

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA



**“Estudio de la biodegradación del crudo Guafita 1X en
dos suelos de diferente textura y composición
mineralógica”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Br. María Gabriela García
López como requisito para
aprobar la asignatura Proyecto
Geoquímico II y optar al Título de
Licenciada en Geoquímica.

Caracas, Julio 2008

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA



**“Estudio de la biodegradación del crudo Guafita 1X en
dos suelos de diferente textura y composición
mineralógica”**

Tutores:

Prof. (a): Liliana López

Prof. (a): Carmen Infante

**Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Br. María Gabriela García
López como requisito para
aprobar la asignatura Proyecto
Geoquímico II y optar al Título de
Licenciada en Geoquímica.**

Caracas, Julio 2008



ACTA

Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del Jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: ***“Estudio de la biodegradación del crudo Guafita 1X en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica”*** presentado por la Br. María Gabriela García López, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Geoquímica.


Prof. Liliana López
Tutora


Prof. Carmen Infante
Tutora


Prof. Anna Gann
Jurado


Prof. Salvador Lo Mónaco
Jurado

DEDICATORIA

A mis padres, Carmen Milena López Córdova y Luis Vicente García Berfon, mi gran orgullo y el mejor ejemplo a seguir, sin su amor y apoyo incondicional no lo hubiese logrado.

A mi hija Eliana Carolina Medina García, todo por ti mi princesita, te dedico todos mis logros.

A mi abuela Braulia Córdova, quien desde el cielo sigue cuidando mis pasos y dándome bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre escucharme, acompañarme y ayudarme, por demostrarme constantemente que con fe y empeño se pueden lograr las más grandes metas.

A la Universidad Central de Venezuela, porque en ella me formé, pase momentos muy agradables y aprendí innumerables lecciones, fue un honor estudiar aquí y le estaré eternamente agradecida.

A mis padres, Carmen Milena López Córdova y Luis Vicente García Berfon, a ellos que siempre han estado allí brindándome un amor y apoyo incondicional, que han sido y seguirán siendo mi gran ejemplo a seguir, que me han enseñado las bases y valores para ser una gran persona, que me han inculcado la importancia de la familia, que me han ayudado a levantarme de mis caídas. Mamá y papá, no me alcanzarán las palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí y para decirles cuanto los quiero.

A mi hija, Eliana Carolina, por ser mi todo, mi vida, mi inspiración, mi alegría, mi fuerza, la lucecita que ilumina todos mis días. Gracias mi niña por escucharme, por entenderme, por acompañarme y por ayudarme como toda una mujercita, gracias porque con solo una sonrisa, un abrazo, un cariñito, una mirada o una bonita palabra eres capaz de transformar el peor de los días en algo hermoso. Mi princesita, eres todo para mí.

A mi hermana, Adriana García, por todos tus consejos y por el apoyo que me has dado cuando lo he necesitado.

A Luis A. Medina, por todo el apoyo, la compañía y el amor que me has dado durante todo este tiempo, por hacerme creer más en mí y porque a tu lado he aprendido muchísimas cosas que me han hecho una persona mejor y más fuerte. Te amo.

A la profesora Liliana López, por ser mucho más que una tutora. Por todo el apoyo, el cariño, la comprensión y la orientación que me ha dado no solo durante la realización del presente trabajo, sino también durante toda la carrera. Por ser una gran profesional gracias a la cual descubrí mi área de preferencia, de verdad la admiro y la quiero mucho profe.

A la profesora Carmen Infante, por su orientación, asistencia y apoyo en la realización de mi trabajo.

Al profesor Ismael Hernández y a Derek Angulo por la asistencia y el apoyo brindado durante la realización de parte de la metodología experimental del presente trabajo.

Al instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por la colaboración con una de las muestras de suelo necesarias para realizar el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Alessia, Mailyng, Rut y Enmanuel quienes han compartido conmigo durante toda la carrera y con los cuales he pasado momentos muy agradables. Enmanuel, realmente eres digno de admiración, te deseo muchísimo éxito. Alessia, muchísimas gracias por todo el apoyo, el cariño y la amistad que me has dado durante todo este tiempo, realmente es incomparable. Mai, gracias por escucharme, por todas las risas, por tu amistad, tu apoyo y tus consejos. Rut, mi madre, gracias por ser tan linda y tan cariñosa conmigo, por tu amistad, tus consejos y por los buenos momentos que hemos pasado y seguiremos pasando. Los quiero mucho.

A los profesores del Instituto de Ciencias de la Tierra, que han sido los encargados de formarme como profesional transmitiéndome su experiencia y conocimiento. Especialmente agradezco a los profesores Manuel Martínez, Anna Gann, Salvador Lo Mónaco, Santiago Marrero, José Méndez y Carlos Barrios, porque han dejado en mí una huella importante.

Al personal técnico por su ayuda y asistencia en la realización de este trabajo, especialmente a Fernanda.

A dos personas especiales con las que he compartido, momentos de angustia, risas y momentos agradables, Prof. Patricia Lugo y Karla Quintero.

Finalmente pido disculpas a quienes olvide mencionar y que de alguna u otra manera me ayudaron a alcanzar tan preciada meta.

GRACIAS



RESUMEN

Se estudió la biodegradación de un crudo liviano, durante 90 días, en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica. El proceso se evaluó en base a: la disminución de la cantidad de crudo extraído en intervalos de tiempo establecidos, los cambios en la composición SARA y la variación de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados del crudo durante el tiempo de estudio. Para ello se tomaron dos suelos de diferente textura y composición mineralógica: un suelo arenoso compuesto por cuarzo e ilita, y un suelo franco- arcillo- arenoso, compuesto por cuarzo y caolinita. Ambos suelos fueron estudiados con y sin un agente estructurante constituido por hojarasca (hojas secas de diferentes árboles caídas en el suelo). Las muestras se dividieron en cuatro grupos de la siguiente manera:

- GRUPO 1: Suelo arenoso
- GRUPO 2: Suelo franco-arcillo-arenoso
- GRUPO 3: Suelo arenoso con agente estructurante
- GRUPO 4: Suelo franco-arcillo-arenoso con agente estructurante

En cada uno de los grupos se tomo el suelo determinado y se contaminó con un crudo liviano (Guafita 1X) a una concentración de aproximadamente 5%, seguidamente se añadió fertilizantes, y de manera periódica se ajustó la humedad y el nivel de oxígeno, mediante aireación, mezclando la muestra con un rastrillo. A los 1 y 30 días de avance de la biodegradación se realizó una extracción sohxlet del crudo presente en el suelo a una muestra de 3g de cada uno de los grupos, empleando como solvente diclorometano. Seguidamente se realizó la separación de asfaltenos, mediante la adición de n-heptano en una proporción 40:1 (n-heptano: extracto), la determinación de la composición SAR (saturados, aromáticos y resinas) mediante cromatografía de adsorción en columna y por último la determinación de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las variaciones mas significativas se observaron en el suelo con predominio de grano fino y en presencia de un agente estructurante; lo cual permitió concluir que en este tipo de suelos el proceso de biodegradación se lleva a cabo de manera mas efectiva que en suelos compuestos por mayores tamaños de grano y que la presencia de un agente estructurante favorece el proceso de biodegradación.



ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Introducción y planteamiento del problema</i>	1
<i>Objetivos</i>	3
• Objetivo General	3
• Objetivos específicos	3
MARCO TEÓRICO.....	4
<i>Fundamentos teóricos</i>	4
1. Suelo	4
1.1 Definición de suelo	4
1.2 Principales tipos de suelo de acuerdo a su textura	5
1.3 Naturaleza y propiedades del suelo	7
1.3.1 Materia orgánica	7
• <i>Influencia de la materia orgánica sobre algunas propiedades de los suelos</i>	7
1.3.2 Humedad o contenido de agua	8
1.3.3 Aire en el suelo	8
1.3.4 Temperatura del suelo	9
1.3.5 Textura del suelo	9
• <i>Influencia de la textura sobre algunas propiedades y cualidades del suelo</i>	9
1.3.6 Profundidad del nivel freático	11
1.3.7 Estructura	11
1.4 Los organismos del suelo	13
2. Crudo	16
2.1 Definición	16
2.2 Composición	16
2.3 Clasificación del crudo basada en la gravedad API	16
3. Métodos de recuperación de suelos	17
Tecnologías de recuperación térmicas	19
Tecnologías de recuperación fisicoquímicas	21
Tecnologías de recuperación biológicas	23
4. Biorremediación	25
Ventajas y desventajas de la biorremediación	29
<i>Antecedentes de la investigación</i>	30



MARCO METODOLÓGICO	34
1.Revisión Bibliográfica	34
2.Propuesta Experimental	34
2.1 Muestreo de los suelos utilizados	34
2.2 Caracterización de los suelos	35
2.2 Proceso de biodegradación	38
2.3 Análisis químicos	41
PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
1. Caracterización del crudo	45
2. Caracterización de los suelos utilizados	48
3. Evaluación de la remoción del crudo en los distintos grupos de suelo	50
4. Variación de la composición SARA	56
5. Biomarcadores	59
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÉNDICES	78
I. Corrección respecto a la temperatura para el método del hidrómetro	78
II. Costos aproximados del proyecto	79
III. Cantidades de fertilizantes añadidos al suelo	80
IV. Gráfico triangular de los esteranos C₂₇, C₂₈ Y C₂₉ y relaciones entre isómeros del esterano C₂₉	81



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Triángulo de textura del sistema de clasificación de la USDA.....	6
Figura N° 2	Catálogo de Munsell.....	36
Figura N° 3	Bandejas etiquetadas y organizadas.....	39
Figura N° 4	Adición del crudo al suelo.....	39
Figura N° 5	Flujograma ilustrativo del procedimiento seguido en la propuesta experimental.....	41
Figura N° 6	Montaje Soxhlet.....	42
Figura N° 7	Distribución inicial de n-alcenos del crudo.....	46
Figura N° 8	Distribución de terpanos y hopanos.....	46
Figura N° 9	Distribución de esteranos.....	47
Figura N° 10	Distribución de diasteranos y esteranos.....	47
Figura N° 11	Espectro de difracción obtenido para el suelo A.....	49
Figura N° 12	Espectro de difracción obtenido para el suelo B.....	50
Figura N° 13	Gráfico de cantidad de extracto vs tiempo para los distintos grupos.....	52
Figura N° 14	Comparación de la variación de la composición SARA en los distintos grupos de suelo: (A) Grupo 1, (B) Grupo 3, (C) Grupo 2 y (D) Grupo 4.....	58
Figura N° 15	Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 1.....	60
Figura N° 16	Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 3.....	61
Figura N° 17	Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 2.....	62
Figura N° 18	Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 4.....	63



Figura N° 19	Cambio en la relación C_{23-3}/C_{30} hopano visible en el ión m/z 191.....	64
Figura N° 20	Comparación de los iones m/z 191 y m/z 177.....	65
Figura N° 21	Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 2.....	66
Figura N° 22	Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 4.....	67
Figura N° 23	Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 3.....	67
Figura N° 24	Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 1.....	68
Figura N° 25	Comparación del TIC a los 1, 30 y 90 días de extracción.....	69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Influencia de la textura sobre algunas propiedades de los suelos.....	11
Tabla N° 2	Grupos de organismos más importantes presentes en el suelo.....	14
Tabla N° 3	Factores que afectan la actividad de los organismos del suelo...	15
Tabla N° 4	Ventajas y desventajas de la biorremediación.....	29
Tabla N° 5	Matriz de ensayos de biodegradación a utilizar en la propuesta	39
Tabla N° 6	Composición SARA del crudo Guafita 1X.....	45
Tabla N° 7	Relaciones iniciales de biomarcadores en el crudo Guafita 1X..	45
Tabla N° 8	Determinación de la textura de los suelos utilizados.....	48
Tabla N° 9	Determinación del color de los suelos utilizados.....	48
Tabla N° 10	Determinación de COT en los suelos utilizados.....	49
Tabla N° 11	Valores obtenidos para los extractos de crudo de los distintos grupos de suelo en los distintos tiempos de extracción. (gcrudo/gmuestra).....	51
Tabla N° 12	Tasa de biodegradación en base a la diferencia de la cantidad de crudo extraída del día 1 al día 90.....	52
Tabla N° 13	Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de extracción para cada uno de los grupos.....	54
Tabla N° 14	Diferencias estadísticamente significativas derivadas de la comparación entre grupos para cada tiempo de extracción.....	55
Tabla N° 15	Variación de la composición SARA del crudo en los distintos tipos de suelo a lo largo del tiempo de estudio.....	56
Tabla N° 16	Tasa de biodegradación de hidrocarburos saturados, a los 30 y 90 días de estudio.....	58
Tabla N° 17	Relaciones de biomarcadores obtenidas para los distintos grupos a los 1 , 30 y 90 días de extracción.....	59



INTRODUCCIÓN

Dentro del consumo energético mundial, el petróleo ocupa el primer lugar como fuente de energía, motivo por el cual se hace tan necesaria su exploración y explotación. En Venezuela, la industria petrolera constituye la fuente principal y más importante de ingresos económicos, por lo que desde hace muchísimos años, Venezuela se ha caracterizado por desarrollar en gran medida la actividad petrolera. Sin embargo, asociados a esta actividad petrolera, se tienen diversos problemas ambientales, entre los cuales uno de los más trascendentales es la contaminación debido al derrame de hidrocarburos, lo que afecta significativamente tanto a los suelos como a los cuerpos de agua.

La contaminación de los suelos por hidrocarburos afecta severamente el medio, provocando efectos tóxicos en el ecosistema, que ocasionan posteriormente la pérdida del mismo (Luque, 2004).

A pesar de la habilidad que la naturaleza tiene de limpiarse por sí sola, a través de, principalmente, la oxidación y biodegradación de hidrocarburos, la biodegradación natural de los contaminantes requiere de una serie de factores vitales y de ciertas condiciones para la proliferación de los microorganismos que llevan a cabo el proceso, entre estos factores se encuentran: humedad, nutrientes, oxígeno, temperatura, pH adecuado, etc. En muchos casos, una o varias de estas condiciones no se cumplen, generando entonces una biodegradación lenta y pobre. De igual manera, la naturaleza y complejidad de los residuos va cambiando, y la capacidad degradativa y amortiguadora de la naturaleza comienza a alterarse (Gutiérrez, 1990). Como resultado de esto, algunos



ecosistemas pueden tardar varias décadas en recuperarse naturalmente de un derrame, o simplemente no recuperarse (Briceño y Méndez, 2006).

Debido a lo anteriormente expuesto, se han venido realizando investigaciones que han permitido desarrollar y evaluar técnicas o metodologías para la recuperación de los suelos contaminados, entre estas técnicas puede citarse la biorremediación.

A partir de 1990 se decide abrir, en Venezuela, una línea de investigación que luego de varios años de trabajo, ha permitido conocer y entender la técnica de biorremediación, la cual se basa en la estimulación y aplicación del proceso de biodegradación para disminuir o suprimir las fracciones tóxicas presentes en el crudo (Infante, 2005), utilizando la capacidad de los organismos para transformar los compuestos químicos, en este caso, en su mayoría, de carácter orgánico (Briceño y Méndez, 2006).

Existen numerosos trabajos acerca del estudio de esta técnica como tecnología amigable para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. Sin embargo, se tiene poca información publicada en relación a la influencia del tipo de suelo en el proceso de biodegradación del crudo. Es por ello que en el presente trabajo se estudio el proceso de biodegradación de un crudo mediano en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica, a fin de comparar la influencia de estos factores en el proceso de recuperación de suelos afectados por derrames de este tipo de hidrocarburos. Los dos suelos estudiados fueron de textura arenosa y francoarcilloarenosa, respectivamente.

Se esperaba que el proceso de biodegradación del crudo en estos suelos no fuera muy efectivo, debido a diversos factores, propios de los mismos, que no les proporcionan la estructura adecuada y dificultan el contacto entre el crudo y los microorganismos presentes en dichos suelos. Para tratar de solventar esta situación se



añadió un agente estructurante o acondicionador orgánico a los suelos mencionados, a fin de mejorar el contacto crudo- microorganismo y con ello el proceso de biodegradación que conlleva a la recuperación de los suelos contaminados.

Objetivos

Objetivo General:

- Evaluar el proceso de biodegradación del crudo Guafita 1X en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica.

Objetivos específicos:

- Caracterizar los suelos a evaluar a fin de conocer algunas de sus características físicas y químicas.
- Evaluar el proceso de biodegradación de un crudo mediano (Guafita 1X) en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica, en base a la variación de la composición SARA y de los biomarcadores correspondientes a la fracción de hidrocarburos saturados del crudo.
- Comparar el proceso de biodegradación del crudo en los dos tipos de suelo en base a la disminución de los hidrocarburos totales del petróleo.
- Evaluar el efecto de la adición de un agente estructurante en el proceso de biodegradación del crudo, en ambos suelos.



MARCO TEÓRICO

El desarrollo del presente proyecto requiere del conocimiento de una serie de aspectos teóricos importantes vinculados a los términos y procesos que forman parte de la técnica de biorremediación de suelos y en particular del problema antes planteado. Por ello, en este capítulo se hace referencia, de modo general, a la definición de suelo, sus propiedades, tipos de suelo de acuerdo a la textura; asimismo, se hace referencia a la definición de crudo, su composición y clasificación de acuerdo a la gravedad API. Por último, se presenta una breve reseña de los métodos de recuperación de suelos, donde se hace énfasis en la biorremediación, exponiendo algunas de sus ventajas y desventajas.

Fundamentos Teóricos

1. Suelo

1.1 Definición de Suelo

El concepto de suelo puede variar de manera considerable, dependiendo del punto de vista desde el cual se estudie; de esta manera, el suelo podría definirse de innumerables formas. Sin embargo existen dos tendencias predominantes de ver el suelo, la pedológica y la edafológica. La Pedología considera al suelo como un producto natural, proveniente de la meteorización de las rocas por acción de distintos agentes como el clima y los microorganismos, enfatiza al suelo como un fenómeno natural: apariencia, modo de formación, composición química, física y biológica, y su clasificación y distribución. La Edafología, por su parte, considera el suelo en relación a



su uso como un medio para el crecimiento de las plantas, considera las diversas propiedades de los suelos en cuanto a su relación con su productividad vegetal. A modo general, en geoquímica, un suelo es una entidad natural de constituyentes minerales y orgánicos, diferenciado "in situ" en horizontes de espesor variable, que difiere del material parental subyacente en morfología, composición química y mineralógica (LoMónaco, 2005).

Tratando de unificar o generalizar el concepto de suelo, la *Word Reference Base for soil resources* (WRB) en su edición del 2006, ha decidido definir como suelo a cualquier objeto que forme parte de la epidermis de la Tierra, es decir, se define como suelo a cualquier material dentro de 2 metros de la superficie de la Tierra, que esté en contacto con la atmósfera, excluyendo organismos vivos, áreas de hielo continuo no cubierto por otro material, y cuerpos de agua de más de 2 metros de profundidad. Esta definición incluye entonces roca continua, suelos urbanos pavimentados, suelos de áreas industriales, suelos de cuevas y suelos bajo agua. Este enfoque tiene varias ventajas, entre ellas, que permite enfrentar problemas ambientales de una manera sistemática y holística, y que evita discusiones estériles sobre una definición universalmente aceptada de suelo y sus requerimientos de espesor y estabilidad (W.R.B, 2006).

1.2 Principales tipos de suelo de acuerdo a su textura

El suelo está compuesto por tres fases: fase sólida, fase líquida y fase gaseosa. Una de las características importantes del suelo se refiere al tamaño de las partículas constituyentes de la fase sólida del mismo, la cual está constituida por diferentes partículas minerales de tamaño variable, conocidas como arenas, limos y arcillas, en función del diámetro de las mismas, donde las arenas tienen un diámetro entre 2 y 0.05 mm., los limos entre 0.05 y 0.002 mm., y las arcillas poseen diámetros inferiores a



0.002mm. Los contenidos de estas tres fracciones minerales del suelo permiten clasificarlos texturalmente usando el denominado triángulo textural (Fig.1).

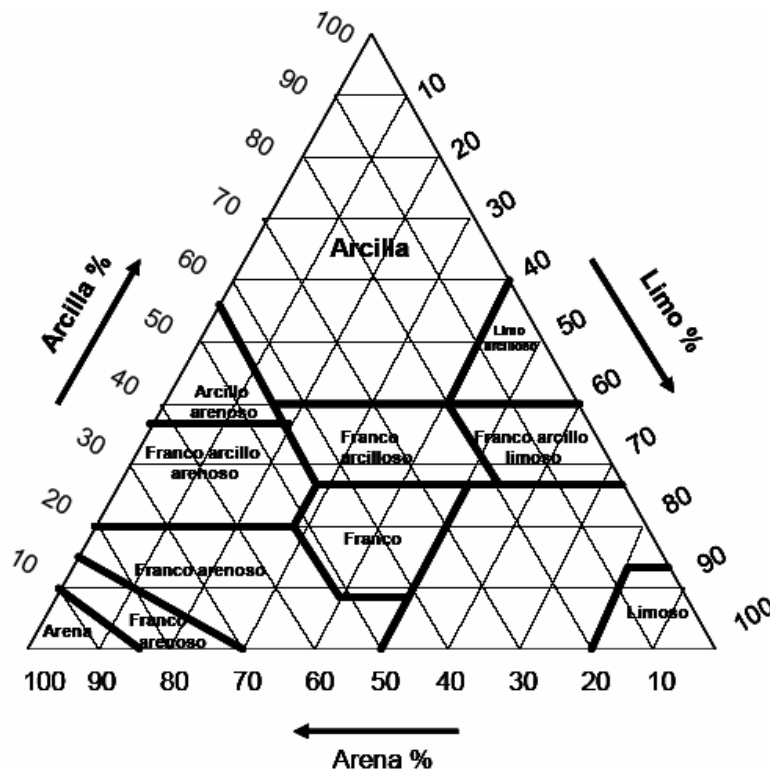


Figura n°1: Triángulo de textura del sistema de clasificación de la USDA. (Tomado de Fernandez *et al*, 2006).

De esta manera, pueden representarse cuatro grupos de suelos:

- **Suelo Arenoso:** La arena representa más del 70% de la fracción sólida del suelo.
- **Suelo Arcilloso:** La arcilla representa un mínimo de 35% en la fracción sólida del suelo, y en la mayoría de los casos más del 40% de la misma
- **Suelo Limoso:** Los limos representan más del 80% de la fracción sólida del suelo.
- **Suelo Franco:** Un suelo franco ideal podría ser definido como una mezcla de arena, limo y arcilla; pero las propiedades que estas fracciones ofrecen al suelo son aproximadamente iguales. La mayoría de los suelos de importancia agrícola, normalmente pertenecen a este grupo textural.



1.3 Naturaleza y propiedades del suelo

Como se ha mencionado anteriormente, el suelo está compuesto por tres fases: sólida, líquida y gaseosa. Además de esto, en el suelo se tiene la presencia de microorganismos que vendrían siendo una cuarta fase constituyente del suelo; es la naturaleza y la interrelación de estas fases la que determina la naturaleza y propiedades de los suelos. Entre estas propiedades se pueden mencionar:

1.3.1 Materia Orgánica: La materia orgánica representa, aproximadamente, el 5% del volumen de un suelo ideal. A pesar de ser un porcentaje relativamente pequeño, su presencia es altamente importante en el crecimiento de las plantas. La adición de residuos orgánicos al suelo, provenientes de plantas y animales, y su posterior descomposición por los microorganismos constituyen dos procesos que determinan el nivel al cual se acumula la materia orgánica en los suelos. La materia orgánica en el suelo puede afectar el destino de compuestos químicos orgánicos que puedan llegar al suelo, en varias vías que incluyen la adsorción y partición, solubilización, fotodescomposición, degradación por hidrólisis, entre otras, las cuales controlan en gran medida el destino de cualquier contaminante (Murray, 1994).

- *Influencia de la materia orgánica sobre algunas propiedades de los suelos*

Entre los efectos de la materia orgánica sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo se pueden mencionar:

- Mejora la agregación y estabilidad de los agregados del suelo reduciendo la susceptibilidad a la escorrentía y a la erosión.
- Aumenta la capacidad de retención de humedad de los suelos, particularmente en aquellos de textura arenosa.



- Tiene influencia sobre el color de los suelos, estando generalmente asociados los colores oscuros con un mayor contenido de materia orgánica.
- Es responsable de un alto porcentaje de la capacidad de intercambio catiónico (CIC).
- En la mineralización de la materia orgánica se liberan cantidades apreciables de N, S, P y algunos micronutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas.
- Algunos óxidos amorfos en el suelo pueden formar complejos con la materia orgánica, disminuyendo la fijación del fósforo hacia formas no aprovechables. (Casanova, 2005).

1.3.2 Humedad o Contenido de Agua: La presencia del agua en la superficie del suelo es vital para el crecimiento de las plantas, no sólo porque las mismas necesitan el agua para sus procesos fisiológicos, sino también porque el agua contiene en solución los nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas. Así mismo, el agua en el suelo controla también el aire y la temperatura en el mismo. Debe considerarse también que el contenido de agua en el suelo tiene gran influencia en el transporte de difusión líquida o gaseosa de diversas sustancias, en donde la difusión líquida aumenta a mayor contenido de agua, mientras que la difusión gaseosa disminuye ante esta misma situación.

El agua es un medio de transporte en dirección horizontal y vertical, principalmente para sustancias considerablemente polares como los alcoholes, seguidos por los aromáticos y finalmente los alifáticos (Tolgyessy, 1993).

1.3.3 Aire en el suelo: Por aireación de un suelo se entiende el intercambio gaseoso del oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂), entre el aire en el suelo y el aire atmosférico. Como resultado del proceso de respiración de las raíces de las



plantas se consume O_2 , por lo tanto, el aire en el suelo tiende a aumentar su concentración de CO_2 y a disminuir su concentración de O_2 . Se hace necesario entonces un mecanismo de renovación de O_2 en el suelo para un óptimo funcionamiento de las raíces y de los microorganismos (Casanova, 2005; Buckman y Brady, 1966).

1.3.4 Temperatura del suelo: La temperatura de los suelos es una propiedad básica, que tiene un papel muy importante en la formación y meteorización de los mismos, en la descomposición de la materia orgánica, reacciones químicas, actividad de los microorganismos y crecimiento de las plantas (Casanova, 2005).

1.3.5 Textura: La textura de un suelo se refiere a la proporción relativa de arena, limo y arcilla expresados como porcentajes en peso. A diferencia de otras propiedades del suelo, la textura es una propiedad permanente de los mismos.

La lixiviación en suelos de texturas gruesas (suelos arenosos) es mucho más rápida que en suelos de texturas finas (suelos arcillosos), los cuales tienen mayor capacidad de retener contaminantes y prevenir su alcance a aguas subterráneas. Además de esto, otros parámetros del suelo, como la permeabilidad y el espacio poroso, dependen de la textura del mismo (Miller, 2004).

- *Influencia de la textura sobre algunas propiedades y cualidades del suelo*

La arena, el limo y la arcilla contribuyen con algunas características de los suelos. La arcilla, conjuntamente con la materia orgánica, aumenta la capacidad de los suelos para retener agua y nutrientes, mientras que las partículas más grandes sirven como soporte del sistema radical de las plantas y ayudan al suelo a ser más permeable y aireado.



Los suelos de textura arenosa son generalmente permeables al aire, agua y raíces, pero normalmente tienen ciertas limitaciones. Una de ellas es la baja capacidad de retener el agua aprovechable para las plantas y la segunda es que son suelos con baja capacidad de suministro de nutrientes (Casanova, 2005).

Estas dos limitaciones están relacionadas a la poca área superficial de las partículas de estos suelos, los cuales deben recibir aplicaciones frecuentes de agua y nutrientes para ser altamente productivos

Debido a su alta permeabilidad, se corre el riesgo de perder fertilizantes por lavado, sin embargo, son suelos capaces de soportar suficiente peso sin compactarse. La mayoría de los poros son grandes (macroporos), y generalmente son responsables de la aireación de los suelos.

Los suelos de textura arcillosa tienen una gran área superficial en sus partículas, por lo tanto, tienen una mayor capacidad de retener agua aprovechable y nutrientes en forma disponible para las plantas. Son suelos de baja permeabilidad y las posibilidades de pérdida de nutrientes por lavado son mucho menores que en el caso de los suelos arenosos (Miller, 2004).

La mayoría de los poros en los suelos arcillosos son pequeños (microporos) y normalmente están llenos de agua, por lo que generalmente la aireación es inadecuada. Estos suelos, cuando se encuentran húmedos, son sumamente blandos y tienen la tendencia a adherirse a cualquier superficie, en contraste, son muy duros cuando se secan, y tienden a compactarse con gran facilidad. Es por ello que las operaciones de labranza requieren de mucha más potencia en estos suelos que en los suelos arenosos, por lo que, en función de esta característica, se ha atribuido el nombre de **pesados** para los suelos arcillosos y **ligeros** para los suelos arenosos (Casanova, 2005).



Los suelos de textura franco – francolimosa son generalmente los mas deseables, ya que tienen suficiente arcilla como para retener cantidades adecuadas de agua y nutrientes, y además poseen una porosidad apropiada, lo cual permite una buena aireación.

En la tabla 1 se muestra en forma cualitativa la influencia de la textura sobre algunas propiedades de los suelos.

Propiedad	Textura		
	Arenosa	Franco - Francolimosa	Arcillosa
Capacidad de Agua aprovechable	Baja	Media - Alta	Alta
Permeabilidad	Alta	Media	Baja
Compactación	Baja	Media	Alta
Nutrientes	Baja	Media	Alta
Macroporosidad	Alta	Media	Baja
Área superficial	Baja	Media	Alta

Tabla n°1: Influencia de la textura sobre algunas propiedades de los suelos (Tomado de Casanova, 2005).

1.3.6 Profundidad del nivel freático: Generalmente, la profundidad del nivel freático en un suelo determina que el suelo esté saturado o no, lo cual, generalmente, determina el tiempo y el espacio para la retención y degradación de posibles contaminantes, previo a su penetración en las aguas subterráneas, dado esto por las propiedades de retención del perfil del suelo (Murray, 1994).

1.3.7 Estructura: El arreglo de las partículas minerales constituyentes del suelo en unidades mas grandes recibe el nombre de estructura del suelo, y generalmente ocurre debido a la tendencia de las partículas más finas a mantenerse juntas. Las unidades de la estructura de un suelo se denominan agregados, los cuales pueden



tener diferentes grados de desarrollo y varios tamaños, sin embargo, es posible encontrar suelos sin agregados, especialmente aquellos que tienen un bajo contenido de arcilla.

Los agregados del suelo también pueden clasificarse de acuerdo a su forma, reconociéndose cuatro formas principales: esférica, laminar, blocosa y prismática. Estas cuatro formas dan origen a 7 tipos de estructura, que se describen brevemente a continuación:

- Estructura Granular: agregados relativamente no porosos, pequeños y esferoidales, sueltos.
- Estructura Granular porosa: agregados relativamente porosos, pequeños y esferoidales, sueltos.
- Estructura Laminar: agregados laminares. A menudo las láminas se superponen e impiden la permeabilidad.
- Estructura Blocosa: agregados en forma de bloque, bordeados por otros agregados cuyas caras angulares bien definidas forman el molde para el agregado. A menudo se quiebra en agregados más pequeños.
- Estructura Blocosa sub-angular: agregados en forma de bloque, bordeados por otros agregados cuyas caras redondeadas y sub-angulares forman el molde para el agregado.
- Estructura Prismática: agregados parecidos a una columna sin las puntas redondeadas. Los otros agregados prismáticos forman el molde para el agregado. Algunos de estos prismas se quiebran en bloques angulares más pequeños.
- Estructura Columnar: agregados parecidos a una columna con puntas redondeadas limitadas lateralmente por otros agregados columnares que forman el molde para el agregado.



Dependiendo de la estructura del suelo, se pueden presentar fisuras o grietas que sirven como vía de transporte, permitiendo así corrientes transitorias de grandes volúmenes de contaminantes a las aguas subterráneas. En ausencia de tales fisuras, la agregación estructural de los suelos induce un flujo más rápido en los macroporos de los interagregados que dentro de los microporos, en los cuales los contaminantes potenciales pueden ser retenidos (Briceño y Méndez, 2006).

1.4 Los organismos del suelo

La flora y la fauna constituyen el gran número de organismos que viven en el suelo. La mayor parte de estos organismos son tan pequeños que se requiere de un microscopio para poder observarlos. En la tabla n°2 se indican los grupos de organismos más importantes presentes en el suelo.

Como se ha mencionado anteriormente, los componentes principales de un suelo son la parte sólida, aire, agua y la materia orgánica. A pesar de que los organismos vivientes son un componente importante del suelo y de que existen en un gran número, generalmente no representan un porcentaje significativo del peso del suelo, sin embargo, las funciones que ellos desempeñan son sumamente importantes dentro del suelo. Una de esas funciones es la descomposición de restos vegetales y animales, que sirven como fuente de energía para los organismos. Otra función importante tiene relación con el mantenimiento de una buena estructura, espacio poroso y permeabilidad, producidas generalmente por las raíces de las plantas, lombrices de tierra, insectos e inclusive algunos roedores.

Mientras la acción de la microflora es fundamentalmente la descomposición química de los residuos vegetales y animales, la acción de la fauna es tanto física como



química, ya que puede tanto transportar partes vegetales de un sitio a otro como favorecer algunas reacciones químicas dentro del suelo.

Fauna	MACRO	Pequeños mamíferos Hormigas y bachacos Lombrices de tierra Arañas Comejenes
	MICRO	Nemátodos Protozoarios Rotíferos
Flora		Bacterias Algas Hongos Actinomicetos

Tabla n°2: Grupos de organismos más importantes presentes en el suelo (Tomado de Casanova, 2005).

Los organismos del suelo pueden clasificarse en base a la fuente de energía y carbono que ellos obtienen para desarrollar sus funciones metabólicas. Los organismos autótrofos son aquellos organismos que obtienen su propia energía, algunos de la luz y el carbono del CO₂ del aire, es decir, son capaces de realizar el proceso fotosintético, por lo que son denominados de forma más adecuada, organismos fotoautótrofos, sin embargo, algunos de los organismos autótrofos obtienen su energía a partir de reacciones químicas inorgánicas (en lugar de la luz), por lo que se les denomina quimioautótrofos.

Los organismos heterótrofos obtienen carbono y energía de la descomposición de materiales orgánicos. La mayoría de los microorganismos del suelo pertenecen a este grupo: la microfauna, la mayor parte de las bacterias, los hongos y los actinomicetos.

En base a los requerimientos de oxígeno, los organismos del suelo pueden clasificarse en aeróbicos y anaeróbicos; estos últimos se subdividen en: anaeróbicos obligados y anaeróbicos facultativos. Los aeróbicos, son aquellos organismos que requieren del oxígeno del aire para determinar sus funciones. Los anaeróbicos son



aquellos que no requieren del oxígeno del aire para sobrevivir, los obligados o estrictos, no pueden vivir en presencia de oxígeno, y los facultativos no requieren de oxígeno para desempeñar normalmente sus funciones vitales, es decir utilizan el oxígeno pero pueden adaptarse a la falta del mismo.

La actividad de los organismos en el suelo no es constante pues se ve afectada por la influencia de diversos factores, tales como temperatura, oxígeno, pH, y los nutrientes presentes en el mismo. De esta manera, dependiendo de las propiedades de un determinado suelo, se tendrá un determinado grupo de microorganismos, tal como se indica a manera de ejemplo en la tabla n°3.

Factor	Hongos	Actinomicetos	Bacterias
Energía y fuente de Carbono	Heterótrofos	Heterótrofos	Quimioautótrofas Heterótrofos
Requerimiento de Oxígeno	Aeróbicos	Aeróbicos	Aeróbicos y anaeróbicos obligados y facultativos
pH del suelo	Generalmente ácido	Neutro-alcalino	Generalmente neutro-alcalino
Número /gramo de suelo	10^5-10^6	10^7-10^8	10^8-10^9
Tasa de crecimiento	Rápida	Lenta	Rápida
Relación C/N preferida (%C %N)	10 (50:5)	6 (50:8.5)	5 (50:10)

Tabla n°3: Factores que afectan la actividad de los organismos del suelo (Tomado de Casanova, 2005).



2. Crudo

2.1 Definición

El crudo puede definirse como una mezcla de hidrocarburos (saturados y aromáticos) y de compuestos orgánicos heteroatómicos poliaromáticos de estructura compleja y de alto peso molecular (resinas y asfaltenos), que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre (Tissot y Welte, 1984).

2.2 Composición del crudo:

A pesar de la diversidad de crudos que existe a nivel mundial, resulta sorprendente que sus composiciones elementales normalmente son muy parecidas y están comprendidas en rangos relativamente estrechos: Carbono (83-87) %, Hidrógeno (10-14) %, Azufre (0.05-6) %, Nitrógeno (0.1-2) % y Oxígeno (0.05-1.5) % (Instituto Mexicano del Petróleo, 2007).

2.3 Clasificación del crudo basada en la gravedad API:

La gravedad API de un crudo, denota la relación correspondiente de peso específico del crudo con respecto al agua (Carrillo, 2007). A modo general se define como (Perry, 1992):

$$Gravedad_{API} = \frac{141.5}{SG(60/60^{\circ}F)} - 131.5$$

El análisis de la fórmula demuestra que la gravedad API se comporta de manera inversa a la gravedad específica del material. El agua es la base para este sistema; de esta manera, el agua tiene una gravedad API de 10. Para los crudos y sus fracciones los valores de gravedad API pueden variar de menos de 10 a más de 50, pero para la mayoría de los crudos se hallan comprendidos en el intervalo de 20 a 45 °API. Los



hidrocarburos más livianos tienen valores de la gravedad API incluso por encima de 52 °API (Barberii, 1982).

Sobre la base de la gravedad API, los crudos pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Condensados naturales*: poseen una gravedad API mayor o igual a 50.
- Crudos Livianos*: poseen una gravedad API comprendida entre 30,1 y 49,9.
- Crudos Medianos*: poseen una gravedad API comprendida entre 30 y 22,1.
- Crudos Pesados*: poseen una gravedad API comprendida entre 22,1 y 10,1.
- Crudos extrapesados*: poseen una gravedad API menor o igual a 10.

3. Métodos de recuperación de suelos contaminados

El manejo adecuado de los desechos generados en las actividades petroleras tiene cada vez mayor relevancia desde el punto de vista ambiental. Un tratamiento y disposición inadecuada puede conllevar a problemas de contaminación de suelos, subsuelos y aguas subterráneas, lo cual se traduce en deterioro de la biodiversidad, daños significativos a los ecosistemas y problemas de salud. Por ello es necesario contar con tecnologías eficientes y seguras ambientalmente, que permitan el tratamiento y en general, el manejo correcto de diferentes tipos de desechos (Infante, 2001)².

Las tecnologías que existen son diversas, pero entre ellas destacan: biotratamiento, incineración, desorción térmica, solidificación/estabilización, inyección, disposición en relleno y lavado. La selección o identificación de la mejor opción tecnológica depende de un conjunto de factores, entre ellos destaca el tipo de desecho, el cual varía en función de sus características físico químicas, volumen a manejar, costos y condiciones del área. Un mismo desecho puede ser tratado con diferentes



tecnologías desde el punto de vista técnico; sin embargo, los costos y el área de la generación pueden definir la selección de una en particular (Infante, 2001)¹.

Las tecnologías de remediación pueden agruparse de diferentes maneras, en base a los siguientes principios: lugar en que se realiza el proceso de remediación, estrategia de remediación, y tipo de tratamiento (Van Deuren *et al.*, 1997; US EPA, 2001).

- De acuerdo al lugar donde se realiza el tratamiento de remediación:

In situ: El tratamiento se realiza en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.

Ex situ: En este caso se requiere realizar una excavación, dragado ó cualquier otro proceso, para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento, que puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera de él (*off site*).

- Las estrategias de remediación pueden usarse separadas o combinadas:

Destrucción ó modificación de los contaminantes: Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.

Extracción ó separación: Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, en base a sus propiedades físicas ó químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica, etc.).

Aislamiento ó inmovilización: En este caso se trata de estabilizar o solidificar los contaminantes por métodos físicos o químicos.

- Por otra parte, el principio de remediación ó funcionamiento determina tres tipos distintos de tratamientos:



Tratamientos térmicos: Por medio de la acción del calor se logra la volatilización (separación), quema, descomposición ó fusión (inmovilización) de los contaminantes en un suelo.

Tratamientos fisicoquímicos: En base a las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes ó del medio contaminado, se separa ó destruye el contaminante.

Tratamientos biológicos (Biorremediación): Esta metodología utiliza el metabolismo de organismos vivos (plantas, hongos, bacterias) para degradar ó transformar los contaminantes a productos metabólicos inocuos ó de menor toxicidad.

Tecnologías de Remediación Térmica

La mayoría de estos métodos suelen aplicarse *ex situ*. Producen vapores, residuos sólidos (cenizas) y, en ocasiones, residuos líquidos que deben ser tratados. Si bien poseen la ventaja de ser procesos rápidos, tienen el inconveniente de ser los más costosos y en la mayoría de los casos destruyen el suelo.

Las tecnologías térmicas más importantes son: *Incineración, Vitricación, Pirólisis y Desorción Térmica* (Sepúlveda y Trejo, 2002).

Incineración:

Se utilizan altas temperaturas de operación, que van desde los 870 a los 1200 °C, para lograr volatilizar y quemar compuestos orgánicos y halogenados, en presencia de oxígeno. Se lleva a cabo de forma *ex situ*.



Vitrificación:

Este proceso puede llevarse a cabo *in situ* o *ex situ*, y se realiza mediante una corriente eléctrica que funde los suelos contaminados, con temperaturas que van de 1600 a 2000 °C. Estabiliza la mayoría de los contaminantes inorgánicos y destruye los orgánicos. Con esta tecnología se produce un material cristalino químicamente estable que no produce lixiviados, en el cual quedan incorporados los compuestos inorgánicos. Durante el proceso, las altas temperaturas provocan la destrucción o remoción de los materiales orgánicos (US EPA, 2001).

Pirólisis:

Mediante este método se produce la descomposición química de materiales orgánicos inducida por calor en ausencia de oxígeno. Se realiza a presión y a temperaturas de operación mayores de 430 °C, en hornos y equipos similares a los utilizados para la incineración, pero se deben operar a temperaturas menores y en ausencia de aire (US EPA 2001).

Desorción Térmica (DT):

La DT consiste en calentar el suelo contaminado por compuestos orgánicos hasta temperaturas entre 90 y 540 °C, con el fin de vaporizar los contaminantes y por consiguiente separarlos del suelo. Los contaminantes liberados son dirigidos hasta un sistema de tratamiento de gases, con el uso de un acarreador de gases o un sistema de vacío. Es un proceso de separación física, que puede o no ser destructivo dependiendo de las temperaturas a las cuales se calienta el suelo (Pellini, 2006).



Tecnologías de Remediación Físicoquímicas

La mayoría de estas tecnologías se aplican *in situ* y se basan en el aprovechamiento de las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes ó del material contaminado, para destruir, separar ó contener la contaminación. Entre ellas se encuentran:

Extracción por Solventes:

Como su nombre lo indica, se disuelven los contaminantes utilizando solventes orgánicos para así removerlos del suelo, a través de la circulación del solvente.

El líquido que resulta del lavado de suelo y de la extracción por solventes requiere de un tratamiento posterior para remover ó destruir los contaminantes (Sellers, 1999; US EPA, 2001).

Extracción de Vapores (EV):

Esta tecnología, también conocida como *ventilación del suelo, vaporización y volatilización*, es una metodología en la que se aplica vacío para inducir un flujo controlado y continuo de aire, removiendo así contaminantes volátiles y semivolátiles del suelo (Riser-Roberts, 1998).

Inundación del Suelo:

Se aplican al suelo o se inyectan en cuerpos de agua cercanos, para aumentar el nivel en la zona contaminada, grandes cantidades de agua para favorecer el paso de los contaminantes hacia el cuerpo de agua. Ésta es extraída y tratada en forma separada. Este tratamiento puede llevarse a cabo con la incorporación de algún aditivo.



Lavado de Suelos:

Los contaminantes son removidos mediante la circulación de soluciones acuosas. El suelo es realmente “lavado” y de esta manera se reduce el volumen del material contaminado, ya que las partículas finas con el contaminante sorbido en ellas son extraídas, quedando retenidas en la solución acuosa.

Remediación Electrocinética (RE):

Esta tecnología está en desarrollo. Aprovecha las propiedades conductivas del suelo, cuyo objetivo es separar y extraer contaminantes orgánicos e inorgánicos (metales) de suelos, lodos y sedimentos, con el uso de un campo eléctrico que permite remover las especies cargadas (iones). Implica la aplicación de una corriente directa de baja intensidad entre un electrodo positivo y uno negativo (US EPA, 2001).

Solidificación/Estabilización (S/E):

En esta técnica el suelo contaminado es mezclado con aditivos para inmovilizar los contaminantes, con el objeto de disminuir ó eliminar la lixiviación. La solidificación se refiere a las técnicas que *encapsulan* (atrapan físicamente) al contaminante, formando un material sólido.

La estabilización limita la solubilidad o movilidad del contaminante, generalmente por la adición de materiales, como cemento Portland, cal o polímeros, que aseguren que los constituyentes peligrosos se mantengan en su forma menos móvil o tóxica. La S/E puede realizarse tanto *in situ* como *ex situ*.

Los métodos mencionados tienen la ventaja de necesitar equipos accesibles y pueden utilizarse para un amplio rango de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos,



pero tienen el inconveniente de que generan residuos que a su vez necesitan tratamiento y disposición final, lo que encarece el proceso.

Tecnologías de recuperación biológicas

Estas tecnologías se encuentran englobadas dentro de la *biorremediación*, la cual, como ha sido mencionado anteriormente, involucra tratamientos que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar ó transformar compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos ó de menor toxicidad (Van Deuren *et al.*, 1997).

Para la aplicación de estas tecnologías se pueden emplear organismos *autóctonos*, propios del sitio contaminado, ó *exógenos*, de otros sitios. También puede realizarse *in situ* o *ex situ* y en *condiciones aerobias* (en presencia de oxígeno) ó *anaerobias* (sin oxígeno).

La degradación de contaminantes orgánicos por parte de los microorganismos constituye un proceso que se produce en forma natural en el ambiente y que depende de las actividades catabólicas de los mismos, ya que éstos utilizan los contaminantes como fuente de carbono y energía para su subsistencia. Sin embargo, dicho proceso se encuentra, la mayoría de las veces, limitado por factores químicos, físicos y medioambientales (Eweis *et al.*, 1999; Sepúlveda, 2002).

El grado de biodegradación depende principalmente de la toxicidad y de la concentración inicial del contaminante, su biodegradabilidad, las propiedades del suelo contaminado y el sistema de tratamiento que se seleccione. La eficacia de las medidas biocorrectivas es limitada en lugares con una alta concentración de compuestos tóxicos



para los microorganismos, especialmente, si dichos compuestos tóxicos se encuentran en grandes cantidades.

Aún cuando no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han utilizado con éxito para el tratamiento de suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP's); solventes (Benceno y Tolueno); explosivos (TNT), clorofenoles (Pentaclorofenol-PCP); plaguicidas (Ácido 2,4-Diclorofenoacético: 2,4-D); conservadores de madera (creosota) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), entre otros (Van Deuren *et al.*, 1997; Semple *et al.*, 2001).

Asimismo, la biorremediación de suelos ha demostrado ser una tecnología eficaz para el tratamiento de la contaminación por petróleo, debido a que gran parte de los componentes del crudo y sus productos refinados son biodegradables (Van Hamme *et al.*, 2003).

Otra tecnología de biorremediación que cada vez tiene mayor importancia es la *Fitorremediación*, que es un proceso que utiliza plantas superiores para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto en forma *in situ* como *ex situ* (Hutchinson *et al.*, 2001).

En la actualidad, las tecnologías de recuperación biológicas son de uso preferencial, debido a que presentan diversas ventajas. Sin embargo, al momento de pensar en la aplicación de este tipo de tratamientos se deben tener en cuenta una serie de factores que pueden constituir desventajas, tales como:



- El tiempo requerido para completar la degradación es mayor que en los tratamientos físico químicos.
- El contaminante debe ser biodegradable.
- No siempre se puede predecir la efectividad.
- El éxito del proceso depende de la destreza para mantener las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano, para lo cual se debe verificar que el contaminante no sea tóxico para los microorganismos y que el suelo sea apto para los mismos.

1. Proceso de Biorremediación

La biorremediación es la aplicación de un proceso biológico, mediante el cual los microorganismos autóctonos (bacterias, hongos, levaduras) transforman las sustancias orgánicas tóxicas presentes en un crudo, aceite de perforación, o lodo petrolizado, en presencia de oxígeno suficiente (condiciones aeróbicas), en componentes como CO₂, H₂O y masa microbiana. En ausencia de oxígeno (condiciones anaeróbicas) los contaminantes son metabolizados y convertidos en metano y masa microbiana.

Este proceso biológico se conoce como biodegradación y está regulado por una serie de factores abióticos, tales como: humedad, pH, oxigenación, disponibilidad de nutrientes, entre otros. Esta tecnología es muy eficiente en los trópicos, dado que las altas y constantes temperaturas, prácticamente durante todo el año, permiten mantener una población microbiana diversa y activa, lo cual se traduce en una alta tasa de biodegradación del hidrocarburo, o fracciones de saturados y aromáticos, presentes en los desechos orgánicos de la industria petrolera (Hinchee *et al.*, 1994).



Tal como se mencionó anteriormente, la biorremediación puede llevarse a cabo en dos modalidades, *in situ* y *ex situ*. La principal ventaja del proceso *in situ* es permitir que el suelo sea tratado en el lugar de origen, sin excavación, lo cual resulta en una disminución del costo en la remoción del suelo del sitio, esto permite salvar los costos sobre métodos que envuelven la excavación y transporte de los suelos contaminados. También presenta ventajas en cuanto al tratamiento simultáneo tanto de aguas subterráneas como de suelos contaminados (Infante, 2001)¹.

La experiencia señala que la efectividad de este proceso depende estrechamente de las características y las cantidades del contaminante depositado en el sitio donde se va a emplear el tratamiento, tales como: temperatura, humedad, radiación solar y viento, presencia de microorganismos con capacidad de metabolizar hidrocarburos, pH del suelo, disponibilidad de oxígeno, nutrientes en las capas superiores del suelo, capacidad de retención de agua en el suelo (CRA) y textura en los primeros horizontes del terreno (Hinchee *et al.*, 1994).

Se ha observado experimentalmente que las mayores tasas de bio-oxidación de residuos de petróleo en el campo son realizadas por las bacterias aeróbicas, lo cual indica la necesidad de mantener aireados los suelos mediante actividad de rastreo, para que de esta forma se vea optimizada la degradación de los hidrocarburos (Bastardo, 1999 citado por Hermoso, 2003)

La cantidad y características de los hidrocarburos representan unas de las variables más importantes dentro del proceso de biodegradación, ya que se ha determinado que descargas exageradas de petróleo generan una significativa disminución en el intercambio gaseoso suelo-aire, como consecuencia de la saturación de los espacios porosos en los horizontes superficiales del suelo (Bastardo, 1999 citado por Hermoso, 2003). Esta situación crea condiciones de anoxia que dificultan el



desarrollo radicular de las plantas, altera la capacidad de infiltración del agua y reduce las comunidades de microorganismos (Stebbing, 1970).

La habilidad o capacidad que presentan ciertos microorganismos para utilizar ciertas fracciones presentes en el crudo como fuente de carbono y energía no se encuentra restringida a unos pocos géneros, sino comprende diversos grupos, como son: bacterias, hongos, levaduras y algas (Hinchee *et al.*, 1994).

Con respecto a los factores climáticos es importante señalar que las altas temperaturas, humedad y la fuerte radiación solar son condiciones favorables para que la biota acelere el proceso de metabolización de los hidrocarburos. En referencia al primero, se ha observado que la degradación del petróleo en el suelo puede presentarse en rangos de temperatura que van desde $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta situación se debe básicamente al incremento en el proceso metabólico de los microorganismos del suelo, su crecimiento poblacional y a la amplitud en la variedad de las especies con capacidad de desdoblar hidrocarburos (Zobell, 1973).

En el caso particular de la humedad, se señala que la misma es requerida por los microorganismos para cubrir sus necesidades hídricas y nutricionales dentro de su configuración celular. Huddleston y Cresswell (1976) determinaron que el valor de humedad más aconsejable para el proceso de desdoblamiento de residuos de petróleo es aproximadamente el 20% del peso total del complejo residuo/suelo. Es decir, que por cada kilo de suelo-crudo, se requieren cerca de 200 gramos de agua.



En cuanto a los nutrientes necesarios, como en toda actividad biológica, los mismos representan una variable clave en el proceso de oxidación microbiana. Entre los mas requeridos se encuentran todos aquellos compuestos ligados al nitrógeno, potasio, fósforo, sodio, calcio, zinc, magnesio, hierro, molibdeno, azufre, manganeso, etc. (Casanova, 2005) . La aplicación de algunos macronutrientes en forma de fertilizantes podría duplicar la tasa de degradación microbiana de lodos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos. Para suelos sin fertilización, se ha determinado que la disminución de hidrocarburos estaba por el orden de 0.25 Kg. de petróleo / m³ suelo-día. (Vanlooche et al, 1976 citado por Hermoso, 2003).

Atlas (1991) estableció que las bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo en el suelo actúan como factores limitantes en la biodegradación. También observó experimentalmente que las relaciones crudo / nitrógeno y crudo / fósforo no deben exceder de 10/1 y 100/1 respectivamente, ya que se podría aumentar en forma negativa los niveles de nitratos y fosfatos en las aguas superficiales y subterráneas.

En cuanto al pH, se ha determinado que rangos de pH entre 6 y 8, así como la presencia de arcillas con elevada capacidad de intercambio catiónico, dan al suelo una condición propicia para la degradación de los hidrocarburos, ya que la mayoría de las bacterias capaces de metabolizar compuestos de hidrocarburos se desarrolla satisfactoriamente en pH neutro. (Atlas, 1991)



Ventajas y Desventajas de la Biorremediación

En la tabla n°4 se resumen las ventajas y desventajas de la tecnología de biorremediación.

Ventajas	Desventajas
Proceso natural, reconocido por la EPA*, como una de las tecnologías mejor demostrada en campo.	Tecnología más lenta, comparada con otras, como incineración, solidificación/estabilización, o desorción térmica.
No requiere de maquinarias y/o equipos sofisticados. Aceptada como una de las tecnologías más amigables con el ambiente	Requiere conocimientos específicos para su aplicación efectiva, pues se corre el riesgo, en caso contrario, de diluir, volatilizar o percolar los contaminantes.
La velocidad de la reacción de biodegradación es dos a tres veces superior en nuestro país vs. países templados.	No aplica si existen concentraciones de metales por encima de los límites establecidos en el TCLP**, por lo que habría que combinarlo con otra tecnología.
No requiere excavación y transporte del desecho (caso específico de las fosas).	
Costos menores que los de otras tecnologías como incineración, desorción térmica, solidificación/estabilización. En el orden de 30-270 \$/m ³	

Tabla n°4: Ventajas y desventajas de la biorremediación (Tomado de Hermoso, 2003).

* siglas de la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (Environmental Protection Agency).

** siglas del test de lixiviación de los EE.UU (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) que fue adoptado como norma venezolana COVENIN N° 2797-91.



Antecedentes de la Investigación

A continuación se presentaran diferentes trabajos de investigación relacionados al tema desarrollado en el presente proyecto:

- **Infante *et al.* (1999):** Aplicaron la técnica de biorremediación a 14 FOSAS de la Refinería de Puerto La Cruz, Edo. Anzoátegui, Venezuela, basada en la bioestimulación de microorganismos autóctonos, mediante la adición de nutrientes, ajustes de pH, control de humedad y mantenimiento de niveles de oxígeno adecuados. La clave de este trabajo consistió en una óptima mezcla del material con agentes estructurantes a fin de mejorar la biodegradación del contaminante. Los resultados mostraron una reducción del 70% de las fracciones biodegradables luego de la aplicación de la técnica, permitiendo concluir que la biorremediación es una de las tecnologías más prometedoras para la restauración de áreas contaminadas.
- **Infante *et al.* (2001)¹:** Mediante diversos ensayos de campo y de laboratorio, determinaron que la adición de nutrientes y de agentes estructurantes a los suelos contaminados resulta en una bioestimulación exitosa de microorganismos autóctonos que degradan el hidrocarburo contaminante, confirmando así la importancia de la bioestimulación en el proceso de biorremediación, a fin de evitar la adición de microorganismos alóctonos como medio para incrementar el proceso de biodegradación del crudo.
- **Infante (2001)²:** Por medio de la industria petrolera venezolana, desarrollaron la tecnología de biodegradación INTEBIOS® (ambientalmente segura), para tratar gran



cantidad de desechos orgánicos, así como también el producto BIORIZE®, que permite acelerar o mejorar dicho proceso de biodegradación. La efectividad de la tecnología y el producto mencionados ha sido demostrada en campo de diversos ecosistemas y en varios desechos generados por la actividad petrolera, lo cual constituye un avance en cuanto a la recuperación de las diversas áreas impactadas.

- **Chaineau *et al.* (2004):** Estudiaron la influencia de la concentración de nutrientes en la biodegradación de un crudo añadido a una población microbiana en un suelo fértil, durante 150 días a través de microcosmos. Determinaron que en condiciones estrictamente aeróbicas la adición de nutrientes en una tasa adecuada es eficiente para la degradación de los hidrocarburos saturados en comparación con la remediación natural. Sin embargo, los resultados sugieren que un exceso de nutrientes reduce la asimilación de dichos hidrocarburos por parte de los microorganismos, mientras que en el resto de los hidrocarburos prácticamente no varía. Esto les permitió concluir que al momento de diseñar la biorremediación de un suelo contaminado por crudo, la relación C/N/P debería ser calculada en base a la concentración de hidrocarburos saturados, ya que la degradación de los mismos es la más sensible a la variación en la concentración de nutrientes.

- **Ayotamuno *et al.* (2006):** Estudiaron la biorremediación de un suelo destinado a la agricultura, contaminado por crudo, obteniendo como resultado que la aplicación de una creciente concentración de nutrientes, mediante la adición de fertilizantes, permite mejores tasas de biodegradación de los contaminantes en los suelos estudiados.



- **Gideon y Paschal (2006):** Realizaron un estudio mediante el uso de microcosmos o composteros, a escala de laboratorio, que reveló la efectividad de la remediación natural (la cual incluye biodegradación, foto-oxidación, evaporación, entre otros procesos), en conjunto con el mecanismo de aireación (con el cual se mantienen niveles de oxígeno adecuados) en la remediación de sedimentos contaminados por crudo presentes en el Delta del Niger.

- **Johnston *et al.* (2007):** Realizaron estudios de biomarcadores y señales de biodegradación a diversos núcleos pertenecientes a un acuífero arenoso afectado por derrames de crudo. La extensión relativa de la biodegradación fue determinada utilizando relaciones de compuestos parcialmente degradados y compuestos resistentes, tales como n-alcanos (n-C₁₇, n-C₁₈), pristano y fitano. La distribución de los biomarcadores y de los indicios de biodegradación permitió identificar al menos dos derrames de crudo en diferentes tiempos. La relación pristano/fitano obtenida permitió inferir una biodegradación aeróbica de los contaminantes; y se determinó que más del 80% del derrame fue remediado a través de la biodegradación y otros procesos constituyentes de la remediación natural.

- **Semple *et al.* (2007):** Realizaron una revisión bibliográfica acerca de las interacciones entre los microorganismos y los contaminantes orgánicos presentes en suelos contaminados. El objetivo de la investigación radicó en considerar la biodisponibilidad de los contaminantes como un factor influyente en la tasa de biodegradación de los mismos y, en tal sentido, para la biorremediación de los suelos contaminados. Para ello, se consideraron y aclararon diversos conceptos de biodisponibilidad, se relacionaron las definiciones de distintas medidas químicas y



microbiológicas de los contaminantes biodisponibles en el suelo; y se exploraron los mecanismos empleados por los microorganismos del suelo para atacar a los contaminantes orgánicos presentes. Los autores concluyen que es sumamente importante la comprensión y el estudio en campo de los aspectos desarrollados en el trabajo, a fin de orientarse a obtener un mejor entendimiento de cuan rápido y en qué medida un suelo contaminado puede ser recuperado.

- **Scheerr *et al.* (2007):** Realizaron un estudio acerca de la influencia de las diferentes fracciones del suelo en el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Para ello evaluaron dicho proceso en el tiempo (durante cuatro meses), tanto en las fracciones finas del suelo como en la fracción arena. Obtuvieron como resultado que el crudo presente en las fracciones finas del suelo muestra un alto porcentaje de biodegradación para un tiempo inicial, sin embargo, este porcentaje disminuye hasta hacerse despreciable al final del tiempo de estudio. En contraste, el crudo presente en la fracción arenosa del suelo fue degradado en menor medida (que aquel presente en las fracciones finas) en tiempos iniciales, pero se mantuvo relativamente constante durante el tiempo de estudio. Estos resultados les permitieron concluir que la composición y la textura del suelo influyen considerablemente en el proceso de biodegradación del crudo ya que influyen la distribución y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo.

Es necesario hacer notar que trabajos o publicaciones específicas acerca del estudio de la influencia de la textura del suelo en el proceso de biodegradación de un crudo escasean en la literatura. En la bibliografía consultada durante el tiempo de realización de este proyecto, no se encontraron publicaciones acerca de este tipo de estudio en zonas tropicales.



MARCO METODOLÓGICO

Con la finalidad de cumplir con los objetivos de este Trabajo Especial de Grado, se siguió una metodología conformada por diversas etapas que se explicaran a continuación. Es de hacer notar que el crudo utilizado es un crudo mediano (Guafita 1X), previamente caracterizado mediante análisis de Gravedad API, SARA y Biomarcadores (López y Lo Mónaco, 1995).

1. Revisión Bibliográfica

En esta primera etapa se realizó una búsqueda de trabajos y publicaciones actualizadas en el área de la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, con la finalidad de elaborar un soporte para el análisis y tratamiento de los datos experimentales obtenidos.

2. Propuesta Experimental:

2.1 Muestreo de los suelos utilizados:

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron dos tipos de suelo, denominados inicialmente como **A** y **B**, dichos suelos fueron obtenidos como se indica a continuación:

- El muestreo del suelo A se llevo a cabo en **área no intervenida** del Sector Las Cocuizas, ubicada a 278 msnm. Latitud N - 09° 01' 11,7" y Longitud O- 64° 27' 38,5"; en la comunidad Indígena Caico Seco, Municipio Aragua, El Tigre estado Anzoátegui. El muestreo del suelo se realizo en el mes de diciembre del 2007. Para ello se uso barreno en los primeros 20 cm de profundidad del suelo.



- El muestreo del suelo B se realizó en un morichal ubicado entre los ríos Sariapo y Ature, en el sur del estado Anzoátegui. Geográficamente el área de estudio se encuentra situada entre las coordenadas UTM N 275000 E 915000 y N 335000 E875000. El muestreo del suelo se realizó en el mes de febrero del 2008. Fueron muestreados los primeros 10 cm de profundidad del suelo.

2.2 Caracterización de los suelos:

Para la caracterización de los suelos a estudiar se utilizaron tres técnicas.

Determinación de la textura y el color de los suelos:

La determinación de la textura de los suelos se realizó mediante el método de Bouyucos o método del hidrómetro, el cual se basa en la relación entre la densidad de una suspensión y la cantidad de partículas de varios tamaños en dicha suspensión (Boul *et al*, 1981). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- El hidrómetro fue calibrado introduciéndolo cuidadosamente en un cilindro graduado que contiene 50 mL de solución 0,02M de pirofosfato de sodio y se completó hasta 1 L con agua destilada.
- Se tomó una muestra de suelo de 100,0g que previamente había sido secada a 105°C y se transfirió a un vaso de metal añadiéndole 50 mL de solución de pirofosfato de sodio 0,02M, y 125mL de agua destilada. La mezcla se dejó reposar por aproximadamente 10 minutos y seguidamente se colocó en un batidor eléctrico durante aproximadamente 15 minutos.
- Se transfirió cuantitativamente la mezcla a un cilindro graduado de 1L y se completó el volumen con agua destilada.



- Seguidamente se agitó el cilindro graduado, se tomó la temperatura de la suspensión, se introdujo el hidrómetro y se tomó la lectura del mismo a los 40 s y a las 2 h.

A cada lectura realizada se le hizo la corrección con la lectura de calibración. Así mismo, dado que el hidrómetro fue calibrado originalmente a 67°F (19,44 °C), se realizó igualmente la corrección respecto a la temperatura (Apéndice I).

Los porcentajes de arena limo y arcilla fueron calculados utilizando las siguientes fórmulas:

- % de arena= $100 - (\text{lectura corregida 40s/peso seco de muestra}) * 100$
- % de arcilla= $100 - (\text{lectura corregida 2h/peso seco de muestra}) * 100$
- % de limo= $100 - (\% \text{ arena} + \% \text{ arcilla})$

Una vez obtenidos dichos porcentajes se determinó la textura de los suelos utilizando el triángulo de clasificación textural (Figura 1).

El color de los suelos fue determinado, tomando una pequeña muestra de los mismos y comparándola visualmente con la escala de Munsell (Munsell,1973)(Figura n°2).

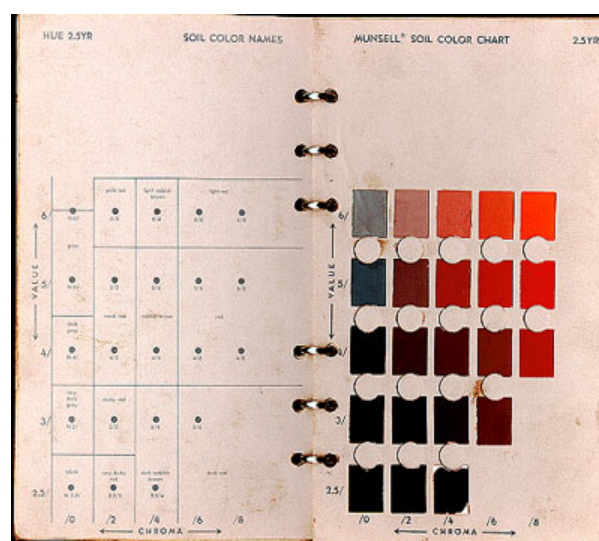


Figura n°2: Catálogo de Munsell



Difracción de rayos X:

Esta técnica permite determinar la composición mineralógica de la muestra. La interacción entre el vector electromagnético de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (tanto destructivas como constructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción (Skoog *et al*, 2001).

El método de difracción de rayos X permite deducir directamente conocimiento sobre el ordenamiento y el espaciamiento de los átomos en los materiales cristalinos, tales como dimensión de la celda unitaria, la estructura cristalina y tamaño del cristal, además permite inferir acerca de la homogeneidad y pureza de las muestras.

La identificación se lleva a cabo por el método de polvo cristalino, basado en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Así, si se encuentra igualdad entre los diagramas de las muestras y del patrón, se da por sentada su identidad.

El equipo que se utilizó para llevar a cabo este análisis es un difractómetro, marca BRUKER, AXS modelo Siemens D-8 ADVANCE. Para determinar las fases presentes en cada sólido se utilizó el programa JCPDS - ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1999).



Determinación de concentración de carbono total LECO

La determinación de las concentraciones de carbono total en cada uno de los suelos, se realizó en un equipo marca LECO® modelo C-144. Para ello se pesaron aproximadamente 170 mg de suelo pulverizado con 100 mg de acelerador en una celda de cuarzo-mullita que fue posteriormente introducida al equipo, obteniéndose una lectura que al relacionar con el peso de la muestra, permitió calcular la concentración de CT en % p/p. La curva de calibración fue realizada con patrones estándar LECO®.

Las concentraciones de carbono orgánico total (COT) se consideraron equivalentes a aquellas obtenidas con el LECO, debido a que el análisis por difracción de rayos X no reflejó fases minerales carbonáticas en las muestras de suelo estudiadas, así: $\% \text{COT} \approx \% \text{CT}$

2.2 Proceso de Biodegradación

En esta etapa se realizó la simulación a escala de laboratorio del proceso de biorremediación del suelo, a través de la biodegradación del crudo seleccionado. Esto con la finalidad de evaluar la cinética de remoción del crudo hasta un tiempo final de 90 días y el efecto de la adición de agente estructurante en cada tipo de suelo. A fin de evaluar cada una de las variables por separado, las muestras se dividieron en cuatro grupos de la siguiente manera:

Grupo 1 (G1): muestras de suelo (A) sin agente estructurante.

Grupo 2 (G2): muestras de suelo (B) sin agente estructurante.

Grupo 3 (G3): muestras de suelo (A) con agente estructurante.

Grupo 4 (G4): muestras de suelo (B) con agente estructurante.



La tabla n° 5 ilustra mejor lo antes indicado.

	Sin Agente estructurante	Con Agente estructurante
Suelo (A)	Grupo 1	Grupo 3
Suelo (B)	Grupo 2	Grupo 4

Tabla n° 5: Matriz de ensayos de Biodegradación

Cada grupo de ensayo correspondió a tres réplicas (composteros), lo que generó un total de 12 composteros. Para fabricarlos se emplearon bandejas de plástico de aproximadamente 35 cm de largo, 25 cm de ancho y 15 cm de profundidad, siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) Se organizaron e identificaron las bandejas por grupos, de la manera indicada anteriormente.



Figura n° 3: Bandejas etiquetadas y organizadas

- 1) Se agregaron 285 g del tipo de suelo correspondiente a cada bandeja.
- 2) Se agregaron 15 g del crudo Guafita 1X a cada bandeja, a fin de obtener una mezcla 5% p/p de crudo.

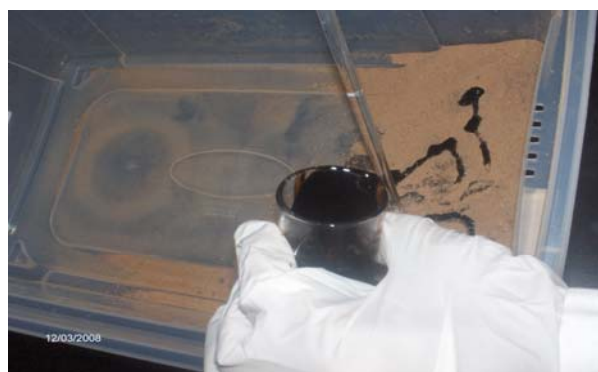


Figura n° 4: Adición del crudo al suelo



- 3) Se homogeneizó de forma manual, utilizando una varilla de vidrio.
- 4) A los grupos 3 y 4 se les añadió el agente estructurante, constituido por hojarasca, en una concentración de aproximadamente 13% p/p; y de igual forma se procedió a homogeneizar utilizando para ello una varilla de vidrio. La hojarasca provenía de hojas secas, recolectadas a la caída de los árboles de la Facultad de Ciencias. Estas fueron picadas finamente en secciones de 1-2 mm. aproximadamente.
- 5) Se añadieron los fertilizantes, satisfaciendo las relaciones carbono/nitrógeno =60 y carbono/fósforo =800. Para ello se tomó como base que el % de C en el suelo es bastante bajo, por lo que todo el C proviene del crudo, teniendo en cuenta que el crudo posee un 80% de C potencialmente biodegradable. De esta forma se efectuaron los respectivos cálculos (Apéndice II) y se añadieron las cantidades de fertilizantes necesarias para satisfacer la relación antes expuesta.
- 6) Cada grupo de composteros fue rociado con agua con la ayuda de un atomizador a fin de ajustar el valor de humedad (40 al 60 % de la capacidad de campo). Cada grupo mostró requerimientos de agua diferentes, el G1 requirió de aproximadamente 15 mL c/2 días, el G2 requirió de aproximadamente 60 mL diariamente, el G3 requirió de aproximadamente 15 mL c/3 días y por último el grupo 4, de 60 mL c/ 2 días.
- 7) Cada compostero fue removido manualmente cada dos días para mantener un nivel de oxígeno adecuado con un rastrillo.



La figura n° 3 muestra un esquema del procedimiento seguido durante el desarrollo experimental del presente proyecto.

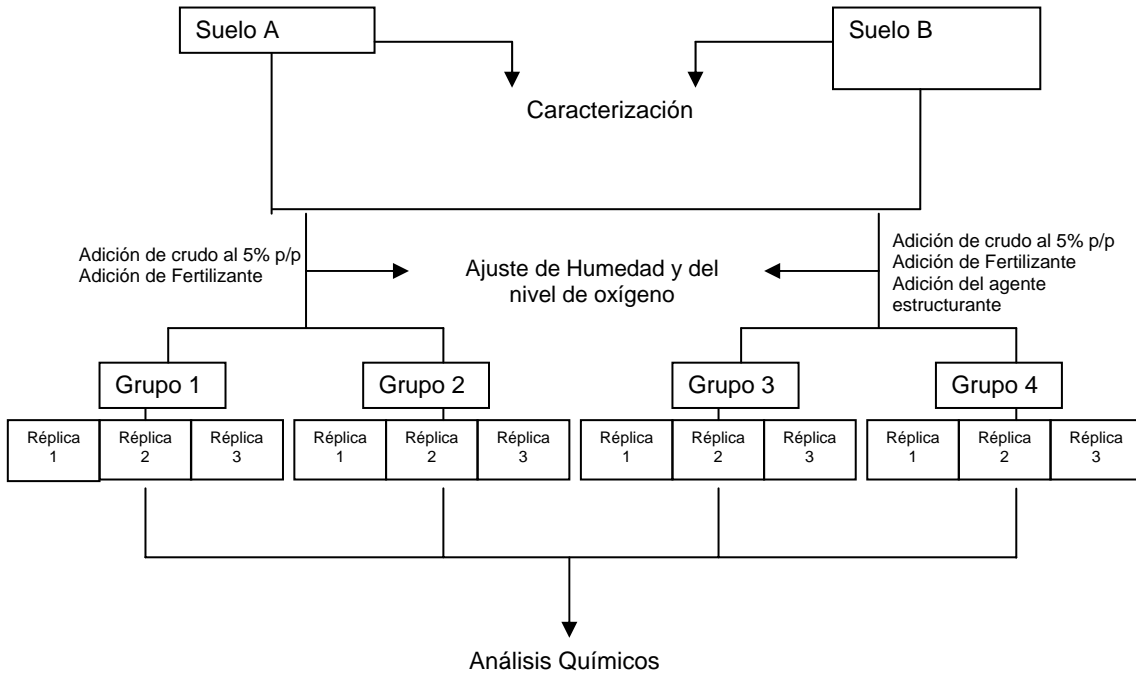


Figura n° 5. Flujograma ilustrativo del procedimiento seguido durante el desarrollo experimental del proyecto.

2.3 Análisis químicos:

A fin de cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo, se tomaron muestras periódicas de los distintos composteros y se realizaron los siguientes análisis: Determinación de cantidad de crudo extraído de cada uno de los grupos de suelo (a los 1, 15, 30, 45 y 90 días de avance de la biodegradación) luego de la extracción sohlet del crudo presente en el suelo: Para ello se tomaron 3 g de suelo de cada bandeja, se colocaron en un dedal de celulosa y se montaron en un equipo sohlet, empleando como solvente diclorometano. Posteriormente se rotaevaporó el solvente y se determinó por gravimetría la cantidad de crudo extraído.



Figura n° 6: Montaje Soxhlet (tomado de www.profeonline.com/.../html/imacroma_note.htm (consultado 6/01/08)

- Separación SARA del crudo extraído a los (a los 1, 30 y 90 días de avance de la biodegradación):

Para obtener la composición SARA del crudo extraído, en los tiempos indicados, se tomó una réplica (constante y escogida al azar) de cada uno de los grupos de suelo evaluados (G1b, G2b, G3a, G4a) y se realizó el siguiente procedimiento:

-Separación de asfaltenos

La fracción de asfaltenos fue separada de la fracción de maltenos (saturados, aromáticos y resinas), mediante precipitación de los primeros. Para ello se añadió n-heptano frío en una proporción 40:1 v/v n-heptano/extracto. La mezcla resultante (de la adición del n-heptano al extracto del crudo del suelo) fue agitada consecutivamente en un equipo ultrasonido, dejada en reposo en frío durante 1 día y posteriormente fue filtrada utilizando un equipo de filtración al vacío marca *millipore*, con filtros de 0,5 μm .

El sólido resultante (asfaltenos), se lavó varias veces con pequeñas cantidades de n-heptano a fin de extraer los maltenos que pudieran haber



quedado ocluidos en él. Posteriormente fue secado al aire y cuantificado mediante gravimetría.

El líquido obtenido, contiene en solución a los maltenos, por lo que el solvente fue rotaevaporado a fin de obtener dicha fracción, necesaria para los ensayos posteriores.

-Separación y cuantificación de los maltenos (saturados, aromáticos y resinas).

Los maltenos fueron separados en las fracciones correspondientes a hidrocarburos saturados, aromáticos y resinas, mediante la técnica de cromatografía de adsorción en columna, la cual se basa en la absorción selectiva de una muestra en solución, sobre la superficie activa de un sólido finamente dividido (fase estacionaria) debido a la diferencia de polaridad que guarda(n) el/los solvente(s) añadido(s) (eluyente(s), fase móvil) con las sustancias presentes en la muestra.

Para realizar la cromatografía se utilizaron columnas, de aproximadamente 25 cm de longitud y 1 cm de diámetro, empacadas con alúmina activada suspendida en n-hexano. La separación se llevó a cabo de la siguiente manera:

-La fracción de hidrocarburos saturados fue eluida utilizando n-hexano como fase móvil.

-La fracción de hidrocarburos aromáticos se obtuvo por adición de tolueno.

-La fracción de resinas fue eluida añadiendo una mezcla de tolueno-metanol en una proporción 70:30 v/v.

Los solventes utilizados en la elución de las distintas fracciones fueron rotaevaporados y las mismas fueron cuantificadas mediante gravimetría



Para garantizar la pureza de la fracción de hidrocarburos saturados, a la cual se le analizarían posteriormente los biomarcadores, se realizó una “doble cromatografía” de dicha fracción. De esta forma, los hidrocarburos saturados fueron eluidos nuevamente con n-hexano, para eliminar posible contaminación con hidrocarburos aromáticos. Para esta segunda cromatografía se utilizaron columnas de menor longitud, aproximadamente 10 cm.

- Análisis de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos:

Los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies, modelo 6890N Network DCSytem, acoplado a un espectrómetro de masas MS Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. Mediante esta técnica se obtuvieron los cromatogramas necesarios para este estudio: m/z 113, m/z 191, m/z 177, m/z 217 y m/z 218 .

- Tratamiento de los datos:

El tratamiento estadístico de los datos de extractos de crudo se llevó a cabo a través del programa Statgraphics Plus 5.1, con el cual se calcularon medias y desviaciones estándar y se hicieron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Fisher para distinguir las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos grupos de suelo.



PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Caracterización del crudo

El crudo utilizado en el presente estudio fue caracterizado por López y Lo Mónaco (1995), obteniendo los siguientes resultados:

El crudo presenta una gravedad API de 27,33°, lo cual lo enmarca dentro del grupo de crudos medianos. La tabla n° 6 muestra la composición SARA obtenida, mediante cromatografía de capa fina con detector de ionización a la llama, en los análisis iniciales del crudo, se observa el predominio de los hidrocarburos saturados y aromáticos sobre el resto de las fracciones, lo cual coincide con la composición reportada para crudos medianos (Carbonagni, 1999).

CRUDO	SATURADOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
Guafita 1X	55	28	7	9

Tabla n°6 : Composición SARA del crudo Guafita 1X

La tabla n°7 muestra las relaciones de pristano/n-C₁₇, fitano/n-C₁₈ y C₂₃₋₃/C₃₀ obtenidas para el crudo original. Estas relaciones fueron escogidas debido a son de gran utilidad como índices de biodegradación ya que en ellas se comparan compuestos resistentes a la biodegradación con compuestos no resistentes, o de menor resistencia a la misma.

RELACIÓN	CRUDO Guafita 1X
Pristano/n-C ₁₇	1,865
Fitano/n-C ₁₈	1,09
C ₂₃₋₃ /C ₃₀ hopano	1,518

Tabla n°7: Relaciones iniciales de biomarcadores en el crudo Guafita 1X.



Las figuras n° 7, 8, 9 y 10 muestran las distribuciones de n-alcenos (m/z 113), terpanos y hopanos (m/z 191) y esteranos y diasteranos (m/z 217, m/z 218) respectivamente, a partir de las cuales se calcularon las relaciones antes mencionadas.

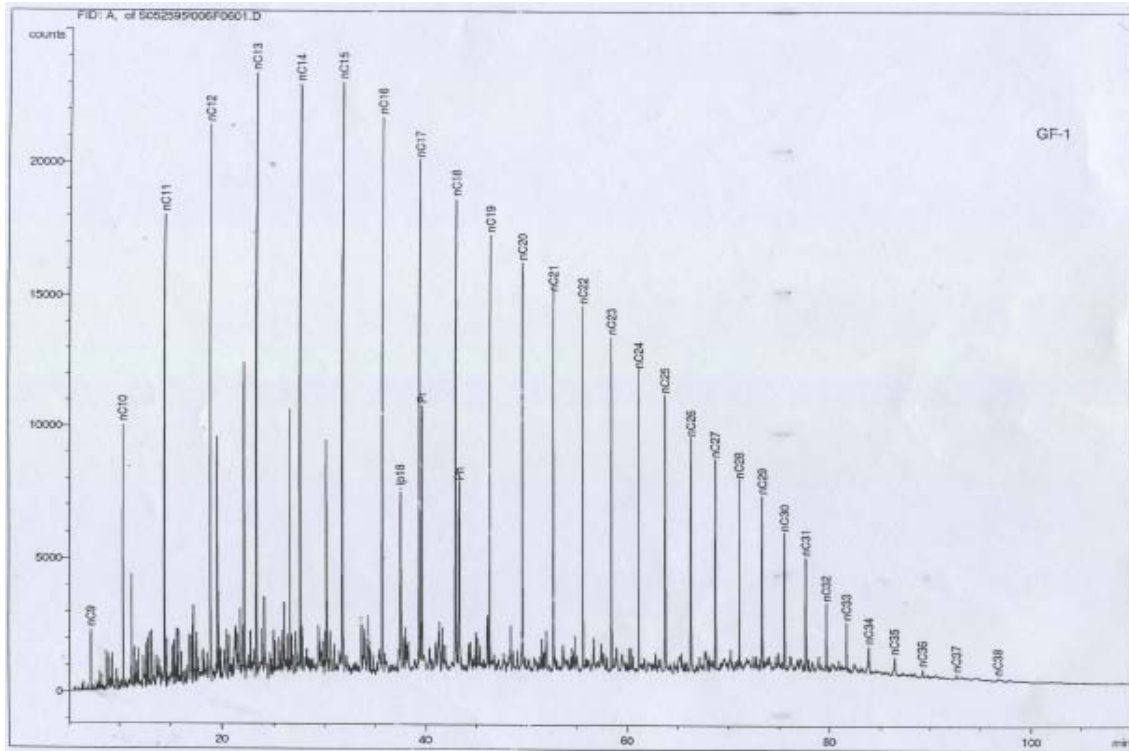


Figura n°7: Distribución inicial de n-alcenos del crudo.

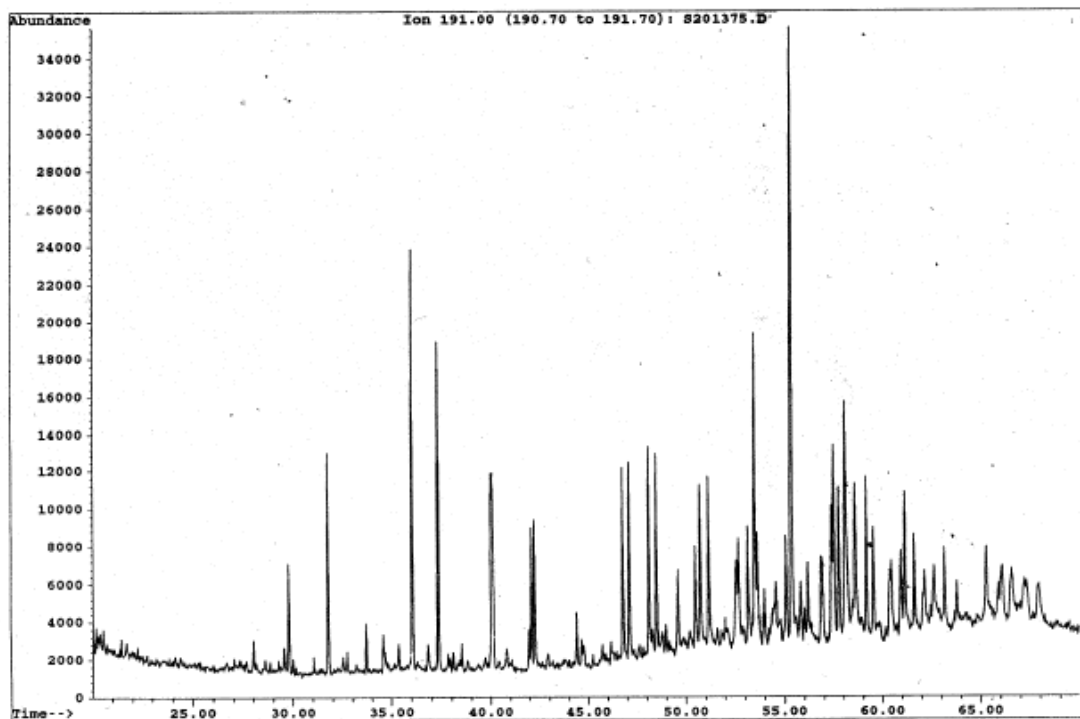


Figura n°8: Distribución de terpanos y hopanos

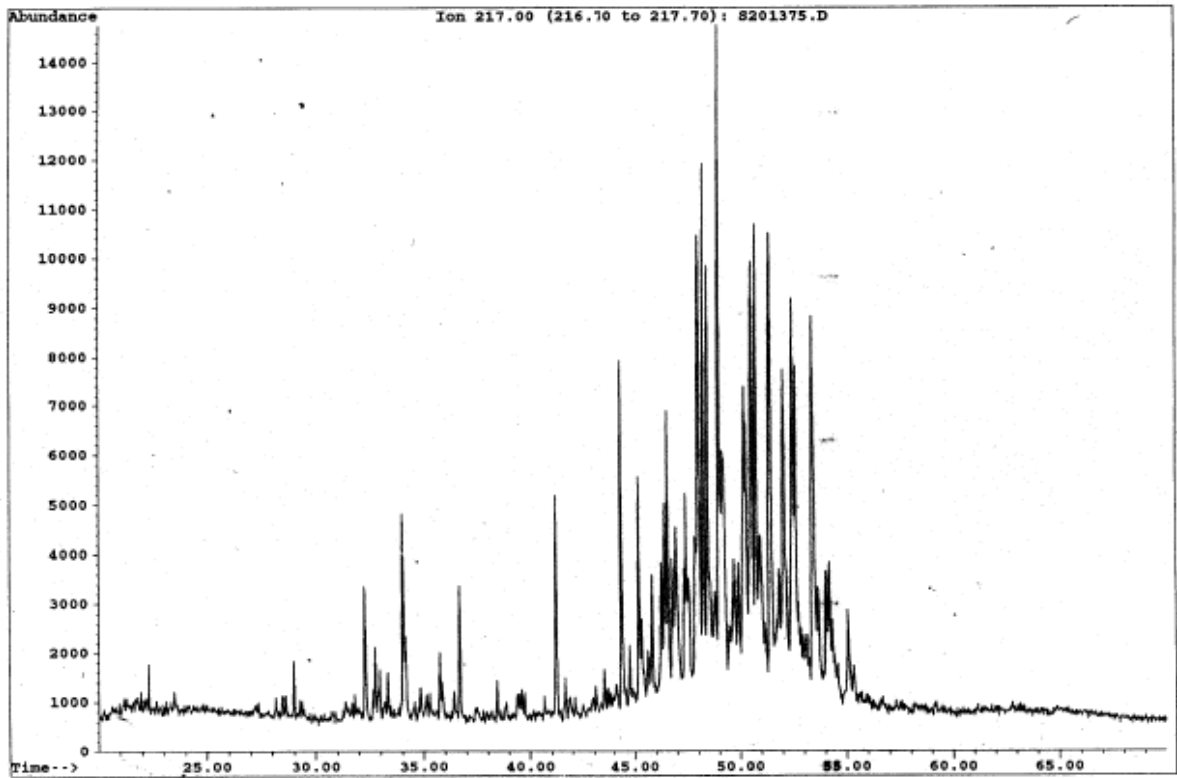


Figura nº 9: Distribución de esteranos

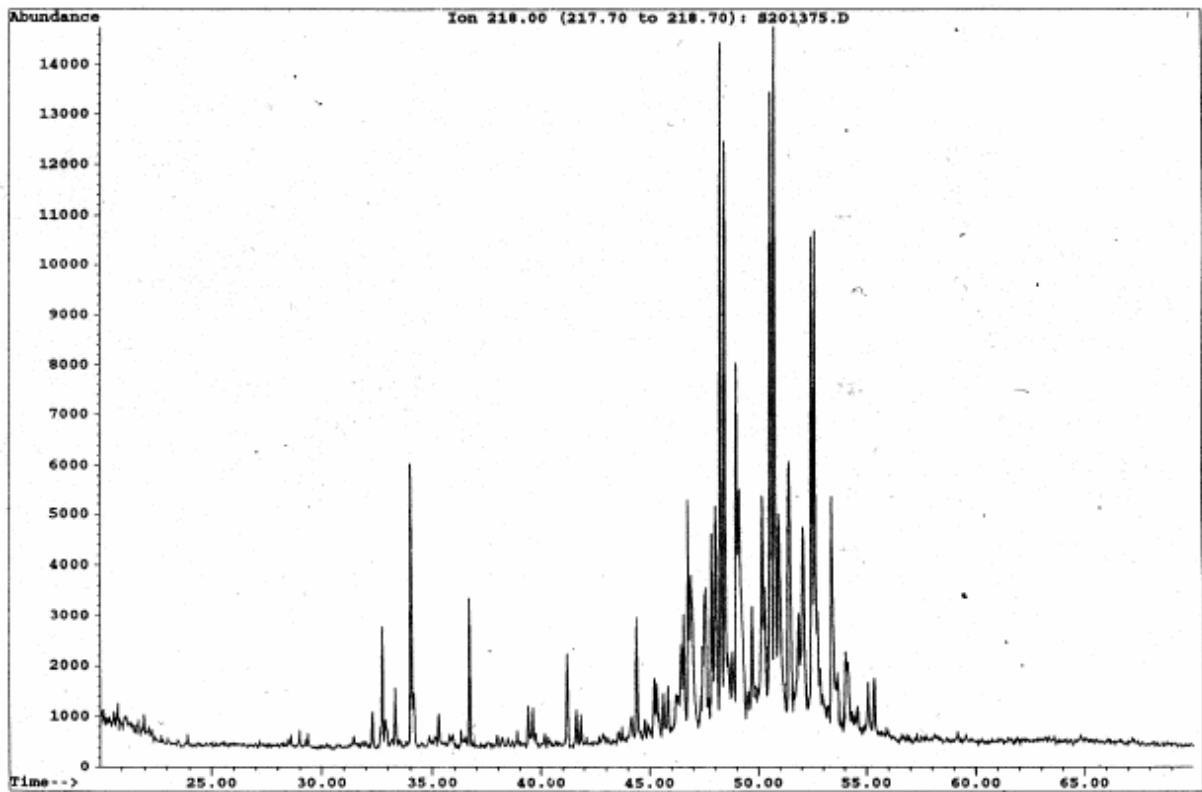


Figura nº 10: Distribución de diasteranos y esteranos



2. Caracterización de los suelos utilizados

El siguiente paso en el desarrollo del presente proyecto fue la caracterización de los suelos empleados, en cuanto a textura, color, COT y composición mineralógica.

La textura de ambos tipos de suelo fue determinada mediante el método del hidrómetro. Una vez establecidas las proporciones de arena, limo y arcilla, se llevaron al triángulo de clasificación textural, con el cual se obtuvieron las texturas mostradas en la tabla n°8, en donde se observa que el suelo denominado como A posee textura arenosa, mientras que el suelo denominado como B posee una textura franco-arcillo-arenosa. De esta forma se tiene un suelo con total predominio de partículas de grano grueso, en contraste con un suelo con notable influencia de partículas de grano fino, condición necesaria para cumplir con los objetivos del presente estudio.

SUELO	% Arena	% Limo	% Arcilla	Textura
A	90,13	6,76	3,11	Arenosa
B	63,5	10	26,5	Franco-arcillo-arenosa

Tabla n°8: Determinación de la textura de los suelos utilizados.

El color de los suelos fue determinado por medio de la escala de color de Munsell, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla n°9.

SUELO	COLOR
Suelo Arenoso	(6/4)7.5YR (Light brown)= Marrón claro
Suelo Franco-arcillo-arenoso	(5/6)7.5YR (Strong brown)= Marrón oscuro

Tabla n°9: Determinación del color de los suelos utilizados

Las concentraciones de COT de los suelos en estudio se muestran en la tabla n°10, se observa que aunque ambos porcentajes son bajos, el del suelo franco-arcillo-arenoso es superior al del suelo de textura arenosa, lo cual coincide con los resultados obtenidos en cuanto al color de las muestras, tomando como base que generalmente el color del suelo se hace más oscuro mientras mayor sea el contenido de COT (Casanova, 2005).



SUELO	COT (%)
Suelo Arenoso	0,26
Suelo Franco-arcillo-arenoso	2,23

Tabla n°10: Determinación de COT en los suelos utilizados

La composición mineralógica de ambos tipos de suelo puede observarse en las figuras n° 11 y 12, en donde se observa que el suelo de textura arenosa está constituido por cuarzo e illita y el suelo franco-arcillo-arenoso está constituido por cuarzo y caolinita, ambas litologías poco reactivas por tratarse de cuarzo y una arcilla tipo 2:1 no expansiva y tipo 1:1 respectivamente.

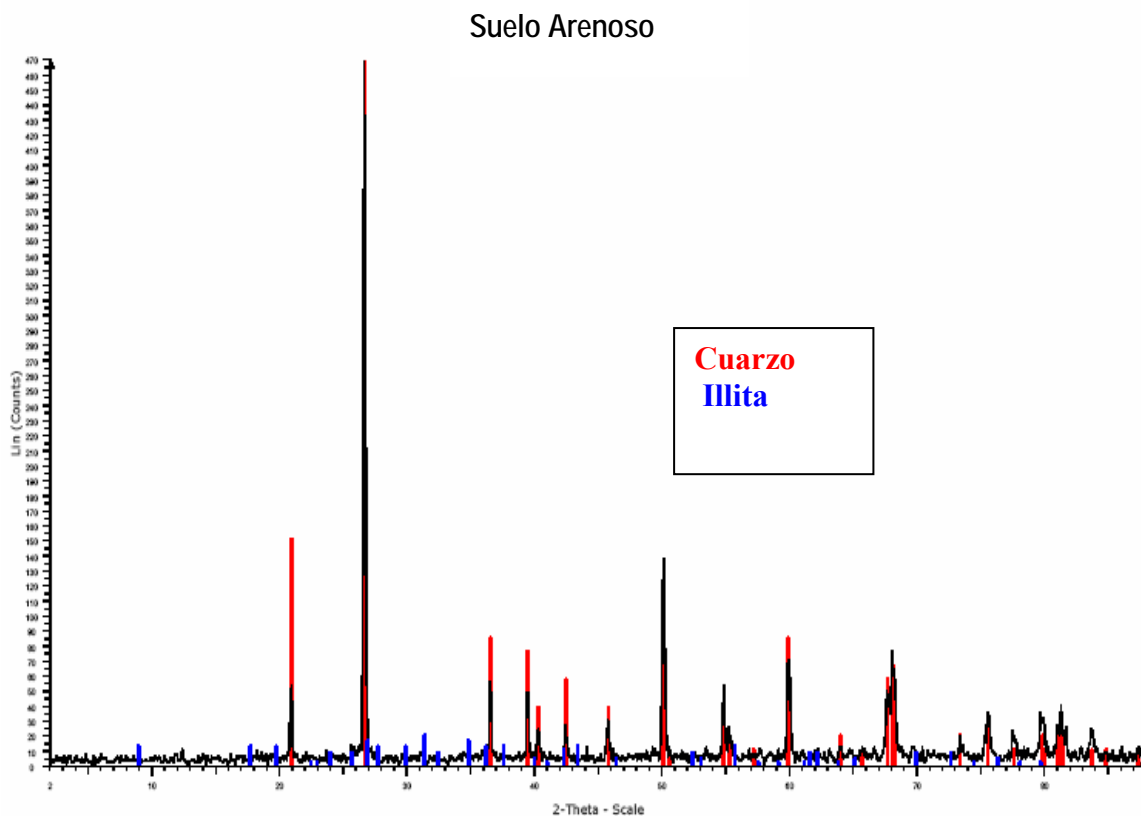


Figura n°11: Difractograma obtenido para el suelo A

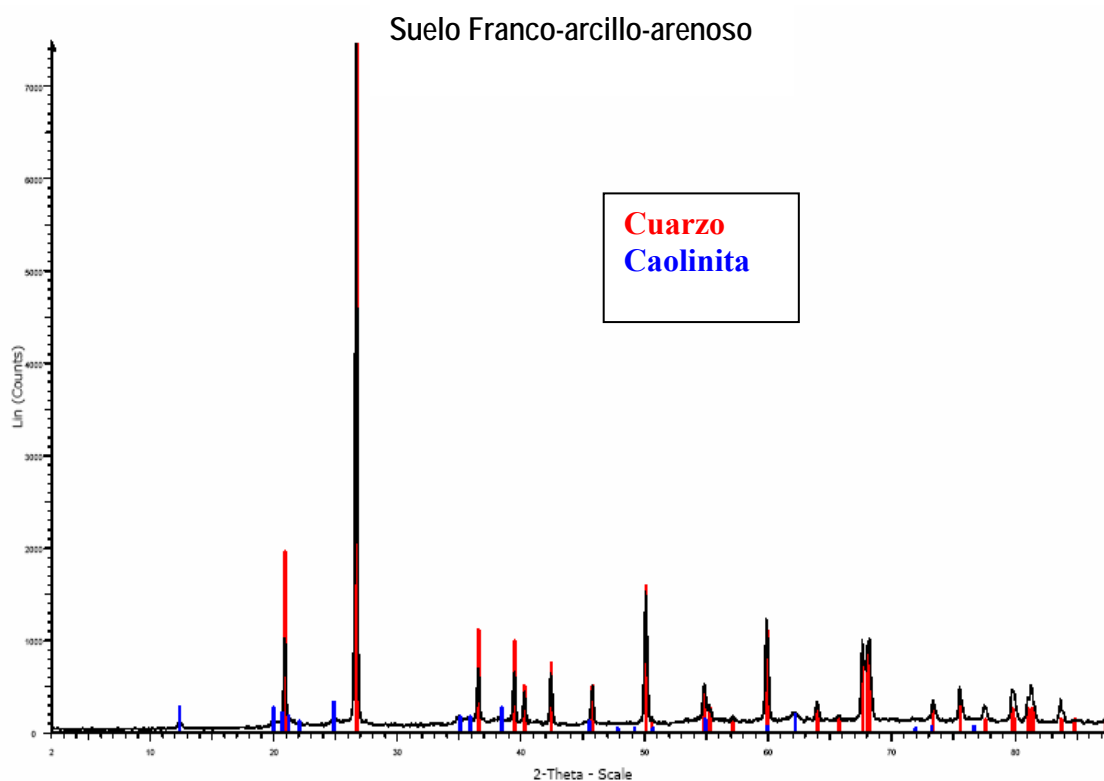


Figura n°12: Difractograma obtenido para el suelo B

En base a esto se puede sugerir que la composición mineralógica de los suelos en estudio, no debe ser un factor que ejerza una influencia dominante en las diferencias observadas en el proceso de biodegradación del crudo en ambos tipos de suelo, ya que se tienen arcillas no expansivas y de baja capacidad de intercambio catiónico que no deberían interactuar fuertemente con el crudo y por tanto generar diferencias significativas al final del tiempo en estudio.

3. Evaluación de la remoción del crudo en los distintos grupos de suelo

En la tabla n°11 se muestran los valores, en g crudo/g muestra, obtenidos para los extractos de cada una de las réplicas, de los distintos grupos de suelo, en los distintos tiempos de extracción, así como el promedio y desviación estándar obtenidos por tiempo de extracción para cada uno de los grupos. A modo general se observa que la



cantidad de extracto disminuye con el transcurso del tiempo y a simple vista no se observan valores discordantes con el resto de la data.

EXTRACCIÓN	RÉPLICA	GRUPO 1 Arenoso	GRUPO 2 Fran-Arc- Aren.	GRUPO 3 Arenoso +AG	GRUPO 4 Fran-Arc- Areno +AG
1 DIA	a	0,0425	0,0376	0,0445	0,0308
	b	0,0470	0,0422	0,0428	0,0310
	c	0,0439	0,0393	0,0394	0,0307
	PROMEDIO	0,0445	0,0397	0,0422	0,0308
	DESV EST	0,0023	0,0023	0,0026	0,0001
15 DIAS	a	0,0405	0,0295	0,0415	0,0248
	b	0,0410	0,0323	0,0413	0,0252
	c	0,0404	0,0317	0,0384	0,0237
	PROMEDIO	0,0406	0,0312	0,0404	0,0246
	DESV EST	0,0003	0,0014	0,0017	0,0008
30 DIAS	a	0,0400	0,0290	0,0411	0,0244
	b	0,0392	0,0312	0,0395	0,0250
	c	0,0396	0,0281	0,0382	0,0234
	PROMEDIO	0,0396	0,0294	0,0396	0,0243
	DESV EST	0,0004	0,0016	0,0015	0,0008
45 DIAS	a	0,0383	0,0239	0,0405	0,0236
	b	0,0386	0,0259	0,0390	0,0240
	c	0,0391	0,0254	0,0377	0,0230
	PROMEDIO	0,0387	0,0251	0,0391	0,0236
	DESV EST	0,0004	0,0010	0,0014	0,0005
90 DIAS	a	0,0299	0,0194	0,0297	0,0196
	b	0,0298	0,0212	0,0277	0,0190
	c	0,0294	0,0198	0,0293	0,0170
	PROMEDIO	0,0297	0,0202	0,0289	0,0185
	DESV EST	0,0011	0,0010	0,0003	0,0014

Tabla n°11: Valores obtenidos para los extractos de crudo de los distintos grupos de suelo en los distintos tiempos de extracción. (g crudo/g muestra).AG=Agente estructurante o hojarasca

Los promedios obtenidos para cada uno de los grupos fueron graficados tal como se muestra en la figura n° 13, a fin de observar con mayor claridad diferencias o similitudes en el comportamiento de los distintos grupos de suelo a lo largo del tiempo de estudio, observándose que los grupos 1 y 3 (suelo arenoso sin y con agente estructurante) tienen un comportamiento sumamente similar, al punto en que los valores se solapan marcando a modo general una sola tendencia. Los grupos 2 y 4 por su parte



(suelo franco-arcillo-arenoso sin y con agente estructurante) muestran tendencias distintas durante los primeros 45 días, tiempo a partir del cual comienzan a comportarse aparentemente de manera muy similar hasta finalizar el tiempo de estudio. Si se expresan los resultados en porcentaje de biodegradación a los 90 días, lo cual representa la disminución de crudo en el tiempo de estudio, se obtienen los resultados mostrados en la tabla n° 12.

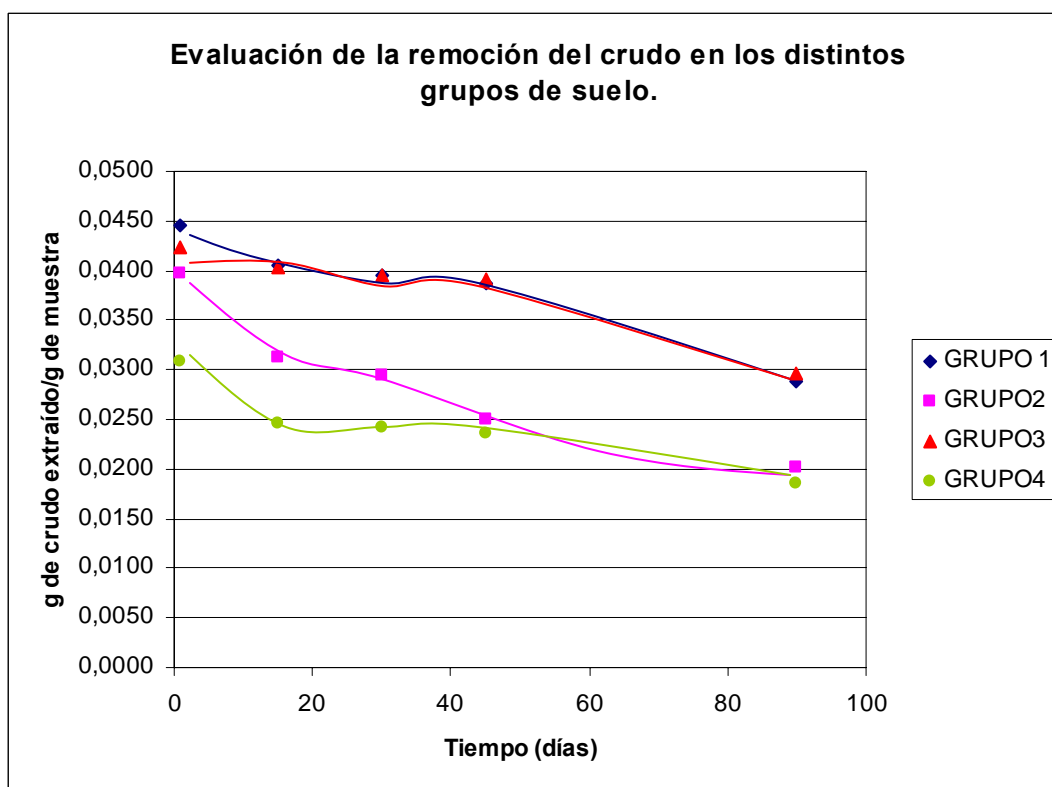


Figura n°13: Gráfico de cantidad de extracto vs tiempo para los distintos grupos. (G1= S. Arenoso, G2=S. Fra-Arc-Aren., G3=S.Arcilloso+AG, G4=S. Fra-Arc- Aren + AG)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
33,2%	49,2%	32,2%	40%

Tabla n°12: Tasa de biodegradación en base a la diferencia de la cantidad de crudo extraída del día 1 al día 90.

Al comparar ahora en base a la tasa de biodegradación, se observa que el grupo que alcanzo el porcentaje más alto, fue el suelo correspondiente al grupo 2 (franco-arcillo-arenoso), seguido por el grupo 4 (suelo franco-arcillo-arenoso con agente



estructurante), se esperaba, en base al resto de los resultados obtenidos, que este orden resultara inverso (grupo 4 mejor que el grupo 2). La discrepancia puede deberse principalmente a la cantidad de crudo extraído el día 1 para cada tipo de suelo. Debido a que la tasa de biodegradación se calcula en base a la diferencia entre la cantidad de crudo extraído el día 1 y el día 90, el hecho de que esta cantidad haya sido tan baja para el grupo 4, el primer día de extracción, influencia considerablemente el resultado. El haber extraído considerablemente menos crudo del esperado en este grupo de suelo, podría obedecer a diversos factores, entre los cuales se podría mencionar que la presencia de partículas finas y de materia orgánica (conformada por el agente estructurante), pudo haber generado interacciones con el crudo que no pudieron ser vencidas por el solvente utilizado, lo cual explicaría el bajo rendimiento de extracción cuando aun no se estaba dando como tal el proceso de biodegradación.

Por último se ubican los grupos 1 y 3 (suelos arenosos) que se comportan como uno solo y responden a los menores porcentajes de tasa de biodegradación. Puede observarse entonces que los suelos con mayor contenido de partículas de grano fino, responden mejor al proceso de biodegradación que aquellos con predominio de partículas de grano grueso, es decir, que la textura del suelo constituye un factor que afecta de manera considerable la respuesta del mismo ante el mecanismo de biorremediación. Sin embargo la disminución de hidrocarburos en todos los grupos estudiados muestra que efectivamente se está llevando a cabo la biorremediación de los suelos contaminados. En cuanto al agente estructurante, en base a estos resultados, aparentemente no ejerce influencia en el proceso de biodegradación del suelo, sin embargo en análisis más finos si se observan diferencias notables, tal como se verá más adelante.



A fin de conocer si las diferencias observadas son estadísticamente significativas, se aplicó a los distintos datos obtenidos, la técnica de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba exacta de Fisher. El método se basa en un procedimiento de comparación múltiple que permite determinar cuales medias difieren significativamente, desde el punto de vista estadístico, de las otras con un 95% de nivel de confianza. Los resultados se muestran en las tablas n° 13 y 14 en donde la X representa una diferencia estadísticamente significativa entre los elementos comparados.

Intervalos de tiempo (días)	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
1- 15	X	X		X
1-30	X	X		X
1-45	X	X	X	X
15-30				
15-45		X		X
15-90	X	X	X	X
30-45		X		
30-90	X	X	X	X
45-90	X	X	X	X

Tabla n° 13: Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de extracción para cada uno de los grupos.

Se observa, que para el grupo 1 o suelo arenoso, se tiene una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de crudo extraído durante los primeros 15 días, el segundo cambio significativo ocurre después de los 45 pero antes de los 90 días, el momento preciso del cambio no puede determinarse debido a que no se monitorearon intervalos menores de tiempo. Finalmente hubo un tercer cambio significativo a partir de este momento hasta los 90 días. Para el grupo 2, correspondiente al suelo franco arcillo arenoso, se observa que hubo un cambio durante los primeros 15 días, luego entre los 15 y los 45 días y por último entre los 45 y los 90 días, haciendo ver que en este grupo el cambio significativo ocurre a espacios cada vez mas prolongados de tiempo. Por su parte el grupo 3, referido al suelo arenoso con el agente estructurante, muestra que el primer cambio significativo, en la cantidad de extracto, se tiene es en los



primeros 45 días y ocurre un segundo cambio entre los 45 y los 90 días, indicando que el tiempo mínimo necesario para generar cambios en este tipo de suelo es de 45 días. Por último, el grupo 4, correspondiente al suelo franco-arcillo-arenoso con agente estructurante, en este análisis muestra un comportamiento similar al del grupo 2.

Una vez establecidas las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de extracción para cada uno de los grupos, se procedió a establecer las diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los grupos para cada tiempo de extracción, los resultados se muestran en la tabla n°14.

GRUPOS DE SUELO	1 DÍA	15 DÍAS	30 DÍAS	45 DÍAS	90 DÍAS
1-2	X	X	X	X	X
1-3					
1-4	X	X	X	X	X
2-3	X	X	X	X	X
2-4	X	X	X		
3-4	X	X	X	X	X

Tabla n°14: Diferencias estadísticamente significativas derivadas de la comparación entre grupos para cada tiempo de extracción.

Se observa entonces que tal como se muestra en la figura n° 13, los grupos 1 y 3 (arenosos sin y con agente estructurante) no muestran diferencias estadísticamente significativas en ningún tiempo de extracción, sugiriendo que la presencia del agente estructurante en el suelo arenoso no afecta para nada el proceso de biodegradación del crudo añadido en este tipo de suelo. De igual forma se observa, mediante el análisis estadístico, que los suelos correspondientes a los grupos 2 y 4 (franco-arcillo-arenosos sin y con agente estructurante) muestran diferencias significativas hasta los 45 días, a partir de donde empiezan a comportarse como un mismo grupo de suelo. Esto sugiere que en este tipo de suelo, la presencia del agente estructurante si marca diferencias pero en un intervalo de tiempo limitado, es decir, llega un momento en el cual la presencia del mismo deja de influir en el proceso de biodegradación del crudo. Finalmente, entre



los suelos arenoso y franco-arcillo-arenoso si se tienen diferencias significativas, siendo mejor la biodegradación en el último, lo cual muestra una influencia de la textura en el proceso de biodegradación del crudo.

4. Variación de la composición SARA

En la tabla n°15 se muestra la variación en la proporción de las distintas fracciones del crudo (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) a los 1, 30 y 90 días de avance de la biodegradación, para cada uno de los grupos de suelo estudiados.

GRUPO 1= SUELO ARENOSO				
DIAS	SATURADOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
1	67	13,3	12,2	7,5
30	60,9	16,9	15,7	6,5
90	55,6	20,9	16,1	7,4

GRUPO 2= SUELO FRANCO-ARCILLO-ARENOSO				
DIAS	SATURADOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
1	70	13	9,2	7,8
30	54	21,7	17,9	6,4
90	38,1	33,4	19,6	8,9

GRUPO 3= SUELO ARENOSO CON AGENTE ESTRUCTURANTE				
DIAS	SATURADOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
1	69,1	12,7	9,7	8,4
30	57,4	16,1	17,2	9,3
90	47,8	23,2	18,4	10,6

GRUPO 4= SUELO FRANCO-ARCILLO-ARENOSO CON AGENTE ESTRUCTURANTE				
DIAS	SATURADOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
1	71,5	11,4	7,1	10
30	49,6	19,8	18,4	12,1
90	29,8	35,2	20,7	14,3

Tabla n° 15: Variación de la composición SARA del crudo en los distintos tipos de suelo a lo largo del tiempo de estudio



Puede observarse que en los cuatro grupos de suelo, se produce una disminución de la fracción de hidrocarburos saturados del crudo. Esto obedece a que dicha fracción es la primera en ser degradada por ser la de menor complejidad y accesibilidad para los microorganismos (Peters *et al.*, 2005). El resto de las fracciones (aromáticos, resinas y asfaltenos) aumenta por enriquecimiento relativo al disminuir la fracción de saturados. Sin embargo, se observa una ligera disminución, de aproximadamente 1%, en los asfaltenos de los grupos 1 y 2 a los 30 días de extracción, esto puede deberse a que parte de los mismos se adsorben sobre el suelo en ausencia del agente estructurante, sin embargo el porcentaje de asfaltenos en estos grupos vuelve a aumentar a los 90 días de extracción indicando una posible desorción de parte de los mismos. Se observa que las variaciones en la composición SARA del crudo en los distintos grupos de suelo no ocurre a la misma intensidad. La disminución de saturados es más significativa en el suelo franco-arcillo-arenoso (grupos 2 y 4) que en el suelo arenoso (grupos 1 y 3) lo cual indica que la biodegradación ocurre con mayor eficiencia en el primero, sugiriendo nuevamente una influencia de la textura en la efectividad del proceso de biodegradación.

De igual forma se observa que, en un mismo tipo de suelo, la disminución de la fracción de hidrocarburos saturados es mayor en presencia del agente estructurante indicando que el mismo favorece el proceso de biodegradación, debido a que otorga al suelo una mejor estructura facilitando así el contacto entre el crudo y los microorganismos presentes. Esto puede visualizarse de forma bastante clara en la figura n°14, en donde se observa que a medida que avanza el proceso de biodegradación la composición SARA se desplaza empobreciéndose en hidrocarburos saturados y enriqueciéndose (de manera relativa) en el resto de las fracciones.

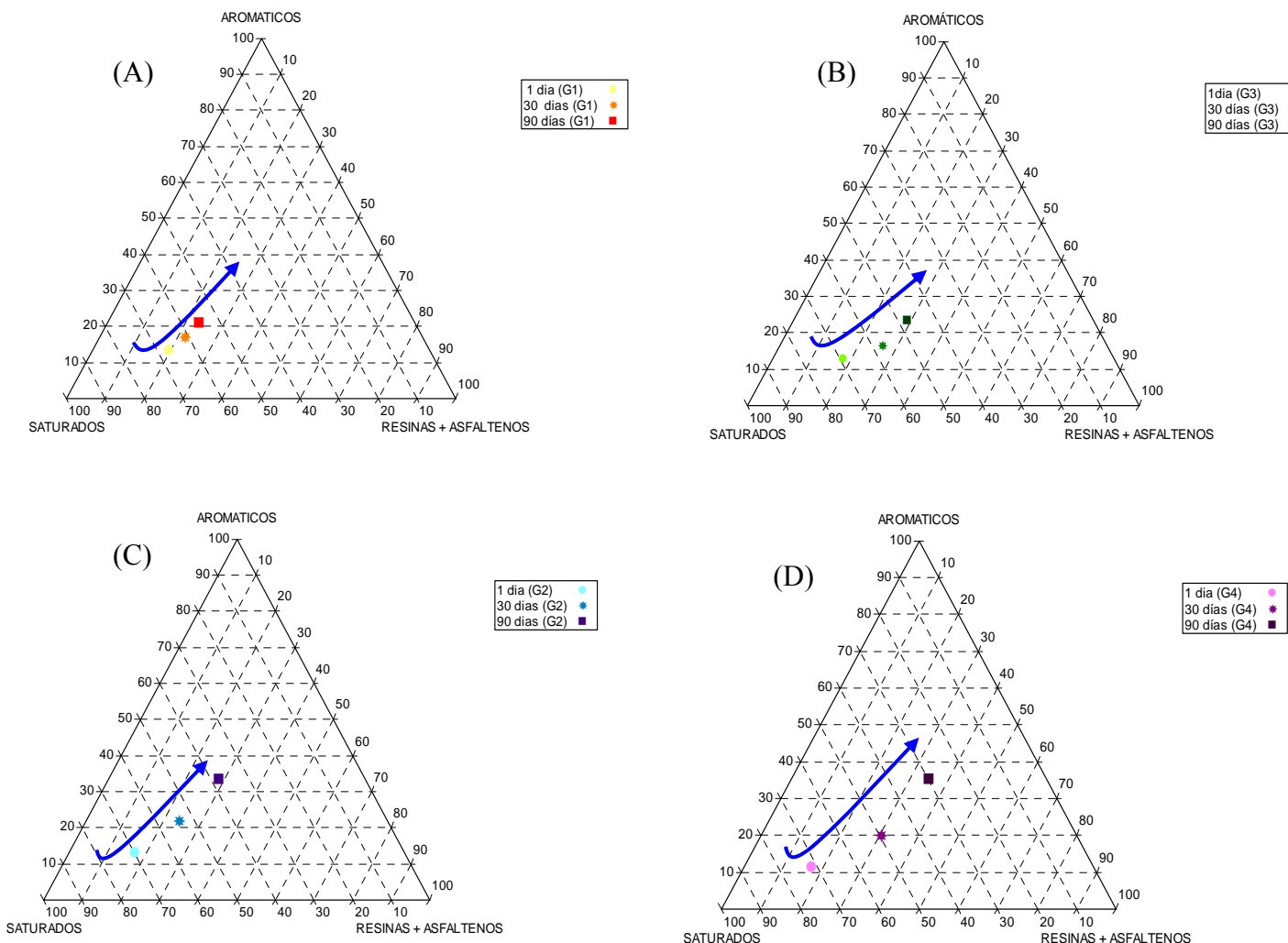


Figura n°14: Comparación de la variación de la composición SARA en los distintos grupos de suelo: (A) Grupo 1, (B) Grupo 3, (C) Grupo 2 y (D) Grupo 4.

Así mismo, se calcularon las tasas de biodegradación de la fracción de hidrocarburos saturados para cada uno de los grupos, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla n° 16

Grupo 1 S.Are	Grupo 2 S. Fr-Arc-Are	Grupo 3 S. Are+ AG	Grupo 4 S. Fr-Arc- Are + AG
44,6 %	72,6 %	52,7 %	75 %

Tabla n° 16: Tasa de biodegradación de hidrocarburos saturados, a los 30 y 90 días de estudio.



Pueden observarse también las diferencias en la intensidad de cambio de la composición SARA, pudiendo establecerse en base a este análisis el siguiente orden de eficiencia del proceso de biodegradación en los distintos grupos de suelo:

Grupo 1 < Grupo 3 < Grupo 2 < Grupo 4.

En este caso si se observa una ligera diferencia entre los grupos 1 y 3 (suelos arenosos sin y con agente estructurante), así mismo la diferencia es marcada entre los grupos 2 y 4 sugiriendo ahora que la presencia del agente estructurante si genera cambios en el comportamiento de los suelo arenoso frente al proceso de biodegradación, favoreciendo el mismo.

5. Biomarcadores

En la tabla n°17 se muestran las relaciones de pristano/n-C₁₇, fitano/n-C₁₈ y C₂₃₋₃/C₃₀ obtenidas para cada uno de los grupos de suelo a los 1, 30 y 90 días de avance de la biodegradación. Como se menciono anteriormente, estas relaciones fueron escogidas debido a su utilidad como índices de biodegradación, ya que comparan compuestos con diferentes grados de resistencia a la biodegradación . En este sentido, pristano, fitano y C₂₃₋₃ son resistentes a la biodegradación mientras que los n-alcános C₁₇, C₁₈ y el hopano C₃₀ son alterados más rápidamente a medida que la biodegradación ocurre, por lo que todas las relaciones deben aumentar con el avance de la misma.

RELACIÓN	G1 1 día	G1 30 días	G1 90 días	G3 1 día	G3 30 días	G3 90 días
Pristano/nC ₁₇	1,83	1,84	2,08	1,81	1,87	ND *
Fitano/nC ₁₈	1,08	1,11	1,33	1,08	1,11	ND*
C ₂₃₋₃ /C ₃₀ hopano	0,72	1,42	1,62	0,72	1,53	1,73

RELACIÓN	G2 1 día	G2 30 días	G2 90 días	G4 1 día	G4 30 días	G4 90 días
Pristano/nC ₁₇	1,80	8,58	ND*	1,82	16,77	19,52
Fitano/nC ₁₈	1,09	7,90	ND*	1,10	15,02	17,18
C ₂₃₋₃ /C ₃₀ hopano	0,82	1,44	1,70	0,70	1,41	1,72

* ND= no determinado por lo ausencia de alguno de los componentes

Tabla n°17: Relaciones de biomarcadores obtenidas para los distintos grupos a los 1 , 30 y 90 días de extracción.



Se puede observar que las relaciones aumentan en todos los casos, lo que indica que se está llevando a cabo el proceso de biodegradación, sin embargo puede notarse la diferencia en la intensidad del mismo dependiendo del grupo de suelo, teniéndose a modo general que la mayor variación la presenta el suelo franco-arcillo-arenoso frente al suelo arenoso y los suelos con agente estructurante frente a los que no lo tienen, resultados consistentes con aquellos obtenidos mediante la separación SARA y que nuevamente indican un claro efecto de la textura del suelo y de la presencia de un agente estructurante en el proceso de biodegradación, sugiriendo que a menor tamaño de grano el mismo se hace más efectivo, así como también se ve favorecido por la presencia de un agente estructurante.

Ahora bien, si se observan con más detalle los resultados del análisis de biomarcadores, a través de los distintos cromatogramas, puede observarse que la secuencia de biodegradación para cada tipo de suelo es ligeramente distinta. La figura n° 15 muestra la comparación de la distribución de n-alcenos durante los distintos tiempos de extracción para el suelo arenoso.

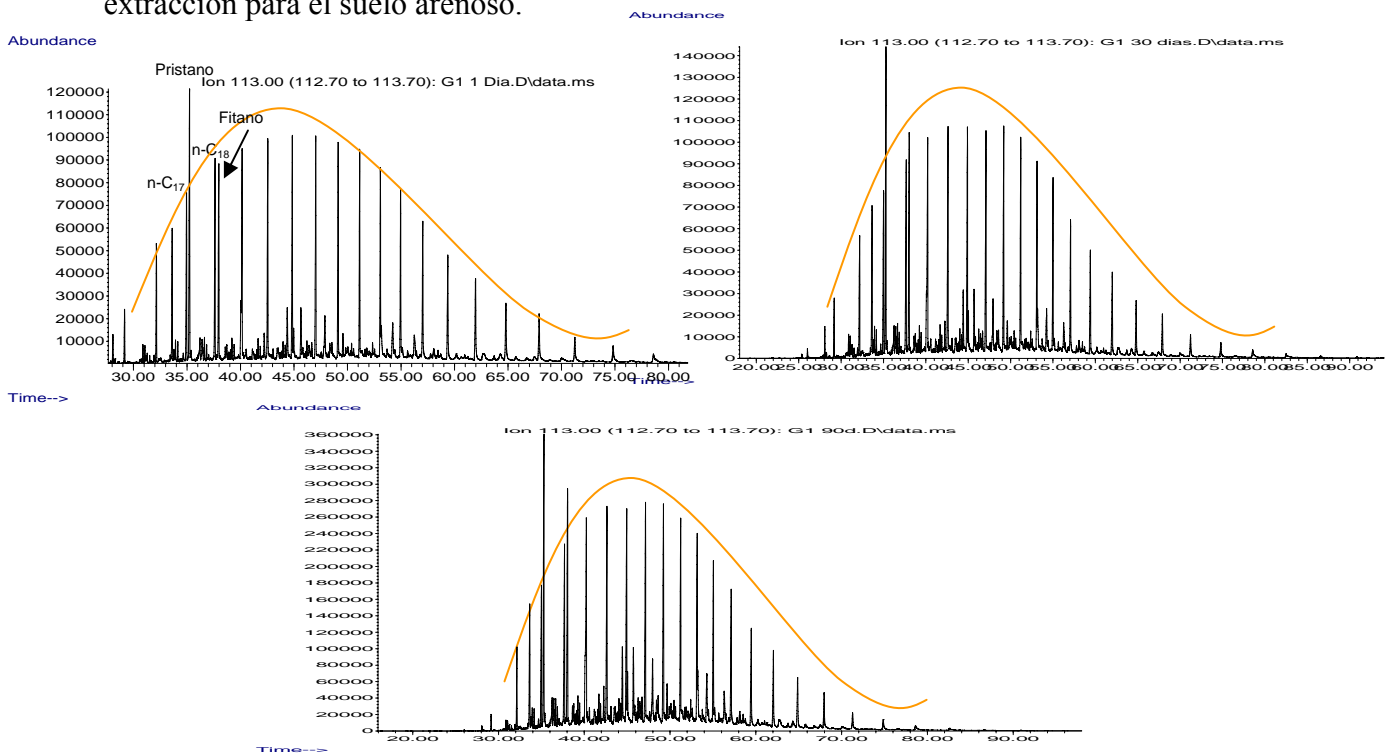


Figura n°15: Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 1



Se observa que prácticamente no hay cambios, o bien los pequeños cambios ocurridos no se aprecian al ver la distribución de n-alcenos, esto concuerda con los resultados obtenidos a partir de los otros ensayos para este suelo, los cuales coinciden en que en este grupo es donde la biodegradación ocurre en muy baja intensidad.

La figura n°16 muestra la comparación de la distribución de n-alcenos, en los distintos tiempos de extracción, correspondiente al suelo arenoso con agente estructurante.

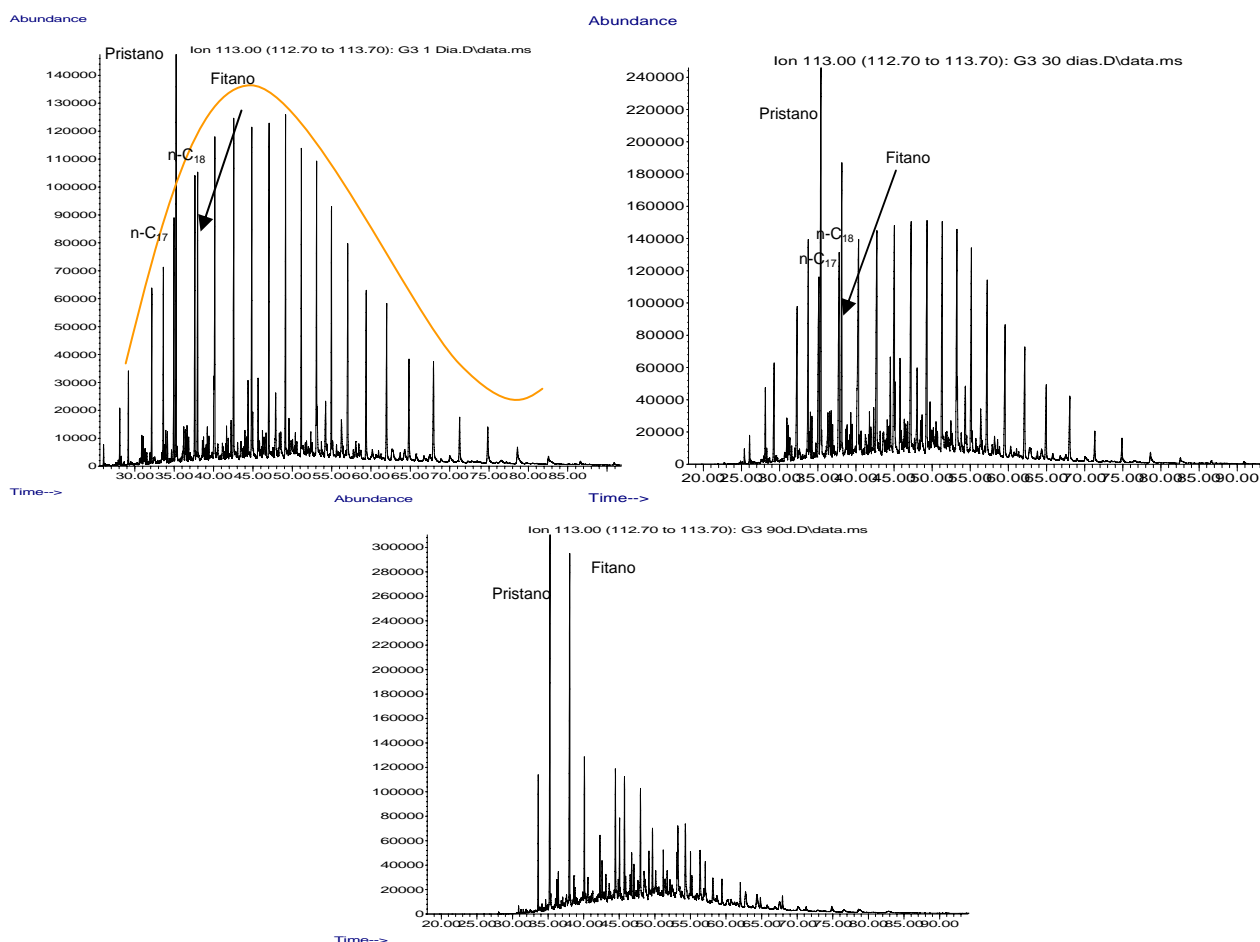


Figura n°16: Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 3

En este grupo los cambios en la distribución de n-alcenos son bastante visibles a los 90 días de extracción, tiempo en el cual se observa que los n-alcenos en general han



sido degradados y específicamente el n-C₁₇ y n-C₁₈ han sido degradados en su totalidad por las bacterias presentes, quedando de forma acentuada los isoprenoides pristano y fitano mas resistentes a la biodegradación. Este resultado obtenido de un análisis a nivel molecular del crudo extraído, muestra de manera clara que la presencia del agente estructurante si influye en la respuesta del suelo arenoso frente a la técnica de biorremediación empleada, indicando que la presencia del mismo favorece la biodegradación del crudo que conlleva a la recuperación del suelo contaminado.

La figura nº17 muestra la comparación de la distribución de n-alcamos, en los distintos tiempos de extracción, correspondiente al suelo franco-arcillo-arenoso.

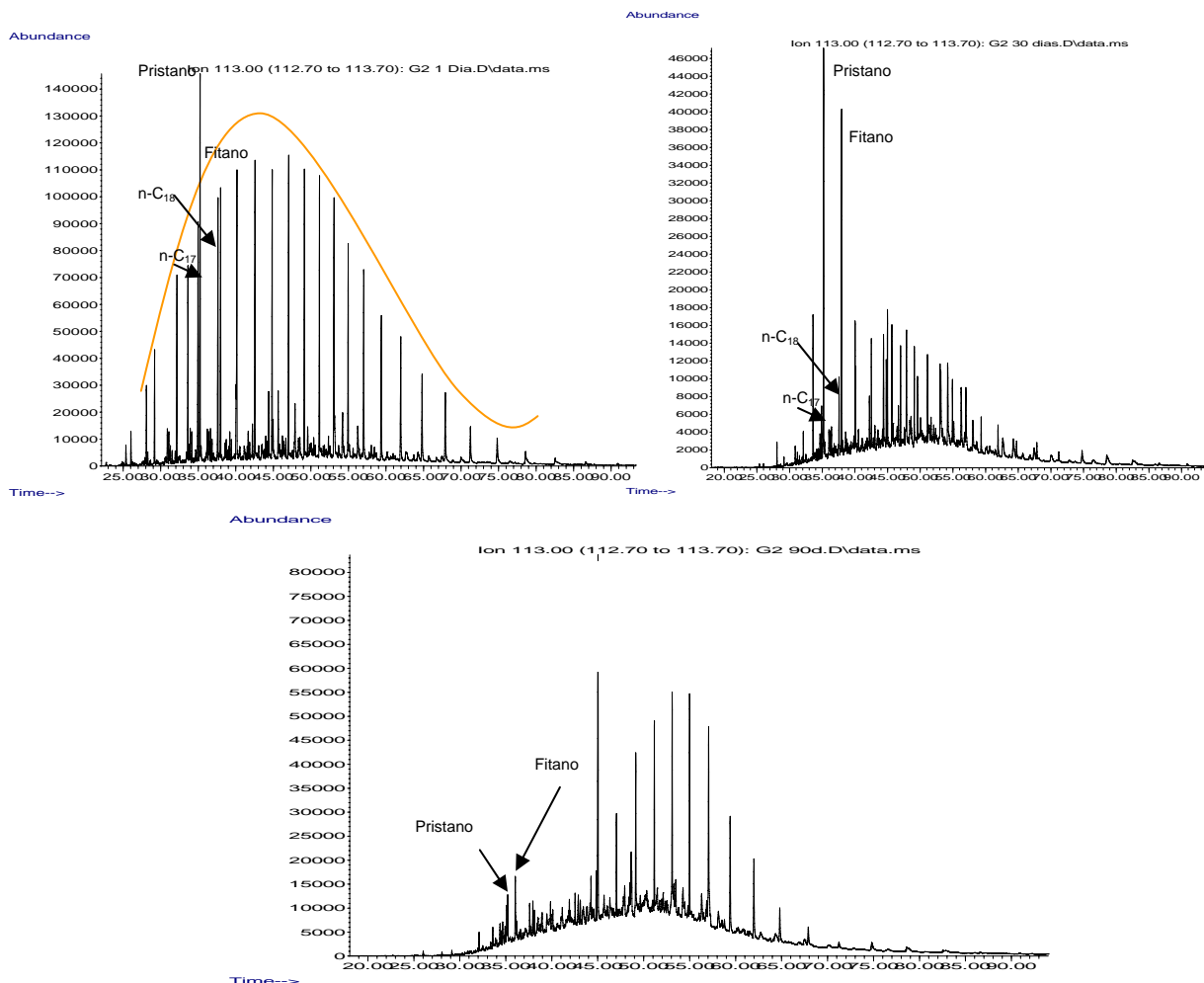


Figura nº17: Comparación de la distribución de n-alcamos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 2



En este grupo de suelo se observa un cambio bastante marcado a los 30 días de avance de la biodegradación, en donde los n-alcenos han disminuido considerablemente siguiendo el orden normal de biodegradación conocido: n-alcenos – isoprenoides (Peters *et al.*, 2005). Sin embargo, a los 90 días se observa cómo las bacterias han degradado los isoprenoides y aun se observan en la distribución los n-alcenos de mayor peso molecular, esto puede deberse a la recalcitrancia que en este caso pueden estar presentando estos compuestos presentes en la mezcla de hidrocarburos.

Finalmente en cuanto a la distribución de n-alcenos, la figura n°18 muestra la comparación de la distribución de n-alcenos, en los distintos tiempos de extracción, correspondiente al suelo franco-arcillo-arenoso con agente estructurante.

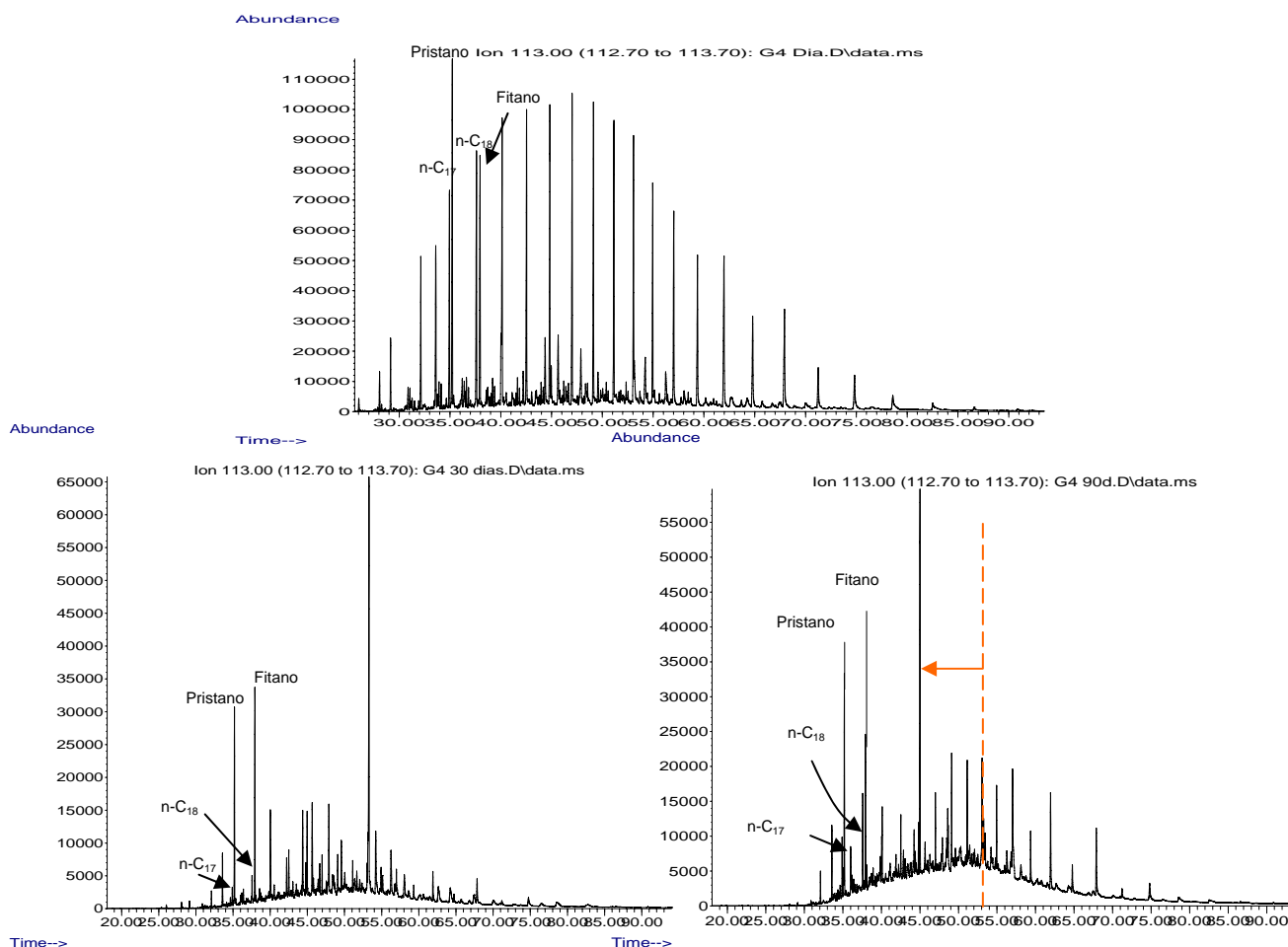


Figura n°18: Comparación de la distribución de n-alcenos a los 1, 30 y 90 días de biodegradación para el grupo 4



En este caso se observa también un cambio bastante acentuado a los 30 días de avance de la biodegradación, el más acentuado en comparación con los grupos anteriores. El pico observado en la figura a los 30 días de biodegradación corresponde a un compuesto que coeluye con el n-alcano C_{25} que aun no ha sido identificado, se sospecha de posible contaminación. A los 90 días se hace visible el UCM (unresolved complex mixture), indicando avances en el proceso de biodegradación. Igualmente se observa que el pico que a los 30 días se encuentra ubicado en un tiempo de retención de aproximadamente 55 minutos, a los 90 días parece haberse corrido hacia un menor tiempo de retención, sugiriendo que dicho compuesto podría haber sufrido cambios (perdiendo alguna parte de la molécula) que indican la degradación del mismo.

En cuanto al ión m/z 191, el cambio en la relación C_{23-3}/C_{30} es relativamente constante para los cuatro tipos de suelo, en todos los tiempos de extracción, esto puede deberse a que dentro de la fracción de hidrocarburos saturados los microorganismos degradan en primer lugar a los n-alcenos, por tanto el cambio significativo en esta relación y las diferencias entre los resultados de cada uno de los grupos, podría empezar a verse una vez que los n-alcenos sean degradados prácticamente en su totalidad. En la figura nº19 se muestra el cambio en la relación mencionada, a los 1 y 30 días de extracción, para el grupo 1 a título de ejemplo para los cuatro grupos de suelo.

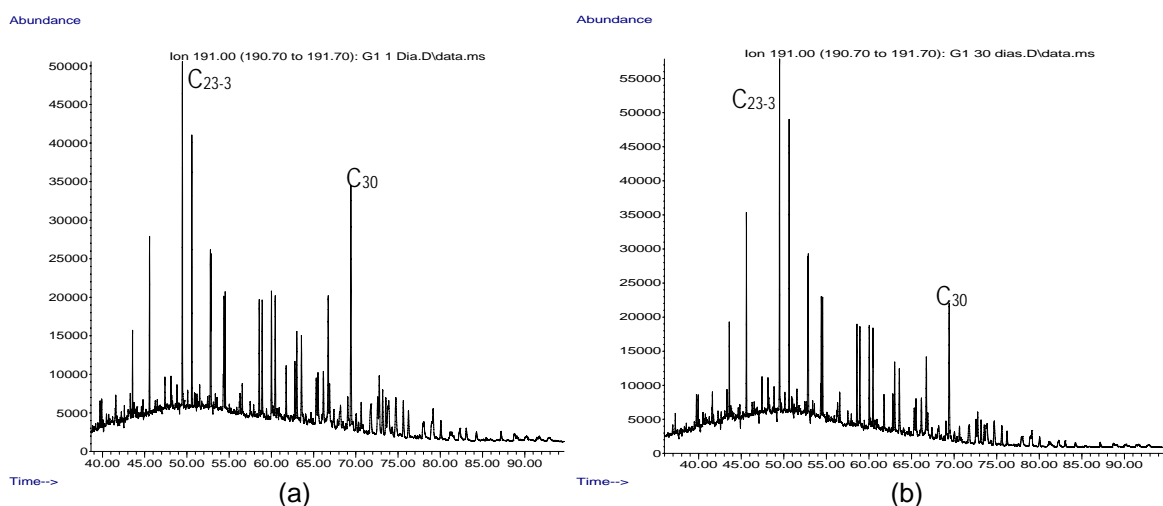


Figura nº19: Cambio en la relación C_{23-3}/C_{30} hopano visible en el ión m/z 191



Puede decirse entonces que la biodegradación a nivel de hopanos es bastante incipiente, esto se confirma al comparar el cromatograma correspondiente al m/z 191 inicial del crudo con el cromatograma correspondiente al m/z 177 del grupo 4 a los 90 días de extracción, siendo este último escogido debido a que ha sido el que ha arrojado más cambios en los análisis anteriores. Al comparar ambos cromatogramas se observa que no hay corrimiento de los picos en el m/z 177, es decir, no se dio la formación de los 25-norhopanos cuya génesis normalmente se atribuye a la biodegradación de los hopanos. Esto puede observarse en la figura n°20.

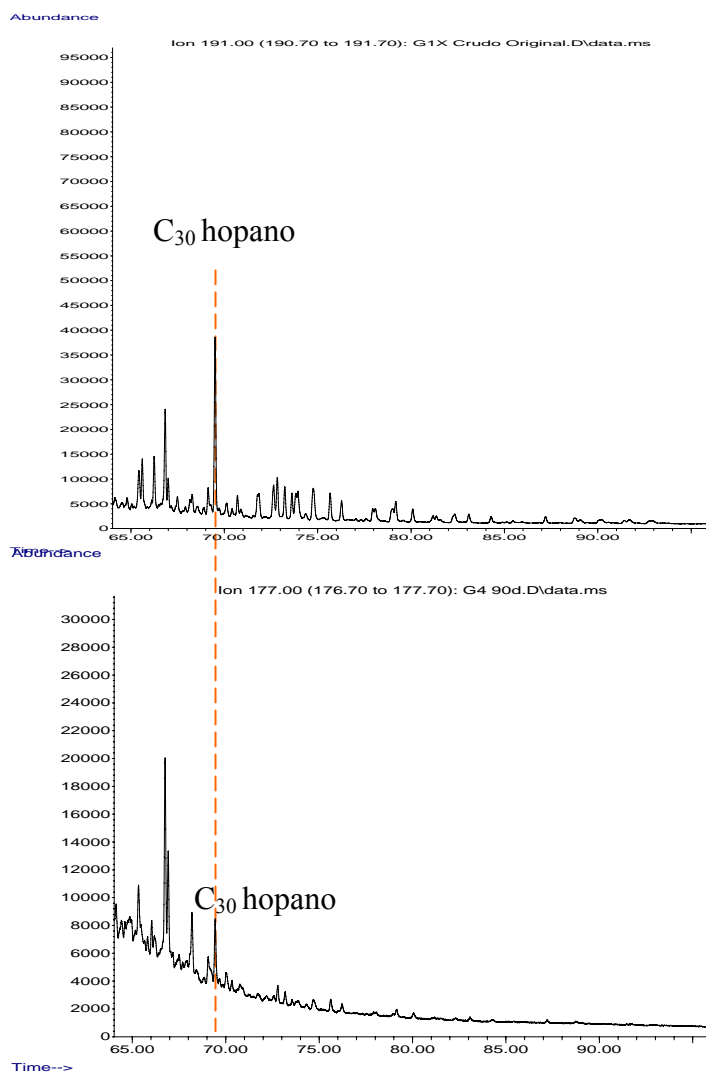


Figura n°20: Comparación de los iones m/z 191 y m/z 177



Sin embargo, al observar la distribución de diasteranos y esteranos en el m/z 218 si se observan cambios considerables a lo largo del tiempo de estudio. Esto indica una secuencia de biodegradación donde hay una degradación completa de los esteranos de bajo peso molecular, ya que los esteranos C_{27} , C_{28} y C_{29} no fueron alterados (Apéndice IV), sin alteración apreciable de los homohopanos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Greenwood *et al.* (2008), quien establece que la secuencia de biodegradación de un determinado hidrocarburo depende de diversos factores entre los que destaca el tipo de bacteria desarrollado en el sistema bajo estudio. Los cambios más resaltantes se observan en los grupos 2 y 4 (figuras n°21 y 22), los cuales muestran desaparición de los esteranos antes mencionados apenas a los 30 días de avance de la biodegradación. Nuevamente el cambio es más acentuado en el grupo 4 que en el grupo 2.

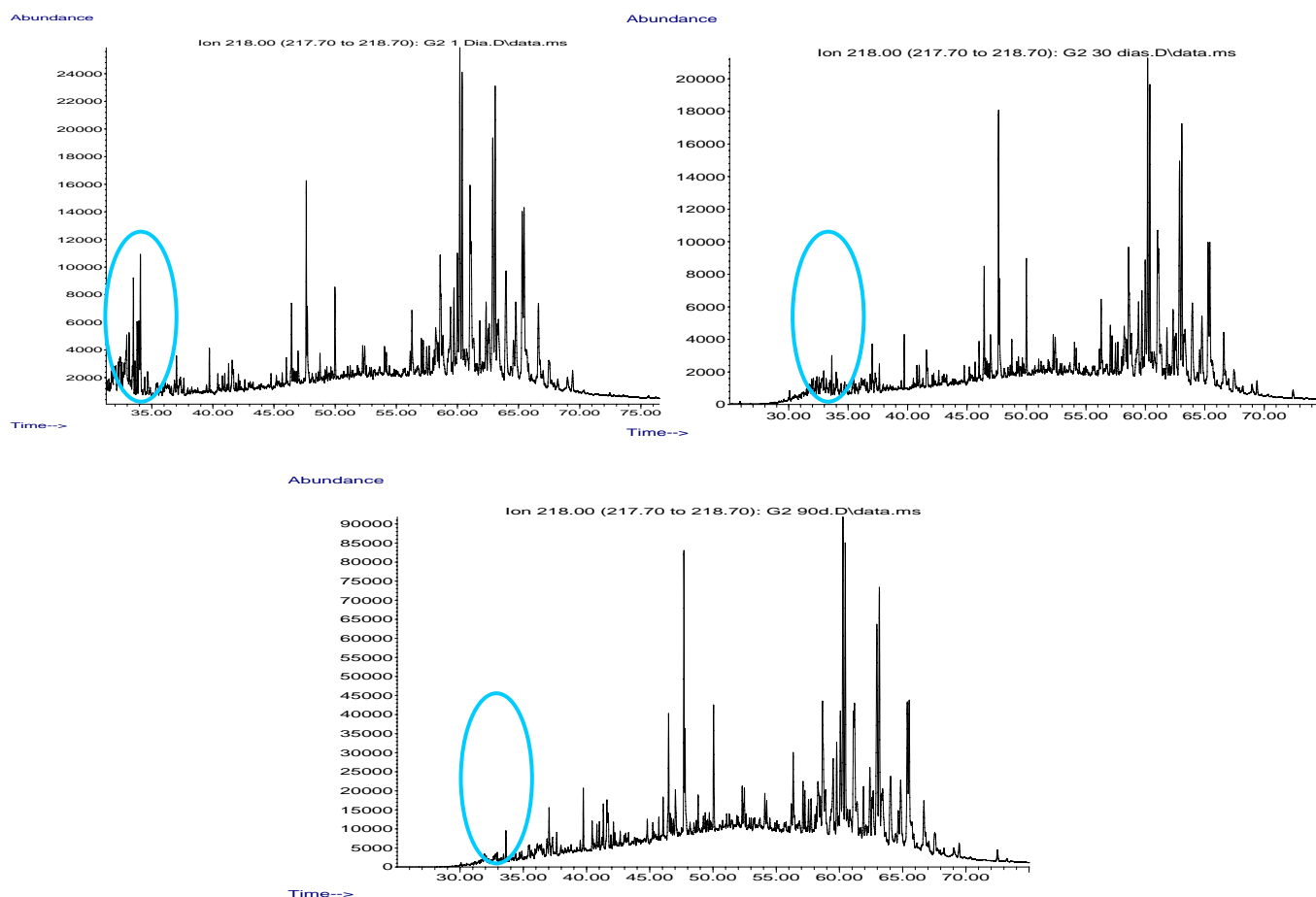


Figura n°21: Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 2

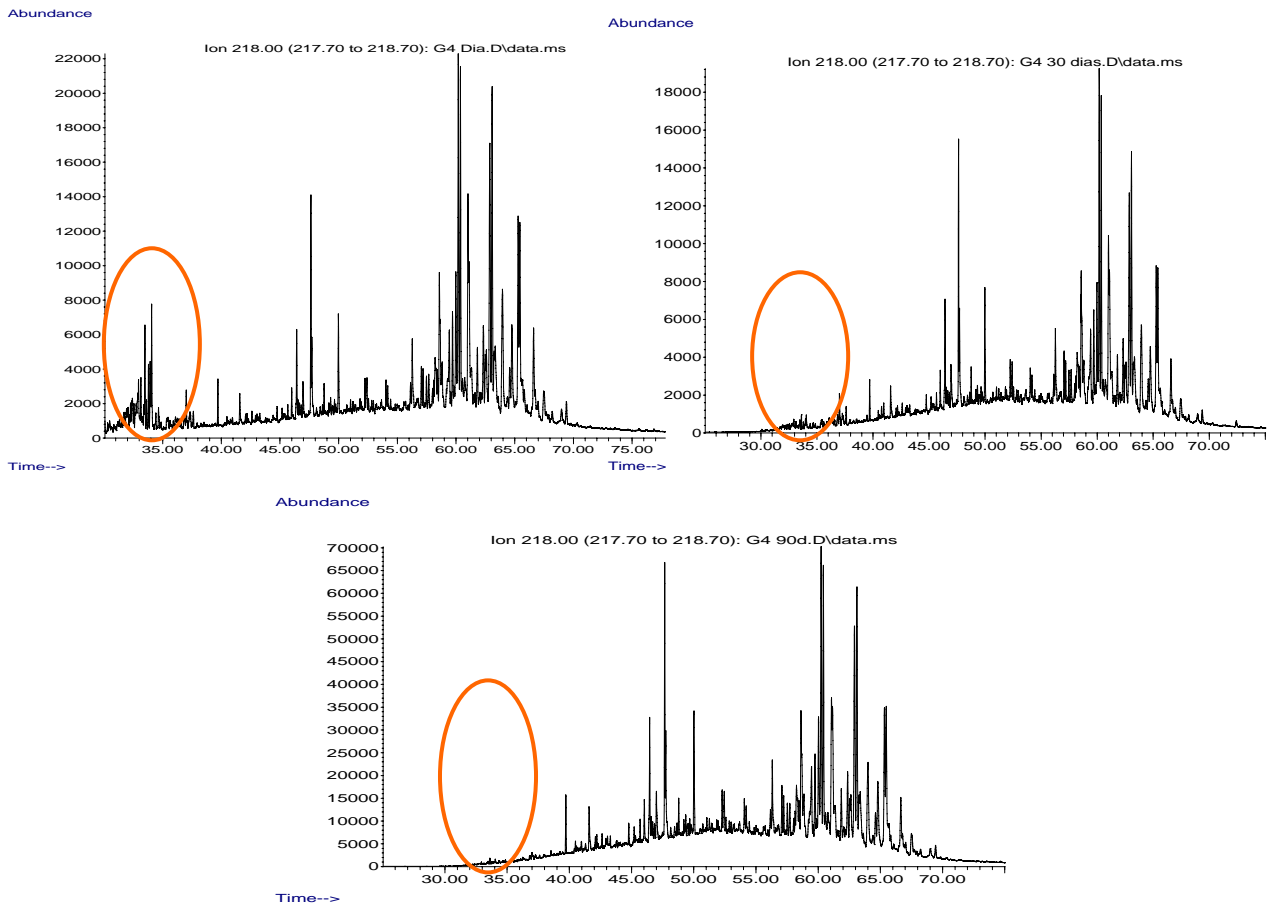


Figura n°22: Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 4

En el grupo 3 la degradación de esteranos de bajo peso molecular se aprecia es a los 90 días de avance de la biodegradación (figura n°23).

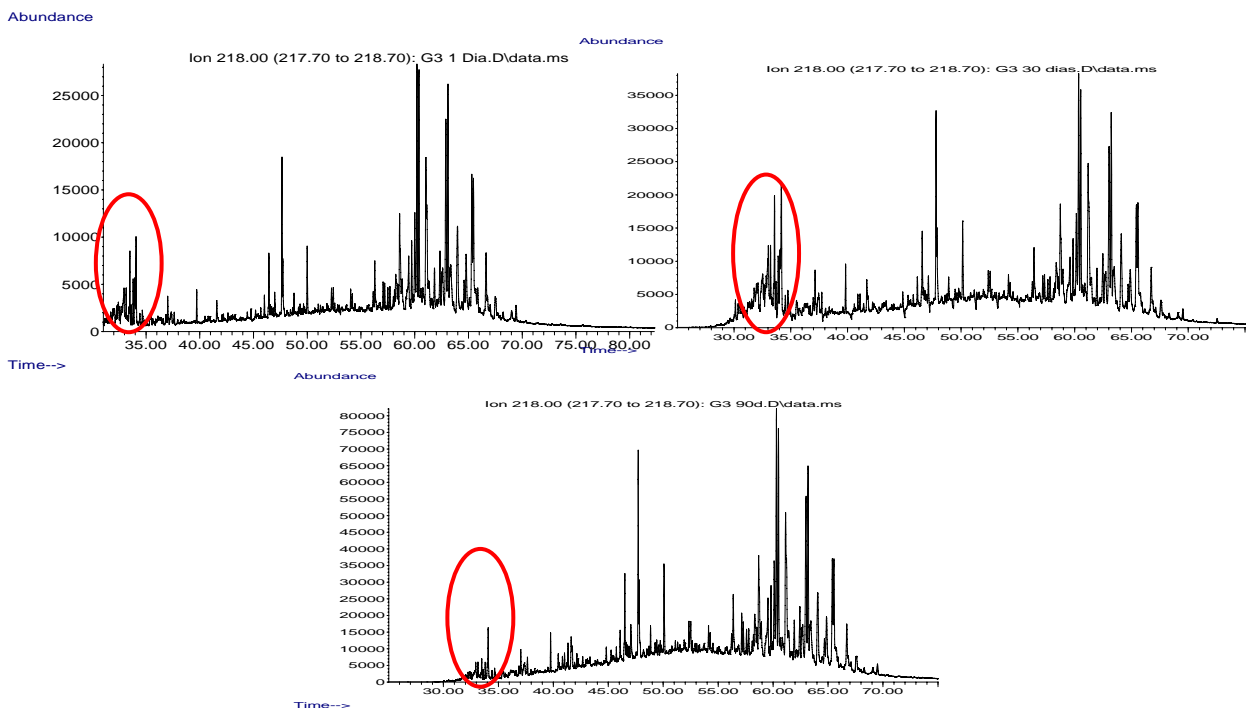


Figura n°23: Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 3



Mientras que en el grupo 1 la degradación de estos compuestos no es apreciable en ninguno de los tiempos de extracción (figura n°24)

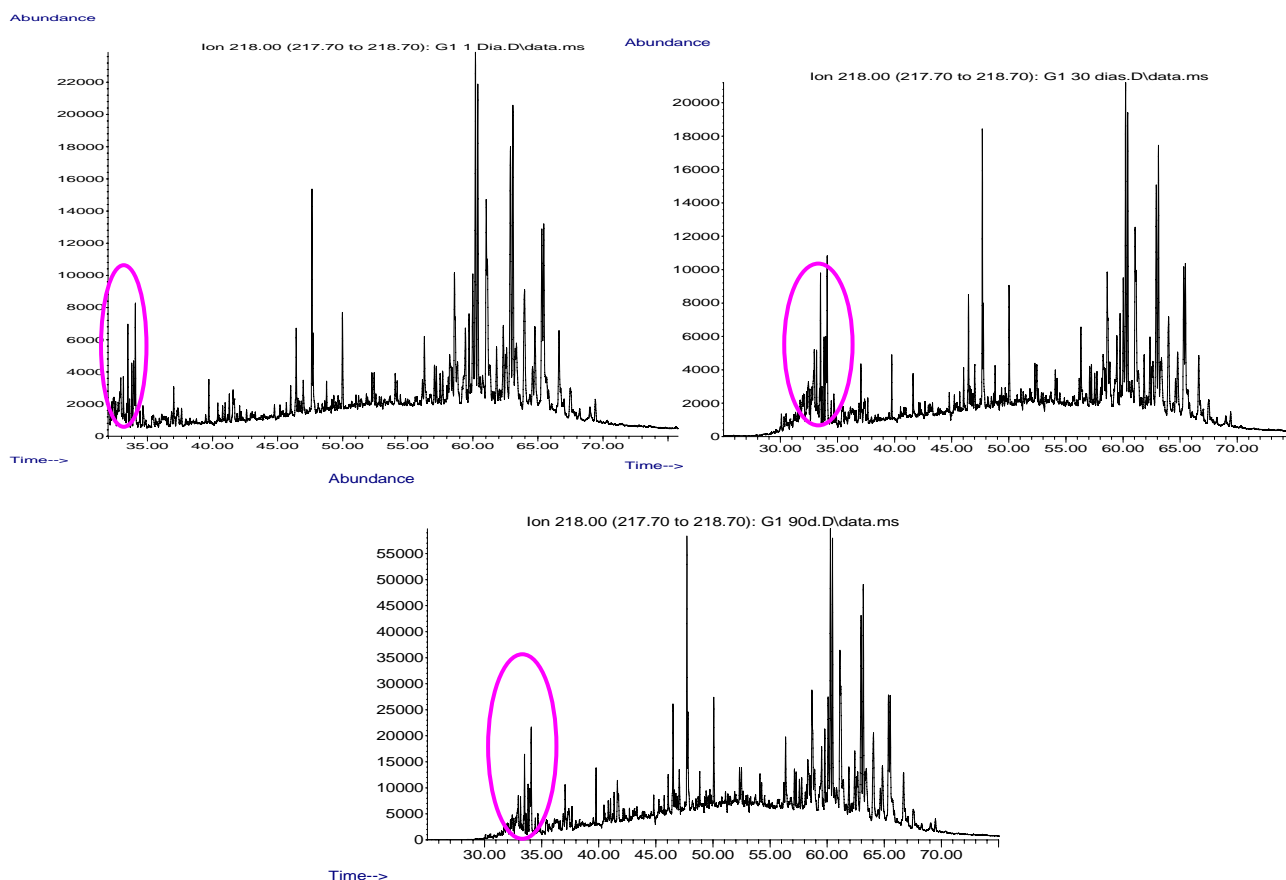


Figura n°24: Comparación del ión m/z 218 a los 1, 30 y 90 días de extracción para el grupo 1

Nuevamente entonces el análisis de biomarcadores demuestra la diferencia que genera la presencia del agente estructurante en los dos tipos de suelo seleccionados para este estudio, indicando que el mismo incrementa la eficiencia del proceso de biodegradación del crudo.

Como última evidencia del avance del proceso de biodegradación se muestra en la figura n°25 la comparación del TIC (total ion chromatography) en los distintos tiempos de extracción, para uno de los grupos de suelo (a título de ejemplo, ya que el comportamiento se repite en el resto de los grupos). Se observa que a medida que avanza el proceso de biodegradación se produce pérdida de línea base en el



cromatograma, esto se debe al incremento del UCM (unresolved complex mixture) generado a medida que las bacterias van degradando los componentes presentes en la mezcla de hidrocarburos. De igual manera, se observa que el incremento del UCM es mayor en los suelos de textura fina respecto a los suelos de textura gruesa, y en los que poseen agente estructurante respecto a los que no.

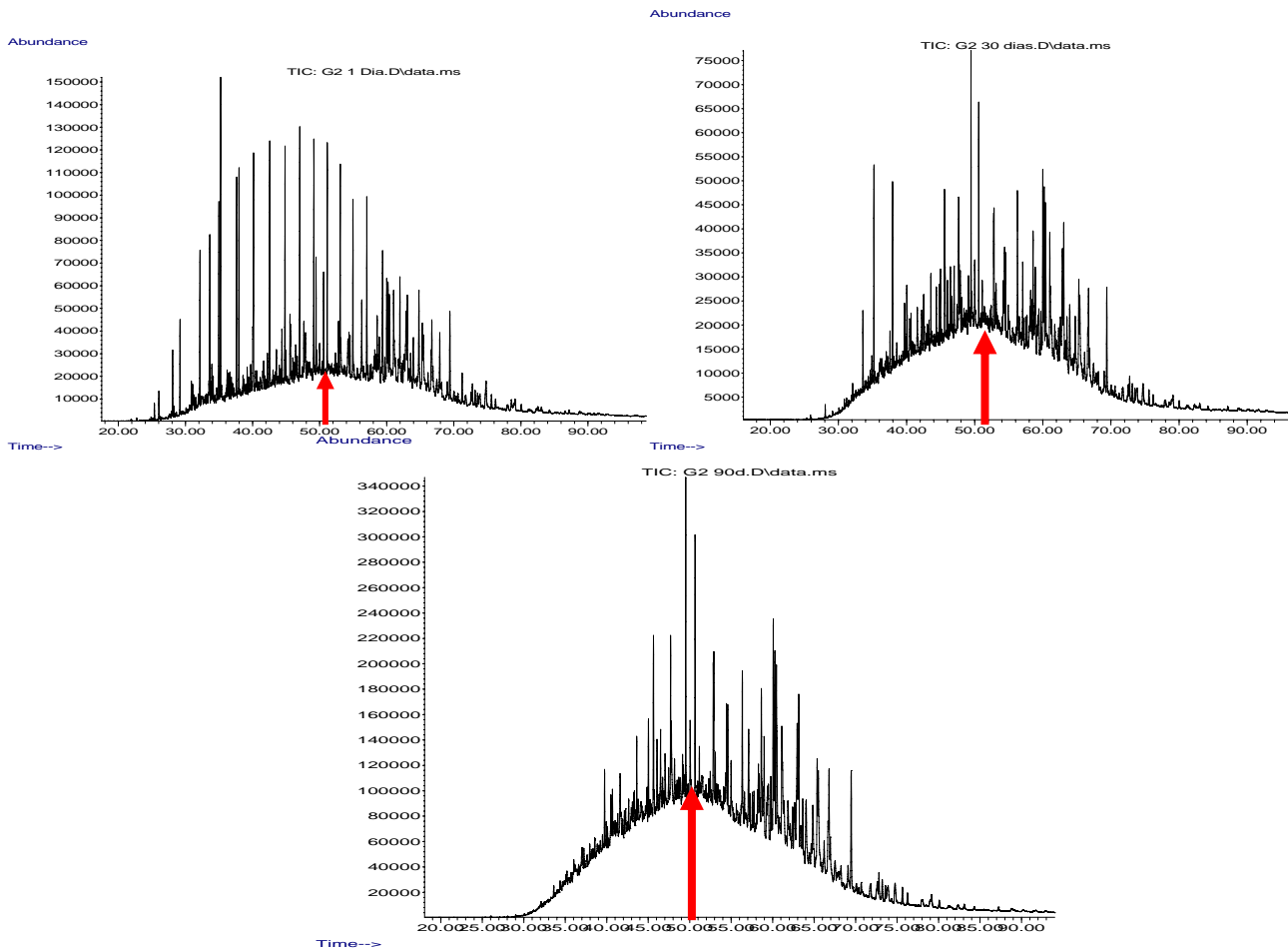


Figura n°25: Comparación del TIC a los 1, 30 y 90 días de extracción



CONCLUSIONES

- El porcentaje de biodegradación del suelo arenoso (G1) fue de 33,2%, el del suelo franco-arcillo-arenoso (G2) fue de 49,2%, el del suelo arenoso con agente estructurante (G3) fue de 32,2% y el del suelo franco-arcillo-arenoso con agente estructurante (G4) fue de 40%. El análisis estadístico indica que estos valores son diferentes entre los grupos 1 – 2, y 2 – 4 e iguales entre los grupos 1-3.
- La composición SARA a lo largo del tiempo de estudio, para todos los grupos, se desplaza empobreciéndose en hidrocarburos saturados y enriqueciéndose (de manera relativa) en el resto de las fracciones.
- La biodegradación del crudo utilizado en el presente estudio ocurrió, de modo general, principalmente a nivel de n –alcanos, seguidos por los esteranos de bajo peso molecular y por una biodegradación incipiente del C₃₀ hopano.
- La textura de un suelo constituye un factor importante a considerar al estudiar la eficiencia del proceso de biodegradación de un crudo mediano, teniéndose que en suelos con predominio de grano fino el proceso de biodegradación se lleva a cabo de manera más efectiva que en suelos con un mayor tamaño de grano.
- La presencia de un agente estructurante favorece el proceso de biodegradación del crudo ya que brinda al suelo una mejor estructura facilitando el contacto entre el crudo y los microorganismos presentes.
- El análisis de biomarcadores revela con más detalle los resultados del estudio permitiendo visualizar diferencias que no son apreciables al determinar parámetros más gruesos.
- La composición mineralógica de los suelos estudiados no constituyó un factor determinante en las diferencias observadas en el comportamiento de los distintos grupos de suelo frente al proceso de biodegradación del crudo.



RECOMENDACIONES

- Estudiar el comportamiento de otros agentes estructurantes y otras dosis en suelos arenosos a fin de conocer si se mejora la biodegradación
- Evaluar la biodegradación del crudo en los distintos tipos de suelo por un período mas prolongado de tiempo, a fin de determinar el tiempo necesario para recuperar los suelos contaminados o llegar a criterios de limpieza según normativa ambiental. Venezolana
- Llevar a cabo experimentos similares con otros tipos de crudo de diferentes grados API, para analizar la influencia de la textura del suelo y agentes estructurantes sobre la biodegradación de estos
- Evaluar los distintos parámetros (extractos de crudo, SARA y biomarcadores) con intervalos de tiempo más cortos para determinar con mayor precisión el momento en que ocurren los distintos cambios.
- Evaluar datos tales como N, P, CIC, MO, pH, conductividad eléctrica, entre otros para ambos tipos de suelo, a fin de realizar una discusión mas completa acerca de los factores que favorecen la biodegradación en determinados tipos de suelo y como pueden cambiar estos factores con la textura del suelo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atlas, R. M. (1991). *Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills*. Journal of Chemical Technical Biotechnology. 52: 149-156.
- Ayotamuno, M., Kogbara, R., Ogaji, S., Probert, S. (2006) *Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria*. Applied Energy 83 (2006) 1249-1257.
- Barberii, E. (1982). *El Pozo Ilustrado*. Programa de educación petrolera. Ediciones Lagoven S. A.
- Briceño, L., Méndez, L. (2006). *Comparación de potencial biodegradativo de técnicas de biorremediación*, Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ingeniería. Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela, Caracas, 102 pág.
- Boul, S., Hole and McCracken, R. (1981). *Génesis y clasificación de suelos*. Editorial Trillas S.A. México.
- Buckman, H., Brady, N.(1974) *The Nature and Properties of Soils*; 8th edition. Mc Millan Publishing Company. New York. 590 p.
- Carrillo, J.(2007) *Determinación de la Gravedad API y Densidad*. [Resumen en línea]. Disponible:<http://www.monografias.com/trabajos37/gravedad-api-densidad/gravedad-api-densidad.shtml> [Consultado: 2007, diciembre 10].
- Carbonagni, L., Mendez, A., Sanchez, V.(1999). *Caracterización de crudos Venezolanos. Orígenes y necesidades*. Acta Científica Venezolana, Vol. 50, Suplemento N° 1, 11-17.
- Casanova, E. (2005). *Introducción a la Ciencia del Suelo*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. UCV. Caracas. 482 pág.



- Chaîneau, C., Rougeux, G., Yepremian, C., Oudot, J. (2004). *Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil*. Soil Biology & Biochemistry 37 (2005) 1490- 1497.
- Eweiss, J.B., Ergas, S.J., Chang D. (1999). *Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisicoquímicos*, Mc Graw Hill / Interamericana de España. Madrid, España. 327 pp.
- Fernández *et al.* (2006). *Manual de Técnicas de Análisis de suelos aplicadas a la Remediación de Sitios Contaminados*. Instituto Mexicano del Petróleo. México DF. 184p.
- Gideon, O., Paschal, O. (2006). *A study of natural attenuation processes involved in a microcosm modelo f a crude oil- impacted wetland sediment in the Níger Delta*. Bioresource Technology (2007).
- Gutiérrez, E.M. (1990). *Los Residuos Sólidos Peligrosos: ¿Un riesgo sin solución?*. Ciencias. N° 20 UNAM.
- Greenwood, P., Wibrow, S., George, S., Tibbett, M. (2008) *Sequential hydrocarbon biodegradation in a soil from arid coastal Australia, treated with oil under laboratory controlled conditions*. Organic Geochemistry, Available online 17 May 2008.
- Hermoso, J. (2003) *Desarrollo de un proceso de tratamiento para las arenas asociadas a la producción de petróleo*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ingeniería. Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela, Caracas, 110 pág.
- Hesse, P. R. (1971). *A Textbook of Soil Chemicals Analysis*. John Murray Publishers. London. 519 p.



- Hincee R., Alleman, B., Hoepfel., Miller R. (1994) *Hydrocarbon bioremediation*. Lewis Publishers. Florida. Pp.163-174
- Hutchinson S.L., Banks, M. y Schwab, A. (2001). *Phytoremediation of aged petroleum sludge*: Effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual*, 30: 395 - 403.
- Huddleston, R.L. and Cresswell, L.W. (1976) *Environmental and Nutritional Constraints of Microbial Hydrocarbon Utilization in the Soil*, in Proceedings of 1975 Engineering Foundation Conference: The Role of Microorganisms in the Recovery of Oil, pp 71- 72, NSF/RANN, Washington.
- Infante C., Romero A., Arrocha A., Gilbert D., Brito F. (1999). *In situ bioremediation of 14 pits of Puerto La Cruz Refinery*. Fourth International in situ and on-site bioremediation Symposium. Battelle press. Pp. 409-413.
- Infante C., Arias M., Sanchez G., León N., Sanchez L. (2001)¹. *In situ biostimulation: a key factor in bioremediation*. The sixth International In situ and On site Bioremediation Symposium. Battelle press. Pp 257- 261.
- Infante C. (2001)². INTEBIOS®. *Biodegradation Technology for treating organic wastes from Oil industry Operations*. Visión Tecnológica. 1:5-10.
- Infante, C. (2005). *Contaminación de suelos y recuperación ecológica en Venezuela*. *Acta Biológica Venezolana*. Vol. 25, N° 1-2: 43-49. Enero-Diciembre.
- Instituto Mexicano del Petróleo. *Acerca del Petróleo*. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.imp.mx/petroleo/composicion.htm> [Consultado: 2007, enero 10]



- Johnston, C., Bastow, T., Innes, N. (2007). *The use of biodegradation signatures and biomarkers to differentiate spills of petroleum hydrocarbon liquids in the subsurface and estimate natural mass loss*. European Journal of Soil Biology 43 (2007) 328-334.
- Lo Mónaco, S. (2005). *Guía de Principios de Geoquímica*. Disponible en línea: <http://gea.ciens.ucv.ve/slomonac/hoja1.htm>. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de ciencias de la Tierra.
- López, L., Lo Mónaco, S. (1995). *Estudio geoquímico de crudos de los campos Caipe, Silvestre, Sinco, Silvan, Palmita, La Victoria y Guafita. Cuenca Barinas- Apure, Venezuela*. Informe presentado a la EXXON Services de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Luque, J. (2004). *Método para recuperar suelos contaminados por derrames de petróleo*. ETC Magazine [Revista en Línea]. Consultado el 13 de octubre de 2007 en: <http://www.etcmagazine.com.ar/index.php>
- Miller, R.W.Gardiner, D.T. (2004). *Soils in our environment* 10 edición, Prentice Hall ed., 642pp
- Murray, B. (1994). “Environmental Chemistry of Soils”. Oxford University Press. USA.
- Munsell, (1973). *Munsell soil color charts*. School of Environmental Science. University of Bradford. Baltimore, Maryland
- Pellini, L. (2006). *Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*. Trabajo Especial de Grado. Laboratorios de la Escuela Superior de Salud y Ambiente – Departamento de Química de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue. México



- Perry, R. (1992). *Manual del Ingeniero Químico*. 6^{ta} edición. México. McGraw-Hill.
- Peters, K., Walters, C., Moldowan, M.(2005). *The Biomarker Guide*. Vol. 2. 2da edición. Cambridge University Press. Cambridge. Reino Unido.1155p.
- Riser- Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils*. Lewis Publishers. 542 pp.
- Scheerr, K., Aichberger, H., Braun, R., Loibner, A. (2007). *Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons*. European Journal of Soil Biology 43 (2007) 341-350.
- Sellers, K. (1999). *Fundamentals of Hazardous Waste Site Remediation*. Lewis Publishers. 326 pp.
- Semple, K., Reid, B., Fermor, T. (2001) *Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants*. Environmental Pollution, 112: 269 - 283.
- Semple, K., Doick, K., Wick, L., Harms, H.(2007). *Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement*. Environmental Pollution 150 (2007) 166-176.
- Sepúlveda,J., Trejo. L. (2002). *Biorremediación de suelos contaminados*. Área de residuos peligrosos. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. Revista Biotecnología. Vol. 2. Número 1.
- Skoog, D., Holler, F., Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5^o edición. Mc Graw Hill. España. 1028p.



- Stebbins, G. (1970). *Flowering Plants, Evolution above the species level*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Tissot, BP. y Welte, DH. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence*. Springer-Verlag, New York. 699p.
- Tolgyessy, J. (1993) *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil. Environmental Aspects*. Elsevier. Czechoslovakia.
- U.S. EPA. (1996). *Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation*. EPA/625/K-96/001.
- U.S. EPA. (2001). *Supplemental Guidance for Developing Soil Screening Levels for Superfund Sites*. Per Review draft. Superfund. Washington 9355-4-24.
- Van Deuren J., Z. Wang y J. Ledbetter. (1997). *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*, 3° Ed. Technology Innovation Office, EPA, U.S.A. (<http://www.epa.gov/tio/remed.htm>).
- Van Hamme, J.D., Singh, A. y Ward, O. P. (2003). *Recent advances in petroleum microbiology*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4):503 – 549.
- Word Reference Base for Soil Resources. (2006). Página oficial: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/wrb/>. Consultado 10 de diciembre de 2007.
- Zobell, C.E. (1973). *Microbial degradation of oil: present status, problems and perspectives*. P.1-16. In D.G. Ahern and S.P. Meyers (eds.). *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*. Pub. No. LSU-SG-73-01, Louisiana State U., Baton Rouge.



APÉNDICES

I. Corrección respecto a la temperatura para el método del hidrómetro:

°C	Corrección
15	- 1,6
16	- 1,4
17	- 1
18	- 0,6
19	- 0,2
20	+ 0,2
21	+ 0,4
22	+ 0,8
23	+ 1,2
24	+ 1,6
25	+ 2,0
26	+ 2,2
27	+ 2,6
28	+ 3,0
29	+ 3,4
30	+ 3,8
31	+ 4,0
32	+ 4,4
33	+ 4,8
34	+ 5,2



II. Costos aproximados del proyecto.

Este estudio esta enmarcado dentro del proyecto n° 03-00-5801-2005/ CDCH (*Interacción de ácidos húmicos con compuestos orgánicos y metales de origen antrópico*), lo cual garantiza su financiamiento. El costo aproximado del proyecto a realizar es de aproximadamente 20288 Bs F, lo cual incluye reactivos, material de laboratorio, análisis a realizar y material de oficina necesario.

Concepto	Descripción	Cantidad	Precio unitario (Bs F)	Precio Total (Bs. F)
Material de Laboratorio	-----	-----	-----	3600
Reactivos	Tolueno	2,5 L	138	138
	Metanol	2,5 L	48	48
	Hexano	4L	130	130
	Heptano	4L	370	370
	Diclorometano	4L	142	142
Análisis	Carbono Total	2	110	220
	Carbono Carbonático	2	60	120
	Difracción de Rayos X	2	50	100
	Iatroskan	36	120	4320
	Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas	36	300	10800
Oficina	Hojas Impresiones Reproducción Encuadernación	-----		400
			TOTAL	20388



III. Cantidad de fertilizantes añadidas al crudo

- Relaciones a satisfacer: $C/P=800$ y $C/N=60$
- Se asume que todo el C potencialmente biodegradable proviene del crudo y que este posee un 80% del mismo.
- 15g de Crudo \longrightarrow 12g de C \longrightarrow $P= C/800= 0,015\text{g}$ de P necesarios.
 $N=C/60= 0,2\text{g}$ de N necesarios.

- Se tienen 2 fertilizantes: Fertilizante A (21% P_2O_5 y 16%N)

Urea (46% N)

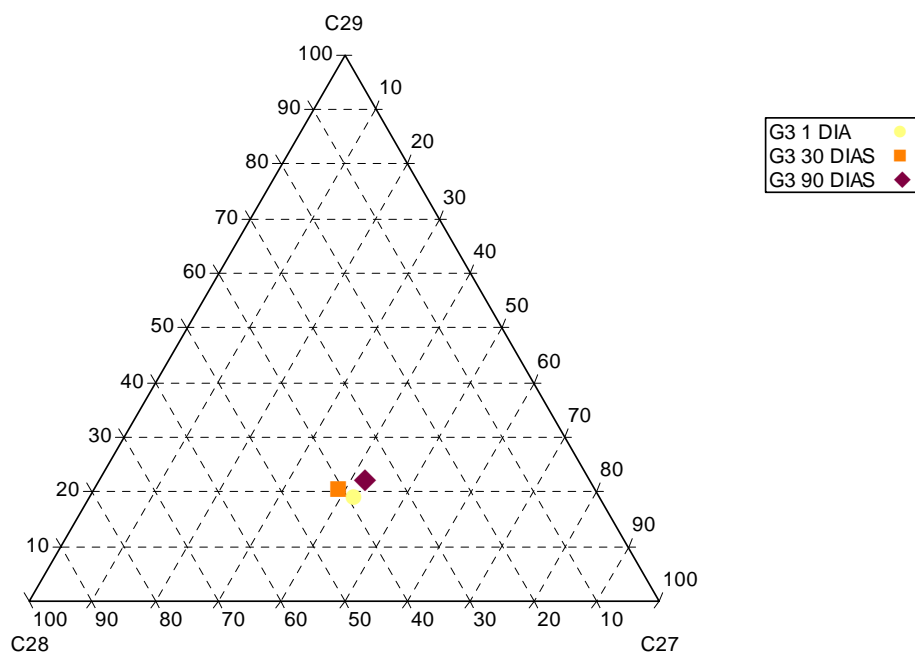
El fertilizante A posee una concentración de $P=0,092\text{g/g}$ de fertilizante, para satisfacer la cantidad de P requerida se deben agregar entonces **0,1630g** del fertilizante A. Al añadir esta cantidad, se están agregando simultáneamente 0,0261g de N con este fertilizante.

- Faltarían por agregar 0,1739g de N, que deben provenir de la Urea.
- Deben agregarse entonces **0,3780g** de úrea.



IV. Gráfico triangular de los esteranos C_{27} , C_{28} Y C_{29} y relaciones entre isómeros del esterano C_{29} .

Todos los grupos presentaron un gráfico triangular similar, éste fue colocado a modo de ejemplo:



A continuación se muestra una tabla con las relaciones de isómeros del C_{29} , donde se observan variaciones muy pequeñas:

Relación	G1 (1d)	G1 (90d)	G2 (1d)	G2 (90d)	G3 (1d)	G3 (90d)	G4 (1d)	G4 (90d)
$C_{29}S/R$	0,49	0,49	0,48	0,42	0,44	0,50	0,46	0,53
$C_{29}\beta/\alpha$	0,45	0,50	0,44	0,37	0,38	0,45	0,45	0,49