

BIODEGRADACIÓN DE ASFALTENO Y RESINAS POR MICROORGANISMOS PRESENTES EN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBURO

CELESTE FERNÁNDEZ¹, MARÍA LLOBREGAT¹, BERNYS JIMÉNEZ¹, VANESSA ALTOMARE¹, HENRY LABRADOR²

¹Universidad de Carabobo, Centro de Investigaciones Ambientales, Av. Universidad, Barbula, Valencia-Venezuela. e-mail: cfernand@uc.edu.ve, celefe@gmail.com

²Universidad de Carabobo, Grupo de Petróleo, Hidrocarburo y Derivado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Av. Universidad, Barbula, Valencia-Venezuela. e-mail: hjlabrad@uc.edu.ve

Recibido: abril de 2008

Recibido en forma final revisado: julio de 2008

RESUMEN

La investigación se basó en la recuperación de un suelo de uso agrícola y ganadero contaminado con crudo mediano proveniente de derrames de pozos abandonados que presentan brotes naturales de crudo aplicando la técnica de biorremediación. La metodología consistió en seleccionar el área impactada y realizar tomas de muestras a una profundidad de 15 cm. Estas muestras se homogenizaron y se colocaron en cuatro biorreactores para su posterior tratamiento, uno como suelo control o blanco y el resto tratado con medio mínimo surfactante (MMS), que aporta nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias. La concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se determinó por gravimetría, y para un tiempo de 30 días de tratamiento se lograron valores de 41 % y 61% en suelos no tratados y tratados, respectivamente, valores que están aún por encima de lo establecido en la normativa ambiental venezolana. Con respecto a la fracción de asfalteno, se registraron cambios en las réplicas, mientras que el suelo control se conservó estable, debido a que las bacterias en presencia del MMS alcanzan los requerimientos necesarios para atacar la fracción del petróleo. En las fracciones de resinas también se obtuvo un decrecimiento en el tiempo, siendo más significativo en las réplicas que en el suelo control.

Palabras clave: Asfaltenos, Resinas, Hidrocarburos totales de petróleo (HTP), Biorremediación.

BIODEGRADATION OF ASPHALT AND RESINS BY MICROORGANISM COMING FROM AN OIL CONTAMINATED SOIL

ABSTRACT

This study was based on the recovery of a soil used by agricultural and cattle activities contaminated with medium crude coming from abandoned well spills that present natural seeps of crude applying the bioremediation technique. The methodology consisted of selecting the affected area and taking samples to a depth of 15 cm, which were then homogenized and placed in four bioreactors for later treatment, one as control while the rest were treated by surfactant minimum means (SMM) that provide necessary nutrients for the development of bacteria. The total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations were determined by gravimetric methods and during a 30 day treatment values of 41% and 61% in the soils treated and not treated were obtained respectively, values which are above those established by Venezuelan environmental norms. With regards to asphalt fractions, changes in the retorts were registered, whereas the soil with control treatment remained stable because the bacteria in the presence of the SMM reach the requirements necessary to attack the fraction of petroleum. In the fractions of resins there was also a decrease over time, more in the retorts that in the control treatment.

Keywords: Asphalts, Resins, Total petroleum hydrocarbons (TPH), Bioremediation.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento tecnológico y el deseo del hombre de vivir en absoluta comodidad han deteriorado vertiginosamente al

medio ambiente, paralelamente a esto se ha ido generando una conciencia de protección y recuperación con el fin de garantizar una mejor calidad de vida para las generaciones actuales y futuras.

Venezuela, como país petrolero, se encuentra dentro de las naciones que producen materiales y desechos peligrosos, provenientes principalmente de la industria manufacturera y petroquímica. Desde el inicio de la actividad petrolera, el medio en que ésta se ha desarrollado, se ha visto afectado por numerosas intervenciones que han dañado severamente el ambiente circundante. Todas las actividades que están envueltas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos al medio ambiente, la extracción, transporte y procesamiento de crudo generan grandes volúmenes de desechos como rípios, lodos petrolizados, agua de perforación y petróleo crudo, constituido básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar de manera natural, por la complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminante si no se maneja de forma adecuada (Ewis *et al.* 1999).

Una manera de lograr la recuperación de suelos contaminados consiste en el aprovechamiento de la microflora de los suelos donde la biodegradación de hidrocarburos por bacterias y hongos tiene la capacidad de oxidar los compuestos hidrocarbonatos del petróleo degradándolos hasta metabolitos que puedan ser fácilmente removidos y dispersados del ambiente (Monticello, 1994).

Científicos e industriales, cuyo objetivo principal era la recuperación de un suelo impactado por un derrame de crudo, determinaron que ciertos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos como alimento y fuente de energía. Las investigaciones demostraron que los microorganismos eran responsables de la descomposición, originando que éstas oxidaran el petróleo a dióxido de carbono, agua y energía. Pero algunos hidrocarburos son resistentes y no degradados totalmente, aunque pueden ser oxidados parcialmente a compuestos menos tóxicos o incorporados como material húmico del suelo, disminuyendo así su viscosidad (Davis, 1967; Atlas, 1986).

Estos microorganismos presentan una especificidad biodegradadora hacia los diferentes componentes del petróleo. Los hidrocarburos saturados son los más propensos a la oxidación y le siguen los hidrocarburos aromáticos (Whyte *et al.* 1997). Las resinas y asfaltenos se consideran como compuestos resistentes a la biodegradación. Esto se debe a que su estructura es muy compleja y deben intervenir diferentes tipos de enzimas que sean capaces de oxidar tanto alcanos lineales como cíclicos, hidrocarburos aromáticos, poliaromáticos y heteropoliaromáticos (Pineda & Mesta, 2001).

En la industria del petróleo, la presencia de compuestos pesados constituye un problema tanto para la extracción, como para el transporte y la refinación, lo que implicaría una disminución del beneficio económico (Pineda & Mesta, 2001). Por estas razones se decidió estudiar la problemática de los hidrocarburos resistentes a la biodegradación en suelos afectados a la zona de Yaracal, estado Falcón. En el presente trabajo se describen y analizan algunos de los parámetros físicos, químicos y biológicos, a ser usados en la biodegradabilidad de las fracciones pesadas del petróleo (resinas y asfaltenos) como una alternativa para la solución de los problemas generados por estos compuestos en la industria petrolera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo de suelo

El sitio de estudio se encuentra en la localidad de Yaracal estado Falcón, en un lugar situado al norte del tramo occidental de la cordillera de la costa en la región noroccidental de Venezuela, entre los 10°18'; 12°11'46'' de latitud Norte. 68°18'; 71°21' de longitud Oeste, con una temperatura promedio mensual 28.7°C. Cabe destacar que la zona fue producto de explotaciones petroleras, las cuales cesaron en el año 1937; sin embargo, hoy en día existen 82 pozos, de los cuales 15 se encuentran emanando petróleo. Se eligió el pozo con una exposición constante de hidrocarburos ya que según Parrish *et al.* 1999 esta favorece la presencia y abundancia de los microorganismos resistentes o degradadores de hidrocarburos. El pozo seleccionado fue el MA-010, afectando a una parcela de 20 m de largo y 20 m de ancho en la cual se seleccionaron nueve puntos, tomando muestras aleatorias a 15 cm de profundidad aproximadamente (Infante, 2005).

Determinación de parámetros fisicoquímicos iniciales de referencias

Para realizar el estudio, se procedió a tomar una muestra mixta de aproximadamente 2 kg de suelo contaminado de los nueve puntos del área en estudio, a partir de estas muestras se determinaron las propiedades fisicoquímicas utilizando el método gravimétrico, método volumétrico, método del ácido ascórbico, metales mediante la técnica de absorción atómica y pH en una solución de bicloruro de calcio empleando un potenciómetro (Apha *et al.* 1998).

Análisis textural del suelo contaminado

La textura general de un suelo depende de las proporciones de partículas de distintos tamaños que lo constituyen. La

metodología empleada fue Textura por Boyoucos Modificado.

Preparación del medio mínimo surfactante (MMS)

El medio mínimo surfactante (MMS) es una solución líquida que aporta los nutrientes necesarios para un desarrollo satisfactorio de las bacterias, con la consecuente producción del biosurfactante necesario en la degradación de hidrocarburos por parte de estos microorganismos.

Para su obtención, inicialmente debieron ser preparadas cuatro soluciones acuosas (medios) A, B, C y D, tal como se indica a continuación:

- Medio A: contiene 1,5 g de KH_2PO_4 ; 1,5 g de NaH_2PO_4 ; 2,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 g de NaCl disueltos en agua destilada hasta obtener 500 ml de solución.
- Medio B: contiene 1 g de NH_4Cl disuelto en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.
- Medio C: contiene 150 mg de FeSO_4 disueltos en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.
- Medio D: contiene 5 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mg de ZnSO_4 y 2,5 mg de molibdato de sodio monohidratado $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.

Cada una de estas soluciones se filtra por separado, utilizando papel de filtro Wathman N° 1, y luego al filtrado del medio A se añade el del D, luego el del C y por último el del B (la mezcla debe realizarse estrictamente en este orden para evitar la formación de precipitados). Esta mezcla constituye una solución 10X, y para su conservación se debe refrigerar en un recipiente de vidrio esterilizado.

Para obtener el MMS se deben mezclar 100 mL de solución 10X con 900 mL de agua destilada y 8 g de glucosa y esterilizar la mezcla en autoclave a 15 libras por 15 minutos. La mezcla resultante es una solución 1X y es empleada como Medio Mínimo Surfactante. Para su contención deben utilizarse recipientes esterilizados de vidrio y para su almacenamiento debieron refrigerarse.

Distribución y muestreo del suelo contaminado en los biorreactores

Se utilizaron cuatro recipientes como biorreactores aproximadamente de 40 cm de largo, 34 cm de ancho y 27 cm de profundidad, en los cuales se colocó igual cantidad de suelo contaminado con crudo. Tres de los biorreactores fueron saturados con MMS, (ATCC, 1973), para dar inicio al

biotratamiento por bioestimulación. Estos sistemas se mantuvieron saturados y aireados durante el lapso del estudio, añadiendo porciones de MMS a medida que se observaba pérdida de humedad del suelo (Ercolli *et al.* 2000), el otro biorreactor funciona como control para establecer comparaciones. Con el fin de monitorear y evaluar la biodegradación del contaminante presente en el suelo, se tomaron muestras de suelo (Volké *et al.* 2005) los días 0, 7, 14, 21 y 30, para analizar el contenido de hidrocarburos totales (HTP) y porcentajes de degradación de resinas y asfaltenos.

Extracción de las fracciones de hidrocarburos del suelo contaminado (EPA, 1996 y 1998)

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, 8020/8100 EPA – 1986. En el suelo contaminado para cada uno de los días monitoreados, se pesaron 20 g de suelo y mediante extracción con el solvente tetrahidrofurano, compuesto heterocíclico moderadamente polar, el cual permite solubilizar los diferentes tipos de compuestos presentes en el crudo al realizar el análisis SARA.

El extracto obtenido se concentró, y se aplicó extracción para precipitar la fracción más pesadas utilizando como solvente n-heptano, la mezcla se agita, se deja en reposo y se procede a filtrar por gravedad, empleando papel filtro hasta separar la suspensión de los asfaltenos (sólido color negro) de los demás compuestos, la solución filtrada obtenida se guarda para análisis posteriores (maltenos).

La solución de maltenos se concentró, para obtener mediante la técnica de cromatografía líquida de adsorción en columna sobre sílice gel, las fracciones de saturados, aromáticos y resinas presentes en el crudo, a través de la elusión con n-hexano, n-hexano-tolueno en relaciones de 25, 50 y 75% hasta llegar a tolueno puro para el caso de los aromáticos. Luego se iniciaron elusiones sucesivas con mezcla de tolueno-metanol, cambiando progresivamente la relación de solvente hasta llegar a metanol puro y extraer las resinas. Cada fracción fue identificada debidamente según la coloración que presentaba durante la elusión, y se aseguró la finalización de la extracción de cada una utilizando la prueba del residuo; la cual consiste en observar la huella del solvente sobre la superficie de un vidrio reloj.

Este procedimiento se aplicó a cada evaluación programada del biotratamiento, y se llevó a cabo por triplicado. Las

fracciones recogidas durante el bioproceso fueron concentradas en atmósfera inerte.

Determinación de la tasa de biodegradación

De acuerdo a las concentraciones de cada uno de los componentes del petróleo (hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) determinados para cada muestra, se calculó la tasa de biodegradación de la fracción de resinas y asfaltenos según la siguiente expresión:

$$\% \text{Degra}_{(inicio)} = 100 - \left(\frac{\% P_{TOTAL[i]}}{\% P_{TOTAL[Dinicio]}} \right) * 100 \quad (1)$$

donde:

$$i = [1..30]$$

$\% \text{Degra}_{(inicio)}$: porcentaje de degradación con respecto a la contaminación inicial (%).

$\% P_{TOTAL[i]}$: porcentaje de petróleo total en el día de muestreo.

$\% P_{TOTAL[Dinicio]}$: porcentaje de petróleo total en el día de inicio.

Caracterización de las fracciones

Una de las caracterizaciones es la resonancia magnética de protones (RMN¹H). Se verifican los picos característicos a campos bajos y altos de las muestras patrón y biodegradada en el tiempo, utilizando un equipo FORMER JEOL 270 con

transformada de Fourier, utilizando tetrametilsilano como estándar interior.

Crecimiento de las Cepas Bacterianas

El crecimiento de los microorganismos de las muestras de suelos contaminadas con hidrocarburos, se efectuó según el método de dilución seriada y vertido en placa de Agar Plate Countn, incubado a 37 °C por 24 horas; para cada día de muestreo se realizó el contaje bacteriano (Aerobios Mesófilos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la composición textural del suelo contaminado es un indicativo de que el proceso de biorremediación es viable ya que las «Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de de los desechos peligrosos» (Gaceta Oficial, 1998), establecen que para la práctica de la técnica de biotratamiento sobre el suelo arable, el área de disposición final debe estar conformada por suelos de textura franca, o franco arenoso o franco limosa o franco arcillosa, o ser acondicionado artificialmente. En este caso el suelo es de textura franco arenoso como se señala en la tabla 1.

Las propiedades fisicoquímicas, producto de las caracterizaciones tanto del suelo contaminado como el suelo tratado con bioestimulación, se pueden apreciar en la tabla 1. Se debe destacar que hay ciertos parámetros que están fuera de lo que establece la norma, uno de ellos es el pH, el suelo control arroja un valor de 4.54, lo mismo sucede para las réplicas con un valor de 4.29, lo que indica que están fuera de las especificaciones propuestas por la norma.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de suelos contaminados con crudo en el proceso de biorremediación.

Parámetro	Suelo Control	Suelo tratado (réplicas)	Rango Permisible
Textura	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
pH	4.54	4.29	6-8
Materia Orgánica	9.39	7.70	2.10
Fósforo (ppm)	7	17	30
Potasio (ppm)	4	8	60
Sodio (ppm)	1	45	110
Carbono orgánico (%)	5.45	4.47	-----
Nitrógeno total (%)	0.11	0.11	0.15
Conductividad eléctrica (dS/m)	0.08	0.40	0.750

Al inicio del tratamiento tanto los pH del suelo control como los de las réplicas estaban fuera de los límites establecidos por la norma, lo que hacía pensar que el proceso de biorremediación era imposible. Este parámetro afecta significativamente la actividad microbiana y por consiguiente el proceso de biorremediación, ya que la mayor parte de los microorganismos tiene un mejor crecimiento en un intervalo de pH situado entre 6 y 8 (Arroyo & Quesada, 2004).

Aunque este parámetro siempre permaneció fuera de los límites establecidos, hasta el final del tratamiento, se demostró que el proceso de biorremediación fue positivo en ambos casos ya que revela una disminución del contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), en un 41% para el suelo control y en un 61% para las réplicas, con respecto a su valor inicial, como se señala en las figuras 1 y 2. Esto se debe a que las bacterias nativas no se adaptaron positivamente al pH tan ácido del suelo, lo cual ocasionó que su período de vida fuera tan corto y por consiguiente una biorremediación menos efectiva.

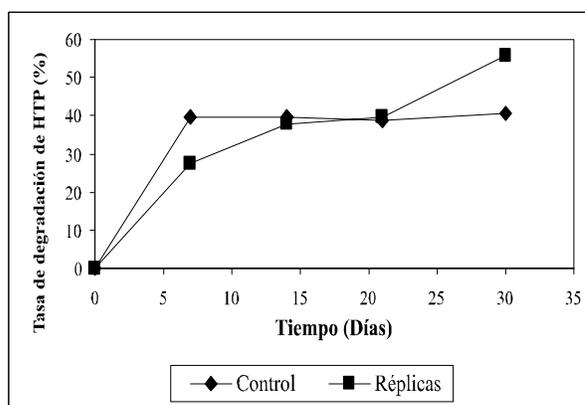


Figura 1. Determinación del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) durante el estudio.

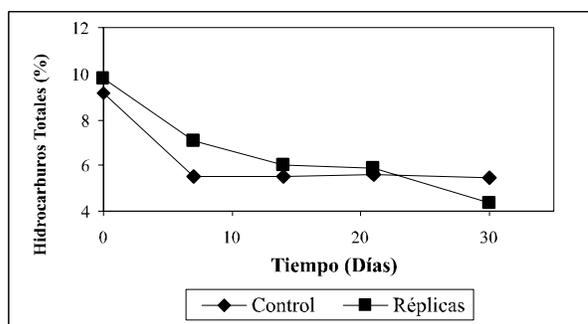


Figura 2. Variación de la tasa de degradación de hidrocarburos totales del Petróleo (HTP) a lo largo de la experimentación.

El hecho de que las réplicas tengan un porcentaje de biodegradación mayor al del suelo control se debe

principalmente a que las bacterias trabajaron más eficientemente con la adición del medio mínimo surfactante (MMS) que estimuló el crecimiento de los microorganismos. Para que las condiciones del suelo mejoren el contenido de materia orgánica debe ser alto, ya que favorece la fertilidad a la capacidad de aminorar el efecto de fijación y adsorción del Fósforo, incrementándose su disponibilidad para las plantas. El aumento de la materia orgánica que presenta el suelo contaminado control con respecto al suelo tratado a los treinta días de experimentación, corresponde con la cantidad de hidrocarburo presente que no fue biodegradado. El contenido de materia orgánica y la actividad metabólica de las bacterias ocasionan acidificación del medio por la producción de ácidos orgánicos y de CO₂. Estos resultados concuerdan con los de La Grega *et al.* (1996), que señalan que los microorganismos pueden alterar los valores de pH y disminuirlos. Similarmente sucedió con Margesin & Schinder (2001) que obtuvieron una disminución de pH en el transcurso de su experimentación logrando una remoción alta de hidrocarburos.

En la figura 3, se aprecia la curva de crecimiento bacteriano mesófila para las réplicas en el tiempo como se mencionó anteriormente, estas bacterias necesitan de ciertas condiciones para su crecimiento donde destacan el pH, la cantidad de nutrientes necesarios para realizar el proceso de biorremediación y la aireación (Infante, 2001).

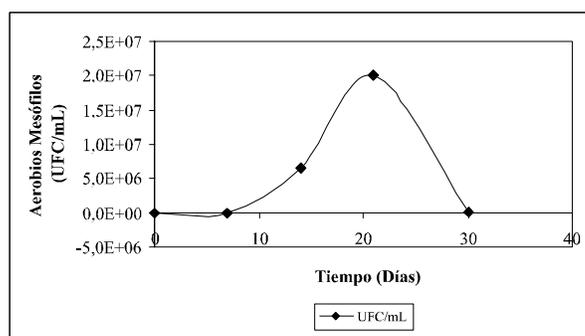


Figura 3. Curva de crecimiento de la población bacteriana durante el estudio de tratabilidad del suelo contaminado con crudo.

Aunque las condiciones no fueron las mejores, ya que el pH del suelo era extremadamente ácido, gracias a los nutrientes proporcionados por la solución de MMS, para su reproducción y crecimiento, fue posible obtener una curva de crecimiento semejante a la teórica, por lo que se afirma que en el proceso de biorremediación, las bacterias nativas cumplieron con las cuatro fases esperadas, el crecimiento alcanzó densidades poblacionales de 2.0×10^7 UFC/ml lo que demostró que las cepas bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos degradan las fracciones del petróleo y se podrían utilizar en el saneamiento de ambientes

contaminados (Kanaly *et al.* 2000; Mishra *et al.* 2001; Margesin & Schinder, 2001).

Con respecto a la conductividad eléctrica se tienen valores de 0.08 dS/m en el suelo control y al final del tratamiento 0.4 dS/m, esto se debe a que el suelo tratado presentó mayor contenido de sales debido a la adición del medio mínimo, la conductividad se encontró en el rango permisible al compararlo con el decreto 2635 (Gaceta Oficial, 1998), el cual establece un límite máximo de 0.75 dS/m para la aplicación de este tipo de tratamiento.

En relación a las fracciones de asfaltenos en la tabla 2, se observa que el porcentaje de esta fracción es mínima en el suelo contaminado debido a que el crudo en la zona es liviano y estudios preliminares determinaron que la caracterización del crudo tenía un 0% de esta fracción, sin embargo al derramar en el suelo el crudo sufre un proceso de oxidación con aire y transforma una pequeña parte del crudo en asfalteno.

Tabla 2. Caracterización de las fracciones del crudo en el proceso de biorremediación.

Fracción de crudo	Porcentaje en Masa de las fracciones (% Frac+0.5)%	
	Crudo	Suelo contaminado antes del tratamiento
Hidrocarburos saturados	37.0	37.4
Hidrocarburos aromáticos	48.0	46.6
Resinas	13.4	14.9
Asfalteno	0.0	1.12

En la figura 4 se observa un decrecimiento de esta fracción en las réplicas, a partir del día siete, precedida de una fase no muy reveladora a partir del día veintiuno. Esto se debe a que los microorganismos, gracias a los nutrientes, provocan la inducción de enzimas necesarias para la degradación.

Es importante señalar que los microorganismos son capaces de utilizar los asfaltenos como fuente de carbono y energía, ya que estos compuestos contienen carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno, y oxígeno, que son los elementos necesarios para el desarrollo de cualquier organismo (Nishijima *et al.* 1997; Pineda *et al.* 2004).

Investigaciones han demostrado que los asfaltenos pueden oxidarse por la actividad metabólica de microorganismos,

produciendo estructuras con grupo ceto e hidroxilo después de diez días de incubación (Rontani *et al.* 1985). Este proceso se favorece cuando la estructura micelar (parafinas, resinas y otros hidrocarburos) de los asfaltenos es eliminada con n-heptano al ser extraído de la muestra de crudo provocando una disponibilidad alta de los microorganismos en el carbono de los asfaltenos.

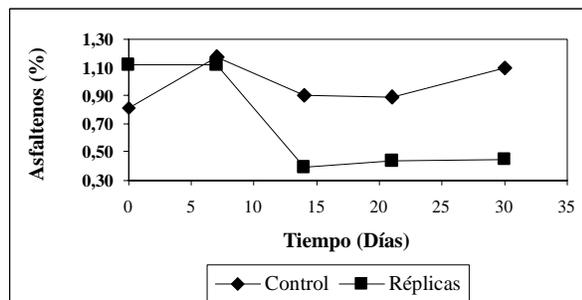


Figura 4. Porcentaje en peso de los asfaltenos durante el estudio de tratabilidad de un suelo contaminado con crudo.

En la figura 5 se aprecia un porcentaje de degradación de las resinas, las bacterias nativas del suelo pueden atacar este tipo de estructuras moleculares y con la ayuda del medio mínimo surfactante mejor aún, ya que estas estructuras moleculares son más susceptibles de biodegradación que los asfaltenos.

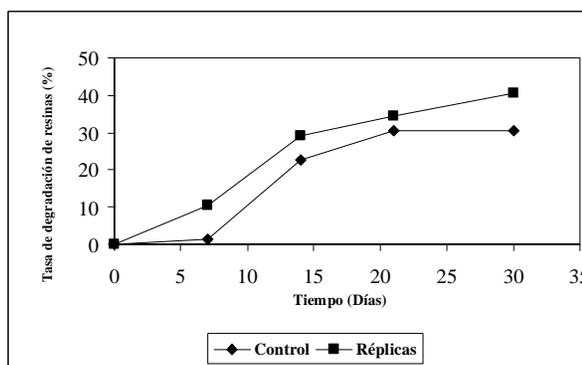


Figura 5. Variación de la tasa de degradación de resinas a lo largo de la experimentación.

Otras de las técnicas complementarias aplicadas a las resinas, fueron los espectros asociados a la resonancia magnética nuclear de protones (RMN) donde se observan las evoluciones del proceso de biorremediación en el tiempo. Al comienzo del tratamiento, día cero, se observa, en las figuras 6 y 7 que los espectros son similares, esto se debe a que los microorganismos están en la etapa de adaptación y la presencia de picos a 7,24 ppm se relaciona al solvente usado (cloroformo), los picos al lado de este, corresponden a la presencia de aromáticos en la muestra, así como también se muestran picos entre 2 y 3 ppm, siendo el tolueno- metanol

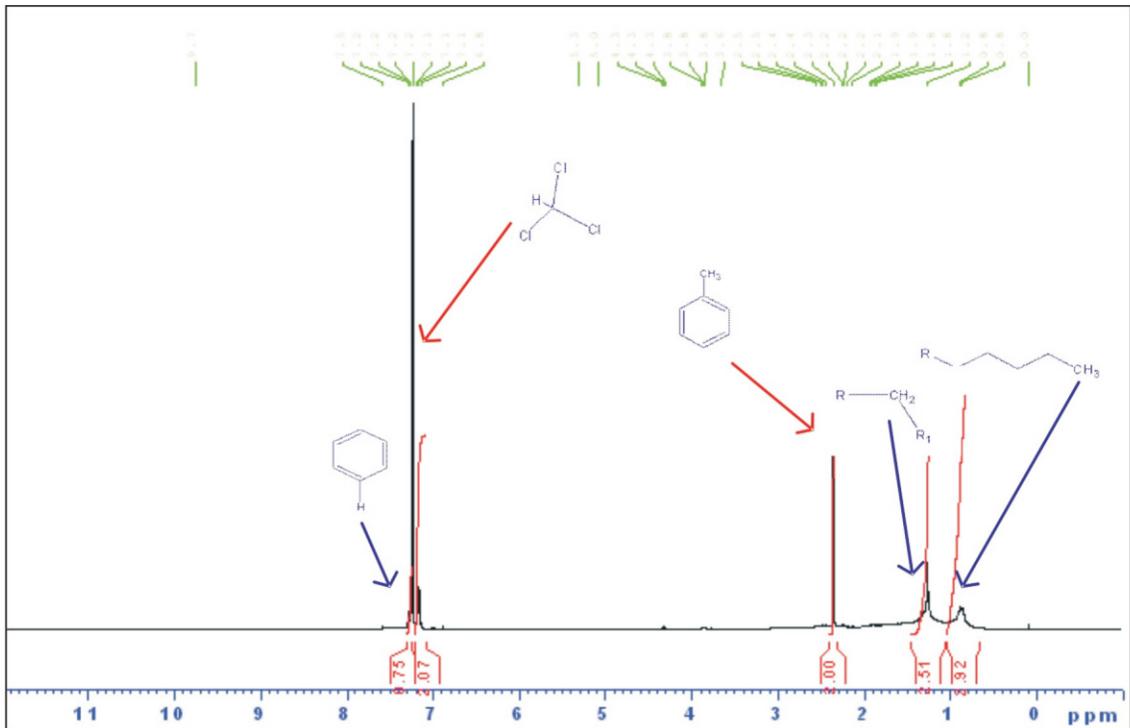


Figura 6. Espectros de resonancia magnética nuclear para el suelo control al día cero.

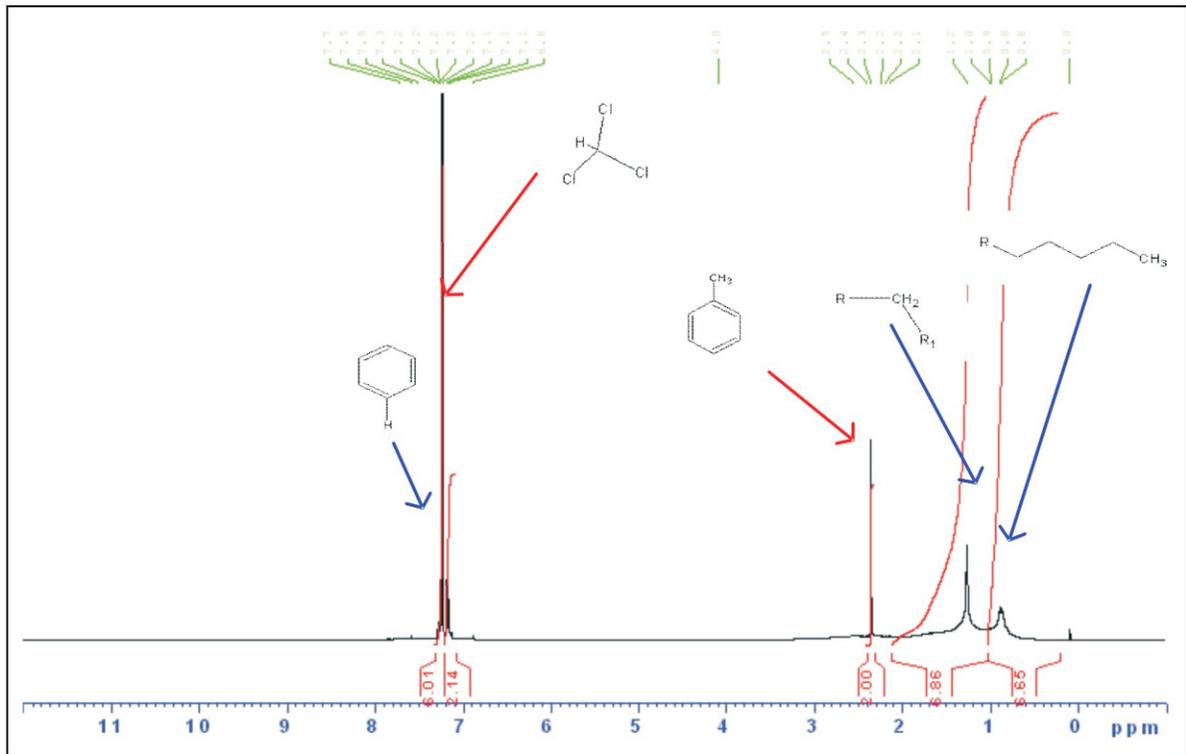


Figura 7. Espectros de resonancia magnética nuclear para las réplicas al día cero.

el solvente usado en el proceso de extracción para la obtención de las resinas. Los valores reportados entre 1 y 2 ppm son los protones más apantallados, es decir, enlaces sigma-carbono, los cuales absorben energía a campos altos.

En la figura 8, a partir del día 14, se tiene que los espectros de las muestras contaminadas con petróleo, medio mínimo y microorganismos, hay diferencias marcadas con respecto al día cero, ya que el consorcio bacteriano se encuentra en

la fase de crecimiento y como única fuente de carbono las resinas que podrán transformarse en estructuras más pequeñas, lo que no se evidencia en el suelo control. Se infiere que a campo bajo del espectro, entre 9 y 10 ppm, sobresale un pico definido que corresponde a la formación de aldehídos, esto se debe a que el proceso de biorremediación tiende a ser oxidativo y reductivo a la vez. Las bacterias no solamente son de tipo aerobias sino que también existen las anaerobias y esto se evidencia en que las primeras tienen un metabolismo más débil y atacan sólo moléculas pequeñas, y tienden a realizar un proceso de biorremediación de tipo oxidativo.

Las bacterias de tipo anaerobias están acondicionadas para atacar moléculas más grandes, como las resinas y los asfaltenos, ya que su metabolismo es más fuerte y están preparadas para soportar este tipo de gasto energético y por lo tanto hacen un proceso de biorremediación de tipo reductivo (Kanaly *et al.* 2000). Esto se demuestra en el espectro en donde surgen picos entre 5 y 6 ppm que corresponden a dobles enlaces y entre 2.5 y 5 se relacionan a los protones atraídos por heteroátomos como el azufre.

Para el día 30, al final del tratamiento, la figura 9 revela picos muy marcados, no tanto como en el día catorce, esto debido a que la densidad poblacional microbiana se encuentra en la fase latente y no tiene la capacidad de biodegradar eficientemente.

CONCLUSIONES

En el proceso de biorremediación de suelos contaminados por perforaciones abandonadas, se demuestra que las bacterias autóctonas pueden degradar moléculas de pesos moleculares altos, mediante nutrientes que estimulan la actividad microbiana, manteniendo condiciones adecuadas de humedad, aireación, y otras en el suelo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los laboratorios del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Facultad de Ingeniería; al laboratorio de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, así como al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UC) por el financiamiento Nro. 00113-07.

REFERENCIAS

- APHA, AWWA, WEF. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 Edition, New York.
- ARROYO, M., QUESADA, J. (2004). *Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos*. Geocisa. División de Protección Ambiental; Guadalajara-México.

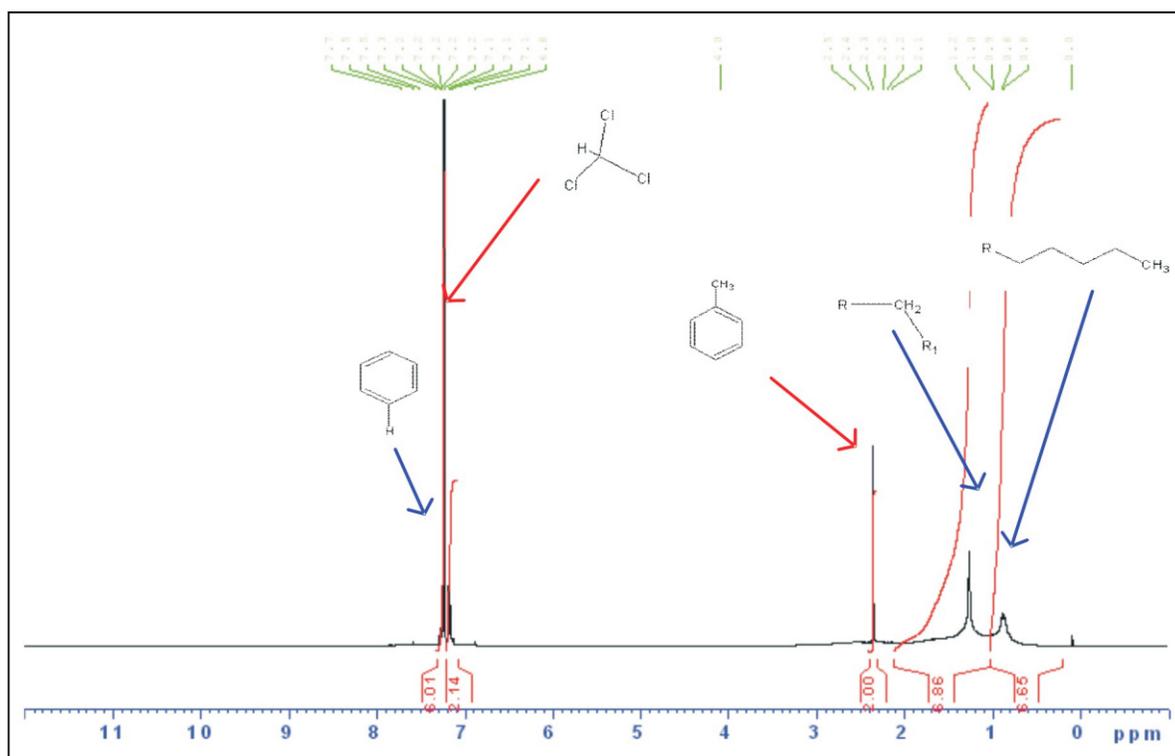


Figura 8. Espectros de resonancia magnética nuclear para las réplicas al día treinta.

- ATCC 2497. (2004). *Rhodoferrax Medium*, 1-1, Manassas, U.S.A.
- ATLAS, R.M. (1986). *Biodegradation of hydrocarbons in the environment*. In: G.S. Omen (ed.). Environmental biotechnology, reducing risks from environmental chemicals through biotechnology. Plenum Press, Nueva York.
- DAVIS, J.B. (1967). *Petroleum microbiology*. Ed. Elsevier. Inglaterra.
- EPA METHOD 3540-C. (1996). *Soxhlet Extraction. Determinación de HTP*. Agencia de protección ambiental (EPA).
- EPA. (8020/8100) MODIFICADO. (1998). Agencia de protección ambiental (EPA). *Caracterización de crudos en fracciones SARA*.
- ERCOLLI, E., DI PAOLA, M., CANTERO, J. (2000). *Análisis y Evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos*. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.
- EWIS, J., ERGAS, S., CHAG, D., SCHOROEDER, E. (1999). *Principios de Biorrecuperación*. MacGraw-Hill. España. 1ª Edición en español, 1.327.
- GACETA OFICIAL. (1998). *Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos*. Decreto 2635. Gaceta Oficial Extraordinaria n° 5245 de la República de Venezuela. Imprenta Nacional. Caracas, Venezuela.
- INFANTE, C. (2005). *Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos*. Apuntes. Facultad de Agronomía. Postgrado Ciencia del Suelo. Universidad Central de Venezuela.
- INFANTE, C. (2001). *Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de Intebios® y Biorize®*. Interciencia. Vol. 26, pp 504-507.
- KANALY, R., BARTHA, R., WATANABE, K., HARAYAMA, S. (2000). Rapid Mineralization of Benzo (a) pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4505-4511.
- LA GREGA, M., BUCKINGHAM, P., JEFFREY, E. (1996). *Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. Mc.Graw Hill. Aravaca, Madrid, España.
- MARGENSIN, R. & SCHINDER, F. (2001). *Biorremediación (Natural Attenuation and Bioestimulation) of Diesel-Oil-Contaminate Soil in an Alpine Glacier Skiing Area*. *Appl. Envir. Microbiol.* 67, 3127-3133.
- MISHRA, S., JYOT, J., KUHAD R., LAL, B. (2001). *Evaluation of inoculum addition to stimulates in situ Biorremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (4): 2235-2240.
- MONTICELLO, D. J. (1994). *The molecular biology of dibenzothiophene desulfurization*. The seven international IGT symposium of gas oil and environmental microbiology. 1-15.
- NISHIJIMA, W., SHOTO, E., OKADA, M. (1997). *Improvement of biodegradation of organic substance by addition of phosphorus in biological activated carbon*. *Wat. Sci. Tech.* 36, 251-257.
- PARRISH, P., CLARK, J., PRINCE, R. (1999). Alaska Oil Spill Bioremediation Monitoring Program: An update. USEPA, NHEERL, Gulf Ecology Division, 1 Sabine Island Drive, Gulf Breeze, FL 32561.EPA.
- PINEDA-FLORES, G., MESTA-HOWARD, A.M. (2001). *Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms*. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*. 43, 143-150.
- PINEDA-FLORES, G., BOLL, G., ARGUELLO, G., LIRA- GALEANA, C., MESTA- HOWARD, A. (2004). *A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source*. *Biodegradation*. 15, 145-151.
- RONTANI, J.F., BOSSER-JOULAK, F., RAMBELOARISOA, E., BERTRAND, J.C., GIUSTI, G. (1985). *Analytical study of ashart crude oil: asphaltenes biodegradation*. *Chemosphere* 14, 1413-1422.
- VOLKÉ, T., VELASCO, J., DE LA ROSA PÉREZ, D. (2005). Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). «*Suelos contaminados por metales y metaloides. Muestreo y alternativas para su remediación*», 1era. edición, México.
- WHYTE, L.G., BOURBONNIÈRE, L., GREER, C.W. (1997). «*Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotropic Pseudomonas strain possessing both alkane (alk) and naphtalene (nah) caabolic pathways*». *App. Env. Microbiol.* 63(9): 3719-3723.