

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



**COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN
CON SOLVENTES DE DIFERENTE POLARIDAD, PARA UN CRUDO
MEDIANO A DOS CONCENTRACIONES EN UN SUELO SOMETIDO A
BIORREMEDIACIÓN**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la **Br. Alexmar
del C. Córdova G**, para optar
al Título de Licenciada en
Geoquímica.

Caracas, marzo de 2011.

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



**COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN
CON SOLVENTES DE DIFERENTE POLARIDAD, PARA UN CRUDO
MEDIANO A DOS CONCENTRACIONES EN UN SUELO SOMETIDO A
BIORREMEDIACIÓN**

Tutores:

Profa. Liliana López

Profa. Carmen Infante

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la **Br. Alexmar
del C. Córdova G**, para optar
al Título de Licenciada en
Geoquímica.

Caracas, marzo de 2011.

ACTA

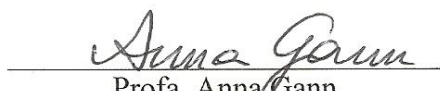
Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela como integrantes del Jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN CON SOLVENTES DE DIFERENTE POLARIDAD, PARA UN CRUDO MEDIANO A DOS CONCENTRACIONES EN UN SUELO SOMETIDO A BIORREMEDIACIÓN**, presentado por la Br. Alexmar del Carmen Córdova González, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por esta Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciada en Geoquímica.



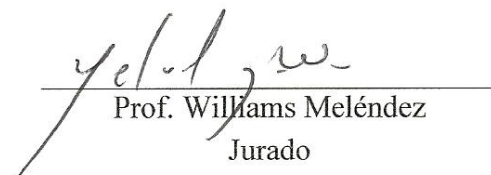
Prof. Liliana López
Tutora



Prof. Carmen Infante
Tutora



Prof. Anna Gann
Jurado



Prof. Williams Meléndez
Jurado

Dedicado a Dios y a mi hermosa familia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza y la sabiduría para el logro de esta meta.

A la Universidad Central de Venezuela y al personal docente que allí laboran, les doy las gracias por darme todas las herramientas y los conocimientos necesarios para alcanzar mis metas académicas.

A mis tutoras, profesora Liliana López y profesora Carmen Infante, por darme su valiosa orientación y guía en la elaboración del presente Trabajo de Grado.

Al proyecto PI-03-00-7178-2008 del CDCH-UCV.

A los laboratorios de Geoquímica Orgánica del Petróleo y Cromatografía de Gases, así como al personal que allí labora (María Gabriela García, César González, Patricia Lugo, Karla Quintero, Fernanda Oduber y Luis Vilchez).

Al personal del Laboratorio de Desechos de la Universidad Simón Bolívar, quienes proporcionaron la muestra de suelo y al profesor Ismael Hernández-Valencia por su colaboración.

A mis padres, Carmen y Alexis, por su infinito amor y paciencia y por ser mi modelo a seguir. A mis hermanos Alejandro, Alejandra, Alexia e Isaac, por estar siempre apoyándome. A mis cuñados Marianelly y Juan Carlos y a mi hermosa sobrina Mariaalejandra.

A mis amigos Khelymey Uzcátegui, Ana Karina Faraco, Nadeztha Hernández, Albani Burbano, Gibran Romero y Richard Henríquez, por su apoyo incondicional, no sólo durante la realización de este proyecto sino durante toda mi carrera.

A todos los profesores que realizaron su labor con mucha dedicación y profesionalismo y me brindaron sus conocimientos durante mi formación como futuro profesional, especialmente a los profesores de Proyecto Geoquímico, Santiago Marrero y Williams Meléndez.

Un agradecimiento especial a la profesora Raíza Fernández por haber sido más que una profesora, una gran amiga, siempre dispuesta a escuchar y a ayudar. Gracias por todos los consejos y palabras de aliento.

A todas las personas que de una u otra manera me estimularon en la culminación de este proyecto.

RESUMEN

Las actividades que están envueltas en la exploración y producción del petróleo producen impactos potencialmente negativos sobre los ecosistemas naturales; en vista de lo cual el hombre ha desarrollado técnicas como la biorremediación. Un aspecto clave dentro del proceso de biorremediación es conocer los límites permisibles que deben alcanzarse mediante la aplicación del tratamiento, siendo el valor límite permisible de aceites y grasas en suelos, establecido por la legislación venezolana, de 1% (m/m). Cuando se realizan estudios de biorremediación de suelos contaminados con crudo es importante considerar el solvente de extracción, el cual no es especificado en la legislación. En la presente investigación se compara la eficiencia de extracción de dos solventes (n-hexano y diclorometano) para la remoción de un crudo mediano, a concentraciones de 5% y 9%, de un suelo arenoso que está siendo sometido a un proceso de biorremediación.

Se realizó en laboratorio el proceso de contaminación de un suelo arenoso con concentraciones de 5% y 9% (m/m) del crudo mediano Guafita 10X, obteniéndose dos tratamientos: A (5%) y B (9%). Se llevó a cabo la extracción del crudo presente en cada tratamiento a los 1, 15, 30, 45 y 90 días del avance de la biodegradación, empleando el método de extracción soxhlet y usando los dos solventes. Luego de la extracción del crudo, se determinó la concentración de COT en cada residuo de suelo. Los extractos de crudo fueron separados y cuantificados en sus fracciones constituyentes, saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos y se realizó el análisis de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados.

Los resultados obtenidos en el estudio muestran una disminución progresiva de la eficiencia de extracción para ambos solventes, La eficiencia de extracción del diclorometano resultó ser mayor que la del n-hexano cuando la concentración inicial de crudo era de 5%, no obstante, a mayores concentraciones de crudo (9%), las eficiencias de extracción obtenidas para ambos solventes no presentan diferencias significativas. La variación en la composición SARA durante el experimento indica que la remoción de la fracción de hidrocarburos saturados ocurre más rápidamente para el tratamiento A, lo cual sugiere que el proceso de biodegradación en éste resultó ser más eficiente. El análisis de biomarcadores, también sugiere que la biodegradación en el tratamiento A avanza más rápidamente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Fundamentos Teóricos.....	4
2.1.1. Suelo.....	4
2.1.1.1. Componentes de los suelos	4
2.1.1.2. Propiedades de los suelos	7
2.1.2. Crudo.....	9
2.1.2.1. Composición del crudo.	9
2.1.2.2. Clasificación del crudo de acuerdo a su gravedad API	10
2.1.2.3. Impacto del crudo sobre las propiedades del suelo.....	11
2.1.2.4 Biodegradación del crudo en el suelo	11
2.1.3. Técnicas para la limpieza de suelos	14
2.1.3.1. Técnicas de biorremediación	17
2.1.3.2. Ventajas y desventajas de la biorremediación	18
2.1.3.3. Criterios de limpieza de la biorremediación	19
2.2. Antecedentes.....	21
3. MARCO METODOLÓGICO	26
3.1. Etapa de muestreo.....	26
3.1.1. Muestreo del crudo.....	26
3.1.2. Muestreo del suelo	26
3.2. Etapa de laboratorio.....	26
3.2.1. Caracterización del suelo	26
3.2.2. Proceso de biorremediación	29
3.2.3. Determinación del crudo extraído	30
3.2.4. Separación SARA	31
3.2.5. Análisis de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados.....	32
3.3. Análisis estadístico de los resultados	33

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Caracterización del suelo.....	35
4.2. Caracterización del crudo	37
4.3. Comparación de las eficiencias de extracción de los solventes.....	39
4.4. Variación en la composición SARA.....	49
4.5. Análisis de biomarcadores	53
5. CONCLUSIONES	66
6. RECOMENDACIONES	67
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8. APÉNDICES	72
Apéndice 1. Corrección de las lecturas del hidrómetro.....	72
Apéndice 2. Cálculo de la cantidad de crudo y fertilizantes que deben añadirse al suelo.	73
Apéndice 3. Cantidades de suelo, agente estructurante y crudo añadidas.....	74
Apéndice 4. Cantidad de crudo extraído (% m/m) para cada grupo a los distintos tiempos de extracción.....	75
Apéndice 5. Eficiencias de extracción (%) de los solventes a los distintos tiempos de experimentación.....	76
Apéndice 6. Curva de calibración para la determinación de la concentración de CT.....	77
Apéndice 7. Concentración de COT de los residuos de suelo	78
Apéndice 8. Pruebas estadísticas realizadas.....	79
Apéndice 9. CG-FID para los grupos A_hexano y B_hexano a los días1, 30 y 90.....	80
Apéndice 10. CG-EM (m/z = 191) para los grupos A_hexano y B_hexano a los días: 1, 30 y 90.....	82
Apéndice 11. CG-EM (m/z = 218) para los grupos A_hexano y B_hexano a los días 1, 30 y 90.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición en volumen (%) del horizonte A de un suelo	4
Figura 2. Triángulo para la determinación de la textura de los suelos	8
Figura 3. Carta de colores Munsell para la determinación del color de los suelos	9
Figura 4. Hidrómetro para determinación de la textura del suelo.....	27
Figura 5. Preparación de los composteros.....	30
Figura 6. Montaje Soxhlet para la extracción.....	31
Figura 7. Esquema experimental	34
Figura 8. Textura del suelo	36
Figura 9. Difractograma para la muestra de suelo.....	37
Figura 10. CG-FID para el crudo Guafita 10X.....	38
Figura 11. CG-EM (m/z = 191) para el crudo Guafita 10X.	38
Figura 12 CG-EM (m/z = 218) para el crudo Guafita 10X.	39
Figura 13. Crudo extraído vs. tiempo de extracción	40
Figura 14. Eficiencia de extracción (%) vs. tiempo de extracción	433
Figura 15. Masa de crudo extraída con n-hexano vs. masa de crudo extraída con DCM (Grupo A) .455	
Figura 16. Masa de crudo extraída con n-hexano vs. masa de crudo extraída con DCM (Grupo B) .466	
Figura 17. Variación del % COT vs. tiempo de extracción.....	48
Figura 18. % de hidrocarburos saturados y de resinas y asfaltenos extraídos para cada grupo el día 1.	51
Figura 19. Variación de la composición SARA para el grupo A_DCM.	52
Figura 20. Variación de la composición SARA para el grupo B_DCM.	52
Figura 21. Variación de la composición SARA para el grupo A_hexano.....	52
Figura 22. Variación de la composición SARA para el grupo B_hexano.....	52
Figura 23. CG-FID para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.	55
Figura 24. CG-FID para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.	56
Figura 25. TIC para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.....	58
Figura 26. CG-EM (m/z = 191) para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.....	60

Figura 27. CG-EM ($m/z = 191$) para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.....	61
Figura 28. CG-EM ($m/z = 191$) para el crudo Guafita 10X y ($m/z = 177$) para el grupo A_DCM al día 90.	62
Figura 29. CG-EM ($m/z = 218$) para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.....	64
Figura 30. CG-EM ($m/z = 218$) para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general de los grupos de organismos más importantes presentes en los suelos	6
Tabla 2. Rango típico de composición elemental de los crudos.....	10
Tabla 3. Clasificación de los crudos de acuerdo a su gravedad API.....	10
Tabla 4. Condiciones que afectan la biodegradación	18
Tabla 5. Características de la muestra de suelo empleada: textura, color y % de COT	35
Tabla 6. Composición SARA del crudo Guafita 10X (López et al., 1998).....	37
Tabla 7. Relaciones de biomarcadores para el crudo Guafita 10X	39
Tabla 8. Crudo extraído (% m/m) para cada grupo en los distintos tiempos de extracción.....	40
Tabla 9. Tasas de biodegradación del crudo (%).....	42
Tabla 10. Eficiencias de extracción de crudo (%) de los diferentes solventes a los distintos tiempos de experimentación	43
Tabla 11. Concentración de COT de los residuos de suelo a los distintos tiempos de extracción.....	48
Tabla 12. Variación en la composición SARA a los distintos tiempos de extracción, para cada grupo.....	49
Tabla 13. Variación en la composición SARA para cada grupo, el día 1.....	50
Tabla 14. Tasa de biodegradación (%) de hidrocarburos saturados a los 30 y 90 días	53
Tabla 15. Relaciones entre biomarcadores a los distintos tiempos de análisis, para cada grupo..	54

1. INTRODUCCIÓN

Venezuela se caracteriza por su gran abundancia en recursos hidrocarburos, lo cual la ha llevado a desarrollar la industria petrolera como su principal generadora de ingresos económicos. Sin embargo, las actividades que están envueltas en la exploración y producción del petróleo producen impactos potencialmente negativos sobre los ecosistemas naturales, afectando en forma directa el suelo, el agua, el aire, la fauna, la flora y al hombre. Con la finalidad de proteger el ambiente y preservar los ecosistemas, el hombre ha desarrollado técnicas como la biorremediación, la cual se basa en el uso del proceso de biodegradación (Nikolopoulou et al., 2007) para transformar los componentes tóxicos de los desechos orgánicos, como son las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos, en productos inocuos para el medio ambiente y la salud humana (Torres, 2003), tales como CO₂, H₂O y biomasa microbiana (Infante y Vásquez, 1999). La biorremediación representa, en la actualidad, una tecnología con un campo amplio de aplicación (Infante, 2001) y resulta una propuesta atractiva para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, debido a que es sencilla de aplicar, económicamente rentable y lleva a la transformación parcial o total de los contaminantes (Frankenberger, 1992).

Los hidrocarburos pueden llegar al suelo como consecuencia de eventuales derrames de crudo, en caso de accidentes, y por la disposición temporal de los desechos sólidos generados en las actividades de exploración y perforación, en sitios denominados fosas (Infante y Vásquez, 1999). Los suelos, frecuentemente, contienen microorganismos capaces de degradar los compuestos orgánicos formados en la naturaleza y para los hidrocarburos existen una cantidad considerable de hongos y bacterias con capacidad degradadora (Alexander, 1999). La biodegradación depende de factores como el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, y tipo y concentración de hidrocarburos; sin embargo, considerando que la mayoría de los procesos naturales de biodegradación pueden proceder lentamente, se aplican las técnicas de biorremediación, que permiten incrementar la velocidad del proceso de degradación biológica.

Algunas herramientas útiles en el monitoreo de la evolución de la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos son: la separación de las distintas fracciones del crudo

(saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), con la posterior determinación de la variación en peso de cada una de ellas y el análisis de los biomarcadores. Estos últimos, permiten medir el avance de la biorremediación en función de su resistencia a la degradación, considerando que los hidrocarburos saturados son degradados más fácilmente que la fracción aromática (Ortiz y Martínez, 2003).

Un aspecto clave dentro del proceso de biorremediación es conocer los criterios de limpieza, que definen los límites permisibles de crudo que deben ser alcanzados mediante la aplicación del procedimiento (Infante y Vásquez, 1999); la legislación venezolana (Art. 50 del Decreto 2635) establece un valor límite permisible de aceites y grasas de 1% (m/m) en los suelos. Para determinar la cantidad de crudo presente en los suelos es necesario realizar su extracción con un solvente, siendo comúnmente utilizados hexano y diclorometano; sin embargo, las normativas venezolanas no establecen un solvente específico a ser empleado. Debido a que los solventes tienen diferentes eficiencias de extracción, es posible que al extraer el crudo de una muestra de suelo, de la misma forma, pero utilizando dos solventes diferentes resulten distintas concentraciones (Fuentes et al., 2010). Esto afectaría de manera directa los criterios de limpieza de la biorremediación, ya que si se subestima la cantidad de crudo presente en el suelo se podrían establecer conclusiones incorrectas acerca de la contaminación del sitio. Por otra parte, durante la exposición del suelo a los contaminantes orgánicos, pueden ocurrir procesos que favorezcan la adsorción de éstos a la matriz del suelo (Singer y Munns, 1999), lo cual podría disminuir la facilidad con la que los hidrocarburos pueden extraerse del mismo.

En función de lo expuesto anteriormente, en este trabajo se plantea estudiar el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con un crudo mediano, a dos concentraciones, realizando la extracción del crudo con dos solventes (hexano y diclorometano), a fin de establecer comparaciones, antes y durante el proceso de biorremediación.

Este trabajo tiene como objetivos:

1.1. Objetivo General

Comparar la eficiencia de extracción con solventes de diferente polaridad, para un crudo mediano a dos concentraciones en un suelo sometido a biorremediación.

1.2. Objetivos Específicos

- Establecer las características físicas y químicas del suelo en función de su textura, composición mineralógica y concentración de carbono orgánico total (COT), y del crudo en base a su gravedad API, composición SARA y distribución de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados.
- Simular en el laboratorio el proceso de contaminación del suelo con concentraciones de 5% y 9% (m/m) de crudo y su posterior biorremediación mediante la estimulación de los microorganismos presentes en el suelo.
- Determinar y comparar la cantidad de crudo extraído con n-hexano y diclorometano para las dos concentraciones de crudo, así como la variación en la concentración de COT del suelo, en diferentes tiempos de extracción.
- Evaluar el efecto de la concentración inicial de crudo sobre el proceso de biodegradación del mismo, a través de las variaciones en su composición SARA (a t_0 = 1 día, t = 30 días y t_f = 90 días) y en la distribución de los biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados (a t_0 = 1 día y t_f = 90 días).

2. MARCO TEÓRICO

En este apartado se presentarán una serie de conceptos que fundamentan y explican aspectos significativos del tema en estudio y permitirán una mejor comprensión de los objetivos propuestos. Una vez establecidos los fundamentos teóricos más relevantes, asociados a la biorremediación de suelos contaminados con crudo, se presentará una revisión bibliográfica de trabajos previos que están relacionados con el problema de la investigación planteada y que sirvieron de base para su desarrollo.

2.1. Fundamentos Teóricos

2.1.1. Suelo: el suelo puede definirse como 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» (Lo Mónaco, 2005).

2.1.1.1. Componentes de los suelos: el suelo puede ser considerado como un sistema de cuatro componentes: mineral, orgánico, agua y aire (Casanova, 2005). El material mineral es derivado de la meteorización de las rocas y el material orgánico proviene de plantas y microorganismos (Singer y Munns, 1999). El horizonte A de un suelo en buenas condiciones para el crecimiento de cultivos contiene, en promedio, 45% en volumen de materia mineral, 5% de materia orgánica y 50% de espacio poroso dividido aproximadamente en 25% de agua y 25% de aire; como se muestra en la figura 1 (Casanova, 2005).

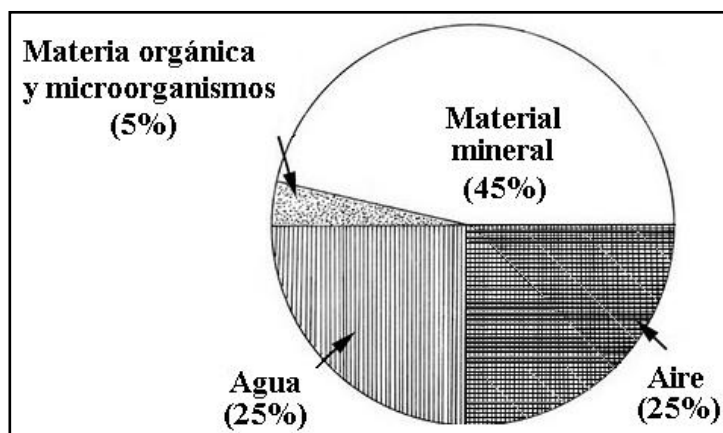


Figura 1. Composición en volumen (%) del horizonte A de un suelo (tomado de Casanova, 2005).

La fracción mineral de los suelos está representada por minerales resistentes, tales como el cuarzo, y minerales neoformados, producto de la meteorización, como arcillas (aluminosilicatos), óxidos e hidróxidos (Fe, Al, Mn), donde los principales minerales neoformados son los aluminosilicatos, que se presentan como pequeñas partículas (coloides) que se cohesionan unas con otras y se adhieren a otras partículas formando agregados (Singer y Munns, 1999).

La materia orgánica de los suelos está constituida principalmente por carbono, combinado con hidrógeno, oxígeno, fósforo, nitrógeno y azufre dentro de macromoléculas. La variedad de compuestos orgánicos en los suelos incluye sustancias húmicas y no húmicas, los cuales forman parte de la fracción coloidal de los suelos (Singer y Munns, 1999). Las sustancias húmicas consisten en material orgánico que se descompone lentamente y donde no pueden reconocerse las estructuras originales; éstas, al igual que las arcillas, son altamente cargadas y tienen una amplia área superficial por unidad de masa, lo cual les permite ser muy reactivas en los suelos y actuar como agente cementante en la formación de agregados (Singer y Munns, 1999). El componente orgánico tiene efectos importantes en las propiedades de los suelos, tales como mejorar la agregación reduciendo la susceptibilidad a la escorrentía, aumentar la capacidad de retención de humedad de los suelos y formar complejos con óxidos amorfos disminuyendo la fijación del fósforo hacia formas no aprovechables por las plantas (Casanova, 2005).

La humedad se refiere a la cantidad de agua presente en el suelo. El agua ayuda a controlar los factores aire y temperatura, los cuales son importantes para el crecimiento de las plantas, y, además, contiene en solución los nutrientes esenciales para el desarrollo de microorganismos y plantas. Por otra parte, el agua juega un papel esencial en la meteorización química, formando parte activa en las reacciones de hidrólisis e hidratación y en la síntesis de nuevos minerales a partir de los materiales que se encuentran en la solución del suelo. Finalmente, el agua que escurre sobre la superficie de los suelos tiene un poder erosivo muy grande, factor que hay que tomar en consideración para la preservación y productividad de los mismos (Brady, 1990; Casanova, 2005).

En cuanto al aire del suelo, el proceso de respiración de los microorganismos y plantas, genera una disminución del contenido de oxígeno (O_2) acompañada de un incremento en la

concentración de dióxido de carbono (CO₂), respecto al contenido atmosférico de estos dos gases (Casanova, 2005). Durante el proceso de aireación del suelo se produce un intercambio dinámico de gases, de manera que el O₂ se mueve de la atmósfera al suelo y el CO₂ se mueve en dirección contraria (Casanova, 2005).

Los organismos no representan una proporción significativa respecto al resto de los componentes de suelo, sin embargo, son responsables de la síntesis y degradación de materiales orgánicos en los mismos, además de participar en el mantenimiento de una buena estructura, espacio poroso y permeabilidad (favorecidas principalmente por las raíces de plantas y lombrices). La mayoría de los organismos pertenecen a la vida vegetal (flora), aunque no debe minimizarse el rol de los animales (fauna) en la descomposición de la materia orgánica, especialmente en las etapas tempranas (Brady, 1990); en la tabla 1 se muestra la clasificación general de los grupos de organismos más importantes presentes en los suelos.

Tabla 1. Clasificación general de los grupos de organismos más importantes presentes en los suelos (modificado de Brady, 1990)

REINO ANIMAL	MACRO	Hormigas
		Escarabajos
		Gusanos
		Ciempiés
		Cochinillas
		Arañas
		Ácaros
	MICRO	Nemátodos
		Protozoarios
		Rotíferos
REINO VEGETAL	Raíces de plantas superiores	
REINO MONERA	Hongos, levaduras, mohos	
	Actinomicetos	
	Bacterias	

Los organismos más pequeños (microorganismos) incluyen los dos tipos de estructuras celulares fundamentales: eucariotas (hongos y protozoarios) y procariotas (bacterias), y llevan a cabo muchos procesos esenciales de los suelos, tales como consumo y destrucción de materia orgánica, formación de sustancias húmicas y reciclaje de nutrientes (Huang et al., 2002). Particularmente las bacterias y hongos desarrollan un papel importante en la biodegradación de contaminantes orgánicos (tales como las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos del crudo), debido a

que pueden asimilar sustancias orgánicas que son tóxicas para la mayoría de los organismos (Singer y Munns, 1999).

Los organismos demandan condiciones físicas favorables y nutrición; entre los nutrientes esenciales se encuentran carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio; de éstos, el nitrógeno y el fósforo son frecuentemente críticos para el desarrollo de los organismos (Casanova, 2005), razón por la cual es necesario mantener sus concentraciones óptimas dentro de los suelos para evitar la lentitud en los procesos biológicos.

2.1.1.2. Propiedades de los suelos: la adecuada relación entre los componentes del suelo determina la disponibilidad de suficientes nutrientes para el crecimiento de las plantas, así como una serie de propiedades, algunas de las cuales se describen a continuación:

➤ *Textura:* es una característica permanente de los suelos y se refiere a la proporción relativa de arena, limo y arcilla, expresados como porcentajes en peso. Los contenidos de estas tres fracciones permiten clasificarlos haciendo uso del triángulo para la determinación de la textura de los suelos, el cual se muestra en la figura 2. Las doce clases texturales pueden agruparse en tres grupos representativos de suelos: los arenosos donde la arena constituye más del 70% de la fracción sólida del suelo e incluye las clases arenosa y areno-francosa; los arcillosos que poseen mínimo 35% de arcilla y en la mayoría de los casos más de 40%, e incluye las texturas arcillo-arenosa, arcillo-limosa y arcillosa; y los francos que pueden definirse de forma ideal como una mezcla de arena, limo y arcilla, donde las propiedades que estas fracciones ofrecen al suelo son aproximadamente iguales (Casanova, 2005).

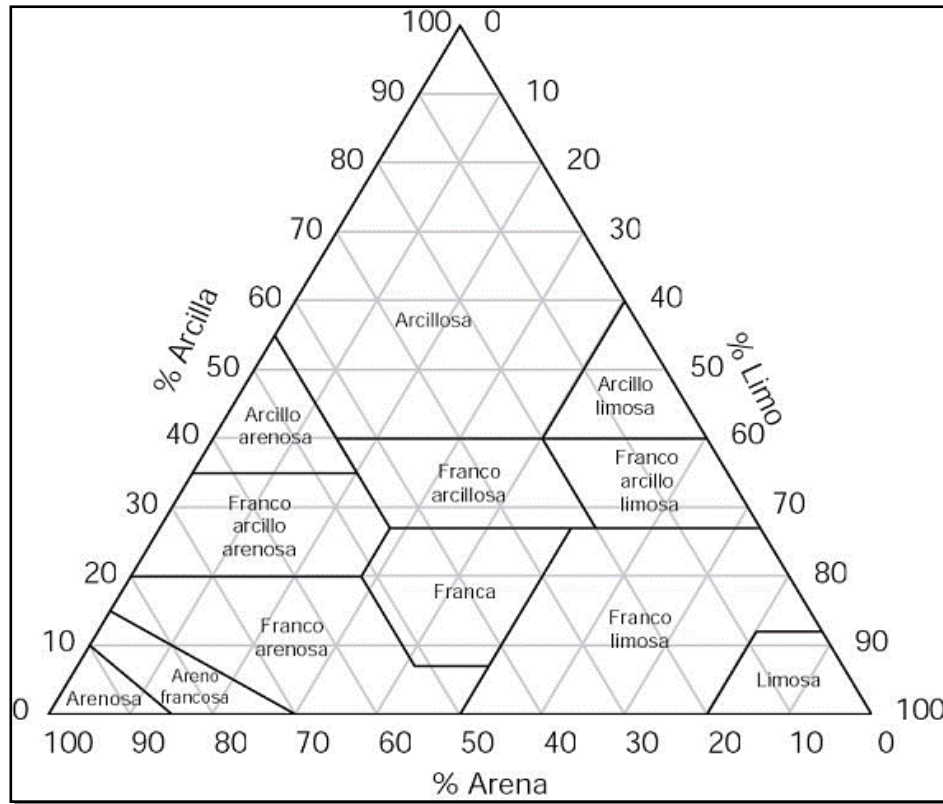


Figura 2. Triángulo para la determinación de la textura de los suelos (Casanova, 2005).

Los suelos de tendencia arcillosa tienen una alta área superficial en sus partículas, por lo tanto tienen una mayor capacidad de retener agua aprovechable y nutrientes en forma disponible para las plantas; la mayoría de los poros en estos suelos son pequeños y normalmente llenos de agua, por lo que generalmente la permeabilidad y aireación son inadecuadas. Por su parte, los suelos arenosos contienen partículas con baja área superficial, lo que genera que tengan baja capacidad de retener agua aprovechable y de suministro de nutrientes; sin embargo, sus partículas grandes sirven como soporte del sistema radical de las plantas y ayudan al suelo a ser más permeable y aireado (Casanova, 2005).

➤ **Color:** es una propiedad física muy importante, por su efecto en la pérdida y ganancia de energía radiante del suelo y es un índice para estimar algunas características del mismo, como contenido de materia orgánica, productividad, drenaje y grado de evolución (Casanova, 2005). La determinación del color se realiza por comparación visual con la carta de colores de suelos Munsell (1973) que se muestra en la figura 3.

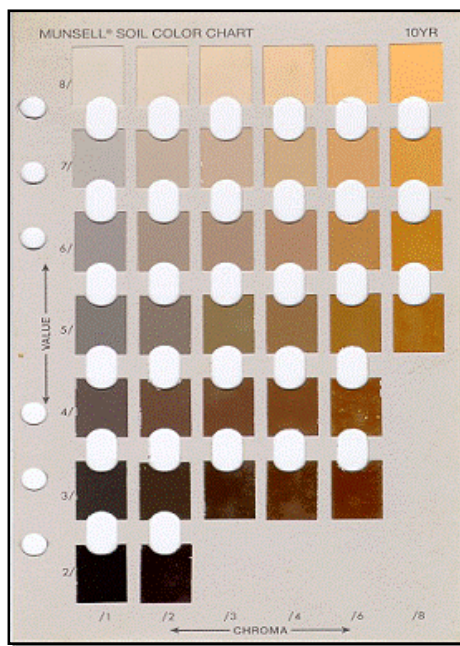


Figura 3. Carta de colores Munsell para la determinación del color de los suelos (Munsell, 1973).

➤ **Estructura:** se refiere al arreglo de las partículas del suelo (arena, limo y arcilla) en unidades más grandes, generalmente ocurre debido a la tendencia de las partículas más finas (especialmente arcillas) a mantenerse juntas. Las unidades de la estructura de un suelo se denominan agregados y pueden tener diferentes grados de desarrollo (débil, moderado, fuerte) y varios tamaños (pequeño, mediano, grande) (Casanova, 2005).

2.1.2. Crudo: puede definirse como una mezcla de hidrocarburos (saturados y aromáticos) y de compuestos orgánicos heteroatómicos, poliaromáticos, de estructuras complejas y de alto peso molecular (resinas y asfaltenos), las cuales contienen nitrógeno, azufre y oxígeno (Tissot y Welte, 1984).

2.1.2.1. Composición del crudo: el rango típico de composición elemental de los crudos se muestra en la tabla 2. Según Tissot y Welte (1984), la composición de un crudo puede estar definida por la concentración de hidrocarburos saturados, que incluyen alcanos lineales (n-parafinas), ramificados (iso-parafinas) y cicloalcanos (naftenos); hidrocarburos aromáticos que comprenden moléculas aromáticas, cicloalcanoaromáticas (naftenoaromáticos) y, usualmente, compuestos cíclicos de azufre (derivados del benzotiofeno); resinas y asfaltenos; los dos últimos,

representan una fracción de compuestos policíclicos de alta masa molecular que contienen átomos de N, S y O.

Tabla 2. Rango típico de composición elemental de los crudos (Killops y Killops, 1993)

Elemento	Abundancia (% m/m)
Carbono	82,2-87,1
Hidrógeno	11,8-14,7
Azufre	0,1-5,5
Oxígeno	0,1-4,5
Nitrógeno	0,1-1,5
Otros	≤ 0,1

2.1.2.2. Clasificación del crudo de acuerdo a su gravedad API: la densidad (masa por unidad de volumen) es una propiedad fundamental usada para evaluar la calidad de un crudo (Peters et al., 2005). Una medida alternativa de la densidad es la gravedad API, que se expresa frecuentemente en grados API y por definición es inversamente proporcional a la densidad (Killops y Killops, 1993). El Instituto Americano del Petróleo (API, por sus siglas en inglés) introdujo esta escala arbitraria donde la gravedad del agua destilada es 10 (gravedad específica de 1,0) (Peters et al., 2005). En esta escala de gravedad API:

$$^{\circ}API = \frac{141,5}{g.e.60^{\circ}/60^{\circ}} - 131,5 \quad \text{donde } g.e.60^{\circ}/60^{\circ} = \text{gravedad específica del crudo a } 60^{\circ} \text{ F en relación con el agua a la misma temperatura (Hunt, 1979).}$$

La concentración de resinas y asfaltenos y la distribución de los tipos de hidrocarburos (saturados y aromáticos), son las principales variables que definen las diferencias en la gravedad API de crudos entre sí (Hunt, 1979). En la tabla 3 se muestra la clasificación de los crudos de acuerdo a su gravedad API.

Tabla 3. Clasificación de los crudos de acuerdo a su gravedad API (Killops y Killops, 1993; Parra, 2003)

Crudo	Gravedad °API
Extrapesado	< 10
Pesado	10-22
Mediano	22-29
Liviano	29-40
Condensado	> 40

2.1.2.3. Impacto del crudo sobre las propiedades del suelo: las principales fuentes de contaminación de los suelos con crudo, lo constituyen la disposición temporal de desechos de la industria del petróleo en cavidades denominadas fosas y eventuales derrames de crudo por ruptura de oleoductos (Infante, 2005). El crudo contamina el suelo por su presencia y permanencia en éste e impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, pueden ser procesos más o menos lentos (López et al., 2006). Entre las consecuencias de la exposición del suelo al crudo pueden nombrarse la mortalidad de los organismos debido a la disminución de recursos alimenticios o a la destrucción del hábitat y limitaciones en la fijación de nitrógeno (Méndez et al., 2005).

2.1.2.4 Biodegradación del crudo en el suelo: el término biodegradación es usado para referirse a una variedad de procesos microbianos que ocurren en los ecosistemas naturales, tales como mineralización y oxidación (Riser-Roberts, 1998), los cuales reducen la persistencia y extensión de los contaminantes químicos de origen orgánico y constituyen la base de la biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos. La velocidad de la biodegradación de los compuestos orgánicos en los suelos depende de: (1) su tasa de metabolismo por parte de las bacterias y hongos, (2) su grado de difusión desde los sitios de adsorción hacia los microorganismos que producen su alteración y (3) su afinidad por la superficie sólida del suelo (Singer y Munns, 1999).

El grado de biodegradación del crudo depende de los siguientes factores:

➤ *Textura del suelo:* constituye un factor importante a considerar al estudiar la eficiencia del proceso de biodegradación de un crudo, 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 (García, 2008).

➤ *Disponibilidad de nutrientes:* el metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para

su asimilación y sintetización. Los nutrientes permiten que los microorganismos creen las enzimas necesarias para descomponer los contaminantes (Vidali, 2001). La adición de grandes cantidades de crudo resulta en altas relaciones C:N y C:P, que son desfavorables para la actividad microbiana, razón por la cual es necesario añadir dosis adecuadas de nitrógeno y fósforo durante el proceso de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos para compensar el desbalance nutricional en el suelo por el exceso de carbono (Infante, 2005); la masa de nutrientes a ser incorporada se determina a partir de la concentración inicial de crudo vertido en el suelo (Brissio, 2005).

➤ *Distribución de sus componentes en términos de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos:* los hidrocarburos saturados son los más susceptibles a la biodegradación, seguidos por los hidrocarburos aromáticos, mientras que los compuestos polares (resinas y asfaltenos) son menos o nada alterados (Peters et al., 2005); por esta razón, los crudos pesados y extrapesados, que se caracterizan por altas concentraciones de resinas y asfaltenos, son considerados de muy poca biodegradabilidad, mientras que los crudos livianos (con altas concentraciones de hidrocarburos saturados), son fácilmente biodegradados (Brissio, 2005).

➤ *Concentración inicial de crudo:* influye en la remoción de los contaminantes orgánicos del medio (Ijah y Antai, 2003). Varios estudios han documentado la tasa inicial de carga de hidrocarburos de crudo en el suelo y su grado de biodegradación, tal es el caso de una revisión preparada para American Petroleum Institute (API), en 1983, sobre las prácticas de tratamiento de tierras, la cual indica que del 70 al 90% de los hidrocarburos que se aplicaron a la superficie de los suelos a tasas de carga de 1 a 5% fueron removidos, principalmente a través de biodegradación (McMillen et al., 2001). Algunos autores sugieren que concentraciones de crudo en suelo por encima del 4% pueden causar efectos tóxicos a los microorganismos, disminuyendo la velocidad del proceso de biodegradación (Trindade et al., 2005), sin embargo, se han obtenido resultados satisfactorios a partir de ensayos con concentraciones iniciales entre 5 y 10% (Infante, 2005).

Dentro de las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos se reconocen compuestos orgánicos complejos denominados biomarcadores, cuyo esqueleto de carbono está formado por

organismos vivos y es suficientemente estable para ser reconocido y asociado con su precursor biológico (Hunt, 1979). Estos biomarcadores son de gran utilidad en el estudio de la biodegradación del crudo, en función de su resistencia a la degradación. En los estudios de biodegradación es común monitorear la variación en el tiempo de relaciones entre biomarcadores de fácil biodegradación con otros que se degradan más lentamente (Ortiz y Martínez, 2003); algunas de estas relaciones son:

- a) Pristano/ n - C_{17} y Fitano/ n - C_{18} : relacionan hidrocarburos de fácil degradación, tales como los n -alcanos de 17 y 18 átomos de carbono (n - C_{17} y n - C_{18}), con hidrocarburos de mayor bioresistencia como pristano y fitano, isoprenoides derivados de la oxidación y reducción de la molécula de clorofila, respectivamente. Se seleccionan pristano y fitano para las comparaciones debido a que son los isoprenoides más abundantes. Un aumento de estas relaciones con el tiempo, como resultado de la remoción de los n -alcanos, indica un avance del proceso de biodegradación (Ortiz y Martínez, 2003).
- b) Pristano/Fitano: la susceptibilidad de los isoprenoides a la biodegradación decrece con el incremento en el número de carbono, siendo pristano (isoprenoide de 19 átomos de carbono) más susceptible a sufrir biodegradación que el fitano (isoprenoide de 20 átomos de carbono). Una disminución de esta relación con el tiempo, como resultado de la remoción preferencial de pristano respecto a fitano, indica un avance del proceso de biodegradación (Peters et al., 2005).
- c) C_{23-3}/C_{30} hopano: los terpanos tricíclicos, como el C_{23-3} , son altamente resistentes a la biodegradación, conservándose aún cuando los hopanos son alterados. Un aumento de esta relación con el tiempo, como resultado de la remoción del C_{30} hopano, indica un avance del proceso de biodegradación (Peters et al., 2005).
- d) C_{29}/C_{27} : la susceptibilidad de los esteranos a la alteración microbiana decrece con el incremento en el número de carbonos, teniendo que los esteranos C_{27} son degradados antes que los C_{28} y C_{29} . Un aumento de esta relación con el tiempo, como resultado de la remoción del esteroano C_{27} , indica un avance de la biodegradación (Peters et al., 2005).

Algunas evidencias sugieren el siguiente orden de degradación para ser usado en el monitoreo de la biorremediación de desechos de refinerías: diasteranos, esteranos C₂₇, terpanos tricíclicos y terpanos pentacíclicos (Moldowan et al., 1995).

2.1.3. Técnicas para la limpieza de suelos: se han realizando numerosos intentos de limpieza de suelos contaminados usando técnicas tanto “in situ” como “ex situ”. Ninguna de éstas es una panacea para remediar los suelos contaminados y, a menudo, más de una técnica puede ser necesaria para optimizar el esfuerzo de limpieza; la complejidad de los suelos y la presencia de múltiples contaminantes también hacen que la mayoría de los esfuerzos de remediación sean arduos y costosos. Los métodos “in situ” son aquellos que se realizan en el sitio de la contaminación, el suelo no necesita ser excavado y por lo tanto, las vías de exposición se reducen al mínimo, algunas de estas técnicas son biorremediación y aislamiento/contención. Por su parte, los métodos “ex situ” involucran la remoción del suelo contaminado, generalmente por excavación, para ser tratado en el sitio o ser transportado a otro lugar y luego tratado; con estos métodos hay peligros de exposición de los contaminantes durante el movimiento y transporte. Algunas de estas técnicas son tratamiento térmico, incorporación de asfalto, solidificación/estabilización y extracción química (Sparks, 2003).

Las técnicas empleadas en el tratamiento de suelos contaminados pueden dividirse en procesos físicos, químicos y biológicos (Riser-Roberts, 1998):

➤ *Procesos físicos y químicos:* involucran tanto los procesos físicos como químicos por los cuales se modifican las propiedades químicas o físicas de un residuo. Estos tratamientos permiten la recuperación de compuestos para su posterior utilización como materia prima en otros procesos, separando los constituyentes peligrosos de la masa total del desecho, reduciendo su movilidad en el medio ambiente, o transformando el residuo en un material que cumpla con las condiciones para ingresar a otro sistema de tratamiento o al sistema de disposición final (Martínez, 2005). Incluyen:

- a) Tratamiento térmico: el suelo excavado se expone a altas temperaturas bajo una atmósfera inerte para incrementar la presión de vapor de los contaminantes orgánicos (Riser-

Roberts, 1998), los volátiles liberados son recolectados y trasladados a través de una cámara de postcombustión donde se oxidan o son recuperados mediante el uso de solventes (Sparks, 2003).

- b) Extracción química: en este tratamiento el suelo excavado se mezcla con un solvente, surfactante, o mezcla de ambos para eliminar los contaminantes. El solvente o surfactante y los contaminantes liberados se separan del suelo, el cual es entonces lavado o aireado para eliminar el solvente o surfactante; este último es entonces filtrado para partículas finas y tratado para eliminar los contaminantes. Esta técnica es costosa y no es de uso frecuente (Sparks, 2003).
- c) Solidificación/estabilización: esta técnica consiste en agregar un aditivo al suelo contaminado, luego de ser excavado, de manera que los contaminantes son encapsulados. La mezcla es depositada en vertederos, por lo tanto, los contaminantes no son libres de moverse solos; sin embargo, no son destruidos. Este método ha sido empleado para reducir al mínimo la contaminación por compuestos inorgánicos (Sparks, 2003). Es una técnica que puede ser empleada tanto “in situ” como “ex situ” (Riser-Roberts, 1998).
- d) Vitrificación: los contaminantes se solidifican con una corriente eléctrica, trayendo como resultado su inmovilización. La vitrificación puede inmovilizar los contaminantes durante un tiempo de hasta 10.000 años. Dado que una gran cantidad de electricidad es necesaria, la técnica es costosa (Sparks, 2003).
- e) Aislamiento/contención: los contaminantes se mantienen en el sitio mediante la instalación de barreras físicas en el subsuelo, tales como forros de arcilla y paredes de lodo, para reducir al mínimo la migración lateral. También se añaden a la arcilla minerales tensoactivos (órgano-arcillas) para mejorar la retención de los contaminantes orgánicos (Sparks, 2003).
- f) Incorporación de asfalto: con este método los suelos contaminados se colocan en mezclas

de asfalto caliente que luego se utilizan en la pavimentación. El asfalto y el suelo son calentados mientras se mezclan (Sparks, 2003).

- g) Extracción de vapor del suelo (SVE): emplea bombas de vacío conectadas a pozos verticales de poco diámetro para reducir la presión de vapor en el suelo e incrementar la volatilización de los contaminantes, los cuales son luego retirados por la misma bomba de vacío (Riser-Roberts, 1998).
 - h) Incineración: en este proceso la materia orgánica es oxidada en presencia de aire, generando emisiones gaseosas que contienen mayoritariamente dióxido de carbono, vapor de agua, nitrógeno y oxígeno (Martínez, 2005).
- *Procesos biológicos*: consisten en la descomposición de contaminantes por acción de los microorganismos (Martínez, 2005). Incluyen:
- a) Biorremediación: es una técnica que emplea el proceso de biodegradación, mediante el cual los compuestos orgánicos son usados como fuente de energía por los microorganismos autóctonos del suelo, ocurriendo una transformación a CO₂, agua, biomasa microbiana y compuestos intermediarios de hidrocarburos.
 - b) Fitorremediación: se basa en el uso de plantas para contener, aislar, remover o degradar compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en suelos, sedimentos, aguas subterráneas y superficiales. Hay cientos de especies de plantas que pueden desintoxicar contaminantes, por ejemplo, el girasol puede absorber uranio, ciertos helechos tienen alta afinidad por el As, hierbas alpinas absorben Zn, mostazas pueden absorber Pb, tréboles toman el crudo, y árboles de álamo destruyen los solventes de limpieza en seco (Tsao, 2003).
 - c) Tratamiento de tierras (landfarming): en esta técnica el suelo contaminado se excava, se extiende sobre una superficie y se mezcla con otros suelos, para aumentar el contacto entre los contaminantes y los microorganismos y promover condiciones aeróbicas,

permitiendo que procesos naturales como la biodegradación o fotodegradación puedan ocurrir para descontaminar el suelo. La superficie es preparada retirando los fragmentos de roca y otros escombros y la zona se rodea de muros de contención para disminuir la escorrentía; también son añadidos nutrientes para la estimulación microbiana (Sparks, 2003).

2.1.3.1. Técnicas de biorremediación: como se indicó anteriormente, se basan en el uso de microorganismos para descontaminar el suelo, convirtiendo los contaminantes orgánicos en productos menos dañinos. Para ello ocurren procesos de oxidación biológica y asimilación que convierten una gran variedad de contaminantes peligrosos en productos inocuos como CO₂, agua y biomasa microbiana (Singer y Munns, 1999). El proceso puede esquematizarse de la siguiente manera:



Es importante considerar que una especie de microorganismos puede ser eficaz en la degradación de un contaminante pero no de otro, por lo tanto, para que la biorremediación sea exitosa, los microorganismos capaces de asimilar los contaminantes deben estar presentes; sin embargo, no necesariamente lo están en la cantidad requerida para la biorremediación del sitio, por lo cual su crecimiento y actividad deben ser estimuladas (bioestimulación) (Infante, 2005). La bioestimulación implica, generalmente, la adición de nutrientes y oxígeno para ayudar a los microorganismos autóctonos (Vidali, 2001). En caso de ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático necesario para degradar los contaminantes, éstas deben ser introducidas al medio (bioaumentación) (Rodríguez y Sánchez, 2003).

La concentración y composición de la comunidad microbiana puede estar influenciada por los siguientes parámetros (Maroto y Rogel, 2002):

➤ *pH del suelo:* afecta significativamente la actividad microbiana y la solubilidad del fósforo, considerando que en suelos ácidos las especies de fósforo precipitan o son adsorbidas por especies de Al (III) y Fe (III), mientras que en suelos alcalinos pueden reaccionar con el

carbonato de calcio para formar hidroxiapatito, que es relativamente insoluble. A valores de pH cercanos a la neutralidad, el fósforo se encuentra en formas disponibles para los organismos (Manahan, 2000).

➤ *Temperatura*: generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose por debajo de 0 °C (Manahan, 2000).

➤ *Humedad*: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. El contenido de humedad para los procesos de biorremediación suele ajustarse a 40-60% de la capacidad de campo (CC) (Atlas y Bartha *en* Infante, 2005), término que se define como el contenido de humedad que el suelo posee cuando ha perdido toda el agua gravitacional (Casanova, 2005). En la tabla 4 se indican algunas condiciones óptimas para la degradación de contaminantes.

Tabla 4. Condiciones que afectan la biodegradación (modificado de Vidali, 2001)

Parámetros	Valor óptimo para degradación del crudo
Humedad	40-60% de CC
pH	5,5-8,0
Contenido de nutrientes	C:N:P = 100:10:1
Temperatura	20-40 °C
Concentración del contaminante	5-10% del peso seco del suelo.

2.1.3.2. Ventajas y desventajas de la biorremediación: Dentro de las ventajas pueden señalarse (Rodríguez y Sánchez, 2003):

- Su amplio ámbito de aplicabilidad en cuanto a compuestos orgánicos.
- Mientras los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir

la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro.

- c) Es una tecnología poco intrusiva en el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar.
- d) Es económica y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

Sin embargo, la técnica presenta también algunos inconvenientes y limitaciones, entre de las cuales pueden citarse (Rodríguez y Sánchez, 2003):

- a) La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida.
- b) Algunos compuestos son resistentes o inhiben la biorremediación.
- c) El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir y el seguimiento y control de la velocidad y extensión del proceso es laborioso.

2.1.3.3. Criterios de limpieza de la biorremediación: un aspecto clave dentro del proceso de biorremediación es conocer los criterios de limpieza, los cuales permiten definir cuando un suelo está limpio y se ha cumplido la meta de biorremediación; asimismo, es necesario conocer las características que debe cumplir el desecho o suelo contaminado para poder aplicarse la técnica (Infante, 2005). En el artículo 50 del Decreto 2635 (1998), se establece un valor máximo permisible en la mezcla suelo/desecho de 1% en peso, expresado como aceites y grasas, término que se refiere a la determinación gravimétrica de la cantidad total de crudo presente en el suelo (McMillen, 1997). Adicionalmente, se indica en el artículo 53 del mismo decreto, que la concentración del contaminante puede ser como máximo de hasta 10% para que se lleve a cabo la práctica de biotratamiento.

2.1.3.4. Determinación del contenido de crudo en los suelos: para determinar el contenido de crudo en el suelo y realizar análisis químicos (separación de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos y distribución de biomarcadores), es necesario separarlo de la matriz del suelo. La extracción puede ser realizada utilizando distintos métodos, tales como:

extracción del analito con un solvente, calentamiento de la muestra o purga de la muestra con un gas inerte, siendo éstos dos últimos usados en los análisis de compuestos volátiles (Brissio, 2005). En el presente trabajo se utilizará la extracción soxhlet, que es un método muy eficiente y ampliamente difundido; este método fue promulgado por la USEPA bajo el compendio SW-846, asignándole el número 3540C y definiéndolo como un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de los sólidos, tales como suelos, lodos y residuos. El proceso de extracción Soxhlet asegura el contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción (USEPA 3540C, 1996).

No existe una norma que establezca el solvente a ser utilizado para realizar el proceso de extracción soxhlet, en el método antes mencionado se indican como solventes de extracción las mezclas acetona/hexano (1:1) (v/v), diclorometano/acetona (1:1) (v/v), tolueno/metanol (10:1) (v/v) y el diclorometano, además de hexano, 2-propanol, ciclohexano y acetonitrilo como solventes de intercambio. En vista de esto, los distintos laboratorios seleccionan el solvente a emplear en función de factores tales como costo, calidad espectral, regulaciones del método, eficiencia de extracción, toxicidad, y disponibilidad (Brissio, 2005). Los solventes más empleados son hexano, diclorometano y triclorotrifluoroetano (freón 113) (McMillen, 1997), aunque el uso de éste último ha sido restringido debido a su efecto perjudicial sobre el ozono estratosférico; este compuesto se evapora cuando se expone al aire y se mueve lentamente hacia la parte superior de la atmósfera (estratosfera), donde actúa como fuente de átomos de cloro que dañan la capa de ozono, lo cual conlleva a un aumento en los niveles de radiación ultravioleta (UV) que alcanzan la superficie terrestre, pudiendo afectar la salud humana y el medio ambiente (USEPA 749-F-94-012, 1994).

Es posible que al extraer el crudo de una muestra, de la misma forma, utilizando diferentes solventes, se obtengan distintas concentraciones; estas discrepancias en cuanto a eficiencias de extracción que se observan al comparar distintos solventes son función de sus respectivas propiedades químicas, de las cuales una de la más importantes es la polaridad, la cual determina la afinidad que tendrá el solvente por los componentes del crudo.

2.2. Antecedentes

➤ *Del Arco y França (2001)*: plantearon un estudio cuya finalidad era determinar la influencia de la concentración de crudo en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en sedimentos arenosos, usando un cultivo mixto asociado a microorganismos indígenas. El tiempo de experimentación fue de 28 días y emplearon un crudo liviano (de composición: 46,50% saturados, 32,23% aromáticos y 21,27% compuestos polares), el cual fue añadido en concentraciones de 1,4%, 2,1% y 2,8% (m/m), en reactores de polivinilo que contenían arena. La extracción del crudo de la arena se realizó empleando el método soxhlet, con tetracloruro de carbono (CCl_4) como solvente extractante; se analizó la biodegradación de la fracción de hidrocarburos saturados, haciendo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM).

Los resultados obtenidos reflejaron que la pérdida acumulada de crudo disminuyó con el aumento del nivel de contaminación; al final del experimento, la degradación en los reactores que contenían 1,4% y 2,1% (m/m) de concentración inicial de crudo alcanzó el mismo nivel, indicando que había una tolerancia de los microorganismos a estos niveles de contaminación, mientras que en el reactor que contenía 2,8% (m/m) de crudo se observó menor actividad microbiana. Al analizar el cromatograma obtenido, observaron que a la menor concentración (1,4% m/m) los n-alcenos (C_{14} - C_{16}) fueron completamente metabolizados, mientras que a mayores concentraciones, disminuyó la actividad microbiana y la extensión de la biodegradación dependió del contenido de hidrocarburos. La susceptibilidad a la biodegradación fue inversamente proporcional al incremento del número de carbonos, encontrándose que la degradación del pristano fue afectada por la concentración de crudo inicial, mientras que la remoción del fitano solo se observó en el reactor de más baja concentración, siendo el compuesto más resistente.

➤ *Ijah y Antai (2003)*: llevaron a cabo un estudio para determinar el efecto de varias concentraciones (10%, 20%, 30% y 40% v/m) de un crudo liviano, derramado en un suelo, sobre los microorganismos indígenas, y el papel de los microorganismos en la remoción del crudo. El tiempo de experimentación fue de 12 meses, con determinaciones de la biodegradación de los

diferentes niveles de crudo, a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses. El extracto de crudo, obtenido con tetracloruro de carbono, fue analizado usando un cromatógrafo de gases (CG) equipado con un detector de ionización a la llama (FID). Los resultados indicaron que la biodegradación comenzó a ocurrir a los 3 meses de experimentación y estuvo asociada con el aumento en el tiempo de exposición; además encontraron que las tasas de degradación disminuyeron con el incremento de la concentración de crudo. El análisis cromatográfico del crudo extraído mostró que los hidrocarburos en el rango C_{14} a C_{32} disminuyeron extensamente en los suelos contaminados con 10% y 20% (v/m) de crudo, luego de 12 meses, pero moderadamente en los suelos tratados con 30% (v/m) de crudo durante el mismo período; en los suelos contaminados con 40% (v/m) de crudo se observó una degradación mínima de los hidrocarburos de C_{14} a C_{32} .

➤ *Kim et al. (2005)*: realizaron un estudio usando arena de mar contaminada con concentraciones de 3% y 6% (m/m) de un crudo liviano, con la finalidad de determinar las estrategias de biorremediación más efectivas para diferentes niveles de contaminación. Aplicaron distintas combinaciones de tres tratamientos (mezcla de tres microorganismos, un surfactante y un fertilizante con una relación C:N:P de 100:10:3) y la efectividad de las combinaciones fue examinada monitoreando la evolución de CO_2 , la actividad microbiana y la tasa de degradación del crudo. La extracción del crudo se realizó usando cloroformo. Los resultados reflejaron que la adición de microorganismos y de nutrientes aumentan la tasa de biodegradación; sin embargo, la adición de un surfactante y la cantidad de crudo no causaron efecto en el avance de la biodegradación, de hecho, se observó aproximadamente la misma tasa inicial y final de CO_2 , independientemente de la concentración inicial de crudo.

➤ *García (2008)*: realizó un estudio con la finalidad de evaluar el proceso de biodegradación del crudo mediano Guafita 1X en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica, durante un periodo de 90 días. Para ello se tomaron dos tipos de suelos (arenoso y franco-arcillo-arenoso), cada uno con y sin agente estructurante, y se contaminaron con el crudo a una concentración aproximada de 5%, se añadieron fertilizantes y, de forma periódica, se ajustó el nivel de humedad y de oxígeno mediante aireación. La extracción del crudo del suelo, se realizó mediante el método soxhlet, empleando diclorometano como agente extractante. Se realizó la separación del extracto en saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos; y posteriormente, se

analizó la fracción de hidrocarburos saturados mediante CG-EM para la determinación de los biomarcadores. Los resultados revelaron un empobrecimiento progresivo en la fracción de hidrocarburos saturados, con el consecuente enriquecimiento del resto de las fracciones. Finalmente se concluyó que la textura de un suelo influye en la eficiencia del proceso de biodegradación, teniéndose que en suelos con predominio de grano fino el proceso es más eficiente que en suelos con mayor tamaño de grano; de la misma manera, se estableció que la presencia de un agente estructurante favorece el proceso de biodegradación, facilitando el contacto entre el crudo y los microorganismos presentes.

En los trabajos mencionados anteriormente, las extracciones de crudo han sido realizadas con diferentes solventes (diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono). Esto demuestra que no existe uniformidad en el uso del solvente de extracción al realizar este tipo de ensayos, lo cual imposibilita el establecimiento de comparaciones entre los resultados obtenidos por diferentes investigadores o por diferentes laboratorios.

➤ *Morales (2009)*: llevó a cabo un estudio para evaluar las opciones de manejo de residuos de perforación de PETROCEDEN, S.A. El desarrollo experimental del trabajo incluyó la separación SARA del extracto de aceites y grasas obtenido con diclorometano, para evaluar el porcentaje de biodegradación que podría obtenerse si se aplican procesos de biorremediación a los ripsos de perforación; la extracción de aceites y grasas de los residuos fue realizada, adicionalmente, con n-hexano. A partir de los resultados se realizó la correlación entre los valores de aceites y grasas obtenidos usando ambos solventes, teniendo que la extracción con n-hexano es aproximadamente un 85% de la obtenida con diclorometano, lo cual indica que con ambos solventes se obtienen resultados diferentes.

➤ *Fuentes et al. (2010)*: evaluaron el efecto del solvente de extracción y la presencia de materia orgánica (hojarasca finamente picada) sobre la determinación del contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTPs) en dos tipos de suelo contaminados con crudo Mesa (M, 29°API) y Zuata (Z, 8,5 °API), antes y después de un proceso de biorremediación. Los suelos evaluados fueron uno de textura franco-arenosa y otro de textura arcillosa correspondiente a 100% arcilla

montmorillonita. Los solventes empleados fueron diclorometano, tolueno, hexano: acetona (1:1) y hexano; los composteros fueron preparados contaminando los suelos con los crudos seleccionados a una concentración final de 7% (m/m) y mezclados con 10% (m/m) de materia orgánica, constituyendo 8 tratamientos. La extracción de HTPs fue realizada siguiendo el método EPA 3540C.

Los resultados obtenidos indicaron que los porcentajes de recuperación de HTPs, en todos los casos, correspondieron a un intervalo 70-80%. En ningún caso se logró extraer el 100% del crudo inicialmente adicionado al suelo. El porcentaje de recuperación para un mismo tipo de tratamiento varió significativamente con el tipo de solvente empleado. La mayor recuperación se logró con la mezcla hexano: acetona (1:1), mientras que el hexano fue el solvente menos eficiente. Se observó una interacción significativa entre tipo de suelo, el solvente y la presencia de MO sobre la eficiencia de la extracción. Se detectaron diferencias en las tendencias relativas de las eficiencias de extracción al inicio y al final de la biorremediación. Estos resultados sugieren que el ensayo HTPs utilizando la norma EPA 3540C no representa la concentración real de hidrocarburos presentes en el suelo, y los valores obtenidos dependen de un conjunto de factores interrelacionados, tales como tipo de suelo, tipo de solvente, grado de biodegradación del crudo y presencia de materia orgánica.

➤ *Infante et al. (2010)*: realizaron un estudio para evaluar el efecto del potasio en la remediación de un suelo franco arenoso contaminado con un crudo liviano. El ensayo tuvo una duración de 60 días con muestreos desde el inicio y cada 15 días para evaluar la tasa de biodegradación. El contenido de crudo del suelo fue determinado mediante la técnica de extracción soxhlet, usando hexano como solvente de extracción. La recuperación de crudo con n-hexano fue de 67%. El porcentaje de biodegradación obtenido para uno de los tratamientos resultó ser mayor que el reportado en otra investigación, donde trabajaron con el mismo suelo, igual tipo de crudo, agentes acondicionantes y fertilizantes, pero empleando diclorometano como solvente de extracción. Estas diferencias fueron atribuidas a que el agente extractante (hexano) empleado en el estudio para la determinación de crudo, no es tan eficiente en la extracción de todas las fracciones del crudo como lo es el diclorometano.

➤ *Pons (2010)*: realizó un estudio para optimizar la extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo, en tres suelos con diferentes características físicas y químicas, utilizando como solventes de extracción hexano, metanol y diclorometano. Se realizaron extracciones soxhlet en cuatro tiempos establecidos. Se concluyó que el tiempo de extracción de hidrocarburos y compuestos que derivan del petróleo en un sistema soxhlet es función directa del tipo de suelo y del disolvente, teniendo que para hexano y diclorometano son necesarias entre 4 y 8 horas de reflujo, mientras que con metanol son necesarias entre 8 y 16 horas. Las extracciones de hidrocarburos totales de petróleo aumentaron conforme incrementaba la polaridad del solvente. Empleando metanol se denota una mayor existencia de compuestos polares en comparación con los hidrocarburos saturados, comúnmente solubles en n-hexano.

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Etapa de muestreo

3.1.1. Muestreo del crudo: el crudo empleado en este trabajo (Guafita 10X) es un crudo mediano (27,9 °API) perteneciente al Campo Guafita, estado Apure, el cual fue caracterizado en base a gravedad API y composición SARA (López et al., 1998).

3.1.2. Muestreo del suelo: el suelo empleado fue recolectado y donado por personal del Laboratorio de Desechos de la USB. Para la recolección se empleó barreno en los primeros 20 cm de profundidad del suelo, se muestrearon 25 puntos en una transecta de 30 m de longitud para luego obtener una muestra compuesta. La zona de muestreo se encontraba en un 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.

3.2. Etapa de laboratorio

3.2.1. Caracterización del suelo: el suelo fue caracterizado en base a textura, color, composición mineralógica y concentración de carbono orgánico total (COT).

3.2.1.1. Determinación de la textura del suelo: se realizó empleando el método del hidrómetro diseñado por Bouyoucos en 1962 (Casanova, 2005). El principio básico del método es la velocidad diferencial de sedimentación de las partículas, la cual está definida por la ley de Stokes y es función de la densidad de las partículas minerales (g/cm^3), la densidad del agua (g/cm^3), la viscosidad del agua (g/cm) y el radio de la partícula sedimentada (cm). Conociendo la velocidad de sedimentación (calculada por la ley de Stokes) y la altura (cm) en el cilindro por debajo de la cual se considera que las partículas ya han sedimentado, se calcula el tiempo de sedimentación (Casanova, 2005). El procedimiento se llevó a cabo como se indica a continuación:

- Se tamizó la muestra de suelo haciéndola pasar por una malla N° 10, con la finalidad de

obtener las partículas menores a 2 mm.

➤ Se midió el blanco introduciendo el hidrómetro y tomando la lectura en un cilindro graduado de 1000 mL que contenía 50 mL de una solución dispersante (pirofosfato de sodio 0,02 M) y cuyo volumen se completó con agua destilada. Adicionalmente se midió la temperatura de la solución (figura 4).



Figura 4. Hidrómetro para determinación de la textura del suelo.

➤ Se agregaron 50 g de suelo (previamente tamizado y secado a 105 °C) en un recipiente metálico y se añadieron 50 mL de la solución dispersante (pirofosfato de sodio 0,02 M) y 125 mL de agua destilada. La mezcla se agitó haciendo uso de un mezclador eléctrico durante aproximadamente 15 minutos.

➤ Se transfirió cuantitativamente la solución a un cilindro graduado de 1 L completando su volumen con agua destilada. Se agitó el cilindro graduado varias veces y se dejó reposar sobre una superficie, anotando el tiempo desde el momento en que se detuvo la agitación.

➤ Se introdujeron el hidrómetro y un termómetro en el cilindro graduado para realizar mediciones de densidad y temperatura a los 40 s y a las 5 h.

➤ Se corrigieron las lecturas con la lectura del blanco y respecto a la temperatura de calibración (19,5 °C) (apéndice 1) y se determinaron los porcentajes de las distintas fracciones aplicando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{arena} = 100 - \left[\left(\frac{\text{lectura corregida a los 40 s}}{\text{peso seco de muestra}} \right) * 100 \right]$$

$$\% \text{ arcilla} = \left(\frac{\text{lectura corregida a las 5h}}{\text{peso seco de muestra}} \right) * 100$$

$$\% \text{ limo} = 100 - (\% \text{arena} + \% \text{ arcilla})$$

➤ Una vez determinados los contenidos de las tres fracciones en el suelo, éste se clasificó haciendo uso del triángulo para la determinación de la textura.

3.2.1.2. Determinación del color del suelo: el color se determinó tomando una muestra de suelo y comparándola visualmente con la carta de colores de suelos Munsell (figura 3) (Munsell, 1973).

3.2.1.3. Composición mineralógica: las fases minerales presentes en la muestra de suelo fueron determinadas mediante la técnica de difracción de rayos X. Para realizar el análisis, se pulverizó la muestra en un mortero de ágata, hasta obtener un polvo fino y homogéneo, con la finalidad de garantizar la orientación de los cristales en todas las direcciones posibles, luego se colocó en un portamuestras y se introdujo en el equipo (difractómetro de polvo marca Bruker, modelo D8 Advancer). La identificación se realizó comparando el difractograma de la muestra de suelo con patrones experimentales almacenados en una base de datos, hasta encontrar una perfecta correspondencia entre el patrón y el diagrama de la muestra, asegurando así la identidad de la misma. Para determinar las fases presentes en el sólido se utilizó el programa EVA.

3.2.1.4. Determinación de carbono orgánico total (COT): la concentración de carbono total (CT) presente en el suelo se determinó utilizando un equipo analizador de carbono marca LECO (C-144), para ello se pesaron aproximadamente 175 mg de suelo y 100 mg de catalizador (Com-

cat LECO) en una celda de cuarzo-mullita y se introdujo la preparación en el equipo LECO; se obtuvieron lecturas que al relacionarlas con el peso de la muestra permitieron obtener la concentración de CT en % m/m. Se realizó la curva de calibración correspondiente utilizando patrones estándar LECO (apéndice 4).

Considerando que el análisis por difracción de rayos X no reflejó la presencia de fases minerales carbonáticas, se supuso que la concentración de COT presente en el suelo es equivalente la obtenida para CT ($COT \cong CT$).

3.2.2. Proceso de biorremediación: en esta fase se realizó en laboratorio, el proceso de contaminación del suelo caracterizado con concentraciones de 5% y 9% (m/m) del crudo mediano Guafita 10X, con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración inicial de crudo en el proceso de biodegradación. Se prepararon dos tratamientos:

- Tratamiento A: suelo con 5% de crudo
- Tratamiento B: suelo con 9% de crudo

Para cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, para un total de 6 composteros, los cuales se construyeron como se indica a continuación:

- Se identificaron las bandejas por grupo y se agregaron 140 g de suelo a cada una.
- Se agregaron 7,91 g de crudo a las bandejas del grupo A y 14,24 g de crudo a las del grupo B, como se muestra en la figura 5, a fin de obtener mezclas de 5% y 9% de concentración de crudo respectivamente (apéndice 2).



Figura 5. Preparación de los composteros.

- Luego de homogeneizar se añadió el agente estructurante en una concentración de 13% (m/m) (aproximadamente 18,2 g). Este agente estructurante estuvo constituido por hojas secas finamente cortadas en trozos de 1 a 2 mm.
- Se añadieron fertilizantes satisfaciendo las relaciones C/N= 60 y C/P= 800 (apéndice 2).
- Cada compostero fue removido con una frecuencia interdiaria para mantener un nivel de oxígeno adecuado y se le agregó agua con la misma frecuencia, a fin de ajustar el valor de humedad.

3.2.3. Determinación del crudo extraído: se llevó a cabo la extracción del crudo presente en cada grupo experimental a los 1, 15, 30, 45 y 90 días del avance de la biodegradación. La extracción se realizó empleando el método soxhlet, cuyo montaje se ilustra en la figura 6; para ello se tomaron 5 g de suelo de cada compostero y se colocaron en un dedal de celulosa previamente pesado (García, 2008). El dedal con la muestra se colocó en el tubo de extracción y se adicionó el solvente de extracción (aproximadamente 250 mL) en un balón previamente pesado que se colocó en el sistema soxhlet (Winefordner, 2003). Los solventes empleados fueron n-hexano grado HPLC (pureza 60-66%, marca Honeywell Burdick & Jackson) y diclorometano grado HPLC (marca Honeywell Burdick & Jackson). Se inició el reflujo por un tiempo aproximado de 8 a 10 horas (USEPA 3540C, 1996), tiempo en el cual se logró obtener el solvente incoloro. Una vez finalizada la extracción, se eliminó el solvente por rotaevaporación y posteriormente se determinó la cantidad de crudo extraída por gravimetría, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ crudo extraído} = \frac{\text{peso balón con crudo} - \text{peso balón limpio y seco}}{\text{peso muestra}} * 100$$



Figura 6. Montaje Soxhlet para la extracción.

Luego de la extracción del crudo, se determinó la concentración de COT en el residuo de suelo, a fin de determinar la variación de este parámetro con el avance de la biorremediación.

3.2.4. Separación SARA: una vez extraído el crudo se procedió a realizar la separación y cuantificación de sus fracciones constituyentes (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), a los 1, 30 y 90 días de experimentación. Para esto se seleccionó una réplica constante y al azar de cada tratamiento (1A y 1B, extraídas con ambos solventes) El procedimiento se realizó en dos etapas:

3.2.4.1. Separación y cuantificación de fracciones: las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos se separaron usando la técnica de cromatografía de adsorción en columna. Se emplearon columnas de aproximadamente 25 cm de longitud y 1 cm de diámetro empacadas con alúmina activada suspendida en hexano (fase estacionaria) y la fase móvil estuvo representada

por solventes de creciente grado de polaridad. La alúmina fue activada calentándola en estufa a 200°C durante 48 horas, posterior a ésto se colocó en caliente en un recipiente que contenía n-hexano. La fracción de hidrocarburos saturados fue eluida con n-hexano grado HPLC y los hidrocarburos aromáticos con tolueno grado HPLC (marca Sigma-Aldrich) (López y Lo Mónaco, 2004), mientras que la proporción de resinas y asfaltenos fue obtenida por diferencia con las dos fracciones anteriores, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ resinas y asfaltenos} = [\text{extracto} - (\text{saturados} + \text{aromáticos})] * 100$$

Los solventes utilizados para eluir las distintas fracciones se eliminaron por rotaevaporación y las mismas fueron cuantificadas por gravimetría.

3.2.4.2. *Purificación de hidrocarburos saturados (doble cromatografía):* los hidrocarburos saturados fueron eluidos nuevamente con n-hexano, ahora utilizando columnas de menor tamaño (aproximadamente 10 cm de longitud * 0,5 cm de diámetro) empacadas nuevamente con alúmina activada. Este procedimiento se llevó a cabo con la finalidad de garantizar la pureza de dicha fracción, a la cual se le realizó, posteriormente, el análisis de biomarcadores (López y Lo Mónaco, 2004; García, 2008).

3.2.5. *Análisis de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados:* se realizó el análisis de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados a $t_0 = 1$ día $t = 30$ días y $t_f = 90$ días de iniciado el proceso de biorremediación. Igualmente se analizaron los biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados del crudo Guafita 10X. La distribución de n-alcanos se obtuvo haciendo uso de la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (FID). Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se obtuvieron los fragmentogramas m/z 191 (terpanos), m/z 177 (25-norhopanos), m/z 217 y m/z 218 (esteranos). Los equipos utilizados fueron un cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 6890N Network DCSysstem, y un espectrómetro de masas MS Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. El CG utilizó una columna DB-1, de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película, con una temperatura de programada a 80 °C durante 4 minutos, 2 °C/min desde 80 °C

hasta 280 °C, 10 minutos a 280 °C, 1 °C/min desde 280 hasta 310 °C y 20 min a 310°C, para un total de 164 minutos de análisis.

3.3. Análisis estadístico de los resultados:

Se calcularon la media, desviación estándar y coeficiente de variación para los datos de cantidad de crudo extraído con cada solvente y para los valores de COT del suelo residuo luego de la extracción; relacionando las cantidades de crudo extraído con las concentraciones de crudo originales se calcularon las eficiencias de extracción de los solventes a los distintos tiempos de experimentación y finalmente, se realizaron pruebas estadísticas “t” de student (apéndice 8) con los valores de cantidad de crudo extraído con cada solvente, eficiencias de extracción y concentración de COT obtenidos, para determinar la probabilidad de que las medias pertenezcan a una misma población (en el caso en que las diferencias no sean significativas) o que provengan de distintas poblaciones (en el caso que las diferencias de medias sea significativas). El programa empleado para realizar el análisis estadístico fue STATISTICA 6.0.

En la figura 7 se ilustra el esquema seguido para llevar a cabo la propuesta experimental.

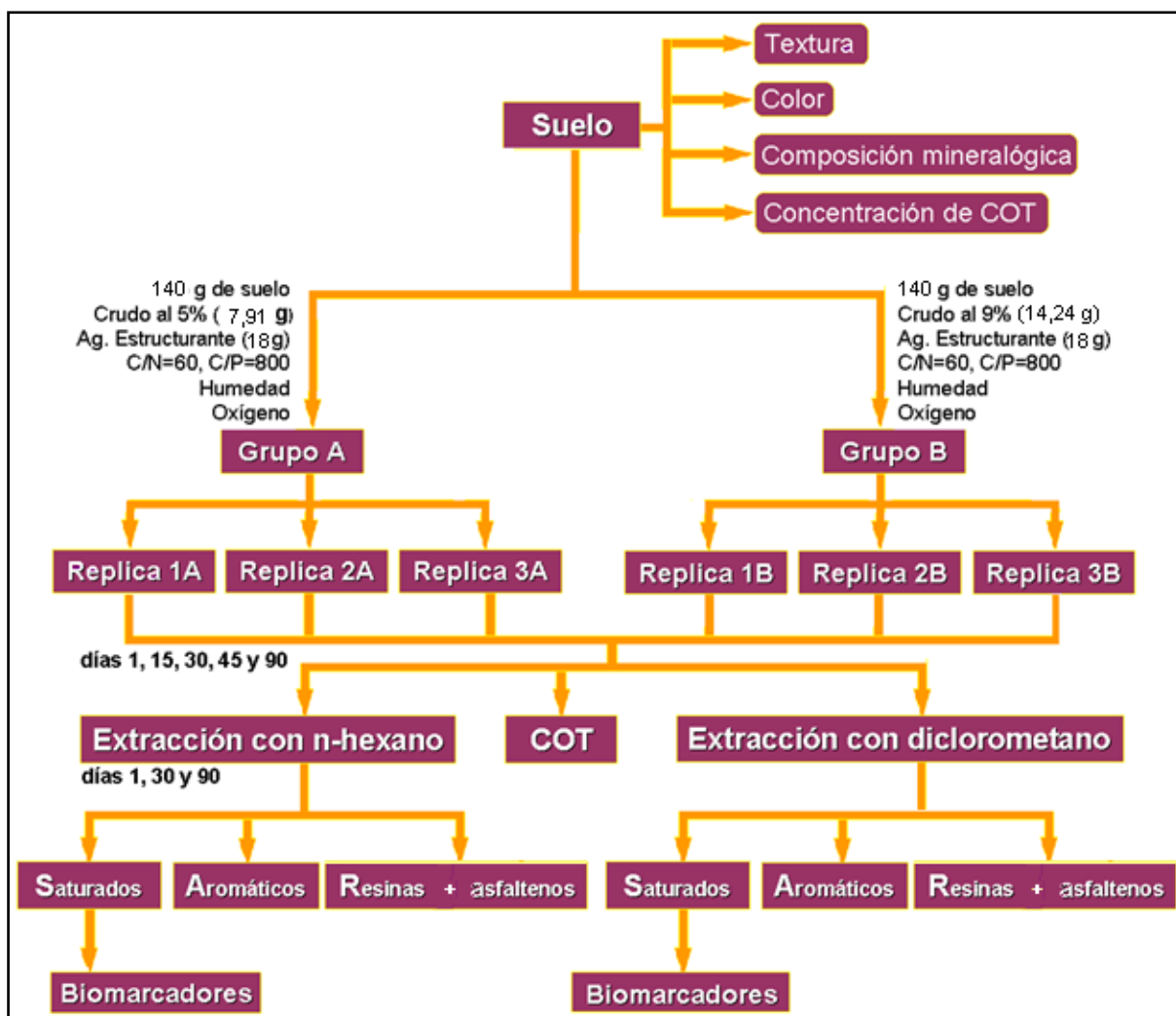


Figura 7. Esquema experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados obtenidos a partir de la metodología previamente establecida, así como la interpretación de los mismos. La discusión comienza con la caracterización del crudo y del suelo empleados, seguido por la comparación de las eficiencias de extracción de los solventes utilizados (n-hexano y diclorometano), el estudio de la variación en la composición SARA con el avance del experimento y finalmente el análisis de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados.

1. Caracterización del suelo

Las características de la muestra de suelo fueron establecidas en función de su textura, color, composición mineralógica y concentración de COT. La proporción de arena, limo y arcilla presentes en el suelo, las cuales fueron obtenidas empleando el método de Bouyoucos (Casanova, 2005), se muestran en la tabla 5. Con estos valores se estableció la textura del suelo, de acuerdo a la ubicación de cada uno de ellos en el triángulo para la determinación de textura, el diagrama obtenido se muestra en la figura 8.

Tabla 5. Características de la muestra de suelo empleada: textura (proporción de arena, limo y arcilla), color y % de COT

TEXTURA	F. granulométrica	Contenido (%)
	Arena	96,4
	Limo	0,6
	Arcilla	3,0
COLOR	Marrón claro (7,5YR6/4)	
COT	Media (7 medidas)	0,13
	Desv. Est.	0,01

A partir de diagrama se establece que el suelo presenta una textura arenosa con un marcado predominio de partículas de grano grueso. Este tipo de textura no es la más favorable para el avance de los procesos de biodegradación, ya que en suelos de textura franca el proceso de biodegradación se lleva a cabo de manera más efectiva que en suelos de textura arenosa (García, 2008); sin embargo, este tipo de suelo presenta ventajas tales como una buena aireación

(Casanova, 2005), necesaria para procesos de biodegradación aeróbica.

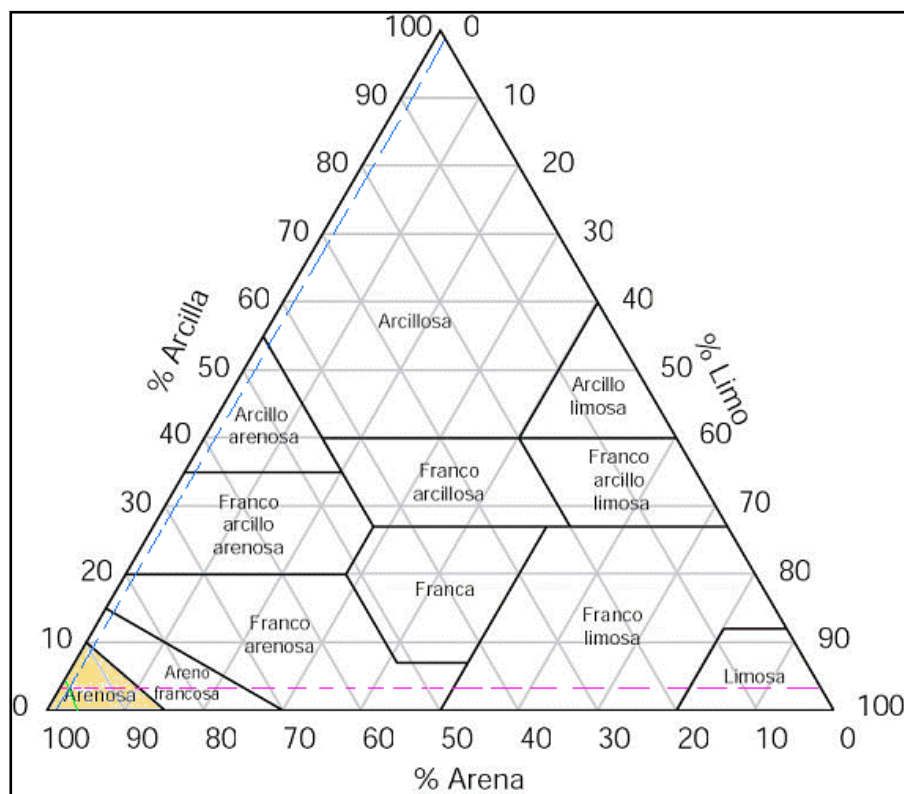


Figura 8. Textura del suelo

El color del suelo fue establecido por comparación visual de la muestra en seco con la carta de colores de suelos Munsell (1973), obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla 5.

La composición mineralógica del suelo se observa en la figura 9. El difractograma refleja como única fase mineral cuarzo. García (2008), realizó estudios de biorremediación empleando un suelo con propiedades similares y estableció que la mineralogía no constituye un factor determinante en el proceso de biodegradación del crudo, por lo cual en el presente estudio no se espera que exista una interacción significativa entre el crudo y la fase mineral, fundamentalmente por su poca reactividad.

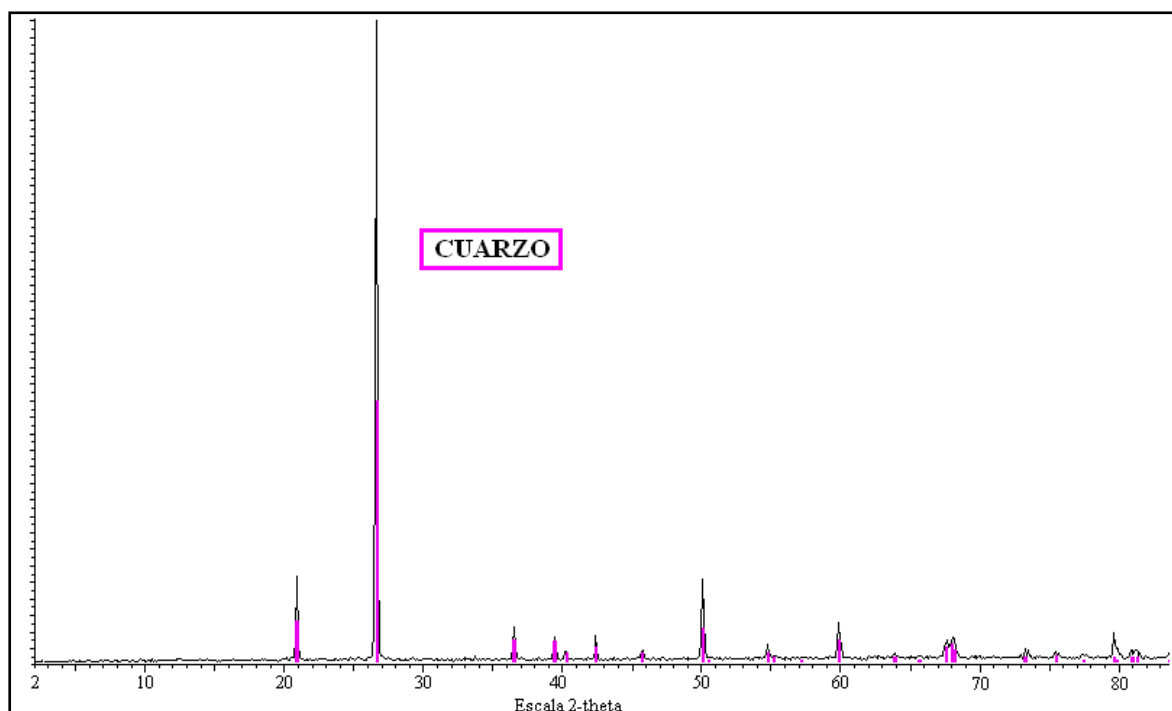


Figura 9. Difractograma para la muestra de suelo.

La concentración de COT del suelo (tabla 5) es baja (0,13%), debido a que se trata de un suelo del oriente venezolano, los cuales se caracterizan por presentar muy bajos contenidos de materia orgánica (Torres et al., 1991). Esto concuerda con otros parámetros estudiados tales como el color, ya que los suelos con cantidades poco significativas de materia orgánica tienden a presentar colores claros (Casanova, 2005). La ausencia de ruido y picos anchos en el difractograma también es indicativa de ausencia de fases amorfas que podrían asociarse a la presencia de materia orgánica.

2. Caracterización del crudo

El crudo Guafita 10X de 27,9 °API, fue caracterizado por López et al. (1998). La composición SARA se presenta en la tabla 6.

Tabla 6. Composición SARA del crudo Guafita 10X (López et al., 1998).

Saturados (%)	Aromáticos (%)	Resinas (%)	Asfaltenos (%)
54	25	11	10

Considerando la gravedad API del crudo, se encuentra dentro del grupo de los crudos medianos (Parra, 2003). Por otra parte, sobre la base del tipo de hidrocarburos constituyentes puede clasificarse como un crudo parafínico-nafténico (López et al., 1998).

La distribución de biomarcadores para el crudo se muestra en las figuras 10 a 12, donde se presentan respectivamente el cromatograma para n-alcenos e isoprenoides y los fragmentogramas para terpanos (m/z 191) y esteranos (m/z 218).

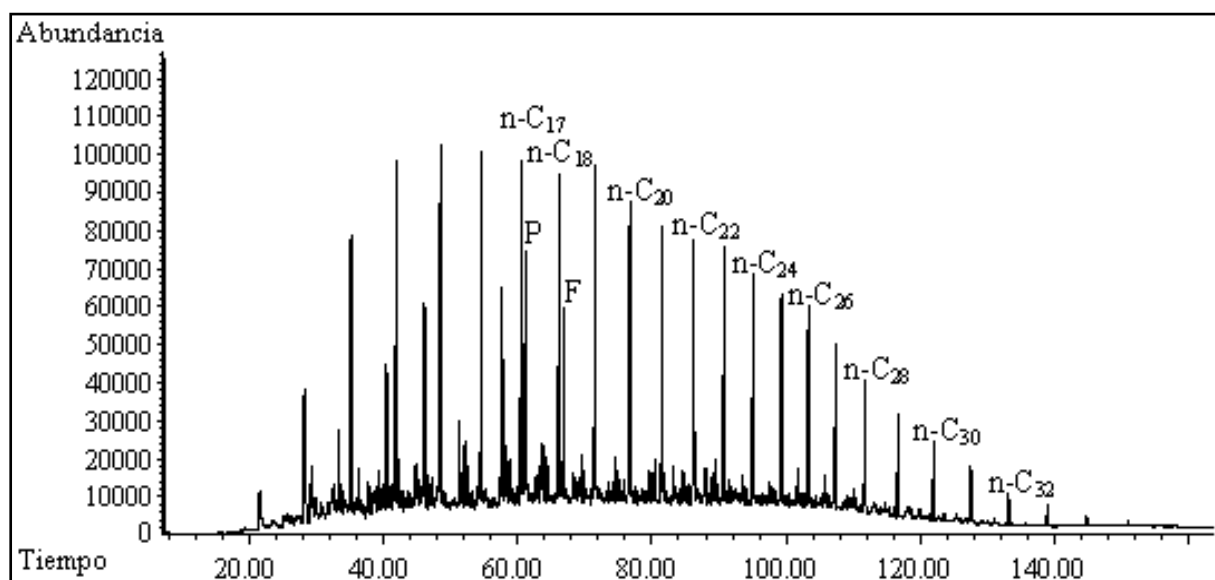


Figura 10. CG-FID para el crudo Guafita 10X.

P=pristano, F=fitano.

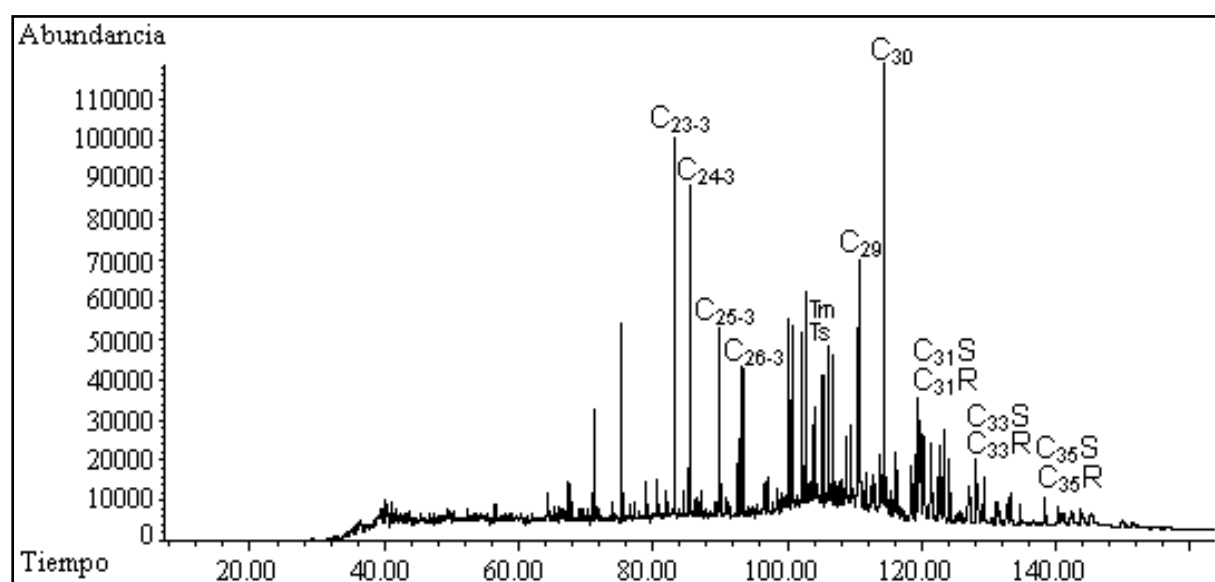


Figura 11. CG-EM (m/z = 191) para el crudo Guafita 10X.

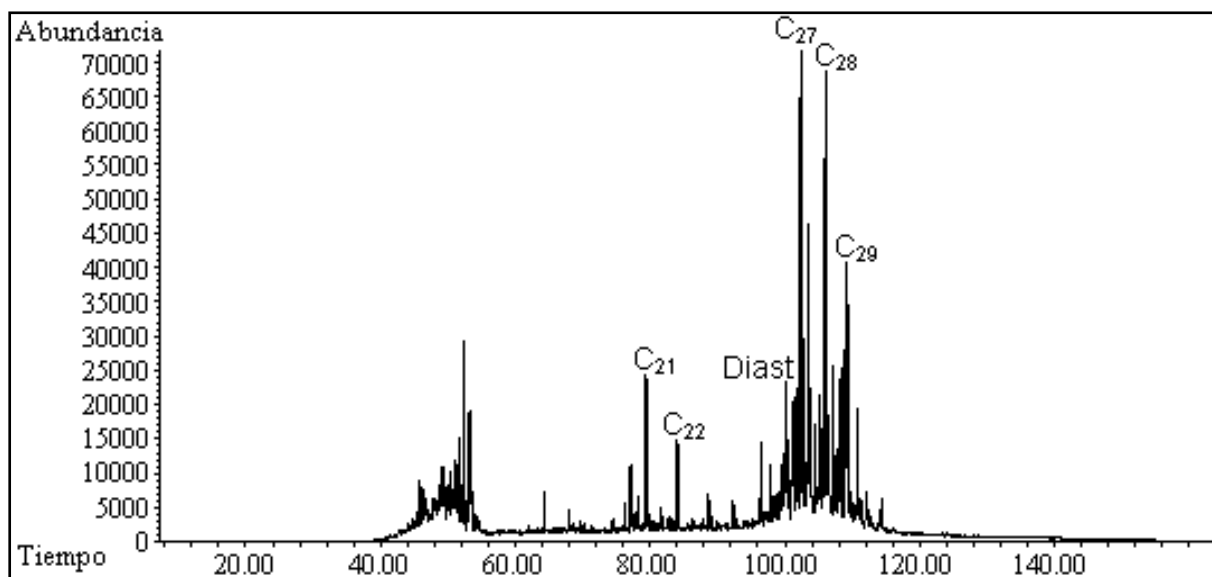


Figura 12. CG-EM ($m/z = 218$) para el crudo Guafita 10X.

A partir del cromatograma de la figura 10 y los fragmentogramas de las figuras 11 y 12, se calcularon las relaciones que se muestran en la tabla 7, cuyo seguimiento es útil para el estudio del avance de los procesos de biodegradación, debido a que relacionan un compuesto que presentan mayor resistencia a la biodegradación con otro compuesto que se biodegrada más fácilmente (Ortiz y Martínez, 2003). Más adelante, compararemos las relaciones de la tabla 7 con aquellas obtenidas a los días 1, 30 y 90 de experimentación.

Tabla 7. Relaciones de biomarcadores para el crudo Guafita 10X

Biomarcadores	Relaciones
Pristano/ n - C_{17}	0,66
Fitano/ n - C_{18}	0,53
Pristano/ Fitano	1,35
C_{23-3}/C_{30} hopano	0,58
Esteranos C_{29}/C_{27}	0,60

3. Comparación de las eficiencias de extracción de los solventes

En la tabla 8 se presentan los estadísticos descriptivos (media, desviación estándar y coeficiente de variación) para las cantidad de crudo extraído a los distintos grupos a los diferentes tiempos de extracción. A partir de la información presentada en la tabla 8 se construyó el gráfico de la figura

13, donde se observa de forma más clara la disminución de la cantidad de crudo extraída con el avance del tiempo de extracción. En el apéndice 4 se muestra la tabla con las mediciones.

Tabla 8. Crudo extraído (% m/m) para cada grupo en los distintos tiempos de extracción.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
Día 1	Media	4,69 <i>a</i>	4,11 <i>b</i>	7,5 <i>a</i>	7,0 <i>a,b</i>
	Des. Est.	0,02	0,05	0,5	0,6
	C.V.	0,59	1,15	7,2	9,0
Día 15	Media	3,6 <i>c</i>	3,20 <i>d</i>	6,3 <i>b,c</i>	5,7 <i>c,d</i>
	Des. Est.	0,1	0,06	0,4	0,4
	C.V.	2,7	1,95	6,8	7,3
Día 30	Media	3,21 <i>d</i>	2,57 <i>e</i>	5,5 <i>c,d</i>	4,9 <i>d,e</i>
	Des. Est.	0,06	0,09	0,4	0,3
	C.V.	1,85	3,40	7,1	6,5
Día 45	Media	2,6 <i>e</i>	2,0 <i>f</i>	5,0 <i>d,e</i>	4,3 <i>e,f,g</i>
	Des. Est.	0,2	0,2	0,5	0,4
	C.V.	5,8	8,7	9,7	8,3
Día 90	Media	2,4 <i>e</i>	2,0 <i>f</i>	4,1 <i>f,h</i>	3,8 <i>g,h</i>
	Des. Est.	0,2	0,1	0,2	0,3
	C.V.	6,4	6,0	5,5	7,2

NOTA: los dos tratamientos establecidos originalmente, A (5% de crudo) y B (9% de crudo), fueron subdivididos en dos grupos cada uno, obteniéndose finalmente cuatro grupos comparativos: grupo A_DCM, grupo A_hexano, grupo B_DCM y grupo B_hexano. DCM = diclorometano. Medias en un mismo tratamiento (A y B) seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba “t” de student ($P \leq 0,05$).

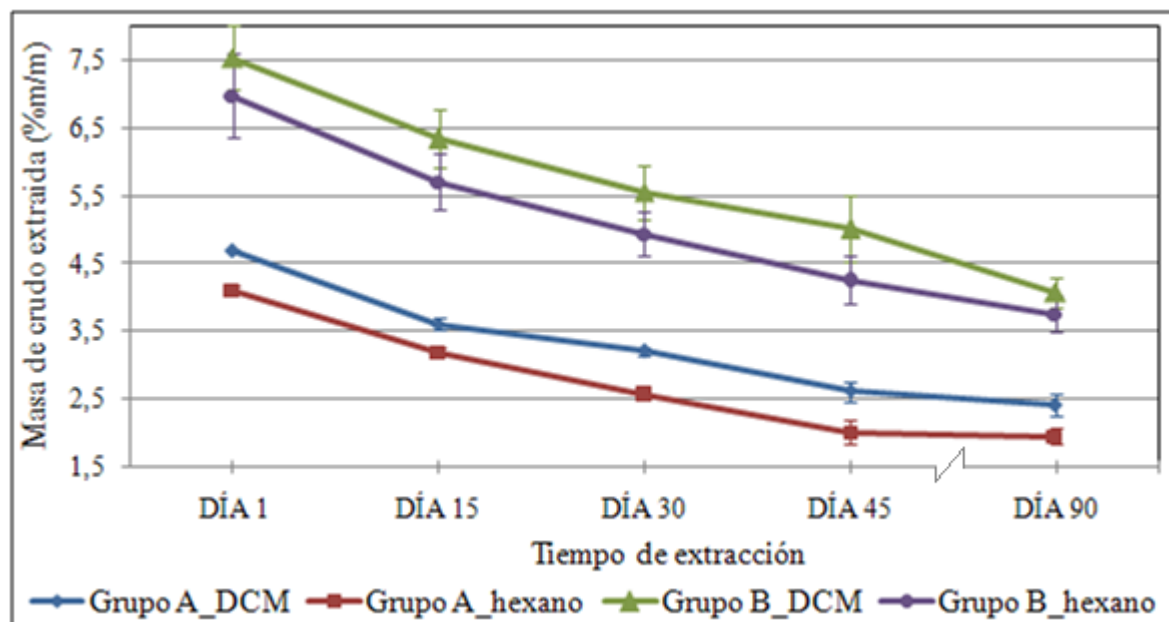


Figura 13. Crudo extraído vs. tiempo de extracción. Las barras verticales representan la desviación estándar de los datos, en los puntos donde la desviación estándar es menor a 0,1 no se distinguen las barras.

A modo general, se observa para todos los grupos una disminución en la cantidad de crudo extraído con el avance del tiempo de experimentación. Esta disminución es atribuible al hecho de que a medida que avanza el tiempo de exposición del crudo al suelo, las fracciones más susceptibles de degradar por los microorganismos (saturados y aromáticos) sufren procesos de alteración. Es necesario hacer notar que para el tratamiento A (5% de crudo) se logra extraer 4,6% y 4,11% de crudo con diclorometano y n-hexano, respectivamente, mientras que para el tratamiento B (9% de crudo) se extrae 7,5% y 7% de crudo. La diferencia tan marcada entre la cantidad de crudo añadido al tratamiento B y la cantidad de crudo que se extrajo pudo deberse, posiblemente, a pérdida por volatilización de los componentes más livianos del crudo o no es extraíble de la matriz del suelo, debido a interacciones de los componentes más polares con la misma (Infante et al., 2010).

En la tabla 8 se observa que para el tratamiento A el diclorometano tiene un poder de extracción superior al n-hexano en todos los tiempos de extracción ($P \leq 0,05$). Este hecho puede deberse a la mayor polaridad del diclorometano que, tal como veremos más adelante al estudiar la variación en la composición SARA, le permite extraer compuestos polares del crudo tales como resinas y asfaltenos en mayor proporción en comparación con el n-hexano, que por su baja polaridad presenta una menor afinidad por dichas fracciones. Adicionalmente, durante la extracción con n-hexano puede ocurrir precipitación de asfaltenos. Por su parte, para el tratamiento B las cantidades de crudo extraídas con ambos solventes no son estadísticamente diferentes, en ningún tiempo de extracción ($P \leq 0,05$).

Para el tratamiento A ocurre una disminución significativa de la cantidad de crudo extraída, durante los primeros 45 días del estudio; entre los días 45 y 90, no se reporta una disminución significativa de la cantidad de extracto ($P \leq 0,05$). Para el tratamiento B, existe un comportamiento similar en la extracción con ambos solventes durante los primeros 45 días, a partir de aquí no hay disminución significativa en la cantidad de crudo extraído con n-hexano, mientras que con diclorometano si hay una disminución de la cantidad de crudo entre los días 45 y 90 ($P \leq 0,05$). Esto sugiere que hacia el día 45 del experimento, en ambos tratamientos, pudiesen estar ocurriendo procesos de adsorción crudo-fases minerales, que limiten la extracción del crudo por parte de los solventes. En el caso del tratamiento B, dichas interacciones no

podieron ser vencidas por el n-hexano, mientras que el diclorometano si fue capaz de superar la interacción del crudo con el suelo.

En la tabla 9 se muestran las tasas de biodegradación del crudo para cada grupo, expresadas en porcentaje. Las tasas de biodegradación se obtuvieron empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de biodeg.} = \frac{(\text{masa de crudo extraído, día 1} - \text{masa de crudo extraído, día 90})}{\text{masa de crudo extraído, día 1}} * 100$$

Tabla 9. Tasas de biodegradación del crudo (%)

	Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
Media	49 <i>a</i>	52 <i>a</i>	46 <i>b</i>	46 <i>b</i>

Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba “t” de student ($P \leq 0,05$).

Puede observarse en la tabla 9 que para un mismo tratamiento, las tasas de biodegradación obtenidas con ambos solventes son estadísticamente iguales. Al comparar entre tratamientos, la tasa de biodegradación para A es mayor que para B, indicando que a mayor concentración de crudo la biodegradación es menos eficiente.

Relacionando los resultados de la tabla 8 con la concentración inicial de crudo añadida a cada compostero (apéndice 3) se obtuvo la eficiencia de extracción de crudo de cada solvente a los distintos tiempos de análisis. En la tabla 10 se presentan los estadísticos descriptivos correspondientes; los mismos se encuentran representados en el gráfico de la figura 14. Los datos de eficiencias de extracción a partir de los cuales se calcularon los estadísticos mostrados, se encuentran en el apéndice 5.

Tabla 10. Eficiencias de extracción de crudo (%) de los diferentes solventes a los distintos tiempos de experimentación.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
Día 1	Media	93 <i>a</i>	81 <i>b</i>	84 <i>a,m</i>	77 <i>b,m</i>
	Des. Est.	1	1	5	7
	C.V.	1	2	7	8
Día 15	Media	72 <i>c</i>	63,4 <i>d</i>	70 <i>c,n</i>	63 <i>d,n,o</i>
	Des. Est.	1	0,8	5	5
	C.V.	2	1,3	7	7
Día 30	Media	63,6 <i>d,e</i>	51 <i>f</i>	62 <i>e,n,o</i>	55 <i>f,o,p</i>
	Des. Est.	0,7	1	4	3
	C.V.	1,1	3	7	6
Día 45	Media	52 <i>g,k</i>	40 <i>h,l</i>	56 <i>g,o</i>	47 <i>h,p,q</i>
	Des. Est.	3	3	5	4
	C.V.	5	8,	9	8
Día 90	Media	48 <i>i,k</i>	39 <i>j,l</i>	45 <i>i,q</i>	42 <i>j,q</i>
	Des. Est.	3	2	2	3
	C.V.	6	6	5	7

Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba “t” de student ($P \leq 0,05$).

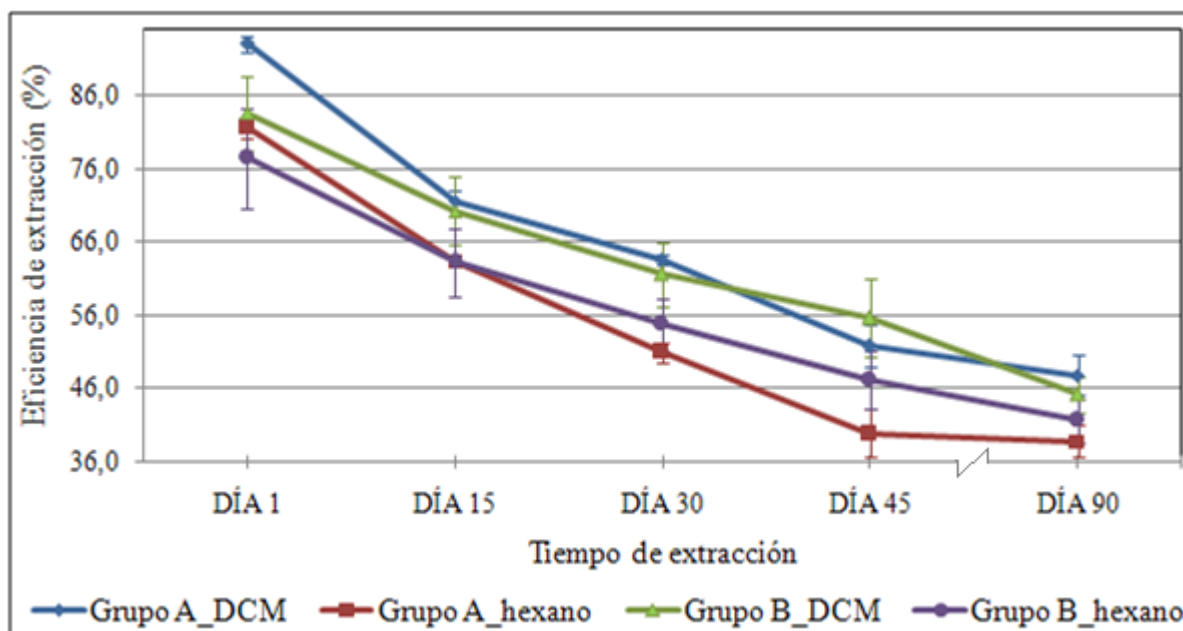


Figura 14. Eficiencia de extracción (%) vs. tiempo de extracción. Las barras verticales representan la desviación estándar de los datos, en los puntos donde la desviación estándar es menor a 0,2 no se distingue la barra.

De manera concordante con el gráfico de la figura 13, en el gráfico de la figura 14 se observa una disminución de la eficiencia de extracción de crudo de los solventes con el avance del tiempo de

experimentación. De los resultados de la tabla 10, se observa que ninguno de los solventes permite recuperar el valor inicial de crudo en el suelo, es decir, para el día 1, con ambos solventes se obtienen concentraciones de crudo menores a la inicial, teniendo que el diclorometano es capaz de extraer hasta el 93% del contenido de crudo mientras que con el n-hexano se recupera hasta el 81%. El contenido de crudo restante (6% para diclorometano y 19% para n-hexano), como se señaló anteriormente, puede haberse perdido por volatilización de los componentes más livianos del crudo o no es extraíble del suelo, debido a interacciones del mismo con los componentes más polares del crudo (Infante et al., 2010).

También se establece que para las distintas concentraciones de crudo no existen diferencias estadísticamente significativas entre las eficiencias de extracción con un mismo solvente ($P \leq 0,05$), lo cual permite indicar que la cantidad inicial de crudo no afecta la eficiencia de extracción de los solventes.

En la misma tabla, puede observarse que para el suelo del tratamiento B no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a eficiencia de extracción con uno u otro solvente, mientras que para el suelo del tratamiento A, las eficiencias de extracción con n-hexano y diclorometano son estadísticamente diferentes, presentando el diclorometano una mayor eficiencia o poder de extracción respecto al n-hexano ($P \leq 0,05$).

En la tabla 10, se observa que durante el tiempo de estudio, el tratamiento A presenta el mismo comportamiento con los dos solventes, existen diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de extracción del día 1 al 15, del día 15 al 30 y del día 30 al 45. Sin embargo, a partir del día 45 no existen diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría estar asociado a posibles procesos de adsorción. Es probable que motivado a la adsorción del crudo, la cantidad extraída este día haya sido más baja de lo esperada, a tal punto de ser similar a la reportada para el día 90, cuando la biodegradación había avanzado.

Para el caso del suelo del tratamiento B, con diclorometano, se registran diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de extracción entre los días 1 y 15, 15 y 45 y 45 y 90 ($P \leq 0,05$). Por su parte, con n-hexano se presentan diferencias estadísticamente significativas

durante los primeros 15 días y entre los días 15 y 45; del día 45 al 90 no existen diferencias significativas en la eficiencia de extracción ($P \leq 0,05$); este hecho puede estar asociado a procesos de adsorción hacia el día 45 de experimentación, que ocasionen que los valores de crudo obtenidos para los días 45 y 90 sean similares.

Para el suelo del tratamiento A ocurren diferencias significativas en la eficiencia de extracción en intervalos cercanos de tiempo, mientras que, para los suelos del grupo B, se requieren períodos de tiempo más prolongados para observar diferencias. Esto se corresponde con las tasas de biodegradación mostradas en la tabla 9, donde se observa que en los suelos del grupo B, la biodegradación es más lenta.

En los gráficos de las figuras 15 y 16 se representa la correlación entre los valores de crudo obtenidos con la extracción con diclorometano respecto a aquellos obtenidos empleando n-hexano, para los tratamientos A y B, respectivamente. Cada punto representa el promedio de las tres medidas realizadas.

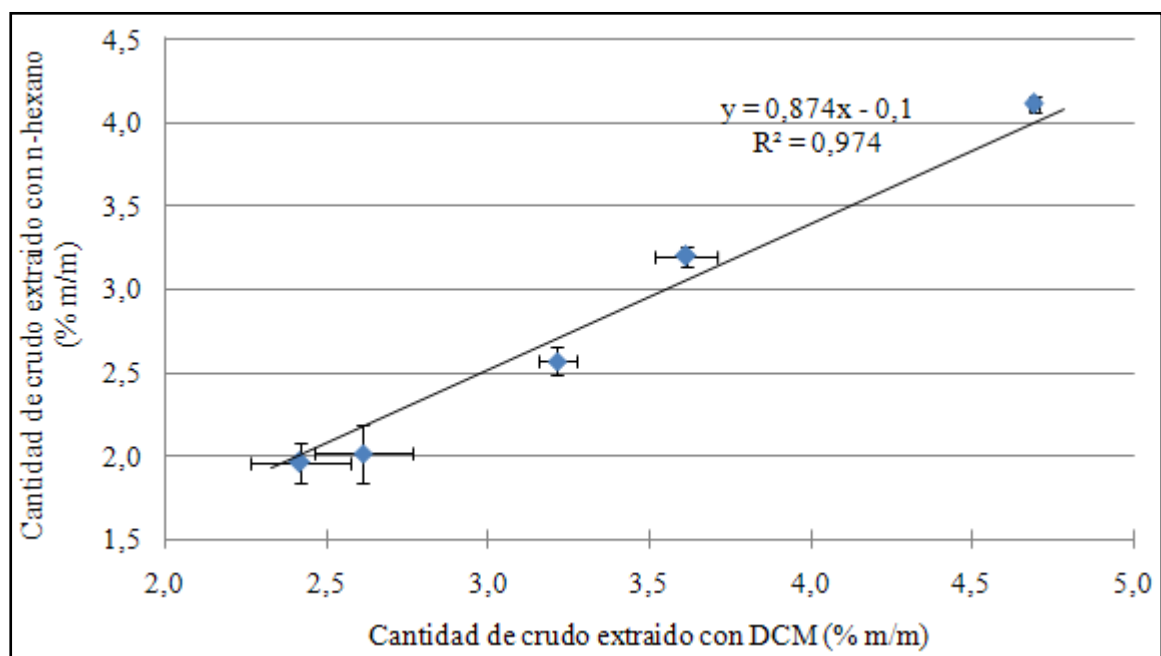


Figura 15. Masa de crudo extraída con n-hexano vs. masa de crudo extraída con DCM (Grupo A). Las barras horizontales y verticales representan la desviación estándar de los datos.

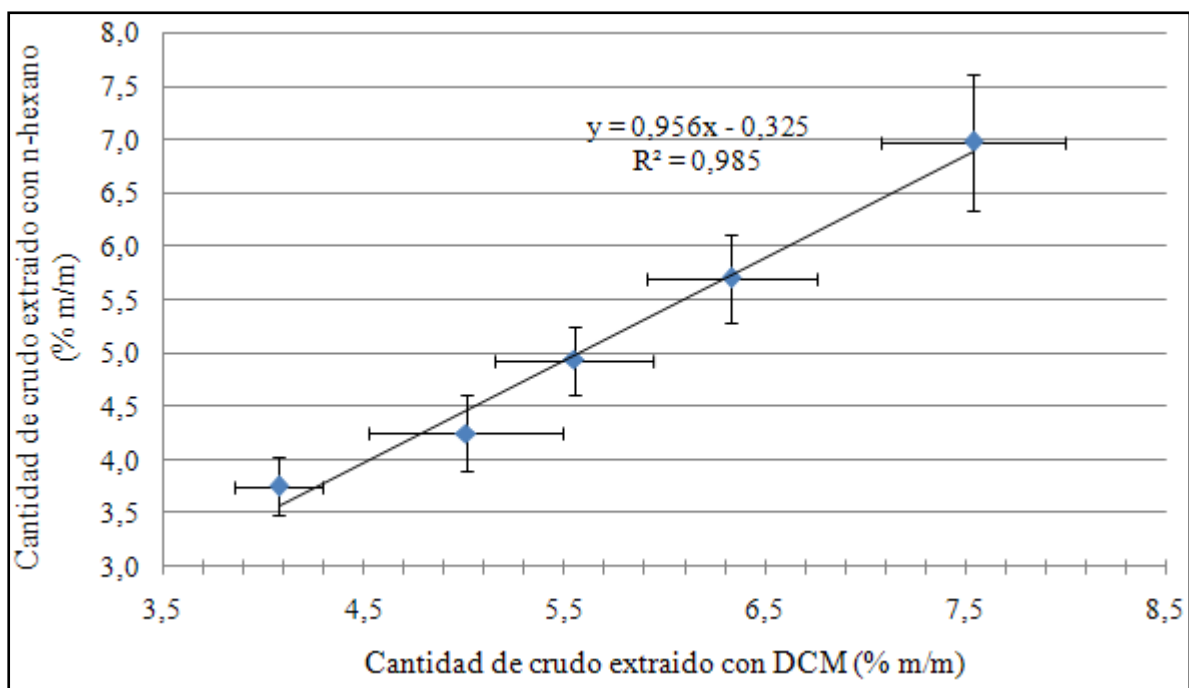


Figura 16. Masa de crudo extraída con n-hexano vs. masa de crudo extraída con DCM (Grupo B). Las barras horizontales y verticales representan la desviación estándar de los datos.

El valor de la pendiente de los gráficos de las figuras 15 y 16, representan la eficiencia de extracción del n-hexano respecto a la del diclorometano. A partir de dichos gráficos, se establece que para el suelo del tratamiento A, la extracción con n-hexano es aproximadamente 87% de la obtenida con diclorometano, valor que se corresponde con el reportado por Morales (2009) de 85%. Para el suelo del tratamiento B, la extracción con n-hexano es aproximadamente 96% de la lograda con diclorometano. Ésto concuerda con la información obtenida a partir del análisis estadístico de las eficiencias de extracción, que indica que para concentraciones de crudo cercanas al 9%, ambos solventes presentan eficiencias de extracción similares, y para concentraciones cercanas al 5 %, la extracción con diclorometano es estadísticamente diferente a la obtenida con n-hexano, ofreciendo el diclorometano una mayor eficiencia de extracción. Por tanto, puede decirse que, para crudos medianos, a concentraciones cercanas al 5%, la eficiencia de extracción con diclorometano es superior que con n-hexano, mientras que, para concentraciones mayores (cercanas a 9%), ambos solventes poseen eficiencias de extracción similares.

Otra herramienta usada para evaluar la remoción del crudo por parte de los solventes fue la

determinación de la concentración de COT en los residuos del suelo posterior a cada extracción. Los estadísticos respectivos se encuentran en la tabla 13 y figura 17. Es necesario acotar que algunos valores fueron descartados para realizar el análisis estadístico porque eran discordantes con el resto de los valores, este hecho se atribuye a problemas de homogeneidad en las muestras debido a que, como se indicó en la metodología, éstas contenían fragmentos de hojas secas y al momento de tomar las alícuotas no fue posible removerlas completamente. Los datos correspondientes a las determinaciones se encuentran en el apéndice 7. Para determinar cuáles valores podían descartarse se realizó la prueba estadística Q de Dixon ($P \leq 0,05$) (apéndice 8).

Tabla 11. Concentración de COT (% m/m) de los residuos de suelo a los distintos tiempos de extracción.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
Día 1	Media	1,7 <i>a</i>	2,61 <i>b</i>	1,80 <i>a</i>	2,53 <i>b</i>
	Des. Est.	0,2	0,09	0,03	0,02
Día 15	Media	1,72 <i>a</i>	2,2 <i>c</i>	2,1 <i>a</i>	2,7 <i>b</i>
	Des. Est.	0,05	0,2	0,2	0,2
Día 30	Media	1,57 <i>a,d</i>	2,372 <i>b</i>	1,76 <i>a</i>	2,8 <i>b,c</i>
	Des. Est.	0,02	0,003	0,07	0,1
Día 45	Media	2,9 <i>b</i>	2,7 <i>b</i>	2,1 <i>a</i>	3,19 <i>c</i>
	Des. Est.	0,3	0,1	0,1	0,03
Día 90	Media	1,22 <i>d</i>	1,64 <i>c</i>	1,91 <i>a</i>	2,25 <i>d</i>
	Des. Est.	0,07	0,04	0,06	0,03

Medias en un mismo tratamiento (A y B) seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba “t” de student ($P \leq 0,05$).

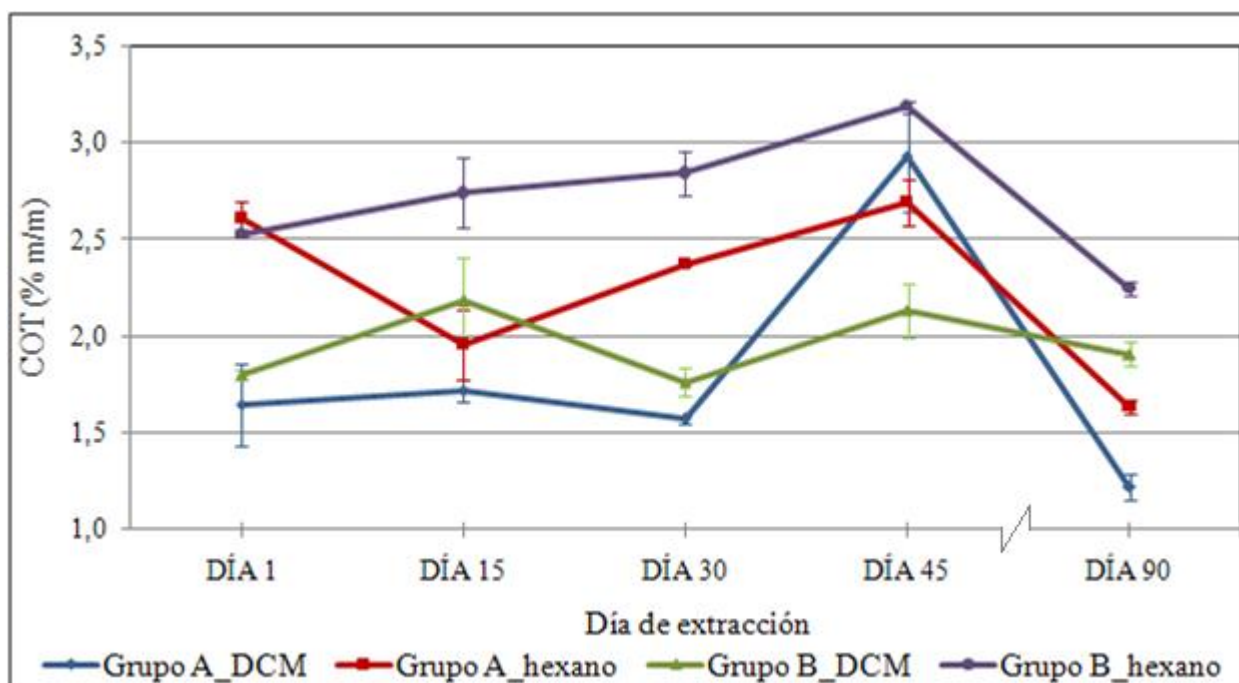


Figura 17. Variación del %COT vs. tiempo de extracción. Las barras verticales representan la desviación estándar de los datos, en los puntos donde la desviación estándar es menor a 0,01 no se distingue la barra.

En la figura 17, puede observarse que para el grupo B_DCM no existen variaciones marcadas entre los valores de COT a los distintos tiempos de extracción, mientras que el resto de los grupos muestran un notable incremento en los valores de COT hacia el día 45 con una posterior disminución hacia el día 90. Este aumento en la concentración de COT pudiera estar indicando la ocurrencia de interacciones del crudo con las fases minerales que no pueden ser vencidas por los solventes. En la tabla 11, se observan diferencias significativas en los valores de COT, a partir del día 15 para los grupos A_hexano y B_hexano y a partir del día 30 para el grupo A_DCM. Si observamos el gráfico de la figura 15, a partir de los tiempos indicados comienza a aumentar la concentración de COT, pudiendo este hecho estar asociado a un proceso de adsorción del crudo al suelo, como se indicó anteriormente. Los resultados sugieren que el diclorometano es más efectivo venciendo las interacciones crudo-fases minerales, en función de que para el grupo B_DCM no se evidencian procesos de adsorción y para el grupo A_DCM, estos procesos ocurren solo entre los días 30 y 45. Por el contrario, el n-hexano es capaz de superar estas interacciones únicamente durante los primeros 15 días y al final del experimento.

Para el tratamiento B, los valores de COT del suelo residuo son mayores para el suelo extraído con n-hexano, en todos los tiempos de extracción, mientras que para el tratamiento A son mayores a los 1, 15, 30 y 90 días, lo cual indica nuevamente que el diclorometano tiene mayor poder de extracción que el n-hexano.

4. Variación en la composición SARA

La interpretación de los resultados obtenidos se realiza en base a dos variables: solvente de extracción y concentración inicial de crudo. En la tabla 12 se presenta la composición SARA del crudo extraído a los distintos tiempos de extracción para cada grupo.

Tabla 12. Variación en la composición SARA a los distintos tiempos de extracción, para cada grupo.

	Grupo A_DCM			Grupo B_DCM		
	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)
Día 1	57	20	25	55	18	27
Día 30	34	24	42	41	23	37
Día 90	20	30	51	22	28	49
	Grupo A_hexano			Grupo B_hexano		
	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)
Día 1	63	18	19	63	20	16
Día 30	42	23	35	48	24	28
Día 90	21	27	51	26	32	42

Al comparar los resultados obtenidos empleando ambos solventes, se observa que el porcentaje de saturados obtenido con diclorometano para ambos tratamientos es menor que el obtenido con n-hexano. De manera contraria, el porcentaje de resinas y asfaltenos es mayor para diclorometano que para n-hexano. Esto se debe a que el n-hexano tiene un comportamiento no polar, razón por la cual tiende a interactuar con compuestos lipídicos de baja polaridad tales como los hidrocarburos saturados; por su parte, el diclorometano es un solvente polar, con tendencia a interactuar con compuestos polares, que dentro de las fracciones del crudo, están representados por las resinas y los asfaltenos (Ortiz y García, 2003). Para definir si estas diferencias son o no significativas se aplicó la prueba estadística “t” de student ($P \leq 0,05$) a los resultados obtenidos el día 1. En la tabla 13 se muestra la composición SARA, por triplicado, del crudo extraído el día 1.

Tabla 13. Variación en la composición SARA para cada grupo, el día 1.

	Grupo A_DCM			Grupo B_DCM		
	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)
Réplica 1	55	20,38	25	55	18	27
Réplica 2	57	20,43	23	55	21	25
Réplica 3	57	20,40	23	60	16	24
Media	56a	20,40c	24d	56a	18c	25d
Desv. Est.	1	0,03	1	3	2	1
	Grupo A_hexano			Grupo B_hexano		
	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)	Saturados (%)	Aromát. (%)	Res. + asf. (%)
Réplica 1	63,1	18,4	18,5	63	20	16
Réplica 2	63,6	17,7	18,7	62	21	17
Réplica 3	63,7	17,5	18,8	65	16	18
Media	63,5b	17,9c	18,7e	64b	19c	17e
Desv. Est.	0,3	0,4	0,2	2	3	1

Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba t de student ($P \leq 0,05$).

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 13, para un mismo solvente, no existen diferencias significativas entre los tratamientos A y B, respecto a los porcentajes de hidrocarburos saturados y de resinas y asfaltenos obtenidos el día 1. Comparando los dos solventes, el diclorometano tiene mayor afinidad hacia las fracciones polares (resinas y asfaltenos) con respecto al n-hexano, el cual muestra mayor afinidad por la fracción menos polar de hidrocarburos saturados ($P \leq 0,05$). Como se indicó anteriormente, la afinidad de los solventes por una u otra fracción es función de su polaridad.

En los gráficos de la figura 18, se confirma que para el día 1, el n-hexano tiene mayor tendencia a extraer hidrocarburos saturados (18A) mientras que el diclorometano muestra mayor afinidad hacia las fracciones de mayor polaridad (18B).

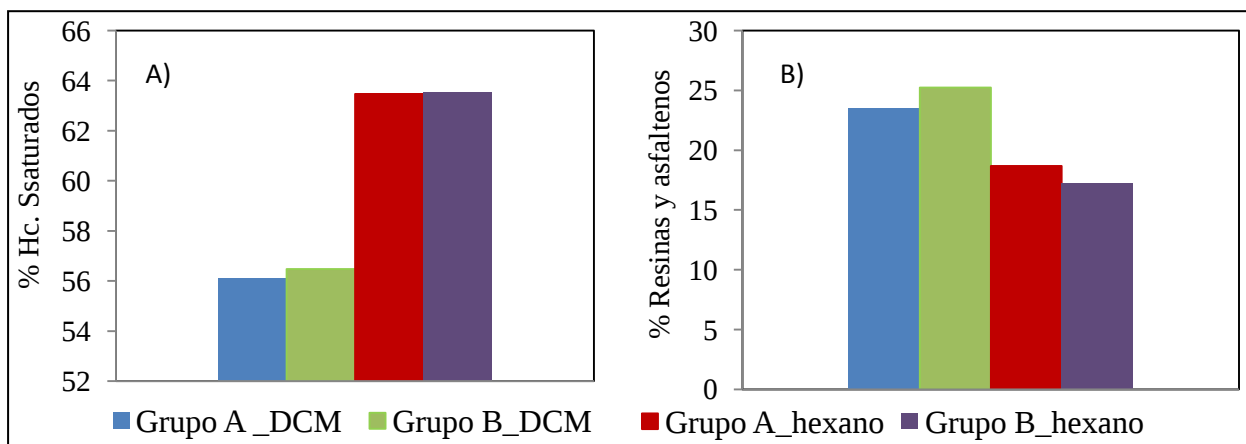


Figura 18. % de hidrocarburos saturados (A) y de resinas y asfaltenos (B) extraídos para cada grupo el día 1.

Para los días posteriores de análisis (30 y 90), continúa observándose la afinidad del n-hexano hacia la fracción de menor polaridad y del diclorometano hacia las fracciones más polares.

Por otra parte, al comparar la composición SARA del crudo Guafita 10X (tabla 6) con la obtenida a partir de los extractos del día 1 (tabla 13), puede decirse que la composición SARA del crudo extraído usando diclorometano es más similar a la del crudo inicial, mientras que el n-hexano es menos eficiente en la extracción de todas las fracciones del crudo. Esto es debido a la menor afinidad del n-hexano por las fracciones más polares (resinas y asfaltenos), lo cual genera como consecuencia que estas fracciones permanezcan adheridas al suelo durante la extracción con dicho solvente.

En los gráficos de las figuras 19 a 22, se observa la variación en la distribución SARA para cada uno de los grupos. Se evidencia una disminución de la fracción de hidrocarburos saturados, los cuales son más susceptibles a la biodegradación (Moldowan et al., 1995), con el consecuente aumento relativo del resto de las fracciones (aromáticos, resinas y asfaltenos).

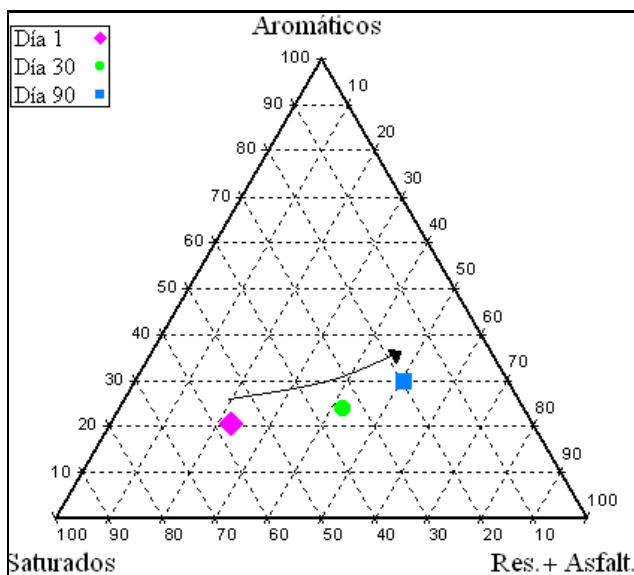


Figura 19. Variación de la composición SARA para el grupo A_DCM.

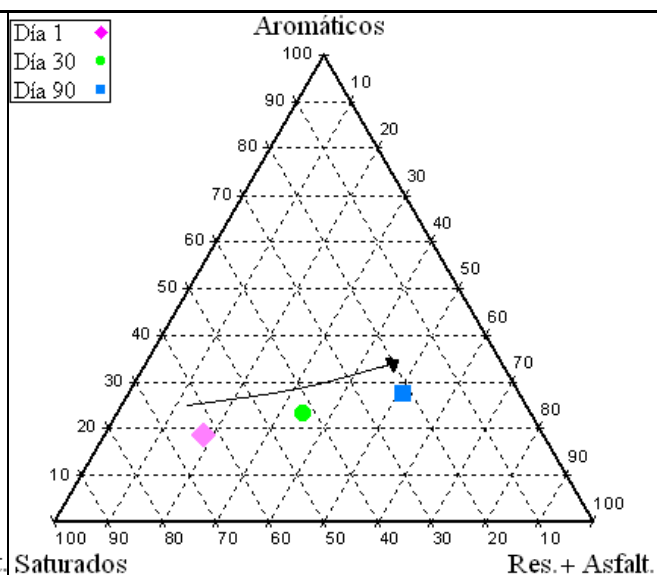


Figura 20. Variación de la composición SARA para el grupo B_DCM.

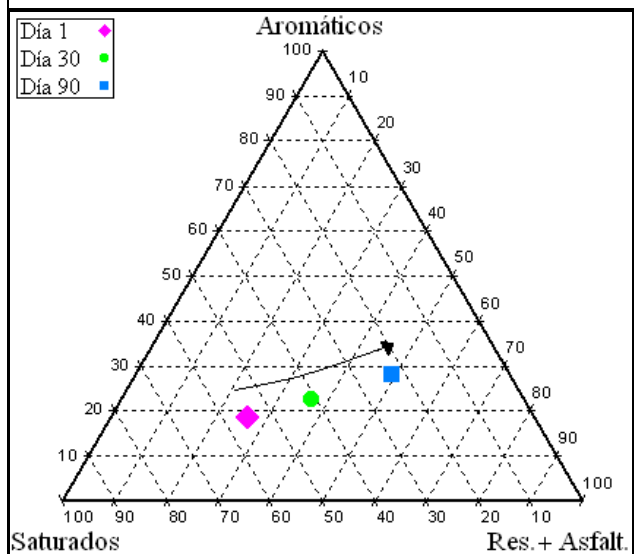


Figura 21. Variación de la composición SARA para el grupo A_hexano

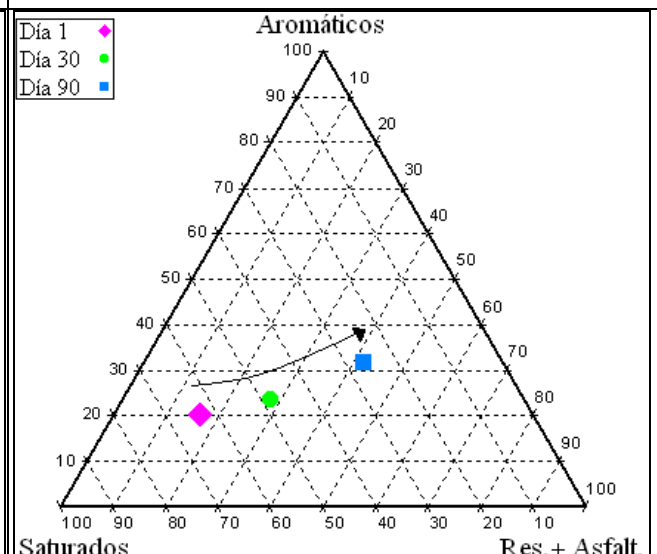


Figura 22. Variación de la composición SARA para el grupo B_hexano

En la tabla 14, se muestran las tasas de biodegradación de los hidrocarburos saturados, expresadas en porcentaje, a los días 30 y 90, las cuales se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\text{T. de biod. HC's sat} = \frac{(\% \text{ HC's sat. día 1} - \% \text{ HC's sat. día 90})}{\% \text{ HC's sat. día 1}} * 100$$

Tabla 14. Tasa de biodegradación (%) de hidrocarburos saturados a los 30 y 90 días.

	Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
30 días	40,12	33,48	26,21	23,68
90 días	65,42	66,02	59,54	58,38

La degradación de la fracción de hidrocarburos saturados no ocurre con la misma intensidad en todos los grupos de suelo. Existe un aumento en las tasas de biodegradación, asociadas con la disminución de la concentración inicial de crudo. En el suelo del tratamiento A (A_DCM y A_hexano), la remoción de la fracción de hidrocarburos saturados ocurre más rápidamente, teniendo que, al final del tiempo de experimentación, la tasa de biodegradación de los mismos para el tratamiento A, es mayor que para el tratamiento B (B_DCM y B_hexano). Este hecho sugiere que mientras mayor es la carga inicial de crudo, se hace menos eficiente el proceso de biodegradación. La mayor eficiencia del proceso de biodegradación en el suelo contaminado con menor concentración inicial de crudo, también se observó al medir las tasas de biodegradación en términos de cantidad de crudo extraído, debido a que la disminución de la fracción más susceptible de ser alterada (hidrocarburos saturados) se refleja en la disminución de la cantidad de crudo extraíble del suelo. Los resultados obtenidos en el estudio para el suelo contaminado con 5% de crudo, posiblemente reflejan una mejor distribución del crudo en la fase sólida del suelo, permitiendo el contacto directo de los microorganismos con el hidrocarburo. La menor biodegradación en el suelo contaminado con mayor concentración de crudo puede ser consecuencia de una difusión parcial en la fase sólida del suelo, resultando en un menor contacto crudo-microorganismos (Del'Arco y França, 2001).

5. Análisis de biomarcadores

Se realizó el análisis de biomarcadores a los 1, 30 y 90 días de extracción, con la finalidad de determinar la influencia de la concentración inicial de crudo sobre el proceso de biodegradación y el efecto del solvente de extracción sobre la distribución de biomarcadores. En la tabla 15 se presenta la variación de las relaciones P/n-C₁₇, F/n-C₁₈ y P/F con el avance del tiempo de estudio, para cada grupo.

Tabla 15. Relaciones entre biomarcadores a los distintos tiempos de análisis, para cada grupo.

Días	Pristano/n-C ₁₇			Fitano/n-C ₁₈			Pristano/Fitano		
	1	30	90	1	30	90	1	30	90
A_DCM	0,68	ND	ND	0,52	ND	ND	1,42	0,69	ND
A_hexano	0,67	ND	ND	0,52	ND	ND	1,40	0,70	ND
B_DCM	0,64	ND	ND	0,52	ND	ND	1,40	1,27	ND
B_hexano	0,64	ND	ND	0,53	ND	ND	1,40	1,28	ND

Días	Relación C ₂₃₋₃ /C ₃₀			Relación esteranos C ₂₉ /C ₂₇		
	1	30	90	1	30	90
A_DCM	0,55	0,55	0,44	0,57	0,55	1,36
A_hexano	0,57	0,55	0,45	0,58	0,59	1,35
B_DCM	0,58	0,58	0,59	0,65	0,65	0,72
B_hexano	0,60	0,58	0,60	0,62	0,62	0,74

Los valores de las relaciones entre biomarcadores obtenidos el día 1 (tabla 15) para cada grupo son similares a los calculados para el crudo Guafita 10X inicial (tabla 7). Las distribuciones de n-alcanos, terpanos y esteranos obtenidas para los cuatro grupos, el día 1 del experimento, se presentan más adelante y se corresponden con las obtenidas para el crudo original (figuras 10 a 12). El hecho de que al inicio del experimento no se observen diferencias en las distribuciones de los biomarcadores para ninguno de los grupos, sugiere que el solvente no ejerce influencia en la distribución de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados.

En las figuras 23 y 24 se presentan las distribuciones de n-alcanos, a los distintos tiempos de análisis, para los grupos A_DCM y B_DCM, respectivamente. Las distribuciones obtenidas para los grupos A_hexano y B_hexano se presentan en el apéndice 9. No se observan diferencias en las distribuciones obtenidas con diclorometano y n-hexano para cada grupo. Esto indica que el solvente de extracción no ejerce ningún efecto sobre la distribución de n-alcanos e isoprenoides.

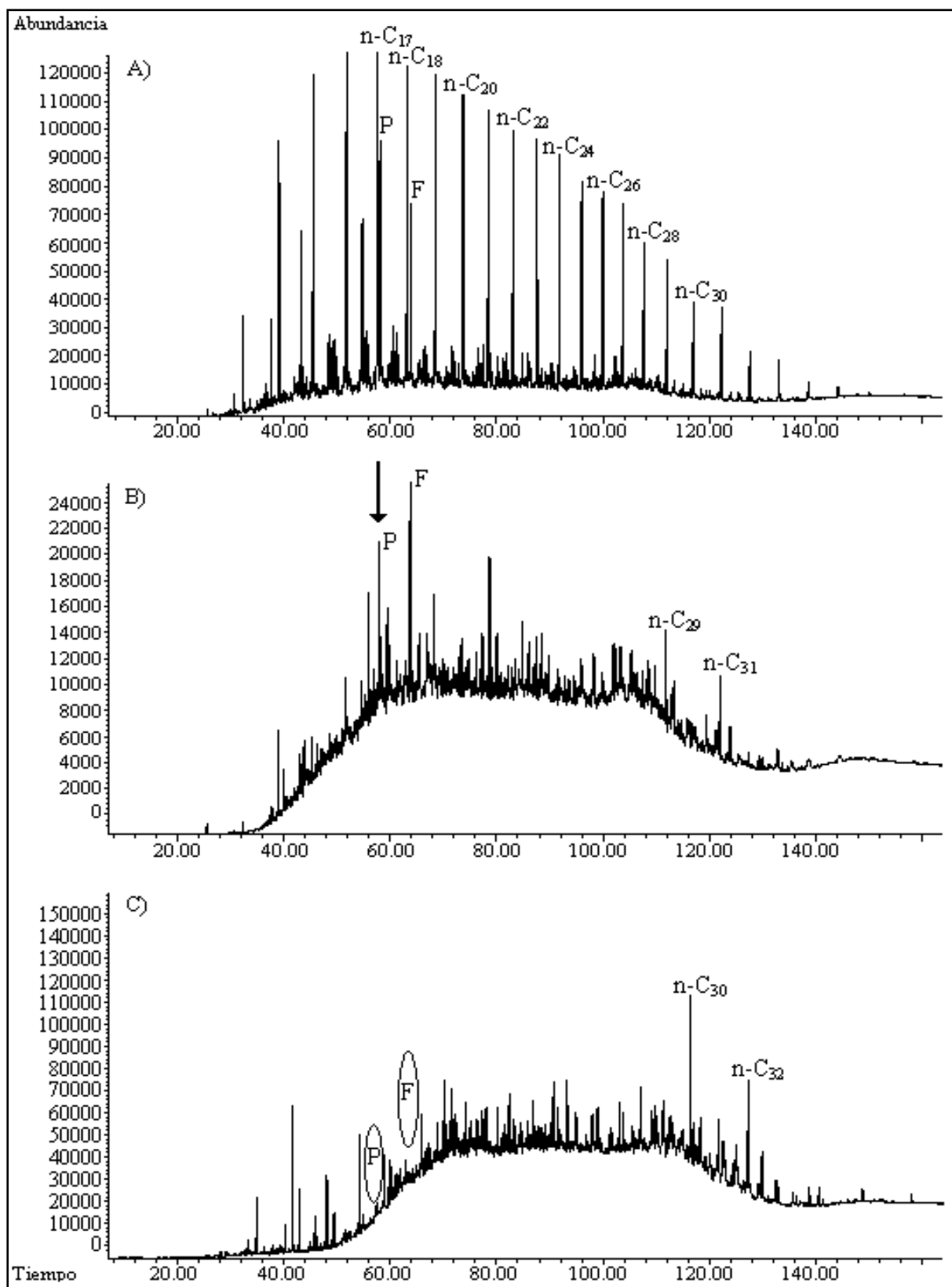


Figura 23. CG-FID para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.
P=pristano, F=fitano.

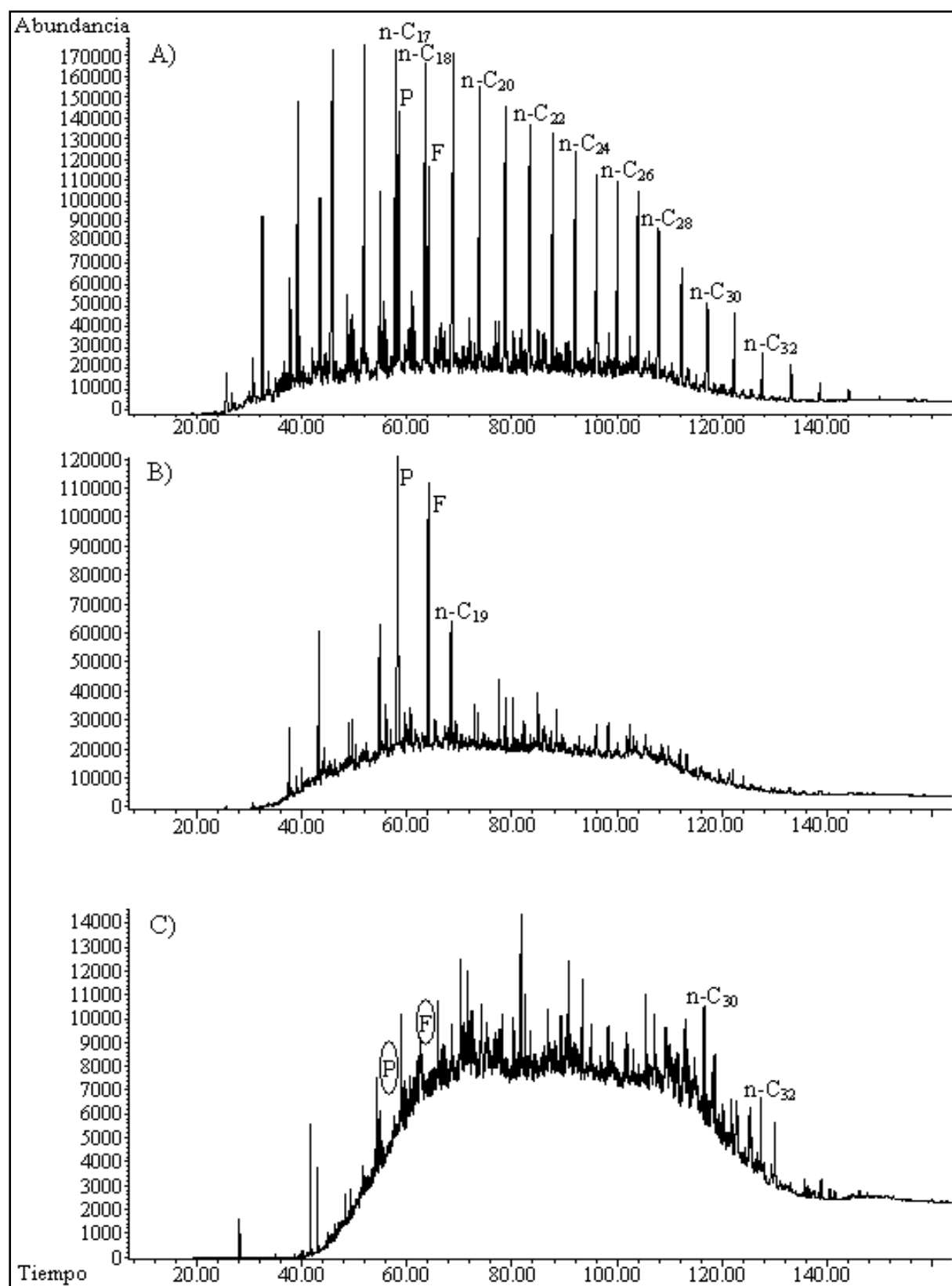


Figura 24. CG-FID para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.
P=pristano, F=fitano.

Al comparar los cromatogramas del grupo A con los del grupo B, se observa que para el día 30 ha ocurrido degradación a nivel de n-alcanos en ambos grupos. A nivel de isoprenoides, entre los días 1 y 30, en los grupos A_DCM y A_hexano se evidencia una disminución de la señal de pristano respecto a la de fitano, reduciéndose notablemente la relación pristano/fitano (tabla 16); mientras para los grupos B_DCM y B_hexano, la relación entre ambas señales se mantiene prácticamente invariable (tabla 16). La degradación preferencial de pristano sobre fitano se debe a que la susceptibilidad a la biodegradación, en los isoprenoides, decrece con el aumento del número de carbonos (Peters et al., 2005).

A los 90 días de experimentación, tanto pristano como fitano han sido completamente removidos en ambos tratamientos. La supresión de los isoprenoides y n-alcanos de menor masa molecular permite observar en los cromatogramas del día 90, la presencia de señales de n-alcanos mayores a n-C₃₀, las cuales se encontraban enmascaradas en los cromatogramas del día 30, al ser las intensidades de estas señales menores a las de los isoprenoides. La preservación de estos n-alcanos es debida a que su biodegradación es difícil por la dificultad de los microorganismos para transportarlos a través de sus membranas celulares (Peters et al., 2005).

A partir del día 30, se observa un levantamiento de la línea base que se hace más prominente con el avance del tiempo. La aparición de este levantamiento, denominado mezcla de compuestos no resueltos (UCM, por sus siglas en inglés), indica una disminución de los compuestos resueltos, como resultado de la degradación microbiana, y consiste de compuestos biorresistentes tales como saturados cíclicos, aromáticos, naftenoaromáticos y compuestos polares que no son sensibles a la rutina de cromatografía de gases (Peters et al., 2005).

En la figura 25 se muestra el cromatograma de iones totales (TIC, por sus siglas en inglés), a los distintos tiempos de extracción, para el grupo A_DCM. Puede apreciarse el notable aumento en el UCM con el avance de la biodegradación. Se toma este grupo a manera de ejemplo, considerando que el tratamiento A fue el que presentó cambios más significativos en el análisis de biomarcadores.

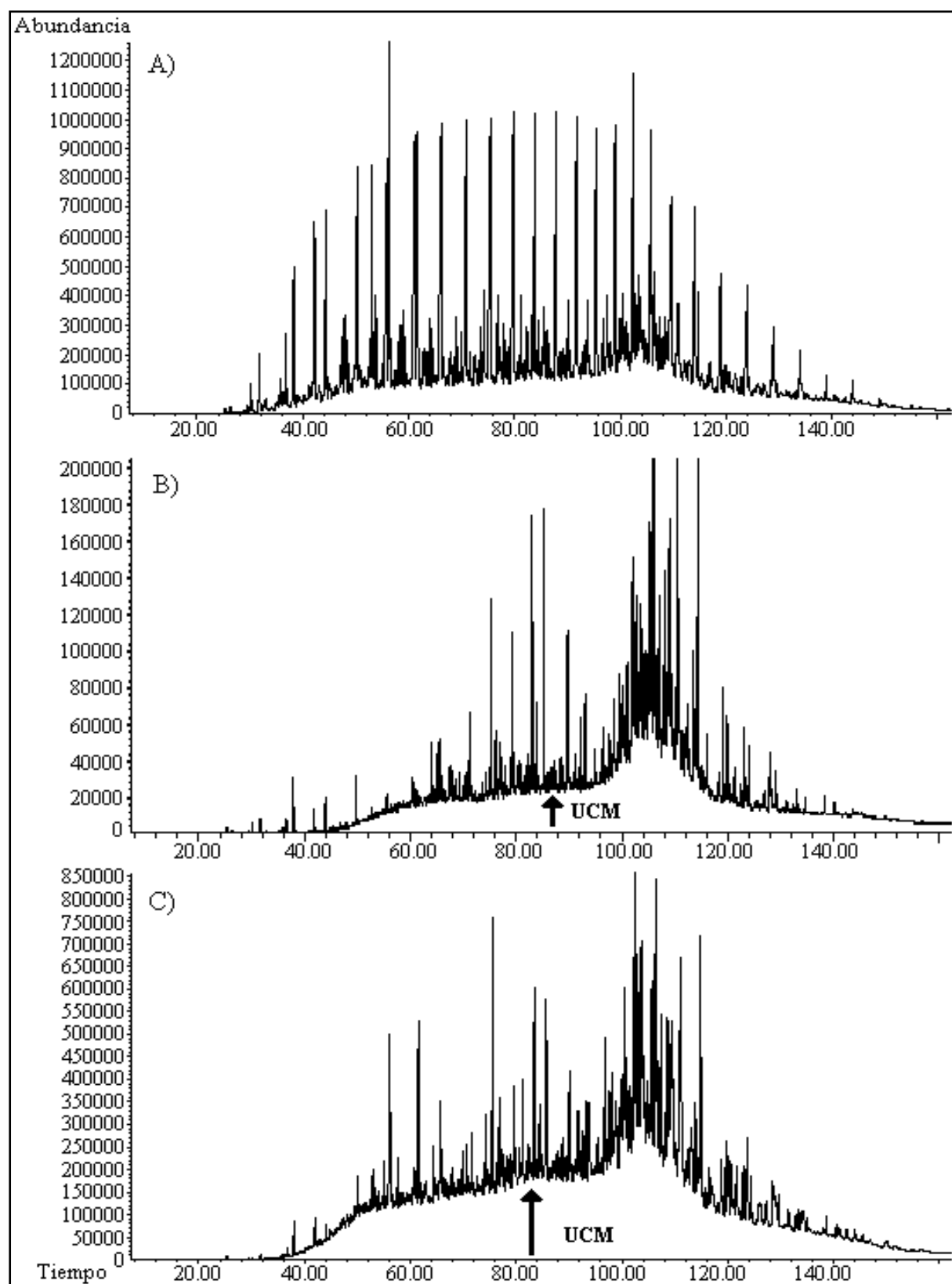


Figura 25. TIC para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.
UCM = "unresolved complex mixture"

En las figuras 26 y 27 se muestran los fragmentogramas de terpanos (m/z 191) para los grupos A_DCM y B_DCM, a los distintos tiempos de extracción. Las distribuciones obtenidas para los grupos A_hexano y B_hexano se presentan en el apéndice 10. Al comparar los fragmentogramas del grupo A_DCM con los del grupo A_hexano y los del grupo B_DCM con el grupo B_hexano, no se evidencian diferencias en las distribuciones de terpanos obtenidas usando uno u otro solvente, indicando nuevamente que el solvente de extracción no tiene efectos sobre la distribución de los biomarcadores.

En la tabla 17 se muestran las relaciones C_{23-3}/C_{30} de cada grupo para los distintos tiempos de análisis. Para el grupo B, estas relaciones se mantienen prácticamente constantes con el tiempo. Por su parte, para el grupo A, durante los primeros 30 días la relación no varía; sin embargo, para el día 90 ha ocurrido una ligera disminución en la relación mencionada, indicando degradación incipiente del compuesto C_{23-3} . Comúnmente, los terpanos tricíclicos (C_{23-3}) son altamente resistentes a la biodegradación, subsistiendo aún cuando los hopanos (C_{30}) han sido removidos. Sin embargo, en algunos crudos venezolanos se ha encontrado que los terpanos tricíclicos parecen ser alterados simultáneamente con los hopanos, aunque a una tasa de degradación más lenta (Alberdi et al., 2001). Pueden presentarse excepciones, ocurriendo remoción de los terpanos tricíclicos antes de los hopanos, siendo las tasas de degradación de estos compuestos dependientes de los procesos microbianos específicos, de las poblaciones de microorganismos (Wang et al., 2001) y de las condiciones del ambiente (Alberdi et al., 2001).

En la figura 28, se comparan los fragmentogramas m/z 191 del crudo Guafita 10X con el m/z 177 (correspondiente a los hopanos demetilados) del grupo A_DCM, a los 90 días. Se seleccionó el tratamiento A considerando que fue el que presentó los mayores cambios a nivel de biomarcadores. En la figura no se observa corrimiento de las señales de los hopanos, con lo cual se descarta la presencia del compuesto 25-norhopano, el cual se forma a partir de la demetilación de los hopanos (Alberdi et al., 2001). La formación del 25-norhopano, vía demetilación de hopanos, comienza antes de la destrucción de los esteranos; como se verá más adelante, los esteranos C_{27} han sufrido biodegradación, por lo cual, considerando que los hopanos han mostrado mayor resistencia a la biodegradación que los esteranos, no sería de esperarse la formación del 25-norhopano (Peters et al., 2005).

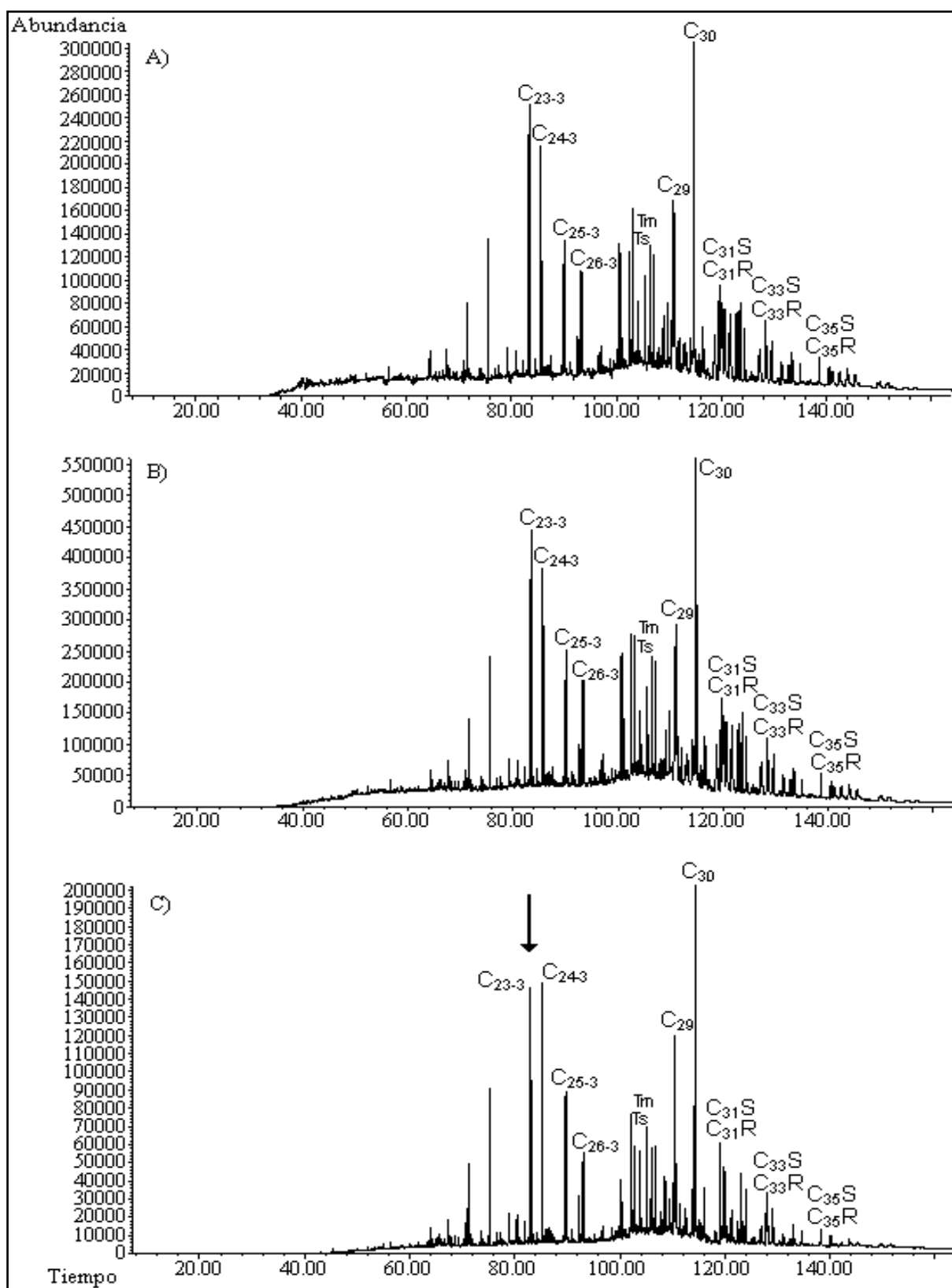


Figura 26. CG-EM ($m/z = 191$) para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.

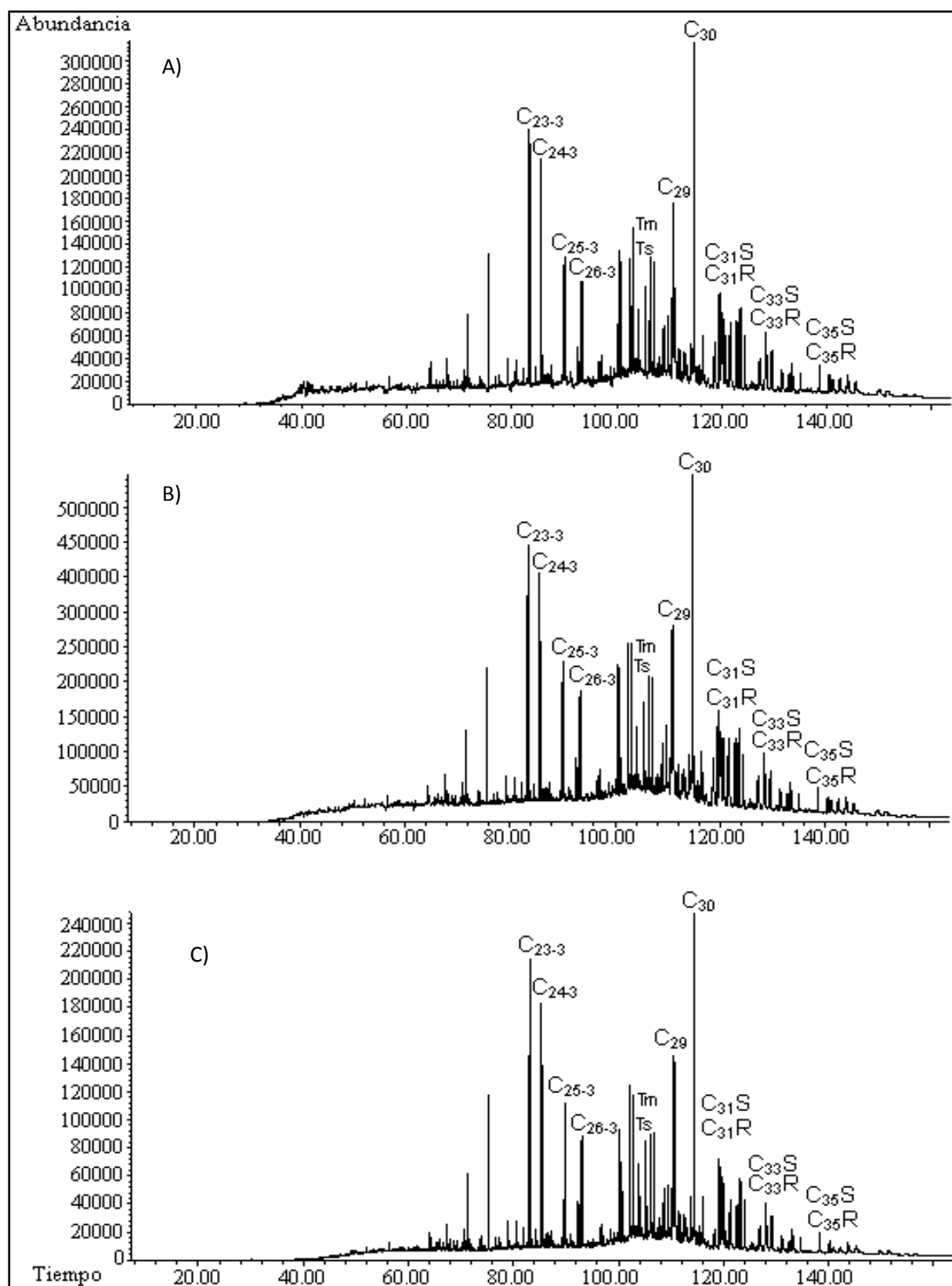


Figura 27. CG-EM ($m/z = 191$) para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.

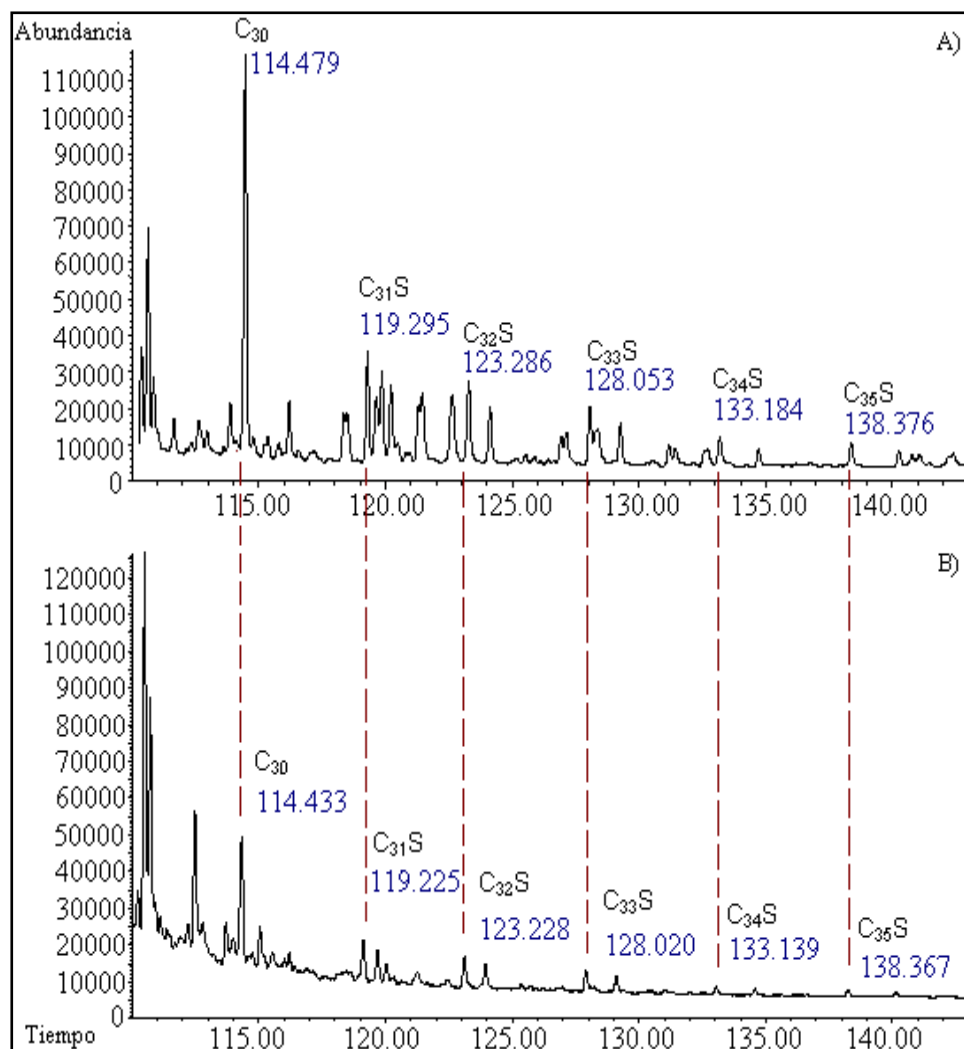


Figura 28. CG-EM A) ($m/z = 191$) para el crudo Guafita 10X y B) ($m/z = 177$) para el grupo A_DCM al día 90.

En las figuras 29 a 30, se muestran los fragmentogramas de esteranos (m/z 218) para los grupos A_DCM y B_DCM, a los distintos tiempos de extracción. Las distribuciones obtenidas para los grupos A_hexano y B_hexano se presentan en el apéndice 11. Nuevamente se hace evidente que no existe una influencia del solvente de extracción sobre la distribución de biomarcadores. Para el tratamiento A, se observa una disminución progresiva de las señales que aparecen a un tiempo de retención entre 44 y 56 minutos, las cuales desaparecen completamente a los 90 días de experimentación. A los 30 días, tanto los esteranos como los diasteranos permanecen inalterados, sin embargo, al día 90 se observa una disminución marcada de las señales de los diasteranos C_{27} y C_{28} y de los esteranos C_{27} . En la tabla 17, se observa como la relación C_{29}/C_{27} aumenta con el transcurso del tiempo, indicando que las bacterias han comenzado a degradar los esteranos C_{27} .

No puede precisarse el orden de biodegradación entre esteranos y diasteranos debido a que a los 30 días no había iniciado la biodegradación y a los 90 días ya ambos habían comenzado a biodegradarse. Sin embargo, Moldowan sugiere un orden relativo de biodegradación, para el monitoreo del proceso de la biorremediación de desechos de refinerías, donde los diasteranos son atacados primero que los esteranos (Moldowan et al., 1995).

Para el suelo del tratamiento B, también se observa una disminución de las señales que aparecen entre 44 y 56 minutos, pero la remoción en el suelo del tratamiento A es más marcada. Para el día 90, los diasteranos y esteranos no han sido notablemente alterados, teniendo que la relación esteranos C_{29}/C_{27} aumenta muy poco, en comparación con la variación registrada para el tratamiento A. En el suelo contaminado con 5% de crudo, se evidencia una biodegradación marcada de los diateranos y esteranos C_{27} durante los 90 días del análisis, mientras que en el suelo contaminado con 9% de crudo, no ocurre biodegradación apreciable a nivel de diasteranos y esteranos, en el mismo período de tiempo. Este resultado difiere con el artículo 53 del Decreto 2635 (1996), según el cual las prácticas de biotratamiento pueden llevarse a cabo con concentraciones de crudo entre 1 y 10%, debido a que sugiere que, para crudos medianos a concentraciones cercanas a 9%, es posible que se inhiba la actividad microbiana, generando como consecuencia que el proceso de biodegradación sea más lento, en comparación con suelos con menor carga inicial de crudo (cercana a 5%).

Luego de analizar los fragmentogramas correspondientes a cada grupo, puede indicarse que el solvente no tiene influencia en la distribución de biomarcadores. Por otra parte, la concentración inicial de crudo ejerció un efecto importante en el proceso de biodegradación. Para el suelo del tratamiento A, donde el proceso de biodegradación fue más eficiente, puede establecerse un orden relativo de biodegradación de n-alcános > isoprenoides > diasteranos ~ esteranos C_{27} > C_{23-3} ; mientras que para el suelo del tratamiento B, el proceso de biodegradación solo afectó a los n-alcános e isoprenoides, con una degradación incipiente de los esteranos C_{27} . El orden de biodegradación obtenido en la presente investigación se corresponde con el propuesto por Moldowan et al. (1995).

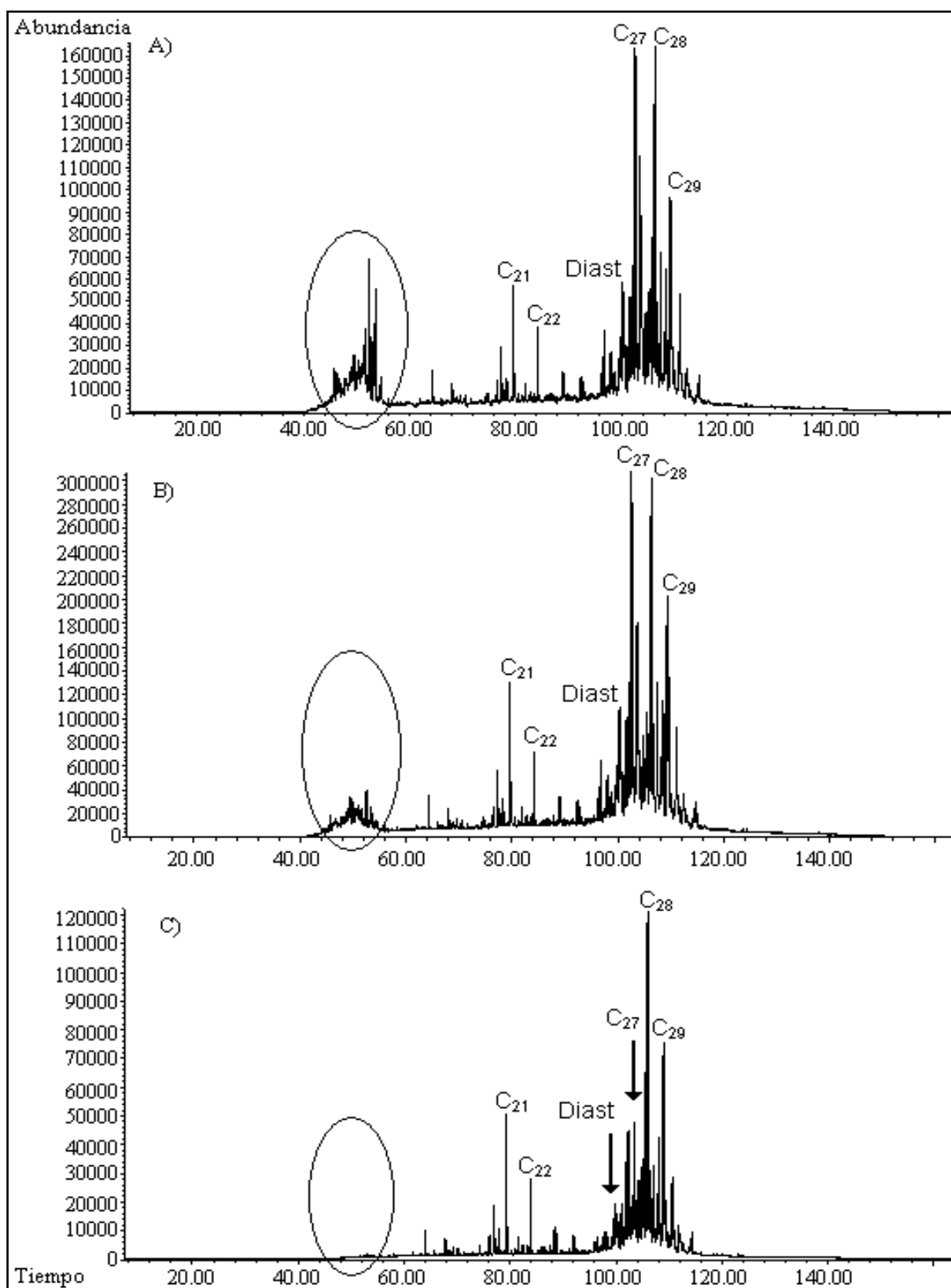


Figura 29. CG-EM ($m/z = 218$) para el grupo A_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.

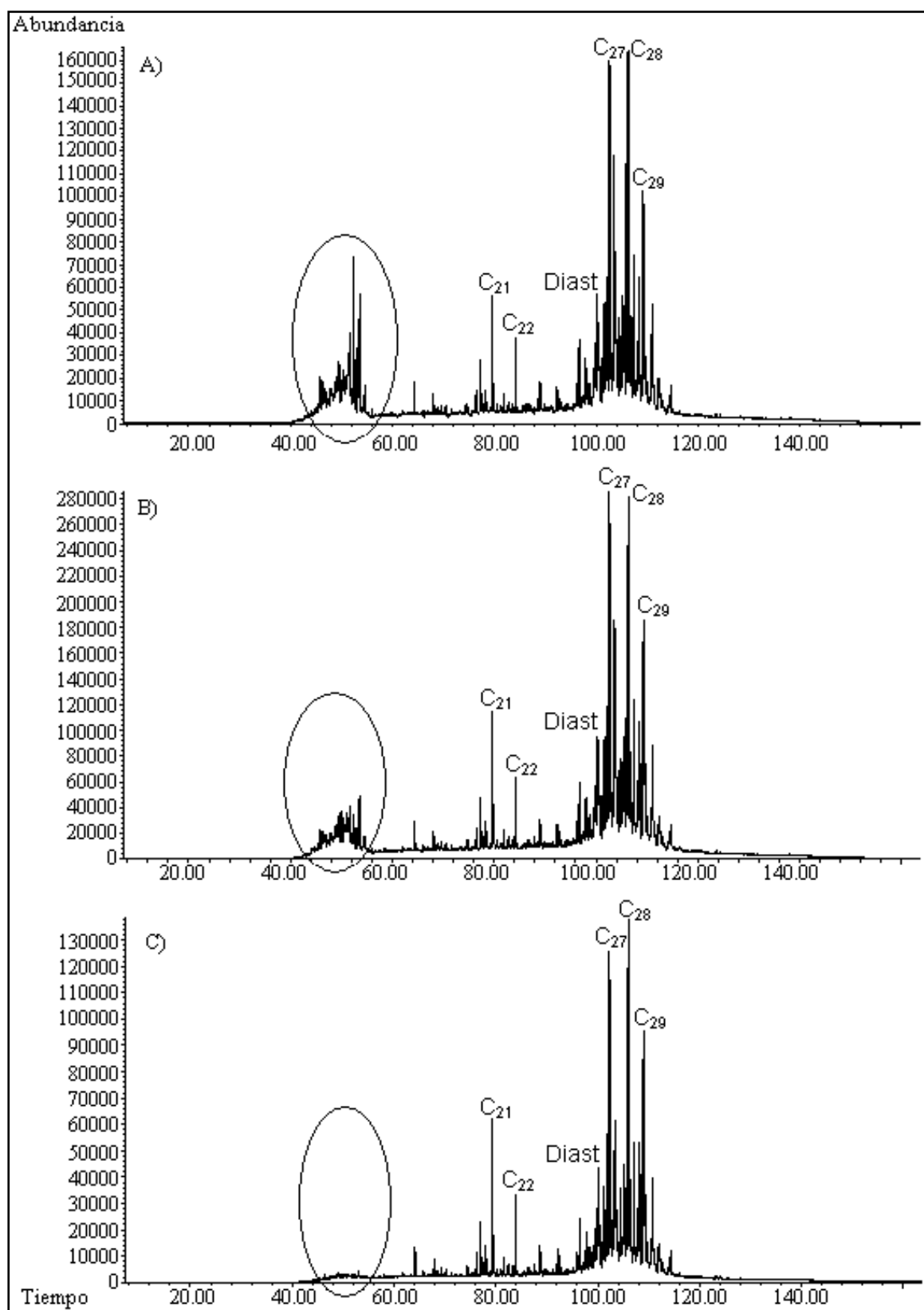


Figura 30. CG-EM ($m/z = 218$) para el grupo B_DCM a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.

5. CONCLUSIONES

Para el suelo con cantidad inicial de crudo de 5%, el diclorometano tiene un poder de extracción superior al n-hexano, siendo la extracción con n-hexano aproximadamente 87% de la obtenida con diclorometano. Para el suelo con carga inicial de crudo de 9%, ambos solventes presentan eficiencias de extracción similares.

Durante la exposición del suelo al crudo ocurren procesos de adsorción crudo-fases minerales. El diclorometano es más efectivo, respecto al n-hexano, venciendo dichas interacciones.

Con ambos solventes (diclorometano y n-hexano) se obtienen concentraciones de crudo menores a la agregada inicialmente, teniendo que el diclorometano es capaz de extraer hasta el 93% del contenido de crudo presente en el suelo, mientras que con el n-hexano se recupera hasta el 81%.

La composición SARA del extracto de crudo obtenido con diclorometano es más similar a la composición SARA del crudo Guafita 10X, que el extracto obtenido con n-hexano. El diclorometano tiene mayor afinidad hacia las fracciones polares (resinas y asfaltenos) con respecto al n-hexano, el cual muestra mayor afinidad por la fracción menos polar de hidrocarburos saturados.

Existe un aumento en las tasas de biodegradación, asociadas con la disminución de la concentración inicial de crudo. La biodegradación ocurre más rápidamente en el suelo contaminado con 5% de crudo que en aquel contaminado con 9%, indicando que mientras mayor es la carga inicial de crudo, se hace más lento el proceso de biodegradación.

El solvente de extracción no ejerce ningún efecto sobre la distribución de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados.

La concentración inicial ejerció un efecto importante en el proceso de biodegradación del crudo Guafita 10X. Durante el período de tiempo estudiado, para el suelo con carga inicial de crudo de 5% puede establecerse un orden relativo de biodegradación de n-alcanos > isoprenoides > diasteranos ~ esteranos $C_{27} > C_{23-3}$; mientras que para el suelo con concentración inicial de crudo de 9%, el proceso de biodegradación solo afectó a los n-alcanos e isoprenoides, con una degradación incipiente de los esteranos C_{27} .

6. RECOMENDACIONES

Realizar comparaciones con otros solventes orgánicos, tales como tetracloruro de carbono y cloroformo, para determinar si ofrecen resultados similares o mejores que los obtenidos para diclorometano y n-hexano.

Realizar análisis de biomarcadores de la fracción de hidrocarburos aromáticos y a tiempos de extracción más cercanos, para establecer con exactitud el inicio de los cambios ocurridos y el orden de biodegradación de los compuestos.

Aplicar la metodología comparando concentraciones iniciales de crudo más cercanas entre sí, con el fin de determinar a qué concentración las eficiencias de extracción de los solventes dejan de ser estadísticamente diferentes.

Realizar los experimentos en suelos de textura franca, franco arcillosa o franco arenosa, donde los procesos de biodegradación del crudo son más favorables.

Realizar los experimentos empleando otros tipos de crudo (pesado y livianos), para determinar la influencia de la concentración inicial de crudo en el proceso de biodegradación de los mismos.

Emplear períodos más largos de experimentación que permitan observar cambios significativos a nivel de biomarcadores, y establecer, en función del grado de contaminación del suelo, cual es el tiempo necesario para alcanzar el criterio de limpieza de la biorremediación establecido por la legislación venezolana.

Realizar otras pruebas, tales como respiración edáfica o producción de CO₂, para determinar en qué medida la concentración inicial de crudo afecta la actividad microbiana.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberdi, M., Moldowan, J.M, Peters, K.E., Dahl, J.E., 2001. Stereoselective biodegradation of tricyclic terpanes in heavy oils from the Bolivar Coastal Fields, Venezuela. *Organic Geochemistry* 32, 181-191.
- Alexander, M., 1999. *Biodegradation and Bioremediation*, segunda ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Brady, N.C., 1990. *The Nature and Properties of Soil*, décima ed. Macmillan Publishing Company, New York.
- Brissio, P.A., 2005. Evaluación Preliminar del Estado de Contaminación en Suelos de la Provincia de Neuquén donde se Efectúan Actividades de Explotación Hidrocarburífera. Trabajo Especial de Grado, Escuela Superior de Salud y Ambiente, Universidad Nacional del Comahue. Argentina.
- Casanova E., 2005. *Introducción a la Ciencia del Suelo*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico UCV, Caracas.
- Decreto N° 2635, 1998. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. *Gaceta Oficial Extraordinaria de la República de Venezuela* N° 5245, 1-91.
- Del'Arco, J.P., de França, F.P., 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbons biodegradation in sandy sediments. *Environmental Pollution* 110, 515-519.
- Frankenberger Jr., W.T., 1992. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. En: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T. (Eds.), *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 237-293.
- Fuentes, R., Medina, A., Morales, F., Ehrmann, E.U., 2010. Efecto del solvente de extracción y la materia orgánica en la determinación del contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) en suelos contaminados con crudo. Primer Congreso de Química del Petróleo, Universidad de Carabobo, Carabobo.
- García, M., 2008. Estudio de la biodegradación del crudo Guafita 1X en dos Suelos de diferente textura y composición mineralógica. Trabajo Especial de Grado, Departamento de Geoquímica - Escuela de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Huang P.M., Bollag J.-M., Senesi N., 2002. Interactions between soil particles and microorganisms: Impact on the terrestrial ecosystems, volumen 8. John Wiley & Sons, USA.
- Hunt, J.M., 1979. *Petroleum Geochemistry and Geology*. W. H. Freeman and Company, USA.
- Ijah, U.J.J., Antai, S.P., 2003. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51, 93-99.
- Infante C., Vásquez, P., 1999. Explotación petrolera y ambiente. *Acta Científica Venezolana* 50, 71-74.

- Infante, C., 2001. Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de interbios y biorize. *Interciencia* 26, 504-507.
- Infante, C., 2005. Contaminación de suelos y recuperación ecológica de Venezuela. *Acta Biológica Venezolánica* 25, 43-49.
- Infante, C., Ortega, C., Morales, F., Ehrmann, U., Hernández-Valencia, I., Pérez, R., 2010. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro* 22, 145-152.
- Killops, S.D, Killops V.J., 1993. *An Introduction to Organic Geochemistry*. John Wiley & Sons, USA.
- Kim, S.-J., Choi D.H., Sim D.S., Oh Y.-S., 2005. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere* 59, 845–852.
- Lo Mónaco, S., 2005. Guía de Principios de Geoquímica. Disponible en línea: <http://gea.ciens.ucv.ve/slomonac/tema6/marcot6.htm>. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de ciencias de la Tierra. Consultado 27 de abril de 2010.
- López, J.B., Quintero, G, Guevara, A.L., Jaimes, D.C., Gutiérrez, S.M., Miranda, J., 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4, 82-90.
- López, L., Lo Mónaco, S., 2004. Geochemical implications of trace elements and sulfur in the saturate, aromatic and resin fractions of crude oil from the Mara and Mara Oeste fields, Venezuela. *Fuel* 83, 365–374.
- López, L., Lo Mónaco, S., Richardson M., 1998. Use of molecular parameters and trace elements in oil-oil correlation Studies, Barinas sub basin, Venezuela. *Organic Geochemistry* 29, 613-629.
- Manahan, S.E., 2000. *Environmental Chemistry*, séptima ed. Lewis Publishers, New York, USA.
- Maroto, M.E., Rogel, J.M., 2002. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Disponible en línea: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdf/lib15/028.pdf>. Geocisa. División de Protección Ambiental de Suelos. Consultado 13 de mayo de 2010.
- Martínez, J., 2005. Guía para la gestión integral de residuos peligrosos, Tomo I: Fundamentos. Red de centros-convenio de Basilea para América Latina y el Caribe.
- McMillen, S.J., 1997. Biodegradability of crude oils in soil. INTEVEP, Venezuela, 16 p.
- McMillen, S.J., Magaw R.I., Carovillano R.L., 2001. Risk-based decision-making for assessing petroleum impacts at exploration and production sites. Department of Energy and the Petroleum Environmental Research Forum, USA.
- Méndez, J.R., Mujica, C.F., Pino, F.B., 2005. Efecto de la contaminación con petróleo sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) en dos suelos del estado Monagas. *Revista UDO Agrícola* 5, 81-87.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 2002. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Pearson

Educación, España.

- Moldowan, J.M., Dahl, J., McCaffrey, M.A., Smith, W.J., Fetzner, J.C., 1995. Application of biological marker technology to bioremediation of refinery by-products. *Energy & Fuels* 9, 155-162.
- Morales, F., 2009. Uso de análisis de riesgos para la evaluación de opciones de tratamiento de desechos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos: Evaluación de opciones de manejo de residuos de perforación, PETROCEDEN, S.A., capítulo 2. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Agregado, Departamento de Procesos y Sistemas, Universidad Simón Bolívar.
- Munsell, 1973. Munsell Soil Color Chart. Baltimore, Maryland, USA.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis N., 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. *Desalination* 211, 286–295.
- Ortiz, J.E., García, M.J., 2003. Técnicas analíticas: Identificación de familias de compuestos. *Industria y Minería* 351, 41-45.
- Ortiz, J.E., Martínez, M.J., 2003. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería* 351, 41-45.
- Parra, E., 2003. Petróleo y Gas Natural: Industria, Mercados y Precios. Ediciones Akal, España.
- Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M., 2005. The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in Petroleum Exploration and Earth History, volumen 2, segunda ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Pons, M., 2010. Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos agrícolas de la Cuenca baja del Río Tonalá. Trabajo de Maestría, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Tabasco, México.
- Riser-Roberts, E., 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical and Chemical Processes. Lewis Publishers, USA.
- Rodríguez, J.L., Sánchez, J., 2003. Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y Minería* 351, 2-16.
- Singer, M.J., Munns, D.N., 1999. Soils: An Introduction, cuarta ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Sparks, D.L., 2003. Environmental Soil Chemistry, segunda ed. Academic Press, USA.
- Shoemaker, J.P., Garland, C.W. and Steinfeld, J.I., 1974. Experiments in Physical Chemistry. McGraw-Hill.
- Tissot, B.P., Welte, D.H., 1984. Petroleum Formation and Occurrence, segunda ed. Springer-Verlag, New York.
- Torres, A., Márquez O., Hernandez, R., Franco, W., 1991. Ensayos de fertilización con fosforita en plantaciones forestales del occidente y el oriente de Venezuela. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay)* 17, 299-308.
- Torres, D., 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos.

Ecosistemas 12, 1-5.

- Trindade, P.V.O., Sobral, L.G., Rizzo, A.C.L., Leite, S.G.F., Soriano, A.U., 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58, 515–522.
- Tsao, D.T., 2003. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Phytoremediation*, volumen 78. Springer-Verlag, New York.
- USEPA 749-F-94-012, 1994. Chemicals in the environment: freon 113. EPA, revisión 1, 2 p.
- USEPA 3540C, 1996. Soxhlet extraction. EPA, revisión 3, 8 p.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation: An overview. *Pure Applied Chemistry*, 73, 1163–1172.
- Wang, Z., Fingas, M., Sigouin, L., 2001. Characterization and identification of a mystery oil spill from Quebec. *Journal of Chromatography A* 909, 155-169.
- Winefordner, J., 2003. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley-Interscience, USA.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Determinación de la textura de suelo: corrección de las lecturas del hidrómetro. Con los datos que se presentan en la siguiente tabla se corregirán las lecturas obtenidas con el hidrómetro, respecto a la temperatura de calibración (19,5 °C).

T (°C)	Corrección
15	-1,6
16	-1,4
17	-0,6
18	-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

Apéndice 2. Cálculo de la cantidad de crudo y fertilizantes que deben añadirse al suelo.

- Se obtuvieron concentraciones de 5% y 9 % de crudo en los suelos.
- Se satisficieron las relaciones $C/P=800$ y $C/N=60$
- Se asumió que todo el C potencialmente biodegradable proviene del crudo y que este posee un 80% del mismo.
- Se utilizaron 2 fertilizantes: Fertilizante A ($30\%P_2O_5$ y $10\%N$) y Fertilizante B (úrea) ($46\%N$)

SUELO A:

a) Cantidad de crudo: $158,2 \text{ g de suelo} \times 5\% = 7,91 \text{ g de crudo}$

b) Cantidad de fertilizantes:

$7,91 \text{ g de Crudo} \times 80\% = 6,33 \text{ g de C}$

$P = C/800 = 0,0079 \text{ g de P necesarios}$

$N = C/60 = 0,1055 \text{ g de N necesarios}$

El fertilizante A posee una concentración de $P=0,1309 \text{ g P/g de fertilizante}$, por lo cual se agregaron $0,0604 \text{ g}$ del mismo para satisfacer la cantidad de P requerida. Al añadir esta cantidad de fertilizante, se agregaron simultáneamente $0,0060 \text{ g de N}$, faltando por agregar $0,0995 \text{ g de N}$, que provinieron del fertilizante B, del cual se agregaron $0,2163 \text{ g}$.

SUELO B:

a) Cantidad de crudo: $158,2 \text{ g de suelo} \times 9\% = 14,24 \text{ g de crudo}$

b) Cantidad de fertilizantes:

$14,24 \text{ g de Crudo} \times 80\% = 11,39 \text{ g de C}$

$P = C/800 = 0,0142 \text{ g de P necesarios}$

$N = C/60 = 0,1898 \text{ g de N necesarios}$

El fertilizante A posee una concentración de $P=0,1309 \text{ g P/g de fertilizante}$, por lo cual se agregaron $0,1085 \text{ g}$ del mismo para satisfacer la cantidad de P requerida. Al añadir esta cantidad de fertilizante, se agregaron simultáneamente $0,0108 \text{ g de N}$, faltando por agregar $0,1790 \text{ g de N}$, que provinieron del fertilizante B, del cual se agregaron $0,3891 \text{ g}$.

Apéndice 3. Cantidades de suelo, agente estructurante y crudo añadida a cada compostero.

Réplica N°	Peso de suelo (g)	Peso de agente estructurante (g)	Peso de crudo (g)	Concentración de crudo (%)
1A	140,0002	18,2008	8,0527	5,09
2A	140,0085	18,2299	7,9417	5,02
3A	140,0159	18,2055	7,9606	5,03
1B	140,0066	18,2088	14,2642	9,02
2B	140,0016	18,2010	14,2400	9,00
3B	140,0068	18,2052	14,2625	9,01

Las concentraciones de crudo (%) fueron calculadas utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. crudo (\%)} = \frac{\text{Peso de crudo (g)}}{\text{Peso de suelo (g)} + \text{peso de ag. estruct. (g)}} * 100$$

Apéndice 4. Cantidad de crudo extraído (% m/m) para cada grupo en los distintos tiempos de extracción.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
DÍA 1	Réplica 1	4,67	4,09	7,9	7,1
	Réplica 2	4,69	4,17	7,0	6,3
	Réplica 3	4,70	4,08	7,6	7,5
	Media	4,69	4,11	7,5	7,0
	Des. Est.	0,02	0,05	0,5	0,6
	C.V.	0,34	1,15	7,2	9,0
DÍA 15	Réplica 1	3,72	3,27	6,8	6,2
	Réplica 2	3,55	3,18	6,0	5,6
	Réplica 3	3,56	3,15	6,2	5,4
	Media	3,61	3,20	6,3	5,7
	Des. Est.	0,10	0,06	0,4	0,4
	C.V.	2,66	1,95	6,8	7,3
DÍA 30	Réplica 1	3,28	2,66	5,8	5,1
	Réplica 2	3,16	2,49	5,1	4,6
	Réplica 3	3,19	2,55	5,7	5,1
	Media	3,21	2,57	5,5	4,9
	Des. Est.	0,06	0,09	0,4	0,3
	C.V.	1,85	3,40	7,1	6,5
DÍA 45	Réplica 1	2,7	2,1	5,1	4,1
	Réplica 2	2,4	1,8	4,5	4,0
	Réplica 3	2,7	2,1	5,5	4,6
	Media	2,6	2,0	5,0	4,3
	Des. Est.	0,2	0,2	0,5	0,4
	C.V.	5,8	8,7	9,7	8,3
DÍA 90	Réplica 1	2,6	2,1	4,3	3,9
	Réplica 2	2,4	2,0	3,9	3,4
	Réplica 3	2,3	1,8	4,0	3,9
	Media	2,4	2,0	4,1	3,8
	Des. Est.	0,2	0,1	0,2	0,3
	C.V.	6,4	6,0	5,5	7,2

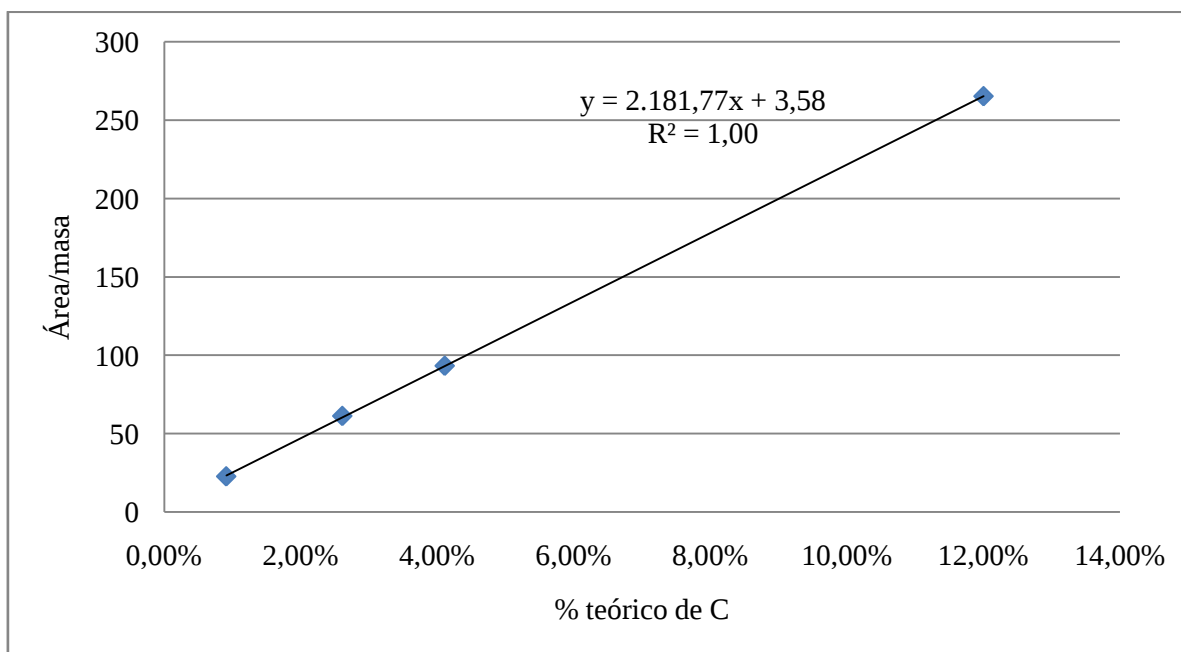
Apéndice 5. Eficiencias de extracción (%) de los solventes a los distintos tiempos de experimentación.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
DÍA 1	Réplica 1	92	80	88	79
	Réplica 2	94	83	78	70
	Réplica 3	93	81	85	83
	Media	93	81	84	77
	Des. Est.	1	1	5	7
	C.V.	1	2	7	9
DÍA 15	Réplica 1	73	64,2	76	68
	Réplica 2	71	63,3	66	62
	Réplica 3	71	62,6	69	60
	Media	72	63,4	70	63
	Des. Est.	1	0,8	5	5
	C.V.	2	1,3	7	7
DÍA 30	Réplica 1	64,4	52	65	57
	Réplica 2	63,0	50	57	51
	Réplica 3	63,5	51	63	56
	Media	63,6	51	62	55
	Des. Est.	0,7	1	4	3
	C.V.	1,1	3	7	6
DÍA 45	Réplica 1	53	42	56	46
	Réplica 2	49	36	50	44
	Réplica 3	54	42	61	52
	Media	52	40	56	47
	Des. Est.	3	3	5	4
	C.V.	6	8	10	8
DÍA 90	Réplica 1	51	40	48	44
	Réplica 2	47	40	44	38
	Réplica 3	45	36	44	43
	Media	48	39	45	42
	Des. Est.	3	2	2	3
	C.V.	6	6	5	7

Apéndice 6. Curva de calibración para la determinación de la concentración de carbono total (CT) empleando el equipo LECO C-144.

La curva de calibración se construyó graficando la señal área/masa determinada por el equipo en función de las concentraciones de los patrones estándar utilizados.

Patrones (% teórico de C)	Área/masa
0,91%	22,75
2,61%	61,29
4,11%	93,29
12,00%	265,26



Apéndice 7. Concentración de COT (% m/m) de los residuos de suelo en los distintos tiempos de extracción.

		Grupo A_DCM	Grupo A_hexano	Grupo B_DCM	Grupo B_hexano
DÍA 1	Réplica 1	1,78	2,61	1,82	3,02
	Réplica 2	1,40	2,55	1,79	2,52
	Réplica 3	1,76	2,68	1,78	2,54
	Media	1,65	2,61	1,80	2,53
	Des. Est.	0,21	0,09	0,03	0,02
	C.V.	13,01	3,49	1,46	0,71
DÍA 15	Réplica 1	1,69	2,2	2,4	2,5
	Réplica 2	1,78	1,8	1,9	2,9
	Réplica 3	1,68	1,9	2,2	2,8
	Media	1,72	2,0	2,2	2,7
	Des. Est.	0,05	0,2	0,2	0,2
	C.V.	3,12	9,0	10,3	6,6
DÍA 30	Réplica 1	1,55	2,374	1,71	2,8
	Réplica 2	1,95	2,988	1,81	2,9
	Réplica 3	1,59	2,370	3,02	3,5
	Media	1,57	2,372	1,76	2,8
	Des. Est.	0,02	0,003	0,07	0,1
	C.V.	1,27	0,126	3,97	3,5
DÍA 45	Réplica 1	3,1	2,8	2,8	3,17
	Réplica 2	2,6	2,6	2,2	3,20
	Réplica 3	2,7	3,3	2,0	3,21
	Media	2,8	2,7	2,1	3,19
	Des. Est.	0,3	0,1	0,1	0,02
	C.V.	9,8	3,7	4,7	0,71
DÍA 90	Réplica 1	1,72	1,98	1,93	2,28
	Réplica 2	1,27	1,67	1,95	2,24
	Réplica 3	1,17	1,61	1,83	2,21
	Media	1,22	1,64	1,91	2,25
	Des. Est.	0,07	0,04	0,06	0,03
	C.V.	5,72	2,44	3,28	1,49

Nota: los datos que se resaltan en **ROJO** son los que se han descartado aplicando la prueba Q de Dixon.

Apéndice 8. Pruebas estadísticas realizadas

a. **Prueba Q de Dixon:** es una prueba empleada para aceptar o rechazar un resultado anómalo, con un nivel de confianza de 95% ($P \leq 0,05$). Para aplicarla se ordenan los datos en forma creciente y se calcula Q (Shoemaker et al., 1974).

$$Q = \frac{\text{desvío}}{\text{recorrido}} = \frac{\text{Diferencia entre el dato sospechoso y su vecino más cercano}}{\text{Diferencia numérica entre el dato de mayor valor y el de menor valor}}$$

Si $Q_{\text{calculada}} > Q_{\text{tabulada}}$ el dato se rechaza.

b. **Prueba t de Student:** permite determinar la probabilidad de que las medias pertenezcan o no a una misma población, con un nivel de confianza de 95% ($P \leq 0,05$). Es empleada cuando el tamaño muestral es pequeño ($n < 30$) (Miller y Miller, 2002).

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s^2 \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde:

x_1 y x_2 son las medias muestrales.

n_1 y n_2 son los tamaños muestrales

s es la desviación estándar, que se calcula a partir de las dos desviaciones estándar individuales, a partir de la ecuación:

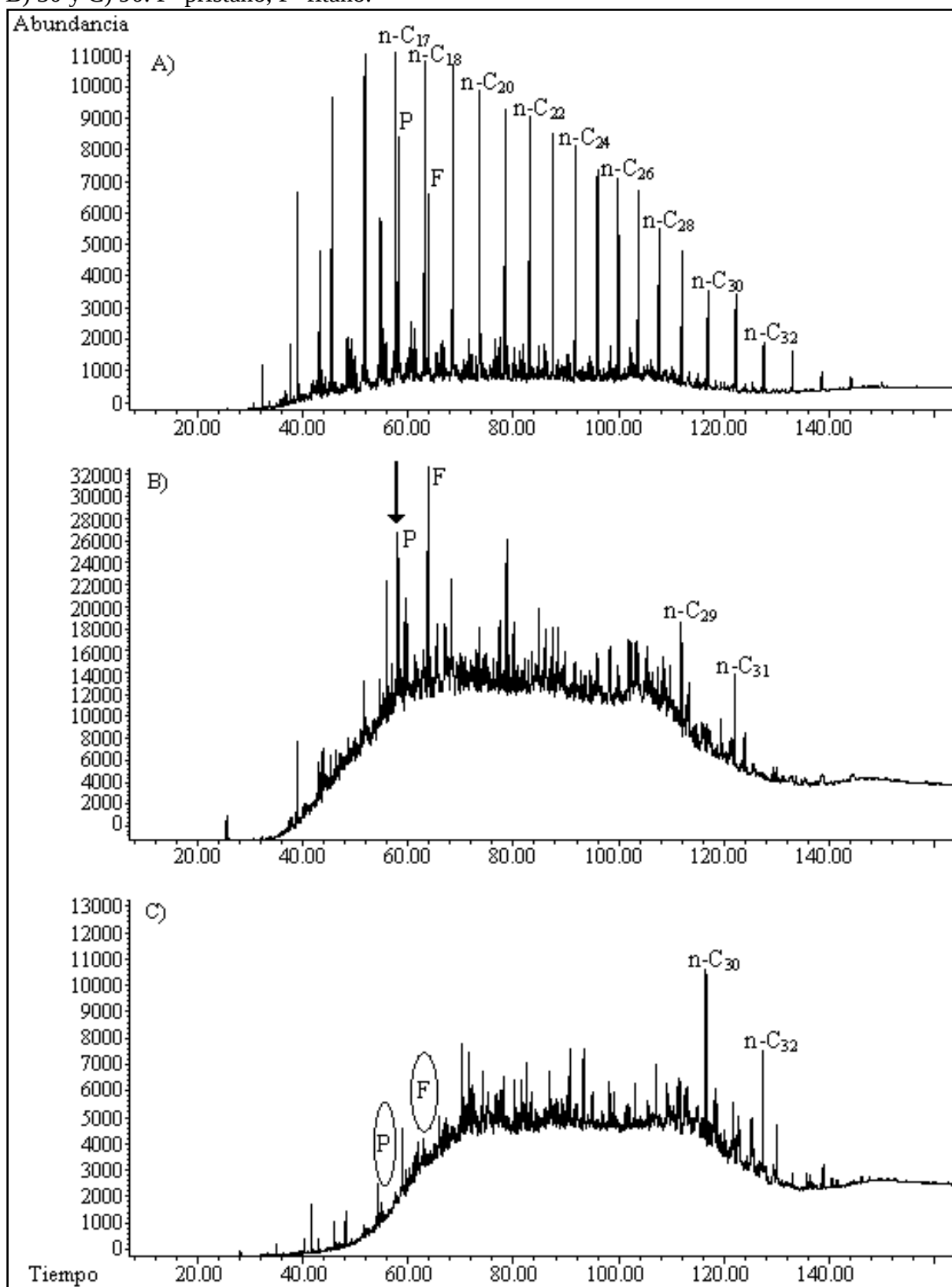
$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

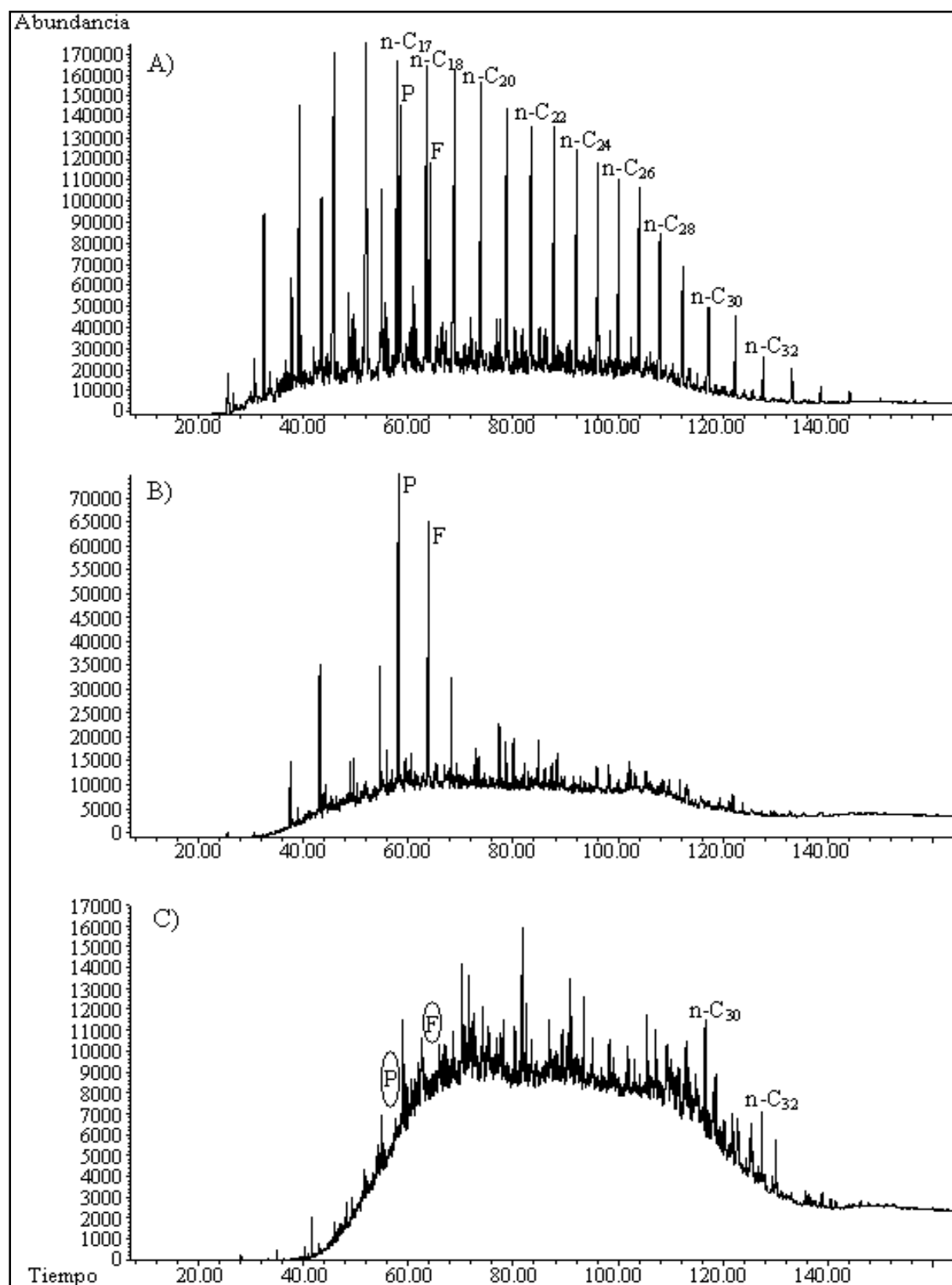
y t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

El valor calculado de t se compara con un valor de referencia basado en el número de grados de libertad y el nivel de significación.

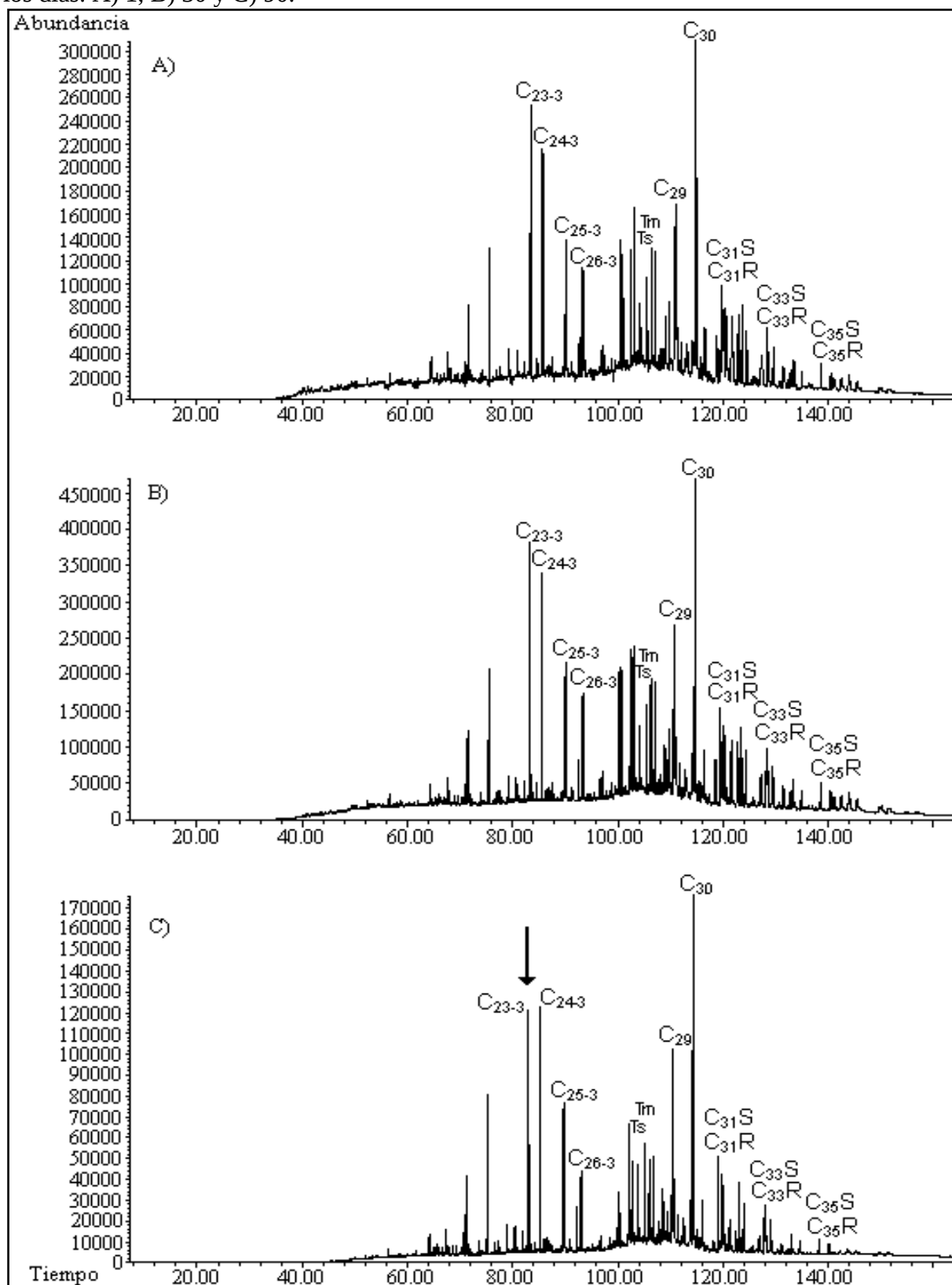
Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ existe diferencia significativa entre las medias.

Apéndice 9. CG-FID para los grupos A_hexano y B_hexano, respectivamente, a los días: A) 1, B) 30 y C) 90. P=pristano, F=fitano.





Apéndice 10. CG-EM ($m/z = 191$) para los grupos A_hexano y B_hexano, respectivamente, a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.



Apéndice 11. CG-EM ($m/z = 218$) para el grupo A_hexano y B_hexano, respectivamente, a los días: A) 1, B) 30 y C) 90.

