122	126,5420	129,3960	2,8540	5,68
06	50,8514	114,0380	116,9180	2,8800	5,66
07	50,3754	99,4770	102,4370	2,9600	5,88
08	50,7532	127,9270	130,7960	2,8690	5,65
09	50,0138	117,3620	120,1280	2,7660	5,53
10	50,2018	99,4660	102,2990	2,8330	5,64

Muestreo Nº: 01 Tiempo muestral: 0 días

Presión ambiente: (714,28 ± 0,05) mmHg

Temperatura ambiente: (28,10 ± 0,5) °C

APÉNDICE B: Tablas de datos y resultados

TABLA B.1.8

MASA TOTAL DE MÁLTENOS Y ASFALTENOS OBTENIDOS DESPUÉS DEL PROCESO DE FILTRACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DIVERSAS FRACCIONES DE CRUDO A ANALIZAR A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE SUELO EN CADA BIORREACTOR PARA EL PRIMER TIEMPO MUESTRAL

Biorreactor Nº	Solución de maltenos			Asfaltenos		
	Masa de fiola vacía ($M_{VAC} \pm 0,0001$) g	Masa de fiola llena ($M_{LL} \pm 0,0001$) g	Masa total de maltenos obtenidos ($m_{TOTAL} \pm 0,0001$) g	Masa del papel de filtro ($m_{PF} \pm 0,0001$) g	Masa del papel de filtro con los asfaltenos ($m_{PFA} \pm 0,0001$) g	Masa total de asfaltenos obtenidos ($M_{TOTAL} \pm 0,0001$) g
01	100,0325	102,8432	2,8107	1,1322	1,2512	0,1190
02	127,1039	129,6789	2,5750	1,1420	1,2578	0,1158
03	120,1560	123,1226	2,9666	1,0970	1,2106	0,1136
04	122,0652	124,5596	2,4944	1,1080	1,2195	0,1115
05	100,0344	102,4972	2,4628	1,1702	1,2996	0,1294
06	102,8640	105,2360	2,3720	1,1200	1,2490	0,1290
07	102,2356	105,0456	2,8100	1,1201	1,2409	0,1208
08	126,5679	129,3009	2,7330	1,0903	1,2093	0,1190
09	103,0156	105,8794	2,8638	1,1530	1,2690	0,1160
10	91,2840	93,7360	2,4520	1,1635	1,2830	0,1195

Muestreo Nº: 01 Tiempo muestral: 0 días

Presión ambiente: (716,13 ± 0,05) mmHg Temperatura ambiente: (29,20 ± 0,5) °C

TABLA B.1.9

**CARACTERIZACIÓN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE CRUDO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE SARA
A LA SOLUCIÓN DE MALTENOS OBTENIDA A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE SUELO
EN CADA BIORREACTOR PARA EL PRIMER TIEMPO MUESTRAL**

Biorreactor Nº	Masa de solución de maltenos tomada ($m_{sol} \pm 0,0001$) g	Prueba de SARA								
		Saturados			Aromáticos			Resinas		
		($m_{sat} \pm 0,0001$) g			($M_{aro} \pm 0,0001$) g			($M_{res} \pm 0,0001$) g		
		Balón vacío	Balón lleno	Masa de saturados	Balón vacío	Balón lleno	Masa de aromáticos	Balón vacío	Balón lleno	Masa de resinas
01	1,2329	91,0360	91,4323	0,3963	91,0360	91,4790	0,4430	91,0360	91,4296	0,3936
02	1,1999	91,2840	91,6280	0,3440	91,2840	91,7160	0,4320	91,2840	91,7079	0,4239
03	1,2046	91,2840	91,6320	0,3480	91,2840	91,7101	0,4261	91,2840	91,7145	0,4305
04	1,2038	91,2840	91,6262	0,3422	91,2840	91,7235	0,4395	91,2840	91,7061	0,4221
05	1,0991	116,1990	116,5680	0,3690	116,1990	116,5870	0,3880	119,0970	119,4391	0,3421
06	1,0926	116,1990	116,5660	0,3670	116,1990	116,5820	0,3830	119,0970	119,4396	0,3426
07	1,1000	119,0970	119,4640	0,3670	119,0770	119,4610	0,3840	119,0970	119,4460	0,3490
08	1,2835	118,8100	119,2040	0,3940	118,8120	119,2180	0,4060	118,8160	119,2995	0,4835
09	1,2800	118,8100	119,1980	0,3880	118,8120	119,2210	0,4090	118,8160	119,2990	0,4830
10	1,2887	118,8100	119,2182	0,4082	118,8120	119,2120	0,4000	118,8160	119,2965	0,4805

Muestreo Nº: 01 Tiempo muestral: 0 días
Presión ambiente: (715,22 ± 0,05) mmHg Temperatura ambiente: (28,60 ± 0,5) °C

TABLA B.1.10
DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE ACIDEZ Y HUMEDAD RELATIVA EN CADA BIORREACTOR PARA EL
PRIMER TIEMPO MUESTRAL

Biorreactor Nº	Determinación de potencial de acidez (pH ± 0,01) adim				Determinación de humedad			
	Ensayo			Promedio	Masa de la cápsula (MC ± 0,0001)g	Masa de la muestra húmeda (PMH ± 0,0001)g	Masa de la muestra seca (PMS ± 0,0001)g	Humedad relativa (H _R ± 0,01)g
	1	2	3					
01	7,27	7,56	7,11	7,31	32,4742	52,2367	51,2984	4,98
02	7,25	7,45	7,84	7,51	26,9283	46,7166	45,8686	4,48
03	7,56	7,23	7,89	7,56	29,3010	49,1194	47,9993	5,99
04	7,52	7,56	7,56	7,55	32,8172	52,0923	51,2769	4,42
05	7,18	7,41	7,20	7,26	91,4897	111,3440	110,4000	4,99
06	7,63	7,03	7,56	7,41	32,4742	52,4500	51,4084	5,50
07	7,89	7,89	7,18	7,65	26,9283	46,7896	45,9360	4,49
08	7,12	7,46	7,56	7,38	29,3010	49,0236	48,0960	4,94
09	7,89	7,12	7,18	7,40	32,8172	52,6520	51,7090	4,99
10	7,56	7,16	7,23	7,32	91,4897	111,0110	110,0980	4,91

Muestreo N°: 01 Tiempo muestral: 0 días

Presión ambiente: (716,02 ± 0,05) mmHg Temperatura ambiente: (29,10 ± 0,5) °C

APÉNDICE B: Tablas de datos y resultados
TABLA B.1.11
**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO EN CADA
BIORREACTOR PARA EL PRIMER TIEMPO MUESTRAL**

Biorreactor Nº	Masa recolectada ($M_{rec} \pm 0,0001$)g	Hora de recolección (hh,mm)	Unidades formadoras de colonias ($CB \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC/g
01	30,2812	5:46pm	$8,10 \times 10^4$
02,03,04	30,0126	5:27pm	$8,80 \times 10^5$
05,06,07	30,1640	5:44pm	$2,00 \times 10^5$
08,09,10	30,8122	5:24pm	$1,60 \times 10^6$

Muestreo Nº: 01 Tiempo muestral: 0 días

Fecha de recolección: 24/10/2007

B.2 TABLAS DE RESULTADOS
TABLA B.2.1
**HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO PARA CADA TRATAMIENTO
EN LOS RESPECTIVOS TIEMPOS MUESTRALES**

Tiempo muestral (días)	Hidrocarburos totales de petróleo (HTP $\pm 0,02$)%			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	5,58	5,58	5,58	5,58
5	5,32	5,05	5,26	4,99
9	5,30	4,93	5,03	4,49
14	5,20	4,07	4,89	3,74
22	5,10	3,47	4,66	2,54

TABLA B.2.2
PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN PARA CADA TRATAMIENTO
EN LOS RESPECTIVOS TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Porcentaje de degradación ($P \pm 0,02$)%			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,54	9,48	5,67	10,48
9	4,89	11,60	9,85	19,53
14	6,74	26,91	12,28	32,91
22	8,50	37,72	16,36	54,48

TABLA B.2.3
CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (CARGA BACTERIANA
MESÓFILA) PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS RESPECTIVOS
TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Carga bacteriana ($\text{Log}_{10}[\text{UFC}] \pm 0,01$) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	4,91	5,94	5,30	6,20
5	7,08	7,18	6,45	7,26
9	6,67	7,36	6,41	7,15
14	4,36	6,91	6,80	6,91
22	5,04	5,53	5,53	6,52

TABLA B.2.4
POTENCIAL DE ACIDEZ PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS RESPECTIVOS
TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Potencial de acidez (pH \pm 0,01) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	7,31	7,54	7,44	7,36
5	7,23	7,14	7,28	7,35
9	7,06	7,08	7,14	7,12
14	6,62	6,47	6,25	6,47
22	6,49	6,16	6,17	6,16

TABLA B.2.5
HUMEDAD RELATIVA PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS RESPECTIVOS
TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Humedad relativa ($H_R \pm 0,01$) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	4,98	4,96	4,99	4,94
5	4,92	5,02	4,99	4,97
9	4,98	5,05	4,92	4,97
14	4,99	4,97	5,06	5,05
22	4,99	4,94	5,01	5,00

TABLA B.2.6
FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS SATURADOS PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS
RESPECTIVOS TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Porcentaje de saturados (% Sat \pm 0,8) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	29,8	29,8	29,8	29,8
5	29,9	25,4	30,6	24,9
9	24,8	22,2	27,1	14,8
14	25,8	18,8	22,3	11,0
22	26,7	12,3	23,8	7,2

TABLA B.2.7
FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS
RESPECTIVOS TIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Porcentaje de aromáticos (% Aro \pm 0,8) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	32,9	32,9	32,9	32,9
5	33,4	32,8	29,2	31,3
9	33,8	31,4	30,1	29,2
14	33,1	26,5	30,5	28,6
22	32,1	24,1	30,6	23,7

TABLA B.2.8
FRACCIÓN DE RESINAS PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS
RESPECTIVOSTIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Porcentaje de resinas (% Res \pm 0,8) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	33,0	33,0	33,0	33,0
5	32,5	37,4	36,0	35,8
9	37,1	39,7	38,5	42,2
14	36,9	50,2	42,8	57,0
22	36,9	60,4	41,5	66,7

TABLA B.2.9
FRACCIÓN DE ASFALTENOS PARA CADA TRATAMIENTO EN LOS
RESPECTIVOSTIEMPOS MUESTRALES

Tiempo muestral (días)	Porcentaje de asfaltenos (% Res \pm 0,8) adim			
	Patrón	Estiércol equino	Humus líquido	Eisenia Foétida
0	4,3	4,3	4,3	4,3
5	4,3	4,2	4,3	4,2
9	4,3	3,9	4,3	4,0
14	4,3	3,8	4,5	3,5
22	4,3	3,6	4,1	2,4



C. MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

En este apéndice se reflejan los fundamentos teóricos básicos de las técnicas de análisis instrumental ejecutadas durante el desarrollo de la investigación.

C.1 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

La cromatografía es un procedimiento de separación de los constituyentes de una mezcla. Es un método de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmobilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación.

Primero se inmobiliza en una columna un sólido finamente dividido llamado fase estacionaria. Se coloca en la parte superior de la columna un pequeño volumen de muestra que hay que separar. Se fuerza a la mezcla disuelta, a través de la fase móvil, a atravesar la columna de arriba abajo para arrastrar los diversos constituyentes. Si los compuestos de la mezcla migran a velocidades diferentes, podrán recogerse separadamente. Para un mejor entendimiento de lo descrito anteriormente obsérvese la figura C.1, en donde se muestra la elución de dos especies a través de una columna cromatográfica.

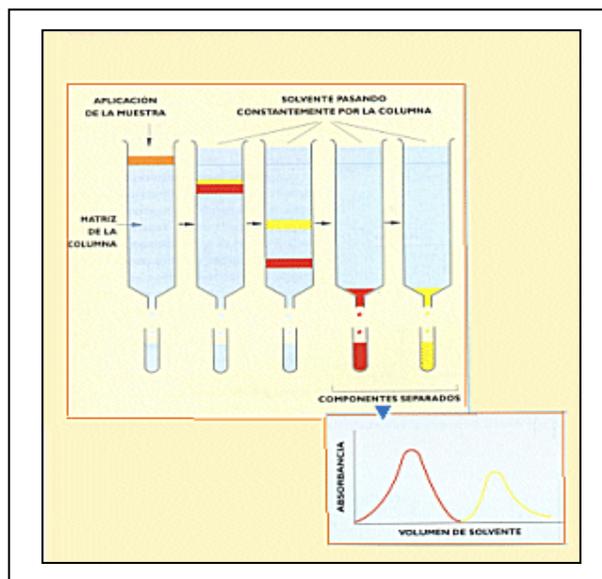


Figura C.1: Elución de dos fracciones distintas a través de la columna cromatográfica (Rouessac F., 2003).

C.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases (CG) es una técnica muy extensa, el cual requiere para su separación, que los compuestos estén en estado gaseoso, el análisis de los líquidos o sólidos implica poder transformarlos en vapor por calentamiento. Es, sin duda, el principal obstáculo antes de elegir esta técnica, puesto que limita su empleo al estudio de los compuestos moleculares termoestables y suficientemente volátiles.

Un equipo (CG) está compuesto de tres módulos específicos: un inyector, una columna y un detector, reunidos en una única instalación. La fase móvil que arrastra la muestra a través de la columna es un gas, llamado gas portador. Los caudales controlados con precisión, permiten una gran repetitibilidad de los tiempos de retención. El análisis comienza en el momento que se introduce una pequeña cantidad de muestra en forma líquida o gaseosa en el inyector, que tiene la doble función de transformar a estado vapor y de introducirlo en el seno de la corriente gaseosa en el principio de la columna. La columna esta situada en un recinto a temperatura controlada. La fase gaseosa a la salida de la columna pasa por el detector antes de salir al aire libre.(véase figura C.2)

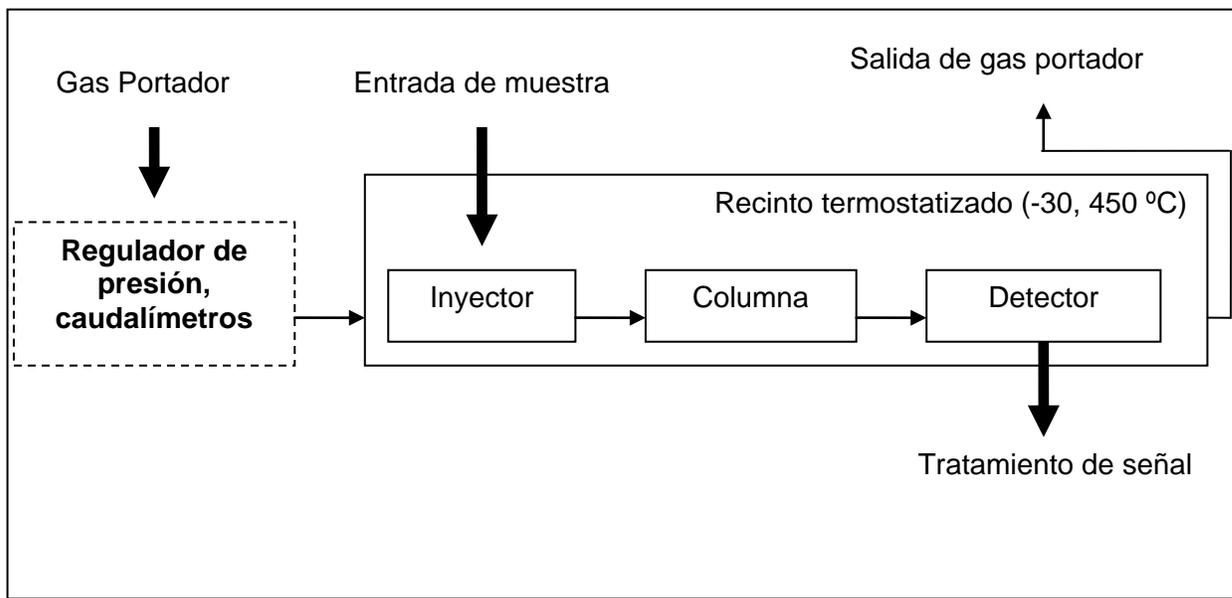


Figura C.2: Conformación básica de un equipo de cromatografía de gases (Rouessac F., 2003).

C.3 ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La Resonancia Magnética Nuclear se fundamenta en la absorción de energía (radiofrecuencia) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. El espectro de resonancia magnética nuclear da una gran cantidad de información acerca de la estructura del compuesto, y se puede determinar algunas estructuras solo con el empleo del espectro RMN.

Sin embargo, se emplea en conjunto con otras formas de espectroscopia y con análisis químico para determinar la estructura de moléculas orgánicas complicadas.

Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Como el carbono y el hidrógeno son los componentes principales de las moléculas orgánicas, para los químicos son muy útiles el protón (^1H) y el carbono 13 (^{13}C). Así se entiende que la “resonancia magnética nuclear” quiere decir “resonancia magnética de protones” a menos que se especifique otro núcleo.

Estos tipos de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espines, iguales que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y además un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético (véase figura C.3) los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α (alfa), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β (beta).

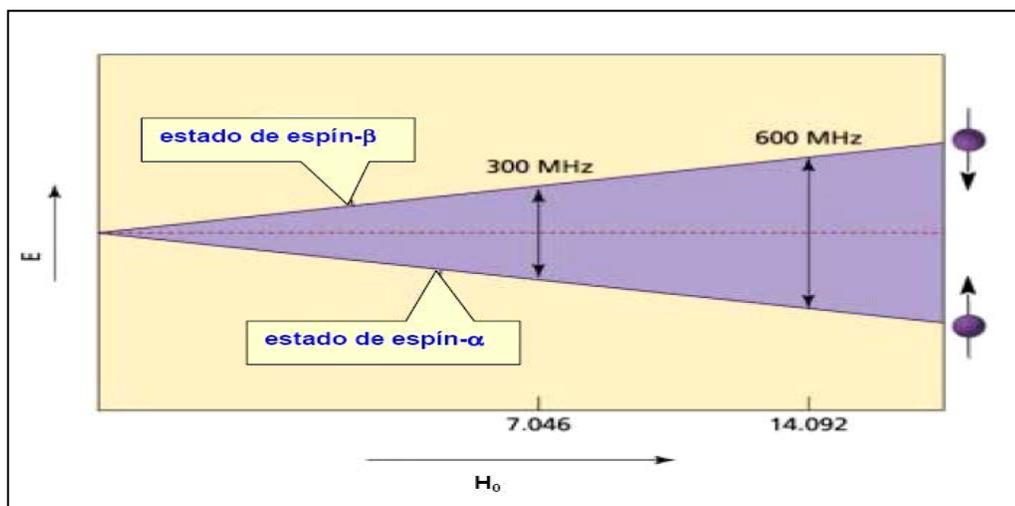


Figura C.3: Orientación de los Espines nucleares al aplicar un campo magnético. Fuente: RMN Artículos científicos Geocities.

La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado (H_0). Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. (véase figura C.4)

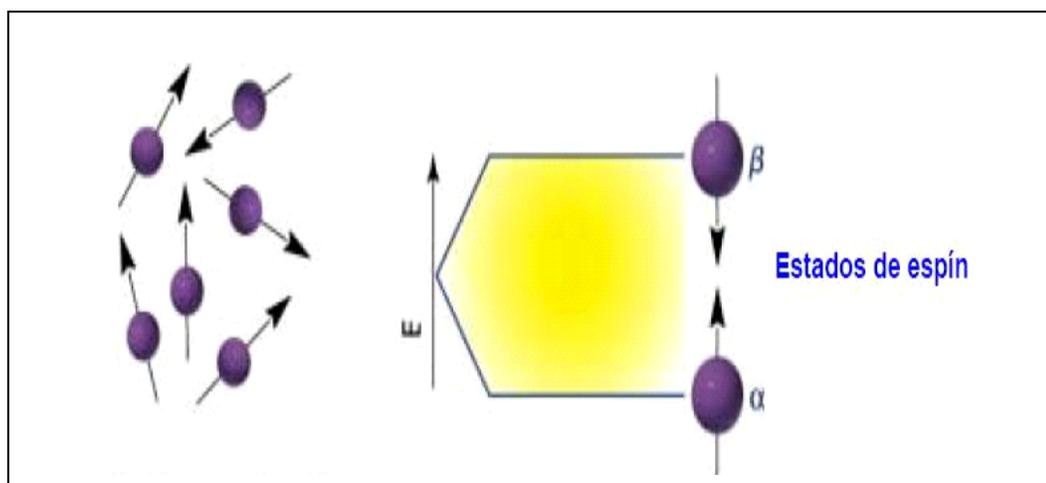


Figura C.4: Variación de la energía entre los estados de espín α y β a medida que aumenta la fuerza del campo magnético aplicado. Fuente: RMN Artículos científicos Geocities.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado

APÉNDICE C: Métodos instrumentales de análisis

de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación (rf). Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos.

Los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear es decir espectrómetro de RMN son:

- Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
- Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
- Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical.

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN). Un espectro FT-RMN puede registrarse en 2 segundos utilizando menos de 5

APÉNDICE C: Métodos instrumentales de análisis

mg de muestra. Las muestras, generalmente son disoluciones en disolventes que no tenga átomos de hidrogeno.

Frecuentemente se usan el deuterocloroformo, hexadeuterodimetilsulfóxido, oxido de deuterio, deuterobenceno, deuteropiridina y otros. Las cantidades de muestra necesaria oscilan entre 1 y 50 mg. Dependiendo del núcleo a observar, el tipo de experiencia y del peso molecular de la muestra. La figura C.5, muestra algunos desplazamientos de moléculas comunes:

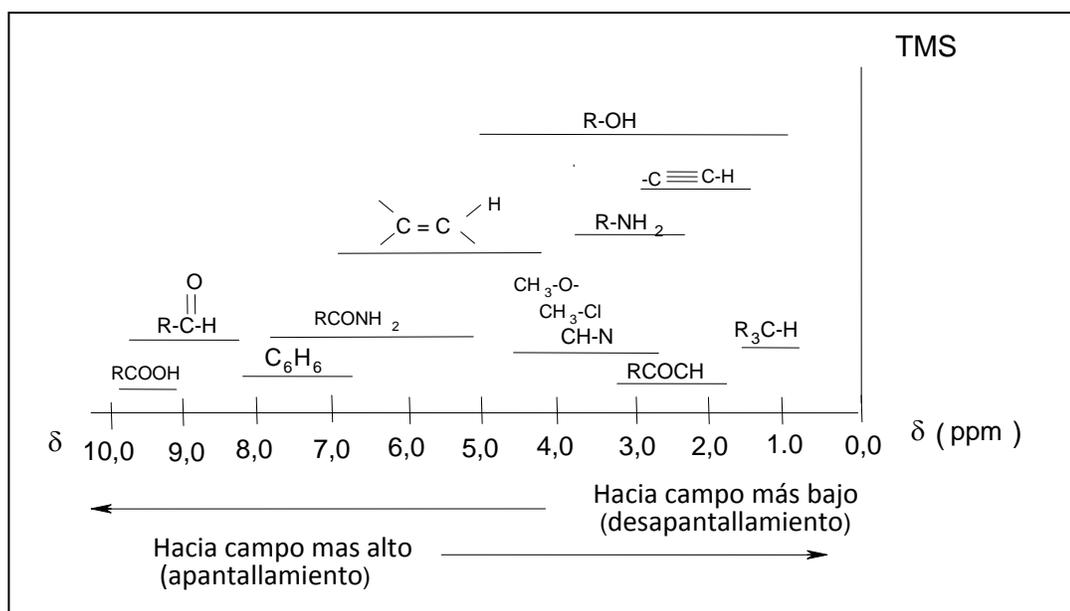


Figura C.5: Desplazamiento químico de las estructuras de los principales protones que aparecen en un espectro de RMN-1H. Fuente: RMN Artículos científicos Geocities.



D. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este apéndice se muestran los principales resultados arrojados por el software estadístico Statistix 8.0 en la verificación de las diversas variables monitoreadas

APÉNDICE D: Análisis estadístico

D.1 Análisis de la variable hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Statistix 8.0 23/02/2008, 02:16:08 p.m.

Randomized Complete Block AOV Table for HTP

Source	DF	SS	MS	F	P
TIEMPO	4	6.3706	1.59264		
REACTOR	3	3.2239	1.07464	4.89	0.0191
Error	12	2.6398	0.21999		
Total	19	12.2343			

Grand Mean 4.8180 CV 9.73

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	2.52251	2.52251	236.52	0.0000
Remainder	11	0.11732	0.01067		

Relative Efficiency, RCB 2.24

Means of HTP for REACTOR

REACTOR	Mean
1	5.3000
2	4.6200
3	5.0840
4	4.2680

Observations per Mean 5
Standard Error of a Mean 0.2098
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2966

Figura D.1.1: Resultados del análisis de varianza para los hidrocarburos totales de petróleo.

Statistix 8.0 23/02/2008, 02:17:13 p.m.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HTP for REACTOR

REACTOR	Mean	Homogeneous Groups
1	5.3000	A
3	5.0840	AB
2	4.6200	AB
4	4.2680	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2966
Critical Q Value 4.199 Critical Value for Comparison 0.8808
Error term used: TIEMPO*REACTOR, 12 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Figura D.1.2: Resultados de la prueba de Tukey para los hidrocarburos totales de petróleo.

APÉNDICE D: Análisis estadístico

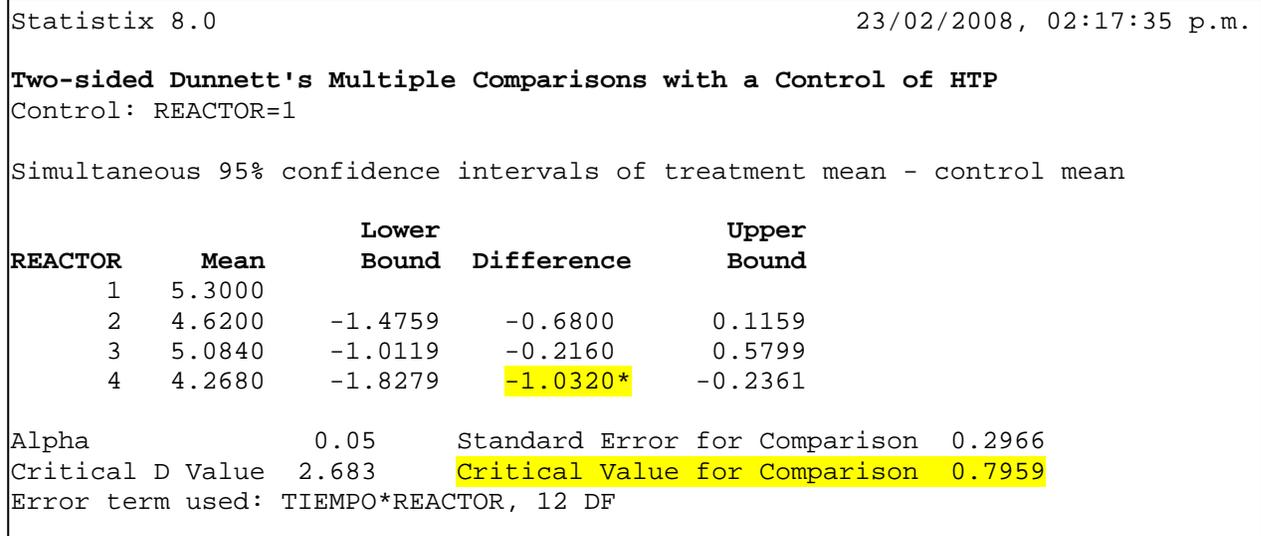


Figura D.1.3: Resultados de la prueba de Dunnett para los hidrocarburos totales de petróleo.

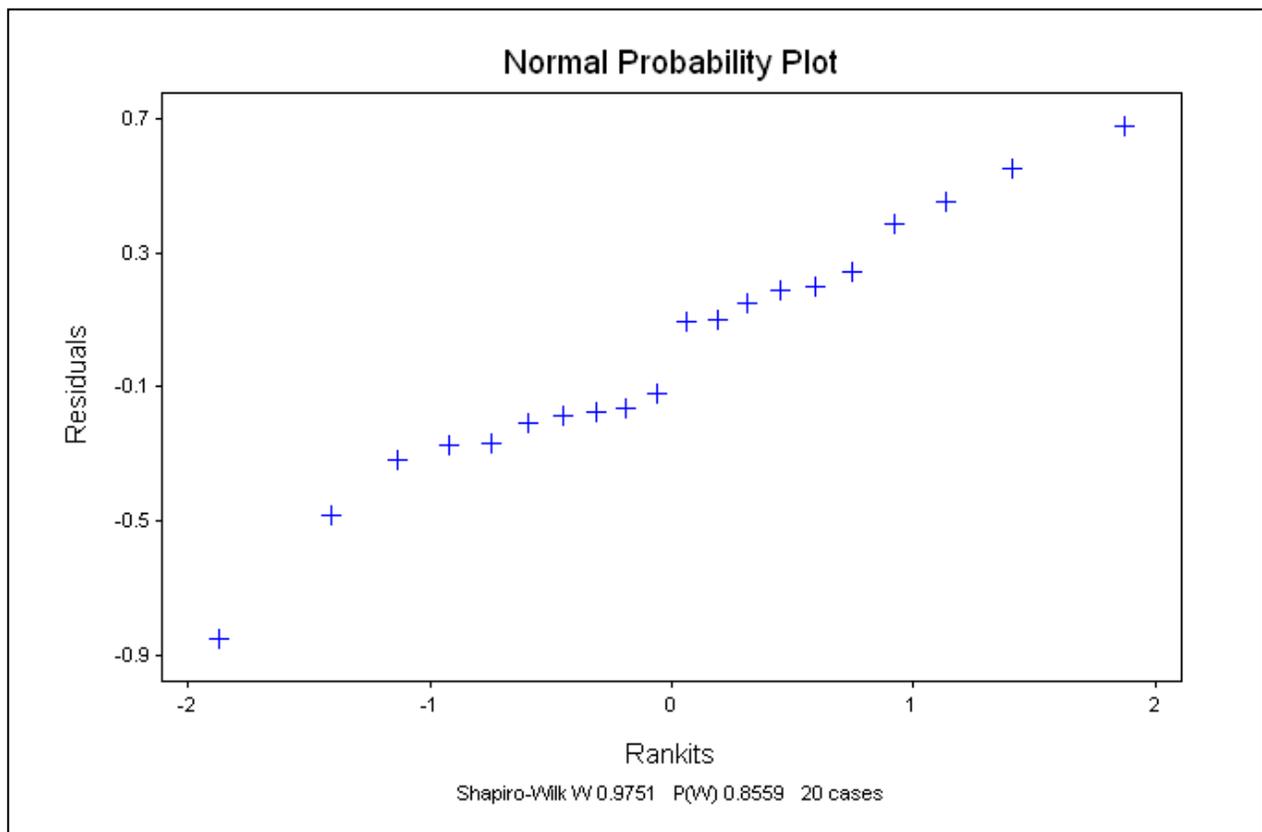


Figura D.1.4: Aplicación de la prueba de Shapiro - Willk para los hidrocarburos totales de petróleo.

APÉNDICE D: Análisis estadístico

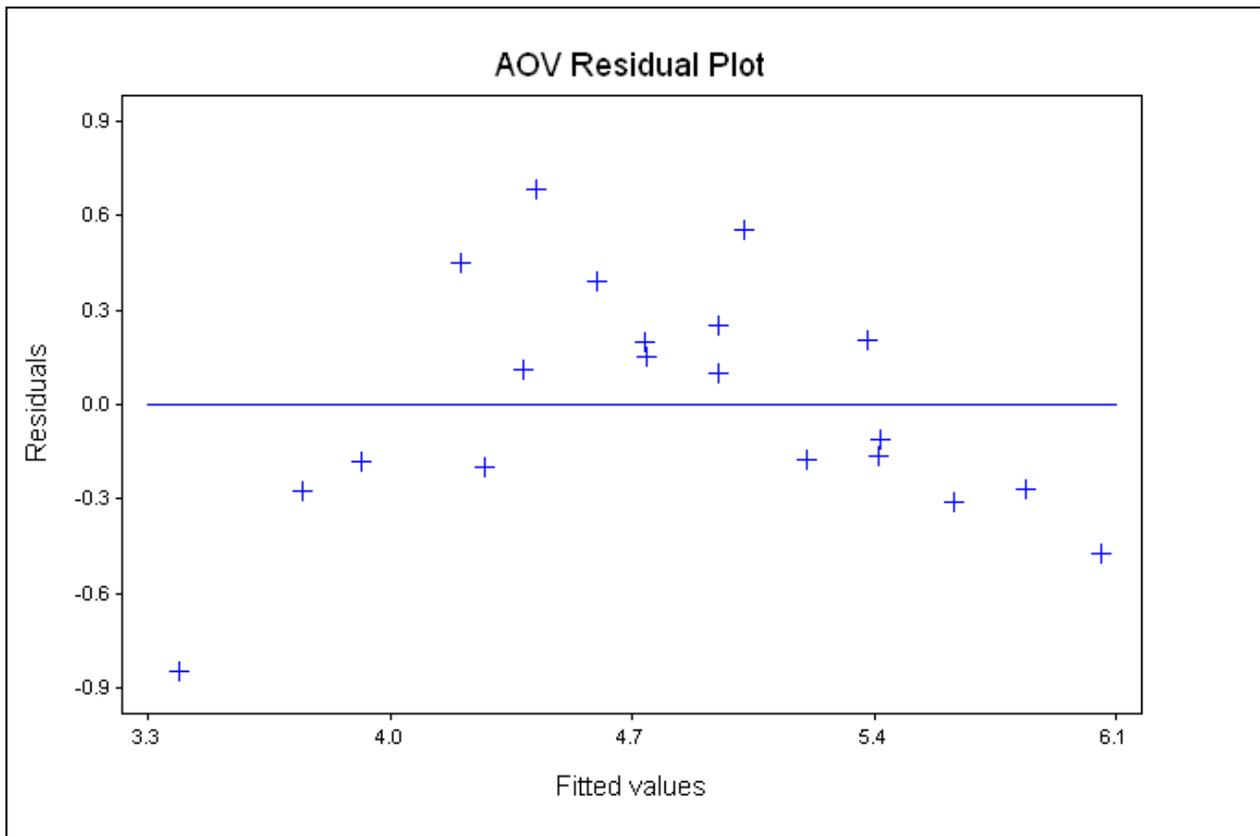


Figura D.1.5: Verificación del supuesto de homogeneidad mediante el gráfico de residuos por valores fijos de hidrocarburos totales de petróleo.



E. ANÁLISIS ECONÓMICO

En este apéndice se muestra el análisis económico realizado a cada uno de los tratamientos empleados en el proceso de degradación.

APÉNDICE E: Análisis económico

E. ESTIMACIÓN DE LA RELACIÓN COSTO BENEFICIO

La estimación del siguiente análisis económico, pretende evaluar las diversas alternativas aplicadas en el presente estudio mediante la realización de un análisis costo-beneficio, en donde se consideran los siguientes aspectos:

- La estimación de precios se realizó en función de fuentes variables, por lo que los mismos están sujetos a cambios.
- Cada tratamiento se corrió por triplicado, en donde se trató una alícuota de aproximadamente 1500 g de suelo contaminado por biorreactor.
- Se desprecian los costos concernientes a mano de obra, ya que el trabajo fue realizado por los autores.
- Se desprecian los costos de la cantidad de agua de riego empleada, por ser no significativos para el presente estudio (despreciables).
- El tiempo de experimentación fue de 22 días continuos de tratamiento, ya que la evaluación que se realiza es a microcosmos, en escala de laboratorio.
- Se consideran cinco tiempos muestrales en los cuales se evalúa cada una de las variables a monitorear durante el proceso, la necesidad de tener un biorreactor de control aumenta en un 10 % el costo de cada tratamiento.

E.1 ESTIMACIÓN DE LA INVERSIÓN INICIAL A REALIZAR

Para llevar a cabo el experimento es necesario realizar una cierta inversión inicial, la cual puede resumirse en la determinación de los siguientes costos

APÉNDICE E: Análisis económico

E.1.1 Costos de montaje de los biorreactores:

Este egreso involucra los costos que se reflejan en la tabla E.1.

TABLA E.1
COSTOS RELATIVOS ASOCIADOS AL MONTAJE DE LOS BIORREACTORES

Descripción	Costo (C ± 0,01) Bs.F /unidad
Envases plásticos de (30 x 20 x 15) cm	3,00
Tapa de malla plástica	1,00
Costos adicionales para el montaje	1,00

Los costos netos para el montaje de tres biorreactores por tratamiento es de (13,00 ± 0,01) Bs.F.

E.1.2 Costos de los agentes bioestimulantes

Los costos de los agentes bioestimulantes empleados para llevar a cabo cada uno de los tratamientos propuestos se revelan en la tabla E.2.

TABLA E.2
COSTOS RELATIVOS ASOCIADOS A LA ADQUISICIÓN DE LOS
AGENTES BIOESTIMULANTES

Tratamiento	Costo relativo	Cantidad total a utilizar
Estiércol equino maduro	0,13 Bs.F/kg	1,05 kg
Humus líquido de lombriz	0,35 Bs.F/kg	0,57kg
Especímenes de Eisenia Foétida	0,10 Bs.F/unidad	45 unidades

Para el tratamiento con estiércol equino el costo equivale a (0,14 ± 0,01) Bs.F, para el tratamiento con humus líquido genera un costo de (0,20 ± 0,01) Bs.F; mientras que el

APÉNDICE E: Análisis económico

tratamiento con Eisenia Foétida tiene un costo aproximado de $(4,50 \pm 0,01)$ Bs.F, y como además se necesita estiércol para dicho tratamiento el costo total neto es de $(4,64 \pm 0,01)$ Bs.F.

E.1.3 Costos de la caracterización inicial del suelo

Los diversos análisis realizados al suelo, se llevaron a cabo en el Laboratorio de ecología de plantas acuáticas del Instituto de zoología tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, Caracas y en el Laboratorio general de suelos del Instituto de edafología de la facultad de agronomía de la UCV, núcleo Maracay. Los precios de los análisis se describen en la tabla E.3.

TABLA E.3
COSTOS ASOCIADOS A LA CARACTERIZACIÓN
INICIAL DEL SUELO VIRGEN

Descripción	Costo total ($C_T \pm 0,01$) Bs.F
Capacidad de intercambio catiónico	8,00
Saturación con bases	6,00
Relación de absorción de sodio	8,00
Calcio total	2,00
Potasio total	2,00
Sodio total	2,00
Magnesio total	2,00
Conductividad eléctrica	2,00
Fósforo total	2,00
Potencial de acidez	2,00
Materia orgánica	2,50
Nitrógeno	2,50
Textura	3,00
Aluminio intercambiable	6,00

APÉNDICE E: Análisis económico

Los costos de caracterización del suelo virgen equivalente a un valor aproximado de (50,00± 0,01) Bs.F.

E.1.4 Costos de la caracterización del humus líquido y estiércol equino

Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio general de suelos del Instituto de edafología de la facultad de agronomía de la UCV, núcleo Maracay. Los precios de los análisis se muestran en la tabla E.4.

TABLA E.4
COSTOS ASOCIADOS A LA CARACTERIZACIÓN INICIAL DE
LOS AGENTES BIOESTIMULANTES

Descripción	Costo total ($C_T \pm 0,01$) Bs.F
Nitrógeno total	16,00
Fósforo total	12,00
Materia orgánica	10,00

Para cada agente bioestimulante la caracterización tiene un valor aproximado de (38,00 ± 0,01) Bs.F.

E.1.5 Otros costos

Dependiendo de los resultados expresados por los análisis anteriores, surge la necesidad de realizar el encalado del suelo, así como también la caracterización inicial del crudo, lo que se traduce en los costos mostrados en la tabla E.5.

TABLA E.5
COSTOS ASOCIADOS CON LA CARACTERIZACIÓN DEL CRUDO Y ACONDICIONAMIENTO
DEL SUELO PARA EL PROCESO DE DEGRADACIÓN

Descripción	Costo total ($C_T \pm 0,01$) Bs.F
Caracterización SARA del crudo	75,00
Costo de encalado del suelo	60,00

Aparte para cada tratamiento, se deben gastar adicionalmente los costos reflejados en la tabla anterior para acondicionar el suelo y caracterizar el crudo, lo que equivale a aproximadamente ($210 \pm 0,01$) Bs.F.

E.2 ESTIMACIÓN DE LOS COSTOS DE SEGUIMIENTO ASOCIADOS A CADA TIEMPO MUESTRAL DURANTE EL BIOTRATAMIENTO.

Para cada tiempo muestral establecido se deben evaluar ciertos variables de seguimiento las cuales tienen un costo que se sugiere en la tabla E.6.

TABLA E.6
COSTOS RELATIVOS ASOCIADOS CON EL SEGUIMIENTO DE LAS DIVERSAS VARIABLES
ESTUDIADAS EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Descripción	Costo relativo ($C_R \pm 0,01$) Bs.F/muestra
Caracterización SARA del crudo	75,00
Análisis de hidrocarburos totales de petróleo	60,00
Carga bacteriana	70,00
Potencial de acidez	2,00
Humedad relativa	5,00
Espectros de RMN-1H de resinas y asfaltenos	20,00
Cromatograma a fracciones saturadas	20,00

APÉNDICE E: Análisis económico

Los costos netos de seguimiento de las técnicas de aproximadamente $(252,00 \pm 0,01)$ Bs.F /tiempo muestral.

E.3 REPRESENTACIÓN DE LOS COSTOS EN LA ESCALA DE TIEMPO Y ESTIMACIÓN DE LOS COSTOS NETOS POR TRATAMIENTO

Cada uno de los costos establecidos anteriormente se puede establecer en la escala de tiempo muestral, tal como lo muestra la figura E.1.

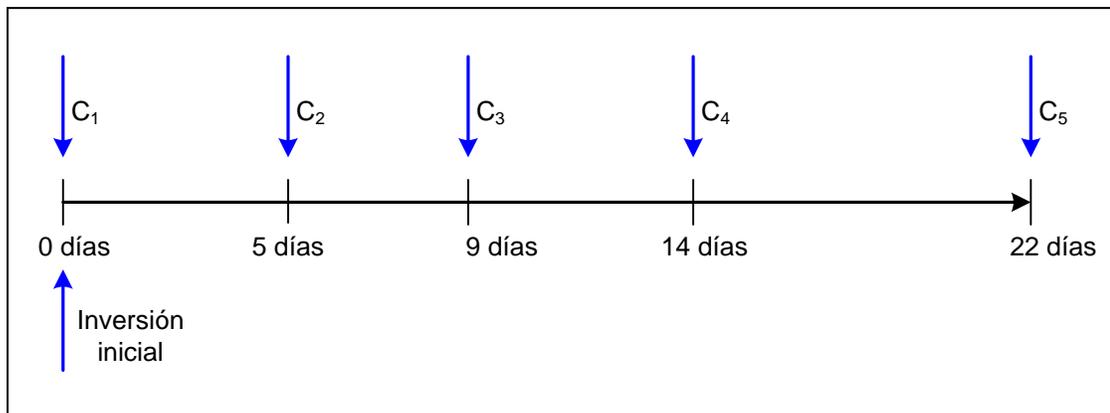


Figura E.1: Evaluación de costos para cada tiempo muestral durante la aplicación de cada el biotratamiento.

En la figura anterior, se tiene una inversión inicial que es distinta según el tipo de tratamiento a llevar a cabo y los costos de seguimiento (C_n), se consideran iguales para cada tiempo muestral y para cada tratamiento.

En este orden de ideas la inversión inicial para cada tratamiento y los costos por tiempo muestral se reflejan en tabla E.7.

TABLA E.7
COSTOS TOTALES ASOCIADOS A LA APLICACIÓN DE LAS DIVERSOS
TRATAMIENTOS DE BIORREMEDIACIÓN

Tipo de tratamiento	Inversión inicial ($I_0 \pm 0,01$) Bs.F	Inversión inicial con biorreactor patrón ($I_{OP} \pm 0,01$) Bs.F	Costos de seguimiento netos ($C_S \pm 0,01$) Bs.F
Estiércol equino	236,14	259,75	1260
Humus líquido	236,20	259,82	
Eisenia Foétida	240,64	264,70	

En donde en la columna inversión inicial se refleja la sumatoria de todos los costos asociados a la inversión que inicialmente se hace por tratamiento y en la columna costos de seguimiento el valor de evaluar todas las variables a monitorear en los cinco días de tratamiento. No obstante, como para cada tratamiento se debe tener un control a este se le atribuye un valor de un 10 % de la inversión inicial por tratamiento, los costos netos se muestran en la tabla E.8.

TABLA E.8
COSTOS NETOS DE CADA TRATAMIENTO TOMANDO EN CUENTA EL
VALOR DEL BIOREACTOR DE CONTROL

Tipo de tratamiento	Costo neto ($C_N \pm 0,01$) Bs.F
Estiércol equino	1519,75
Humus líquido	1519,82
Eisenia Foétida	1524,70

E.4 ESTIMACIÓN DE LOS BENEFICIOS ADQUIRIDOS EN FUNCIÓN DE CADA TÉCNICA APLICADA.

Para la estimación de los beneficios debe tenerse en cuenta que existen aquellos que se pueden estimar cuantitativamente y otros que no, lo que representa un sesgo en el análisis

APÉNDICE E: Análisis económico

costo beneficio. Según De Sousa y Domínguez, 2002 la técnica más empleada para tratar este tipo de desechos es la deposición de los desechos en un relleno sanitario, la cual para tratar la cantidad de suelo aproximada a la del presente estudio requiere una inversión total de aproximadamente $(3200,00 \pm 0,01)$ Bs.F. (Tomando en consideración la evaluación efectiva de la técnica)

E.5 ESTIMACIÓN DE LA RELACIÓN COSTO-BENEFICIO DE CADA TRATAMIENTO.

Lo anterior significa que los beneficios reales de la técnica corresponden a la diferencia entre el costo neto de otra técnica que compita con la biorremediación (relleno sanitario) y el costo neto de cada tratamiento aplicado. Con lo que es posible determinar una relación de costos-beneficios, tal como se muestra a en la tabla E.9.

TABLA E.9

ANÁLISIS COSTO/BENEFICIO PARA CADA TRATAMIENTO APLICADO

Tipo de tratamiento	Costo neto ($C_N \pm 0,01$) Bs.F	Beneficio neto ($B_N \pm 0,01$) Bs.F	Relación costo/beneficio ($T_R \pm 0,2$) %
Estiércol equino	1519,75	1680,25	110,6
Humus líquido	1519,82	1680,18	110,6
Eisenia Foétida	1524,70	1675,30	109,8

Los resultados predicen que la actividad económica es rentable, ya que se obtienen porcentajes mayores al 100 %. No obstante, este análisis está sesgado por los beneficios que no son atribuibles cuantitativamente, razón por la cual es necesario el cálculo del tiempo de retorno de la inversión. En este orden de ideas, se pueden representar los beneficios y los costos establecidos en función de la escala del tiempo, suponiendo que se obtiene un igual beneficio a partir del quinto día en cada día de tratamiento, como lo establecen De Sousa y Domínguez, 2002.

E.6 REPRESENTACIÓN DE LOS COSTOS – BENEFICIOS EN LA ESCALA DE TIEMPO Y ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE RECUPERACIÓN DE LA INVERSIÓN.

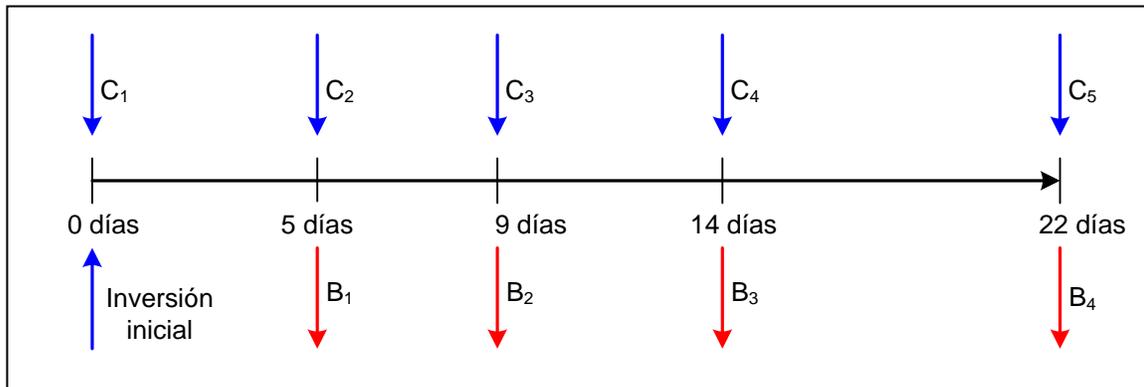


Figura E.2: Evaluación de costos-beneficios para cada tiempo muestral durante la aplicación del biotratamiento.

La tabla E.10 muestra el tiempo de recuperación de la inversión, en donde en la columna costo neto se colocan para cada tiempo los costos mostrados en la figura E.2, nótese que para el tiempo muestral cero el costo neto está representado por la inversión inicial más lo que cuesta el monitoreo de las variables a tiempo cero para un total de $(511,75 \pm 0,01)$ Bs.F y para dicho tiempo no se obtienen beneficios.

Para el segundo tiempo muestral, tal como lo indica la figura E.2, el único costo corresponde al de monitorear las variables para ese tiempo $[(252,00 \pm 0,01)$ Bs.F], y el beneficio es el resultado de dividir equitativamente el beneficio neto mostrado en la tabla E.9 por cada tiempo muestral $[(438,56 \pm 0,01)$ Bs.F], a partir del quinto día. Pudiéndose calcular los beneficios netos obtenidos en cada tiempo $[(186,56 \pm 0,01)$ Bs.F]. Ahora bien, se recupera la inversión cuando la sumatoria de estos beneficios netos esté por encima del valor inicial invertido, que para el caso del tratamiento con estiércol equino la inversión se recupera al día catorce con una ganancia aproximada al 9 % del valor inicial.

TABLA E.10
TIEMPO DE RECUPERACIÓN DE LA INVERSIÓN PARA EL TRATAMIENTO
CON ESTIÉRCOL EQUINO

Tiempo muestral	Costo neto por tiempo muestral ($C_{NTM} \pm 0,01$) Bs.F	Beneficios por tiempo muestral ($C_{NTM} \pm 0,01$) Bs.F	Beneficio neto ($B_N \pm 0,01$) Bs.F
0	511,75	0,00	0,00
5	252,00	438,56	186,56
9	252,00	438,56	186,56
14	252,00	438,56	186,56
Sumatoria beneficio neto (Bs.F)			559,68



F. NORMATIVA AMBIENTAL

En este apéndice se reflejan los artículos más representativos de la normativa ambiental vigente en Venezuela que regulan las disposiciones del biotratamiento.

DECRETO 2635**Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos****(Gaceta Oficial Extraordinaria No 5245 del 3 de agosto de 1998)****CAPITULO III****Del Manejo de los Desechos Peligrosos de Actividades de Exploración y Producción de Petróleo y de Exploración y Explotación de Minerales****SECCION II****De las Disposiciones Técnicas para el Manejo de Desechos Peligrosos Generados por la Exploración y Producción de Petróleo**

Artículo 50.- La práctica de esparcimiento en suelos se llevará a cabo cumpliendo con las siguientes condiciones:

1. El área de disposición final debe estar alejada por lo menos 500 m de cuerpos de agua o fuera de la planicie de inundación de dichos cuerpos, de acuerdo a la información hidrológica existente.
2. La topografía del área de disposición final deberá tener una pendiente menor de 3 %, orientada hacia el cuerpo de agua superficial más cercana.
3. El desecho no debe exceder las concentraciones máximas permisibles en lixiviados, establecidas en el Anexo D de esta norma.
4. La mezcla suelo/desecho debe cumplir con los parámetros establecidos en la lista siguiente:

Potencial de acidez (pH)	5 - 8
Conductividad eléctrica (mmhos/cm)	< 3,5
Cloruros totales (ppm)	< 2.500
Relación de adsorción de Sodio (RAS)	< 8

APÉNDICE F: Normativa ambiental

Aluminio intercambiable (meq/100 gr)	< 1,5
Saturación con bases (%)	> 80
Aceites y grasas (% en peso)	≤ 1
Arsénico	25 mg/kg
Bario	20.000 mg/kg
Cadmio	8 mg/kg
Mercurio	1 mg/kg
Selenio	2 mg/kg
Plata	5 mg/kg
Cromo	300 mg/kg
Cinc	300 mg/kg
Plomo	150 mg/kg

Artículo 53.- La práctica de biotratamiento se llevará a cabo cumpliendo con las siguientes condiciones:

1. Contenido de hidrocarburos biodegradables en el desecho entre 1% y 10%.
2. El desecho no exceda las concentraciones máximas permisibles en lixiviados establecidas en el Anexo D.
3. El desecho tenga un pH entre 6 - 8.
4. Para la aplicación de la técnica de biotratamiento sobre el suelo arable:
 - 4.1. El área de disposición final debe estar conformada por suelos de textura franca, o franco arenosa o franco limosa o franco arcillosa, o acondicionado artificialmente.
 - 4.2. La profundidad del nivel freático debe ser mayor de 4 metros.
 - 4.3. . El área de disposición final no debe ser inundable.

Parágrafo Único: El desecho y el terreno podrán ser acondicionados o tratados para alcanzar las condiciones descritas en este artículo, previo a la aplicación del biotratamiento

TABLA F.1

ANEXO D. (CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMISIBLES EN LIXIVIADOS)

Constituyente	Concentración máxima permitida (mg/L)	Constituyente	Concentración máxima permitida (mg/L)
Arsénico	5,0	Benceno	0,5
Bario	100,00	Eter bis (2-cloro etílico)	0,05
Cadmio	1,0	Clorobenceno	100,0
Cromo hexavalente	5,0	Cloroformo	6,0
Níquel	5,0	Cloruro de metilo	8,6
Mercurio	0,2	Cloruro de vinilo	0,2
Plata	5,0	1,2-diclorobenceno	4,3
Plomo	5,0	1,4-diclorobenceno	7,5
Selenio	1,0	1.2-dicloroetano	0,5
Acrilonitrilo	5,0	1.1-dicloroetileno	0,7
Clordano	0,03	Disulfuro de carbono	14,4
O-cresol	200,0	Fenol	14,4
M-cresol	200,0	Hexaclorobenceno	0,13
P-cresol	200,0	Hexacloro-1,3-butadieno	0,5
Acido 2,4- diclorofenoxiacético	10,0	Isobutanol	36,0
2,4-dinitrotolueno	0,13	Etilmetilcetona	200,0
Endrin	0,02	Piridina	5,0
Heptacloro (y su epóxido)	0,008	1.1.1.2-tetracloroetano	10,0
Hexacloroetano	3,0	1.1.2.2-tetracloroetano	1,3
Lindano	0,4	Tetracloruro de carbono	0,5
Metoxicloro	10,0	Tetracloroetileno	0,7
Nitrobenceno	2,0	Tolueno	14,4
Pentaclorofenol	100,0	1.1.1-tricloroetano	30,0
2,3,4,6-tetraclorofenol	1,5	1.1.2-tricloroetano	1,2



I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En esta sección se describe e identifica el problema que genera el desarrollo de la presente investigación, la situación actual y la deseada, así como el planteamiento de los objetivos propuestos con sus respectivas justificaciones y limitaciones

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El tratamiento biológico de los suelos contaminados con derivados de petróleo en: yacimientos, refinерías, petroquímicas, terminales, estaciones de servicio, tanques de combustible en todos los sectores industriales; presentan características específicas que los distinguen radicalmente de las alternativas convencionales de tratamiento biológico de efluentes, sean industriales o municipales. Existe sin embargo, un importante denominador común en cuanto a los conceptos involucrados, que permiten una comprensión significativa de los problemas que se presentan, así como una razonable evaluación de las posibles alternativas de tratamiento efectivo, en casos como: derrames ocurridos en la zonas aledañas a los pozos petroleros, accidentes de transporte, roturas en redes de distribución o pérdidas de tanques de combustible o solventes, dando lugar a terrenos contaminados con productos industriales de considerable riesgo en ciertos casos.

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural. Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación. (Infante C., 2001)

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos. El objetivo común de estos sistemas consiste en la conversión o transformación de los compuestos contaminantes en agua, anhídrido carbónico u otro gas o sustancia inorgánica y masa celular (biomasa). Dicho de otra manera, suministrar o garantizar un entorno artificial a los efectos de replicar fenómenos que ocurren en la naturaleza. (LaGrega, *et al.*, 2002)

El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial

Capítulo I. Planteamiento del problema

degradativo de consorcios microbianos y de otros organismos vivos como lombrices de tierra de interés en biorremediación. (Canals V., 2005).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a éste (exógenos), y llevarse a cabo en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (in situ), o bien excavando el material para tratarlo fuera de él (ex situ).

Para llevar a cabo la biorremediación de áreas impactadas por derrames de crudos y otros desechos orgánicos con el fin de disminuir y suprimir las fracciones tóxicas como lo son los saturados y aromáticos, mediante la bioestimulación de los microorganismos autóctonos presentes en el sitio de la contaminación, así como a partir de la bioaumentación, es necesaria la aplicación de las diversas etapas que se muestran en la figura 1.1

Es importante resaltar que Venezuela cuenta con un gran parque industrial conformado por empresas que transforman el petróleo crudo, en donde existe un aumento en el deterioro, contagio y desequilibrio de los ecosistemas debido a las emisiones y los residuos que se generan.

Al analizar específicamente el caso de la explotación petrolera en la faja petrolífera del Orinoco, en donde debido al descubrimiento de amplias reservas de petróleo en la zona, se pueden originar contaminación por ripsos de perforación, crudos livianos y pesados, entre otros; en donde se hace necesario la aplicación de diversas técnicas de saneamiento efectivas para cumplir con las exigencias de la normativa ambiental en el país.

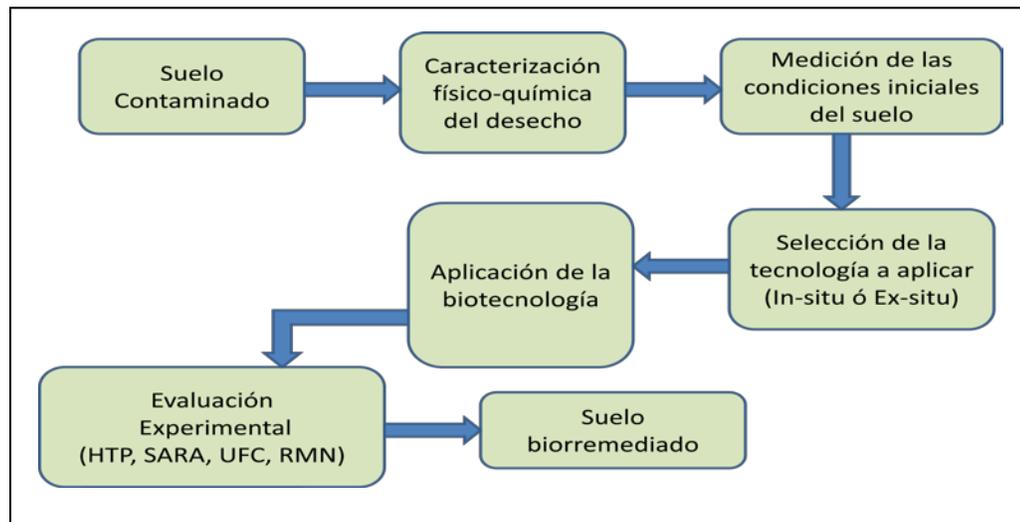


Figura 1.1: Etapas del proceso de biorremediación de suelos contaminados con crudos a partir de técnicas biológicas. (Álvarez y Guevara. 2003)

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores de petróleo como Venezuela. En los suelos el petróleo crudo representa un riesgo para el aire, las aguas subterráneas, la calidad del suelo, la flora y la fauna.

1.2.1 Situación actual

Actualmente en Venezuela se tienen numerosos suelos contaminados con crudos. En la presente investigación se busca aplicar la biorremediación específicamente en el estado Monagas por el sector Cerro Negro, en la faja petrolífera del Orinoco. En donde a partir del empleo de bacterias degradativas y organismos vivos bajo condiciones controladas se logra biodegradar los crudos presentes en los suelos disminuyendo su grado de contaminación, sin embargo, es relevante indicar que en el proceso de degradación se invierte mucho tiempo, situación que limita su uso. También es de gran importancia mencionar que de seguir contaminados estos suelos con el pasar del tiempo pueden crear inmensos daños al ambiente

Capítulo I. Planteamiento del problema

ocasionando así un gran retardo en la restauración de las características naturales de dichos ecosistemas.

1.2.2 Situación deseada

Se requiere disponer de una evaluación del proceso de biorremediación de suelos contaminados con crudos por medio de la lombricultura (earthworm-composting), empleando para ello lombrices rojas californianas (*Eisenia foétida*) y también por medio de la bioaumentación con humus líquido y estiércol equino. Con esto se proponen las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso de degradación en el menor tiempo posible.

En cuanto al alcance, se busca determinar cual es el proceso más adecuado para la biorremediación de los suelos, de manera tal de poder establecer las mejores condiciones para llevarlo a cabo e implantar una metodología que permita el buen seguimiento de las técnicas utilizadas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de degradación del crudo presente en un suelo proveniente de la faja petrolífera del Orinoco mediante la aplicación de técnicas de biorremediación y lombricultura, con el fin de reducir su nivel de contaminación.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las mejores condiciones para la aplicación de técnicas biológicas en suelos contaminados con crudo, con la finalidad de definir las diversas variables a monitorear durante el proceso de biorremediación.

Capítulo I. Planteamiento del problema

2. Determinar la sobrevivencia y desarrollo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*) en suelos contaminados con crudo, con el fin de verificar su adaptación ante un medio tóxico.
3. Realizar la caracterización del crudo a degradar, con la finalidad de determinar las concentraciones iniciales de los compuestos presentes en el mismo.
4. Aplicar las técnicas de biorremediación en suelos contaminados con crudo, con la finalidad de comparar cual de ellas es más eficiente en la degradación de los hidrocarburos presentes en dichos suelos.
5. Realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos, con la finalidad de establecer las diferencias más significativas entre las técnicas aplicadas y seleccionar la más adecuada.
6. Estimar la relación costo-beneficio producto de la implementación de las técnicas de biorremediación, con la finalidad de determinar cual es la más rentable de aplicar desde el punto de vista económico.

1.4 JUSTIFICACIÓN

En Venezuela como en muchos de los países productores de petróleo se sufren de problemas de contaminación de suelos por causa de derrames de crudo, fosas de almacenamiento de desechos de perforación, entre otros. Para que estos sitios recobren nuevamente sus características naturales es necesario el transcurso de cientos de años de atenuación natural de los contaminantes. Para acelerar este proceso existen muchas técnicas tanto físicas como químicas y las más novedosas y amigables desde el punto de vista económico y ambiental son las técnicas biológicas.

Capítulo I. Planteamiento del problema

Para la Universidad de Carabobo esta investigación es de suma importancia ya que le permite contar con una fuente de información referente a la evaluación del proceso de degradación de crudos por medio de técnicas de biorremediación y lombricultura, lo que representa un antecedente a futuras investigaciones que se pueden llevar a cabo en esta área.

En ese mismo sentido, estimula y contribuye a ampliar la capacidad del ingeniero químico para solventar problemas que se puedan presentar ante este tipo de inconvenientes presentes en la industria.

1.5 LIMITACIONES

Dentro de las principales limitaciones que se pudieran presentar durante el desarrollo de la presente investigación, se encuentra la adquisición de las lombrices rojas californianas Eisenia foétida y su adaptación al medio contaminado en donde serán expuestas.

Otra limitación es el tiempo de biodegradación natural por medio de las bacterias autóctonas del suelo en el mecanismo de biorremediación a analizar. Además debe tenerse en consideración el alto costo de las pruebas de laboratorio a realizar para la determinación de hidrocarburos totales en los suelos y el manejo de los equipos involucrados para tal fin.



II. MARCO TEÓRICO

En la siguiente sección se muestran una serie de antecedentes nacionales e internacionales relacionados con la presente investigación, así como los principales fundamentos teóricos necesarios para el conocimiento global del tema.

2.1 ANTECEDENTES

Se han realizado una gran cantidad de estudios basados en la degradación del petróleo crudo presente en los suelos, por medio de técnicas de biorremediación y lombricultura, tal es el caso de los siguientes autores:

Araujo Ismenia *et al.* (2006). **Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.** Asociación Interciencia. Caracas Venezuela.

En la presente investigación el objetivo principal consistió en la aplicación de cepas bacterianas y aplicación de lodo estabilizado en la biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos; el cual se basó en cuatro etapas: aislamiento de cepas bacteriana, ensayo de tratabilidad, factibilidad y análisis estadísticos de los resultados.

Tal investigación permitió concluir que las cepas bacterianas fueron las más eficientes en la degradación del gasoil con una remoción máxima de 79 % en 35 días. Adicionalmente los tratamientos donde se utilizó lodo ofrecieron una mayor eficiencia en la degradación de los hidrocarburos que aquellos sin lodo, debido a que su presencia favoreció la actividad bacteriana lográndose una remoción del 90 % en 150 días.

La relación existente entre el trabajo expuesto y el actual es que ambos estudios se basan en la aplicación de la biorremediación por medio del uso de bacterias y de la técnica de compostaje. La diferencia radica en que el trabajo experimental a realizar no se aíslan las cepas bacterianas, así como tampoco se realiza el empleo de una solución de microelementos.

Tomas Hubalek *et al.* (2006). **Monitoreo de la ecotoxicidad de los suelos contaminados con hidrocarburos durante la biorremediación: Un caso de estudio.** Instituto de microbiología. Académia de Ciencias de La República Checa. Praga. República Checa.

Este trabajo de investigación se basó en monitorear la ecotoxicidad de los suelos contaminados con hidrocarburos durante el proceso de biorremediación por bacterias autóctonas, para ello se utilizaron diferentes organismos vivos, entre ellos lombrices de tierra y hongos observándose su comportamiento durante el proceso de biorremediación.

Como resultado se obtuvo que la *Eisenia foétida* soportó mejor las condiciones a las que fue expuesta, 6380 µg/g de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) y logra su reproducción efectiva a partir del tercer mes del experimento con la degradación de la materia orgánica.

Este trabajo corrobora la mejor adaptación de la *Eisenia foétida* como agente degradador de la materia orgánica bajo condiciones de altas concentraciones de hidrocarburos en los suelos. La diferencia principal radica en el hecho que en este antecedente solo se emplean las lombrices de tierra para verificar la toxicidad del suelo más no como un ente degradador, ya que para ello se emplea una solución bacteriológica; mientras que en la investigación en estudio se usa a la *Eisenia foétida* como un promotor de la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo.

Canals Viñas Marc (2005) **Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica**. Universidad de Barcelona. Facultad de biología. Departamento de microbiología. Barcelona. España

El objetivo general de esta investigación fue estudiar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, y al disponer de distintos consorcios microbianos, se planteó caracterizar catabólicamente estos consorcios para su posible inoculación (bioaumentación) en suelos contaminados por distintos productos petrolíferos. Para ello, se caracterizaron catabólicamente tres consorcios microbianos adaptados a diferentes familias de hidrocarburos: gasoil, fracción saturada de crudo de petróleo pesado y una mezcla de 5 HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos) respectivamente. Se utilizó un crudo de petróleo ligero como representante de una matriz compleja de hidrocarburos, que incluye todas las familias de

hidrocarburos de interés. Se caracterizó el tipo de biodegradación llevada a cabo en las diferentes fracciones químicas del crudo, por cada uno de los tres consorcios, simulando o no, condiciones de bioaumentación, empleando para ello diversas pruebas como SARA (Saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos).

Como resultado más relevante se logró la degradación más efectiva a partir de los consorcios microbianos adaptados a cada crudo en particular mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en el menor tiempo posible de remediación.

La similitud de este antecedente con la investigación que se lleva a cabo involucra el desarrollo metodológico como tal y la realización de las pruebas destinadas para realizar el seguimiento, tales como el HTP y SARA. No obstante, en dicho antecedente solo se trabajan con consorcios bacterianos y no con organismos multicelulares vivos como las lombrices de tierra como medio para seguir la ecotoxicidad del proceso de biorremediación

Schaefer Maïke *et al.* (2006). **Efectos de la *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* y *Eisenia foëtida* sobre las comunidades dinámicas microbianas en los suelos contaminados por petróleo.** Departamento de Ecología teórica y General. Centro de Tecnología e Investigación ambiental. Universidad de Bremen. Alemania

El objetivo principal de esta investigación fue identificar los efectos de la utilización de organismos vivos como: *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* y *Eisenia foëtida* en las comunidades microbianas de los suelos contaminados con petróleo. El enfoque de este estudio fue caracterizar la dinámica microbiana y la comunidad bacteriana en el suelo contaminado por petróleo incubado con y sin las lombrices. Se empleó un suelo contaminado con 10.000 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). En dichos suelos, la respiración y la concentración de la biomasa microbiana fueron realizadas perceptiblemente por la presencia de las lombrices alimentadas con estiércol del ganado, y las concentraciones de HTP disminuyeron perceptiblemente.

Los resultados demostraron que las lombrices pueden contribuir positivamente al biorremediación del suelo contaminado con petróleo, pero que el efecto puede ser especie-dependiente, obteniéndose mayor degradación con el empleo de la Eisenia foétida.

Este antecedente presenta similitud con la investigación que se quiere llevar a cabo en la realización de los distintos análisis fisicoquímicos y microbiológicos, tales como las pruebas de TPH, así como en la utilización de la Eisenia foétida como principal ente degradador. A diferencia del antecedente la investigación que se va a llevar a cabo solo se trabajará con una solo tipo de lombriz.

Álvarez José *et al.* (2004). **Biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos**. Centro de Investigaciones del Petróleo. Ciudad de la Habana. Cuba

En este estudio se aplicó la técnica de biorremediación a un área impactada (20 m³) con 58 barriles de petróleo crudo de 14° API (petróleo pesado), aladaña a un pozo de petrolero situado en la república de Cuba. El seguimiento de los tratamientos se realizó mediante análisis químicos y microbiológicos utilizando técnicas de valoración gravimétricas y espectrofotométricas, mensualmente durante 369 días. El área fue humectada y aireada periódicamente mediante un tractor con arado de disco.

Como resultados se obtuvo una disminución en la concentración de hidrocarburos totales del petróleo hasta obtener valores inferiores al 1 % recomendado por las normas internacionales, Se logró recuperar el suelo impactado en un periodo de un año. Se identificaron especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el suelo tratado. No se encontró toxicidad por ninguno de los métodos empleados en el suelo tratado. Se sembraron plantas en el área tratada (Piñón de jardín), que esto no fue efectivo, ya que las plantas autóctonas de la zona resultaron más efectivas, de acuerdo con las condiciones existentes en el suelo.

El análisis económico del proceso de biorremediación arrojó valores dentro del rango internacional estipulado para este tratamiento.

Este antecedente presenta similitud con el trabajo a desarrollar en cuanto a la metodología empleada y en los diversos estudios espectrofotométricos y gravimétricos que se utilizan. La diferencia radica en el hecho que la técnica de biorremediación empleada fue solamente la autóctona, es decir por medio de las bacterias inoculadas al suelo; mientras que en la presente investigación se hace referencia a la biorremediación por lombricultura.

Sánchez Prometeo, *et al.* (2004). **Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán.** Colegio de Postgraduados. Texcoco-México.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la limpieza de los suelos contaminados con petróleo usando pasto alemán (*Echinochloa Polystachya*) asociados con poblaciones autóctonas de bacterias y hongos rizosféricos.

Dentro de las conclusiones de este trabajo se tiene que las bacterias, los hongos y la asociación bacterias-hongos tuvieron las poblaciones más grandes a los 120 días con una diferencia de ($p < 0,05$), en los tratamientos con rizósfera del pasto alemán. Por otra parte la restauración del suelo mediante asociaciones de bacterias, hongos nativos y pastos forrajeros, es una alternativa viable para la limpieza de los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, aunque reduce la producción de biomasa vegetal.

La similitud de este trabajo con la presente investigación radica en la aplicación de biorremediación por medio de microorganismos presentes en los suelos contaminados. La diferencia básica es que en la investigación actual se aplicará una bioaumentación por medio de la adición de sustrato, lombrices y humus líquido; sin necesidad hacer uso del pasto alemán.

Vásquez Ana *et al.* (2004). **Lombricultura para la remediación y postremediación de suelos contaminados con n-alcanos**. Universidad Nacional Autónoma de México. El Rosario. Atzacapotzalco. México

Este experimento consistió en utilizar a la lombriz compostera *Eisenia sp.* como organismo central del proceso para la eliminación de los residuos presentes en los suelos contaminados. Además se estudiaron las interacciones posibles entre la *Eisenia sp.* tanto con una bacteria degradadora (*Pseudomonas aeruginosa*) de parafina; así como con la microflora nativa del residuo industria, usando modelos a escala de ecosistemas contaminados.

Entre las conclusiones más importantes de este trabajo se resalta el porcentaje promedio de los tratamientos de degradación de los n-alcanos presentes en los residuos industriales de parafina original fue de 85,4 %. Con todos los biotratamientos aplicados en general se logró la intemperización (mineralización parcial) de los residuos industriales de parafina.

Este trabajo presenta gran similitud con la presente investigación ya que se aplican tratamientos de biorremediación en suelos contaminados por medio de la lombricultura. La discrepancia de este trabajo radica en que este aplica la lombricultura para la degradación de los n-alcanos presentes en la parafina; además de estudiar las posibles interacciones que puedan presentarse. Por otro lado, en la presente investigación propuesta para llevar a cabo se busca comparar la capacidad degradativa entre la biorremediación por bioaumentación y la biorremediación por lombricultura en suelos contaminados con crudos.

Callaham Mac *et al.* (2002). **Efectos de la incorporación de la lombriz de tierra (*Eisenia foétida*) y de la paja de trigo (*Triticum aestivum*) sobre propiedades seleccionadas de los suelos contaminados con petróleo**. División de ciencias ambientales. Laboratorio nacional de Oak Ridge. Tennessee. USA

En esta investigación se estudiaron los efectos de la incorporación de la lombriz de tierra Eisenia foétida y de la paja de trigo sobre la respiración del suelo, el crecimiento de plantas, formación de biomasa, la cantidad de dióxido de carbono producido y el HTP en los suelos contaminados con petróleo.

Como resultados más relevantes se mejoró el crecimiento celular bacteriano con la adición de las lombrices de tierra y de la paja de trigo, así como la respiración del suelo con un incremento del 30 % y se pudo optimizar el tiempo de biorremediación de los suelos con la incorporación de los organismos tratados.

La principal semejanza de este antecedente con la investigación que se lleva a cabo es la utilización de la Eisenia foétida como ente promotor en la optimización del tiempo de biorremediación requerido. Las principales diferencias radican en las propiedades controladas del suelo las cuales no corresponden a las que se controlan en esta investigación, a excepción de los HTP.

Infante Carmen (2001). **Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de Intebios® y biorize®**. Asociación Interciencia. Caracas-Venezuela

El objetivo principal de este trabajo de investigación se fundamentó en el desarrollo de tecnologías Intebios® con el fin de evaluar la factibilidad de aplicar un proceso de biorremediación, definiendo así la modalidad de la tecnología que permita una correcta aplicación en campo. Adicionalmente se realizó el estudio de la implementación del producto Biorize® para la aceleración de la biorremediación en ecosistemas sensibles.

De las conclusiones más importantes del trabajo expuesto se tiene que la aplicación de la tecnología Intebios® permitió disminuir significativamente los componentes saturados y aromáticos, reduciendo niveles de grasas y aceites presentes en los crudos. También se tiene

que la aplicación del producto Biorize® no sólo se limita a la recuperación de suelos impactados por crudos sino que también es aplicable en el manejo de los desechos durante la perforación.

En cuanto a la similitud que tiene el trabajo presente con respecto a la investigación que se va a realizar se basa en que ambos evalúan las características del ecosistema, es decir, factores abióticos (pH, humedad, textura del suelo, dosis máxima y mínima del contaminante, entre otros); además es de mencionar que estos trabajos aplican la biorremediación por medio de la bioaugmentación. A pesar de la gran semejanza también se tiene cierta diferencia entre un trabajo y el otro tal es que en el investigación actual no se realiza una formulación a base de biomasa vegetal, si no que se va a contar con la inoculación de microorganismos presentes en el sustrato, humus y lombrices para acelerar dicho proceso de degradación.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 El suelo

2.2.1.1 Estructura y componentes del suelo

El suelo se define como la capa superficial de la corteza terrestre, y se trata de un sistema formado por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico. (Casanova E., 2005).

2.2.1.1.1 El componente sólido: comprende el 50% del volumen total del suelo y está conformado por una fracción mineral (45%) y una fracción orgánica (5%). La porción mineral está integrada por las partículas de diferentes tamaños que se encuentran en el suelo, denominadas separados del suelo y que se clasifican en arcillas, limos y arenas. La porción

orgánica conocida como materia orgánica del suelo (MOS.) la conforman todos los residuos de origen vegetal y animal en proceso de descomposición.

2.2.1.1.2 La fase líquida: constituida por el agua del suelo, incluye cerca del 25% del volumen total del sistema y es importante porque garantiza el suministro de agua para que las plantas puedan llevar a cabo el proceso de transpiración y absorción de nutrientes.

2.2.1.1.3 La fase gaseosa: constituida por el aire del suelo, representa alrededor del 25% del volumen total de éste y comprende el espacio poroso que permite la circulación del aire y el agua para que las raíces de las plantas y los microorganismos puedan llevar a cabo el proceso de respiración.

2.2.1.2 Horizontes del suelo

Se denomina horizontes del suelo a una serie de niveles horizontales que se desarrollan en el interior del mismo y que presentan diferentes caracteres de composición, textura, adherencia, entre otros. El perfil del suelo es la ordenación vertical de todos estos horizontes. (Casanova E., 2005). Clásicamente, se distingue en los suelos completos o evolucionados cuatro horizontes fundamentales que desde la superficie hacia abajo son:

2.2.1.2.1 Horizonte A, o zona de lavado vertical: es el más superficial y en él enraíza la vegetación herbácea. Su color es generalmente oscuro por la abundancia de materia orgánica descompuesta o humus elaborado, de fragmentos de tamaño fino y de compuestos solubles.

2.2.1.2.2 Horizonte B o zona de precipitación: carece prácticamente de humus, por lo que su color es más claro, en él se depositan los materiales arrastrados desde arriba, principalmente, materiales arcillosos, óxidos e hidróxidos metálicos, carbonatos, entre otros.

2.2.1.2.3 Horizonte C o *roca madre*, o *subsuelo*: está constituido por la parte más alta del material rocoso *in situ*, sobre el que se apoya el suelo, más o menos fragmentado por la alteración mecánica y la química, pero en él aún puede reconocerse las características originales del mismo.

2.2.1.2.4 Horizonte D u horizonte R o *material rocoso*: es el material rocoso subyacente que no ha sufrido ninguna alteración química o física significativa. Algunos distinguen entre **D**, cuando el suelo es autóctono y el horizonte representa a la roca madre, y **R**, cuando el suelo es alóctono y la roca representa sólo una base física sin una relación especial con la composición mineral del suelo que tiene encima (véase figura 2.1). (Sandoval J., 2002).

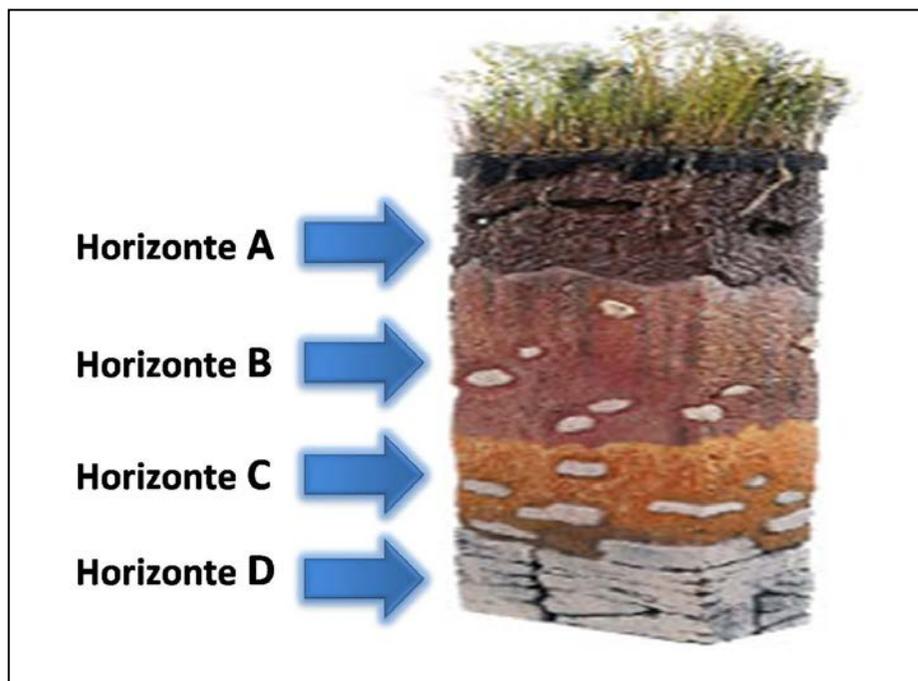


Figura 2.1: Perfil del suelo dividido en sus respectivos horizontes. Fuente: Enciclopedia del planeta tierra. (2007)

2.2.1.3 Enmiendas del suelo

Las enmiendas son productos naturales a base de calcio y magnesio que se utilizan para corregir la acidez del suelo y neutralizar los efectos tóxicos causados por altas concentraciones

de aluminio, hierro y manganeso en los suelos ácidos. Así mismo se usan para suministrar calcio y magnesio cuyas deficiencias son muy comunes en dichos suelos. Por sus altos contenidos de calcio también se les denomina cales. Los principales tipos de enmiendas o cales que se encuentran en el mercado son los siguientes:

2.2.1.3.1 Cal viva: es la misma piedra caliza calcinada o quemada en hornos. Es un óxido de calcio (CaO) que contiene alrededor del 70 % de calcio.

2.2.1.3.2 Cal apagada: conocida también como cal hidratada $[Ca(OH)_2]$, se obtiene al tratar la cal viva con agua. Es menos fuerte que la cal viva y se vende como un polvo blanco, difícil y desagradable de manipular. El contenido de calcio es cercano al 50 %.

2.2.1.3.3 Cal agrícola: en su forma natural se encuentra como carbonato de calcio ($CaCO_3$) y tiene una concentración aproximada del 40 % de calcio.

2.2.1.3.4 Cal dolomítica: es una mezcla de carbonatos de calcio y de magnesio en diferentes proporciones. Esta cal es la más recomendada para corregir suelos ácidos deficientes en calcio y magnesio porque, además de neutralizar la acidez del suelo, permite mantener la relación entre estos dos elementos alrededor de tres, que es la más indicada para la mayoría de los cultivos. (Sandoval J., 2002)

2.2.1.4 Textura del suelo

En el componente sólido del suelo las partículas establecen relaciones topográficas precisas de acuerdo a su tamaño y ello da lugar a la formación de espacios que se comunican entre si como poros o canales y que pueden rellenarse con aire o agua. Según la textura del suelo los mismos pueden ser clasificados de la siguiente manera:

2.2.1.4.1 Arenoso: compuesto por partículas de mayor tamaño, permitiendo un mayor espacio entre partículas. El agua drena muy rápidamente a través de él, arrastrando nutrientes con ella.

2.2.1.4.2 Arcilloso: suelo compuesto por partículas muy pequeñas y con muy poco espacio entre ellas. La arcilla tiene la habilidad de retener el agua y los nutrientes por lo que el aire no puede penetrar en estos espacios, especialmente cuando ellos están saturados con agua. Se caracteriza por un pobre drenaje y aireación. La arcilla húmeda es difícil de trabajar, mientras que cuando esta seca es muy dura.

2.2.1.4.3 Limoso: este suelo está compuesto por partículas intermedias entre la arcilla y la arena, a la forma húmeda es difícil de trabajar, a diferencia de la arcilla cuando es seca es elástica y granulosa. (Casanova E., 2005)

2.2.2 Composición del crudo de petróleo

2.2.2.1 Composición general

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Canals V., 2005). Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 50-98 % de la composición), por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales. Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos.

La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 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 (Clark y Brown. 1977). Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones (véase tabla 2.1).

TABLA 2.1
PRINCIPALES COMPUESTOS CONSTITUYENTES PARA CADA
FRACCIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO

Fracción Composición	Compuestos constituyentes
Saturados	Familias de <i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

Fuente: Canals Viñas Marc (2005)

2.2.2.2. Principales tipos de petróleo crudo

2.2.2.2.1 Petróleos asfálticos: negros, viscosos y de elevada densidad (0,95 g/mL), en la destilación primaria producen poca nafta y abundante fuel oil, quedando asfalto como residuo.

2.2.2.2.2 Petróleos parafínicos: son de color claro, fluidos y de baja densidad (0,75-0,85 g/mL), rinden más nafta que los asfálticos, cuando se refina sus aceites lubricantes se separa parafina.

2.2.2.2.3 Petróleos mixtos: tienen características y rendimientos comprendidos entre las otras dos variedades principales, aunque sin ser iguales entre sí, son de base mixta. (Carbognani *et al.*, 1997)

2.2.2.3 Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias: parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C₁₀), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C₁₀- C₄₀), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo aparte residirían los componentes de las resinas y los asfaltenos los cuales constituyen a compuestos de alto peso molecular definidos por la autora Infante C., 2002 como fracciones de crudo recalcitrantes.

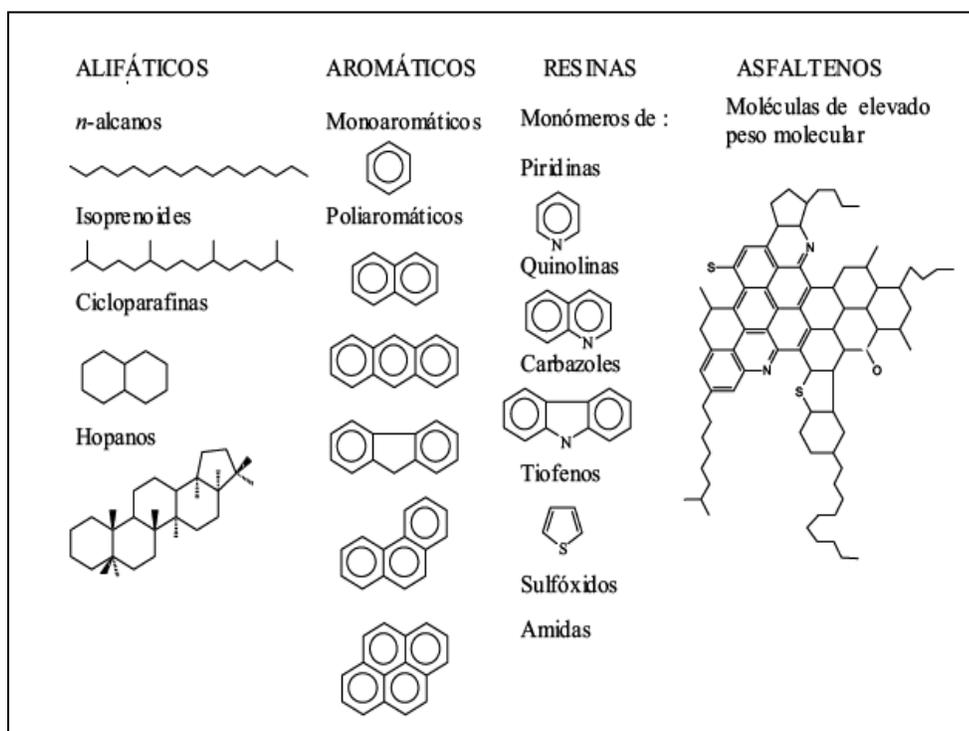


Figura 2.2: Estructura molecular de los principales compuestos constituyentes en las fracciones del petróleo crudo. Fuente: (Canals Viñas Marc. 2005)

2.2.2.4 Parafinas volátiles (*n*-alcanos e isoprenoides volátiles):

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son *n*-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C₁-C₁₀ (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C₁-C₅. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los homólogos de mayor peso molecular disminuyen su presencia en el crudo con el incremento de peso molecular. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C₁₀ (2,6 di-metil octano) (Howe-Grant, 1996).

2.2.2.5 Parafinas no volátiles (*n*-alcanos e isoprenoides)

Se definen como aquellos *n*-alcanos e isoprenoides entre C₁₁-C₄₀. Los componentes entre C₁₁-C₁₅ son de volatilidad intermedia. Los *n*-alcanos oscilan entre C₁₁-C₄₀, aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el (15-20) % de crudos no degradados. Los isoprenoides varían de C₁₂-C₂₂ y constituyen entre (1-2) % del crudo, llegando a 15 % en crudos degradados. En la tabla 2.2 pueden verse los isoprenoides presentes en un crudo con interés en el campo de la geoquímica y la biorremediación.

TABLA 2.2
PRINCIPALES CONSTITUYENTES DE LAS PARAFINAS NO VOLÁTILES EN
LA FRACCIÓN DE SATURADOS DEL CRUDO

Isoprenoide	Átomos de C	Nomenclatura
Pristano	19	2,6,10,14 tetrametilpentadecano
Fitano	20	2,6,10,14-tetrametilhexadecano
Farnesano	15	2,6,10-trimetildodecano
Norpristano	18	2,6,10-trimetilpentaecano
I21	21	2,6,10,14-tetrametilheptadecano

Fuente: Canals Viñas Marc (2005)

El pristano y fitano se han utilizado como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero actualmente no deberían utilizarse, ya que se han descrito tanto su biodegradación como sus vías catabólicas (Watkinson *et al.*, 1990).

2.2.2.6 Naftenos (cicloalcanos)

Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31 % del crudo.

Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al (50-55) % de esta fracción, los tricíclicos al 20 % y los tetracíclicos al 25 %. Esta familia engloba a los hopanos, antes mencionados

2.2.2.7 Olefinas (alquenos)

Los alquenos están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de *cracking*, existiendo hasta un 30 % en gasolinas y un 1 % en fueles.

2.2.2.8 Hidrocarburos aromáticos

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAP's, con más de dos anillos bencénicos).

2.2.2.8.1 Hidrocarburos monoaromáticos: se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.

2.2.2.8.2 Hidrocarburos polimaromáticos: entre los hidrocarburos diaromáticos, se tiene el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetra-metilnaftalenos). constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (véase figura 2.2).

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, se encuentran el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados.

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, se encuentran el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos)

También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles). (Canals V., 2005)

2.2.2.9 Resinas y asfaltenos

Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel (metaloporfirinas). Constituyen entre un 10 % en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60 % en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas,

quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, y fenoles polihidratados. (Howe-Grant, 1996).

Las resinas son las responsables de conservar separados a los asfaltenos en el crudo manteniendo al sistema en estabilidad, debido a que la fuerza de repulsión electrostática es mayor que la fuerza de atracción de Van Der Waals. Cuando se adiciona un solvente ionizador como el n-hexano se provoca que la concentración de moléculas de resina cambie, ya que algunas resinas abandonan la micela, alterando la estabilidad de las partículas asfálticas suspendidas en el crudo y causando la debilitación de las fuerzas repulsivas, provocando una interacción mutua entre asfaltenos. (Delgado J., 2006), logrando que se formen cúmulos que luego se depositan. La figura 2.3 ilustra este proceso.

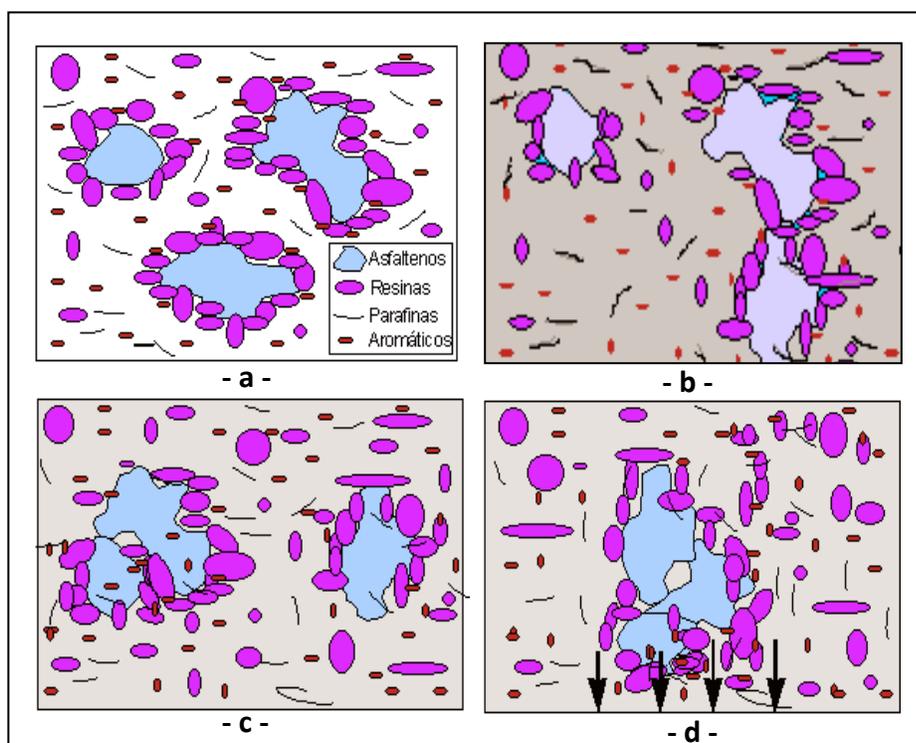


Figura 2.3. Fenómeno de agregación de asfaltenos. -a-) Asfaltenos en estado coloidal peptizados por resinas; -b-) Después de inyectar un solvente ionizador como n-hexano (representado por el fondo marrón), las resinas abandonan a los asfaltenos; -c-) Si en su recorrido dos asfaltenos hacen contacto en áreas libres de resina, entonces quedan pegados formando cúmulos; -d-) Cuando el tamaño de los cúmulos aumenta se vuelven menos difusivos y pesados, y tienden a depositarse en el fondo.

2.2.3. Contaminación por hidrocarburos de petróleo

Desde el último tercio del siglo XIX, el petróleo es la energía primaria más importante a nivel mundial. Prácticamente todas las actividades económicas se sustentan en el petróleo, de manera que alrededor del 40 % de las necesidades energéticas mundiales son cubiertas con esta fuente de energía no renovable.

En la actualidad, uno de los problemas medioambientales más preocupantes son los vertidos de petróleo en el mar y la consecuente contaminación de la costa, así como los derrames ocurridos en las áreas de explotación de petróleo que impactan directamente al suelo. Éstos se producen como consecuencia de una combinación de diferentes acciones y circunstancias. (Martínez y Gaju., 2005)

2.2.4 Biorremediación de desechos de petróleo

La biorremediación es el proceso utilizado por el hombre para detoxificar variados contaminantes en los diferentes ambientes –mares, estuarios, lagos, ríos y suelos– usando de forma estratégica microorganismos, plantas o enzimas de estos.

Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho.

Afortunadamente la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar. A continuación se enumeran algunas, alternativas que se emplean para el tratamiento efectivo de suelos contaminados:

2.2.4.1 Bioestimulación: como su nombre lo indica, consiste en estimular los microorganismos nativos del suelo adicionando nutrientes como nitrógeno o fósforo.

2.2.4.2 Bioaireación: es una forma de estimulación realizada con gases, como por ejemplo oxígeno y metano, estos son adicionados de forma pasiva en el suelo para estimular la actividad microbiana.

2.2.4.3 Bioaumentación: es la inoculación de una alta concentración de microorganismos en el suelo contaminado para facilitar la biodegradación. Como se van a inocular, estos microorganismos deben ser seleccionados del suelo que se desea tratar.

2.2.4.4 Compostaje: esta estrategia de biorremediación utiliza microorganismos aeróbicos y termófilos, formando pilas de material que deben ser mezcladas y humedecidas periódicamente para promover la actividad microbiana.

2.2.4.5 Fitorremediación: es el uso de plantas para remover, contener o transformar un contaminante. Esta puede ser directa, donde las plantas actúan sobre el compuesto, o indirecta, donde estas se utilizan para estimular microorganismos en la rizósfera.

2.2.4.6 Landfarming: la técnica más usada para la biorremediación de los lodos contaminados con hidrocarburos y de otros desechos de la industria petrolera es la denominada landfarming. Se realiza trasladando los contaminantes a un suelo no contaminado, el cual ha sido preparado con anterioridad para la posterior disposición del proceso de degradación. (Gallego *et al.*, 2004)

No obstante, para el éxito de cada proceso de degradación microbiana involucrado es indispensable que el conjunto de factores bióticos y abióticos, tomados en cuenta como parámetros de control, se encuentren dentro de los rangos que se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 2.3
VALORES ACEPTABLES DE LOS DIVERSOS FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS NECESARIOS
PARA LA APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BIORRECUPERACIÓN

Parámetro de interés	Valor aceptable (Rango)
Potencial de acidez (pH ± 1) adim	(5-8)
Temperatura (T ± 1) °C	(10-40)
Humedad (H± 1) % de la capacidad del campo	(50-70)
Nutrientes (adim)	C/N= (45-100) C/P=(650-900)
Carga bacteriana mesófila (UFC/g de suelo)	Mayor a 10 ⁵
Carbono orgánico (C _o ± 1) %p/p	(3-10)

Fuente: Levin M.L *et al.*, (1997), citado por Infante C., (2001)

2.2.5 Organismos bacterianos

Las **bacterias** son microorganismos unicelulares. Tienen típicamente algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 µm) y se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras, y espirales. Generalmente poseen una pared celular similar a la de plantas u hongos, pero compuesta por peptidoglicanos. Muchos antibióticos son efectivos sólo contra las bacterias ya que inhiben la formación de esta pared celular. Muchas bacterias disponen de cilios o flagelos y son móviles. (Bacteria- Wikipedia., 2007).

2.2.5.1 Estructura de la célula bacteriana

Las bacterias son organismos relativamente sencillos. Sus dimensiones son muy reducidas, unos 2 µm de ancho por 7-8 µm de longitud en la forma cilíndrica (bacilo) de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0,5-1,5 µm.

Carecen de un núcleo delimitado por una membrana aunque presentan un nucleoide, una estructura elemental que contiene una gran molécula circular de ADN. En el citoplasma se aprecian plásmidos, pequeñas moléculas circulares de ADN que coexisten con el nucleoide, contienen genes y son comúnmente usados por las bacterias en la "reproducción sexual". El citoplasma también contiene vacuolas (gránulos que contienen sustancias de reserva) y ribosomas (utilizados en la síntesis de proteínas). Una membrana celular compuesta de lípidos rodea el citoplasma y, al igual que las células de las plantas, la mayoría posee una pared celular a base de carbohidratos. El espacio comprendido entre la membrana celular y la pared celular se denomina periplasma. Algunas bacterias presentan una cápsula y otras son capaces de evolucionar a esporas, formas durmientes capaces de resistir condiciones extremas. Entre las formaciones exteriores propias de la célula bacteriana destacan los flagelos y los pilis.

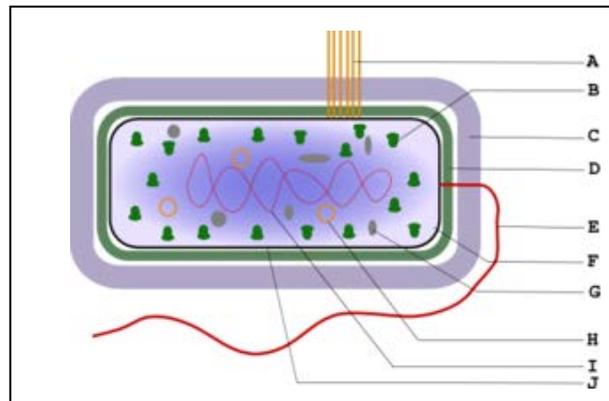


Figura 2.4: Estructura de la célula bacteriana. Fuente: (Bacteria- Wikipedia., 2007). **A**-Pilis; **B**- Ribosomas; **C**-Cápsula; **D**-Pared celular; **E**-Flagelo; **F**-Citoplasma; **G**-Vacuola; **H**-Plásmido; **I**-Nucleoide; **J**-Membrana celular.

2.2.5.2 Curvas de crecimiento bacteriano

Una curva de crecimiento bacteriano es una representación gráfica que muestra la reproducción de los microorganismos en función del tiempo, dada las condiciones idóneas para su desarrollo, tal como lo muestra la figura 2.4. En la cual se distinguen cuatro fases ,a saber:

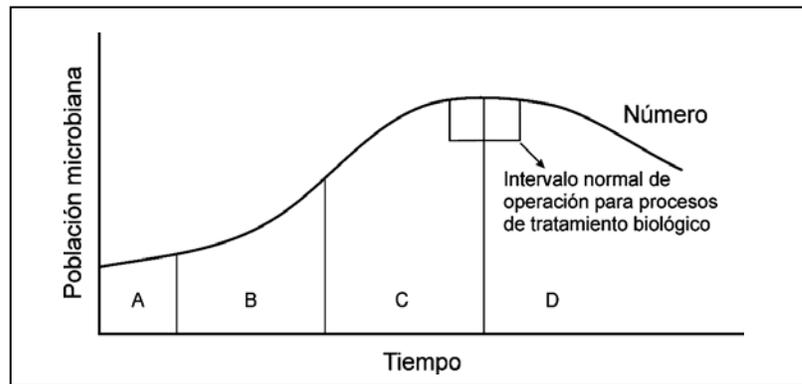


Figura 2.5: Curva de crecimiento bacteriano. Fuente: (Crecimiento bacteriano- Wikipedia., 2007)

2.2.5.2.1 Fase de latencia (A): es un periodo lento de duplicación debido a que el cultivo recién inoculado debe adaptarse al medio en que se encuentra sintetizando para ello enzimas, RNA y ribosomas.

2.2.5.2.2 Fase de crecimiento logarítmico (B): se caracteriza por el crecimiento de las células a una velocidad constante máxima, es una región de rápido ascenso, casi todos los microorganismos poseen vitalidad e igual vigor.

2.2.5.2.3 Fase estacionaria(C): se caracteriza por el cese del crecimiento debido al agotamiento de los nutrientes y a las sustancias inhibidoras.

2.2.5.2.4 Fase endógena o fase de muerte (D): las células se lisan completamente. El límite del crecimiento está determinado por el volumen y composición del medio.

2.2.6 Tratamiento biológico de suelos contaminados con petróleo

El tratamiento biológico es la degradación del residuo orgánico por la acción de los microorganismos. La degradación altera la estructura molecular de los compuestos orgánicos y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización.

El término biotransformación se refiere a la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar. En la mineralización se produce la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y se incorpora el resto a las estructuras de los microorganismos. Se puede decir que la biotransformación es una degradación parcial y la mineralización es completa. Se puede realizar el tratamiento biológico de casi todos los residuos orgánicos peligrosos, porque esencialmente, todas las sustancias químicas se degradan si se establecen, mantiene y controlan las poblaciones microbianas apropiadas. (LaGrega *et al.*, 2002)

Las bacterias crecen y se alimentan extrayendo nutrientes, electrones y energía del ambiente para crear y mantener una biomasa bacteriana, estos procesos son conocidos en general como oxidativos, debido a la adición de oxígeno atómico o molecular y reductivos por la adición de hidrógeno molecular dentro de las estructuras, según lo explica la figura 2.6.

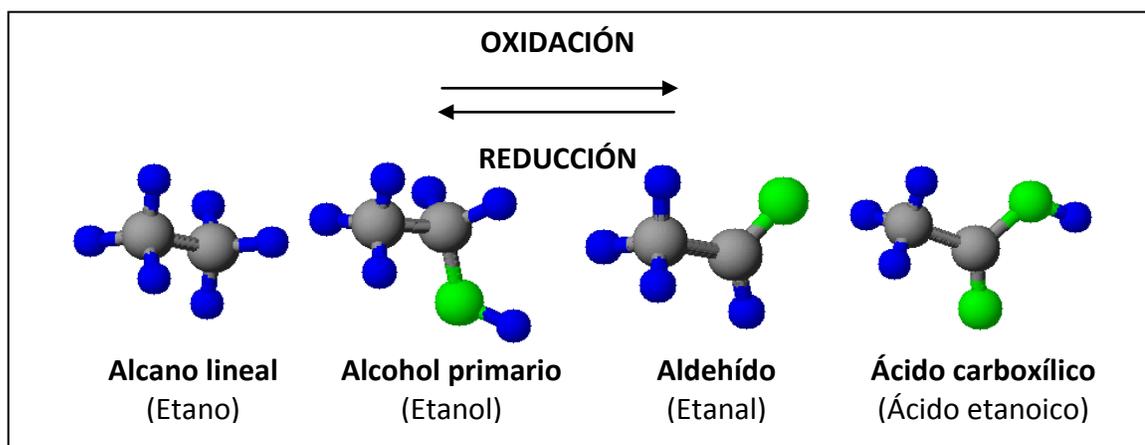


Figura 2.6: Proceso de oxido reducción de una molécula de etano mediante el empleo de bacterias con metabolismo oxidativo y reductivo. (La Grega *et al.*, 2002)

2.2.6.1 Parámetros microbiológicos

2.2.6.1.1 Fuentes de energía y sustrato: todo ser vivo necesita energía y carbono para desarrollarse, la fuente de energía donde los microorganismos obtienen su

energía y carbono celular proporciona una base para su clasificación, como se muestra a continuación:

TABLA 2.4
FUENTES PRIMARIAS DE CARBONO Y ENERGÍA PARA DIVERSAS
CLASES DE MICROORGANISMOS

Clasificación de los microorganismos	Fuente de energía	Fuente de carbono (Sustrato)
Autótrofos (Fotoautótrofos)	Luz	Dióxido de carbono
Quimiolitótrofos	Reacciones de óxido reducción de compuestos inorgánicos	Dióxido de carbono
Heterótrofos	Reacciones de óxido reducción de compuestos orgánicos	Carbono orgánico

Fuente: La Grega *et al.*, 2002

2.2.6.1.2 Procesos enzimáticos: el tamaño de los constituyentes que forman el residuo varía desde una sencilla molécula a diferentes agrupaciones. Para que se produzca la degradación, el residuo, como el sustrato, tiene que entrar primero en contacto con la parte más externa de la célula bacteriana. Esta acción desencadena una serie de procesos metabólicos involucrados en la degradación de los residuos orgánicos.

Las enzimas son grandes moléculas proteicas compuestas principalmente por aminoácidos que se pliegan adoptando formas complejas en la que interviene enlaces peptídicos y puentes de hidrógeno, actuando como catalizadores orgánicos que activan las reacciones en la célula.

El primer paso consiste en el transporte del sustrato al interior de la célula que se puede producir por tres métodos:

- Formación de un complejo enzima-sustrato extracelular
- Degradación parcial
- Transporte directo

2.2.6.1.3 Biodegradabilidad del sustrato: la mayoría de los compuestos orgánicos son biodegradables, no obstante existen diversos compuestos que resisten la degradación (compuestos recalcitrantes o refractarios) o se produce tan lentamente como para hacer eficaz al tratamiento biológico (compuestos persistentes).

2.2.6.1.4 Inhibición y toxicidad: una sustancia orgánica que es biodegradable a una determinada concentración se puede volver persistente a concentraciones más elevadas porque inhibe el crecimiento del cultivo microbiano. A concentraciones incluso más altas, la sustancia puede ser tóxica incluso para el cultivo. Estos efectos derivan, presumiblemente, del grado de saturación del sistema enzimático que normalmente la degrada.

2.2.6.1.5 Población microbiana el tratamiento biológico implica una compleja interacción entre la mezcla de poblaciones microbianas (biomasa). Para la transformación y mineralización de la mayoría de los compuestos orgánicos se necesita de la actuación en cadena de un conjunto de bacterias en donde cada una desempeña un eslabón vital.

2.2.6.2 Parámetros técnicos

El tratamiento biológico consiste en promover y mantener una población microbiana que metaboliza un determinado residuo. Existen una serie de parámetros que influyen en la velocidad en la que se tiene lugar el metabolismo y por lo tanto, en la biodegradación. Se puede identificar, establecer y controlar las condiciones favorables que aseguren el crecimiento y desarrollo de la biomasa a través de las investigaciones y aplicaciones de estos parámetros

2.2.6.2.1 Aceptor electrónico: A las reacciones catabólicas que implican una transferencia de electrones desde el residuo a un aceptor electrónico, y los procesos biológicos por lo que esto se produce se le denomina respiración.

En una respiración aerobia, las bacterias utilizan oxígeno como aceptor final de electrones de los compuestos orgánicos oxidados. De forma general, en el caso de la biotransformación, el oxígeno se incorpora a la molécula orgánica y el hidrógeno se elimina. Tras la completa mineralización el oxígeno se reduce a agua y el carbono orgánico se oxida a dióxido de carbono.

2.2.6.2.2 Humedad: la biodegradación necesita humedad por dos razones, primero: para el desarrollo celular, ya que el (75 - 80) % de su masa es agua y segundo: en las especies inmóviles, como medio para desplazarse los microorganismos hacia el sustrato o viceversa. En los suelos se puede producir la degradación con niveles de humedad por debajo del de saturación, por lo general en un 40 % del nivel de saturación.

2.2.6.2.3 Temperatura: la temperatura tiene una mayor influencia sobre la velocidad de crecimiento. La actividad celular, específicamente de los sistemas enzimáticos, responde al calor, produciéndose, al ir aumentando la temperatura, un brusco aumento de la velocidad de crecimiento, hasta que se alcanza el óptimo. Un aumento de unos pocos grados por encima del óptimo hace disminuir drásticamente el crecimiento, por inactivación de los sistemas enzimáticos y reduce la capacidad reproductora.

Exposiciones continuas a elevadas temperaturas pueden disolver los lípidos de la membrana y, como consecuencia, producirse la muerte celular. En contraste, las bajas temperaturas no son, por lo general, letales sino que con el tiempo las células pasan a un estado latente y tiene lugar una reducción de la actividad celular.

TABLA 2.5
RANGOS DE TEMPERATURA ÓPTIMOS PARA EL DESARROLLO DE DIVERSOS
GÉNEROS DE BACTERIAS

Clasificación	Rango relativo	Valores óptimos
Psicrófilas	-2 a 30 °C	12 a 18 °C
Mesófilas	20 a 45 °C	25 a 40 °C
Termófilas	45 a 75 °C	55 a 65 °C

Fuente: La Grega *et al.*, 2002

2.2.6.2.5 Potencial de acidez (pH): la actividad enzimática depende del pH. La cantidad de una determinada enzima en estado catalíticamente activo varía en función de este, coincidiendo la máxima cantidad con el óptimo de pH. El crecimiento bacteriano en consecuencia, también depende del pH. La mayoría de las bacterias crecen mejor en un estrecho rango próximo a la neutralidad (es decir en un rango de pH de 6-8).

Generalmente la ausencia del crecimiento se produce por debajo de pH 4-5 y por encima de un pH 9-9,5; no obstante existen cepas que se desarrollan fuera de estos límites.

2.2.6.2.6 Nutrientes: la masa celular contiene carbono y otros numerosos elementos. El metabolismo requiere de estos elementos como nutrientes, además del carbono orgánico como sustrato. Al nitrógeno y al fósforo se les denomina macronutrientes porque se necesita, para la síntesis de las estructuras celulares, mucho más de ellos que del resto.

Los micronutrientes implicados en el metabolismo celular son fundamentalmente azufre, potasio, calcio, hierro y magnesio. Existen diversas relaciones para la adición de macro y micro nutrientes que se realizan con base en determinaciones empíricas de los tratamientos para el mejor funcionamiento de los tratamientos biológicos aplicados.

2.2.7 Lombricultura

La lombricultura es una biotecnología que utiliza, a una especie domesticada de lombriz, como una herramienta de trabajo, recicla todo tipo de materia orgánica obteniendo como fruto de trabajo humus, carne y harina de lombriz. Se trata de una interesante actividad zootécnica, que permite perfeccionar todos los sistemas de producción agrícola. La lombricultura es un negocio en expansión, y en un futuro será el medio más rápido y eficiente para la recuperación de suelos de las zonas rurales. (Infoagro, 2005).

2.2.7.1 Epigeas: viven sobre la superficie del suelo, se alimentan de materia orgánica y producen humus.

2.2.7.2 Endógeas: son las más conocidas, viven dentro del suelo cavan galerías horizontales y comen y fecan tierra.

2.2.7.3 Anecicas: viven dentro del suelo, cavan galerías verticales y durante la noche suben a la superficie del suelo alimentándose de materia orgánica. (Agroforestal San Remo, 2004).

2.2.8 Tipos de lombrices

En la actualidad se están manejando dos tipos de lombrices, la roja californiana y la roja africana.

2.2.8.1 La roja californiana (*Eisenia foétida*): es de color rojo púrpura, su engrosamiento (clitelo) se encuentra un poco céntrico, su cola es achatada, de color amarillo y mide aproximadamente de 8 a 10 cm., son muy resistentes a condiciones adversas del medio.

2.2.8.2 La roja africana (*Fudrillus ssp*): es de color oscuro, su engrosamiento (clitelo) se encuentra más craneal, su cola es redonda y de color blanquecino y mide

aproximadamente de 15 a 20 cm. No son muy resistentes a condiciones adversas cuando no se les da su medio o hábitat recomendado, ellas emigran y por lo general mueren. Pero en condiciones óptimas se reproduce más rápido que la californiana y genera más abono por lo que son menos utilizadas. (Infoagro, 2005).

2.2.9 La lombriz roja californiana

Se la conoce como Lombriz Roja Californiana porque es en ese estado de E.E.U.U. donde se descubrieron sus propiedades para el ecosistema y donde se instalaron los primeros criaderos.

2.2.9.1 Clasificación zoológica

El aspecto físico de las comunidades de los macroorganismos de *Eisenia foétida* se muestra en la figura 2.7; mientras que su clasificación zoológica se resume en la tabla 2.6.



Figura 2.7: Aspecto físico de los macroorganismos de *Eisenia foétida*.

TABLA 2.6
CLASIFICACIÓN ZOOLOGICA DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA
(EISENIA FOÉTIDA)

Reino	Animal
Tipo	Anélido
Clase	Oligoqueto
Orden	Opisthoro
Familia	Lombricidae
Género	Eisenia
Especie	Eisenia Foétida

Fuente: (Infoagro, 2005).

Eisenia Foetida es la lombriz más conocida y empleada en más del 80 % de los criaderos del mundo.

2.2.9.2 Características morfológicas de la Eisenia foétida

Los macroorganismos de *Eisenia foétida* están constituidos morfológicamente por las partes:

- **Cutícula:** es una lámina muy delgada de color marrón brillante, quitinosa, fina y transparente.
- **Epidermis:** situada debajo de la cutícula, es un epitelio simple con células glandulares que producen una secreción mucosa. Es la responsable de la formación de la cutícula y del mantenimiento de la humedad y flexibilidad de la misma.
- **Capas musculares:** son dos, una circular externa y otra longitudinal interna.

- **Peritoneo:** es una capa más interna y limita exteriormente con el celoma de la lombriz.
- **Celoma:** es una cavidad que contiene líquido celómico y se extiende a lo largo del animal, dividida por los septos, actuando como esqueleto hidrostático.
- **Aparato circulatorio:** formado por vasos sanguíneos. Las lombrices tienen dos vasos sanguíneos, uno dorsal y otro ventral. Posee también otros vasos y capilares que llevan la sangre a todo el cuerpo. La sangre circula por un sistema cerrado constituido por cinco pares de corazones.
- **Aparato respiratorio:** es primitivo, el intercambio de oxígeno se produce a través de la pared del cuerpo.
- **Sistema digestivo:** en la parte superior de la apertura bucal se sitúa el prostomio con forma de labio. Las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que pasa posteriormente al esófago donde se localizan las glándulas calcíferas.

Estas glándulas segregan iones de calcio, contribuyendo a la regulación del equilibrio ácido básico, teniendo a neutralizar los valores de pH. Posteriormente se tiene el buche, en el cual el alimento queda retenido para dirigirse al intestino.

- **Aparato excretor:** formado por nefridios, dos para cada anillo. Las células internas son ciliadas y sus movimientos permiten retirar los desechos del celoma.
- **Sistema nervioso:** es ganglionar. Posee un par de ganglios supraesofágicos, de los que parte una cadena ganglionar. (Infoagro, 2005).

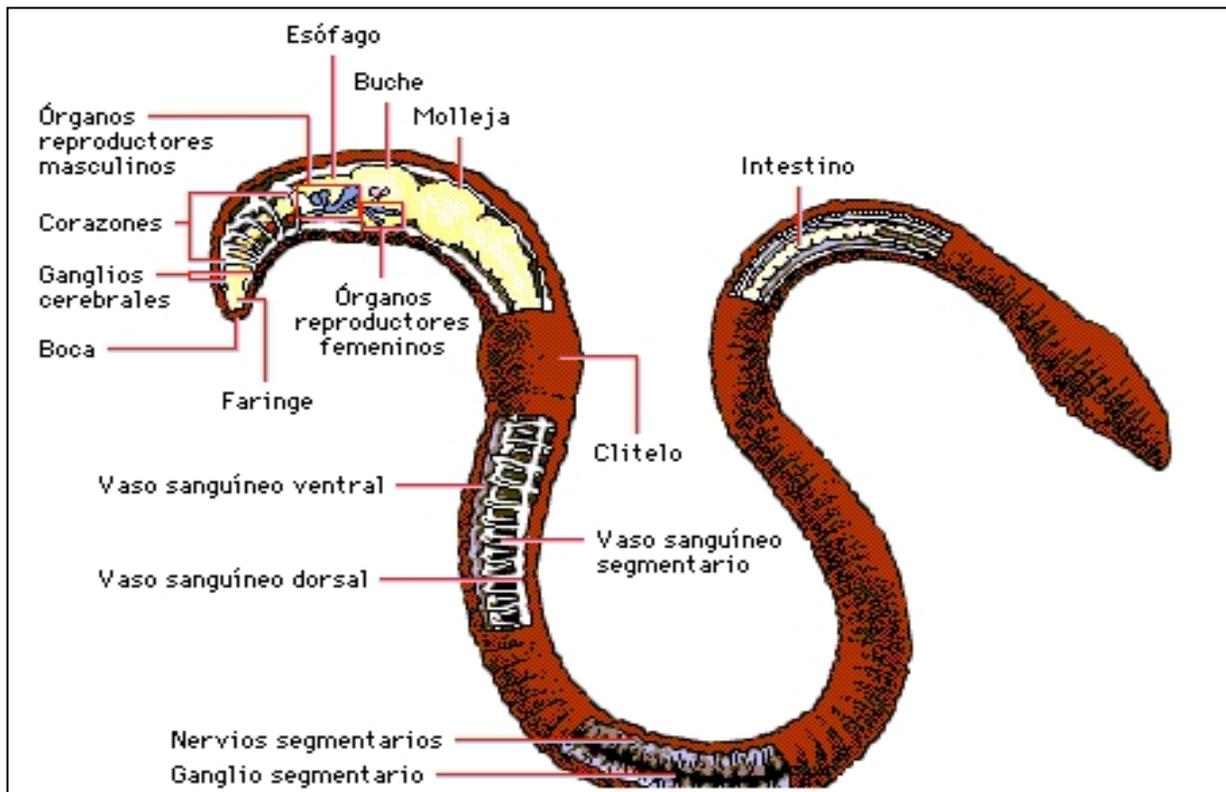


Figura 2.8: Estructura interna de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*). Fuente: (Agroforestal San Remo, 2004).

2.2.9.3 Aparato reproductor de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*)

La lombriz de tierra es hermafrodita, los órganos masculinos y femeninos están en posición ventral y anterior. El sistema reproductor masculino comprenden: dos pares de testículos, un embudo espermático, el vaso deferente, el poro masculino y dos pares de vesículas seminales. El sistema reproductor femenino comprende: un par de ovarios, dos embudos del oviducto, los oviductos y dos pares de receptáculos seminales. (Ramírez, 1999).

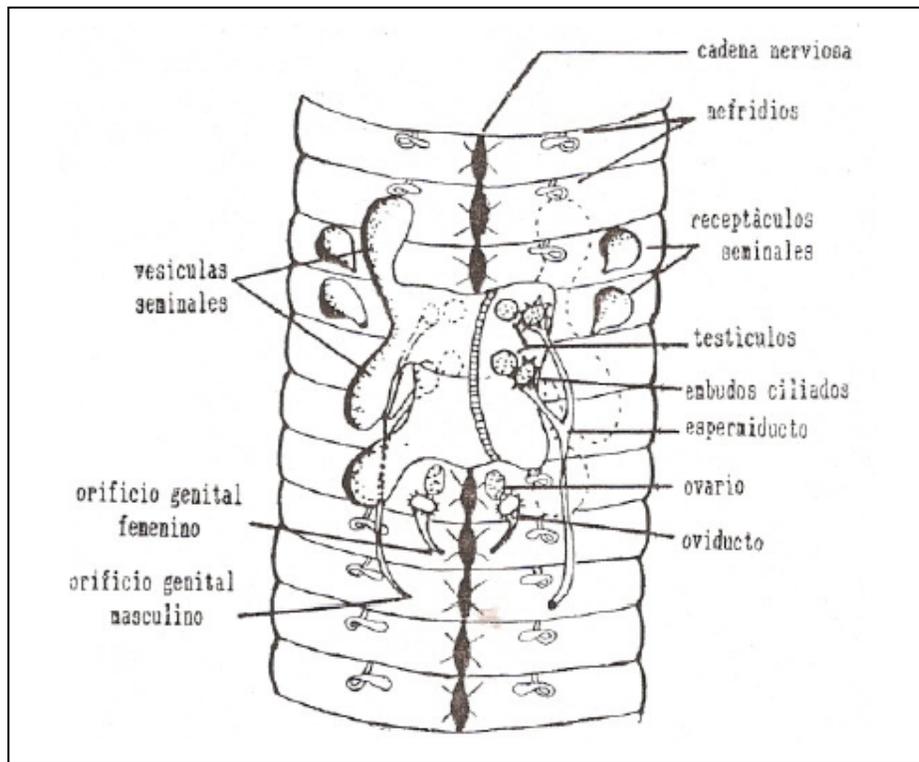


Figura 2.9: Órganos reproductores de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*). Fuente: (Ramírez, 1999).

2.2.9.3.1 Reproducción

La lombriz es hermafrodita insuficiente (tiene ambos sexos, pero necesita aparearse para reproducirse). Por lo que estas no pueden autofecundarse puesto que los espermatozoides maduran antes que los óvulos, haciendo indispensables el acoplamiento. Las dos lombrices se unen de tal modo que el clitelo de una de ellas queda frente a los receptáculos seminales de la otra. Los espermatozoides se liberan a nivel del orificio sexual masculino, se deslizan a lo largo de la cresta sexual y penetran en los receptáculos seminales de otra lombriz. A medida que se efectúa la puesta, los óvulos son fecundados por los espermatozoides almacenados y conservados en los receptáculos seminales.

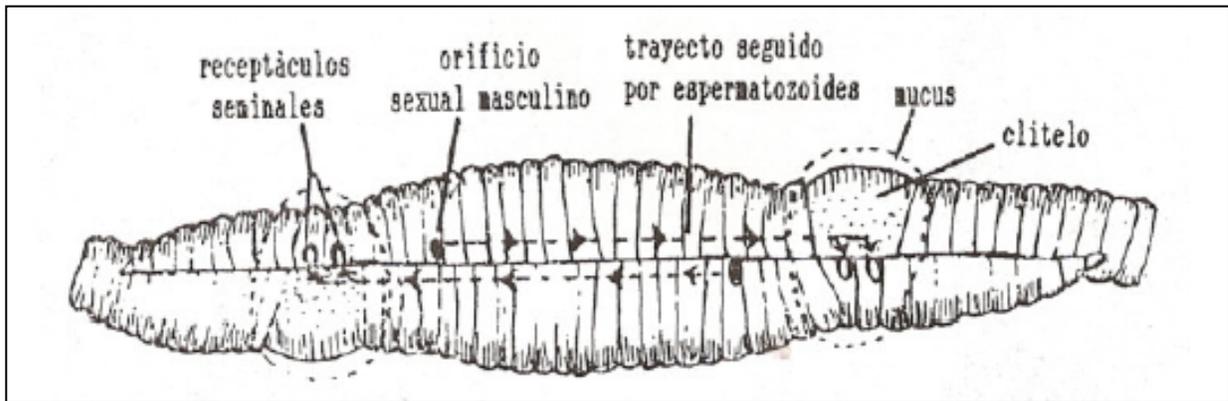


Figura 2.10: Lombriz roja (*Eisenia foétida*) en el momento de la copulación. Fuente: (Ramírez, 1999).

La *Eisenia foétida* elimina sus huevos por los gonoporos femeninos, y de laguna forma penetran en le capullo antes de que abandone el clitelo. Los espermatozoos son depositados en el capullo a medida que pasan sobre los receptáculos seminales. Una vez que el capullo se desliza sobre la cabeza de la lombriz y queda liberado del cuerpo, se desintegra rápidamente el tubo mucoso, y los extremos del capullo experimentan constricción y se cierran por sí mismos. (Ramírez, 1999). La copulación ocurre cada 7 o 10 días. Luego cada individuo coloca una cápsula (huevo en forma de pera de color amarillento) de unos 2 mm. De la cual emergen de 2 a 21 lombrices después de un periodo de incubación de 14 a 21 días, dependiendo de la alimentación y de los cuidados. (Agroforestal San Remo, 2004).

2.2.10 El sustrato o estiércol

El manejo de estiércol o sustrato es el elemento de mayor importancia dentro del cultivo de lombrices, puesto que si nosotros entregamos estabilizado o maduro el estiércol a las lombrices, estaremos asegurando que nuestro pie de cría se reproduzca aceleradamente y en poco tiempo lo habremos multiplicado para aumentar nuestra área. (Legall *et al.*, 2000)

En el manejo del estiércol o sustrato se tienen que tener en cuenta 3 factores muy importantes:

- Humedad
- Temperatura
- pH (Acidez, alcalinidad)

2.2.10.1 Humedad

La humedad es un factor de mucha importancia que influye en la reproducción y fecundidad de las cápsulas o cocones, una humedad superior al 85 % es muy dañino para las lombrices, haciendo que éstas entren en un período de dormición en donde se afecta la producción de lombrihumus y la reproducción de biomasa. Las condiciones más favorables para que la lombriz produzca y se reproduzca se presentan a una humedad del 80 %, es aceptable hasta 70 %, debajo de 70 % de humedad es una condición desfavorable, por otro lado niveles de humedad de 55 % son mortales para las lombrices.

2.2.10.2 Temperatura

La temperatura es otro de los factores que influyen en la reproducción, producción (lombrihumus) y fecundidad de las cápsulas. Una temperatura entre 20 a 25 grados centígrados es considerada óptima, que conlleva al máximo rendimiento de las lombrices.

2.2.10.3 Potencial de acidez (pH)

El pH es un factor que depende de la humedad y temperatura, si estos dos últimos factores son manejados adecuadamente, se puede controlar el pH siempre y cuando el sustrato contenga pH alcalinos. La lombriz acepta sustratos con pH de 5 a 8,4 disminuidos o pasados en esta escala la lombriz entra en una etapa de dormición.

Con pH ácido en el sustrato se desarrolla una plaga conocida en el mundo de la Lombricultura como planaria (descrita en la parte de plagas). Para la preparación del sustrato debe hacerse mediante fermentación aeróbica. Esta fermentación es el resultado de la actividad de una serie de microorganismos de diferentes grupos. El tiempo que dure la fermentación depende de los factores antes mencionados (pH, humedad, temperatura y tipo de sustrato). (Legall *et al.*, 2000)

2.2.11 Tipos de sustratos

Es importante tener en cuenta que la lombriz *Eisenia foétida* se nutre con cualquier tipo de sustancia orgánica, que haya superado su estado de calentamiento, como consecuencia de su putrefacción y posterior fermentación, entre los principales tipos de sustratos se tienen:

2.2.11.1 Estiércol de equino: es óptimo por su alto contenido en paja, es decir, en celulosa. Muy indicado tanto para constituir el sustrato inicial como para ser fuente de alimento en el período invernal. El tiempo de envejecimiento necesario para conseguir un valor de pH aceptable es aproximadamente de 5 a 6 meses.

2.2.11.2 Estiércol de vaca: muy bueno, utilizable también como sustrato inicial y como alimento durante la producción. El período mínimo de envejecimiento aconsejable es de 6 meses, pero es más fácil encontrarse con un pH adecuado, cuando este período ha sido de 7 meses.

2.2.11.3 Estiércol de ternero: bueno, análogo al de vaca. A pesar de ello, es preciso efectuar un análisis químico para poder verificar cual es la cantidad de proteínas que los animales no han asimilado. El envejecimiento medio aconsejado es de 6 a 7 meses; si el estiércol en cuestión carece de proteínas, dicho período es de 10 a 11 meses.

2.2.11.4 Estiércol de ovino: normalmente este estiércol se presenta como una capa muy compacta y endurecida, por la acción del peso de las ovejas que lo han estado pisando, con un espesor de (80-90) cm. Es conveniente esperar de 3 a 4 meses para dejar que el producto llegue a su perfecta maduración controlando mensualmente su pH.

2.2.11.5 Estiércol de porcino: totalmente desaconsejable, en principio. En efecto la mayoría de los grandes porcicultores efectúan un tratamiento a los excrementos producidos en sus explotaciones. Es conveniente esperar 9 a 10 meses para que envejezca lo suficiente, dado que normalmente este estiércol contiene una dosis elevada dosis de proteínas no asimiladas por los cerdos.

2.2.11.6 Estiércol de conejo: constituye un alimento óptimo. Se usa en estado original o se recoge debajo de la jaula de los conejos, tiene que ser tratado y oxigenado antes de poder ser suministrado.

Finalmente no deben utilizarse estiércoles cuyos procesos fermentativos sean superiores a los dos años; ya que en un estado tan avanzado de maduración, su contenido en proteínas y vitaminas sería prácticamente nulo. (Ferruzzi C., 1994)

2.2.12 Características y propiedades del lombrihumus

2.2.12.1 Características del lombrihumus

El lombrihumus es conocido con muchos nombres comerciales en el mundo de la lombricultura, se puede encontrar con los nombres siguientes: casting, lombricompost y otros nombres comerciales dependiendo de la casa que lo produzca. Se considera que el lombrihumus es el mejor abono orgánico del mundo.

El humus de la lombriz está compuesto principalmente por el carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, encontrándose también una gran cantidad de microorganismos.

Las cantidades de estos elementos dependerán de las características químicas del sustrato que dieron origen a la alimentación de lombrices. (Legall *et al.*, 2000)

El lombrihumus cumple un rol trascendente al corregir y mejorar las condiciones físicas, químicas, biológicas de los suelos, influyendo de la siguiente manera:

2.2.12.2 Propiedades del lombrihumus:

2.2.12.2.1 Propiedades químicas:

- Incrementa la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y azufre.
- Incrementa la eficiencia de la fertilización, particularmente nitrógeno.
- Estabiliza la reacción del suelo, debido a su alto poder amortiguador.
- Inactiva los residuos de plaguicidas debido a su capacidad de absorción.
- Inhibe el crecimiento de hongos y bacterias que afectan a las plantas.

2.2.12.2.2 Propiedades físicas:

- Mejora la estructura, dando soltura a los suelos pesados y compactos por la consiguiente mejora de su porosidad.
- Mejora la permeabilidad y ventilación.
- Reduce la erosión del suelo.
- Incrementa la capacidad de retención de humedad
- Confiere un color oscuro en el suelo ayudando a la retención de energía calorífica.

2.2.12.3 Importancia económica

La eliminación de los residuos urbanos y desechos agroindustriales son un problema a nivel mundial. La solución a este grave inconveniente es la selección de las basuras y con la ayuda de las lombrices se puede regenerar y transformar éstas en un 100% de fertilizante orgánico. La lombriz roja californiana tiene una gran importancia económica, pues contribuye a la fertilización, aireación, mejora la estructura y formación del suelo.

El humus de lombriz es un producto con grandes posibilidades de comercialización en todo el mundo, pero su calidad es un factor importante para obtener los mejores precios del mercado. La carne de lombriz puede ser utilizada en la alimentación animal de forma cruda y directa o en la elaboración de harina de carne de lombriz para ser mezclada con otros productos y producir concentrados de excelente calidad. Dicha carne de lombriz se trata de una carne roja, siendo una fuente de proteínas de bajo costo, de la que se obtiene harina con un 73% de proteína y una gran cantidad de aminoácidos esenciales. La carne de lombriz se emplea tanto en la alimentación humana como en la animal. (Infoagro, 2005).

2.2.13 Extracción de hidrocarburos totales de petróleo

Los términos hidrocarburos totales de petróleo (abreviados TPH en inglés) se usan para describir una gran familia de varios cientos de compuestos químicos originados de petróleo crudo. Los TPH son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono, llamados hidrocarburos. Los científicos han dividido a los TPH en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en forma similar en el suelo o el agua. Estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos de petróleo. Cada fracción contiene muchos productos químicos individuales. En el petróleo crudo los TPH están descritos por las diversas fracciones que lo componen, a saber: aromáticos, resinas, saturados y asfaltenos. (Canals V.,2005).

Para su extracción se emplea un equipo Soxhlet, el cual es un recipiente cilíndrico de vidrio que tiene un tubo sifón el cual permite que el proceso de extracción sólido-líquido se efectúe de forma más eficiente.

2.2.14 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DDE) es precisamente la forma eficaz de hacer pruebas en los procesos, ya que proporciona la técnica y la estrategia necesaria para evaluarlos y lograr su optimización. Simplemente consiste en determinar cuales pruebas y como es que se deben realizar, para obtener datos que al analizarlos estadísticamente se obtengan conclusiones y decisiones que derivan en mejoras del desempeño del proceso. (Pulido y De la Vara. 2004).

2.2.14.1 Etapas del diseño de experimentos

Para llevar a cabo un diseño de experimentos exitoso se requiere que se sigan adecuadamente los siguientes pasos:

- **Planeación:** definir el problema, los factores a estudiar, los parámetros a fijar, seleccionar el diseño a aplicar, seleccionar las variables de respuesta y organizar el trabajo experimental.
- **Análisis estadístico:** se realiza el experimento y se obtiene la data experimental con la cual se recurre al modelo de análisis de varianza (ANOVA).
- **Interpretación:** se establecen los resultados en base al cumplimiento de los supuestos y las comparaciones respectivas entre las variables de interés.
- **Conclusiones:** se definen las variables de salida y se discuten los resultados obtenidos en función de los objetivos propuestos.

2.2.14.2 Principios básicos del diseño de experimentos

- **Aleatorización:** consiste en realizar las corridas experimentales en orden aleatorio y con material seleccionado también de forma aleatoria.
- **Repetición:** es correr más de una vez un tratamiento o combinación de factores dado para estimar la variabilidad natural del error aleatorio.
- **Bloqueo:** tomar en cuenta de forma adecuada todos los factores que afectan la respuesta observada para obtener resultados más homogéneos que el conjunto total de datos. Evitar cualquier tipo de sesgo.

2.2.14.3 Diseños para comparar dos o más tratamientos

En el contexto de un problema de investigación surge la necesidad de realizar alguna comparación de tratamientos con el fin la mejor alternativa de las que existen, o por lo menos para tener una mejor comprensión del comportamiento de la variable de interés en cada uno de los distintos tratamientos. Por lo general el interés del experimentador se basa en comparar dichos tratamientos en cuanto a sus medias poblacionales, entonces la hipótesis fundamental a probar cuando se comparan dos o más tratamientos es decidir si son iguales estadísticamente en cuanto a sus medias, contra la alternativa que al menos dos de ellos son diferentes, es decir, aceptar o rechazar la hipótesis nula (en donde los tratamientos son iguales). (Pulido y De la Vara. 2004).

En este tipo de diseños siempre existe un factor de interés (los tratamientos) y factores de bloque, que no se incluyen en el experimento porque interese estudiar su efecto como tal, sino como un medio para estudiar de manera más adecuada y eficaz al factor de interés. Para comparar dos o más tratamientos se tienen los siguientes diseños:

- Completamente al azar: (0 factores de bloque)
- En bloques completos al azar: (1 factor de bloque)
- En cuadro latino: (2 factores de bloque)
- En cuadro grecolatino: (3 factores de bloque)

2.2.14.4 Análisis estadístico

Para investigaciones científicas las variaciones aleatorias, debidas a una multitud de causas, siempre harán variar los resultados, sin importar la cantidad de esfuerzos desplegados para controlar todos los factores conocidos. Por tal motivo al realizar análisis en suelos se ve la necesidad del análisis estadístico para sentar una base objetiva de evaluación (Little y Hills, 1979).

El análisis estadístico se basa en la realización de análisis de varianza (ANOVA) en donde se utilizan los coeficientes de varianza para probar la igualdad en los tratamientos y se deben probar los supuestos del modelo, los cuales son: Normalidad, Varianza constante e Independencia

2.2.14.4.1 Supuesto de normalidad

La normalidad implica que el componente aleatorio de los tratamientos (error experimental) de un ensayo debe seguir una distribución simétrica cuando la distribución es normal. Se puede probar la normalidad mediante la prueba de Shapiro- Wilk, esta es una de las pruebas con mayor sensibilidad a la no normalidad. (Pulido y De la Vara, 2004)

2.2.14.4.2 Supuesto de homogeneidad de varianzas

Uno de los supuestos más importantes y cruciales en el análisis de varianzas, es el de igualdad de varianzas entre los grupos que se están comparando. La prueba correspondiente se

conoce como prueba de homogeneidad de varianza o prueba de homoscedasticidad. Si las varianzas son diferentes, se dice que hay heteroscedasticidad (Pulido y De la Vara. 2004)

2.2.14.4.3 Supuesto de aleatoriedad

Este supuesto, se debe garantizar si las mediciones hechas para los diferentes tratamientos son realizadas con muestras tomadas al azar.

2.2.14.5 Comparación de medias

Cuando se realiza el análisis de varianza y se rechaza la hipótesis nula para indeterminado factor fijo, se llega a la conclusión de que por lo menos una de las medias de los grupos involucrados en esa fuente de variación difiere del resto y no se puede especificar cual de ellas es la que presenta la diferencia. Por ello es de gran utilidad efectuar comparaciones adicionales entre las medias de los grupos o tratamientos. Dichas comparaciones se realizan en términos de los totales de tratamiento ó de los promedios de tratamiento. Los procedimientos para efectuar las comparaciones se denominan métodos de comparación múltiple (Pulido y De la Vara. 2004)

Una de las pruebas más empleadas es la de Tukey, la cual es un procedimiento de comparación múltiple que está basado en los intervalos. Este procedimiento hace uso de la amplitud “estudentizada” y es aplicable a pares de medias; necesita de un solo valor para juzgar la significancia de todas las diferencias. Es fácil y rápido de comparar ya que solo se hacen comparaciones por pares.

Otro método de comparación es la prueba de Dunnett, la cual se basa en la comparación de diversos tratamientos en función de un control, para lo cual se haya el valor crítico de comparación y se evalúan en función de un intervalo de confianza las medias de los demás

tratamientos para establecer si existe diferencia significativa con un control, el cual carece del tratamiento como tal.

Mediante el empleo de un software estadístico es posible desarrollar más fácilmente el modelo, no obstante debe tenerse en consideración que la interpretación de los resultados obtenidos es el paso más importante en la toma de decisión para seleccionar el mejor de los tratamientos aplicados. (Pulido y De la Vara. 2004).

2.2.15 Análisis económico

Para preparar un proyecto de inversión se deben pasar por las distintas etapas: idea, pre inversión, inversión y operación. A su vez la etapa de pre inversión implica seguir los pasos sucesivos de estudios de nivel perfil, pre factibilidad y factibilidad (Análisis costo beneficio INIE, 1996)

2.2.15.1 Relación costo-beneficio

El análisis Costo-Beneficio, permitir definir la factibilidad de las alternativas planteadas o del proyecto a ser desarrollado. La técnica de análisis de costo - beneficio, tiene como objetivo fundamental proporcionar una medida de los costos en que se incurren en la realización de un proyecto, y a su vez comparar dichos costos previstos con los beneficios esperados de la realización de dicho proyecto. Se puede emplear el análisis costo-beneficio en las siguientes situaciones:

- Para valorar la necesidad y oportunidad de acometer la realización del proyecto.
- Para seleccionar la alternativa más beneficiosa para la realización del proyecto.
- Para estimar adecuadamente los recursos económicos necesarios en el plazo de realización del proyecto.

Si se quiere realizar un análisis de costo - beneficio fiable, se deben de seguir los siguientes pasos:

- Producir estimaciones de costos-beneficios.
- Determinar la viabilidad del proyecto y su aceptación.

2.2.15.2 Estimaciones de costos - beneficios.

Lo primero que debemos de realizar es elaborar dos tipos de listas, la primera con lo requerido para implantar el sistema y la segunda con los beneficios que traer consigo el nuevo sistema. Antes de redactar la lista es necesario tener presente que los costos son tangibles, es decir se pueden medir en alguna unidad económica, mientras que los beneficios pueden ser tangibles y no tangibles, es decir pueden darse en forma objetiva o subjetiva.

Dentro de los costos debe especificarse la inversión inicial y los costos de monitoreo de las variables para un proceso de biorremediación para cada tiempo muestral. Además deben estimarse los beneficios en función de la ventaja que tenga la técnica aplicada con respecto a la más utilizada para ese tipo de desecho.

2.2.15.3 Determinación de la viabilidad del proyecto y su aceptación.

Para determinar si un proyecto es conveniente o no realizarlo es necesario realizar un estudio de viabilidad, donde se determina si el proyecto es factible o no, basándose en uno de los siguientes métodos:

2.2.15.3.1 Retorno de la inversión.

Este método consiste en calcular el costo y beneficio total, sabiendo el costo total al iniciar el proyecto. Permitir saber en que tiempo se recupera el costo total inicialmente

estimado en el proyecto, donde el tiempo de recuperación de la inversión es cuando la sumatoria de los beneficios netos es igual al costo total del inicio del proyecto.

2.2.15.3.2 Valor actual.

Este método permite tener en cuenta que un gasto invertido durante un cierto tiempo produce un beneficio. Con este método se puede determinar la cantidad de dinero que es viable invertir inicialmente para que se recupere la inversión en un período de tiempo corto.

Se debe calcular en primer lugar, el beneficio neto que se obtendrá en cada período. Dicho beneficio no es real, ya que se debe estimar el valor real de dicha cantidad en el tiempo actual tomando en consideración el valor de la inflación mediante un porcentaje de interés. El proyecto será viable si la sumatoria del valor actual es mayor al costo Inicial a lo largo del proyecto. (Análisis costo-beneficio, INIE 1996).



III. MARCO METODOLÓGICO

En la siguiente sección se muestra el tipo de investigación, la profundidad de la misma y el desarrollo metodológico que involucra el presente trabajo, así como el conjunto de actividades llevadas a cabo para el cumplimiento de los objetivos planteados.

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo de grado se enmarca dentro de la modalidad de proyecto de investigación experimental o de laboratorio.

Se entiende por investigación de laboratorio, el análisis sistemático y simulación de problemas de la realidad controlando algunas variables, con el propósito bien sea de describirlos, interpretarlos, entender su naturaleza y factores constituyentes, explicando sus causas y efectos, o predecir su ocurrencia, haciendo uso de métodos característicos de los enfoques de investigación conocidos o en desarrollo. (Scriven M., 1986).

Según el nivel de profundidad para el desarrollo de este trabajo de grado se utiliza un estudio de carácter evaluativo, ya que lo que se requiere es disponer de una evaluación de los procesos de degradación de los crudos en suelos, aplicando diversas técnicas de biorremediación.

La investigación evaluativa implica una actividad constante de juzgar la hipótesis, diseños, experimentos y análisis propios y ajenos mediante una actividad de tipo comparativo desde diversidad de dimensiones. (Scriven M., 1986).

3.2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES A MONITOREAR DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Durante cualquier proceso de degradación microbiana de contaminantes es importante definir las variables que serán determinadas para garantizar el buen desempeño de la técnica aplicada en la restauración de las características y condiciones normales de los ecosistemas perturbados (Infante C., 2001).

3.2.1 Selección de las variables

Para ello se realizó una tormenta de ideas con el fin de establecer las diversas variables que son más influyentes en el proceso de biorremediación a llevar a cabo, tomando en consideración las técnicas utilizadas y los trabajos que se han realizado anteriormente, así como la opinión de expertos en el área.

3.2.2 Diagrama causa- efecto (Ishikawa)

Para establecer las causas más significativas que influyen en la selección de las variables a monitorear durante el proceso de degradación, se realizó un diagrama de causa-efecto (véase figura 3.1). Mediante la agrupación de seis renglones principales en los que se ubican los efectos de bloque, conocidos como las seis “M”, a saber: mano de obra, maquinaria, materiales, métodos, medición y medio ambiente, que luego de ser agrupadas en la forma gráfica conocida como “espina de pescado”, es posible determinar los parámetros más influyentes que permitan establecer las variables a monitorear durante el proceso de biorremediación de manera tal que éste se evalúe de manera efectiva.

Dentro de efectos de bloque que se consideraron para la construcción del diagrama causa-efecto, se tienen:

MATERIALES: representado por los reactivos, y por material de vidrio especial (Como los equipos de extracción Soxhlet y los matraces tipo Schlenkt), así como de los agentes bioestimulante los cuales representan un factor muy importante para la selección, ya que depende de ciertos factores tales como:

- Disponibilidad: en caso que no se cuente con el reactivo grado analítico y la cantidad suficiente para el análisis de las pruebas, al igual que se permita su uso según la normativa legal vigente en el país.

- Toxicidad: se debe tener en cuenta este aspecto a la hora de manipular los reactivos, garantizado su buena manipulación para evitar daños y perjuicios de cualquier tipo.
- Costo: el valor monetario para la adquisición de los reactivos y del material de vidrio influye de manera directa en su rápida obtención.

MEDICIÓN: este factor involucra los equipos de medición empleados, dentro de los cuales destacan las balanzas, material volumétrico, equipos instrumentales de análisis.

- Material volumétrico: para la medición de las diversas cantidades de solventes a emplear y adición de nutrientes.
- Balanzas: para las determinaciones de las diversas fracciones gravimétricas de los hidrocarburos.
- Potenciómetros ó pH-metros: Medidores de pH para cada una de las muestras de suelo tomadas en cada tiempo muestral.

MAQUINARIA: este factor se relaciona con los diversos equipos que son necesarios para el posterior análisis de las muestras extraídas.

- Funcionamiento: se debe verificar que los equipos se encuentren en perfecto estado de funcionamiento, para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.
- Calibración: se debe calibrar los equipos corriendo para ello patrones estándar de comparación de forma tal de obtener resultados válidos.
- Disponibilidad: bien sea en la Universidad de Carabobo, o en alguna otra institución que permita el acceso al análisis de las diversas variables involucradas.

MÉTODOS: aquí se analiza la técnica de extracción a emplear así como los métodos de análisis a utilizar, los factores que se toman en cuenta son:

- Tiempo: la duración del montaje del proceso de extracción en los Soxhlet así como el establecimiento del monitoreo del proceso de degradación.
- Disponibilidad: es importante tener a la mano la metodología a seguir y el permiso respectivo en casos especiales.
- Antecedentes: debe contar con por lo menos un ente de confirmación nacional o internacional, es decir, tener un aval para que esto corrobore la efectividad del método de análisis utilizado.

MEDIO AMBIENTE: representado por el lugar en donde se lleva a cabo la realización del experimento, se consideran los siguientes factores:

- Laboratorios: deben estar dotados de los equipos necesarios y además deben ser de fácil acceso.
- Consideración de las normativas ambientales: se deben realizar las pruebas de manera tal de tener presente la normativa ambiental vigente en el país con el fin de no contribuir a la degradación de las características naturales de los ecosistemas.
- Montaje de los biorreactores: Se requiere de un espacio físico con condiciones idóneas de iluminación y temperatura para el montaje de las unidades experimentales.

MANO DE OBRA: se refiere a la disponibilidad, capacitación y habilidad de los técnicos de los equipos y la familiarización de los experimentadores con la técnica constituye la mano de obra que influye en la selección de las diversas variables a monitorear.

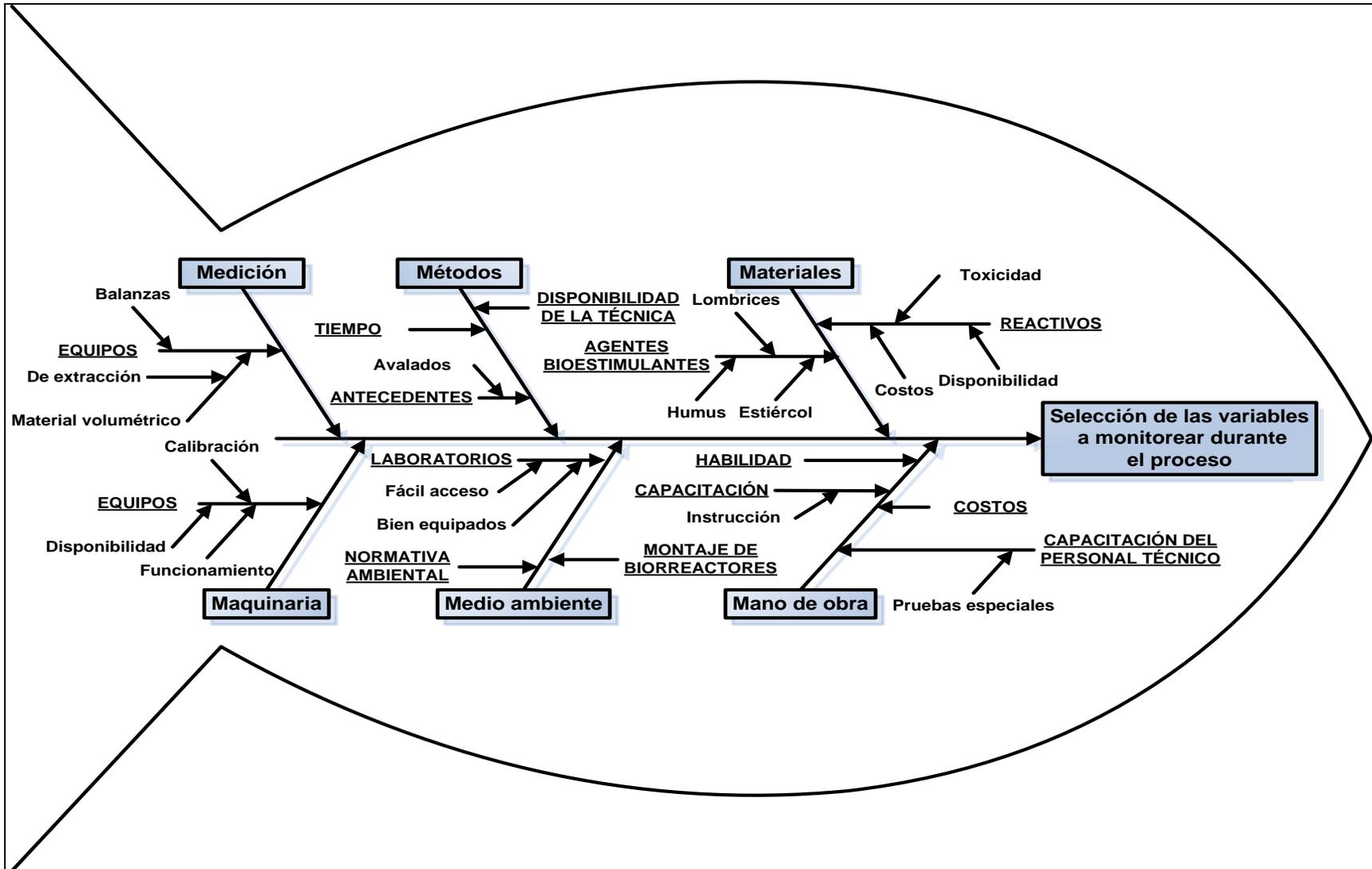


Figura 3.1: Diagrama causa-efecto para la determinación de las diversas variables a monitorear durante el seguimiento del proceso de biorremediación.

3.2.3 Matriz de selección

Dentro de la gran cantidad de posibles variables a ser determinadas en el seguimiento del proceso de biorremediación, se tienen:

- Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)
- Porcentaje de aceites y grasas (% AG)
- Caracterización de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA)
- Porcentaje de humedad relativa (%H_R)
- Potencial de acidez (pH)
- Conteo de aerobios mesófilos (UFC)
- Respirometría (R-CO₂)
- Porcentaje de azufre total (% S_T)
- Tensión interfacial (TI)
- Cromatografía de gases saturados (CG-S)
- Espectros de infrarrojo a aromáticos (IR-A)
- Espectro de masas a aromáticos (CG-MS)
- Espectros de RMN de protones a resinas y asfaltenos (RMN-1H)

Es por ello que se realizó una matriz de selección tomando los criterios más significativos expuestos en el diagrama de causa- efecto (véase figura 3.1), para lograr establecer que variables medir durante cada uno de los tratamientos, entre los cuales se destacan las siguientes causas:

- Maquinaria: disponibilidad de los equipos
- Materiales: disponibilidad de los reactivos, costos
- Métodos: tiempo, antecedentes, disponibilidad de la técnica

A cada uno de estos factores se les asignó un valor comprendido entre un intervalo de (0-1), el cual corresponde al valor del ponderado experto para realizar la matriz de selección, la tabla 3.1 resume los valores otorgados así como la ponderación de cada factor en función a la ventaja o no de dicho factor.

TABLA 3.1
VALORES DE PONDERADO EXPERTO ASIGNADOS A CADA FACTOR DE INTERÉS Y
PONDERACIÓN RELATIVA DE ACUERDO A LAS VENTAJAS QUE OFREZCA

Factores clave		Ponderado experto		Criterio de ponderación Rango (0-10) adim
		Porcentaje (%)	Neto (adim)	
Disponibilidad de	Reactivos	15	0,15	Disponible (10)
	Equipos	15	0,15	No disponible (0)
	Técnica	15	0,15	
Costos		30	0,30	Económico (10) Moderado (5) Costoso (0)
Tiempo		20	0,20	Rápido (10) Moderado (5) Lento (0)
Antecedentes		05	0,05	Muchos (10) Moderados (5) Pocos (0)

Ahora bien, con los datos suministrados en la tabla 3.1 se puede establecer la matriz de selección para cada variable involucrada la cual se muestra en la tabla 4.1.

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA LLEVAR A CABO EL PROCESO DE DEGRADACIÓN

Una vez determinadas las variables a monitorear durante el proceso de degradación, las cuales son:

Hidrocarburos totales de petróleo (HTP), caracterización de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), porcentaje de humedad relativa (%H), potencial de acidez (pH), conteo de aerobios mesófilos (UFC), cromatografía de gases saturados (CG-S), espectros de RMN de protones a asfaltenos y resinas (RMN-1H).

Se pueden establecer en función de los antecedentes las mejores condiciones bajo las cuales se puede llevar a cabo el proceso de degradación del crudo merey presente en un suelo que será expuesto a la acción de un proceso de biorrecuperación.

3.4 OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DEL SUELO

3.4.1 Obtención de las muestras de suelo

Se trabajó con un suelo proveniente de Morichal, estado Monagas en el rodal del módulo MPE – 3 de SINOVENSA (filial de PDVSA). Las muestras de suelo fueron recolectadas el día viernes 01 de junio de 2007. El muestreo de suelo se realizó de la siguiente manera:

- Se observó el relieve y la topografía del área en estudio y se plotearon muestras en forma de zig-zag.
- Se seleccionaron dos puntos de muestreo (Morichal punto 1 y Morichal punto 2). El punto 1 se ubica geográficamente entre las coordenadas 50° 97' 62,00" E y 96° 49' 19,00" N, con una pendiente de aproximadamente 1,3 %, levemente mayor que la del

punto 2, la vegetación presente es pinos (*Pinus caribea*). El punto 2 se ubica entre las coordenadas 51° 02' 97,00" E y 96° 49' 39,00" N, con una pendiente de 1 % y la vegetación en esa área es de chaparros y gramíneas del genero Trachypogon.

- En cada punto seleccionado se consideraron dos horizontes a diferentes profundidades el A [profundidad (0 – 15) cm] y B [profundidad (30 – 45) cm]. (véase figura 3.3).

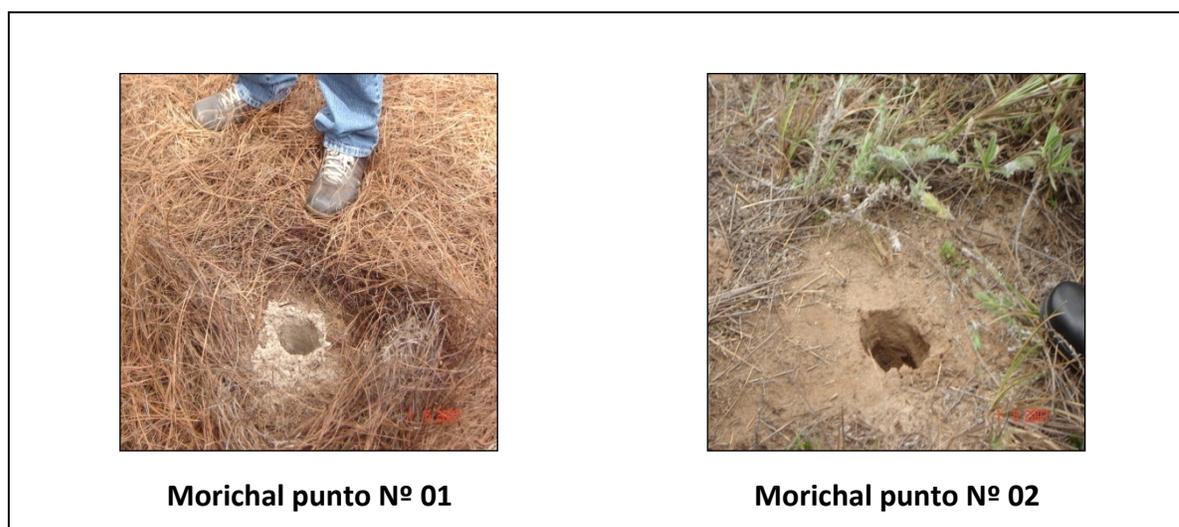


Figura 3.2: Puntos muestreados en el rodal del módulo MPE – 3. SINOVENSA, Edo. Monagas

3.4.2 Caracterización del suelo

Las submuestras fueron mezcladas para obtener una mezcla homogénea, las cuales se llevaron al Laboratorio de Plantas Acuáticas del Instituto de Zoología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y al Laboratorio General de Suelos del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de dicha universidad en donde se determinaron los siguientes parámetros:

Variables químicas: capacidad de intercambio catiónico (CIC), porcentaje saturación con bases (% SB), relación de absorción de sodio (RAS), pH, calcio (Ca), fósforo (P), nitrógeno total

(N) potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg), conductividad eléctrica (Ce), porcentaje de materia orgánica (% MO), aluminio intercambiable (% Al^{3+}_{INT}).

Variabes físicas: porcentaje de arcillas (% A), porcentaje de limo (% L) y porcentaje de arena (% a).

3.4.3 Encalado del suelo virgen

A partir de la caracterización química que se realizó anteriormente se pudo evidenciar que los valores de potencial de acidez en el suelo eran bajos (aproximadamente 4,87), factor limitante para aplicar técnicas de biorremediación, según lo expresa el artículo 53 del decreto 2635: “Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos” publicado en gaceta oficial extraordinaria Nº 5.245 del 3 de agosto de 1998, según el cual para aplicar el biotratamiento es indispensable valores de potencial de acidez en el rango de (6 - 8) adim (véase apéndice F), por lo que es necesario realizar el encalado del suelo con el fin de disminuir su toxicidad por el aluminio intercambiable que origina la acidez (Casanova E., 2005).

3.4.3.1 Determinación de la capacidad de saturación del suelo ó capacidad de retención de agua (CRA)

Con base en la experiencia realizada por González y González 2006, en donde se cita a la norma ASTM D2216 (1998), se procedió a pesar aproximadamente 200 g de suelo virgen en un vaso de precipitado a los cuales se les fue adicionando gradualmente un volumen de 1 mL de agua destilada hasta observar una ligera capa sobrenadante de agua en la superficie del suelo (véase figura 3.3), el instrumento para la recolección de datos se muestra en la tabla B.1.1.

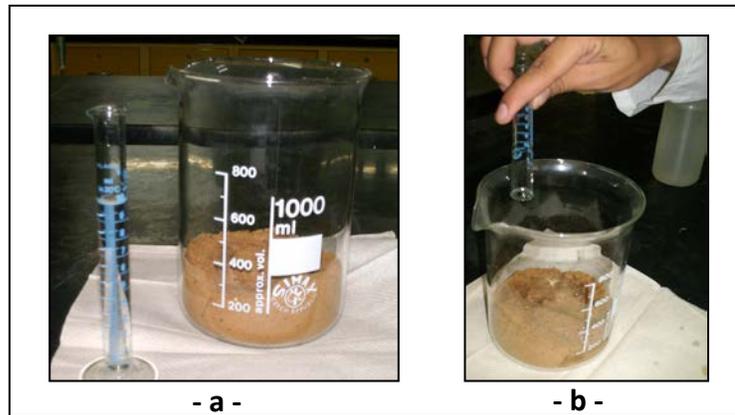


Figura 3.3: Determinación de la capacidad de saturación del suelo. -a-) Suelo y cantidad de agua a agregar; -b-) Adición del agua

3.4.3.2 Determinación de la densidad del suelo

Para tener una idea de la densidad aparente del suelo se siguió la metodología planteada por Casanova E., 2005, para la determinación de la densidad aparente de una muestra suelo ex situ (fuera del campo), la cual consiste en colocar durante un período aproximado de 12 horas la muestra de suelo en una estufa. Una vez seca se colocó en un vaso de precipitado y se midió el volumen que ocupa el suelo sobre el vaso de precipitado, evitando ejercer excesiva presión sobre la superficie, para conservar la estructura natural del suelo. Una vez hecho esto se pesó la muestra de suelo y se puede calcular su densidad muestra la ecuación (III-1); mientras que los datos se tabulan como se indica en la tabla B.1.2.

$$\rho_s = \frac{M_{Bv} - M_{Bs}}{V_s} \quad (\text{III} - 1) \quad (\text{Casanova E., 2005})$$

Donde:

ρ_s : Densidad aparente del suelo (kg/mL)

M_{Bv} : Masa del vaso de precipitado vacío (kg)

M_{Bs} : Masa del vaso de precipitado con el suelo seco (kg)

V_s : Volumen del nivel de suelo en el vaso de precipitado (mL)

3.4.3.3 Determinación de la cantidad de cal a añadir

Para realizar la enmienda del suelo se seleccionó el carbonato de calcio sólido (CaCO_3) que permite la corrección de la acidez por el intercambio de los cationes aluminio en la matriz suelo (Casanova E., 2005), para la estimación de la cantidad de cal que fue necesaria añadir para corregir el potencial de acidez de un nivel muy ácido a la neutralidad, se emplea la siguiente correlación empírica:

$$M_{\text{CaCO}_3} = \frac{M_S \times [\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}] \times \text{Fe}}{\rho_S \times P_S} \quad (\text{III} - 2) \quad (\text{Casanova E., 2005})$$

Donde:

M_{CaCO_3} : Masa de carbonato de calcio a adicionar (kg)

M_S : Masa de suelo a encalar (kg)

$[\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}]$: Cantidad de aluminio intercambiable presente en el suelo (meq $\text{Al}_{\text{INT}}^{3+}$ /100g de suelo)

ρ_S : Densidad aparente del suelo (ton/m^3)

P_S : Profundidad a la que fue tomada el suelo (m)

Fe: Factor empírico; $\left(\text{Fe} = 1,65 \times 10^{-4} \frac{\text{ton} \times \text{ha} \times 100 \text{ g de suelo}}{\text{ha} \times \text{m}^2 \times \text{meqAl}_{\text{INT}}^{3+}} \right)$

3.4.3.4 Proceso de encalado del suelo para corregir la acidez

Seguido a esto se pesaron aproximadamente 15 kg de suelo virgen y se procedió a realizar la adición del carbonato de calcio, el cual fue disuelto en una cantidad de agua correspondiente al 60 % de la cantidad de saturación hasta formar una emulsión, agregándolo lentamente y mezclando muy bien con el empleo de un rastrillo y guantes de goma, observándose una ligera efervescencia, según lo muestra la figura 3.4.

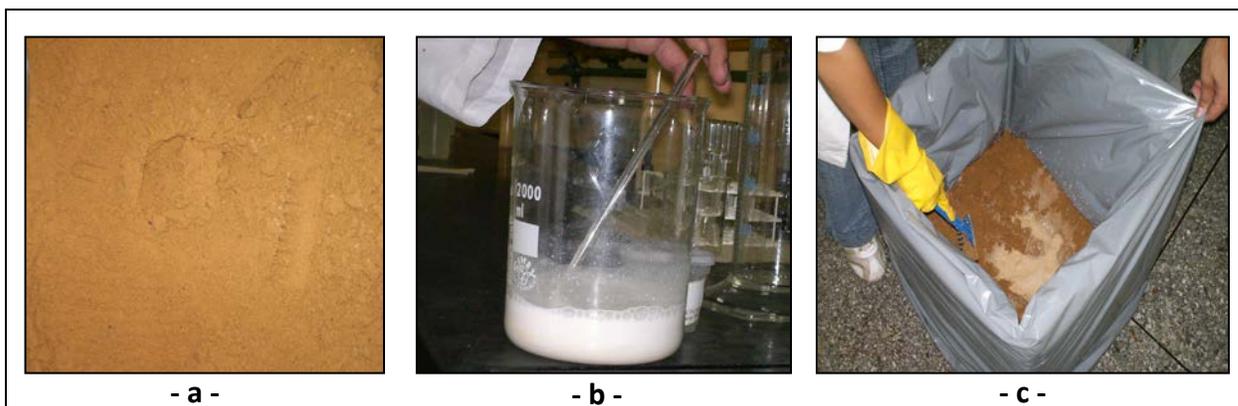


Figura 3.4: Proceso de encalado del suelo virgen. -a-) Suelo virgen antes de encalar; -b-) Mezcla CaCO_3 más agua; -c-) Mezcla suelo con CaCO_3 .

3.4.3.4.1 Medición del potencial de acidez

Se utilizó un pH-metro para potenciometría directa, marca Orión modelo 720-A. Equipado con un electrodo de referencia de calomel y uno indicador de membrana de vidrio sensible con referencia interna de Ag/AgCl .

Para la calibración del pH-metro se introdujo el mismo en dos soluciones buffer de pH 4,00 y 7,00. Una vez calibrado, se tomaron aproximadamente 5 g de suelo encalado en un vaso de precipitado al cual se le agregaron 25 mL de agua destilada (relación 1:5) según Martínez 2005, se colocó en una plancha de agitación con un agitador magnético por espacio de 15 min, luego se decantó el líquido sobrenadante y finalmente se midió el pH introduciendo el electrodo dentro del vaso de precipitado que contenía la solución, realizando las mediciones por triplicado. Tal como se muestra en la figura 3.5.



Figura 3.5: Determinación del potencial de acidez al suelo encalado. -a-) Medición del pH a la solución sobrenadante después de ser decantada; -b-) Valor arrojado por el pH-metro

El suelo encalado se dejó en reposo durante una semana, tiempo en el cual se realizó el mismo seguimiento midiendo el potencial de acidez hasta verificar que esta se mantiene en el valor deseado y de forma constante, empleando la tabla de datos B.1.3.

3.5 OBTENCIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO

El petróleo crudo se extrajo de un ripio de perforación, el cual se encuentra ubicado en la faja petrolífera del Orinoco, por el sector Cerro Negro (campo Carabobo). (véase figura 3.6).

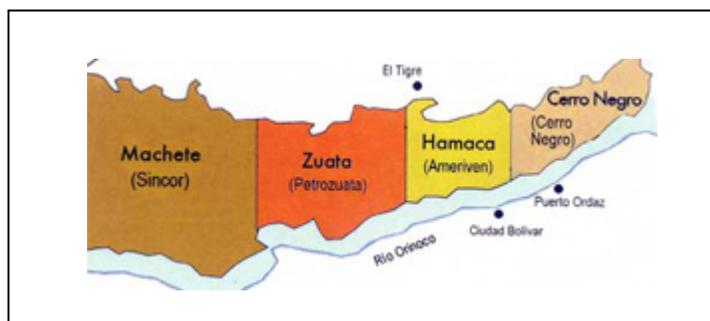


Figura 3.6: Áreas de la faja petrolífera del Orinoco: Boyacá (Machete), Junín (Zuata), Ayacucho (Hamaca), Carabobo (Cerro Negro).

La muestra de crudo fue captada por la empresa “Y&V Ecoproyectos” y constó de aproximadamente un litro de petróleo crudo tipo “Merey” de 15,70 ° API, la cual fue debidamente envasada en un recipiente de vidrio y sellada en bolsas de plástico color negro para su posterior transporte. Los puntos de captación de crudo se ubica geográficamente en 08° 38' 36.09" N y 62° 47' 60.00" O. (véase figura 3.7).



Figura 3.7: Vista aérea del lugar de captación del petróleo crudo en la faja petrolífera del Orinoco. Imagen a 214 pies de altura. Fuente: Google Earth (2008).

3.6 ADAPTACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE LA LOMBRIZ EISENIA FOÉTIDA EN UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO

3.6.1 Obtención de los especímenes de la Eisenia foétida

Las lombrices de tierra del género *Eisenia foétida* fueron obtenidas de la unidad de Lombricultura del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay (véase figura 3.8), las cuales se prepararon con una mezcla de sustrato correspondiente a estiércol equino maduro.



Figura 3.8: Vista de las instalaciones de la unidad de Lombricultura del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay.

3.6.2 Preparación de los biorreactores de prueba

Con la finalidad de observar el comportamiento evolutivo y desarrollo de la lombriz *Eisenia foétida* se dispuso del suelo anteriormente encalado y de una pequeña porción del crudo Merrey, como lo muestra la figura 3.9.

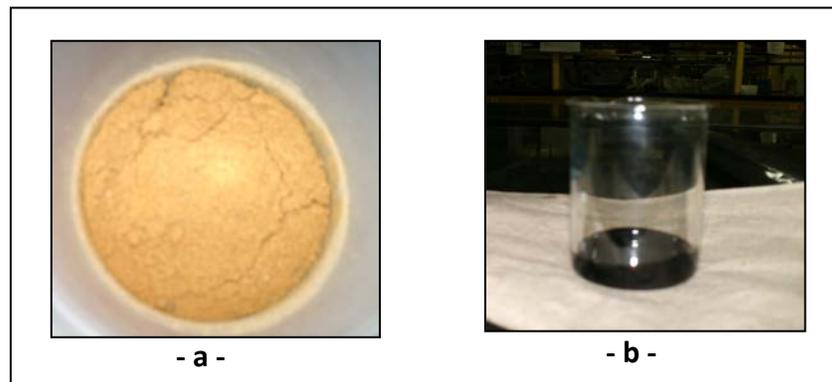


Figura 3.9: Preparación de los biorreactores de prueba. -a-) Suelo encalado; -b-) Crudo Merrey

Con cual se realizaron tres biorreactores de prueba a pre-escala según lo recomienda (Méndez L *et al.* 2006), de la siguiente forma (véase figura 3.10):

- **Alto impacto:** contiene (60 ± 1) g del suelo encalado con aproximadamente 6 g de crudo, para una concentración de hidrocarburos totales de 10 %.
- **Medio impacto:** contiene (60 ± 1) g del suelo encalado con aproximadamente 3 g de crudo, para una concentración de hidrocarburos totales de 5 %.
- **Bajo impacto:** contiene (60 ± 1) g del suelo encalado con aproximadamente 1 g de crudo, para una concentración de hidrocarburos totales de 2 %.

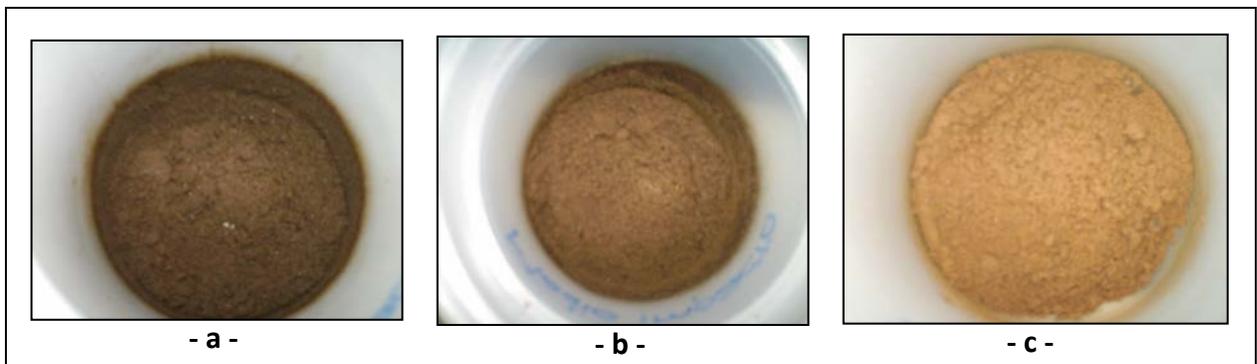


Figura 3.10: Biorreactores de prueba a pre-escala. -a-) Alto impacto; -b-) Medio impacto; -c-) Bajo impacto

3.6.3 Adición del sustrato

En este paso no fue necesario realizar el tratamiento respectivo al sustrato (mejor conocido como estiércol); ya que esta fue facilitada por el técnico encargado de la unidad de Lombricultura del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay.

Dicho sustrato poseía una apariencia física de color oscuro, inoloro, compacto y con presencia de cierto grado de humedad. (véase figura 3.11).



Figura 3.11. Sustrato o estiércol equino listo para ser usado como agente bioestimulador

Se realizó la adición de aproximadamente 25 g del sustrato a las respectivas muestras con la ayuda de una espátula de porcelana se unificaron ambos componentes tratando de obtener una mezcla homogénea; por otra parte se adicionó una capa superficial extra de estiércol. Ya realizado la adición del sustrato se procedió a la adición de cierta cantidad de agua para humectar el sustrato.

Es importante mencionar que el sustrato debe estar bien humedecido o poseer al menos un 80 % de humedad, ya que de llegar a tener un porcentaje de humedad por debajo del 60 % sería mortal para las lombrices (Ferruzzi C., 1994) tal como se muestra en la figura 3.12.



Figura 3.12. Adición de agua al sustrato o estiércol en los biorreactores a pre-escala

3.6.4 Inoculación de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*)

Se procedió a la inoculación de las lombrices en cada muestra, en total se inocularon 12 lombrices en cada envase, esto se realizó al aire libre y en plena luz del día (Ferruzzi C., 1994). Es de resaltar que no se debe de ayudar a las lombrices a introducirse en las muestras, ni colocarles una capa de sustrato encima.

Al pasar el tiempo se pudo apreciar como las lombrices se fueron introduciendo al nuevo habitat tal como se muestra en la figura 3.13.

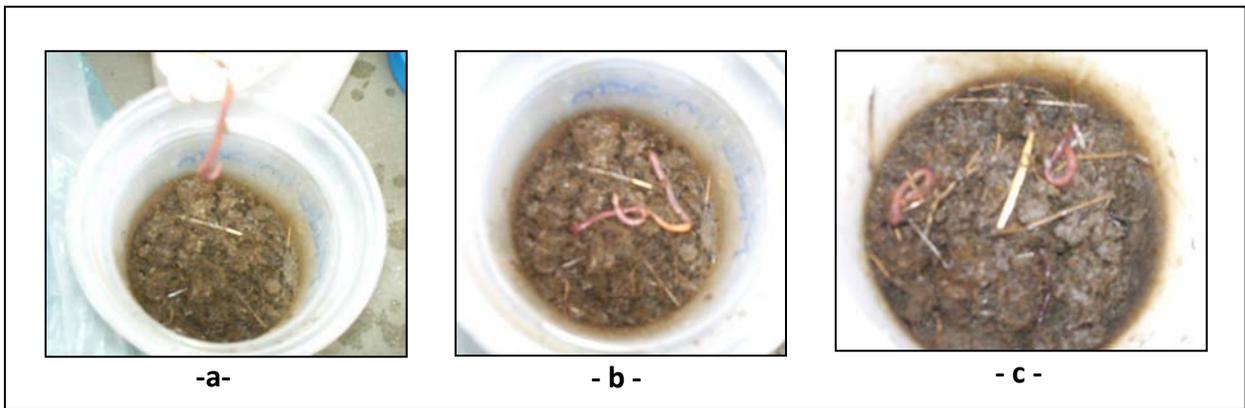


Figura 3.13. Inoculación de las lombrices de tierra *Eisenia foétida* en los biorreactores a pre-escala con el estiércol. -a-) Alto impacto; -b-) Medio impacto; -c-) Bajo impacto

3.6.5 Conteo de macroorganismos vivos (*Eisenia foétida*)

En este paso se procedió a extraer el contenido de cada muestra y verterlo sobre una superficie limpia. A partir del día 02/10/2007 a las 5:30 pm fecha en la cual fueron inoculadas se humectó cada dos días los biorreactores a pre-escala, y se realizó un conteo manual de los organismos vivos presentes, durante un período aproximado de dos semanas, empleando la tabla mostrada en B.1.4.

3.7 CARACTERIZACIÓN DEL CRUDO MEREY

Para la realización de la caracterización inicial del crudo, se siguió el procedimiento de determinación gravimétrica de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), según la norma propuesta por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), por sus siglas en inglés, 8020/8100 EPA - 1986, citada por Polychroniadis y Barrios 2006.

3.7.1 Obtención de la fracción de asfaltenos

Inicialmente se pesan a temperatura ambiente en un vaso de precipitado ($10,0 \pm 0,1$) g de crudo y se diluyen en 300 mL de n-hexano p.a luego se le introduce a la mezcla un agitador magnético y se coloca el vaso de precipitado en una plancha de agitación. Se agita constantemente por espacio de 4 horas en un nivel de 4-5 de agitación. Posteriormente la mezcla se deja en reposo por 2 horas.

Luego de transcurrido el tiempo de reposo se procede a filtrar por gravedad, empleando para ello papel de filtro Whatman N° 40 hasta separar la suspensión de los asfaltenos (sólido color negro) de los demás compuestos, la solución filtrada obtenida se guarda para análisis posteriores, mientras que el sólido adherido al papel de filtro (asfaltenos), se envuelve empleando pabilo y otro papel de filtro para formar una especie de "hallaca". Para luego, situarlos en un equipo de extracción Soxhlet reflejándolos con h-hexano p.a hasta observar que el solvente se torna totalmente incoloro.

Una vez logrado esto se sacan los asfaltenos y se dejan secar a temperatura ambiente por 1 hora, la solución que quedó del reflujo en el equipo de extracción Soxhlet, se debe incorporar a la solución filtrada obtenida anteriormente. Al tener los asfaltenos completamente secos, se raspan con mucho cuidado sobre otro papel de filtro previamente pesado y el porcentaje de asfaltenos en el crudo se puede estimar por la relación (III-3), reportando los valores en la tabla B.1.5. Esta metodología se resume en la figura 3.14.

$$\% \text{ Asf} = \frac{\text{MPF}_{(A)} - \text{MPF}}{M_C} \times 100 \quad (\text{III} - 3) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

% Asf: Porcentaje de asfaltenos en el crudo (%)

MPF_(A): Masa del papel de filtro con los asfaltenos recolectados (g)

MPF: Masa del papel de filtro (g)

M_C: Masa inicial del crudo a fraccionar (g)

3.7.2 Obtención de los maltenos

El sobrenadante obtenido (solución filtrada) de la precipitación de los asfaltenos es llamado maltenos (Canals V., 2005) y está constituida por las fracciones de saturados, aromáticos y resinas. Esta mezcla es colocada en un rotaevaporador para someterla a destilación en donde se recupera del n-hexano contenido en los maltenos.

Se debe activar la silica gel 60 de Merck [63-200µm (70-230 mesh ASTM)] para esto se procede a tomar la cantidad en gramos de la misma en relación 1:30 con respecto a la cantidad de solución de maltenos tomada para efectuar la elución en la columna sometiéndola durante 24 horas a calentamiento en una estufa a 120 °C.

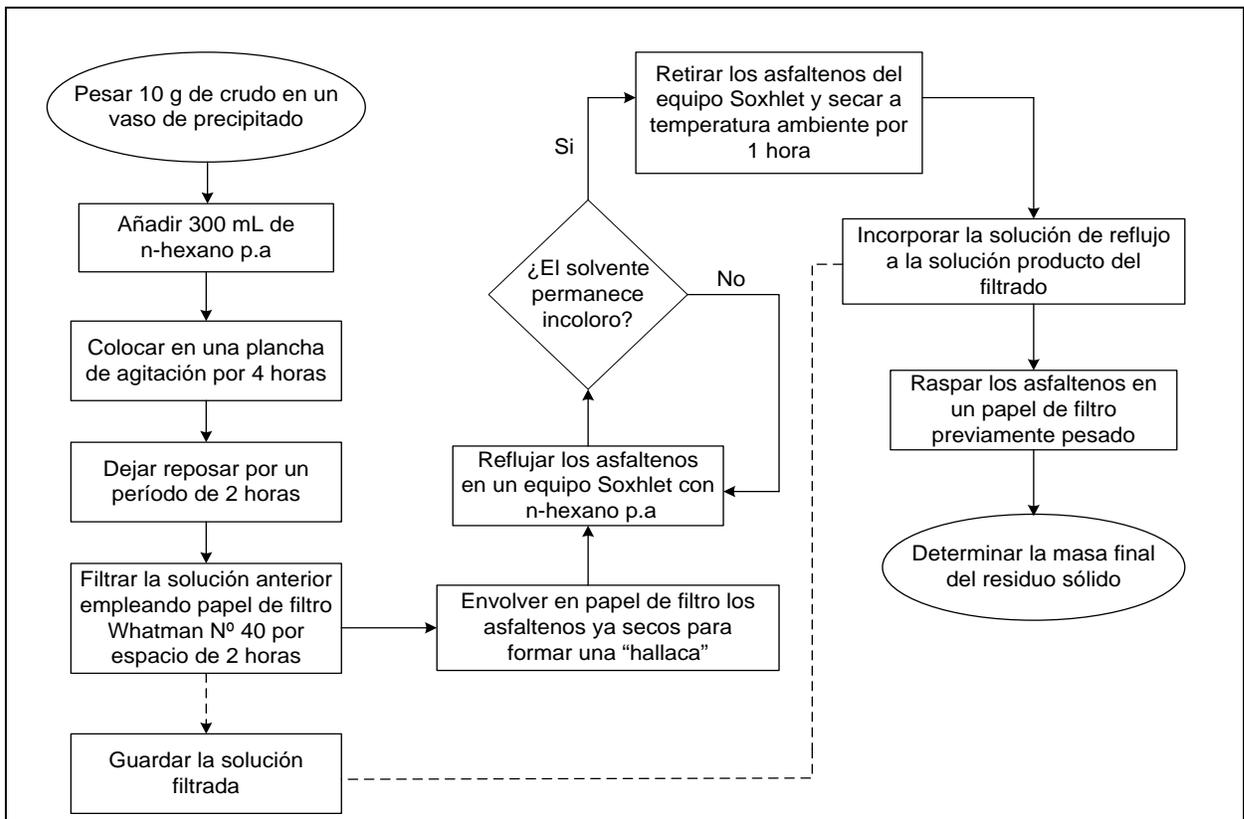


Figura 3.14: Procedimiento a seguir para la obtención de la fracción de asfaltenos presente en el crudo.

Para realizar el empaquetamiento se coloca al final de la columna un poco de lana de vidrio, se debe llenar la columna de vidrio hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con n-hexano cuidando de no dejar gotas de aire a lo largo de la columna, luego se va agregando la sílice gel lentamente dando pequeños golpes a la columna con una manguera de goma para así lograr un empaquetamiento uniforme mientras se agrega la sílice, este procedimiento se realiza hasta agregar toda la cantidad de sílice pesada.

Es de suma importancia que el nivel de líquido en la columna se mantenga siempre aproximadamente 2 cm por encima del tope del empaque de sílice y cuidar que la columna cromatográfica no se seque.

3.7.2.1 Obtención de la fracción saturada:

Se pesan aproximadamente un gramo de los maltenos obtenidos y se disuelven en un poco de n-hexano p.a y agregándolos a la columna por la parte superior del empaque y con la llave abierta, continuamente se sigue agregando n-hexano en una cantidad aproximada de 50 mL por gramo de muestra. Para este momento ya se comenzara a observar la separación en la columna cromatográfica de la fracción saturada la cual es totalmente incolora.

3.7.2.2 Obtención de la fracción aromática:

Se deben agregar 50 mL de una mezcla hexano-tolueno 50:50 y posteriormente 50 mL de tolueno en varias porciones hasta observar con una lámpara manual de luz ultravioleta que ya han aparecido toda la cantidad de compuestos aromáticos los cuales son resaltados con esta luz (coloración azul intenso), procediendo al reemplazo del vaso de precipitado recolector ubicado al final de la columna cuando esto suceda, para obtener la fracción aromática incolora más la que presenta una coloración amarillo claro.

3.7.2.3 Obtención de la fracción resinas:

Se deben agregar 50 mL de una mezcla tolueno-metanol 50:50 y posteriormente 50 mL de metanol en varias porciones hasta que la columna se encuentre completamente limpia, cambiando el vaso de precipitado recolector al observar que la parte más oscura de líquido retenido en la columna empieza a caer. La figura 3.15 ilustra de forma esquemática la metodología para la separación de los maltenos.

Al finalizar estos pasos se procede a evaporar o recuperar el solvente que contiene cada fracción de crudo en un rotaevaporador, se pesan los residuos reportando los valores en un modelo de tabla B.1.6 y se calculan los porcentajes en base a la cantidad de crudo pesada inicialmente, según las ecuaciones III-4, III-5 y III-6.

$$\% \text{ Sat} = \frac{\left(1 - \frac{\% \text{ Asf}}{100}\right) \times (M_{\text{Sat}} - M_{\text{Bv}})}{M_{\text{T}}} \times 100 \quad (\text{III} - 4) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

% Sat: Porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo (%)

M_{Sat} : Masa del balón lleno con la fracción saturada después de la rota evaporación (g)

M_{Bv} : Masa del balón vacío antes de la rota evaporación (g)

M_{T} : Masa de maltenos tomada para realizar la elución en la columna (g)

$$\% \text{ Aro} = \frac{\left(1 - \frac{\% \text{ Asf}}{100}\right) \times (M_{\text{Aro}} - M_{\text{Bv}})}{M_{\text{T}}} \times 100 \quad (\text{III} - 5) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

% Aro: Porcentaje de hidrocarburos aromáticos en el crudo (%)

M_{Aro} : Masa del balón lleno con la fracción aromática después de la rota evaporación (g)

$$\% \text{ Res} = 100 - (\% \text{ Asf} + \% \text{ Sat} + \% \text{ Aro}) \quad (\text{III} - 6) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

% Res: Porcentaje de resinas presentes en el crudo (%)

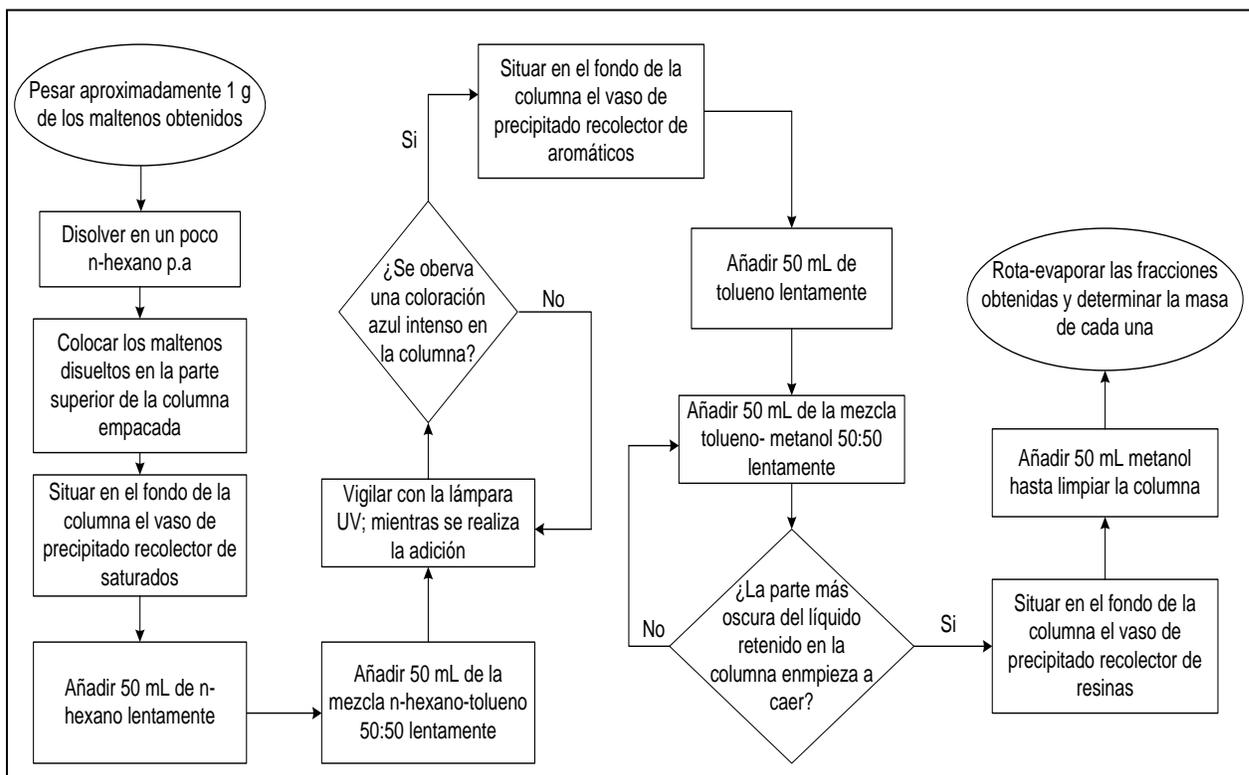


Figura 3.15: Procedimiento a seguir para la obtención de la fracción de saturados, aromáticos y resinas presente en el crudo.

3.8 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN

3.8.1 Preparación del suelo contaminado

A los 15 kg de suelo encalado se le adicionó aproximadamente una cantidad de 850 g de crudo Merrey, el cual era un líquido de aspecto viscoso color negro y se procedió a unir ambos componentes, empleando para ello guantes de goma y máscaras para gases, en un lugar ventilado hasta obtener una mezcla totalmente homogénea. Este proceso se resume en la figura 3.16.



Figura 3.16: Preparación del suelo contaminado. -a-) Adición del crudo al suelo; -b-) Proceso de mezclado del crudo con el suelo encalado; -c-) Suelo contaminado

Una vez obtenido el suelo contaminado se procedió a pesar las cantidades de $(1,5000 \pm 0,0001)$ kg de suelo contaminado y de $(0,3500 \pm 0,0001)$ kg estiércol equino, disponiéndose en bolsas plásticas para su fácil transporte y manejo. (véase figura 3.17).



Figura 3.17: Disposición de las muestras de suelo contaminado y estiércol equino para su posterior traslado.

3.8.2 Determinación del porcentaje de los macro elementos en los biorreactores

Antes de iniciar el montaje de la unidades experimentales, es importante conocer en base a las caracterizaciones de suelo virgen y de los sustratos (agentes bioestimulante), las relaciones de carbono – nitrógeno, presentes al inicio de la experimentación.

Como no fue posible la caracterización del suelo contaminado, se consideró que el nitrógeno y el fósforo presente en el mismo son iguales a los del suelo virgen, mientras que el porcentaje de carbono total se puede estimar mediante la siguiente correlación propuesta por Levin M *et al.*, 1997.

$$C_T = 0,78 \times \text{HTP} \quad (\text{III} - 7) \quad (\text{Levin M } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

C_T : Carbono total (%)

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo del suelo contaminado al inicio del tratamiento (%)

Como en los datos de caracterización del suelo y de los fertilizantes se registró el porcentaje de materia orgánica, se emplea la siguiente ecuación para estimar el carbono orgánico total, conocida la materia orgánica:

$$C_T = \frac{M_o}{1,724} \quad (\text{III} - 8) \quad (\text{Levin M } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

M_o : Materia orgánica (%)

Una vez obtenidas las caracterizaciones de todos los compuestos involucrados, se puede estimar el porcentaje de un macro elemento (C, N, ó P), en la mezcla de suelo contaminado y sustrato dentro del biorreactor, como sigue:

$$\%M_E = \frac{\frac{M_S \times \%M_{ES}}{100} + \frac{M_B \times \%M_{EB}}{100}}{M_S + M_B} \times 100 \quad (\text{III} - 9) \quad (\text{Brown T } et \text{ al.}, 2005)$$

Donde:

$\%M_E$: Porcentaje del macro elemento en el biorreactor (%)

$\%M_{ES}$: Porcentaje del macro elemento presente en el suelo (%)

$\%M_{EB}$: Porcentaje del macro elemento presente en el bioestimulante (%)

M_B : Masa del bioestimulante agregada al biorreactor (g)

M_S : Masa de suelo agregada en el biorreactor (g)

Con los valores de los macro elementos presentes en los biorreactores se pueden estimar las diversas relaciones de nutrientes.

3.8.3 Montaje de las unidades experimentales

Posteriormente se procedió al montaje de los 10 biorreactores, correspondientes a tres tipos de tratamientos establecidos por la presente investigación, en donde se sigue un diseño de experimentos completamente aleatorizado, tal cual como se expone a continuación:

Tratamiento tipo 1: unidad de bioestimulación con estiércol equino:

(Biorreactores 2, 3, 4)

Contienen:

- $(1,5000 \pm 0,0001)$ kg del suelo contaminado.
- $(0,3500 \pm 0,0001)$ kg de sustrato (estiércol equino) previamente tratado.

Tratamiento tipo 2: unidad de bioestimulación con humus líquido

(Biorreactores 5, 6, 7)

Contienen:

- $(1,5000 \pm 0,0001)$ kg del suelo contaminado.
- $(0,1900 \pm 0,0001)$ kg de humus líquido.

Tratamiento tipo 3: unidad de bioestimulación con Eisenia foétida

(Biorreactores 8, 9, 10)

Contienen:

- (1,5000 ± 0,0001) kg del suelo contaminado.
- (0,3500 ± 0,0001) kg de sustrato (estiércol equino) previamente tratado.
- Inocular 15 macroorganismos del género Eisenia foétida por biorreactor.

Adicionalmente se monta el biorreactor N° 01 que contiene 1,5 kg de suelo impactado, al cual no se le adiciona ningún tipo de bioestimulante, también llamado tratamiento control o patrón. La figura 3.18 muestra el aspecto físico de los biorreactores al inicio de los tratamientos.



Figura 3.18: Condiciones físicas iniciales de los biorreactores para el día del montaje experimental (tiempo muestral cero días)

Una vez realizado el montaje de los biorreactores los cuales fueron dejados en un lugar ventilado, sin exposición directa a la luz solar y bajo las mismas condiciones, se procedió a la recolección de muestras correspondiente a cada tratamiento para los distintos tiempos muestrales que fueron establecidos, a saber 0, 5, 9, 14 y 22 días de evaluación continua de las diversas variables que fueron seleccionadas para realizar el monitoreo.

Para la recolección de las muestras de suelo en cada tiempo muestral se empleó el método propuesto por Volké T *et al.*, 2005 citado por González y González 2006. En donde la muestra de un biorreactor es considerada como el conjunto de varias submuestras tomadas en nueve puntos en forma de rejilla para formar una muestra compuesta (véase figura 3.19)



Figura 3.19: Método de muestreo para obtener una muestra compuesta en cada biorreactor

Posteriormente en cada biorreactor se tomaron las muestras necesarias para realizar las diversas pruebas. Estableciendo como el día cero de tratamiento, la fecha del montaje que fue el día miércoles 24/10/2007. Las muestras para la determinación de hidrocarburos totales y carga bacteriana eran guardadas en embases plásticos, debidamente etiquetadas y mantenidas bajo refrigeración para su posterior análisis. (véase figura 3.20).



Figura 3.20: Disposición final de las muestras y de los biorreactores

3.8.4 Determinación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Esta variable fue determinada según la norma propuesta por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) por sus siglas en inglés, conocida como METHOD 3540C SOXHLET EXTRACTION-1996, citado por Bernys J., 2006.

Primeramente se recolectó una muestra compuesta del suelo de aproximadamente 50 g siguiendo la metodología descrita anteriormente, la cual se envolvió en un papel de filtro de manera tal de darle la forma de una “hallaca” sujetándola firmemente con pabilo (véase figura 3.21). Se procedió a pesar el balón de destilación de 250 mL y se registró la masa del mismo, introduciéndole perlas de ebullición.

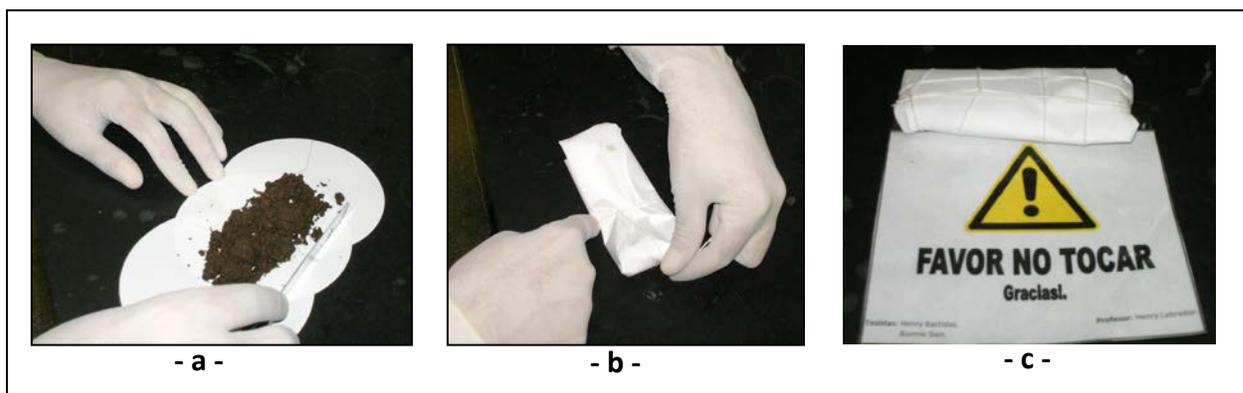


Figura 3.21: Proceso de elaboración de la “hallaca” para el montaje Soxhlet. -a-) Disposición de el suelo seco en el papel de filtro; -b-) Formación de la hallaca con pabilo; -c-) Hallaca terminada.

Por otro lado, se instaló el equipo de extracción Soxhlet, asegurándose de añadir al balón de destilación tetrahidrofurano p.a (C_4H_8O) hasta la mitad de la capacidad del mismo (véase figura 3.22).

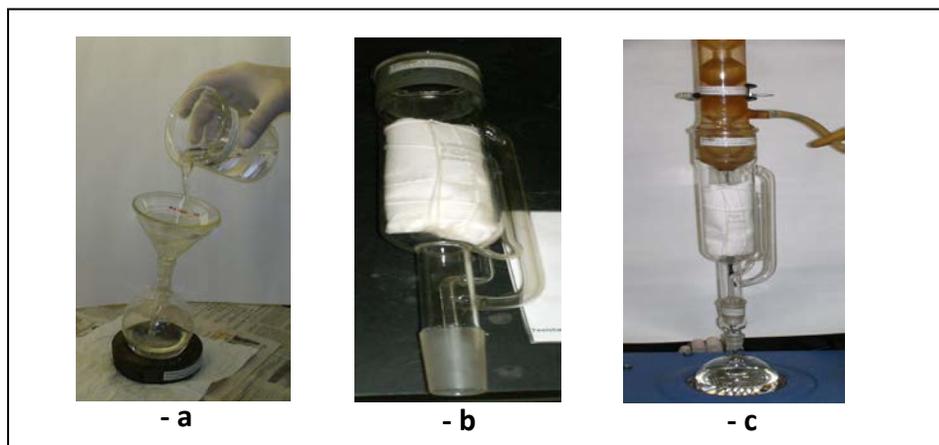


Figura 3.22: Montaje del equipo de extracción Soxhlet. -a-) Adición de tetrahidrofurano al balón de 250 mL; -b-) Hallaca con muestra de suelo dentro del Soxhlet; -c-) Aspecto inicial del equipo de extracción

Luego, se ajustó el control del manto calorífico situándolo en un nivel 2 de temperatura y se procedió a realizar la extracción, refluendo el solvente hasta que se observó transparencia del mismo en la parte superior del equipo Soxhlet (véase figura 3.23).

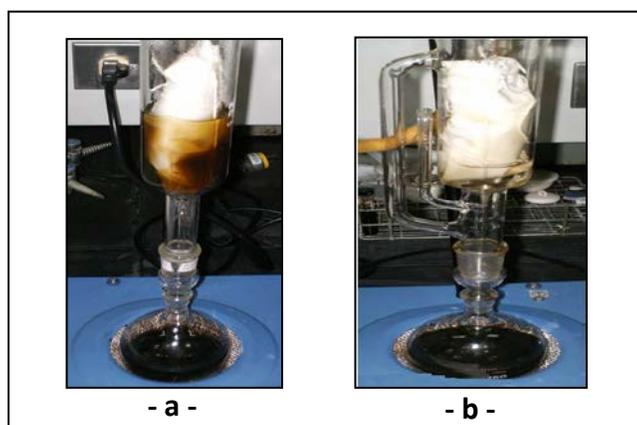


Figura 3.23: Operación del equipo de extracción Soxhlet: -a-) Coloración del solvente comenzando la extracción del hidrocarburo; -b-) Coloración del solvente luego de finalizada la extracción.

Transcurrido el periodo de extracción, se dejó enfriar el sistema, sin cerrar el flujo del agua de enfriamiento. Se recuperó el solvente empleando un rotaevaporador mostrado en la figura 3.24.



Figura 3.24: Rotaevaporador empleado para la recuperación de solventes.

Y el residuo de crudo que quedó se transvasó a un fiola o matraz Erlenmeyer previamente pesado, en donde se evaporó a sequedad el solvente, bajo una plancha de calentamiento a un nivel 1 de temperatura. Una vez hecho esto se procede a pesar la fiola llena, este procedimiento se describe en la figura 3.25.

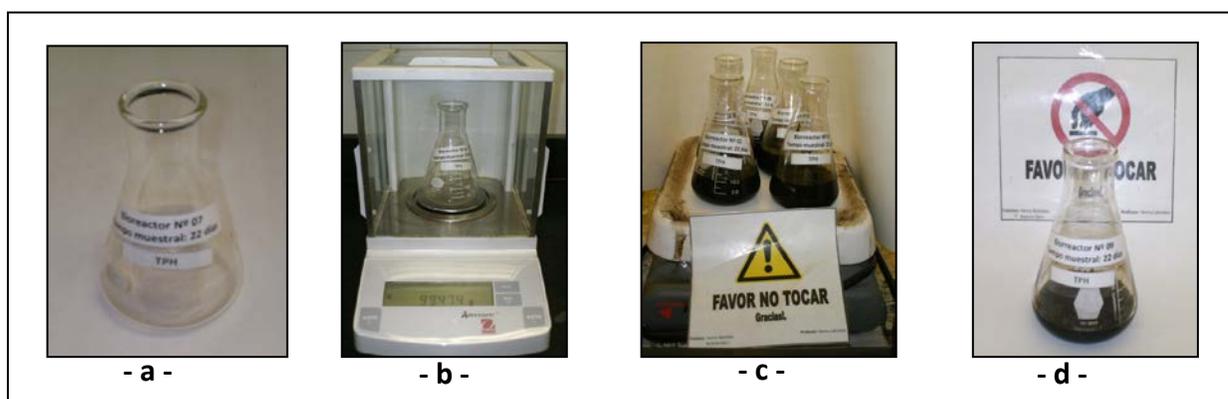


Figura 3.25: Tratamiento del hidrocarburo extraído. -a-) Fiola vacía en donde se adiciona el hidrocarburo; -b-) Pesada de la fiola vacía; -c-) Evaporación del solvente; -d-) Hidrocarburo extraído ya pesado

El hidrocarburo total de petróleo extraído se puede estimar por la ecuación III-10. Este procedimiento se resume en la figura 3.26.

$$\% \text{ HTP} = \frac{M_{FV} - M_{FC}}{M_S} \times 100 \quad (\text{III} - 10) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

M_{FV} : Masa de la fiola vacía (g)

M_{FC} : Masa de la fiola con el hidrocarburo extraído (g)

M_S : Masa de suelo recolectada (g)

Mientras que el porcentaje de degradación se pudo calcular mediante la relación expuesta en III-11:

$$\%D_t = \left(1 - \frac{(\text{HTP})_0}{(\text{HTP})_t} \right) \times 100 \quad (\text{III} - 11) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

$\%D_t$: Porcentaje de degradación de hidrocarburos (%)

$(\text{HTP})_0$: Hidrocarburos totales de petróleo al inicio de tratamiento (%)

$(\text{HTP})_t$: Hidrocarburos totales de petróleo a un tiempo (t) del tratamiento (%)

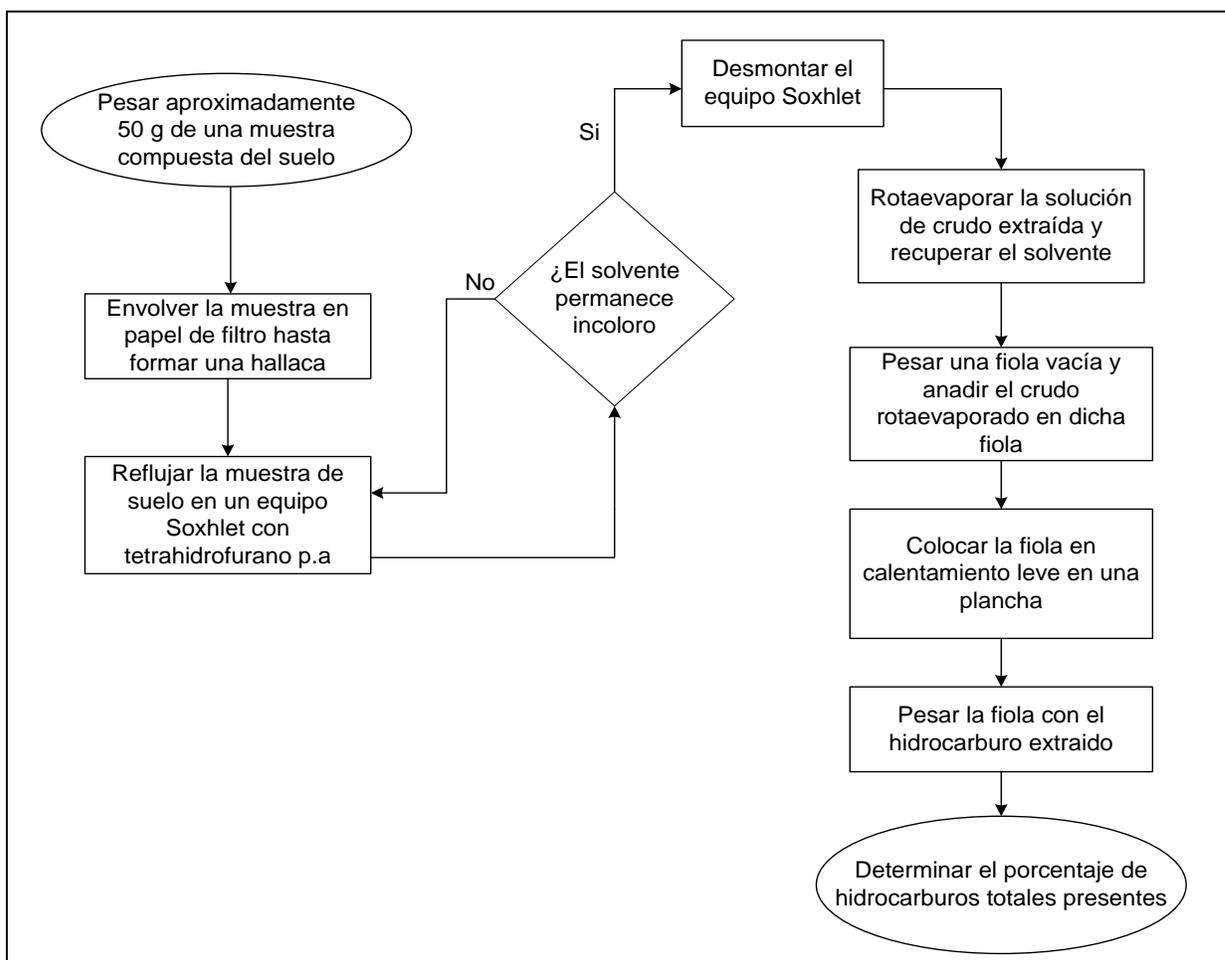


Figura 3.26: Procedimiento a seguir para la obtención de los hidrocarburos totales de petróleo.

3.8.5 Precipitación de asfaltenos:

Se procedió de manera similar a como se realizó la obtención de la fracción de asfaltenos en la caracterización del crudo. Para ello se adicionaron aproximadamente 60 mL de n-hexano p.a y se dejó en agitación por un período de cuatro horas en una plancha de agitación empleando un agitador magnético. Luego, se procedió al filtrado de la suspensión de asfaltenos y se dejó en reposo por un día, tal como se muestra en la figura 3.27.



Figura 3.27: Obtención de asfaltenos. -a-) Etapa de precipitación con n-hexano p.a; -b-) Etapa de filtración

Después se procedió a raspar los asfaltenos adheridos al papel de filtro, empleando para ello una espátula de metal, tal como se muestra en la figura 3.28.

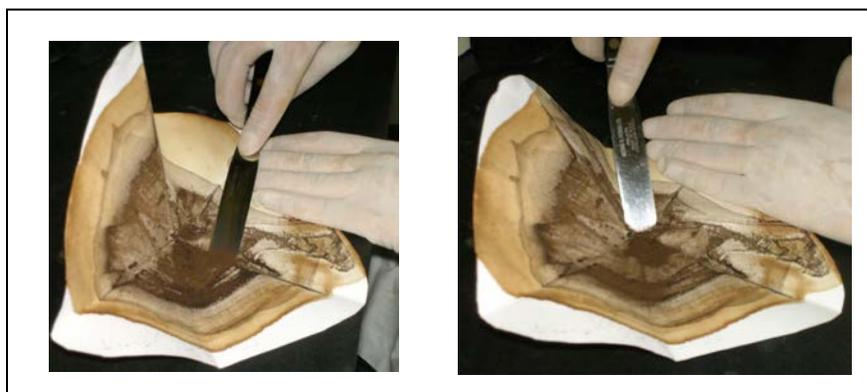


Figura 3.28: Proceso de raspado de asfaltenos del papel de filtro.

Los asfaltenos raspados se agregaron en un vaso de precipitado de 50 mL y se les adicionó aproximadamente 10 mL de n-hexano p.a, luego se llevaron a un equipo de ultrasonido Marca *Ultrasonic bath Fisher Scientific* modelo FS110H, por aproximadamente 30 minutos, como se muestra en la figura 3.29.

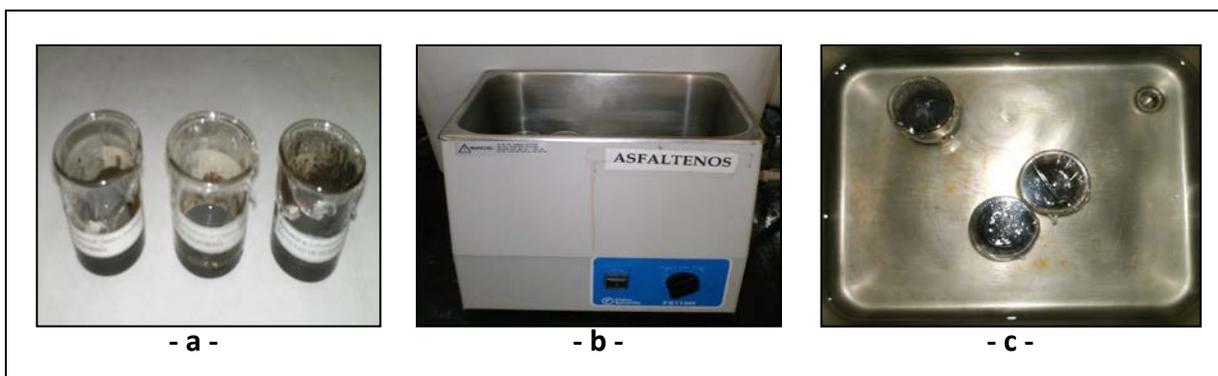


Figura 3.29: Tratamiento de los asfaltenos con ultrasonido. -a-) Mezclas asfaltenos con n-hexano p.a; -b-) Equipo *Fisher Scientific Ultrasonic Bath FS110H*; -c-) Durante el proceso de ultrasonido

Posteriormente se re-filtraron los asfaltenos obtenidos y se volvieron a raspar tal como se explicó anteriormente, sobre otro papel de filtro previamente pesado (véase figura 3.30).

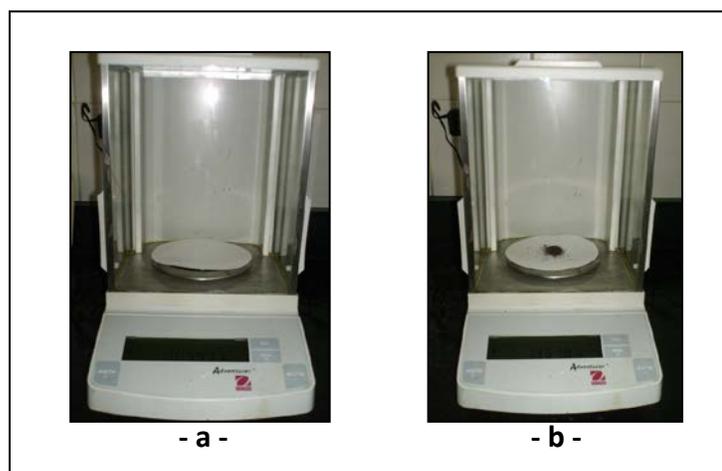


Figura 3.30: Proceso de pesada de los asfaltenos obtenidos. -a-) Pesada del papel de filtro vacío; -b-) pesada del papel de filtro con los asfaltenos.

Una vez conocida la masa de los asfaltenos, se procede a colocarlos en un matraz tipo Schlenk de 50 mL sobre un baño de agua en ebullición y con una conexión a “vacío” durante un periodo aproximado de cuatro horas (véase figura 3.31).

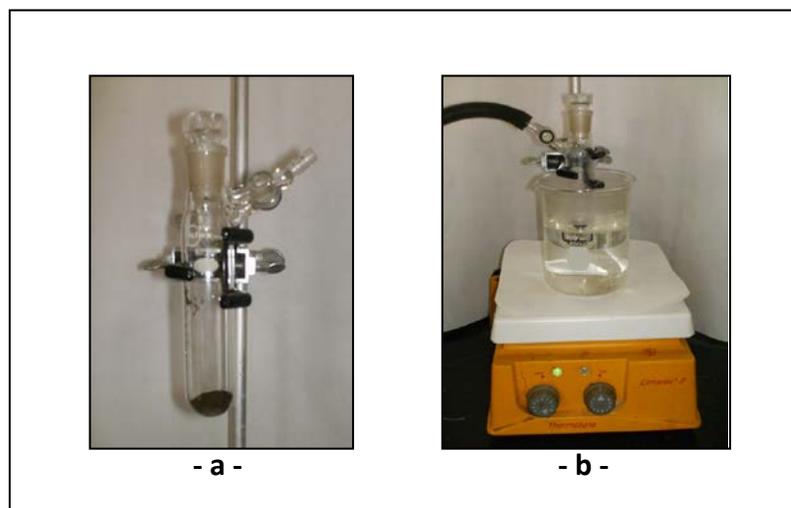


Figura 3.31: Proceso de secado de los asfaltenos. -a-) Asfaltenos en el matraz tipo Schlenk; -b-) Montaje del proceso de secado descrito

Finalmente los asfaltenos fueron guardados en frascos de vidrio color ámbar con atmósfera de nitrógeno y sellados con teflón en la tapa del frasco (véase figura 3.32). Los datos tomados se registran en una tabla como la mostrada en B.1.5.



Figura 3.32: Envasado de los asfaltenos para su posterior análisis

3.8.6 Fraccionamiento de maltenos

Se procedió de la misma forma que se hizo en la caracterización del crudo. Empleando la prueba de SARA para obtener las fracciones de saturados, aromáticos y resinas.

Una vez activada la sílice gel se procede a llenar la columna cromatográfica tal como se especifica en la metodología.

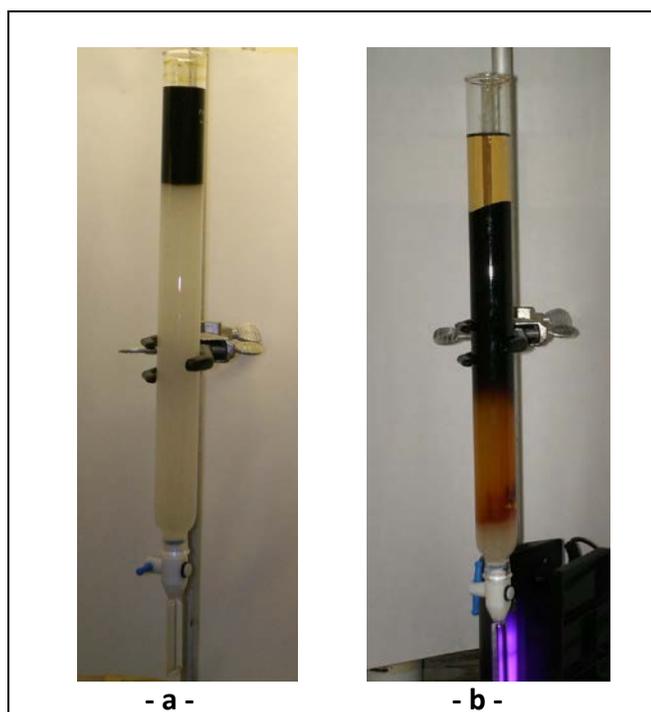


Figura 3.33: Elución de las diversas fracciones en la cromatografía de columna. -a-) Inicio de la elución; -b-) Elución de los saturados, aromáticos y resinas

A medida que va transcurriendo el tiempo se van haciendo los cambios de solventes según como se expone al igual como se hizo durante la caracterización del crudo. Durante el paso de la mezcla n-hexano- tolueno 50:50 hay que tener mucho cuidado y colocar la lámpara de luz ultravioleta con el fin de hacer el cambio de los vasos de precipitado de recolección para el momento en que empiezan a salir de la columna los compuestos aromáticos (véase figura 3.41). Esto ocurre cuando con lámpara de luz UV se resaltan dichos compuestos, como lo muestra la figura 3.34.



Figura 3.34: Elución de la fracción de compuestos aromáticos dentro de la columna

Finalmente, luego de adicionar las respectivas mezclas de solventes en la columna cromatográfica, se obtienen las diversas fracciones como se muestra a continuación:

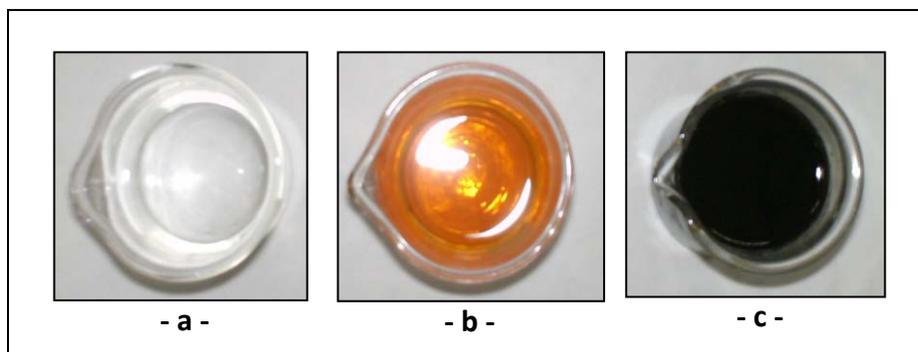


Figura 3.35: Diversas coloraciones de las fracciones extraídas. -a-) Fracción saturada; -b-) Fracción aromática;-c-) Fracción resinas

Todas las fracciones obtenidas en el paso anterior son rotaevaporadas. Las fracciones de saturados y aromáticos son guardadas en envases de vidrio bajo refrigeración; mientras que las fracciones de resinas son disueltas en diclorometano (CH_2Cl_2) p.a y guardadas en envases de vidrio color ámbar, bajo atmósfera de nitrógeno. Los datos tomados se reflejan en una tabla B.1.6.

3.8.7 Análisis cromatográfico de la fracción saturada del crudo

Una vez obtenida la fracción saturada del crudo, se procedió a realizar un análisis cromatográfico empleando un cromatógrafo de gases modelo VARIAN 3800 (véase figura 3.36), empleando helio como gas de arrastre, en la cual se inyectaron 2 μL de la fracción obtenida previamente rota evaporada. El análisis detallado de esta técnica se describe en el apéndice C.2. Las condiciones bajo las cuales se operó el cromatógrafo se resumen en la tabla 3.2.



Figura 3.36: Cromatógrafo de gases modelo VARIAN 3800.

TABLA 3.2

CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS CROMATOGRAFÍAS DE GASES A LA FRACCIÓN SATURADA DEL CRUDO MEREY

Parámetro de interés	Valor fijado
Temperatura del detector ($T_D \pm 1$) $^{\circ}\text{C}$	300
Temperatura inicial del horno ($T_0 \pm 1$) $^{\circ}\text{C}$	100
Temperatura final del horno ($T_F \pm 1$) $^{\circ}\text{C}$	290
Gradiente: ($\Delta T \pm 1$) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	4
Temperatura del inyector: ($T_I \pm 1$) $^{\circ}\text{C}$	270
Tiempo de la corrida($t \pm 1$)min	49,50

Para el análisis cromatográfico se empleó una columna capilar con las características que se citan en la tabla 3.3.

TABLA 3.3
ESPECIFICACIONES DE LA COLUMNA CAPILAR EMPLEADA EN LA REALIZACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES A LA FRACCIÓN SATURADA DEL CRUDO MEREY

Característica	Especificación
Material	Sílica fundida-100 % dimetil polysiloxano
Modelo	BP1- No polar
Longitud ($L \pm 1$)m	30
Diámetro interno ($D_i \pm 0,01$)mm	0,22
Diámetro interno ($D_e \pm 0,01$)mm	0,33
Espesor interno del relleno ($E \pm 0,01$) μ m	0,25

3.8.8 Determinación del potencial de acidez

Se utilizó un pH-metro para potenciometría directa, marca Oaklon modelo 510. Equipado con un electrodo de referencia de calomel saturado y uno indicador de membrana de vidrio sensible con referencia interna de Ag/AgCl.

Se empleó la misma metodología expuesta para el control del encalado del suelo pero con la diferencia que después de agitar la mezcla de suelo, esta suspensión se filtró por gravedad y posteriormente se le midió el pH introduciendo el electrodo previamente calibrado dentro de la solución de suelo filtrada. Las mediciones se realizaron por triplicado (González C. y Thompson J. 2007) y los resultados se reportaron en una tabla como la que muestra la figura 3.37.



Figura 3.37: Determinación del potencial de acidez de las muestras de suelo. –a-) Proceso de filtración por gravedad; -b-) Mediación con el pH metro marca Oaklon modelo 510.

3.8.9 Determinación de la humedad relativa presente en el suelo

Para la determinación de esta variable se utilizó el método de ensayo estándar para la determinación del contenido de humedad de suelo por masa (ASTM D2216-98), citada por Méndez L *et al.*, 2006.

Inicialmente se debe determinar la masa de una cápsula de Petri con tapa, sobre la cual se deben tomar aproximadamente 20 g del suelo. Una vez hecho esto se registra la masa final de la cápsula con la muestra de suelo y se coloca en la estufa a 120 °C por alrededor de 12 horas. (véase figura 3.38).



Figura 3.38: Determinación de humedad de la muestra de suelo. –a-) Pesada de la cápsula de Petri;-b-) Adición de aproximada de 20 g de suelo; -c-) Pesada de la muestra húmeda; -d-) Introducción de la muestra en la estufa por 12 horas.

Posteriormente, se extrae la muestra de la estufa y se coloca en un desecador con cristales de silica gel anhidro, hasta que se enfríe, para posteriormente pesar de nuevo la cápsula con la muestra de suelo. (véase figura 3.39)

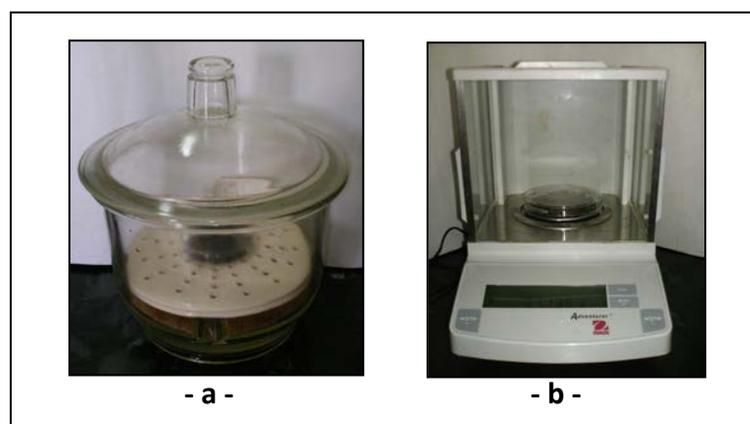


Figura 3.39: Determinación de humedad de la muestra de suelo (continuación). –a-) Muestra de suelo enfriando en el desecador; -b-) Pesada de la muestra seca

Una vez obtenidos datos de las respectivas masas involucradas el porcentaje de humedad relativa del suelo, puede estimarse con la ecuación (III-12), los resultados de humedad y potencial de acidez se reportan en una tabla como la B.1.10.

$$\%H_R = \frac{PM_H - PM_S}{PM_S - P_C} \times 100 \quad (\text{III} - 12) \quad (\text{Himmelblau D., 1988})$$

Donde:

$\%H_R$: Porcentaje de humedad relativa del suelo (%)

PM_H : Masa de la muestra húmeda de suelo en la cápsula (g)

PM_S : Masa de la muestra seca de suelo en la cápsula (g)

P_C : Masa de la cápsula de Petri vacía (g)

3.8.10 Determinación de la carga bacteriana mesófila

La determinación de esta variable se realizó en la Unidad de Microbiología Ambiental (UMA) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo para ello se tomaron aproximadamente 10 g de suelo contaminado por birreactor en cada tiempo muestral (muestra compuesta), los cuales se colocaron en envases plásticos y fueron mantenidos bajo refrigeración hasta su posterior análisis. Los resultados se reportaron en la tabla B.1.11.

3.8.11 Determinación de los espectros de resonancia magnética nuclear a las fracciones de resinas y asfaltenos

Estas pruebas se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), la cual se basó en la obtención de los espectros RMN-1H de las muestras empleando un espectrómetro BRUKER-AC-200. Los valores de los desplazamientos químicos se obtuvieron en (ppm), utilizando TMS (tetrametilsilano) como referencia interna y las muestras fueron disueltas en cloroformo p.a. Las condiciones de registro para estos espectros fueron:

Tiempo de adquisición: 2,720 s.

Anchura de pulso: 5,31 ms.

Tiempo entre pulsos: 1s.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar la estimación de las principales variables estadísticas de interés se empleó el software analítico STATISTIX 8.0 para Windows. Con el cual se verificó la diferencia significativa entre las diversas variables monitoreadas durante el proceso de biorremediación, tomando como factor de bloque a los tiempos muestrales en donde se tomaron las muestras para su posterior análisis.

3.9.1 Inserción de los datos en el programa estadístico

Primeramente se arreglaron los datos dentro del programa Microsoft Office Excel 2008, para su posterior introducción dentro del programa Statistix 8.0. (véase figura 3.40)

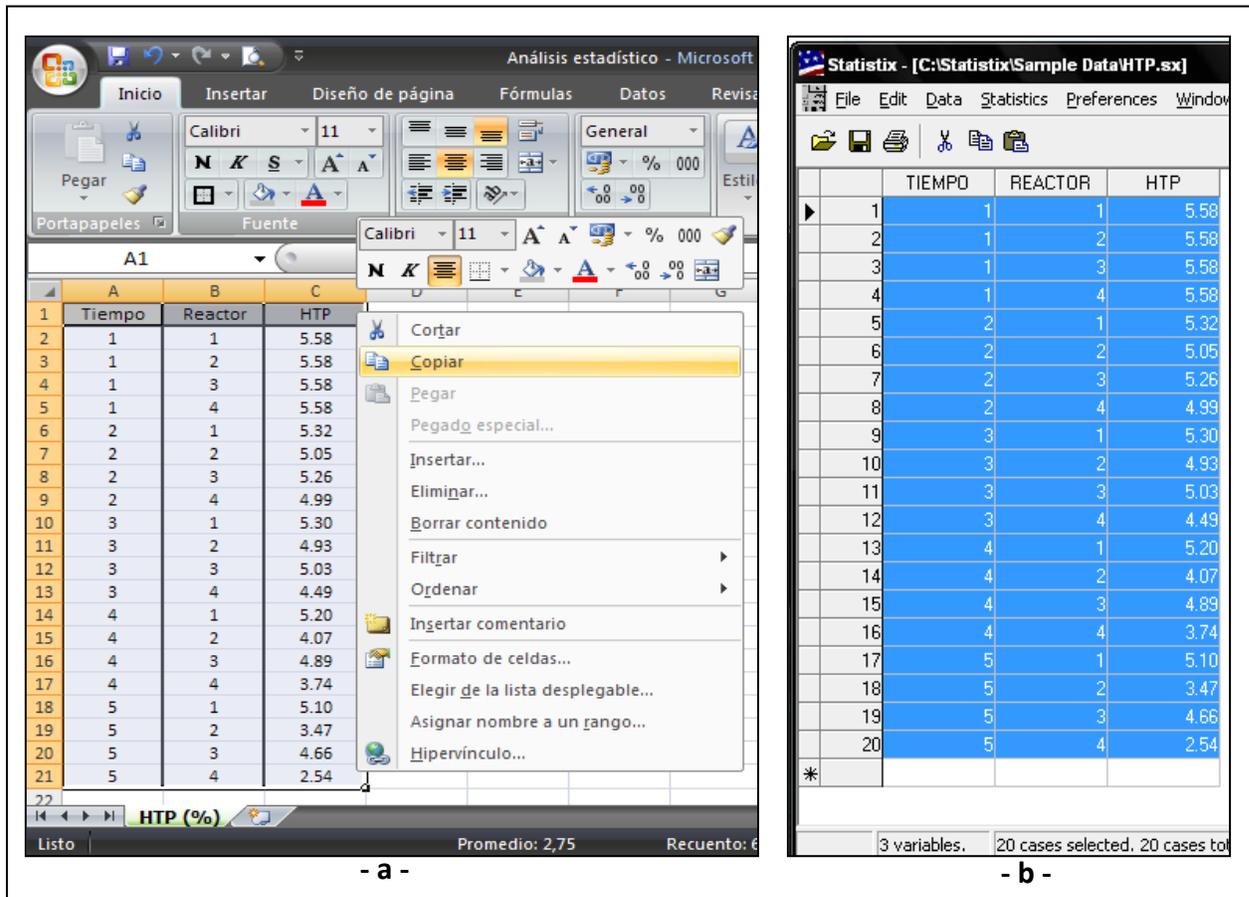


Figura 3.40: Manejo de los datos de la variable de respuesta. -a-) Organización en el programa Microsoft Excel 2008; -b-) Introducción en Statistix 8.0 mediante la secuencia copiar-pegar.

En la figura 3.40, la columna “Tiempo” representa el factor de bloques del diseño de experimentos y la columna “Reactor” representa los diversos tratamientos llevados a cabo en los biorreactores (véase tabla 3.4); mientras que en la columna “HTP” se encuentran reportados todos los valores de la variable de respuesta: hidrocarburos totales de petróleo para cada tratamiento en función de los tiempos muestrales.

TABLA 3.4
CODIFICACIONES UTILIZADAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE LAS VARIABLES
DE SALIDA A SER ANALIZADAS POR EL PROGRAMA STATISTIX 8.0

Tiempo muestral (TIEMPO)	Tipo de tratamiento (REACTOR)
Día cero (0) = 1	Suelo control = 1
Día cinco (5) = 2	Estiércol equino = 2
Día nueve (9) = 3	Humus líquido = 3
Día catorce (14) = 4	Eisenia foétida = 4
Día veintidós (22) = 5	

Los datos que se muestran en la figura 3.50, se representan en la tabla B.2.1 para su mejor entendimiento

3.9.2 Realización del análisis de varianza

Posteriormente, para comprobar si existe variabilidad en los resultados obtenidos de la variable de respuesta, se ejecutó la siguiente secuencia de comandos: STATISTICS>>>LINEAR MODELS>>>ANALYSIS OF VARIANCE>>>RANDOMIZED COMPLETE BLOCK, tal cual como se ilustra en la figura 3.41. Así se realiza el análisis de varianza con dos criterios de clasificación (ANOVA TWO-WAY) para conocer si existe diferencia significativa entre los valores de las diversas variables monitoreadas durante el proceso de biorremediación en función del tiempo muestral, para los diversos tratamientos, a través de la aceptación o rechazo de la hipótesis nula

(H_0) con respecto a la hipótesis alternativa (H_A). Para ello es necesario la definición de la variable dependiente (variable de salida), la variable independiente (los tratamientos involucrados) y el factor de bloque considerado (tiempos muestrales).

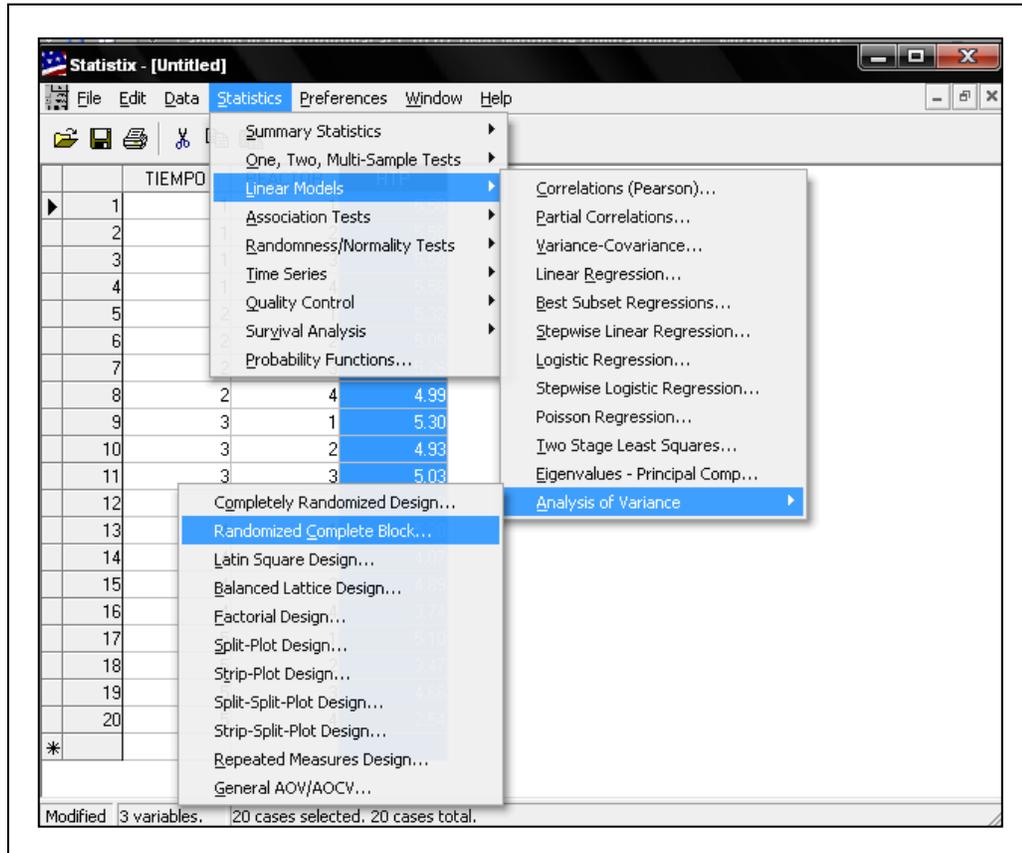


Figura 3.41: Secuencia de comandos a seguir para la realización de el análisis de varianza con dos criterios de clasificación en el programa Statistix 8.0.

Los resultados del análisis de varianza fueron tratados mediante las pruebas de significancia. El valor de la significancia predefinida (α) se situó en $\alpha = 0,05$ (Pulido y De la Vara, 2004); mientras que el valor de la significancia observada (p -value) era determinado en la tabla del ANOVA TWO WAY. Se rechaza H_0 si la significancia observada es menor a la significancia dada.

3.9.3 Verificación de supuestos del modelo

También se aplicaron las pruebas de estimación de supuestos como la de Shapiro - Wilks para la normalidad en la cual se ejecutó la siguiente secuencia de comandos: RESULTS>>>PLOTS>>>NORMAL PROBABILITY PLOT, como se muestra en la figura 3.42. Después se realizó la prueba de homogeneidad de las varianzas mediante el gráfico de los residuos por valores fijos, a través de la siguiente secuencia de comando: RESULTS>>>PLOTS>>>RESIDS BY FITTED VALUES (véase figura 3.42).

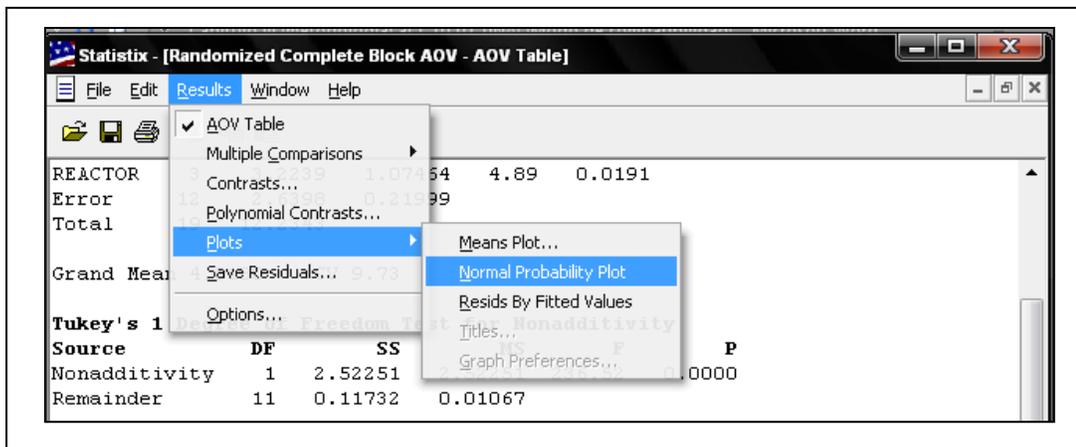


Figura 3.42: Secuencia de comandos a seguir para la realización de la verificación de los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas en un diseño en bloques completos al azar empleando el software Statistix 8.0.

3.9.4 Comparación efectiva de los tratamientos

Adicionalmente para lograr la comparación de los tratamientos en conjunto se realizó la prueba de Tukey HSD o de diferencia honestamente significativa para ello se ejecutó la siguiente secuencia de comandos: RESULTS>>>MULTIPLE COMPARISONS>>>ALL-PAIRWISE COMPARISONS, seleccionando "Tukey HSD" como prueba de comparación. Además para realizar la comparación de las unidades experimentales en función del tratamiento control, se empleó la prueba de Dunnett, mediante la siguiente secuencia de comandos:

RESULTS>>>MULTIPLE COMPARISONS>>> COMPARISONS WITH A CONTROL, seleccionando el nivel del tratamiento de control. (véase figura 3.43).

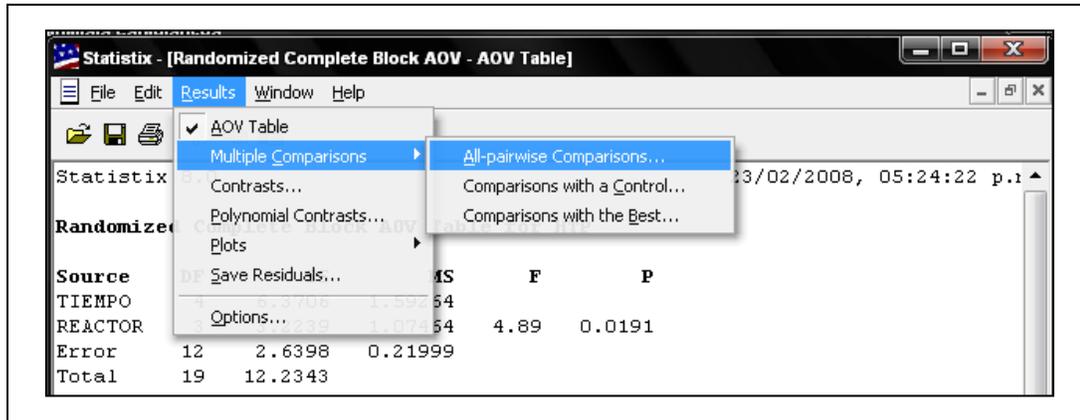


Figura 3.43: Secuencia de comandos a seguir para la realización de las pruebas de comparación de Tukey HSD y Dunnett.

3.10 ANÁLISIS ECONÓMICO

En el análisis económico de las técnicas de biorremediación realizadas es importante conocer que tratamiento es más factible de aplicar desde el punto de vista económico, es decir, aquel que genere una mayor rentabilidad con la disminución de las salidas de dinero y el aumento de los beneficios o entradas de dinero.

Ahora bien, según Álvarez y Guevara, 2003 una ventaja que representan las técnicas de biotratamiento en general con respecto a otras técnicas es su bajo costo, por lo que se hace necesario establecer una evaluación económica justa entre los diversos tratamientos aplicados para lograr una selección que no este sesgada por este hecho.

Para lograr conocer cual técnica resulta menos costosa, es necesario estimar la relación costo/beneficio, la cual representa la tasa de rentabilidad del proyecto (De Sousa y Domínguez, 2002), calculada como:

$$T_R = \frac{B}{C} \times 100 \quad (\text{III} - 13) \quad (\text{De Sousa y Domínguez, 2002})$$

T_R : Tasa de rentabilidad de la técnica aplicada (%)

B: Beneficios o ingresos obtenidos (\$)

C: Costos asociados a la técnica evaluada (\$)

Aplicando la expresión anterior se puede evaluar económicamente una alternativa dada tomando la mayor tasa de rentabilidad como criterio de selección. No obstante, se debe estimar también el tiempo de recuperación de la inversión, el cual es un parámetro que permite conocer cuanto tiempo es necesario para recuperar la inversión en función de la duración del biotratamiento.

En este orden de ideas el primer paso a seguir es la determinación de todos los costos asociados a la aplicación de cada técnica, realizando ciertas consideraciones es posible tener con exactitud un estimado de esta variable. Luego los beneficios se calculan en función de los costos obtenidos y mediante la comparación justa de la técnica aplicada con las más empleadas a nivel de campo, para luego realizar la estimación de la relación costo/beneficio en función de los tratamientos aplicados. (véase apéndice E).



IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se muestran los resultados de cada uno de los objetivos llevados a cabo durante el desarrollo de la presente investigación, así como las discusiones derivadas de cada efecto para el mejor entendimiento de los mismos.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

4.1 VARIABLES A MONITOREAR DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

En cualquier proceso de descontaminación natural es importante la selección de las variables a determinar para lograr interpretar de manera adecuada la información suministrada por el medio, mediante la evaluación periódica de dichas variables para conocer si el proceso o medio de biorremediación utilizado es o no efectivo. (Infante C., 2001).

Para poder realizar la selección correcta de las variables a monitorear durante el proceso de biorremediación se partió del diagrama causa-efecto mostrado en la figura 3.1. Al cual se le realizó un análisis tomando en consideración los factores más significativos, donde se descartaron los efectos de bloque que no limitaban la realización o el seguimiento de alguna variables en específico, tal como lo muestra la figura 4.1.

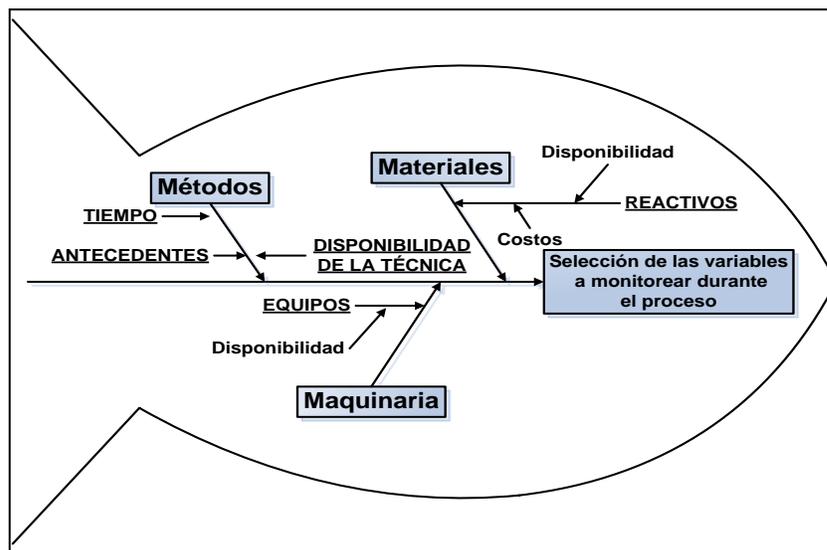


Figura 4.1: Diagrama causa-efecto con los factores más influyentes para la selección de las variables a monitorear durante el proceso de biorremediación.

La escogencia de los factores descritos en la figura 4.1 se realizó principalmente en función al factor limitante que se presentaba para la determinación de una variable de interés, tal como sigue:

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

- **Materiales:** este aspecto es decisivo, por parte de los agentes bioestimulantes su adquisición esta garantizada por la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay; no obstante, los reactivos representan un factor muy limitante debido a su elevado costo.
- **Maquinaria:** al igual que los reactivos, los equipos para la realización de las pruebas especiales de algunas variables son una limitante.
- **Métodos:** el contar con la técnica y que la misma esté avalada por entes nacionales e internacionales, así como que el tiempo necesario para su desarrollo no sea excesivo es importante en la selección de las diversas variables a monitorear.
- **Mano de obra:** se cuenta con el personal necesario para la realización de las diversas pruebas de laboratorio que involucren las variables a determinar, por lo que no se considera como un factor limitante.
- **Medición:** todos los materiales de medición básicos (volumétrico, de extracción y balanzas) se encuentran en el Laboratorio de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, por lo que no se considera como un factor limitante.
- **Medio ambiente:** de igual forma se cuenta con la autorización de laboratorios de la universidad para realizar las diversas experimentaciones, por lo que este factor no considera una limitante de interés. Además la correcta deposición de los solventes y residuos generados no involucra un incumplimiento con la normativa ambiental.

De la inmensa gama de variables existentes para el seguimiento de pruebas de biorremediación descritas por los diversos autores, se escogieron las más representativas por el tipo de información que otorgan y el carácter que permiten predecir con respecto al hecho de

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

que ocurra una degradación de las diversas fracciones del crudo presente en el suelo contaminado. Para ello se realizó una matriz de selección tal como lo sugieren González y Tompson, 2007, en donde se evaluaron las diversas variables preseleccionadas en función de los factores expuestos en la tabla 3.1, para lo cual se estableció un valor de ponderado experto, asignado mayor peso al factor más limitante y una escala de ponderación en un intervalo de 0 a 10 para hacer más sensible el análisis, los factores se describen a continuación (véase tabla 4.1):

- Disponibilidad de los reactivos: con un 15 % de relevancia si el reactivo para una prueba determinada esta disponible adquiere el mayor valor de ponderación.
- Disponibilidad de los equipos: con un 15 % de relevancia si el equipo para una prueba determinada (cromatografía de gases) esta disponible adquiere el mayor valor de ponderación.
- Disponibilidad de la técnica: con un 15 % de relevancia se conoce la técnica a seguir en la determinación de la variable de interés se pondera con el mayor valor del rango.
- Costo: con un 30 % de relevancia ya que es el factor limitante por excelencia en la realización de cualquier prueba de laboratorio.
- Tiempo: con un 20 % de relevancia ya que al igual que el costo puede limitar la realización de los experimentos para los cuales se dispone de un límite de tiempo específico.
- Antecedentes: con un 5 % de relevancia ya que es importante contar con un respaldo bibliográfico que garanticen el éxito de las pruebas seleccionadas.

TABLA 4.1
MATRIZ DE SELECCIÓN EMPLEADA PARA ESCOGER LAS VARIABLES A MONITOREAR
DURANTE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO PRESENTE EN EL SUELO

Variables Factores	Ponderado experto	HTP	%AG	SARA	%H _R	pH	UFC	R-CO ₂	% S _T	TI	CG-S	IR-A	CG-MS	RMN-1H
Reactivos	0,15	10	0	10	10	10	10	0	0	0	10	0	0	10
Equipos	0,15	10	10	10	10	10	10	0	0	0	10	10	0	10
Técnica	0,15	10	10	10	10	10	10	10	0	0	10	10	0	10
Costos	0,30	10	5	10	10	10	0	5	5	5	10	5	5	10
Tiempo	0,20	10	5	10	10	10	10	5	5	5	10	5	5	0
Antecedentes	0,05	10	5	10	10	10	10	10	0	0	10	5	5	10
Totales	1,00	10,00	5,75	10,00	10,00	10,00	7,00	4,50	2,50	2,50	10,00	5,75	2,75	8,00

Leyenda:

Hidrocarburos totales de petróleo (**HTP**)

Porcentaje de aceites y grasas (**% AG**)

Caracterización de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (**SARA**)

Porcentaje de humedad relativa (**%H_R**)

Potencial de acidez (**pH**)

Conteo de aerobios mesófilos (**UFC**)

Espectros de RMN de protones a resinas y asfaltenos (**RMN-1H**)

Respirometría (**R-CO₂**)

Porcentaje de azufre total (**% S_T**)

Tensión interfacial (**TI**)

Cromatografía de gases saturados (**CG-S**)

Espectros de infrarrojo a aromáticos (**IR-A**)

Espectro de masas a aromáticos (**CG-MS**)

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En los cuales se seleccionaron las variables con un acumulado mayor a 6 (véase tabla 4.1), con lo que se espera que el resultado de la aplicación de estas variables de seguimiento puedan determinar y evaluar de manera eficaz los tratamientos de biorremediación aplicados.

Para lograr la optimización de las técnicas de biorremediación aplicadas es necesario que las diversas variables determinadas anteriormente sean medidas en condiciones idóneas para el éxito del tratamiento, esto es manteniendo fijos la mayor cantidad de parámetros para que el error de las variables medidas sea despreciable.

Siguiendo las recomendaciones del autor Infante C., 2001 planteadas en la tabla 2.3 se pueden mejorar las mediciones de las variables de salida propuestas, esto con el fin de que el proceso de degradación sea evaluado de manera justa, evitando cualquier tipo de sesgo; no obstante, se deben seguir también las condiciones para llevar a cabo el proceso recomendadas por Álvarez y Guevara 2003, las cuales se mencionan en la tabla 4.2

TABLA 4.2
CONDICIONES AMBIENTALES ÓPTIMAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN
DE LOS HIDROCARBUROS

Factores ambientales	Niveles óptimos
Condiciones redox	Potencial de oxidación mayor a 50 mili voltios (mV)
Ecología del suelo	Baja población de protozoarios predadores. Elevado número variedad de microbios consumidores de hidrocarburos
Niveles de contaminación	Nivel suficientemente bajo para prevenir toxicidad hacia los microorganismos, pero suficientemente alto para inducir las enzimas

Fuente: Álvarez y Guevara, 2003.

4.2 CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DEL SUELO

La recolección de las muestras de suelo in situ se basó en la realización de una muestra compuesta (constituida de varias submuestras), las cuales fueron extraídas en forma zig-zag para garantizar la homogeneidad de las mismas.

4.2.1 Análisis de la textura del suelo

Para la correcta aplicación de las técnicas de biotratamiento es indispensable que sea controlada la textura del suelo, la cual se refiere a las diversas clases de partículas que conforman el suelo (Casanova E., 2005), la tabla 4.3 muestra los resultados de este análisis:

**TABLA 4.3
ANÁLISIS TEXTURAL DEL SUELO VIRGEN EMPLEADO EN EL
PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN**

Parámetro	Morichal punto 01		Morichal punto 02	
	Horizonte A	Horizonte B	Horizonte A	Horizonte B
Arena (Ar ± 0,1)%	63,0	65,0	66,0	67,0
Arcilla(Ac ± 0,1)%	20,8	24,8	20,8	20,8
Limo (L ± 0,1)%	16,2	10,2	13,2	12,2

Los valores de textura obtenidos para el suelo virgen, revelan que éste contiene en promedio un (65,0 ± 0,1) % de arena, no obstante es preciso comparar los demás niveles del resto de las partículas para establecer el tipo de textura atribuible al suelo, tal como lo hicieron Polychroniadis y Barrios, 2006.

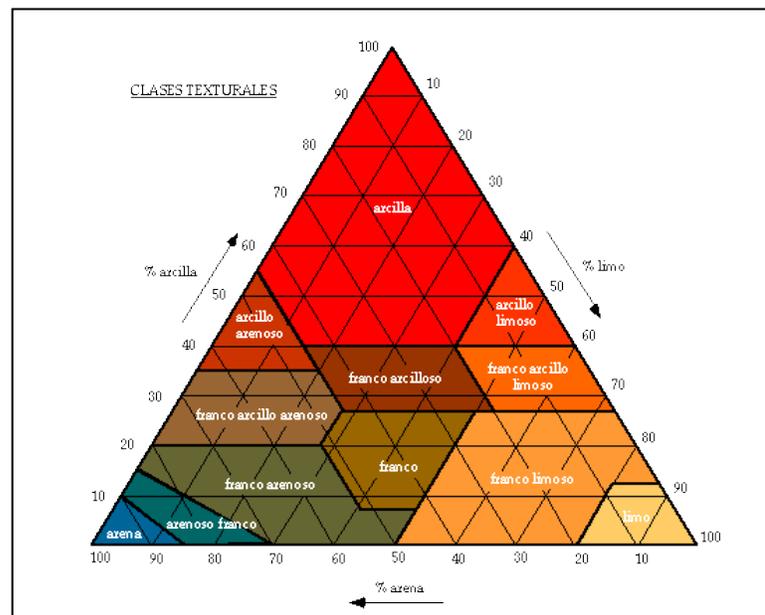


Figura 4.2: Triángulo textural. Fuente: Agroinformación 2005.

De acuerdo con el triángulo textural, la textura del suelo virgen es franco arenosa, lo cual favorece al proceso de biorremediación a llevar a cabo según lo establecido en el decreto 2635, artículo 53 (véase apéndice F).

El hecho de que la textura sea arenosa significa que los suelos están bien aireados, bien drenados y son livianos (poco trabajable con maquinarias pesadas). Casanova E, 2005

4.2.2 Análisis de los macro elementos presentes en el suelo virgen

Los macro elementos N, P, K, Ca, Na y Mg contribuyen en el crecimiento vegetativo de las plantas que pueden desarrollarse en el suelo. (Sandoval J. 2002)

De acuerdo a los análisis de los resultados obtenidos los cuales se muestran en la tabla 4.4, se tiene que:

TABLA 4.4

ANÁLISIS DE LOS MACROELEMENTOS Y MATERIA ORGÁNICA PRESENTE DEL SUELO VIRGEN EMPLEADO EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Parámetro	Morichal punto 01		Morichal punto 02	
	Horizonte A	Horizonte B	Horizonte A	Horizonte B
Calcio total (Ca ± 0,01)mg/kg	<40,00	<40,00	<40,00	<40,00
Potasio total (K ± 0,01)mg/kg	270,70	148,89	87,21	152,41
Sodio total (Na ± 0,01)mg/kg	<40,00	<40,00	<40,00	115,75
Magnesio total (Mg ± 0,01)mg/kg	<40,00	<40,00	57,83	<40,00
Fósforo total (P ± 0,01)mg/kg	3,10	2,05	<2,00	<2,00
Nitrógeno total (N ± 0,001)%	0,022	0,022	0,022	0,022
Materia orgánica (Mo ± 0,01) %	1,36	0,54	1,51	0,00

En ambos horizontes el porcentaje de materia orgánica (Mo) es menor a 1,60 %, esto indica la deficiencia de este parámetro en el suelo (Casanova E., 2005). La escasez de materia orgánica se debe a la falta de humedad en el suelo a causa de la textura arenosa la cual permite que haya buen drenaje en el suelo.

Según Casanova E, 2005 la falta de materia orgánica en los suelos impide mejorar la agregación y estabilidad de los agregados de este reduciendo la susceptibilidad a la escorrentía y a la erosión, también disminuye la capacidad de retención de humedad particularmente en este tipo de suelo con texturas arenosas.

El fósforo (P) en ambos horizonte de cada punto, presenta valores bajos menores a 10 mg/kg (Sandoval J., 2002) lo cual indica que puede haber fijación de este elemento (Casanova E., 2005). Por otro lado los valores de calcio (Ca), sodio (Na) y magnesio (Mg) en ambos perfiles de cada punto son menores de 40 mg/kg, esto significa que son bajos comparado con los niveles propicios para el desarrollo de plantas en los suelos (Sandoval J., 2002), por tanto hay deficiencia de estos elementos en el suelo, mientras que los valores de potasio (K) se

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

encuentran por encima de 150 mg/kg lo que resulta satisfactorio en la fertilización con este elemento (Sandoval J., 2002). La cantidad de nitrógeno total presente en el suelo es baja, lo que limita el crecimiento de los consorcios bacterianos dentro del suelo en estudio (Canals V., 2005)

4.2.3 Análisis de los factores abióticos de importancia en el suelo

Dentro del conjunto de parámetros analizados se encuentra el potencial de acidez del suelo (pH), la conductividad eléctrica, la saturación con bases, la cantidad de aluminio intercambiable, la relación de absorción de sodio y la capacidad de intercambio catiónico, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.5.

TABLA 4.5
ANÁLISIS DE LOS FACTORES ABIÓTICOS DE INTERÉS EN EL SUELO VIRGEN EMPLEADO
EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Parámetro	Morichal punto 01		Morichal punto 02	
	Horizonte	Horizonte	Horizonte	Horizonte
	A	B	A	B
Potencial de acidez (pH \pm 0,01)adim	4,55	4,47	5,28	5,18
Conductividad eléctrica (Ce \pm 0,01)mS/cm	31,40	14,77	17,68	9,76
Saturación con bases (Sb \pm 0,01)%	0,12	0,06	0,08	0,08
Aluminio intercambiable (A \pm 0,001) meq/100 g de suelo	7,710	7,710	7,710	7,710
Relación de absorción de sodio (RAS \pm 0,001) adim	0,128	0,125	0,050	0,428
Capacidad de intercambio catiónico (CIC \pm 0,01) meq/100 g de suelo	0,73	0,50	0,60	0,65

La CIC en los horizontes A varía entre 0,73 a 0,50 (meq/100 g de suelo) y horizontes B 0,60 –a 0,65 (meq/100 g de suelo) para cada punto muestreado, los valores son muy bajos, de acuerdo a lo planteado en el decreto 2635, lo que quiere decir que las partículas coloidales del

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

suelo (principalmente arcillas), se encuentran saturadas por cationes aluminio (Al^{3+}) y protones (H^+), en lugar que por cationes intercambiables como calcio, magnesio, sodio y potasio. Esto se debe principalmente al alto contenido de protones del suelo (suelo ácido), tal como se muestra en la figura 4.3.

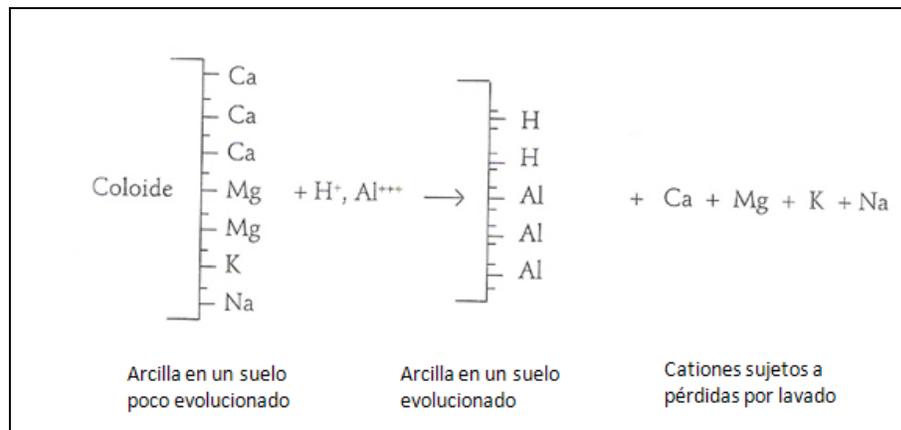


Figura 4.3: Expresión gráfica de los cambios que ocurren en los sitios de intercambio cuando el suelo es sometido a procesos de meteorización (Casanova E., 2005).

Este tipo de suelo no tiene la habilidad de retener nutrientes como Ca, Na, Mg y K por que son susceptibles al lavado del perfil; esto ocasiona que el porcentaje de saturación con bases sea bajo ($< 65\%$), ya que el decreto 2635 establece un nivel mayor a 80% Y debe tenerse en consideración que el porcentaje de saturación con bases refleja la proporción de la capacidad de intercambio catiónico que es ocupada por cationes básicos, la cual es muy baja al ocurrir el proceso descrito en la figura 4.3. Estos suelos no tienen problemas de sodio porque la relación de absorción de sodio (RAS) es menor a 8. (véase apéndice F).

El valor de conductividad eléctrica promedio es de $18,40 \text{ mmhos/cm}$, lo cual indica que en suelo hay problemas de salinidad, ya que el decreto 2635 establece un máximo permitido de $3,5 \text{ mmhos/cm}$, lo que puede inhibir el normal desarrollo de los cultivos. No obstante, como la textura del suelo es franco arenoso, manteniendo controlada la humedad se pueden perder cationes por lavado y bajar la alta conductividad del suelo (Casanova E., 2005). Además trabajos

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

anteriores realizados por Infante C., 2001 no toman en cuenta a la conductividad como un parámetro crítico en un proceso de biodegradación.

El potencial de acidez en los horizontes evaluados ($\text{pH} < 5,00$) refleja acidez en el suelo. Esto es debido a la presencia de gran cantidad iones aluminio (Al^{3+}) e iones hidronios, por lo que se procedió a realizar la enmienda o encalado del suelo, ya que los protones liberados en el proceso de mineralización de la materia orgánica pueden reaccionar con las estructuras cristalinas de las arcillas, liberando aluminio y ácido salicílico a la disolución del suelo. El ión aluminio pasa a los sitios de intercambio de las arcillas y puede sufrir un proceso de hidrólisis produciendo una mayor cantidad de iones hidronios que disminuyen el pH , finalmente el aluminio precipita como hidróxido de aluminio $[\text{Al}(\text{OH})_{3(s)}]$. (véase figura 4.4)

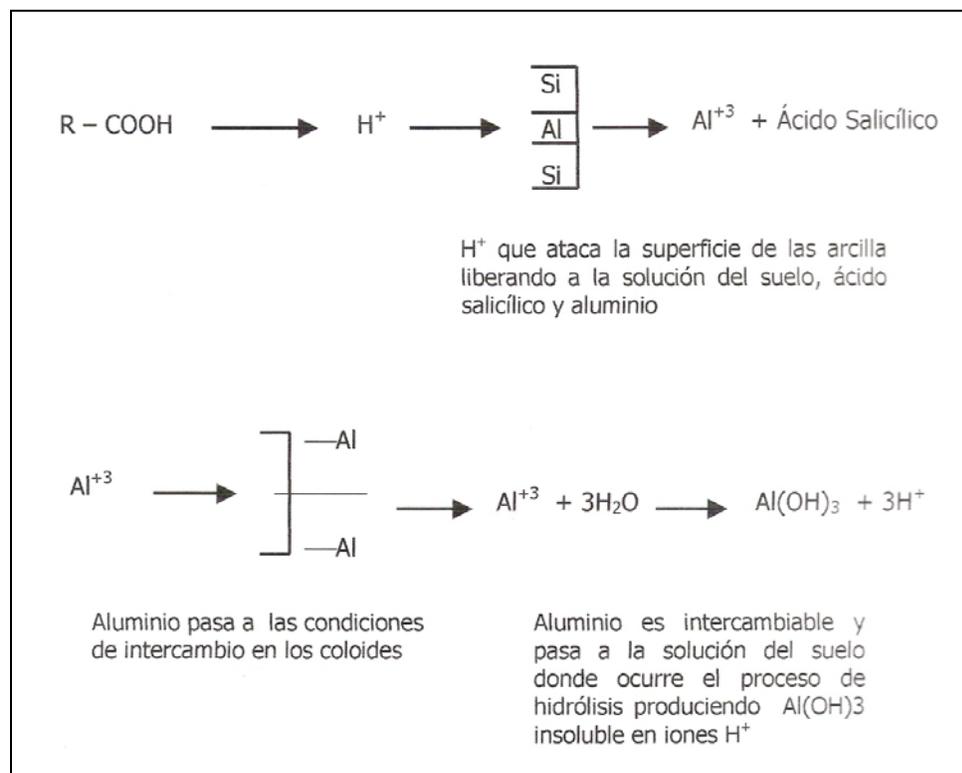


Figura 4.4: Ilustración del efecto del aluminio intercambiable como fuente de acidez en los suelos. (Casanova E., 2005).

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

4.2.4 Análisis del proceso de encalado del suelo

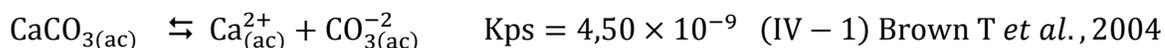
Como el pH del suelo era ácido se realizó un proceso de encalado empleando carbonato de calcio [$\text{CaCO}_{3(s)}$], para corregir el valor de pH y disminuir la toxicidad por el aluminio intercambiable (Sandoval J., 2002). Para ello es necesario conocer la capacidad de retención de agua (CRA) que poseía el suelo, el cual es una constante de humedad conocida muy similar a la capacidad de campo, en donde los macroporos del suelo están llenos con aire y los microporos con agua (Casanova E., 2005).

De la tabla B.1.1 se deduce que 200 g de suelo se saturan con aproximadamente 15 mL de agua. No obstante Álvarez y Guevara, 2003 al igual que Infante C., 2001 describen a la capacidad de campo en función de la capacidad de retención de agua, es decir, el contenido de humedad del suelo cuando todos los espacios porosos están ocupados por agua capilar.

Los valores de densidad aparente del suelo mostrados en la tabla B.1.2 reflejan un valor promedio de $(1,318 \pm 0,002)$ g/mL, lo que permite clasificar al suelo como bajo en materia orgánica ya que la materia orgánica es un componente menos pesado que la fracción mineral del suelo. Y como el suelo está compuesto de baja cantidad de materia orgánica y alta fracción mineral, se le atribuye una alta densidad.

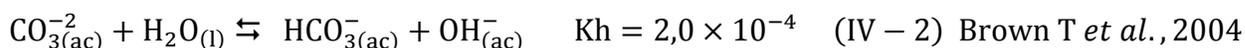
Para realizar la adición del carbonato de calcio al suelo se estimó una masa de $(96,52 \pm 0,02)$ g de $\text{CaCO}_{3(s)}$ necesarios para corregir el pH del valor 4,87 a la neutralidad de aproximadamente 15 kg de suelo virgen, empleando la correlación empírica propuesta por Casanova E., 2005 (véase ecuación III-2). La masa de carbonato de calcio fue mezclada con una cantidad de agua equivalente al 60 % de la capacidad de saturación, como lo sugiere Sandoval J., 2002, porque dos fases sólidas (suelo y carbonato de sodio), no pueden reaccionar sin un medio acuoso y tomando en cuenta que el CaCO_3 es una sal poco soluble al disolverla en agua forma una mezcla según la siguiente reacción:

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

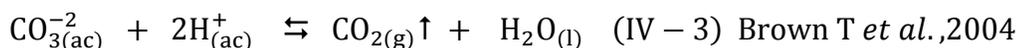


Cuando los iones carbonatos en disolución acuosa son mezclados con el suelo se producen una serie de reacciones químicas dentro de las cuales son neutralizados los protones provenientes de la hidrólisis de aluminio, y éste último es fijado en su precipitación como hidróxido.

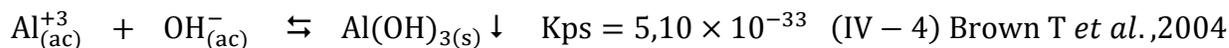
Primeramente el ión carbonato se hidroliza, según la siguiente reacción:



Según De Perdomo Y *et al.*, 2002 en las soluciones de iones metálicos que tienen propiedades ácidas (como una solución de aluminio en suelo) se produce efervescencia debido a la formación de dióxido de carbono gaseoso (CO_2), según:



Razón por la cual al adicionar la mezcla carbonato de calcio en agua al suelo virgen se produjo una ligera efervescencia. Ahora bien el carbonato de aluminio, no se conoce en solución acuosa, debido a que en la hidrólisis del ión carbonato se producen los iones oxidrilos necesarios para la precipitación del hidróxido correspondiente:



Todas estas reacciones han sido descritas por Casanova E., 2005 en una reacción global, como la que se muestra en la figura 4.5. Ahora bien como dentro del proceso de encalado se neutralizan los protones responsables de la alta conductividad de la solución del suelo, la cantidad de sales disueltas y de electrolitos activos presentes se reducen, siendo remplazadas

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

por especies como hidróxidos metálicos anfotéricos, los cuales poseen una menor movilidad iónica, lo que disminuye la conductividad de la solución de suelos.

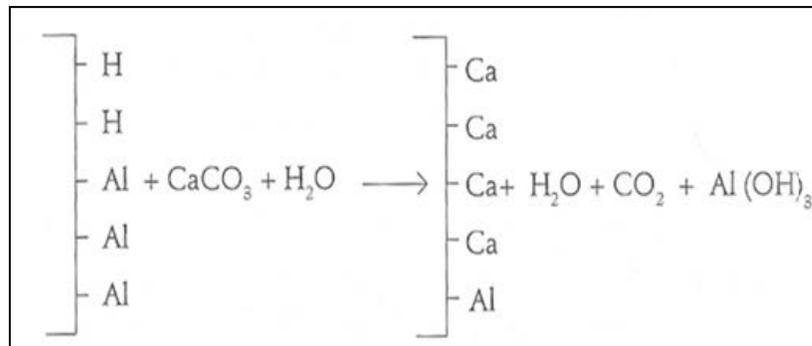


Figura 4.5: Reacción del carbonato de calcio sobre los intersticios del suelo para la corrección de acidez por aluminio. (Casanova E., 2005).

Una vez realizado la adición del carbonato de calcio a la mezcla de suelo, se determinó el pH del suelo enclavado por triplicado, tal como se expone en el capítulo anterior, y se evaluaron los valores de pH a través de una semana como lo sugiere Casanova E, 2005, ya que en suelos franco arenosos la cal requiere de 7 a 15 días para reaccionar completamente. Los valores de potencial de acidez determinaron comprueban que el proceso de enclavado fue efectivo ya que se logró mantener el pH en un valor constante cercano a la neutralidad (véase tabla B.1.3).

4.3 DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA EISENIA FOÉTIDA

Uno de los motivos principales por los cuales se decidió utilizar a la Eisenia foétida como bioestimulante, es la gran facilidad que tienen estas especies de ser cultivadas, además de ser un macroorganismo fuerte y con gran capacidad de tolerancia a altos rangos de temperatura, humedad y potencial de acidez (Callaham M *et al.*, 2002). Además Schaefer M *et al.*, 2006 empleó este macroorganismo como agente bioestimulador en la degradación de crudo obteniendo excelentes resultados.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En la preparación del alimento de las lombrices (sustrato) mejor conocido como estiércol, se usó el excremento de caballo (estiércol equino), ya que el mismo posee un pH cercano a la neutralidad y se encontraba en estado de post-maduración. Se adicionó sustrato ya que estos macroorganismos no son de tierra, es decir; no son autóctonas del suelo así como tampoco sobreviven de algún nutriente que posea el suelo (Ferruzzi C., 1994).

Las lombrices a inocular eran todas adultas, por lo que alcanzan a pesar aproximadamente 1 g y al mismo tiempo su consumo diario en cuanto a alimentación es aproximadamente equivalente a su peso corporal (Ferruzzi C., 1994). Razón por la cual se pesaron aproximadamente 25 g de estiércol para cada biorreactor pre-escala y se mezcló junto con el suelo contaminado.

Con los montajes definitivos, se procedió a la inoculación de las lombrices en sus respectivos biorreactores. Para realizar la introducción de las lombrices a sus respectivos nuevos medios fue necesario efectuar dicha operación bajo la luz del sol, esto con el fin que la luz solar obligue a las lombrices a introducirse rápidamente en su nuevo hábitat, ya que por naturaleza la lombriz es fotofóbica, es decir, no soporta altas condiciones de iluminación. (Ferruzzi C., 1994).

Los resultados obtenidos del conteo de macroorganismos revelan que la sobrevivencia de la lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*) ante un medio tóxico como el suelo contaminado con crudo resultó todo un éxito y esto se puede apreciar en la tabla B.1.4, donde en cada conteo realizado se encontraron en cada biorreactor pre-escala la misma cantidad de lombrices inoculadas al inicio de la experimentación.

Esto demuestra que dichos macroorganismos son capaces de resistir un medio con condiciones adversas, por lo que se pueden emplear para el tratamiento que se requiere realizar en el trabajo de investigación.

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO**4.4.1 Fraccionamiento de asfaltenos**

La cantidad de asfaltenos obtenidas a partir de la técnica descrita en la metodología del capítulo anterior es de $(4,3 \pm 0,8)$ %, lo que representa un crudo con un alto contenido asfáltico como lo es el de tipo Merey de aproximadamente $15,70$ °API.

4.4.1.1 Análisis de espectros de resonancia magnética nuclear a los asfaltenos del crudo Merey

Los asfaltenos obtenidos se colocaron en un matraz tipo Schlenkt tal como lo describe la metodología esto con el fin de retirar todos los posibles restos de solvente por evaporación del mismo en los asfaltenos. Aunado a ello se guardaron las muestras bajo atmosfera de nitrógeno y en frascos de vidrio color ámbar para evitar su posible oxidación y garantizar su permanencia en el traslado para la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear, el espectro de RMN empleando núcleos de protones (H^1) se muestra en la figura 4.6.

La asignación de regiones de integración para los espectros de RMN-1H se realizó de la misma forma que el autor (Rico G *et al.*, 2003), como sigue:

- Protones aromáticos (H_{ar}): (6,35 - 9,0) ppm.
- Protones en α de cadenas alquídicas laterales (H_{α}): (2,0 - 4,0) ppm.
- Protones en β de cadenas alquídicas laterales (H_{β}): (1,05 - 2,01) ppm.
- Protones alifáticos de grupos terminales (H_{γ}): (1,05 - 0,5) ppm.

Aparte debe tomarse en consideración que como las muestras fueron disueltas en cloroformo no deuterizado, la señal del mismo aparece en los espectros alrededor de 7,24 ppm

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En el espectro de la figura 4.6 que representa al asfalteno del crudo se observa en la región aromática al cloroformo, el cual enmascara a los protones aromáticos que aparecen en ese rango. Se observan señales entre (2-3) ppm que corresponden a protones en α de cadenas alquídicas, protones cercanos a grupos carbonilos o metóxidos. Así mismo se pueden observar señales de protones en α a grupos carbonilos y los protones alifáticos de grupos terminales.

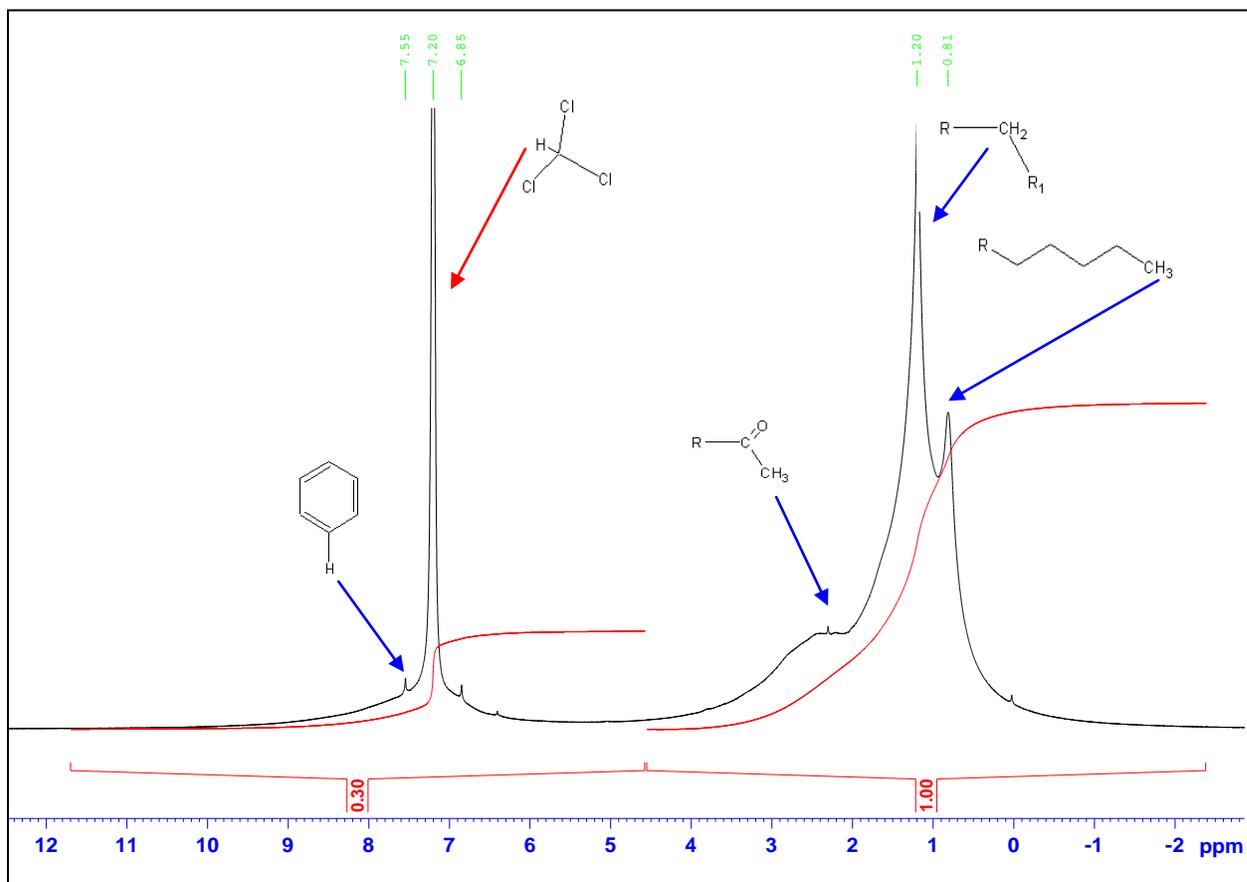


Figura 4.6. Espectro de resonancia magnética nuclear para el asfalteno del crudo Merrey.

4.4.2 Fraccionamiento de maltenos

Primeramente se realizó una precipitación mediante la utilización de un solvente poco polar (n-hexano), pero a su vez capaz de disolver compuestos de bajo peso molecular y en el cual los asfaltenos sean insolubles, quedando como resultado de esa separación los compuestos S.A.R. (saturados, aromáticos y resinas) también conocidos como maltenos. (Canals V., 2005).

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Para realizar la separación se emplea una columna cromatográfica empaquetada previamente con un soporte moderadamente polar como fase estacionaria (silica gel), esta tiene como objetivo retener los compuestos de hidrocarburos, el empaquetamiento de sílice debe estar en relación 1:30 con respecto a la cantidad de maltenos a fraccionar, para que se logre una separación efectiva (8020/8100 EPA - 1986). Se hace circular la fase móvil en este caso el crudo disuelto en algún solvente poco polar en un primer lugar (generalmente es utilizado el mismo solvente con el cual se precipitaron los asfaltenos), de manera que solo pasa a través de la columna la fracción menos polar de la mezcla, en este caso los saturados, ya que el n-hexano (C_6H_{14}) con sus débiles fuerzas de dispersión de London a lo largo de su estructura, solo es capaz de solubilizar a los compuestos de polaridad baja, dándose una interacción del tipo dipolo inducido-dipolo inducido (Brown T *et al.*, 2004).

Seguidamente para arrastrar a la fracción aromáticos se debe seleccionar un solvente no polar como para solubilizar a dichos compuestos pero que no supere la polaridad del empaque de la columna y evite disolver las resinas, en este caso el tolueno (C_7H_8) es un solvente ideal debido a su baja polaridad y su gran afinidad con los aromáticos al encontrarse en el mismo grupo de hidrocarburos.

En esta etapa se debe vigilar la aparición de dichos compuestos que cuando no presentan ninguna coloración (aromáticos mono y di sustituidos), pueden identificarse al recibir fotoexcitación en la región UV-visible, mediante la absorción de un fotón que promueve un electrón de un orbital molecular ocupado a otro vacío (transiciones), lo que origina que se observe una coloración azul intenso cuando son expuestos a luz visible mediante una lámpara UV.

Por último se debe seleccionar un solvente altamente polar para extraer a las resinas y en este caso se seleccionó el metanol (CH_3OH), el cual permite arrastrar a las resinas mediante la interacción dipolo-dipolo que se establece, al igual que los puentes de hidrógeno entre los

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

átomos de nitrógeno (N), azufre (S) y oxígeno (O) que poseen dichos compuestos (Brown T, 2004).

Una vez que se realizó la elución de cada componente de la solución de maltenos en la columna cromatográfica, tal como se explicó en la metodología, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.6.

TABLA 4.6
COMPOSICIÓN DE SATURADOS, AROMÁTICOS, RESINAS Y ASFALTENOS (SARA) DEL
PETRÓLEO CRUDO EMPLEADO EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Componente	Porcentaje en peso de la fracción(%F ± 0,8)%
Saturados	29,8
Aromáticos	32,8
Resinas	32,9
Asfaltenos	04,3

De la tabla 4.6 se deduce que el crudo Merey tiene un alto contenido de resinas y de hidrocarburos aromáticos, además de poseer un alto contenido de asfaltenos, catalogado como crudo pesado, lo que lo convierte en una excelente alternativa para aplicar técnicas de biorremediación ya que se puede estimar la degradación que se puede llevar a cabo en los compuestos presentes en el mismo.

4.4.2.1 Análisis de los cromatogramas de la fracción saturada del crudo

A partir de las condiciones establecidas en la metodología se realizó una cromatografía de gases a la fracción saturada del crudo, esto se hizo con la finalidad de establecer bases cualitativas con respecto a la degradación a llevar a cabo, es decir, con relación a la cantidad e intensidad de las señales emitidas por el cromatógrafo se quiere determinar si hubo o no degradación de la fracción saturada que según Infante C., 2001, es la más fácil de degradar por

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

medio de la oxidación de consorcios microbianos. La figura 4.7 muestra el cromatograma obtenido para la fracción saturada del crudo.

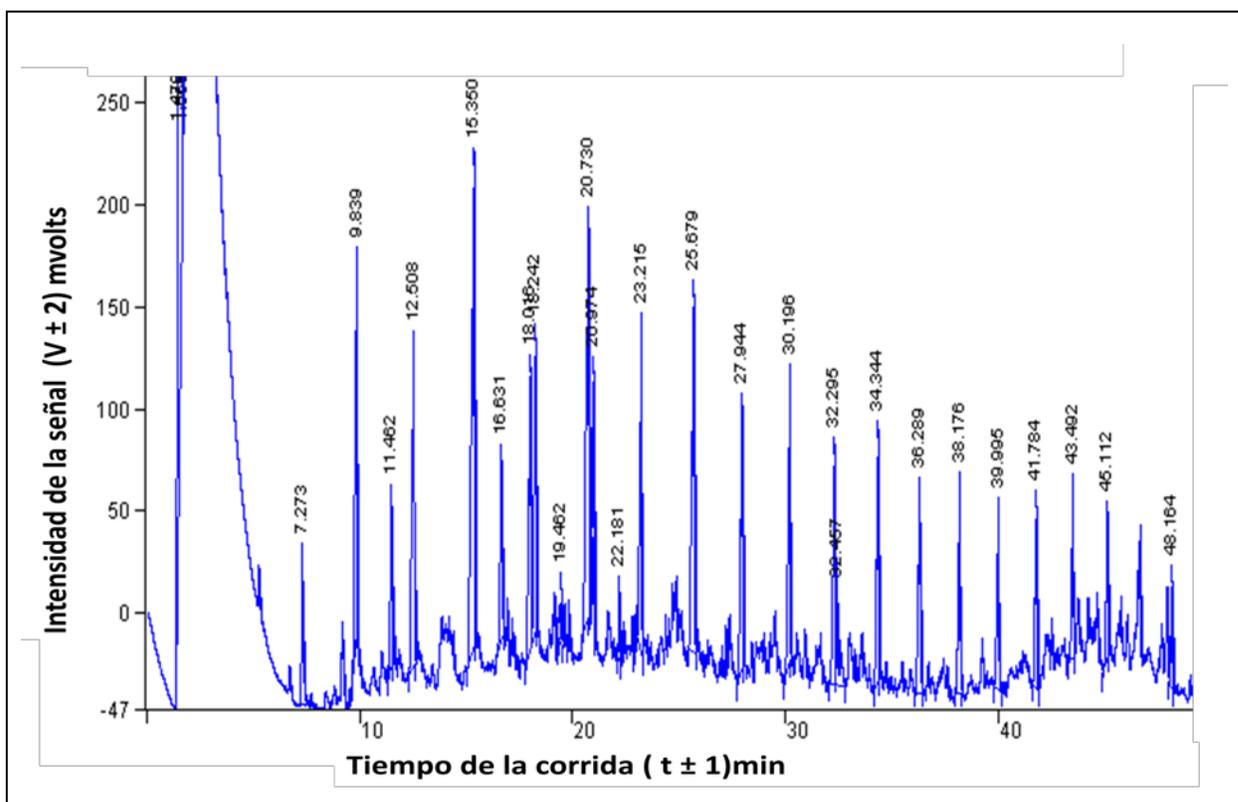


Figura 4.7: Cromatograma para la fracción saturada del crudo Mery.

4.4.2.2 Análisis de espectros de resonancia magnética nuclear a las resinas del crudo Mery

Se emplearon las mismas condiciones que las seguidas en la obtención del espectro de RMN-1H de asfaltenos, la figura 4.8 muestra el espectro obtenido. En dicho espectro, se pueden observar tres picos representativos, los cuales son debidos a tres posibles contaminantes dentro de las muestras analizadas. El primero corresponde al cloroformo, tal como se explicó anteriormente, el cual aparece en un campo alto de 7,24 ppm.

Ahora bien, cuando se realiza la extracción SARA, la rota-evaporación no es efectiva por lo que pueden quedar rastros de los solventes empleados (hexano, tolueno y metanol). Para

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

el caso del metanol como su intervalo de aparición es muy amplio (1 – 6) ppm no se considera efectivo su análisis; mientras que el hexano aparece sumándose a los picos de la región alifática. En el caso del tolueno, los protones del grupo metilo aparecen en aproximadamente 2,35 ppm, observándose una señal muy intensa en ese punto. Hay que tener en cuenta que a la hora de analizar las muestras de resinas, una vez rotaevaporadas, se adicionó un poco de diclorometano (CH_2Cl_2) para evitar su posible oxidación, esto origina que se noten picos cercanos a los (4,5 - 5,3) ppm que es la región en donde aparece este solvente.

Se observan picos en el área alifática correspondientes a protones de dichas cadenas saturadas, protones unidos a grupos carbonilos (características de la alta polaridad de las resinas), además de picos en el área de aromáticos, apantallados por el cloroformo. Se observa además un pequeño pico correspondiente a un aldehído a 10 ppm, debido principalmente a que los crudos provenientes de la faja petrolífera del Orinoco son superficiales, lo que da indicio que parte de ellos se encuentran pre-degradados a baja escala.

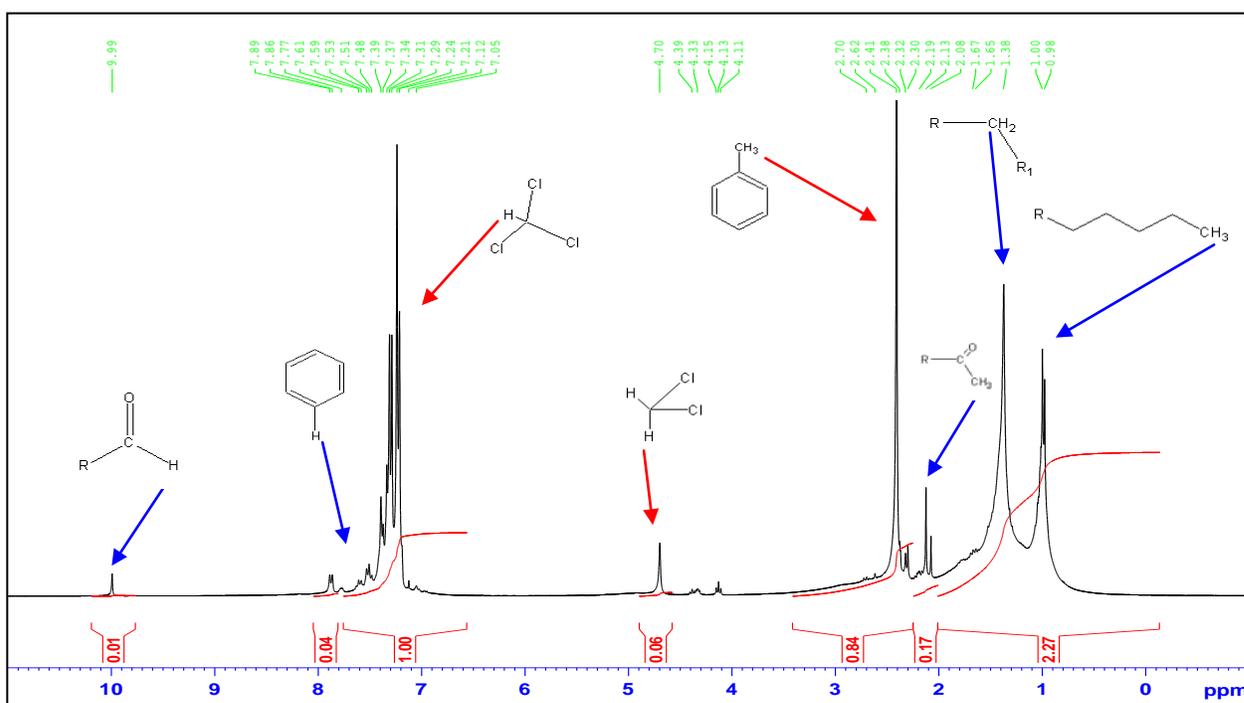


Figura 4.8. Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas del crudo Merer.

4.5 EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN APLICADAS

Para la evaluación de las técnicas de biorremediación se realizó una mezcla homogénea del suelo virgen con el petróleo crudo previamente caracterizado, esto con el fin simular las condiciones de contaminación que sufre el suelo en las áreas de donde se extrajo. Dando como resultado una concentración inicial de $(5,58 \pm 0,02)$ % de hidrocarburos totales de petróleo.

4.5.1 Análisis de la caracterización de los agentes bioestimulantes

En la tabla 4.7 se deduce que el estiércol equino es rico en el nutrimento fósforo, en materia orgánica y en nitrógeno total, no obstante, algunos autores como Sandoval J., 2002 sugieren que los estiércoles se deben utilizar más como acondicionadores y mejoradores del suelo y no como fertilizantes, debido a baja cantidad de nutrientes que aportan con respecto a la excesiva demanda de éstos que requieren los suelos.

TABLA 4.7
CARACTERIZACIÓN DEL ESTIERCOL EQUINO A EMPLEAR COMO BIOESTIMULANTE
EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Parámetro	Valor
Materia orgánica ($M_o \pm 0,02$) %	1,81
Carbono total ($C_T \pm 0,02$) %	1,05
Nitrógeno total ($N_T \pm 0,02$) %	0,14
Fósforo total ($P_T \pm 0,2$) mg/kg	290,2

El humus líquido es una gran fuente de nutrimentos como nitrógeno, carbono y fósforo de excelencia sobre los estiércoles, sin embargo en la tabla 4.8 puede observarse que los valores arrojados de los diversos macro elementos presentes en el humus líquido son muy bajos, esto es debido principalmente a que el humus líquido corresponde a un solución de lavado sobre la pila de compostaje, lo que origina que el residuo de lavado (humus) esté muy

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

diluido, razón por la cual se observan valores tan bajos de macroelementos en este agente bioestimulante.

TABLA 4.8

**CARACTERIZACIÓN DEL HUMUS LÍQUIDO A EMPLEAR COMO BIOESTIMULANTE
EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN**

Parámetro	Valor
Materia orgánica ($M_o \pm 0,02$) %	0,34
Carbono total ($C_T \pm 0,02$) %	0,19
Nitrógeno total ($N_T \pm 0,02$) %	0,16
Fósforo total ($P_T \pm 0,2$) mg/kg	100,0

4.5.2 Análisis de las condiciones iniciales de nutrientes para cada tratamiento aplicado

Si existen 15 macroorganismos de Eisenia foétida por biorreactor éstos ingerirían 15 g de sustrato diariamente para un total de 330 g sustrato aproximadamente a lo largo de los veintidós días de tratamiento, razón por la cual se adicionaron ($0,350 \pm 0,001$) kg de sustrato para cumplir con las necesidades de alimentación de los macroorganismos.

Bajo las condiciones descritas en el párrafo anterior, Ferruzi C., 1994 revela que si la Eisenia foétida ingiere diariamente lo que pesa, entonces esta excreta el 60 % en forma de humus líquido, lo que se traduce a decir un valor aproximado de 0,60 g, resultando que las 15 lombrices en el biorreactor producen 9 g de humus diariamente. Al cabo de los 22 días de tratamiento los macroorganismos en conjunto habrán producido aproximadamente 190 g de humus, razón por la cual se mezcló dicha cantidad de humus con el suelo impactado, con el fin de simular lo que la lombriz haría en ese período de tiempo.

De acuerdo con Infante C., 2001 para que el proceso de biorremediación sea exitoso, es imprescindible mantener una relación de nutrientes adecuada (véase tabla 4.9), ahora bien

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

con la caracterización inicial del suelo virgen, del humus líquido y del estiércol equino, y tomando en consideración la alternativa planteado por Levin L *et al.*, 1997 en la cual se establece que un suelo contaminado con crudo posee aproximadamente un 78 % en masa de carbono orgánico total, se pueden estimar en función de las cantidades de bioestimulante adicionadas las relaciones de nutrimentos iniciales en los biorreactores, tal como lo muestra la tabla 4.9.

TABLA 4.9
RELACIÓN DE NUTRIENTES PRESENTES EN LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS
AL INICIO DE LA EXPERIMENTACIÓN

Tipo de tratamiento	Biorreactores Nº	Relación de nutrientes (R ±0,04) adim		Relación de nutrientes óptima	
		(C/N)	(C/P)	(C/N)	(C/P)
Control	01	197,84	14040,00	45-100	650-900
Estiércol equino	02,03,04	93,25	679,83		
Humus líquido	05,06,07	102,36	3473,20		
Eisenia foétida	08,09,10	93,25	679,83		

Para el tratamiento control (atenuación natural), las relaciones de nutrientes indican que existe un déficit de nitrógeno y de fósforo ya que las relaciones son mayores al rango óptimo lo que sugiere que los microorganismos autóctonos del suelo no podrán degradar todo el carbono presente en el suelo debido a que hay muy pequeñas cantidades de nitrógeno y de fósforo.

Para los tratamientos con estiércol equino y Eisenia foétida, las relaciones arrojan resultados favorables dentro del rango propuesto por Infante C., 2001 no obstante, en el tratamiento con humus líquido se pone de manifiesto una deficiencia de fósforo por encima de la deficiencia de nitrógeno como agentes propiciadores del buen desarrollo bacteriano.

4.5.3 Análisis de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) y carga bacteriana

Se empleó tetrahidrofurano p.a (C_4H_8O) como solvente extractor, ya que es un compuesto heterocíclico que es moderadamente polar, lo cual le permite solubilizar a todos los diferentes tipos de compuestos presentes en el crudo (SARA). Los resultados se muestran en la tabla B.2.1 y se resumen en la figura 4.9.

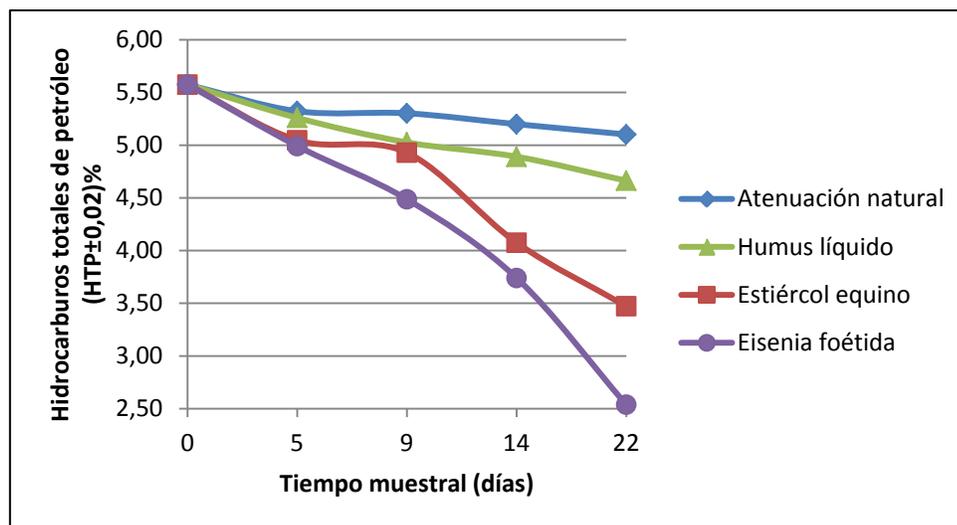


Figura 4.9: Disminución de los hidrocarburos totales de petróleo en cada una de los tratamientos aplicados.

Los resultados obtenidos revelan que existe una disminución de los hidrocarburos totales de petróleo en función del tiempo de estudio, esto se debe principalmente al establecimiento de comunidades bacterianas autóctonas que logran degradar parte de los compuestos que están presentes en el crudo, debido a que se mantienen ciertas condiciones que propician su desarrollo. (Canals V., 2005).

Según La Grega *et al.*, 2002 las bacterias son las responsables de las reacciones de biodegradación y acotan que aunque dichas reacciones forman parte normal del metabolismo de una célula bacteriana, el objetivo de estos microorganismos no es la eliminación de los

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

contaminantes ambientales; sino crecer y mantenerse. El desarrollo de la carga bacteriana mesófila se evidencia en la figura 4.10.

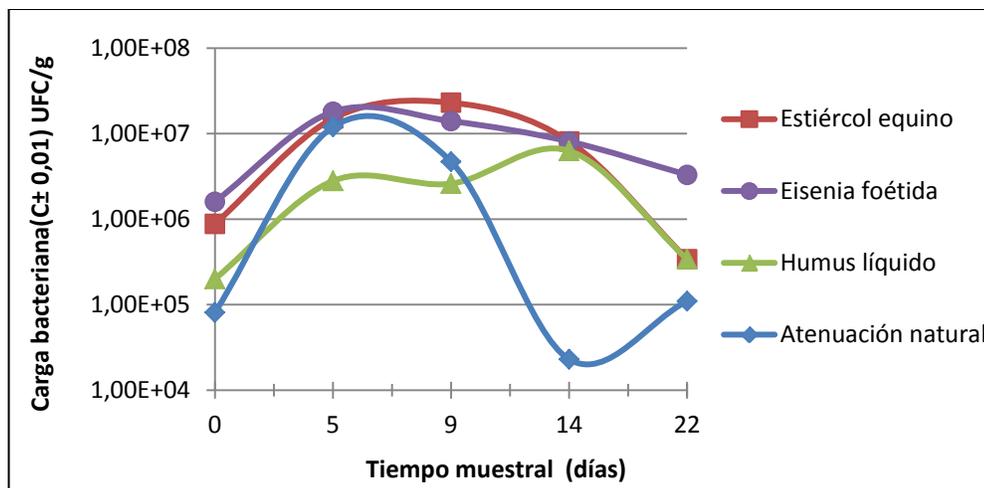
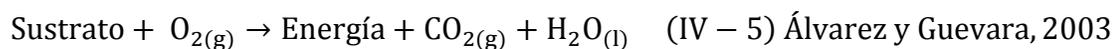


Figura 4.10: Evolución de la carga bacteriana mesófila para cada una de los tratamientos aplicados.

Este comportamiento es sinónimo que existió un proceso de biodegradación del crudo presente en el suelo, por la acción de las bacterias propias del suelo, las cuales se vieron bioestimuladas debido a la adición de estiércol equino, humus líquido y el humus proveniente de la lombriz, los cuales son acondicionadores que aumentan la capacidad de degradación de los microorganismos, según la siguiente reacción:



En la cual sugiere que se dió una oxidación (ingreso de oxígeno) por medio de las bacterias para obtener energía y reproducirse. Lo que cambia la estructura molecular del sustrato como lo explica la figura 2.6. Así mismo, la figura 4.11 muestra el porcentaje de degradación estimado para cada técnica aplicada.

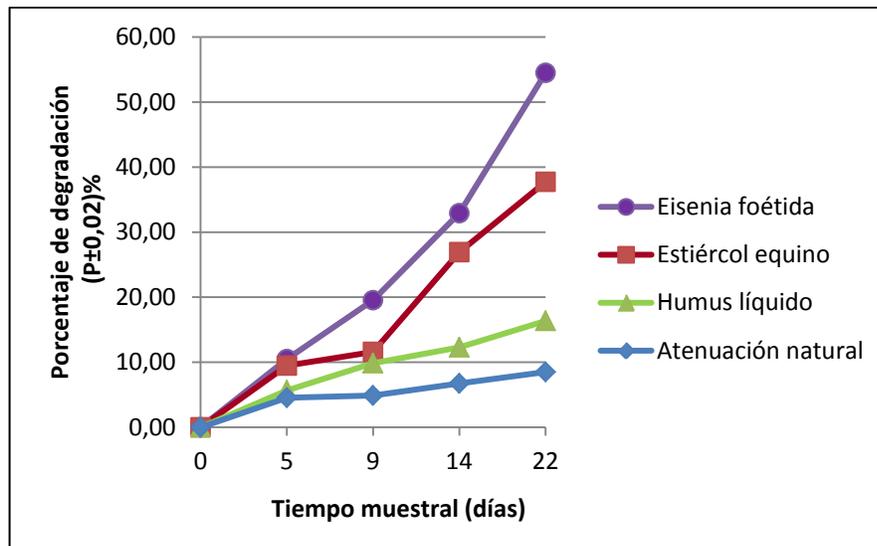


Figura 4.11: Porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales de petróleo en cada una de los tratamientos aplicados.

4.5.3.1 Suelo patrón (atenuación natural).

Los resultados obtenidos en el suelo patrón reflejan que hubo un porcentaje de degradación de $(8,50 \pm 0,02)$ % al día final del tratamiento, lo que se traduce en una disminución de los hidrocarburos totales de petróleo de $(5,58 \pm 0,02)$ % a $(5,10 \pm 0,02)$ %.

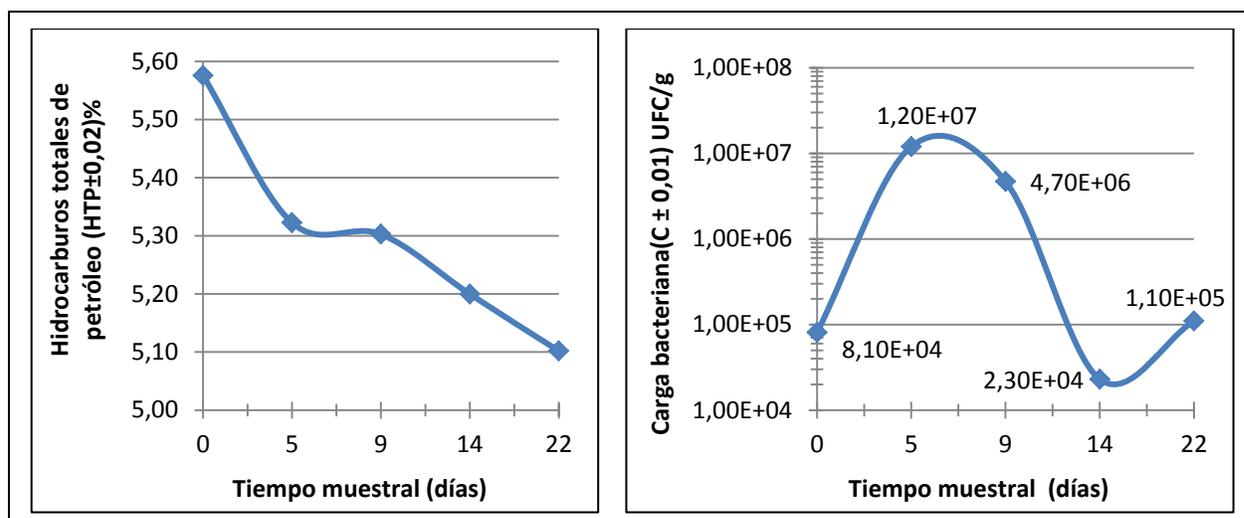


Figura 4.12: Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento control (atenuación natural).

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En la figura 4.12 puede evidenciarse que al inicio de tratamiento se obtuvo una carga bacteriana de $(8,10 \pm 0,01) \times 10^4$ UFC/g, obteniéndose una máxima carga bacteriana al quinto día de tratamiento de $(1,20 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g luego la curva comienza a decrecer producto de la fase de muerte de las bacterias.

Según Álvarez y Guevara, 2003 el hecho por el cual un tratamiento control, al cual no se le adicionó ningún tipo de microorganismo presenta degradación, se debe generalmente a que se da un proceso de hidrólisis, la cual es una transformación química mediante la que una molécula orgánica reacciona con el agua y mediante una sustitución nucleofílica se introduce un ión oxidrilo en un carbono electrofílico. Aunado a ello también se pueden establecer reacciones de oxidación producto de la aireación del suelo contaminado a lo largo del tratamiento. Más sin embargo debe tenerse en cuenta que la tasa de biodegradación es menor a los otros tratamientos aplicados (véase figura 4.11).

4.5.3.2 Tratamiento con estiércol equino

Los resultados obtenidos en este biorreactor reflejan que hubo un porcentaje de degradación de $(37,72 \pm 0,02)$ % al día final del tratamiento, lo que se traduce en una disminución de los hidrocarburos totales de petróleo de $(5,58 \pm 0,02)$ % a $(3,47 \pm 0,02)$ %.

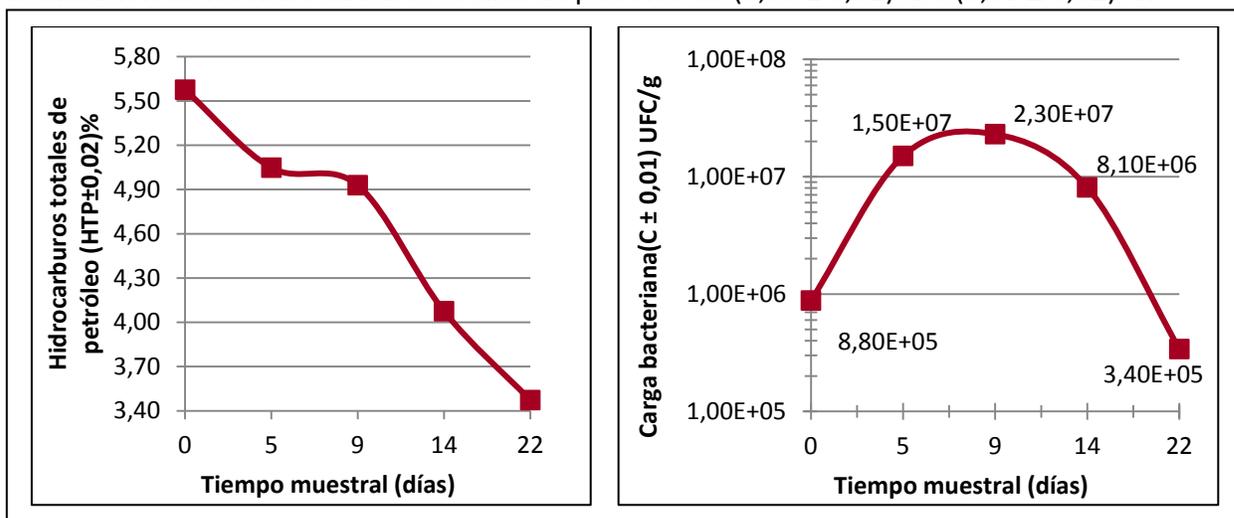


Figura 4.13: Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con estiércol equino.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En la figura 4.13 puede evidenciarse que al inicio de tratamiento se obtuvo una carga bacteriana de $(8,80 \pm 0,01) \times 10^5$ UFC/g, obteniéndose una máxima carga bacteriana al noveno día de tratamiento de $(2,30 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g luego la curva comienza a decrecer producto de la fase de muerte de las bacterias.

Es de hacer notar que los valores de carga bacteriana son mayores a los obtenidos que para el suelo control, lo que se traduce en una mejor biodegradación y por ende un menor valor de hidrocarburos totales de petróleo al finalizar el tratamiento. Esto se debe principalmente a que dicho tratamiento se empleó unas relaciones de nutrientes óptimas, como lo plantea Infante C., 2001. Además es importante mencionar que el estiércol equino es un buen acondicionador de suelo lo que favorece el intercambio de oxígeno molecular en los intersticios del suelo. (Sandoval J., 2002).

4.5.3.2 Tratamiento con humus líquido

Los resultados obtenidos en este biorreactor reflejan que hubo un porcentaje de degradación de $(16,36 \pm 0,02)$ % al día final del tratamiento, lo que se traduce en una disminución de los hidrocarburos totales de petróleo de $(5,58 \pm 0,02)$ % a $(4,66 \pm 0,02)$ %.

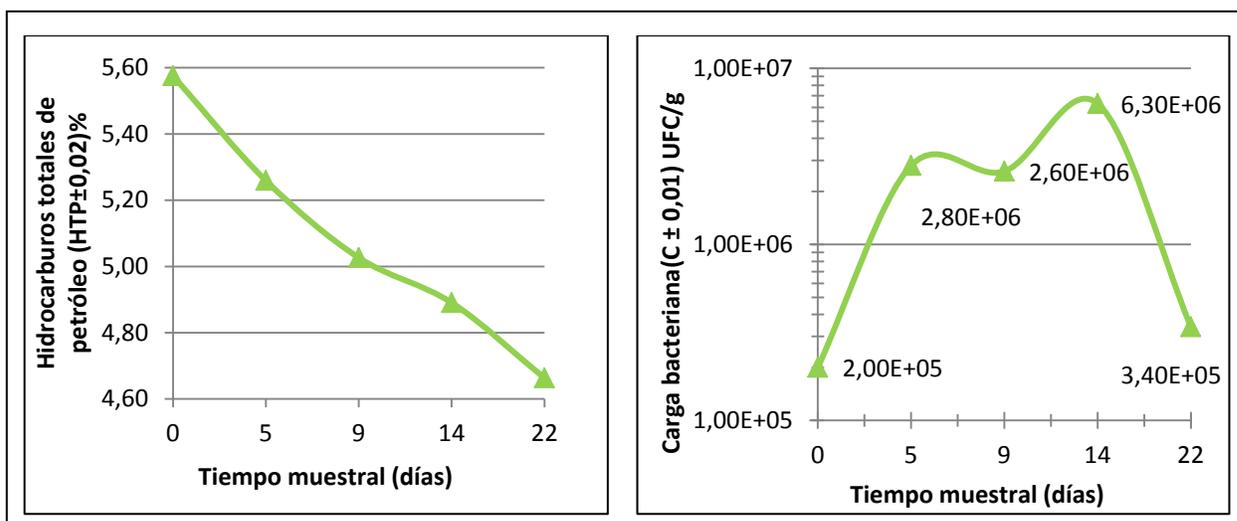


Figura 4.14: Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con humus líquido.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En la figura 4.14 puede evidenciarse que al inicio de tratamiento se obtuvo una carga bacteriana de $(2,00 \pm 0,01) \times 10^5$ UFC/g, obteniéndose una máxima carga bacteriana al día catorce de tratamiento de $(6,30 \pm 0,01) \times 10^6$ UFC/g luego la curva comienza a decrecer producto de la fase de muerte de las bacterias, registrándose un valor mínimo al noveno día de tratamiento $(2,60 \pm 0,01) \times 10^6$ UFC/g.

Los valores de carga bacteriana obtenidos en este tratamiento son menores a los obtenidos para el tratamiento control en los primeros nueve días y mucho menores a los del estiércol equino para todos los días, esto se debe principalmente a que en dichos biorreactores, las relaciones de nutrientes no eran las más adecuadas para que se estableciera un proceso de degradación microbiana. Ya que existe una cantidad excesiva de carbono orgánico y muy poca cantidad del nutriente fósforo (P) (véase tabla 4.9) ya que según LaGrega *et al.*, 2002, el nitrógeno y el fósforo son necesarios para su incorporación en la biomasa. Siendo sus concentraciones limitantes de la capacidad de degradación microbiana. Es por ello que la curva de crecimiento bacteriano presenta un mínimo ya que en ese punto las concentraciones de los nutrientes en el medio se agotaron y las bacterias entran en una etapa de latencia. Luego con la adecuada aireación y mantenimiento de la humedad es posible reincentivar el crecimiento bacteriano aunque en menor proporción (Álvarez y Guevara, 2003).

4.5.3.2 Tratamiento con los macroorganismos de *Eisenia foétida*.

Los resultados obtenidos en este biorreactor reflejan que hubo un porcentaje de degradación de $(54,48 \pm 0,02)$ % al día final del tratamiento, lo que se traduce en una disminución de los hidrocarburos totales de petróleo de $(5,58 \pm 0,02)$ % a $(2,54 \pm 0,02)$ %.

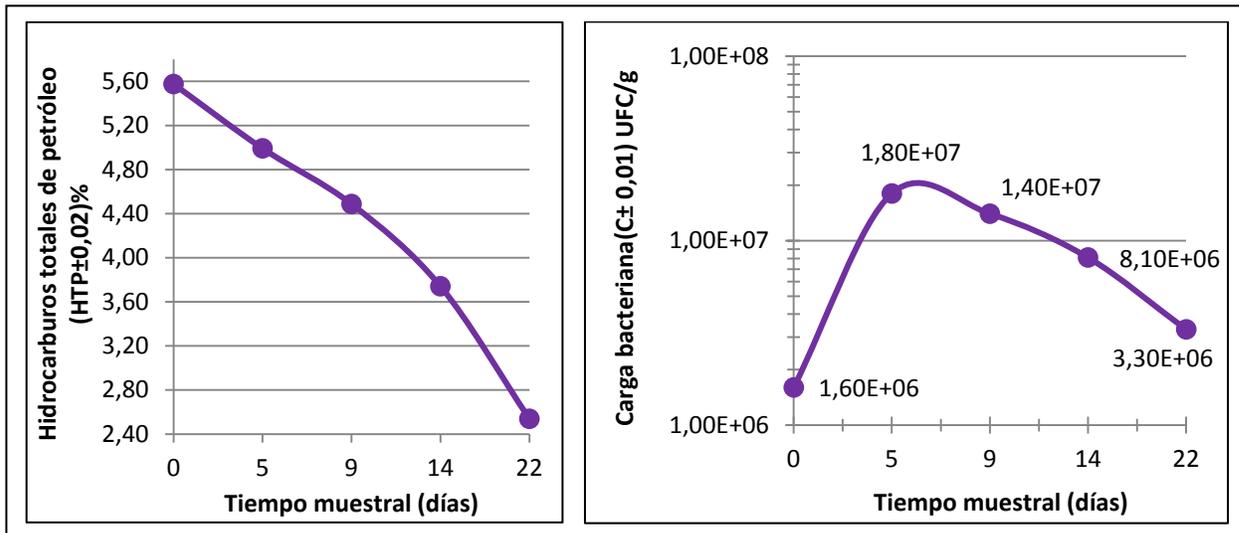


Figura 4.15: Hidrocarburos totales de petróleo y curva de crecimiento bacteriano para el tratamiento con los macroorganismos de Eisenia foétida.

En la figura 4.15 puede evidenciarse que al inicio de tratamiento se obtuvo una carga bacteriana de $(1,60 \pm 0,01) \times 10^6$ UFC/g, obteniéndose una máxima carga bacteriana al quinto día de tratamiento de $(1,80 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g luego la curva comienza a decrecer producto de la fase de muerte de las bacterias en los demás días del tratamiento.

El tratamiento con la Eisenia foétida produjo los mejores resultados de carga bacteriana de todos los tratamientos, esto influye notablemente en la degradación que se llevó a cabo. A pesar que experimentos anteriores realizados por Schaefer M *et al.*, 2006 describen que la máxima concentración de crudo en suelo a las que pueden ser expuestas los especímenes de Eisenia foétida es cercano a los 9500 mg/kg, los resultados obtenidos por el presente estudio permiten comprobar la supervivencia y adaptación de este macroorganismo logrando una degradación de aproximadamente un 55 % en un suelo contaminado con un 5,58 % (55.800 mg/kg), es decir, la Eisenia foétida toleró una concentración de crudo casi seis veces mayor a la propuesta por Schaefer M *et al.*, 2006 y aunado a ello no presentó una tasa de mortalidad significativa como se muestra en la figura 4.16.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

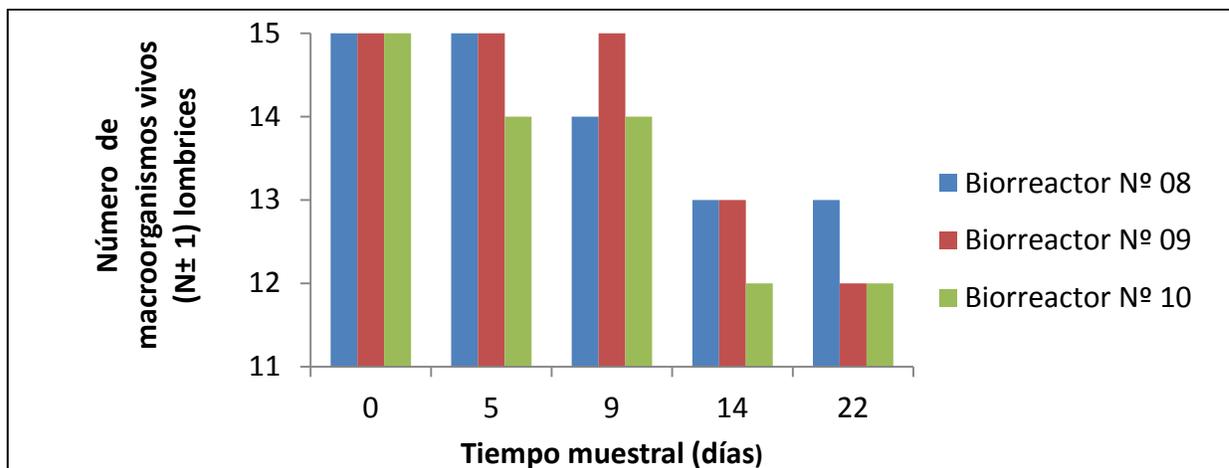


Figura 4.16: Conteo de especímenes de *Eisenia foetida* presentes en los biorreactores durante el proceso de degradación.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Hubalek T *et al.*, 2006 el cual realizó un monitoreo de ecotoxicidad en un suelo contaminado con crudo empleando macroorganismos de *Eisenia foetida* en donde obtuvo una tasa de mortalidad pequeña al trabajar por un período de veintiocho días bajo una concentración de crudo de 6380 $\mu\text{g/g}$, se puede estimar que la mortalidad de los macroorganismos reflejada no es significativa, ya que debe tenerse en cuenta que a medida que transcurren los días el sustrato fuente de alimento se agota, y no siempre la reducción en la contaminación va acompañada con la reducción de la toxicidad del suelo, ya que la degradación incompleta y la formación de metabolitos intermediarios pueden conducir al incremento de la toxicidad y por ende a la muerte de los macroorganismos de *Eisenia foetida* presentes en el suelo (Hubalek T *et al.*, 2006), por lo que se sugiere que en estudios posteriores se evalúe los compuestos más tóxicos presentes en las fracciones aromáticas para evaluar el progreso del biotratamiento.

También debe tenerse en consideración que las características físicas de todos los biorreactores para cada tratamiento, cambiaron a lo largo de la experimentación, así como una atenuación del fuerte olor en los tratamientos con estiércol equino y *Eisenia foetida*. La figura 4.17 muestra los biorreactores al finalizar el tratamiento.

Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados



Figura 4.17: Condiciones físicas de los biorreactores a los veintidós días de tratamiento.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

4.5.4 Análisis de las diversas fracciones de crudo (SARA) obtenidas a partir de cada tratamiento.

4.5.4.1 Análisis de la fracción de hidrocarburos saturados

Para el análisis de los cambios que se registraron en la fracción saturada del crudo durante el proceso de biorremediación, se obtuvo inicialmente un valor de $(29,8 \pm 0,8)$ % los resultados se muestran en la figura 4.18.

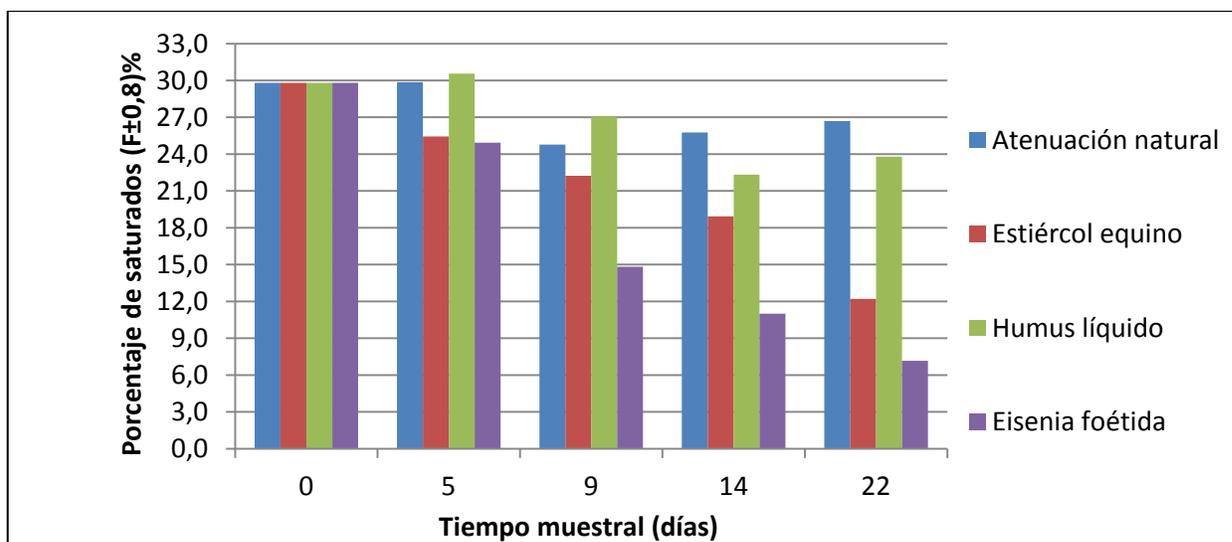


Figura 4.18: Porcentaje de fracciones de hidrocarburos saturados presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación.

En la figura 4.18 se concluye que el tratamiento que degradó mayor cantidad de estos hidrocarburos fue el que contenía los macroorganismos de *Eisenia foetida* con un porcentaje remanente de $(7,2 \pm 0,8)$ % al finalizar el tratamiento. El segundo más efectivo en cuanto a la degradación de saturados fue el tratamiento con estiércol equino con un $(12,3 \pm 0,8)$ % al día veintidós. En la figura 4.18, puede observarse que los tratamientos de humus líquido y control, no sufrieron cambios representativos, lo que revela el porqué en dichos biorreactores al finalizar los tiempos muestrales todavía se lograba percibir un olor muy fuerte a petróleo crudo, ya que una propiedad física de los hidrocarburos saturados es un olor muy fuerte similar al del

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

keroseno (Brown T *et al.*, 2004), a diferencia del resto de los biorreactores en donde no se apreció ningún tipo de olor pasados los nueve días de tratamiento.

Todo esto es debido a que los microorganismos autóctonos presentes en el suelo les resulta más fácil degradar las fracciones de hidrocarburos saturados (Infante C., 2001), ya que éstos constan de ramificaciones lineales de átomos de carbonos (parafinas) por lo tanto se observa altas tasas de biodegradación de este tipo de hidrocarburos en los tratamientos aplicados.

4.5.4.1.1 Análisis cromatográfico de las fracciones de saturados

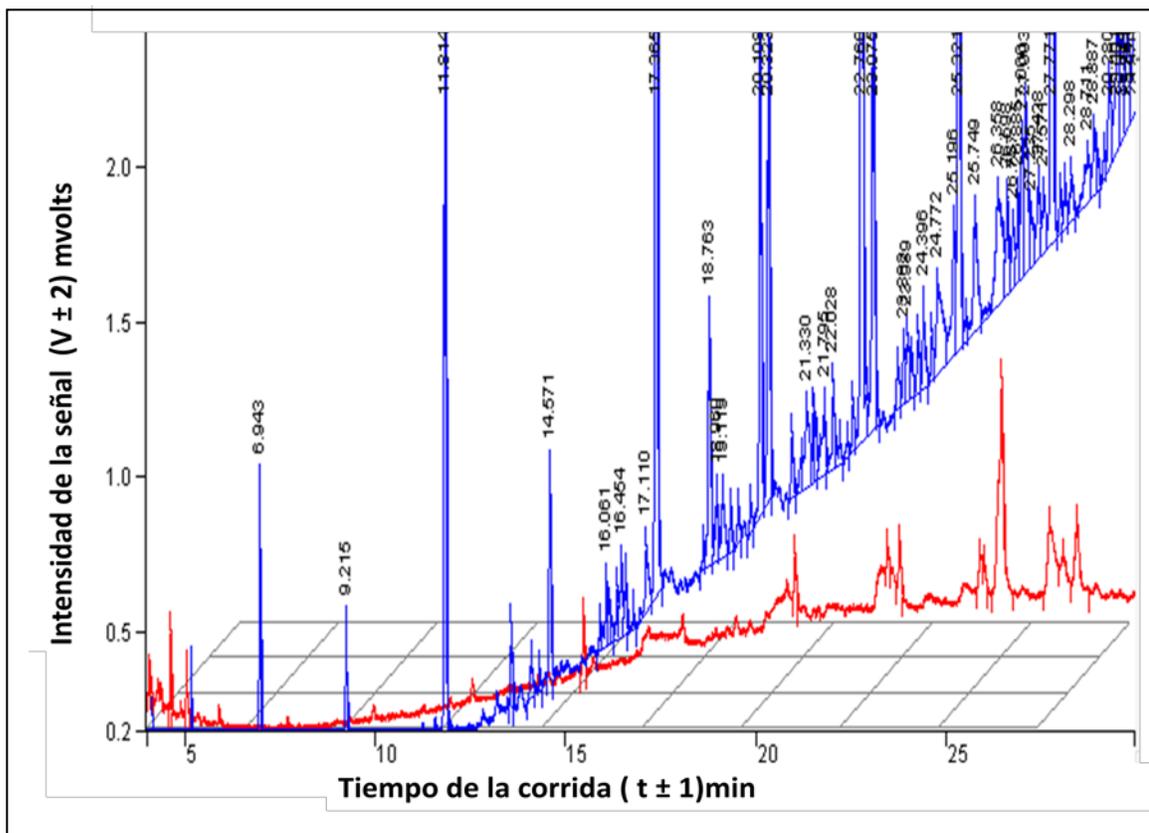


Figura 4.19: Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con estiércol equino. Al inicio del tratamiento (curva color azul) y al final del mismo (curva color rojo).

De la figura 4.19 se deduce que efectivamente existió una degradación de los hidrocarburos saturados mediante la simple comparación de los cromatogramas, tal cual como

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

lo hizo Schaefer M *et al.*, 2006, la reducción de las áreas en el tratamiento con estiércol equino involucra un cambio estructural en el arreglo molecular de los compuestos saturados.

No fue necesario correr un patrón de referencia a la hora de estimar los diversos picos ya que lo que se quiere evaluar es si hubo presencia de degradación y no fuentes biológicas de materia orgánica sedimentaria, medios deposicionales, madurez de la materia orgánica, edad geológica, los cuales se analizan por medio de las relaciones de fitano y pristano presentes en el hidrocarburo. (Ortiz y García, 2006). Por otra parte en el caso del tratamiento con la *Eisenia foétida* se obtuvo una mayor degradación de los hidrocarburos saturados, tal como lo muestra la figura 4.20.

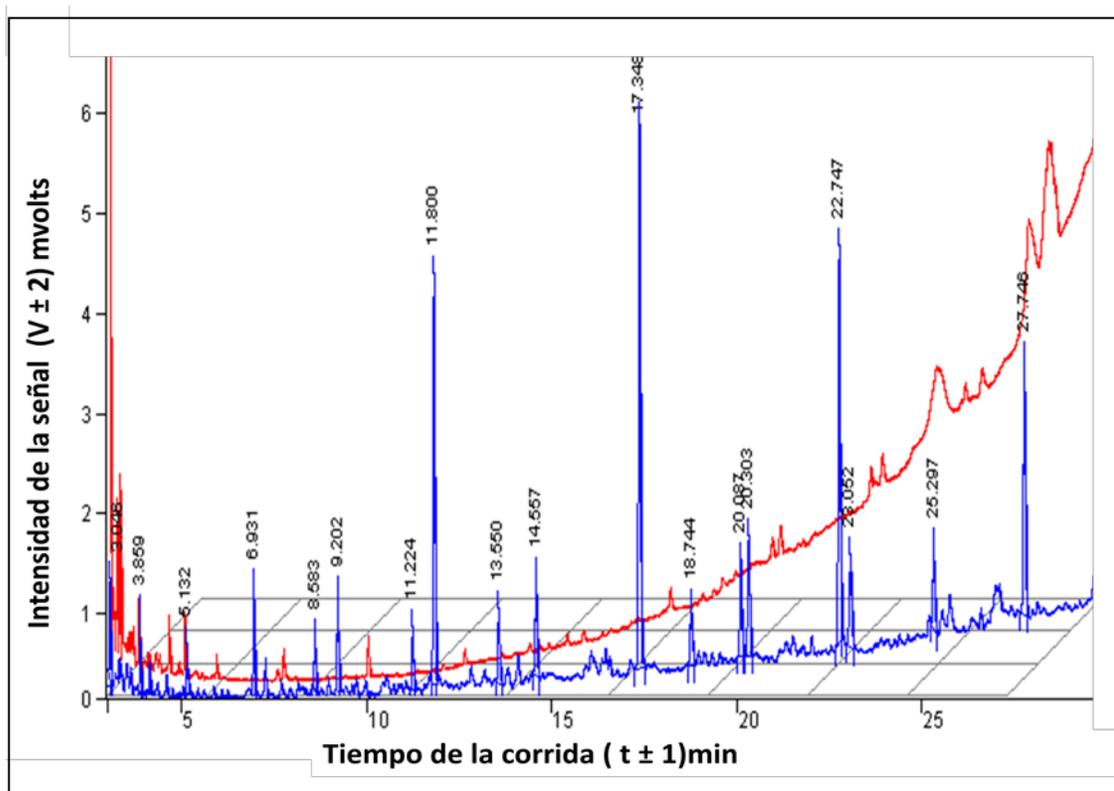


Figura 4.20: Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con los macroorganismos de *Eisenia foétida*. Al inicio del tratamiento (curva color azul) y al final del mismo (curva color rojo).

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Para el caso del humus líquido y del tratamiento control, los cromatogramas iniciales y finales revelan que hubo solo una pequeña biodegradación en menor escala que los mostrados anteriormente (véase figura 4.21).

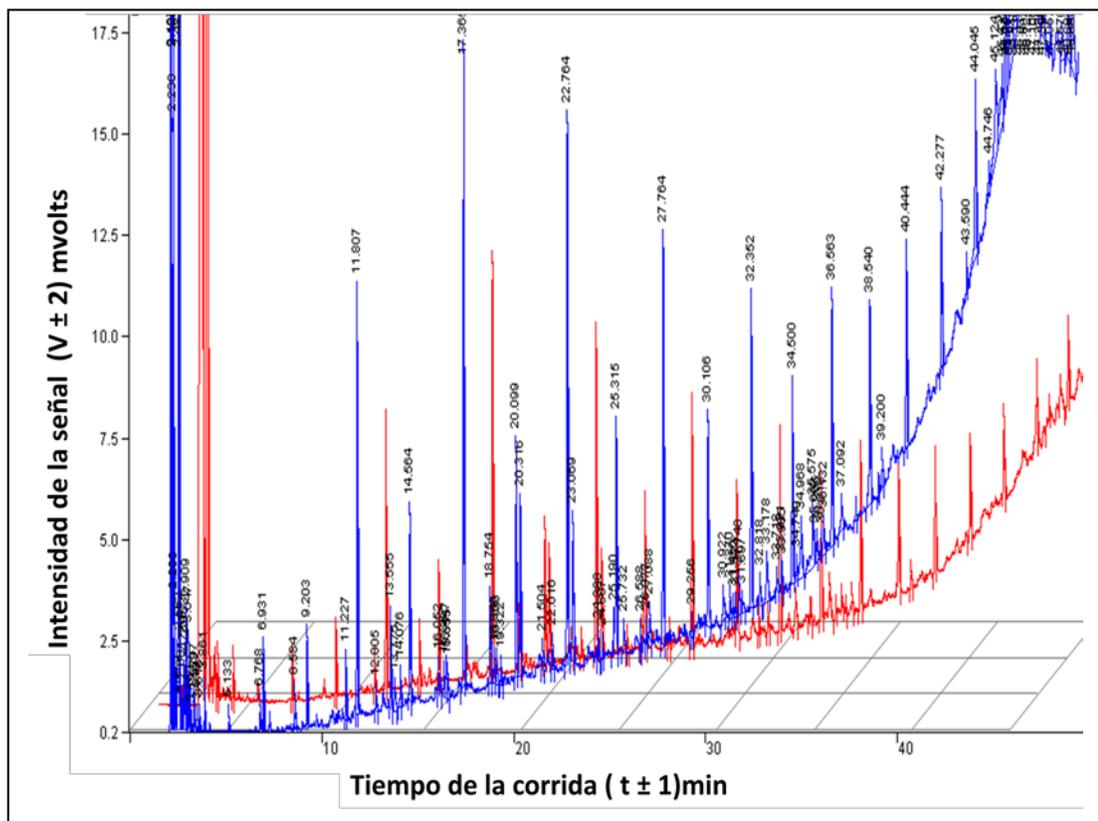


Figura 4.21: Cromatograma de la fracción saturada en el tratamiento con humus líquido. Al inicio del tratamiento (curva color azul) y al final del mismo (curva color rojo).

4.5.4.2 Análisis de la fracción de hidrocarburos aromáticos

La fracción aromática inicial de hidrocarburos saturados presente en los biorreactores corresponde a $(32,9 \pm 0,8) \%$, en la figura 4.22 se observan todos los cambios que sufrieron este tipo de hidrocarburos a lo largo del biotratamiento.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

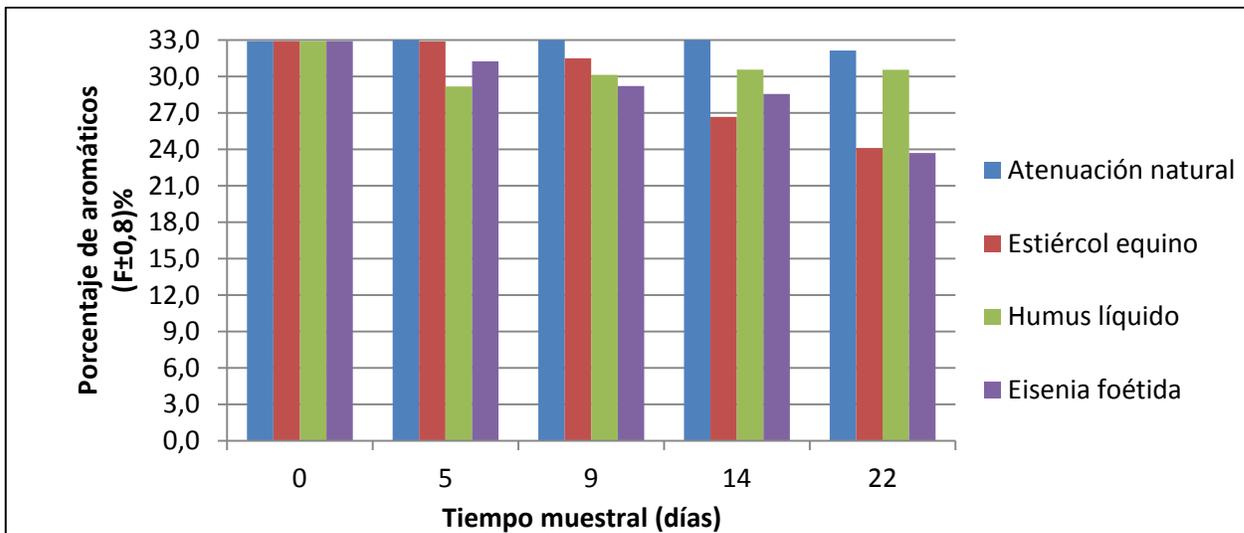


Figura 4.22: Porcentaje de fracciones de hidrocarburos aromáticos presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación.

Para el biorreactor control no hubo una variación significativa de la fracción aromática al igual que para el tratamiento con humus líquido, lográndose al día final del tratamiento un porcentaje de $(32,1 \pm 0,8) \%$ y $(30,6 \pm 0,8) \%$ respectivamente. No obstante para los demás tratamientos se obtuvo al finalizar los tiempos muestrales un valor de $(24,1 \pm 0,8) \%$ en los biorreactores con estiércol equino y $(23,7 \pm 0,8) \%$ en los que contenían a los macroorganismos de *Eisenia foétida*.

Según Infante C, 2001 la biorremediación permite disminuir significativamente los componentes aromáticos del crudo. Lo cual se verificó en los biorreactores que contenían los especímenes de *Eisenia foétida*, esto es debido a que la lombriz se abre paso a través del suelo excretando humus, lo sirve como transporte para que las diversas bacterias entren en contacto de forma más eficaz con el contaminante y se pueda inducir la degradación (Singer A.C *et al.*, 2001).

Por otro lado Infante C., 2001 señala que los hidrocarburos aromáticos son biodegradables hasta cierto punto, ya que estos están compuestos por hidrocarburos aromáticos policíclicos que son fracciones recalcitrantes.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En cuanto a la efectividad aparente de los tratamientos con el estiércol (Sandoval J., 2002) señala que estos ayudan a la estructuración del desecho, al incrementar la porosidad del mismo y con ello el intercambio de oxígeno, lo que favorece el proceso de biodegradación.

4.5.4.3 Análisis de la fracción de resinas

El porcentaje inicial de resinas presentes en los biorreactores es de $(33,0 \pm 0,8) \%$ en la figura 4.23 se observan todos los cambios que sufrieron este tipo de hidrocarburos a lo largo del biotratamiento.

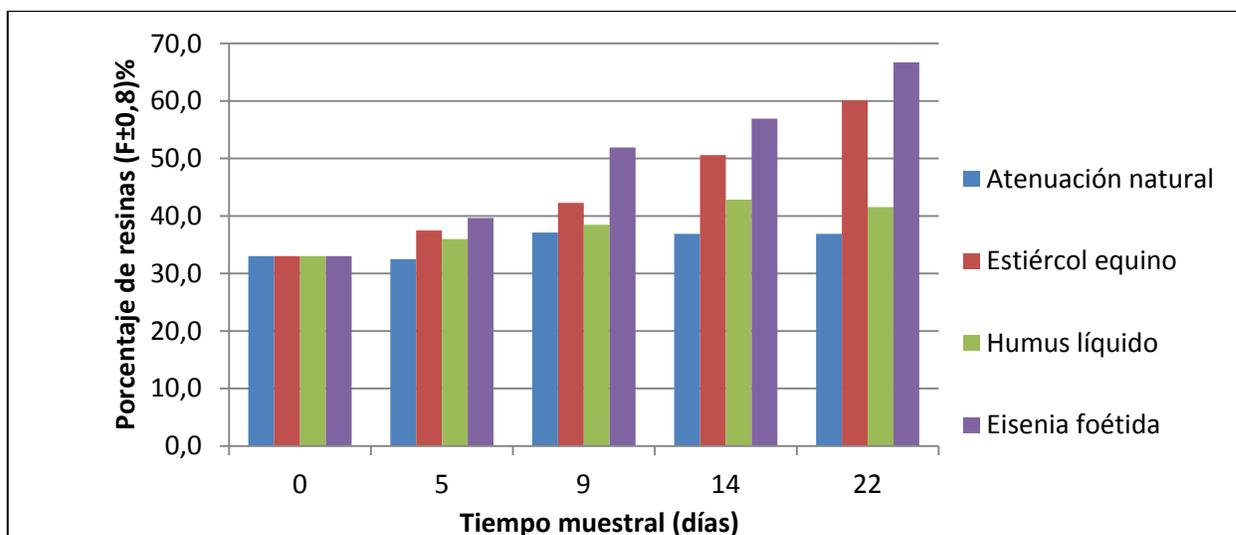


Figura 4.23: Porcentaje de fracciones de resinas presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación.

Se puede notar que hubo un aumento progresivo de las fracciones que involucran la cantidad de resinas en todos los tratamientos, correspondiendo al tratamiento con la Eisenia foétida el valor más alto alcanzado de $(67,7 \pm 0,8) \%$, al igual que para el estiércol equino de $(60,1 \pm 0,8) \%$. Mientras que para el tratamiento con humus líquido se alcanzó un valor de $(41,5 \pm 0,8) \%$ y para el control un valor de $(36,9 \pm 0,8) \%$.

Estos resultados sugieren que hubo ciertos cambios a nivel molecular en la estructura de las resinas producto de las técnicas de biorremediación aplicadas. A pesar de que Infante C.,

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

2001 señala que las resinas son fracciones recalcitrantes, Álvarez y Guevara 2003, establecen que los microorganismos autóctonos son capaces de poder degradar estos compuestos, ya que durante el proceso de biorremediación no solo actúan las bacterias mesófilas aerobias, sino que también se forman áreas anóxicas en donde crecen bacterias anaeróbicas que son capaces de degradar compuestos de estructura molecular más compleja. (LaGrega *et al.*,2002).

Otra causa del posible aumento se debe a que como se están trabajando con proporciones expresadas en porcentajes, cuando un valor de alguna fracción como los saturados en los tratamientos con *Eisenia foétida* disminuye mucho, existe un rearrreglo de los demás porcentajes que no considera si hubo o no un aumento o disminución de la masa de la fracción.

4.5.4.3.1 Análisis de los espectros de RMN-1H para la fracción de resinas a lo largo del biotratamiento.

4.5.4.3.1.1 Suelo patrón

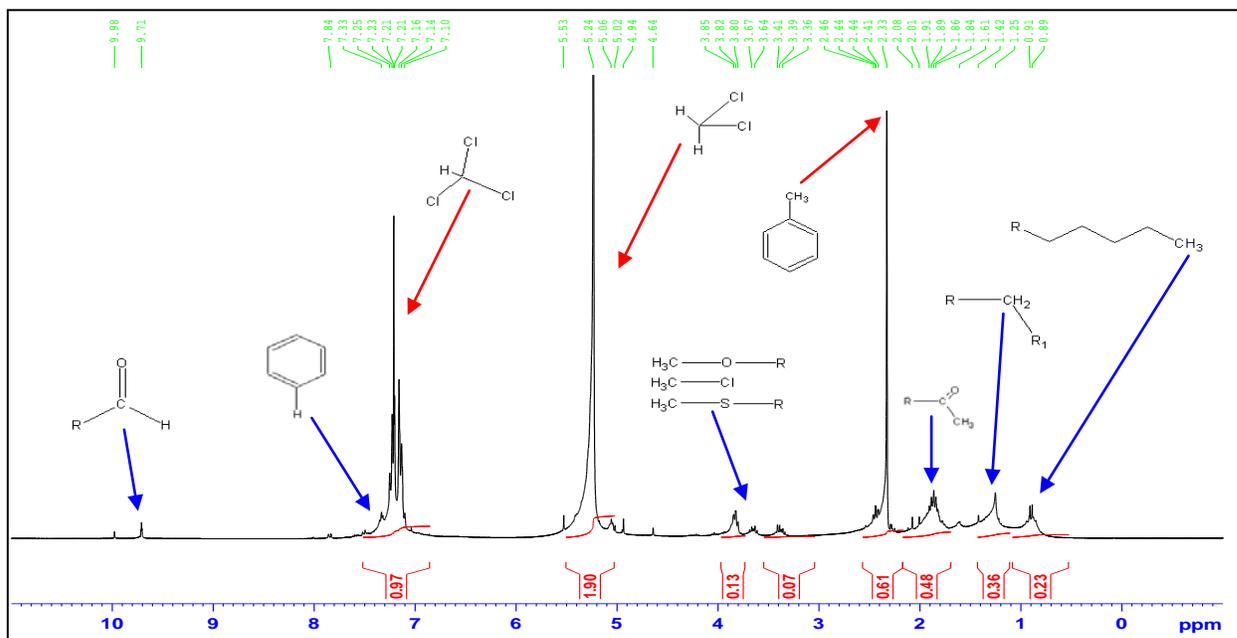


Figura 4.24. Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento control al último día de la experimentación.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

De la comparación del espectro de la figura 4.24 con el obtenido a partir de las resinas del crudo (véase figura 4.8) no existen muchas diferencias, salvo el hecho que al final del tratamiento aparecen picos entre (3 – 4) ppm, lo que refleja la presencia de hidrógenos unidos a heteroátomos (N, O, S, Cl), producto del proceso de degradación aerobia (oxígeno y nitrógeno) y anaerobia (nitrato, sulfatos y dióxido de carbono) por medio de los microorganismos autóctonos.

4.5.4.3.1.2 Tratamiento con estiércol equino

De la comparación del espectro de la figura 4.25 con el obtenido a partir de las resinas del crudo (véase figura 4.8) se reflejan algunas diferencias entre las cuales destaca la disminución de la frecuencia de aparición de los compuestos lo que sugiere que hubo una posible degradación por parte de los microorganismos que se encuentran presentes en el suelo (Álvarez y Guevara, 2003), así como la inclusión de heteroátomos.

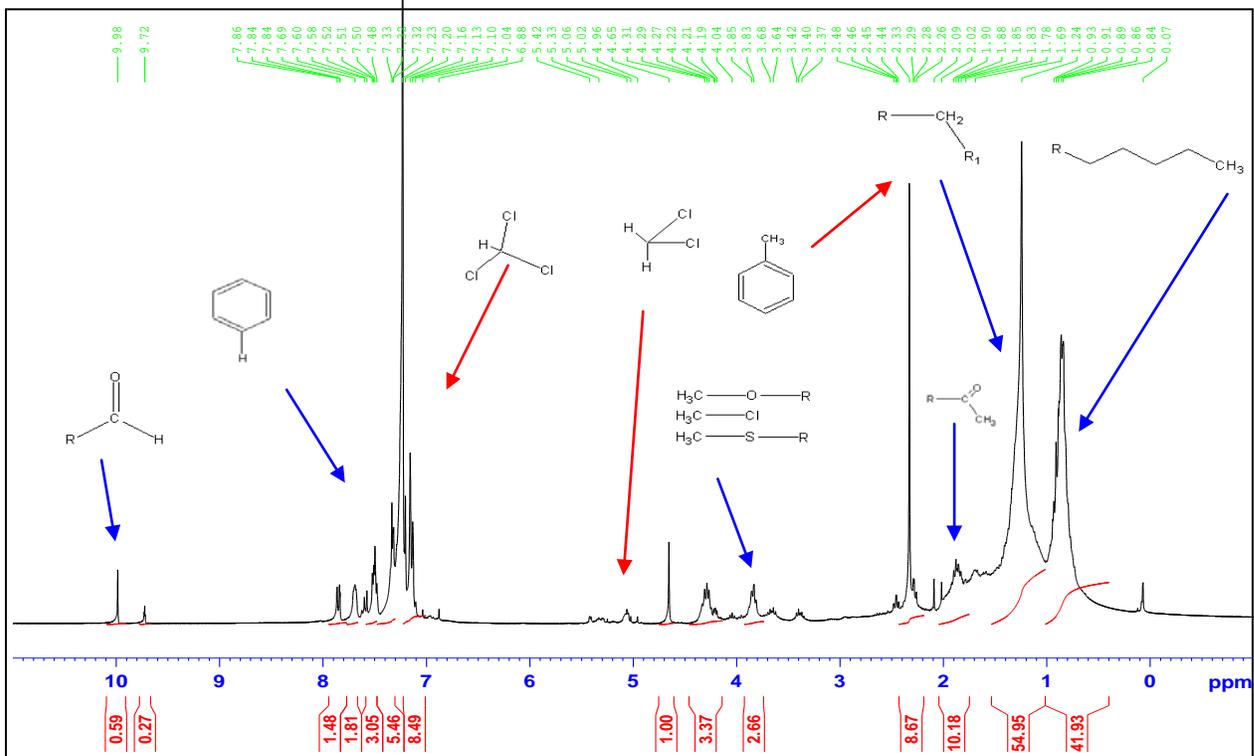


Figura 4.25. Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento con estiércol equino al último día de la experimentación.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

4.5.4.3.1.3 Tratamiento con humus líquido

De la comparación del espectro de la figura 4.26 con el obtenido a partir de la resinas del crudo (véase figura 4.8) no existen muchas diferencias ya se observan prácticamente las mismas estructuras presentes en el tratamiento control. Aparece una banda en 1,7 ppm indicativo de protones en β de cadenas alquílicas, producto de la degradación reductiva de ciertos microorganismos.

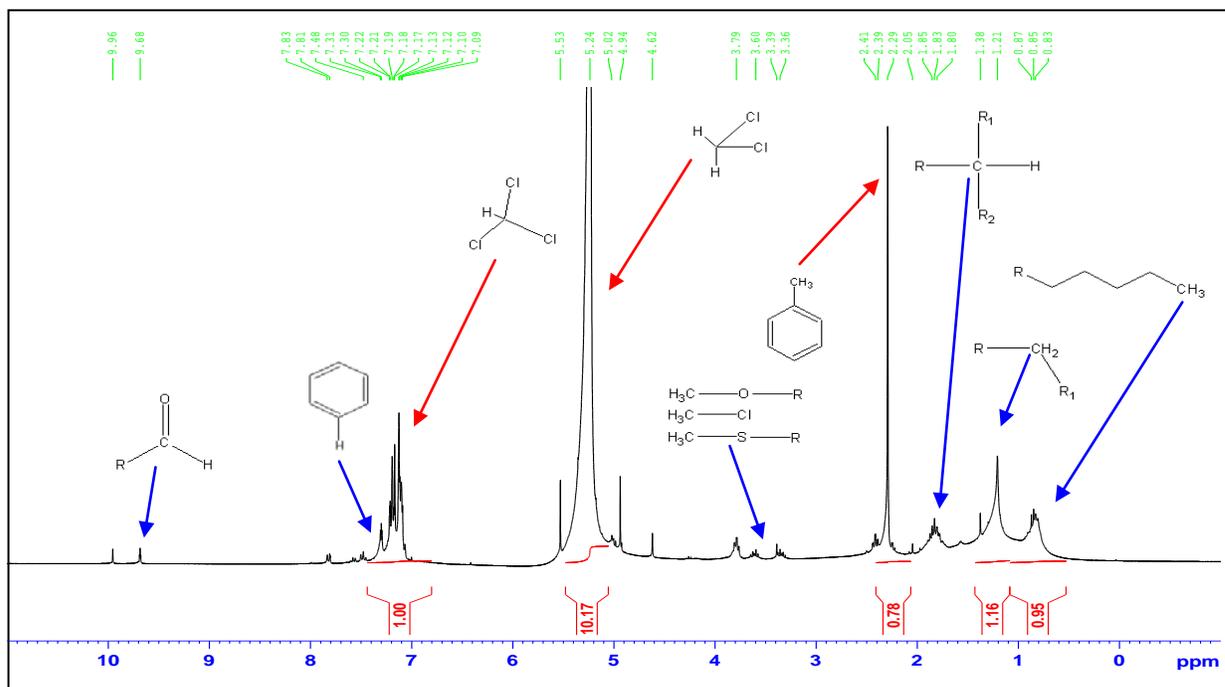


Figura 4.26. Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento con humus líquido al último día de la experimentación.

4.5.4.3.1.4 Tratamiento con Eisenia foétida

De la comparación del espectro de la figura 4.27 con el obtenido a partir de la resinas del crudo (véase figura 4.8) no existen muchas diferencias ya se observan prácticamente las mismas estructuras presentes en el tratamiento control y en las de humus líquido. Más en todos los tratamientos existe una reducción de los protones alifáticos de las resinas.

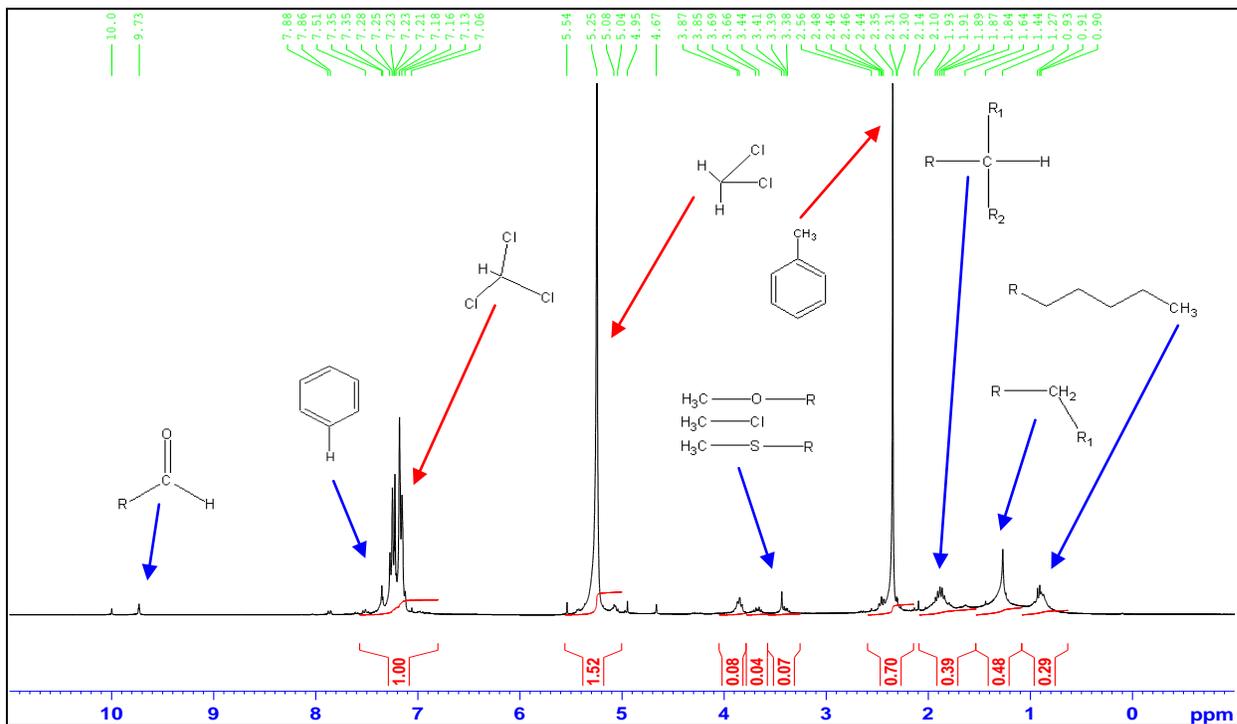


Figura 4.27. Espectro de resonancia magnética nuclear para las resinas extraídas del suelo con el tratamiento *Eisenia foetida* al último día de la experimentación.

4.5.4.4 Análisis de la fracción asfaltenos

El porcentaje inicial de asfaltenos presentes en los biorreactores es de $(4,3 \pm 0,8)$ % en la figura 4.28 se observan todos los cambios que sufrieron este tipo de hidrocarburos a lo largo del biotratamiento.

Puede notarse que esta fracción no presentó casi ningún cambio, salvo en el tratamiento con *Eisenia foetida* con un $(2,4 \pm 0,8)$ % al final del tratamiento y un $(3,6 \pm 0,8)$ % para los biorreactores con estiércol equino.

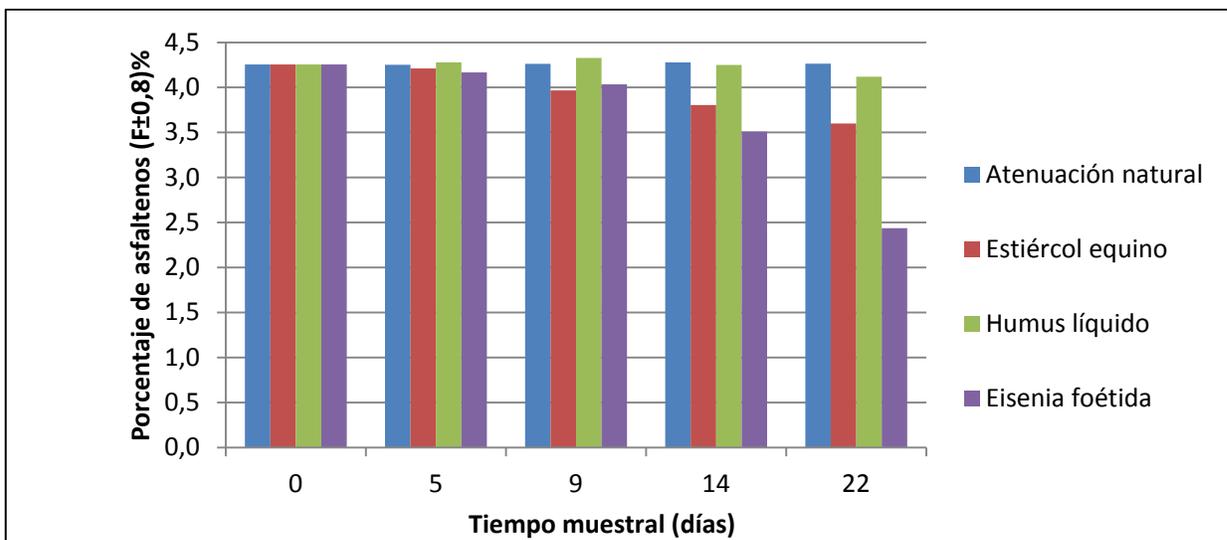


Figura 4.28: Porcentaje de fracciones de asfaltenos presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación.

Esto se debe principalmente a que los asfaltenos son fracciones recalcitrantes del crudo (Infante C., 2001) ya que son moléculas conjugadas muy complejas que pueden ser capaces de resistir la degradación, debido a que los microorganismos son selectivos a la hora de establecer un proceso de degradación. No obstante, se observa un decrecimiento de dicha fracción en los biorreactores que fueron tratados con lombrices, esto se debe principalmente a que las sustancias húmicas tienen un contenido bacteriano que es efectivo en la degradación de compuestos de alta masa molecular como los asfaltenos.

4.5.4.4.1 Análisis de los espectros de RMN-H para la fracción de asfaltenos a lo largo del biotratamiento.

4.5.4.4.1.1 Suelo patrón

A diferencia del espectro del asfalteno del crudo se observa presencia de heteroátomos (véase figura 4.29), ya que en el biorreactor posiblemente se establecieron condiciones de degradación aerobia que permitieron la inclusión de oxígeno, nitrógeno y azufre en la estructura del asfalteno (Álvarez y Guevara, 2003).

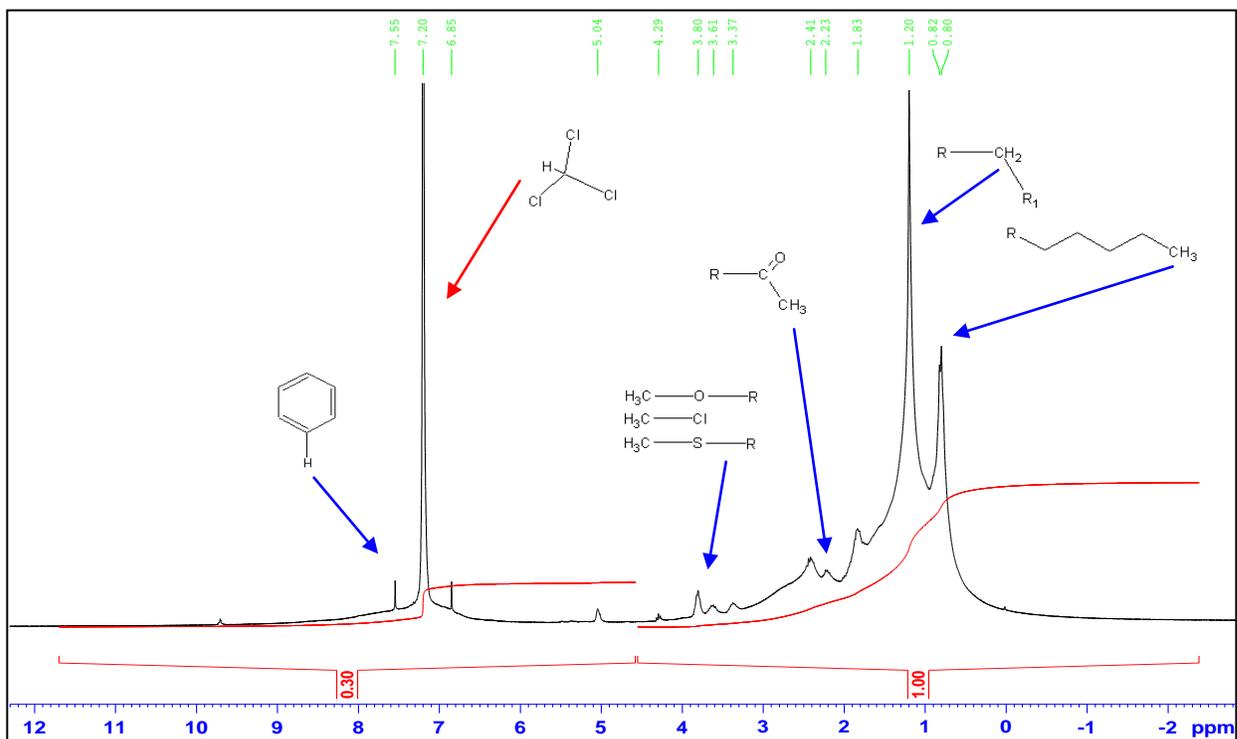


Figura 4.29. Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento control al último día de la experimentación.

4.5.4.4.1.2 Tratamiento con estiércol equino

El espectro obtenido del biorreactor con estiércol equino (véase figura 4.30), muestra también formación de heteroátomos que son producto de una degradación oxidativo por medio del oxígeno y nitrógeno que se incorporan al reactor. Esto se debe a que como se mencionó anteriormente el estiércol es una agregado del suelo que aumenta su porosidad lo que impide que se creen zonas anóxicas y por ende degradaciones reductivas.

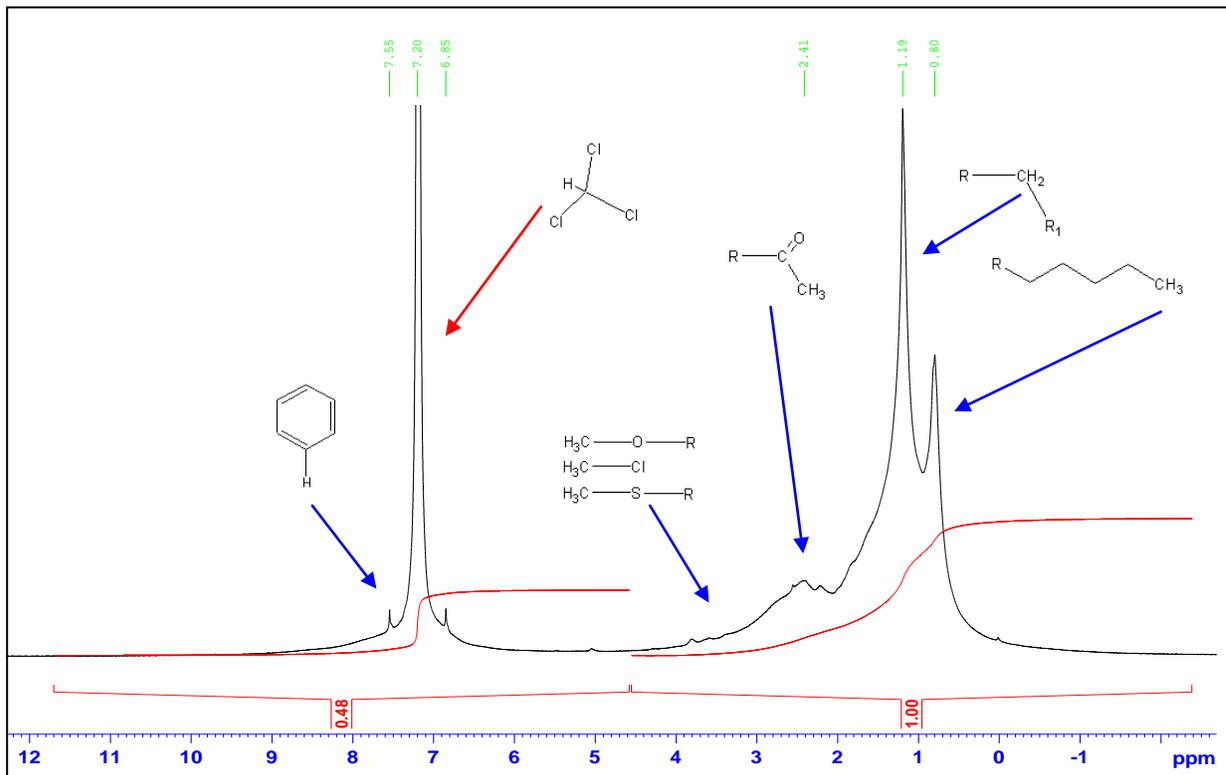


Figura 4.30. Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con estiércol equino al último día de la experimentación.

4.5.4.4.1.3 Tratamiento con humus líquido

En el espectro del biorreactor con humus líquido (véase figura 4.31), se observa la misma tendencia que el suelo control, lo que evidencia su comportamiento similar.

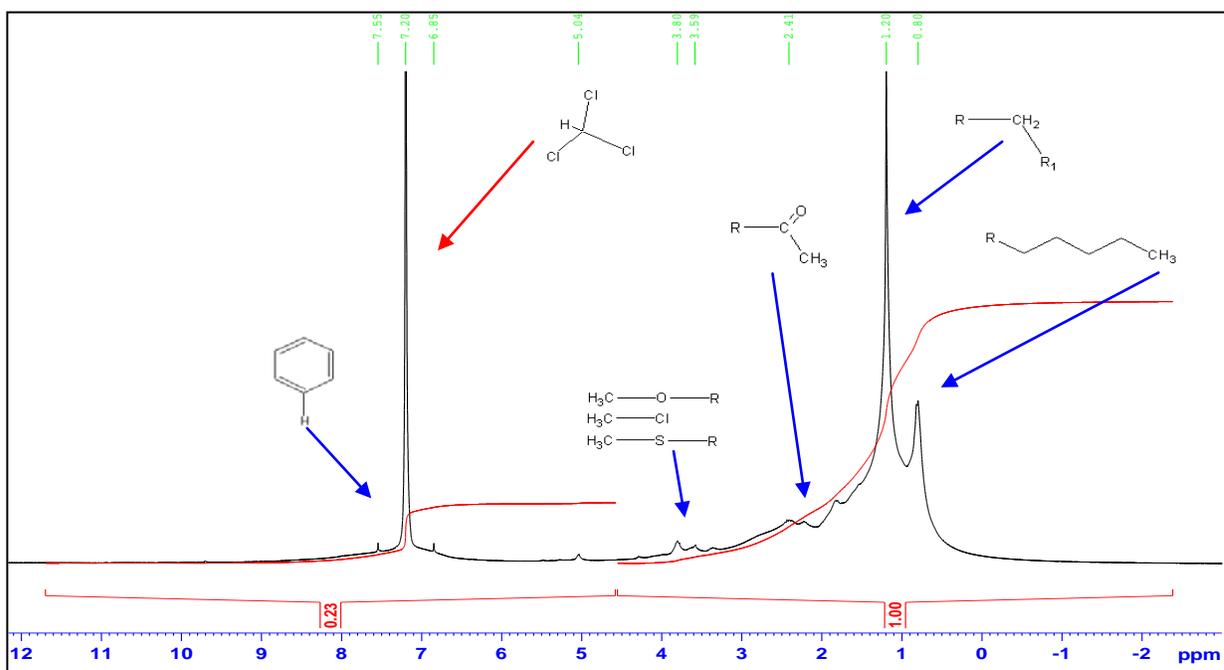


Figura 4.31. Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con humus líquido al último día de la experimentación.

4.5.4.4.1.4 Tratamiento con Eisenia foétida

En este tratamiento al igual que con el estiércol se observa la inclusión de heteroátomos a la estructura del asfalteno (véase figura 4.33). Ahora bien debe tenerse en consideración que dicho asfalteno cambió de coloración, como se muestra la figura 4.32.

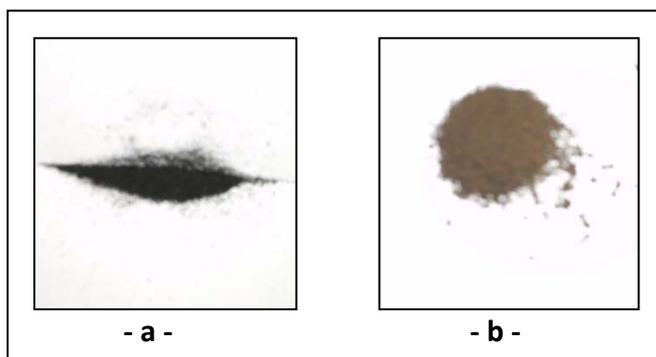


Figura 4.32: Aspecto físico de los asfaltenos obtenidos al finalizar los tratamientos. -a-) Del biorreactor control; -b-) Del biorreactor con la Eisenia foétida.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Los valores de frecuencia obtenidos para el tratamiento con los macroorganismos de la *Eisenia foétida* son menores a los demás tratamientos, lo que sugiere que existió la mayor degradación de protones alifáticos en esta fracción, seguida de la correspondiente al estiércol equino.

El hecho por el cual los asfaltenos cambiaron de coloración se debe principalmente a que al romperse los enlaces de la parte alifática del asfalto, que es más fácil de degradar por las bacterias, este va adquiriendo una estructura más aromática por lo cual existe mayor número de transiciones moleculares entre los orbitales del anillo bencénico estabilizado por resonancia, lo que origina que la luz visible que incide en ellos se absorba en mayor proporción lo que le atribuye como propiedad física una coloración marrón, es decir, se produjo un cambio en la estructura del asfalto producto de la degradación.

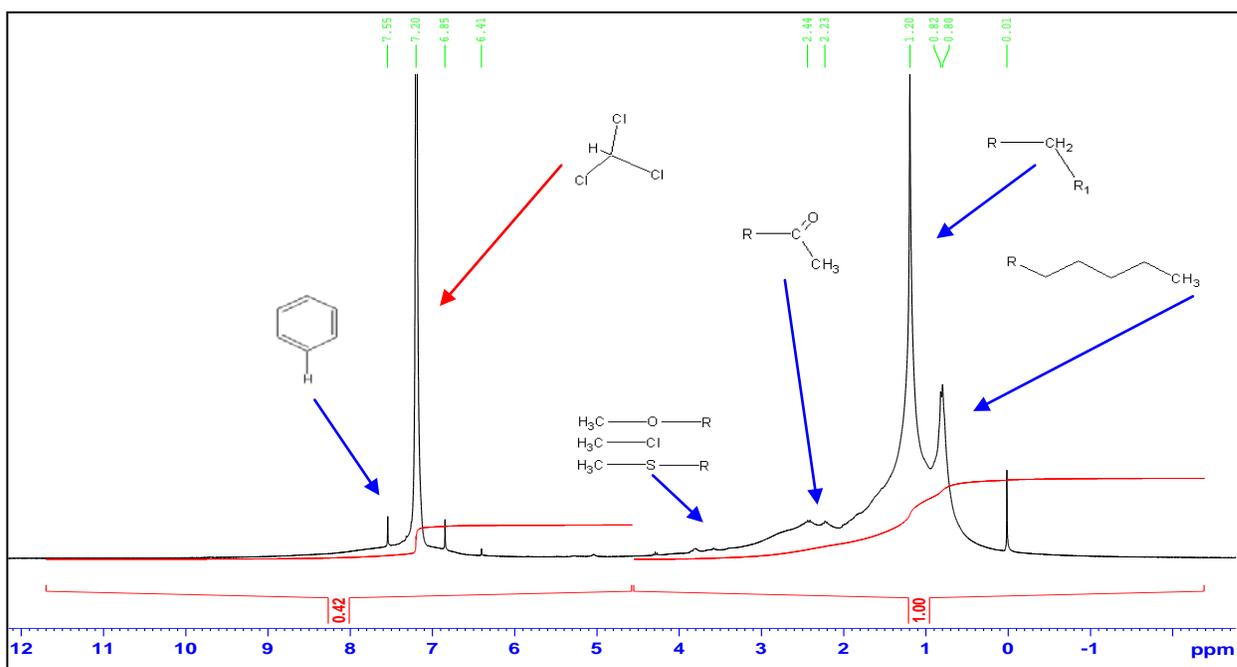


Figura 4.33. Espectro de resonancia magnética nuclear para los asfaltenos extraídos del suelo con el tratamiento con *Eisenia foétida* al último día de la experimentación.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

4.5.5 Análisis de potencial de acidez (pH)

Inicialmente el valor del potencial de acidez permanece en un rango ligeramente básico, muy cercano a la neutralidad, de $(7,35 \pm 0,01)$ adim ya que predomina el equilibrio representado por la reacción (IV-2). Los resultados del monitoreo de esta variable para cada tiempo muestral se evidencian en la figura 4.34.

El hecho por el cual el pH del suelo no varió de forma significativa (variaciones mayores a la unidad), se debe principalmente a que cuando se realizó la enmienda con carbonato de calcio este adquirió una capacidad reguladora y es capaz de resistir los cambios bruscos de potencial de acidez.

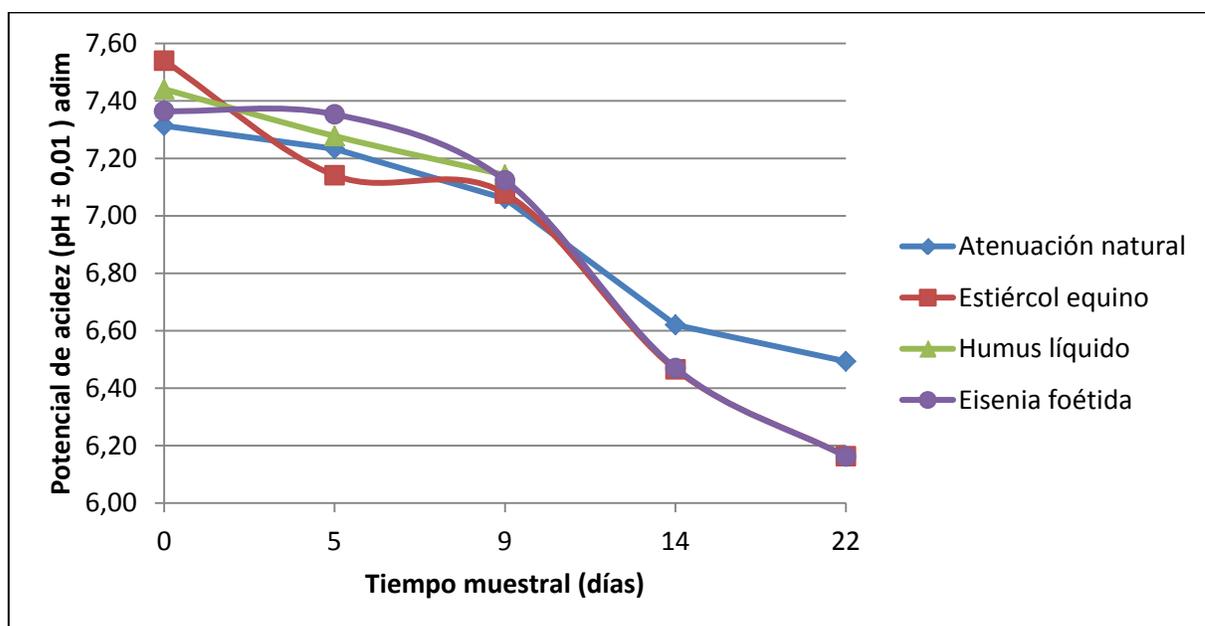


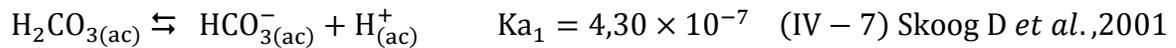
Figura 4.34: Potencial de acidez del suelo durante el proceso de biorremediación.

Esto se debe a que durante la mineralización de la materia orgánica se produce dióxido de carbono gaseoso que se absorbe en el agua contenida en los microporos del suelo según la siguiente reacción:



Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

El ácido carbónico producido se disocia según la siguiente reacción:



Los iones bicarbonatos se suman como un ión común al equilibrio representado por (IV-2) y el par conjugado ($[\text{CO}_3^{-2}]/[\text{HCO}_3^-]$) en cantidades apreciables, puede regular el pH manteniéndolo en valores cercanos a la neutralidad.

4.5.6 Análisis de otros factores abióticos

Aparte de las variables anteriormente analizadas, durante el proceso de biodegradación se manipularon los siguientes factores abióticos, los cuales si son controlados, ayudan a que se lleve a cabo de manera más exitosa el proceso de biorrecuperación de suelos.

4.5.6.1. Humedad relativa

La humedad relativa fue un parámetro que se controló durante el proceso de degradación del crudo, los valores obtenidos se muestran a continuación:

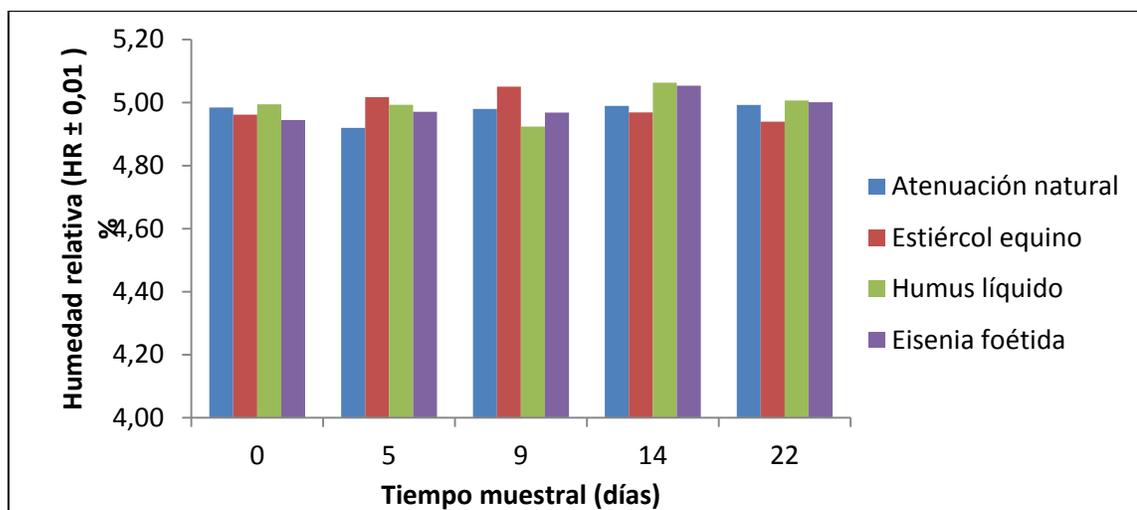


Figura 4.35: Humedad relativa presente en el suelo durante el proceso de biorremediación.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

La humedad relativa se mantuvo en aproximadamente un valor cercano al 5 %, lo cual significa que en los 20 g de suelo evaluado existe 1 g de agua. Ahora bien para saturar éstos 20 g de suelo se requieren aproximadamente 1,5 mL de agua (ya que la capacidad de saturación es de 15 mL por cada 200 g); no obstante según Infante C., 2001 la humedad debe mantenerse en aproximadamente 60 % de la capacidad de saturación, por lo que este valor corresponde precisamente a un valor de humedad relativa cercano al 5 %.

4.5.6.2. Temperatura

Este factor aunque no fue controlado como tal se mantuvo en valores aceptables, ya que Venezuela cuenta con un clima tropical en donde se mantiene temperaturas cálidas durante todo el año. En el transcurso del experimento se mantuvo un valor de temperatura promedio ($29,5 \pm 0,5$) °C ya que según Álvarez y Guevara, 2003 para que la actividad bacteriana sea adecuada los valores de temperatura deben oscilar entre (0 - 40) °C.

4.5.4.3. Aireación

Este parámetro fue controlado de manera periódica ya que la aireación asegura que se lleve a cabo la mejor oxidación de los compuestos presentes en el suelo contaminado, debido a la incorporación de oxígeno. Mas sin embargo debe tenerse en consideración que el oxígeno molecular puede agotarse creando zonas anóxicas y generando una degradación de tipo reductivo tal como lo señala Álvarez y Guevara, 2003.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Debido a la gran variabilidad que presentan los suelos, la estadística siempre esta presente en este tipo de estudios para garantizar que los resultados sean representativos y así poder concluir acerca del estado del suelo (García. A, 1994) citado por (González y Tompson, 2007).

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Como se requieren comparar los diversos tratamientos que se aplican (bioestimulando el suelo con estiércol equino, humus líquido y con la Eisenia foétida), para lo cual se toma como factor de interés los tratamientos y como factor de bloques a los diversos tiempos muestrales dentro de los cuales se realiza el seguimiento de las técnicas evaluadas. La necesidad de contar con un material homogéneo para llevar a cabo este tipo de diseño experimental se asegura en vista a que se seleccionó una muestra de suelo compuesta al azar considerando varios zonas puntuales de muestreo dentro del biorreactor, Volké T., 2005.

En un diseño en bloques completos al azar (Araujo I *et al.*, 2006) se consideran tres fuentes de variabilidad: el factor de tratamientos, el factor de bloques, y el error experimental (Pulido y De la Vara, 2004). En este caso la aleatorización se establece dentro de cada bloque, ya que no tiene sentido común el seleccionar al azar el orden de los días para tomar las muestras, ya que es imposible retroceder en el tiempo. Para cada tratamiento se estableció un mismo número de unidades experimentales de tres réplicas, esto es debido a que se esperaba que hubiese una diferencia significativa entre los tratamientos efectuados ya que los mismos fueron corridos bajo las mismas condiciones lo que disminuye su error aleatorio; mientras que el tratamiento control solo se corrió una vez porque los resultados de las variables de respuesta en él, se usan solo como un patrón de referencia (Infante C., 2001). Además considerando el costo y el tiempo de experimentación global se tomó un número impar de réplicas tal como lo sugieren Pulido y De la Vara 2006.

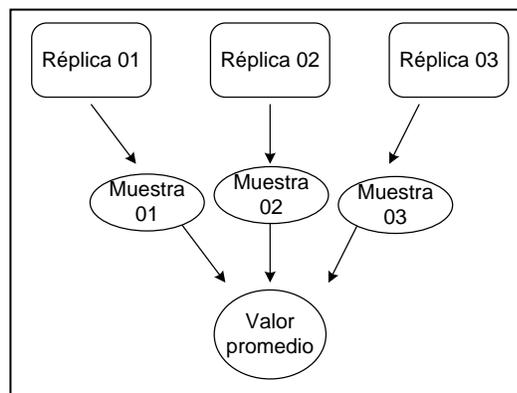


Figura 4.36: Diseño experimental para hallar el valor promedio de cierta variable de salida en los biorreactores.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Todos los cálculos estadísticos involucrados se ejecutaron empleando el Software Statistix 8.0, esto para darle mayor confiabilidad a los resultados obtenidos del procesamiento de las diversas variables de salida. Siendo el Statistix 8.0 una herramienta fácil de manejar y comúnmente utilizada en el área de suelos, la cual se usó para obtener los resultados del análisis de varianza con dos criterios de clasificación (ANOVA TWO-WAY), probar sus supuestos, y lograr la comparación de las diversas técnicas aplicadas en conjunto y en función del tratamiento control.

TABLA 4.10
COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE SIGNIFICANCIA CALCULADA Y PREDEFINIDA
PARA LAS DIVERSAS VARIABLES DE SALIDA DETERMINADAS

Variable de salida	Significancia calculada ($p \pm 0,0001$) _{adim}	Análisis estadístico
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	0,0191	Existe diferencia significativa entre los resultados
Carga bacteriana (UFC)	0,0224	
Fracción saturados (% S _{AT})	0,0042	
Fracción resinas (% R _{ES})	0,0424	
Humedad relativa (%H _R)	0,8754	No existe diferencia significativa entre los resultados
Potencial de acidez (pH)	0,7381	
Fracción aromáticos (% A _{RO})	0,0561	
Fracción asfaltenos (% A _{SF})	0,0563	

Siguiendo el método sugerido por Pulido y De la Vara 2006, los resultados del análisis de varianza fueron probados en función del nivel de significancia encontrado en cada tratamiento. Siendo la significancia el riesgo máximo que el experimentador esta dispuesto a correr, de rechazar la hipótesis nula siendo verdadera (error tipo I), fijando un valor de significancia predefinida de $\alpha = 0,05$ (Schaefer M *et al.*, 2006) para comparar los resultados del valor de p (p-value) o significancia observada, la cual representa el área bajo la distribución F, más allá del valor del estadístico de prueba F_0 . En la siguiente tabla se encuentran los valores de p

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

calculados mediante el programa Statistix 8.0 (véase apéndice D) para cada variable de salida medida por tratamiento para los tiempos muestrales establecidos.

En la tabla 4.10 se concluye que las variables en las cuales se produjeron resultados estadísticamente diferentes son los hidrocarburos totales de petróleo, la carga bacteriana y las fracciones de saturados y resinas, los demás resultados solo expresan una tendencia.

Por otro lado el porcentaje de humedad relativa por ser un parámetro de control, se justifica el hecho de no obtener variaciones significativas entre los tratamientos, ya que lo que indica es que no hubo variabilidad en la humedad presente en el suelo durante el tratamiento, lo que garantiza que se mantenga como un valor constante que no incide directamente en el error aleatorio de los demás variables.

Por otra parte las fracciones asfaltenos, se consideran recalcitrantes (Infante C., 2001), al igual que los aromáticos policíclicos (Canals V., 2005), lo que puede inferir en que los resultados que se obtengan de dichas fracciones sean no significativos. Mientras que al realizar el encalado del suelo con la adición de carbonato de calcio, el suelo adquiere una capacidad reguladora (Casanova E., 2005) que lo protege de variaciones bruscas en el potencial de acidez, hecho por el cual se mantuvo el pH en valores cercanos a la neutralidad para cada tratamiento.

Es importante destacar que en la tabla del análisis de varianza se detalla el valor de la eficiencia relativa del diseño en bloques completos al azar: relative efficiency (RCB), el cual es un parámetro estadístico que indica cuan eficiente resultó la aplicación de diseño en bloques con respecto a totalmente aleatorizado, es decir, la influencia del factor de bloques dentro del análisis de varianza realizado. Y el valor del coeficiente de variación (CV), el cual proporciona una idea de la heterogeneidad del suelo según Carrasquero, 1999. Es sabido que la utilidad del diseño experimental esta muy restringida en los experimentos de campo, debido a la poca homogeneidad del suelo, lo que se traduce en coeficientes de variación elevados. En la tabla 4.11 se resumen los valores obtenidos de estos parámetros.

TABLA 4.11
PÁRAMETROS DE EFICIENCIA DEL DISEÑO EN BLOQUES COMPLETOS AL AZAR
PARA CADA VARIABLE DE SALIDA DETERMINADA

Variable de salida	Eficiencia relativa del modelo (E ± 0,01)%	Coeficiente de variación (CV ± 0,01)%
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	2,24	9,73
Carga bacteriana (UFC)	1,94	8,81
Fracción saturados (% S _{AT})	2,38	16,08
Fracción resinas (% R _{ES})	1,94	15,38
Humedad relativa (%H _R)	0,92	0,88
Potencial de acidez (pH)	14,52	14,52
Fracción aromáticos (% A _{RO})	1,49	7,04
Fracción asfaltenos (% A _{SF})	1,38	10,16

En la tabla 4.11 se puede evidenciar que la mayoría de las eficiencias del modelo son mayores a la unidad, lo que se traduce en decir que el diseño en bloques es más preciso que el completamente aleatorizado para el caso bajo estudio. Además estos valores proporcionan una garantía de que se deben controlar como factores de bloques a los tiempos muestrales en el seguimiento de un proceso de biorremediación para poder comparar los resultados obtenidos de manera más eficiente, es decir, existen diferencias entre los tiempos muestrales para cada una de las variables de salida monitoreadas. No obstante debe tenerse en cuenta que el objetivo del diseño no es comparar los factores de bloque ya que su control dentro del análisis solo se hace para lograr una comparación más justa y precisa de los tratamientos aplicados. (Pulido y De la Vara, 2004).

Con respecto a los valores de los coeficientes de variación, se consideran excelentes si se comparan con los obtenidos por González y Tompson 2007, cercanos al 10 % y los obtenidos por

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Carrasquero 1999, cercanos al 30 %, lo que infiere que las muestras analizadas son homogéneas.

Para autentificar los resultados arrojados por el análisis de varianza (ANOVA), se deben cumplir los tres supuestos básicos que implica el modelo, los cuales son:

- Supuesto de Normalidad: Las variables de salida siguen una distribución normal, que se estima por medio de la prueba de Shapiro-Wilk, donde el valor de la significancia calculada (p-value) debe ser mayor que el nivel de significancia predefinida.
- Supuesto de homogeneidad de varianzas: Cuando los tratamientos tienen igual varianza. Se realizó mediante la forma gráfica que adoptan los residuos del análisis de varianza en función de los valores fijos
- Supuesto de independencia: se garantiza por que se realizó la medición de las diversas variables de salida en forma aleatoria. (Martínez Y., 2005).

En el apéndice D puede observarse las diversas representaciones gráficas para la prueba de los supuestos del análisis de varianza, en el caso del supuesto de homogeneidad de varianzas, si los puntos de la gráfica de residuos se distribuyen aleatoriamente en una banda horizontal (sin ningún patrón claro y contundente), entonces es señal de que se cumple el supuesto de que los tratamientos tienen igual varianza. Pulido y De la Vara, 2004. Razón por la cual se puede decir que las variables determinadas en cada biorreactor cumplen el supuesto de varianza constante (véase apéndice D)

Para comprobar el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro- Wilk, se obtiene el valor p de cada variable, los cuales se resumen en la tabla 4.12.

TABLA 4.12

VALORES DE LA SIGNIFICANCIA CALCULADA EN LA VERIFICACIÓN DEL SUPUESTO DE NORMALIDAD MEDIANTE LA PRUEBA DE SHAPIRO-WILK

Variable de salida	Significancia calculada ($p \pm 0,0001$) _{adim}	Análisis estadístico
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	0,8559	Se cumple el supuesto de normalidad
Potencial de acidez (pH)	0,8660	
Fracción saturados (% S _{AT})	0,6141	
Fracción resinas (% R _{ES})	0,9043	
Humedad relativa (%H _R)	0,8259	
Fracción asfaltenos (% A _{SF})	0,3821	No se cumple el supuesto de normalidad
Fracción aromáticos (% A _{RO})	0,1419	
Carga bacteriana (UFC)	0,2106	

No obstante, de forma gráfica también es posible determinar el supuesto de normalidad, mediante la curva de probabilidad normal (*normal probability plot*) mostrada en los apéndices, en donde si la tendencia seguida por los residuos es una línea recta, entonces el supuesto de normalidad está garantizado. Pulido y De la Vara, 2004. Sin embargo, analíticamente es posible hacer dicha determinación por la prueba de Shapiro-Wilk en donde se obtiene un valor de significancia que debe ser mayor a la de la significancia predefinida. El hecho de que existan para algunas variables como la carga bacteriana y las fracciones de aromáticos y asfaltenos incompatibilidades con respecto al supuesto de normalidad, indican que los valores obtenidos por el análisis no son significativos, más sin embargo debe tenerse en consideración que el ajuste de puntos en una recta no tiene que ser perfecto, dado que el análisis de varianza resiste pequeñas y moderadas desviaciones al supuesto de normalidad. Pulido y De la Vara 2004.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

Ahora bien, en el análisis estadístico obtenido anteriormente se refleja que alguna de las variables determinadas son significativamente diferentes, por lo tanto se recurre a la prueba de Tukey (HSD) para determinar cuales variables son distintas y en que tratamiento, por ejemplo si en dos biorreactores de distintos tratamientos se obtienen valores HTP estadísticamente iguales a ambos se les asigna una misma letra, mientras que si son diferentes se les asignan letras distintas para realizar la comparación efectiva.

De la prueba de Tukey se concluye que los valores de HTP, carga bacteriana mesófila, porcentaje de saturados y resinas para el tratamiento con la Eisenia foétida son distintas con respecto al tratamiento patrón; además este último es igual al tratamiento con humus líquido. Para el potencial de acidez, la humedad relativa y la fracción de aromáticos y asfaltenos la prueba de Tukey no arroja ninguna diferencia significativa en cada tratamiento. (véase apéndice D).

No obstante, para el caso bajo estudio uno de los tratamientos a comparar constituye un tratamiento control, es decir, un biorreactor al cual no se le adicionó ningún tipo de bioestimulante para acelerar el proceso de degradación del crudo, por lo que se hace necesaria la comparación de cada tratamiento adicional con respecto al tratamiento control. Para realizar esta demanda es necesario aplicar el método de Dunnett, en el cual se compara si hubo o no diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control, para ello se halla el valor crítico de comparación de Dunnett y si el valor calculado por tratamiento es mayor al valor crítico entonces se rechaza la hipótesis nula (Pulido y De la Vara, 2004).

Para los valores de HTP, fracción de saturados, aromáticos y resinas se comprueba la diferencia significativa del biorreactor con Eisenia foétida sobre el control, para la carga bacteriana mesófila existe diferencia significativa, entre el control y los biorreactores con estiércol equino e Eisenia foétida, más para el humus líquido se comporta igual al tratamiento control.

4.7 ANÁLISIS ECONÓMICO

La selección de la técnica más factible de aplicar desde el punto de vista económico, tiene mucho que ver con el costo de los agentes bioestimulantes empleados (véase tabla 4.13).

TABLA 4.13
COSTOS RELATIVOS DE LOS BIOESTIMULANTES EMPLEADOS EN LOS TRATAMIENTOS
DURANTE EL PROCESO DE DEGRADACIÓN

Descripción	Costo relativo
Estiércol equino maduro	0,13 Bs.F/kg
Humus líquido de lombriz	0,35 Bs.F/kg
Especímenes de Eisenia foétida	0,10 Bs.F/unidad

Fuente: Agrotendencia (2007).

De la tabla 4.13, se puede establecer que los costos de los agentes bioestimulantes no son muy distintos entre sí. No obstante, por simple inspección se podría decir que el tratamiento con estiércol es el más económico, ya que el humus es un poco más costoso que este, y como el tratamiento con los macroorganismos de Eisenia foétida requiere además la adición de estiércol, este último sería el más costoso de todos. No obstante del análisis económico realizado (véase apéndice E), se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 4.14

Todos los tratamientos mostraron un balance positivo con respecto a la relación costo-beneficio, ya que con respecto a la técnica de relleno sanitario propuesta por (De Sousa y Domínguez, 2002), las técnicas de biorremediación evaluadas resultan económicamente factibles obteniéndose aproximadamente un 10 % de ganancias netas.

TABLA 4.14
RELACIÓN COSTO-BENEFICIO Y TIEMPO DE RECUPERACIÓN DE LA INVERSIÓN
PARA LAS ALTERNATIVAS EVALUADAS

Tratamiento	Relación costo/beneficio ($T_R \pm 0,2$) %	Tiempo de recuperación de la inversión ($t_{RI} \pm 1$) días
Estiércol equino maduro	110,6	14
Humus líquido de lombriz	110,6	14
Especímenes de Eisenia foétida	109,8	14

Este hecho lo corroboran Álvarez y Guevara, 2003 al sugerir que las técnicas de biorremediación son mucho más económicas que las demás técnicas de saneamiento existentes. Sin embargo, para establecer una comparación mucho más justa que permita decidir que técnica usar se determinó el tiempo de recuperación de la inversión, la cual arrojó un mismo valor para todos los tratamientos.

En vista que el tratamiento aplicado duró tan solo veintidós días, no se hace necesario que se tenga que comparar el valor actual de cada tratamiento para lograr una conclusión no sesgada, ya que en un período de tiempo tan pequeño no existen, por lo general, variaciones significativas de las tasas de interés (depreciación, inflación, entre otros).

El tratamiento con la Eisenia foétida fue en el que se obtuvo mayor degradación de crudo y como en todos los tratamientos se recupera la inversión a los catorce días es recomendable aplicar este tipo de tratamiento, ya que se obtienen resultados satisfactorios a razón del mismo costo de otros tratamientos que no resultaron ser tan efectivos en la remoción de los contaminantes presentes en el suelo.

Conclusiones y recomendaciones

CONCLUSIONES

1. Durante los tratamientos aplicados se monitorearon las variables: Hidrocarburos totales de petróleo (HTP), caracterización de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), porcentaje de humedad relativa (% H_R), potencial de acidez (pH), conteo de aerobios mesófilos (UFC), cromatografía de gases saturados (CG-S) y espectros de RMN-1H a resinas y asfaltenos.
2. El suelo virgen utilizado era de textura franco-arenosa y presenta problemas de baja cantidad de nutrientes y un alto contenido de acidez.
3. Se verifica que la aplicación de carbonato de calcio al suelo permite reducir los contenidos de aluminio intercambiable y neutralizar su acidez, otorgándole una capacidad reguladora de pH.
4. La lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*) es un macroorganismo capaz de sobrevivir y tolerar un medio tóxico con condiciones adversas cercano a $(5,58 \pm 0,02)$ % de HTP en la cual la temperatura no representa un factor importante para su desarrollo y sobrevivencia.
5. La caracterización del crudo indica que el mismo corresponde a un crudo mediano con un $(4,3 \pm 0,8)$ % de asfaltenos, $(29,8 \pm 0,8)$ % de saturados, $(32,8 \pm 0,8)$ % de aromáticos y $(32,9 \pm 0,8)$ % de resinas.
6. La caracterización del estiércol equino indica que este posee un buen contenido de macronutrientes; mientras que el humus líquido presentaba un déficit de los mismos, por lo tanto las relaciones de nutrientes en los biorreactores con estiércol equino y *Eisenia foétida* al inicio del tratamiento son favorables, a diferencia de la del biorreactor con humus líquido.

Conclusiones y recomendaciones

7. Los HTP disminuyeron en $(8,50 \pm 0,02)$ % al final del tratamiento para el control, un $(37,72 \pm 0,02)$ % para el estiércol equino, $(16,36 \pm 0,02)$ % para el humus líquido y $(54,48 \pm 0,02)$ % para el tratamiento con Eisenia foétida, desarrollándose una máxima carga bacteriana mesófila en el tratamiento control de $(1,20 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g, $(2,30 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g para el estiércol equino, $(6,30 \pm 0,01) \times 10^6$ UFC/g para el humus líquido y $(1,80 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g para el tratamiento con Eisenia foétida.

8. La fracción de hidrocarburos saturados bajó de $(29,8 \pm 0,8)$ % a $(7,2 \pm 0,8)$ % en los tratamientos de Eisenia foétida y a $(12,3 \pm 0,8)$ % con el estiércol equino; mientras que en el tratamiento control y de humus líquido no hubo variación significativa.

9. La fracción de resinas aumentó de $(33,0 \pm 0,8)$ % a $(66,7 \pm 0,8)$ % en los tratamientos con Eisenia foétida y a $(60,4 \pm 0,8)$ % con el estiércol equino; mientras que las fracciones de aromáticos y asfaltenos no variaron significativamente en ningún tratamiento.

10. El potencial de acidez y el porcentaje de humedad en los biorreactores durante el tratamiento, no sufrieron cambios significativos, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

11. Se obtuvieron resultados significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$) en la fracción saturada y de resinas del crudo presente en el suelo para los biorreactores con el tratamiento de Eisenia foétida y estiércol equino; a diferencia de la fracción aromática y de asfaltenos. No obstante se verificó la inclusión de heteroátomos dentro de la estructura del asfalteno al final del tratamiento.

12. En la prueba de Dunnett no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con humus líquido y el control, mientras que para los demás tratamientos si hubo diferencia significativa ($p < 0,05$).

13. Al evaluar económicamente las técnicas aplicadas los valores de la tasa de rentabilidad fueron casi iguales, y se obtuvo el mismo tiempo de recuperación de la inversión en todos los tratamientos.

Conclusiones y recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Ofrecer las condiciones primordiales y básicas necesarias en la alimentación de las lombrices (sustrato) garantiza en gran parte la sobrevivencia de la Eisenia foétida.
2. Disponer de los medios necesarios para determinar como variable de interés la producción de dióxido de carbono por los organismos del suelo y el seguimiento del contenido de nutrientes en cada biorreactor.
3. Realizar la corrida cromatográfica de patrones saturados de interés, como fitano, pristano, con el fin de poder evaluar cuantitativamente la degradación de esta fracción.
4. Realizar las separaciones SARA por triplicado de manera tal de disminuir el alto error que se le asocia a esta técnica gravimétrica.
5. Al realizar los espectros de RMN-1H se debe emplear un solvente deuterizado o tetracloruro de carbono bidestilado como mínimo.
6. Realizar cromatografías de gases acoplada a un detector de masas a las fracciones aromáticas obtenidas para evaluar su comportamiento.
7. Expandir un poco más el tiempo del proceso de biorremediación para estudiar la posible reproducción de las lombrices en el suelo contaminado.
8. Realizar una caracterización del suelo al final del tratamiento para conocer más a fondo la dinámica de las sales minerales y la retención de nutrientes que se pueda llevar a cabo.

Referencias bibliográficas

BIBLIOGRAFÍA

1. AGROFORESTAL SAN REMO (2004). Página web en línea. Disponible en: <http://www.agroforestalsanremo.com/lombricultivos.htm>. [Consulta: 2007, Octubre 25].
2. AGROINFORMACIÓN (2005). **“Triángulo textural”** [Documento en línea]. Disponible en: www.agroinformacion.com/.../Suelos/image003.gif. [Consulta: 2007, Diciembre 26].
3. AGROTENDENCIAS (2007) Revista XLI. **“Agentes Bioestimulantes”**. Costos. Documento en línea. Disponible en: <http://www.agrotendencias.net.ve/bio/fertilizantes/costos.html>. [Consulta: 2007, Noviembre 15].
4. ÁLVAREZ, J. A, Nuñez C. Ana, Díaz Miguel A. (2004). **“Biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos”**. Centro de Investigaciones del Petróleo. La Habana. Cuba.
5. ÁLVAREZ, P y Guevara, E. (2003). **“Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas”** Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UC) de la Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.
6. ANÁLISIS COSTO-BENEFICIO. Instituto Nacional de Informática y Estadística. Lima. Perú. Enero de 1996 [Documento en línea] Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/web/metodologias/attach/lib604/3-6.htm> [Consulta: 2008, Enero 20].
7. ARAUJO, Ismenia. Montilla M. Cárdenas C. Herrera L. Angulo N y Morillo G (2006). **“Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos”**. Asociación Interciencia Caracas. Venezuela.
8. BACTERIA. (2007). La Enciclopedia Libre. **Ingeniería Ambiental. Bacteria** documento en línea disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>. [Consulta: 2007, Octubre 18]
9. BERNYS, J (2006) **“Evaluación de los tratamientos de suelos contaminados con crudo empleando el proceso de biorremediación en la localidad de Yaracal, estado Falcón”**. Trabajo Especial de Grado no publicado. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.
10. BROWN, T. LeMay H. Bursten E y Burdge J (2004). **“Química, la ciencia central”**. Novena edición. México D.F. Pearson. Prentice Hall.
11. CALLAHAM, A Mac. Stewart A. Alarcón C. McMillen S. (2002). **“Efectos de la incorporación de la lombriz de tierra (*Eisenia foétida*) y de la paja de trigo (*Triticum aestivum*)”**

Referencias bibliográficas

sobre propiedades seleccionadas de los suelos contaminados con petróleo. División de ciencias ambientales". Laboratorio Nacional de Oak Ridge. Tennessee. USA.

12. CANALS, Viñas Marc (2005) *"Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica"*. Tesis Doctoral publicada. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de microbiología. Barcelona. España.

13. CARBOGNANI, L., y Espidel, Y. (1997) *"Separación y caracterización preliminar de grupos de hidrocarburos neutros, ácidos, básicos y anfotéricos provenientes de crudos de la faja petrolífera del Orinoco"*. Trabajo de ascenso publicado. Universidad Simón Bolívar. Caracas Venezuela.

14. CARRASQUERO, A. (1999). *"Determinación de los procesos químicos asociados a la contaminación con cadmio en las almendras de cacao. Ocumare de la costa. Estado Aragua"*. Tesis doctoral, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado en ciencias del suelo.

15. CASANOVA, Eduardo (2005) *"Introducción a la ciencia del suelo"*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV) de la Universidad central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

16. CLARK, R. C. y D. W. Brown. (1977). *"Petróleo: Propiedades y análisis en sistemas bióticos y abióticos"* Academic Press Inc. London

17. CRECIMIENTO BACTERIANO. (2007). **Ingeniería Ambiental. Crecimiento bacteriano** documento en línea disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Crecimientobacteriano>. [Consulta: 2007, Octubre 18]

18. DELGADO José G. (2006). *"Asfaltenos: composición, agregación y precipitación"*. Laboratorio de formulación, interfases y reología de procesos. Trabajo publicado. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

19. DE PERDOMO Y, González M. De Gudiño M (2002). *"Manual de laboratorio de química general"*. Departamento de Química. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.

Referencias bibliográficas

20. DE SOUSA, Lucibeth y Domínguez María Elena (2002) ***“Evaluación del tratamiento de los suelos contaminados con fuel-oil empleando el proceso de biorremediación en un complejo termoeléctrico”*** Trabajo especial de grado no publicado, Universidad de Carabobo. Valencia-Venezuela.
21. ENCICLOPEDIA DEL PLANETA TIERRA. (2007) Página Web en línea. Disponible en http://www.encyclopedia-sm.com/dkeng/clipart/earth/image_earth012.htm [Consulta: 2007, Agosto 21].
22. FERRUZZI Carlo (1994). ***“Manual de lombricultura”***. Ediciones MUNDI- PRENSA. Madrid. España.
23. GACETA OFICIAL EXTRAORDINARIA. Año CXXV- Mes X. Nº 5245 Extraordinario. Decreto Nº 2635.
24. GALLEGO P. Cuéllar R. Dussán J (2005). ***“Biorremediación de residuos de petróleo”***. Documento en línea. Disponible en: <http://www.mindefensa.gov.co/derecho/mea01gua.html> [Consulta: 2008, Enero 16].
25. GARCÍA, A (1994). ***“Contaminación de suelos por metales pesados”***. Curso dictado en la UCV. Facultad de Agronomía. Maracay.
26. GONZÁLEZ C, y Thompson Y, (2007) ***“Determinación del contenido de cadmio en función del tamaño de las partículas de un suelo de la cuenca del lago de valencia”*** Trabajo especial de grado no publicado, Universidad de Carabobo. Valencia- Venezuela.
27. GONZÁLEZ, J y González (2006) ***“Evaluación de la aplicación de un tratamiento biológico a los efluentes generados en la actividad productiva de la empresa Sercongas, c.a.”*** Trabajo especial de grado no publicado, Universidad de Carabobo. Valencia- Venezuela.
28. GOOGLE EARTH (2008). Centro satelital de imágenes fijas. [Consulta, Enero 25].
29. HIMMELBLAU D. (1988). ***“Balances de materia y energía”***. Cuarta edición. Prentice Hall. México DF.
30. HOWE-GRANT, M. (1996). ***“Petróleo. Enciclopedia de química Tecnológica”*** Cuarta edición. Wiley Inerscience Publication. New York.
31. INFANTE, Carmen (2001). ***“Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de intebios® y biorize®”***. Asociación Interciencia. Caracas-Venezuela.

Referencias bibliográficas

32. INFOAGRO. Introducción a la lombricultura (2005). Documento en línea. Disponible en: <http://www.infoagro.com/abonos/lombricultura.asp>. [Consulta: 2007, Octubre 01].
33. LAGREGA, M. Buckingham P. Evans J. (2002). ***"Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos"*** Volumen II. Editorial Mc.Graw Hill, Madrid.
34. LEGALL J. Dicoyskiy L y Valenzuela Z. (2000). ***"Manual básico de lombricultura en climas tropicales"***. Estelí. Nicaragua.
35. LEVIN, M. Gealt, M. (1997). ***"Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos"***. 1ª Edición. Editorial Mc.Graw Hill, Madrid.
36. LITTLE T.M y Hill F.J (1979). ***"Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura"***. México. Editorial Trillas.
37. MARTÍNEZ A, M. y Gaju, N. (2005). ***"El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo"*** Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. Documento en línea disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/122.pdf> [Consulta: 2007, Agosto 29].
38. MARTÍNEZ, Y. (2005). ***"Fraccionamiento de metales pesados en suelos tratados con diferentes dosis de un lodo residual y biodisponibilidad en un cultivo"***. Tesis doctoral sin publicación. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, Postgrado en ciencias del suelo.
39. MÉNDEZ L. Briceño L. (2006) ***"Comparación del potencial biodegradativo de técnicas de biorremediación"***. Trabajo especial de grado no publicado. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.
40. NORMA ASTM D2216 (1998). ***"Determinación del Contenido de Humedad"***, documento disponible en: www.geotecnia.edu.bo/administrador/manual/Humedad.pdf [Consulta: 2007, Agosto 10].
41. NORMA 8020/8100 (1986) Agencia de protección ambiental (EPA) – Caracterización de crudos en fracciones SARA.
42. NORMA METHOD 3540C (1996) Soxhlet Extraction. Determinación de HTP.
43. ORTIZ J. García M. (2006). ***"Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la degradación del petróleo"*** Laboratorio de Estratigrafía molecular. Madrid. España.

Referencias bibliográficas

44. POLYCHRONIADIS, C y Barrios L, (2006) ***“Evaluación del proceso de biorremediación de un suelo en la degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos empleando bioestimulación”***. Trabajo especial de grado sin publicar. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.
45. PULIDO, H y De la Vara (2004) ***“Análisis y diseño de experimentos”*** Primera edición. México. Mc Graw-Hill.
46. RAMÍREZ, M (1999) ***“Factibilidad de sobrevivencia y reproducción de la lombriz roja californiana Eisenia Foétida utilizando como sustrato lodo residual”***. Trabajo de grado no publicado. Universidad Central de Venezuela. Maracay- Aragua.
47. RICO G. Blanco M. Pargada L. y Solera R. (2003). ***“Determinación estructural de betunes asfálticos empleados en impermeabilización”*** Tesis doctoral publicada. Laboratorio General de Estructura y Metales (CEDEX). Universidad Complutense de Madrid. España.
48. RMN -Artículos científicos- Geocities. Página web en línea. Disponible en: http://es.geocities.com/go_10_rm/ [Consulta: 2008, Enero 05]
49. ROUESSAC, F, Rouessac A. Ourisson G (2003). ***“Análisis Químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas”***. México. Mc Graw-Hill.
50. SÁNCHEZ, G., Prometeo, Volke V. Linares. L, Vázquez R, Rivera MC, Ferrra R (2004). ***“Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán”***. Revista agrociencia. Colegio de Postgraduados. Texcoco-México.
51. SANDOVAL, José (2002) ***“Acondicionadores y mejoradores de suelo”***. Instituto colombiano agropecuario. Medellín. Colombia.
52. SCHAEFER, Maike y Filser J.(2006). ***“Efectos de la Lumbricus terrestris, Allolobophora chlorotica y Eisenia foétida sobre las comunidades dinámicas microbianas en los suelos contaminados por petróleo”***. Revista Science-Direct. Departamento de Ecología teórica y General. Centro de Tecnología e Investigación ambiental. Universidad de Bremen. Alemania.
53. SCRIVEN M (1986). ***“Métodos de investigación científica”***. Documento en línea. Disponible en: http://www.monografias.com/análisis/02456_Scriven/investigación.html [Consulta: 2007, Septiembre 01].

Referencias bibliográficas

54. SINGER A. Luepromchai J. Yahng C. Crowley D (2001). ***Contribución de las lombrices de tierra en la degradación de hidrocarburos bituminosos policíclicos***. Artículo publicado en ELSEVIER. Soil Biology & Biochemistry.
55. SKOOG, D. West, D. Holler, F. Stanley C. (2001). ***Química Analítica***. Sexta edición. México. Mc Graw-Hill.
56. STATISTIX 8.0 for Windows (2003). ***Analytical Software***. Tallahassee, FL
57. TOMAS, Hubalek. Vosahlová S. Mateju V. Kovacova N. Novotny C. (2006). ***Monitoreo de la ecotoxicidad de los suelos contaminados con hidrocarburos durante la biorremediación: Un caso de estudio***. Instituto de microbiología. Academia de Ciencias de La República Checa. Praga. República Checa.
58. VÁSQUEZ, T., Ana. Ruíz N. (2004). ***Lombricultura para la remediación y postremediación de suelos contaminados con n-alcános***. Universidad Nacional Autónoma de México. El Rosario. Atzacapotzalco. México.
59. VOLKÉ, T. y Velasco, J. (2005). **El composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México**. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, documento en línea disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/381/volke.html>[Consulta: 2007, Agosto 15].
60. WATKINSON, R. J., y P. Morgan. (1990). ***Fisiología de los microorganismos degradadores de hidrocarburos saturados: Biodegradación***. New York. USA.