

**Universidad Católica Andrés Bello
Estudios de Postgrado
Área de Ingeniería
Postgrado Ingeniería Ambiental**

**Trabajo de Grado
Para optar al título de Magíster en Ingeniería Ambiental**

**Potencial uso del potasio como acelerador del proceso de
biodegradación de un crudo mediano en un suelo franco del
estado Miranda.**

Presentado por:

**Ing. Agr. Carmen Janet Ortega
11.475.977.**

Tutora:

PhD. Carmen Infante

Caracas, Enero de 2007

Dedicatoria

A mi Dios..... Mi compañero de siempre

A mi hermosa Madre.... Que Dios la bendiga

Agradecimientos

A mi tutora, Profesora Carmen Infante, por su invaluable apoyo, su gran paciencia, por sus palabras acertadas y oportunas, por su perseverancia, su inmensa experiencia y conocimientos fueron la guía de este arduo trabajo. La admiro Profe.....

Al Profesor Fernando Morales, de la Universidad Simón Bolívar por su apoyo, esmero y colaboración, sin el cual no hubiese sido posible realizar este estudio. Miles de gracias.

Al Profesor Manuel Gaspar por su atención, esmero, paciencia, consejos y preocupación para que este trabajo se concretara.....

A la Profesora Ursula Erman, por su colaboración y asesoría en la realización de las pruebas cromatográficas. También por su paciencia y comprensión.

Al Profesor Wickar Miralles por su disposición permanente a ayudarme, paciencia y atenciones.

Al personal del Laboratorio de Química Ambiental y Desechos de la Universidad Simón Bolívar, por siempre estar dispuestos a ayudarme en la realización de todos los análisis necesarios....

A Mauro, por su gran apoyo, paciencia y dedicación...

Al Profesor Roso Pérez de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo en realizar los análisis estadísticos. ..

A mis amigas y amigos apoyos en todo momento... sin ellos imposible seguir adelante., gracias por su amor, compañerismo, atenciones y solidaridad.

Índice de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	11
2	MARCO TEÓRICO	13
2.1	CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR LA EXTRACCIÓN Y MANEJO DE PETRÓLEO.	13
2.2	PRINCIPIO DE BIORREMEDIACIÓN.	15
2.3	TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE SUELOS CONTAMINADOS CON DESECHOS ORGÁNICOS.	15
2.4	PARÁMETROS A CONSIDERAR EN LA BIORREMEDIACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS.....	15
2.5	NUTRIMENTOS.....	18
3	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	21
3.1	OBJETIVO GENERAL	21
3.2	HIPÓTESIS PLANTEADA.	21
4	MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1	UBICACIÓN DEL ENSAYO.	22
4.2	DURACIÓN DEL ENSAYO.....	22
4.3	CARACTERÍSTICAS DEL SUELO Y CRUDO UTILIZADOS EN EL ENSAYO.	22
4.4	PREPARACIÓN DE LOS COMPOSTEROS UTILIZADOS EN EL ENSAYO.....	23
4.5	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:	27
4.6	TÉCNICAS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO.....	28
4.6.1	<i>Caracterización del suelo</i>	29
4.6.1.1	Análisis químicos y físicos realizados al suelo:.....	29
4.6.1.1.1	Relación Adsorción de Sodio (RAS).....	29
4.6.1.1.2	Determinación del pH.....	29
4.6.1.1.3	Determinación de la Conductividad Eléctrica (CE).....	30
4.6.1.1.4	Determinación de la Salinidad.....	30
4.6.1.1.5	Determinación de Cloruros (CL-).....	30
4.6.1.1.6	Determinación de Aluminio (Al) intercambiable.....	30
4.6.1.1.7	Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico.....	30
4.6.1.1.8	Determinación de bases intercambiables.....	31
4.6.1.1.9	Determinación del Porcentaje de Saturación de bases.....	31
4.6.1.1.10	Determinación de la humedad del suelo.....	31
4.6.2	<i>Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540</i>	32
4.6.2.1	Protocolo para medir la remoción de crudo del suelo.....	32
4.6.2.2	Verificación de recuperación efectiva del solvente.....	34
4.6.3	<i>Protocolo de medición del Dióxido de Carbono (CO₂)</i>	35
4.6.4	<i>Determinación de los parámetros establecidos en el Decreto 2635 en la mezcla final suelo-crudo</i>	38
4.6.5	<i>Determinación mediante análisis cromatográfico de fracciones remanentes del crudo Mesa</i>	38
4.6.5.1	Procedimientos utilizados para la determinación cualitativa de las fracciones remanentes del crudo Mesa con el uso de cromatografía.....	38
4.6.6	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	40
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1	CARACTERIZACIÓN DEL SUELO.....	42
5.1.1	<i>Análisis fisicoquímicos del suelo</i>	42
5.2	CINÉTICA DE REMOCIÓN DE CRUDO.....	45
5.2.1	<i>Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540</i>	45
5.3	MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂).....	53
5.4	EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LA MEZCLA SUELO/DESECHO ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635 (ARTÍCULOS 50).....	56

5.5	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA DEGRADACIÓN DE LAS FRACCIONES DEL CRUDO MESA CON EL USO DE CROMATOGRAFÍA.....	60
6	CONCLUSIONES	63
7	RECOMENDACIONES.....	65
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9	ANEXOS	69
	ANEXO A. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA EXTRACCIÓN DE CRUDO CON EL MÉTODO SOXHLET.....	69
	FIGURA A1. ASPECTO DE LOS DEDALES CON LA MUESTRA DE SUELO PULVERIZADA, PREPARADO PARA COMENZAR EL PROCESO DE EXTRACCIÓN CON HEXANO.	69
	FIGURA A2.- PROCESO DE EXTRACCIÓN CON HEXANO.....	69
	FIGURA A3- PROCESO DE EXTRACCIÓN CONTINUA.....	70
	FIGURA A4. SOLVENTE INCOLORO LUEGO DE UNA HORA Y TREINTA CINCO MINUTOS (1:35 MIN).....	70
	A5. PROCESO DE FILTRADO DEL SOLVENTE CON EL CRUDO EXTRAÍDO DE LAS MUESTRAS DE SUELO. ...	73
	A6.- INTRODUCCIÓN DEL SOLVENTE EN LA ESTUFA PARA RECUPERAR EL CRUDO EXTRAÍDO.....	73
	ANEXO B. CANTIDADES DE CRUDO REMOVIDO CON EL MÉTODO SOXHLET EN LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS Y PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN.....	74
	ANEXO C. VALORES PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES INDEPENDIENTES DE LOS PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN.....	75
	ANEXO D. RESULTADOS TOTALES DE LA PRODUCCIÓN DE CO₂ POR TRATAMIENTO DURANTE LOS 60 DÍAS DEL EXPERIMENTO.....	76
	ANEXO E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CINÉTICA DE REMOCIÓN DE CRUDO DE LOS NUEVE TRATAMIENTOS EVALUADOS DURANTE LOS 60 DÍAS DE ENSAYO.....	77
	TABLA E1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) PARA LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN A PRIMER DÍA DE TRATAMIENTO (3 REPETICIONES).....	77
	TABLA E2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) PARA LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN A LOS 15 DÍAS DE TRATAMIENTO (3 REPETICIONES).....	77
	TABLA E3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) PARA LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN A 45 DÍAS DE TRATAMIENTO (3 REPETICIONES).....	78
	TABLA E4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) PARA LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN A 60 DÍAS DE TRATAMIENTO (3 REPETICIONES).....	78
	ANEXO F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE CO₂ EN LOS NUEVE TRATAMIENTOS DURANTE LOS 60 DÍAS DE ENSAYO.....	79
	TABLA F1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO ₂ PRODUCIDA AL DÍA CERO DEL EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES.....	79
	TABLA F2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO ₂ PRODUCIDA A LOS 7 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES.....	80
	TABLA F3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO ₂ PRODUCIDA A LA 14 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES.....	80
	TABLA F4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO ₂ PRODUCIDA A LOS 21 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES.....	81
	TABLA F5. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO ₂ PRODUCIDA A 28 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES..	81

TABLA F6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO₂ PRODUCIDA A 35 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES... 82

TABLA F7. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO₂ PRODUCIDA A LOS 45 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES. 82

TABLA F8. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO₂ PRODUCIDA A LOS 52 DÍAS DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES..... 83

TABLA F9. RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL RANGO ESTUDENTIZADO DE TUKEY (HSD) APLICADA A LOS DATOS DE LA CANTIDAD DE CO₂ PRODUCIDA 60 DÍAS DE DE EXPERIMENTO PARA TRES REPETICIONES.83

Índice de Tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DEL CRUDO MESA USADO EN EL EXPERIMENTO.....	23
TABLA 2.- FRACCIONES DEL CRUDO MESA, DESTILADO ENTRE 20- 100 °C	23
TABLA 3.- FRACCIONES DEL CRUDO MESA, DESTILADO ENTRE 200-250 °C.....	23
TABLA 4. RESUMEN DE LAS CANTIDADES DE SUELO Y CRUDO USADAS EN EL ENSAYO.	25
TABLA 5. DOSIS DE FERTILIZANTES Y FUENTES NPK UTILIZADAS EN EL ENSAYO.	25
TABLA 6.- FECHAS DE LAS MEDICIONES DE LAS RESPIRÓMETRIAS.....	37
TABLA 7.-CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO UTILIZADO EN EL ENSAYO.	42
TABLA 8.- CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO UTILIZADO EN EL ENSAYO (TOMADAS DE LEÓN ET AL., 1998).....	42
TABLA 9. CONTENIDO PROMEDIO Y PORCENTAJES DE CRUDO MESA EXTRAÍDO EN EL TIEMPO PARA CADA TRATAMIENTO.	46
TABLA 10. PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE CRUDO MESA REMOVIDO EN LOS TIEMPOS EVALUADOS.....	46
TABLA 11. PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO MESA EN EL TIEMPO.....	47
TABLA 12. PROMEDIOS DE LA PRODUCCIÓN CO ₂ , OBSERVADOS DURANTE LOS 60 DÍAS DE EXPERIMENTO (TRES RÉPLICAS POR TRATAMIENTO).....	53
TABLA 13. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO SIN FERTILIZACIÓN (T2) COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	56
TABLA 14. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO (T3) FERTILIZADO CON NPK (C/K 200/1) COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	57
TABLA 15. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO (T4) FERTILIZADO CON NPK (C/K 400/1) COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	57
TABLA 16. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO (T5) FERTILIZADO CON NPK (C/K 600/1) COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	57
TABLA 17. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO (T8) FERTILIZADO CON K (C/K 600/1) COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	58
TABLA 18.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL TRATAMIENTO (T9) FERTILIZADO CON NP COMPARADOS CON LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL DECRETO 2635.....	58

Índice de Figuras

FIGURA 1. ASPECTO DEL SUELO TAMIZADO ANTES DE MEZCLARLO CON LA HOJARASCA Y EL CRUDO.....	24
FIGURA 2. ASPECTO DE LOS COMPOSTEROS PREPARADOS CON LA MEZCLA SUELO, HOJARASCA, FERTILIZANTE Y CRUDO, SEGÚN EL CASO, CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	26
FIGURA 3. EQUIPO SOXHLET PARA EXTRACCIÓN CONTINUA DE CRUDO.....	32
FIGURA 4. DIAGRAMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD CRUDO EN MUESTRAS DE SUELO.....	34
FIGURA 5. RESPIRÓMETRO DE CAMPO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CO ₂ , (FUENTE: INFANTE Y GONZÁLEZ, 1995).....	35
FIGURA 6. CÁMARAS INVERTIDAS (RESPIRÓMETROS) PARA LA RETENCIÓN DE CO ₂	36
FIGURA 7. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO PARA LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS.....	48
FIGURA 8. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO EN LOS TRATAMIENTOS T3, T4, T5 Y T9.	49
FIGURA 9. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL CRUDO EN LOS TRATAMIENTOS T1, T2, T6, T7, T8 Y T9.	51
FIGURA 10. PRODUCCIÓN DE CO ₂ DE LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS DURANTE 60 DÍAS DE ENSAYO.....	54
FIGURA 13. CROMATOGRAMAS DEL CRUDO MESA SIN DEGRADAR.....	60
FIGURA 14. CROMATOGRAMAS DE LAS CANTIDADES REMANENTES DE CRUDO EN LOS TRATAMIENTOS T3, T4 Y T5, UNA VEZ FINALIZADO EL ENSAYO.	61

Resumen

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Química Ambiental, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar. Se evaluó el efecto del Potasio (K) sobre la biodegradación del crudo mediano Mesa (29 ° API), producido en el Oriente del país, en un suelo modelo de textura franca, procedente del estado Miranda.

Se instalaron nueve tratamientos con la técnica del compostero (tres (3) réplicas cada uno), con un diseño completamente aleatorizado. Se evaluaron tres tratamientos con la combinación Nitrógeno (N), C:N 60:1; Fósforo (P), C:P 800:1, relaciones reportadas como óptimas en la literatura, variándose las relaciones C:K (200:1; 400:1 y 600:1). Otros tres tratamientos sólo con K (200:1, 400:1 y 600:1), y NP (C:N 60:1, C:P 800:1), un control abiótico y un tratamiento sin fertilizar fueron analizados.

Para el suministro de nutrimentos NPK se usó Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), Fosfato de Amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y Cloruro de Potasio. Los composteros se mantuvieron a 30-40 % de la capacidad de campo. La temperatura en el laboratorio se mantuvo entre los 24 y 27 °C.

El experimento constó de tres etapas: (1) Caracterización del suelo, (2) Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540 y la efectividad de la biodegradación, a través de la medición de la producción CO_2 (con respirómetros); y (3) Evaluación de parámetros de la mezcla final suelo-desecho, de acuerdo a lo establecido en el Decreto 2635 sobre **“Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos”**; así como la determinación cualitativa de la degradación de las fracciones del crudo Mesa, utilizando la técnica de la cromatografía de gases con detección a la llama.

Como medida directa de la biodegradación, se cuantificó el contenido de crudo a los 0, 15, 45 y 60 días. La efectividad de la biodegradación se determinó a través de la medición de la producción CO_2 como un indicador indirecto del proceso.

El nivel de fertilización con potasio (C/K, 400/1) combinado con nitrógeno (N) y fósforo (P), denominado T4, presentó la mayor tasa de biodegradación del crudo Mesa (72, 83 %) a los 60 días de experimentación. Sin embargo, dado que no se aprecian diferencias estadísticas significativas entre los tres tratamientos evaluados con la combinación NPK, T3 (NP y K (C/K, 200/1)), T4 y T5 (NP y K (C/K, 600/1)), se podría entonces recomendar la utilización de la menor relación de potasio evaluada (T5), siendo evidente que las tres ejercieron un efecto positivo en los procesos de biodegradación, por lo menos para el crudo y suelo ensayado en este estudio.

Las pérdidas del crudo atribuibles a factores abióticos (por volatilización, fotólisis u otro elemento diferente a la degradación por intermedio de microorganismos) estuvieron en el orden del 23 %. Las bajas tasas de degradación observadas en el control abiótico, se correspondieron con la escasa producción de CO_2 durante todo el ensayo. Asimismo, el análisis estadístico demostró diferencias significativas ($p < 0,05$, para un límite estadístico de 95% de confianza), entre el control abiótico y todos los demás tratamientos, resultando incuestionable que los microorganismos actuaron positivamente en los demás tratamientos, evidenciándose el impacto de la actividad microbiana en el proceso de degradación del crudo Mesa.

El tratamiento que no recibió fertilización presentó porcentajes de biodegradación siempre menores a los tratamientos que recibieron fertilización completa e incompleta, sugiriendo el desarrollo de procesos de atenuación natural del crudo en el suelo.

Los datos obtenidos de las cantidades de crudo degradadas (con la remoción de aceites y grasas) simultáneamente con la validación cromatográfica cualitativa, revelaron petróleo degradado en los

tratamientos evaluados, que contenían fertilización completa con las tres relaciones C/K. No obstante el tratamiento con la dosis intermedia NPK (C:K, 400:1), presentó los picos más bajos de fracciones remanentes de hidrocarburos, y por lo tanto la mayor degradación. El remanente de los hidrocarburos pesados C16-C35, dominaron la escasa distribución de hidrocarburos en los residuos de petróleo, en las muestras a las que se les analizó las fracciones de crudo Mesa a los 60 días.

1 Introducción

La industria petrolera representa para Venezuela la más importante fuente de ingresos, siendo uno de los países privilegiados a nivel mundial por la presencia de petróleo en el subsuelo en grandes reservas. La necesidad de explotar este recurso no renovable tiene asociados problemas de contaminación, desde la fase de exploración y extracción del crudo hasta su procesamiento y transformación en productos refinados., lo que da lugar a grandes cantidades de residuos sólidos.

El manejo de los residuos sólidos generados, tales como los rípios de perforación, y el tratamiento adecuado de suelos contaminados por eventuales derrames de crudo, se ha convertido en un importante reto, debido a la necesidad de disminuir los impactos negativos que estos contaminantes tienen o tengan sobre el ambiente (Eweis, Ergas, Chang y Schroeder, 2000).

La explotación y perforación de pozos petroleros en Venezuela, genera como en todas las partes del mundo, cantidades significativas de rípios de perforación que deben ser dispuestos adecuadamente para asegurar que la empresa que explota el recurso, cumpla con lo establecido en la normativa ambiental nacional. La norma venezolana que rige y regula el manejo ambientalmente seguro de este tipo de desechos es el Decreto N° 2635 sobre Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos (Gaceta Oficial N° 5212, 12 de Febrero de 1998). Además del adecuado tratamiento y disposición de los rípios de perforación generados en las operaciones de exploración y perforación, es necesario dar el tratamiento adecuado a los suelos potencialmente contaminados por eventuales derrames de crudo, y a una serie de desechos como sedimentos de fondo de tanques y fosas contaminadas por hidrocarburos.

Existen muchas alternativas de tratamientos químicos y biológicos para reducir el potencial contaminante de estos desechos. Las tecnologías biológicas son unas de las más usadas por su compatibilidad con el ambiente y su menor costo comparado con las fisicoquímicas, Dentro de las biológicas, se acuña el término biorremediación que incluye una gran variedad de formas de aplicación. Mediante esta técnica, los microorganismos utilizan los compuestos orgánicos tóxicos o sustancias químicas orgánicas contaminantes, transformándolos en productos inocuos para el ambiente.

Esto ocurre mediante la combinación de procesos metabólicos donde se obtiene una degradación parcial o total de estos contaminantes, o mediante la utilización de estas sustancias como sustratos de crecimiento por los microorganismos, produciéndose, al menos, la mineralización de parte de los compuestos. De esta forma, con la estimulación del crecimiento microbiano, puede obtenerse la destrucción o conversión de estos contaminantes en productos menos dañinos. En los trópicos y particularmente en nuestro país, la tecnología de biodegradación de hidrocarburos ha sido muy aplicada y existen diversos estudios documentados donde se indica la efectividad de esta tecnología en remediar suelos contaminados con hidrocarburos (Infante y Vásquez, 1999; Infante, 2001).

Generalmente para que ocurra la biorremediación, es necesaria la presencia de determinados compuestos para lograr el crecimiento microbiano, tales como nutrimentos y donantes y/o aceptores de electrones (Bouwer y Zehnder, 1993).

Se han realizado estudios para evaluar la influencia o efectividad de nutrimentos como el Nitrógeno y el Fósforo, optimizando las relaciones Carbono/ Nitrógeno (C/N) y Carbono /Fósforo (C/P), en el proceso de biorremediación. Sin embargo se conoce muy poco sobre el potasio. Se sabe que el potasio es un macroelemento que puede tener un efecto positivo sobre la tasa de biodegradación de contaminantes del petróleo, lo que ha sido reportado por Dibble y Bartha, (1979), para áreas templadas, sin embargo para zonas tropicales no existe documentación al respecto, o por lo menos de dominio público donde se muestre la comparación de diferentes niveles de uso de Potasio y su efectividad sobre el proceso de biodegradación. (C. Infante, Comunicación personal, abril 18, 2005).

Siendo la biorremediación una tecnología ambiental de alto potencial e importancia en nuestro país, se hace necesario realizar estudios que contribuyan a determinar y dar a conocer la relación y la efectividad del Potasio para acelerar los procesos de biodegradación de contaminantes orgánicos al menor costo. La necesidad de conducir investigaciones que conlleven a conocer y determinar la efectividad del potasio sobre un proceso de biorremediación, podría traducirse en información científica nueva y conocimiento en el área de estudio, principalmente en las zonas tropicales. Al mismo tiempo el potasio sería un soporte clave, de comprobarse que pudiese ser un efectivo acelerador en los procesos de biodegradación del proceso. Con base a ello, es de gran importancia la investigación que se conduzca al respecto, a fin de contribuir a mejorar el proceso de biodegradación en las áreas tropicales.

2 Marco teórico.

2.1 Contaminación de suelos por la extracción y manejo de petróleo.

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a nivel mundial, un problema de contaminación de los suelos y cuerpos de agua. La Environment Protection Agency (EPA) define como sustancia peligrosa a toda aquella que posea una de las cuatro características siguientes: toxicidad, reactividad, corrosividad o inflamabilidad, lo cual aplica para los hidrocarburos y sus residuos generados en la explotación y refinación del petróleo (Sellers, 1999).

La extracción y el manejo del petróleo en los países productores de hidrocarburos en América Latina, tales como Brasil, México, Argentina, Ecuador y Venezuela produce severas consecuencias en lo que a contaminación se refiere, provocando un deterioro creciente de las fuentes de abastecimiento de agua potable, ya sea superficial o subterránea y de suelos potencialmente productivos (Luque, 1995).

La contaminación con petróleo se caracteriza por su persistencia en el ecosistema, dependiendo del tipo de crudo y de las características y vulnerabilidad del ecosistema, a pesar de los procesos de degradación natural y/o antrópica que puedan ocurrir o inducirse. La contaminación por hidrocarburos tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un suelo, pudiendo impedir o retardar el crecimiento de la vegetación sobre el área contaminada (Luque, 1995; Lieth y Markert, 1990).

En Venezuela dada la importancia de la actividad petrolera, existe una cifra muy alta de sitios en el país donde se requiere efectuar acciones de remediación. Lo que más complica la problemática de aquellos sitios contaminados por hidrocarburos es que, hasta hace pocos años, prácticamente no existía una conciencia del grado de dificultad y del enorme costo que la remediación de los suelos y cuerpos de agua contaminados representan para la sociedad, haciéndose patente que resulta más costoso remediar que prevenir (Marín, 2000).

La solución ambientalmente adecuada para el tratamiento de los residuos sólidos conteniendo hidrocarburos, generados durante los procesos de la perforación, extracción y producción del petróleo se encuentra dentro de las prioridades fundamentales de la industria petrolera (Infante, 2001).

Se han utilizado diversas técnicas con variados índices de efectividad para contrarrestar el efecto de la contaminación por hidrocarburos. No obstante, no existe un criterio uniforme en cuanto a su eficacia, sus costos, sus ventajas y desventajas. Tecnologías como el proceso de incineración, la desorción térmica, extracción con vapor, por citar algunas, resultan demasiado costosas y/o ecológicamente incompatibles para considerarse como una solución viable en determinados casos (Mata, Korn y Torrents, 2000). Sin embargo, cada tecnología tiene su nicho o campo de aplicación que se selecciona en base a un conjunto de factores entre ellos, volumen del desecho, grado y

tipo del contaminante, ubicación y tipo del ecosistema, altura del nivel freático, tipo de suelo, facilidades, disponibilidad de terreno (Eweis et al., 2000; Sellers 1999).

El desarrollo de una tecnología eficiente para el tratamiento de estos desechos, debiera incluir la recuperación del valor energético de estos residuales y su reintroducción en el proceso productivo. Es por ello que la tendencia mundial está orientada hacia la minimización en la generación de desechos, el reciclaje o reutilización y como última opción el tratamiento y disposición final (Sellers, 1999).

Dentro de las prácticas de reuso y reciclaje, se encuentran las aplicadas a lodos, utilizados en el proceso de perforación de los pozos de petróleo, debido a que casi el 10 % de éstos se reutilizan, lo que conlleva a elevar la eficiencia de esta actividad, de esta manera se minimiza la generación de desechos (Abboud, 2000).

Todas las actividades que conlleven a minimizar, reusar o reciclar materiales son más aceptadas desde el punto de vista ambiental y económico. Cuando el desecho ya no puede ser reciclado o reusado no queda otra alternativa que darle un tratamiento o disposición final. En este sentido el desarrollo de tecnologías, para el tratamiento de desechos, debe incluir la recuperación del valor energético de estos y su reintroducción en el proceso productivo. En estos casos se puede aplicar una incineración con recuperación de la energía o un biotratamiento o biorremediación para darle un reuso al material resultante como acondicionador de suelos. El estudio de la variante tecnológica más adecuada depende de las características del residuo sólido a tratar, las condiciones del sitio contaminado, así como del costo de la propuesta tecnológica realizada. (Eweis et al., 2000).

La biorremediación es una de las tecnologías que pudiera ser utilizada para tratar estos desechos, principalmente por el bajo costo de su implementación, y por la transformación de los contaminantes a compuestos como agua, CO₂ y biomasa microbiana, que no son dañinos al medio (León, Infante, Arias, Márquez, Gorrión, McMiller y Smart, 1998; EPA 1992). Además, la presencia de compuestos persistentes en suelos o matrices acuosas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos o los bifenilos policlorados, han conducido al desarrollo de varias tecnologías para incrementar la biodegradabilidad de estos contaminantes (Guíz y Kriston, 1995).

En Venezuela la biorremediación ha sido aplicada exitosamente en el tratamiento o recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, ripios de perforación con base aceite, sedimentos de fondo de fosas entre otras, usando la bioestimulación o proceso de acondicionamiento de los factores abióticos (mejoradores o agentes estructurantes, relación C/N, C/P) para favorecer el desarrollo de los microorganismos indígenas o autóctonos presentes el suelo/desecho, evitando así la adición de microorganismos exógenos al medio (Infante, 1999; Infante, 2001).

Aún cuando la biorremediación ha sido ampliamente aplicada en nuestro país, una de las desventajas es que es un proceso de limpieza lento, por lo que actualmente se investiga como mejorar el uso de los factores abióticos para contribuir a acelerar dicho proceso.

2.2 Principio de Biorremediación.

El principio básico del proceso de biorremediación consiste en la destrucción, o más propiamente dicho, la transformación de la estructura de los hidrocarburos para convertirlos en los componentes no tóxicos, como dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana, entre otros. Esto se logra mediante la acción de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) con capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y a las características del suelo en el sitio del tratamiento (Eweis *et al.*, 2000).

2.3 Tratamiento biológico de suelos contaminados con desechos orgánicos.

La biodegradación en suelo, en la capa arable, consiste en la mezcla de crudo con la capa reactiva (0-30 cm.) y el suministro de condiciones adecuadas de humedad, aireación y nutrimentos para mejorar la actividad de los microorganismos degradadores y, por ende, la velocidad del proceso (Infante, 2001).

El tratamiento biológico de suelos contaminados involucra el uso de microorganismos y/o plantas para la degradación o transformación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de modificación determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares. Los procesos biológicos se aplican frecuentemente al tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (LaGrega, Buckingham y Evans, 2001).

Los parámetros críticos a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración de contaminante, cantidad de microorganismos, concentración de nutrimentos, aireación, humedad, temperatura, pH, características del suelo, presencia de inhibidores y biodisponibilidad del contaminante (Levin y Gealt, 1998).

2.4 Parámetros a considerar en la biorremediación de contaminantes orgánicos.

Tipo de hidrocarburos. La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. No todos los compuestos se degradan con la misma facilidad (Levin y Gealt, 1998). Los compuestos de saturados y cadenas lineales son de más fácil biodegradación que compuestos de alta complejidad con anillos y cadenas ramificadas (Gibson, 1984).

Infante, Vásquez y Lippke (1999) realizaron pruebas de biodegradación con tecnologías en las que se estimulaba la acción de microorganismos autóctonos, para transformar los componentes tóxicos de los desechos orgánicos (fracciones de saturados y aromáticos) en productos inocuos como CO₂, H₂O y biomasa microbiana. En el ensayo, la tasa de biodegradación de estos componentes se expresó en términos de reducción de aceites y grasas (contenido de crudo en el suelo), la cual fue muy marcada antes de los 90 días observándose la reducción significativa de las fracciones saturadas y aromáticas. Luego a

partir de los 90 días el contenido de aceites y grasas se mantuvo constante, alcanzando las máximas tasas de estabilización del proceso. Los resultados de Infante y *Colaboradores* (1999), indicaron que a los 90 días ya se había alcanzado una alta tasa de biodegradación (>70 %). Los autores indican que este tiempo es, bastante corto comparado con los resultados obtenidos en estudios similares de biodegradación de desechos en otras latitudes (CONCAWE, 1980 citado en Infante et. al., 1999).

Infante (2001), encontró tasas de biodegradación de un crudo mediano muy eficientes comparadas con otros reportes de otras latitudes. Así por ejemplo en menos de 3 meses un 76 % de remoción de crudo por biodegradación fue obtenido en un suelo venezolano. Por el contrario en zonas templadas para un crudo mediano la tasa de biodegradación en 3 meses es menor al 60 % (Stauwer, Lewis and Philopks, 2002).

Concentración de hidrocarburos. Cuando la concentración de un contaminante es alta puede que se produzca la inhibición del desarrollo microbiano, ocasionando la disminución de su capacidad de metabolización, y por lo tanto su muerte (LaGreca *et al.*, 2001). Se han registrado, en ensayos de campo, procesos biológicos a concentraciones de hasta 30 %, medido por extracción sucesiva con solventes (Levin y Gealt, 1998). Por encima del 30 % se han observado casos donde la velocidad es muy baja pero no nula. Sin embargo las tasas de biodegradación no son eficientes a estas altas concentraciones de hidrocarburos (30 %).

En Venezuela se han realizado investigaciones en las que se ha demostrado que la concentración de crudo para que se desarrollen los microorganismos eficientemente es hasta un 10 %, como el máximo para que ocurra el proceso de biorremediación. Dicho parámetro está normado en el Decreto 2635 (1998) sobre *Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos*. Aunque este 10 % se refiere a los hidrocarburos biodegradables, pudiéndose interpretar como los compuestos de saturados y aromáticos de un crudo.

Antigüedad de la contaminación. A medida que transcurre el tiempo después de un derrame se va modificando la composición del hidrocarburo por acción de los agentes ambientales. Primero se pierden los volátiles y después se produce la eliminación de parafinas, ya sea por evaporación, por actividad fotoquímica o actividad biológica; luego se eliminan otros componentes. Como resultado de ello el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar; por lo que la velocidad de reacción disminuye a medida que transcurre el tiempo (Reineke, 2001).

Presencia de microorganismos. Los microorganismos (bacterias, hongos) son los agentes biológicos responsables de la degradación de hidrocarburos en suelos (León et al., 1998). Ellos pueden degradar hidrocarburos y otras sustancias contaminantes en forma de cultivos puros (especie única) o cultivos mixtos (varias especies en relaciones o proporciones adecuadas). Para el caso del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 10^3 a 10^4 UFC/g suelo (UFC: unidades formadoras de colonias) y de microorganismos heterótrofos totales de 10^5 a 10^6 UFC/g de suelo (Baheri y Meysami, 2002).

Existen diversos estudios acerca de la biodegradación en los que se enfoca el uso de la bioestimulación (estimulación de los microorganismos presentes en el suelo – desecho,

sin agregar inóculos) comparando la bioaumentación (preparaciones de inóculos y adición) (Leavitt y Brown, 1994), donde resulta más eficiente la bioestimulación.

Se presume la pérdida de los hidrocarburos más livianos por evaporación (componentes de 5 carbonos hasta los de 14 carbonos y luego se inicia la biodegradación como tal (Hinchee et al., 1994). Este proceso, efectuado por poblaciones naturales de microorganismos, representa uno de los mecanismos primarios por el que la contaminación con petróleo es eliminado del medio ambiente.

Según “The Biodegradative strain database” (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>), una base de datos, publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de moléculas orgánicas, se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos, entre los que se incluyen: ***Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomona***. Asimismo también gran diversidad de géneros de hongos degradadores, tales como: ***Agrocybe*, *Aspergillus*, *Candida*, *Crinipellis*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Bjerkandera*, *Fusarium*, *Kuehneromyces*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Mortierella*, *Mucor*, *Naematoloma*, *Laetiporus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Ramaria*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Syncephalastrum*, *Trametes* y *Trichoderma***.

Uno de los más importantes factores que se toman en cuenta al comparar la biorremediación con otras tecnologías para remediar, es el tiempo requerido para alcanzar el nivel de tratamiento deseado. Para ello, se recurre al suministro de aditivos, entre los que se incluyen el uso de cultivos de bacterias especializadas para incrementar la tasa de pérdida de contaminantes (proceso conocido como bioaumentación). Muchas de estas técnicas mejoradas requieren significativamente más esfuerzo y dinero para su implementación (Leavitt y Brown, 1994). Otros aditivos y más eficientes son los denominados mejoradores orgánicos o acondicionadores, que mejoran la estructura, manejabilidad, porosidad de la mezcla del desecho donde se ha de aplicar el proceso de biodegradación (Infante y Colaboradores 2001).

La tecnología de la biorremediación ha sido ampliamente efectiva en países tropicales, debido principalmente a las altas y relativamente constantes temperaturas durante el año. Es decir, las condiciones ambientales promueven la dinámica natural de las comunidades microbiológicas del suelo, favoreciendo la biodegradación de hidrocarburos. Para estimular la población microbiana, sin introducir microorganismos exógenos (bioaumentación), se acondicionan los factores abióticos “in situ” ajustando las relaciones de C/N, C/P, y adición de materiales orgánicos (agentes acondicionantes), lo que mejora las propiedades físicas de los desechos que están siendo tratados (Infante, Arias, Sánchez, León y Sánchez, 2001).

Leavitt y Brown (1994) e Infante y colaboradores (2001), obtuvieron resultados en experimentos sobre bioestimulación “in situ”, en los cuales demuestran la estimulación de poblaciones nativas de bacterias en suelos por cambios en los factores abióticos tales como nutrientes, aireación y humedad. Estos factores permiten el desarrollo de una

población microbiana degradante del hidrocarburo o lodo petrolizado sin la necesidad de adicionar cultivos biológicos que no sólo resultan ineficaces sino que también incrementan los costos de biotratamiento.

2.5 Nutrientos

Los nutrientes son compuestos necesarios para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en varios grupos: fuentes de carbono (C), fósforo (P), nitrógeno (N), potasio (P) y oligoelementos (Brook, Stiver y Zytner, 2001).

La fuente de C en nuestro caso es el contaminante, que proporciona el C necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO₂, agua, enzimas) y biomasa de microorganismos (Ercoli, Gálvez, Di Paola; Cantero; Videla; Medaura; Bauzá, 2001). El N proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas. (Kanaebel, Federle, McAvoy y Vestal, 1994). El P interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación. Dado que la utilización de este compuesto es muy rápida y en grandes cantidades, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. Este parámetro es de importancia crítica para el buen desarrollo de procesos biológicos (Casanova, 1991).

Por su parte, el K es un macronutriente utilizado como ingrediente estándar en formulaciones de fertilizantes en la agricultura. Existe en el suelo como ión K en estructuras minerales, y como ión K hidratado en la solución del suelo o adsorbido en las posiciones de intercambio, desde donde puede ser tomado por las plantas y microorganismos (Thompson y Troeh, 1982). El K es importante para muchos procesos biológicos en los microorganismos, tales como: síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y producción de energía, coadyuvando en concentraciones bajas, en comparación con las requeridas para C y N, a los procesos de biorremediación al estimular el crecimiento microbiano (Ercoli et al., 2001).

Existen varios reportes en relación a la estimulación del proceso de biodegradación de hidrocarburos con la fertilización mineral, sin embargo no se han realizado esfuerzos sistemáticos para determinar los niveles de fertilización óptima (Brook *et al.*, 2001). Una de las limitaciones de la biodegradación, es el desbalance nutricional entre el C del sustrato proveniente del hidrocarburo y los macronutrientes (NPK) requeridos para el crecimiento de los microorganismos, principalmente debido a que las reservas en el suelo de NPK generalmente son bajas (Dibble y Bartha, 1979). Para aumentar la eficiencia en el proceso de biodegradación se utiliza comúnmente la mezcla de nutrientes minerales que contiene NPK (King, Long y Sheldon, 1993 citados por Infante y González, 1995).

Generalmente se indica que los macronutrientes son indispensables en el proceso de biodegradación (Brook, Stiver y Zytner, 2001), cuyas proporciones adecuadas estimulan la presencia y desarrollo de microorganismos autóctonos en el sitio de contaminación (Infante, 2001).

Existen estudios en los que se señala la efectividad del N y el P (Diblle y Bartha, 1979; Mills y Frankenberger, 1994; Brook, Stiver y Zytner, 2001), dosificados en función de la concentración del contaminante, de acuerdo a una relación que vincula C/N:P, y que varía según los autores entre 100:10:1 a 100:2:0,2 (Infante, Vázquez y Lippke, 1999). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de las bondades del K, particularmente en nuestro país (C. Infante, Comunicación personal, abril 18, 2005).

Por ejemplo los investigadores Brook, Stiver y Zytner (2001) realizaron estudios de biodegradación de un combustible diesel en suelos, agregando varios regímenes de N. En el estudio se utilizaron como fuentes de N, el nitrato de potasio (N:P:K= 10:0:38), el nitrato de amonio (N:P:K= 35:0:0), la urea (46:0:0) y oligómeros de urea (25:0:0). Se seleccionaron dos relaciones C/N (20:1 y 40:1) identificadas en la literatura como óptimas. El P fue agregado en la forma de fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4). En el experimento se monitoreó la tasa de pérdida de fuel diesel como Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP). Las tasas de remoción de HTP para todas las fuentes de N utilizadas mostraron un incremento en la degradación del diesel, demostrándose la dependencia del aumento del proceso de la fuente de N y de la relación C/N. Para ambas relaciones de C/N evaluadas, la tasa de degradación del hidrocarburo fue más alta para los tratamientos con nitrato de amonio y urea. Sin embargo, no se evaluó el efecto del K presente en las formulaciones utilizadas.

Mills y Frankenberger (1994) evaluaron suministro de fuentes de P para incrementar la biorremediación del fuel diesel en suelos. Determinaron la efectividad del Fosfato de Potasio (K_2HPO_4), observándose un aumento de la biodegradación con la adición de de Fosfato de Potasio a concentraciones de 100 a 500 mg/Kg, sin embargo solo destacaron el efecto del P y no evaluaron la influencia del K en el proceso.

Por otro lado, en nuestro país, Infante (2001) demostró, en un estudio llevado a cabo en San Tomé en el Oriente de Venezuela, que el mejoramiento de las condiciones abióticas, entre ellas la relación C/N y C/P, disminuye significativamente los componentes saturados y aromáticos en suelos contaminados con hidrocarburos, teniendo un efecto positivo en el proceso de biodegradación.

En un estudio realizado en Nueva Jersey (USA) por Diblle y Bartha (1979), con hidrocarburos para determinar el efecto de parámetros ambientales en la biodegradación de lodos aceitosos, agregaron a muestras de suelo fertilización con N en la forma NH_4NO_3 , y el P y K en la forma K_2HPO_4 . En la investigación se controlaron las condiciones de humedad, pH, nutrientes minerales, micronutrientes y suplementos orgánicos. Se evaluaron tres tratamientos con mezclas de NPK, (tratamiento 1- C/N 300:1, C/P 4000:1 y C/K, 2000:1; tratamiento 2 C/N 60/1, C/P 800/1 y C/K, 400/1 y tratamiento 3.- C/N 15:1, C/P 200/1 y C/K, 100:1). En la determinación de los hidrocarburos residuales se confirmó que el porcentaje de biodegradación fue mayor en el nivel de fertilización intermedia con NP y K, es decir para la relación de N 60/1, P 800/1 y K en proporción 400/1. En este experimento, según los autores, el K fue un elemento que en proporción estuvo en exceso para los requerimientos microbianos. Aún así, los investigadores no determinaron el nivel óptimo para este componente en específico, sino que el estudio se enfocó en establecer las cantidades de NP adecuadas para convertir el hidrocarburo efectivamente en biomasa.

En México, el K es recomendado como uno de los parámetros que deben ser considerados para aumentar la eficiencia del proceso de composteo en el tratamiento de suelos contaminados con compuestos orgánicos (Volke y Velasco, 2003), en un rango óptimo comprendido entre las relaciones C/K 100 a 1000, sin embargo, no especifican una dosis precisa para este elemento.

En otro trabajo de investigación, realizado en Cuba por Álvarez, Novoa, Romero, Núñez, Díaz, Millar, López, López Escobar, Laffita, y Sánchez (2007), utilizaron lodos residuales provenientes de operaciones de extracción y perforación petrolera, como fuente de los nutrimentos esenciales N, P y K, para estimular el crecimiento microbiano. No obstante, sólo determinaron los contenidos de N y P total, y no el K ni su efecto en la biorremediación.

Según la EPA (1999a), el K es frecuentemente recomendado y utilizado para aumentar la eficiencia del proceso de biodegradación en zonas templadas. Por el contrario en los trópicos, y específicamente en nuestro país, muy poco se conoce al respecto y, aunque se aplique, no existe una data que confirme su efectividad en el incremento de la velocidad de la biorremediación ni la cantidad óptima recomendable para el proceso (Infante, 1999; 2001). Siendo la fertilización uno de los elementos claves en la biorremediación, se requiere entonces conocer el adecuado balance de N, P y K.

Por lo tanto, resulta interesante conocer los aspectos relacionados con el suministro de K sobre la biodegradación de contaminantes orgánicos, y su efecto en el incremento de la eficiencia de esta tecnología ambiental. La investigación que se conduzca al respecto, podría contribuir a indicar el efecto de la incorporación de este macronutriente en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos o si por el contrario no es necesario en nuestras condiciones tropicales, en base a los análisis técnicos económicos pertinentes (Infante, 1999; Infante, 2001).

3 Problema de investigación

La mayoría de los procesos de biodegradación aplicados en el saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos en nuestro país utilizan generalmente como elementos estimulantes y aceleradores del proceso al Nitrógeno (N) y al Fósforo (P), no obstante no utilizan el Potasio (K) como fuente mineral, por lo que no existe documentación científica y técnica que indique el grado de efectividad y la dosis óptima de este elemento para la biorremediación.

En este sentido resulta de mucha importancia conocer los aspectos relacionados con el suministro de K sobre la biodegradación de contaminantes orgánicos, pues esto podría incrementar la eficiencia de esta tecnología ambiental e incidir probablemente en la disminución de los costos operativos y técnicas usadas comúnmente para estimular la biorremediación.

Existe la necesidad de conducir investigaciones al respecto que permitan probar potenciales incrementos de las tasas de biodegradación de compuestos orgánicos o hidrocarburos por medio de la incorporación de distintas dosis de K; o por el contrario, contribuir a dilucidar si no es necesaria la utilización del nutrimento en nuestras condiciones tropicales para el mejoramiento del proceso (Infante, 1999; Infante, 2001).

Esta investigación pudiera contribuir a determinar cuál de las relación para suministro del macronutrimento K, es más efectiva como elemento acelerador de los procesos de biodegradación de hidrocarburos, por otro lado evaluar la posible influencia de las relaciones de NP, reportada en la literatura como efectivas, en combinación con las relaciones de K propuestas en el presente ensayo en el proceso de biodegradación de un crudo mediano, de la serie Mesa producido en el Oriente de Venezuela.

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del Potasio (K) sobre la biodegradación de un crudo mediano en un suelo franco.

3.2 Hipótesis planteada.

Existe un nivel del nutrimento Potasio (K) que puede tener un efecto positivo en la biodegradación de hidrocarburos de un crudo mediano en suelos.

4 Materiales y métodos.

4.1 Ubicación del ensayo.

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Química Ambiental del Departamento de Química de la Universidad Simón Bolívar, ubicado en Sartenejas Municipio Baruta, estado Miranda.

4.2 Duración del ensayo.

El ensayo tuvo una duración total de 60 días, siendo los tiempos de muestreo para evaluar la cinética de biodegradación a los 0, 15, 45 y 60 días, mientras que para la producción de CO₂ se realizaron mediciones semanales durante dos meses, tal como se detalla en los puntos 4.6.2 y 4.6.3.

4.3 Características del suelo y crudo utilizados en el ensayo.

La investigación se realizó utilizando un suelo de textura franca proveniente de una zona de Los Teques, estado Miranda, con características típicas que favorecen la ocurrencia de procesos de biodegradación. Este suelo ha sido usado en otros ensayos realizados en el país para evaluar la biodegradación de diferentes crudos venezolanos sobre un sustrato base (León et al., 1998). Las propiedades fisicoquímicas del suelo se detallan en los resultados de la caracterización (Tablas 7 y 8)

El crudo empleado en este experimento fue suministrado por Petróleos de Venezuela Sociedad Anónima (PDVSA), a través de su filial INTEVEP, el mismo pertenece a la serie Mesa, producido en el Oriente del país, clasificado como mediano, de acuerdo a su gravedad específica de 29,4 grados API.

El crudo Mesa presenta una baja proporción de asfáltenos (2,5 % p/p), una viscosidad cinemática a 100 °C de 11,21 y un bajo punto de inflamabilidad, además contiene un alto porcentaje de parafinas (33,6 %), isoparafinas (37,00 %) y de naftas (superior al 23%), características que lo hacen volátil y biodegradable. Las características generales del crudo se muestran en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Características del crudo Mesa usado en el experimento.

Propiedad	Medida	Unidad
Gravedad API a 60 °F	29,4	
Gravedad específica 15/4 °C	0,8762	
Viscosidad cinemática a 100 °F	8,25	cSt
Viscosidad cinemática a 122 °F	6,33	cSt
Contenido de sales	7,2	lb/MBIs
Azufre	1,08	% p/p
Presión de vapor	5,42	psi
H ₂ S existente	< 1	ppm
Contenido de cera	5,26	% p/p
Factor de caracterización UOP K	11, 9	
Cloruros inorgánicos	6,26	ppm
Asfáltenos	2,15	% p/p
Residuos de carbono	5,2	% p/p
Cenizas	0,024	% p/p
Vanadio	53	ppm
Aluminio	< 8	ppm
Níquel	9	ppm

Fuente: PDVSA, Manufactura y Mercadeo, 2006.

Tabla 2.- Fracciones del crudo Mesa, destilado entre 20- 100 °C

Parafinas –PNA (% vol)	33,6
ISO Parafinas – PNA (% vol)	37,0
NAFTENOS – PNA (% vol)	23,2
AROMÁTICOS – PNA (% vol)	6,2

Fuente: PDVSA, Manufactura y Mercadeo, 2006.

Tabla 3.- Fracciones del crudo Mesa, destilado entre 200-250 °C

Aromáticos (HPLC) % en peso	29,0
Aromáticos – FIA % vol	21,5
Saturados – FIA % vol	77,6
Olefinas – FIA % vol	0,9

Fuente: PDVSA, Manufactura y Mercadeo, 2006

4.4 Preparación de los composteros utilizados en el ensayo.

Para evaluar el proceso de biodegradación, se usó la técnica del compostero, ampliamente recomendada en estos tipos de ensayos (León et al., 1998, Infante 2001).

El suelo utilizado en el ensayo fue cernido a través de un tamiz de 2 mm de diámetro, hasta obtener una granulometría uniforme (En la Fig. 1 se muestra el aspecto del suelo tamizado). Este fue acondicionado con agentes estructurantes (hojarasca) para aumentar porosidad y favorecer la aireación, y mejorar la estructura y la manejabilidad del

compostero. En todos los tratamientos se usó una relación de 3 % (V/V) de hojarasca, citada en la literatura como adecuada (Infante, 2001). La hojarasca utilizada estuvo conformada principalmente por restos vegetales secos de especies de las familias Fabáceas, Bignoniáceas y Gramíneas. Este material fue finamente molido hasta obtener un tamaño de partículas que osciló entre 2 y 3 mm, que luego fue mezclado homogéneamente con el suelo tamizado. Esta mezcla se colocó en envases de 40 cm de largo, por 25 cm de ancho y 15 cm de altura, a razón de 2 Kg. de mezcla de suelo y agentes acondicionantes por compostero (ver Fig.2).



Figura 1. Aspecto del suelo tamizado antes de mezclarlo con la hojarasca y el crudo.

Seguidamente se procedió a mezclar manualmente, la cantidad de 160 ml del crudo Mesa por compostero, para lograr la concentración requerida de 7 % (p/p) en cada unidad experimental. Para reducir el error asociado con la heterogeneidad, la mezcla suelo tamizado-hojasca y el crudo fueron mezclados vigorosamente después de su aplicación, no obstante fue relativamente fácil homogeneizar la mezcla suelo/crudo dadas las características de fluidez del crudo.

Los composteros fueron aireados con un rastrillo manual de manera uniforme, 2 veces por semana, simulando los pases de una rastra en un suelo normal, con la finalidad de facilitar el intercambio de oxígeno atmosférico con el suelo y mantener el proceso en condiciones aeróbicas, ya que el proceso de biodegradación de los hidrocarburos es aeróbico fundamentalmente (Gibson, 1984).

En la Tabla 4 se presenta un resumen de las cantidades de suelo y crudo utilizados en la preparación de cada compostero.

Tabla 4. Resumen de las cantidades de suelo y crudo usadas en el ensayo.

Descripción	Cantidad	unidad
Masa de suelo + hojarasca	2	kg
Volumen de suelo afectado	0,00143	m ³
Concentración de crudo	7	% p/p
Densidad crudo	0,87	g/cm ³
Peso del crudo usado	0,14	kg
Volumen del crudo usado	160,00	cm ³ = ml
Peso Carbono en el crudo	112,00	g

Los fertilizantes empleados en el ensayo para suministrar N, P y K y sus proporciones se muestran en la Tabla 5. Se utilizaron fertilizantes comerciales, de uso común en los procesos de biorremediación en el país, y no de grado analítico de laboratorio, con el fin de reproducir las condiciones de aplicación de campo.

Para los cálculos de las cantidades específicas de cada nutrimento, se tomó en cuenta la composición del fertilizante, es decir si se trató de un fertilizante nitrogenado, se revisó si existía algún aporte de fósforo o de potasio; en todo caso se cumplió con las relaciones C/N C/P y C/K establecidas y requeridas en el presente ensayo.

Se utilizó Úrea (CO(NH₂)₂), como fuente de N, el fertilizante Fosfato de Amonio (NH₄H₂PO₄), como fuente de P y N, mientras que, para el suministro de K se usó Cloruro de Potasio.

Tabla 5. Dosis de fertilizantes y fuentes NPK utilizadas en el ensayo.

Dosis	Fuentes de NPK utilizadas.
T1 Control abiótico	Sin fertilizantes Cloruro de Mercurio (HgCl ₂)
T2 (NPK = 0)	Sin fertilizantes
T3 N (C/N 60/1)+ P (C/P 800/1) + K (C/K 200/1)	Fosfato de Amonio (NH ₄ H ₂ PO ₄)
	Cloruro de potasio (KCl)
	Úrea (CO(NH ₂) ₂) (46 % N)
T4 N (C/N 60/1)+ P (C/P 800/1) + K (C/K 400/1)	Fosfato de Amonio (NH ₄ H ₂ PO ₄)
	Cloruro de potasio (KCl)
	Úrea(CO(NH ₂) ₂) (46 %N)
T5 N (C/N 60/1)+ P (C/P 800/1) + K (C/K 600/1)	Fosfato de Amonio NH ₄ H ₂ PO ₄
	Cloruro de potasio(KCl)
	Úrea (CO(NH ₂) ₂) (46 % N)
T6 (Potasio C/K, 200/1)	Cloruro de potasio (KCl)
T7 (Potasio C/K, 400/1)	Cloruro de potasio (KCl)
T8 (Potasio C/K, 600/1)	Cloruro de potasio (KCl)
T9 N (C/N 60/1+ P (C/P 800:))	Fosfato de Amonio NH ₄ H ₂ PO ₄
	Úrea (CO(NH ₂) ₂) (46 % N)

T= Tratamiento

En la Fig. 2, se muestran los composteros con la mezcla final de suelo, hojarasca, fertilizante y crudo.



Figura 2. Aspecto de los composteros preparados con la mezcla suelo, hojarasca, fertilizante y crudo, según el caso, con los diferentes tratamientos.

4.5 Diseño de la investigación:

Se instalaron nueve tratamientos con tres (3) réplicas cada uno (27 composteros en total), con un diseño similar, en cuanto a réplicas y controles, al utilizado en los estudios de laboratorio de biorremediación en suelos contaminados con lodos petrolizados, realizados por Morelli, Del Panno, De Antoni y Paincera (2005); y por León y colaboradores (1998). Los tratamientos se detallan a continuación:

1. **T1** – ($T_{\text{abiótico}}$) Control abiótico. Los microorganismos fueron eliminados utilizando Cloruro de Mercurio al 2 %. No se consideró relevante agregar fertilización a este tratamiento, dado que fundamentalmente se requería evaluar los efectos abióticos influyentes en el proceso de degradación del crudo. Éste tratamiento permitió comparar la producción de CO_2 y los cambios en la composición del crudo resultante de los procesos abióticos con los bióticos de los otros composteros (Song, Wang y Bartha, 1990; León *et al.*, 1998).
2. **T2** – ($T_{\text{sin fertilizar}}$): Control sin fertilizar. Éste tratamiento se realizó para estimar la producción de CO_2 por los microorganismos y evaluar la biodegradación natural del crudo.
3. **T3** – ($T_{\text{N+P+K1}}$): Fertilizado con K en la relación 1 (C/K, igual 200/1, para probar una dosis superior a la recomendada por Dibble y Bartha (1979)) combinado con NP en las proporciones C/N y C/P iguales a 60/1 y 800/1 respectivamente, reportadas como óptimas (Dibble y Bartha, 1979; Infante, Viale-Rigo, Salcedo, Rodríguez y Melchor, 1997; Rocha y Infante, 1997; Acosta, Infante y López, 1995). Nótese que la relación C/K:200/1 implica la adición de mayor cantidad de K, en otras palabras fue la mayor evaluada en el ensayo.
4. **T4** – ($T_{\text{N+P+K2}}$): Fertilizado con K en la relación 2 (C/K, igual 400/1, dosis recomendada por Dibble y Bartha (1979) C/K, 400/1) combinado con NP en las proporciones indicadas para **T3**.
5. **T5** – ($T_{\text{N+P+K3}}$): Fertilizado con K en la relación 3 (C/K, igual 600/1, para probar una dosis inferior a la recomendada por Dibble y Bartha (1979) combinado con NP en las proporciones indicadas para **T3**. Nótese que la relación C/K: 600/1 implica la adición de menor cantidad de K, en otras palabras es la menor evaluada en el ensayo.
6. **T6** – (T_{K1}): Fertilizado con K en la relación 1 (C/K, igual 200/1) sin NP, para probar una dosis superior a la recomendada por Dibble y Bartha (1979).
7. **T7** - (T_{K2}): Fertilizado con K en la relación 2 (C/K, igual 400/1) sin NP, recomendada por Dibble y Bartha (1979).
8. **T8** - (T_{K3}): Fertilizado con K en la relación 3 (C/K, igual 600/1) sin NP para probar una dosis inferior a la recomendada por Dibble y Bartha (1979).
9. **T9** - T ($T_{\text{P+N}}$): Fertilizado con NP (C/N y C/P iguales a 60/1 y 800/1 respectivamente) reportadas en la literatura como óptimas.

4.6 Técnicas y herramientas utilizadas en el ensayo

Los composteros se mantuvieron a 30-40 % de humedad, capacidad de la campo del suelo, siendo regado dos veces por semana, aplicando 220 ml de agua a cada compostero, con el fin de compensar la evaporación. La temperatura en el laboratorio se mantuvo entre los 24 y 27 °C.

El experimento constó de tres etapas de toma de muestras y mediciones, que se especifican a continuación:

1. Caracterización del suelo.
2. Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540 y la efectividad de la biodegradación a través de la medición de la producción CO₂ en cada una de las unidades experimentales.
3. Evaluación de parámetros de la mezcla final suelo-crudo establecidos en el Decreto 2635 sobre “**Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos**”, (Artículo 50) y determinación cualitativa de la degradación de las fracciones del crudo Mesa.

4.6.1 Caracterización del suelo.

Se realizó una caracterización del suelo, al inicio del ensayo, con el fin de conocer sus principales propiedades físicas y químicas, las cuales deben ser tomadas en cuenta si se requiere realizar ajustes de balances de masas en suelos contaminados con crudos o desechos, una vez seleccionada la tecnología de tratamiento o disposición final a aplicar.

4.6.1.1 Análisis químicos y físicos realizados al suelo:

Los análisis fisicoquímicos se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en el Manual del Programa de Suelos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), (1989), utilizado en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar. Se realizaron los siguientes análisis:

4.6.1.1.1 Relación Adsorción de Sodio (RAS).

La RAS se midió para determinar el sodio intercambiable presente en el suelo. La misma se basa en una fórmula empírica que relaciona los contenidos de sodio (Na), calcio (Ca) y magnesio (Mg), y que expresa el porcentaje de sodio de cambio en el suelo en situación de equilibrio. Es un índice que denota la proporción relativa en la que se encuentra el Na respecto al Ca y al Mg, cationes divalentes que compiten con el Na por los lugares de intercambio del suelo. La alta concentración de Na en el suelo ocasiona la disolución de la materia orgánica, y la subsecuente deposición en la superficie del mismo. Además, es un elemento dispersante del suelo, que generalmente afecta las características físicas, reduciendo la permeabilidad (Casanova, 1991). Se define por la ecuación:

$$RAS = [Na^+] / \sqrt{\frac{Ca^{+2} + Mg^{+2}}{2}}$$

4.6.1.1.2 Determinación del pH.

El pH expresa la concentración efectiva de iones H⁺ en la solución de suelo, es un parámetro que influye en la mayoría de los procesos biológicos, afectando la absorción de elementos nutritivos esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de microorganismos, que disminuye a valores extremos de pH. La mayor o menor aprovechabilidad de nutrimentos por parte de los organismos, ocurre en el rango de pH correspondientes a suelos neutros (6.5- 7,0). Elementos como N, P, K, Ca y Mg son menos solubles cuando los suelos son más ácidos o alcalinos (Casanova, 1991). Se expresa como:

$$pH = \log \frac{1}{H^+}$$

4.6.1.1.3 Determinación de la Conductividad Eléctrica (CE).

La CE es un índice de la concentración de sales disueltas, que puede afectar el desarrollo de organismos en el suelo, la misma se expresa en mmhos/cm o en decisiemen por metro (dS/m) (ICA, 1989).

4.6.1.1.4 Determinación de la Salinidad.

Las sales disminuyen el potencial osmótico de la solución del suelo haciendo que el agua y los nutrimentos sean menos disponibles para plantas y microorganismos; otras al acumularse tienen efectos tóxicos o pueden causar desbalances nutricionales, ocasionando efectos adversos en los procesos biológicos esenciales de un suelo (Pankhurst, Yu, Hawke y Harch, 2001). Por otro lado, los cationes dominantes, Ca y Mg, causan floculación y alta permeabilidad en el suelo, factores muy limitante para el normal desarrollo de organismos en suelos y plantas (Casanova, 1991).

Con la conductividad eléctrica de suelo, se calculó la salinidad con la siguiente ecuación:

$$\text{Salinidad} = \text{CE} \times 0.64$$

4.6.1.1.5 Determinación de Cloruros (CL-).

Se determinó para conocer la cantidad de sales de cloruros en la solución de suelo y que pueden inhibir significativamente el crecimiento de los microorganismos (Casanova, 1991).

4.6.1.1.6 Determinación de Aluminio (Al) intercambiable.

La reacción del suelo se relaciona con la disponibilidad de los elementos nutritivos, y cuando ésta es ácida generalmente se asocia con altos niveles de aluminio intercambiable, el cual afecta la absorción y translocación de Ca, reduce la absorción de agua y nutrimentos, disminuye la aprovechabilidad y causa el precipitado del P, tanto del suelo como de los fertilizantes añadidos, ocasionando un efecto tóxico directo y afectando el crecimiento y desarrollo de plantas y microorganismos (Kamprath, 1967; De Rojas, 1974).

El porcentaje de Al intercambiable se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Saturación Al} = \frac{\text{Al}^{+3} \text{ Intercambiable (meq/100 g suelo)}}{\text{CIC (meq/100 g suelo)}}$$

4.6.1.1.7 Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico.

La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) define aprovechabilidad de la nutrición mineral por los organismos del suelo y plantas, dado que indica la disponibilidad de los cationes. Representa la cantidad de cationes (Al^{+3} , H^+ , K^+ , Mg^{+2} , y Ca^{+2}) retenidos de forma intercambiable a un determinado pH. Los cationes solubles son expresados en

miliequivalentes por 100 g de suelo (meq/100g a 25 C°) de los diferentes cationes intercambiables presentes en las muestras y se estiman de la siguiente manera:

$$CIC = H^+ + Al^{+3} + Na^+ + Mg^{+2} + Ca^{+2}.$$

4.6.1.1.8 Determinación de bases intercambiables.

Las constituyen los cationes básicos Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ y Na^+ , que predominan en condiciones de alcalinidad. Para un suelo en el que todos los contraiones corresponden a estas cuatro bases, se dice que está saturado. Según Casanova (1991) un suelo que tiene una baja cantidad de bases intercambiables con respecto de la CIC es un suelo desaturado y poco fértil, mientras que si la suma de las bases intercambiables es igual o casi igual a la CIC, es un suelo con gran cantidad de cationes disponibles, considerándose fértil.

4.6.1.1.9 Determinación del Porcentaje de Saturación de bases.

Se determinó para conocer la proporción de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de los cationes básicos (Ca + Mg + K + Na) en la solución de suelo. Indica si el porcentaje de saturación de bases es adecuado para lograr un buen crecimiento de organismos.

Se calculó con la siguiente expresión:

$$\% SB = \text{Bases Intercambiables} / CIC * 100$$

4.6.1.1.10 Determinación de la humedad del suelo.

La humedad controla la actividad microbiana, siendo que el agua es el componente principal del protoplasma y elemental en procesos fisiológicos de los organismos del suelo. No obstante la humedad excesiva, limita la proliferación microbiana al disminuir el suministro de oxígeno disponible. Tradicionalmente se expresa como la relación entre la masa de agua presente en una muestra y la masa de la muestra después que se ha secado hasta su peso constante.

4.6.2 Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540.

4.6.2.1 Protocolo para medir la remoción de crudo del suelo.

Como medida directa de la biodegradación, se cuantificó el contenido de crudo en las muestras de suelo/desecho a los 0, 15, 45 y 60 días, obteniendo un total de 108 mediciones en el experimento. La disminución registrada en los diferentes tiempos expresa la remoción del crudo atribuible a la biodegradación.

Las determinaciones se realizaron mediante el método de extracción Soxhlet (EPA, Method 3540, Test Methods for Evaluating Solid Waste, 1986). Este se basa en la extracción con solvente, evaporación del solvente y pesado por gravimetría. El equipo Soxhlet de extracción continua de crudo del suelo se muestra en la Fig. 3.

El principio consiste en extraer de una matriz sólida el crudo (saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos) con un agente extractante. El solvente utilizado en este estudio fue el hexano, por tratarse de un crudo mediano, mientras que para crudos o fracciones pesadas se recomienda utilizar el diclorometano. Luego el solvente es evaporado y por diferencia gravimétrica se determina el contenido de crudo presente en la muestra.



Figura 3. Equipo Soxhlet para extracción continua de crudo.

Para la preparación de las muestras, se procedió a tomar aproximadamente 15 gramos de suelo de los composteros, seguidamente se agregó Sulfato de Magnesio anhidro para eliminar residuos de agua, mezclando hasta obtener una muestra pulverizada y uniforme, la cual se dejó reposar durante 12 horas. En el Anexo A, se presenta un resumen fotográfico del proceso de extracción de crudo con el método Soxhlet

Transcurrido el tiempo, se realizó el transvase de las muestras a un dedal de papel de filtro (ver Anexo A, Fig. A1), para luego introducirlos en los tubos del equipo Soxhlet e iniciar el proceso de extracción del crudo.

En cada balón de extracción se colocaron aproximadamente 150 ml hexano grado analítico, seguidamente fueron calentados a 69 °C, temperatura de ebullición del hexano, para evaporar y condensar el solvente hasta la muestra sólida. Una vez llenado el tubo, se produjo un sifonamiento haciendo descender el líquido sobre la muestra, pasando a través de la misma (ver Fig. A2 y A3 del Anexo A).

El proceso se repitió cíclicamente, haciendo que el solvente al traspasar la muestra cambiara su color ennegrecido a menor intensidad, mientras que el solvente en el balón se tornara más oscuro. Estos cambios son indicadores de que el agente extractante retira el crudo de la muestra. Una vez que el solvente, al fluir a través de la muestra hasta el balón, era totalmente incoloro se suspendió la extracción, pues ha retirado todo el crudo (ver Fig. A4, Anexo A). El reflujo se realizó para cada muestra, durante una hora y treinta cinco minutos.

Una vez culminada la extracción del crudo de la muestra, se procedió a eliminar posibles restos de agua de la mezcla solvente–crudo, filtrándola con Sulfato de Magnesio anhidro (Fig. A5, Anexo A). La mezcla fue colocada en bandejas de aluminio e introducidas en una estufa (Fig. A6, Anexo A), a una temperatura promedio de 69 °C, hasta eliminar el solvente por evaporación, y recuperar el crudo (aceites y grasas).

Finalmente se midió el peso con una balanza analítica, para luego por cálculo gravimétrico determinar el contenido de crudo remanente. Los cálculos de las cantidades de crudo se hicieron en base a peso seco, para lo cual se midió el porcentaje de humedad. Para determinar el de peso seco, se procedió a pesar 10 gramos de suelo por cada muestra, para luego secarla en una estufa por 24 horas a 100 °C.

En la Fig. 4, se presenta un diagrama del proceso de extracción y determinación de la cantidad crudo presente en las muestras de suelo, incluyendo la estimación del peso seco del suelo.

Proceso de extracción del crudo de las muestras de suelo.

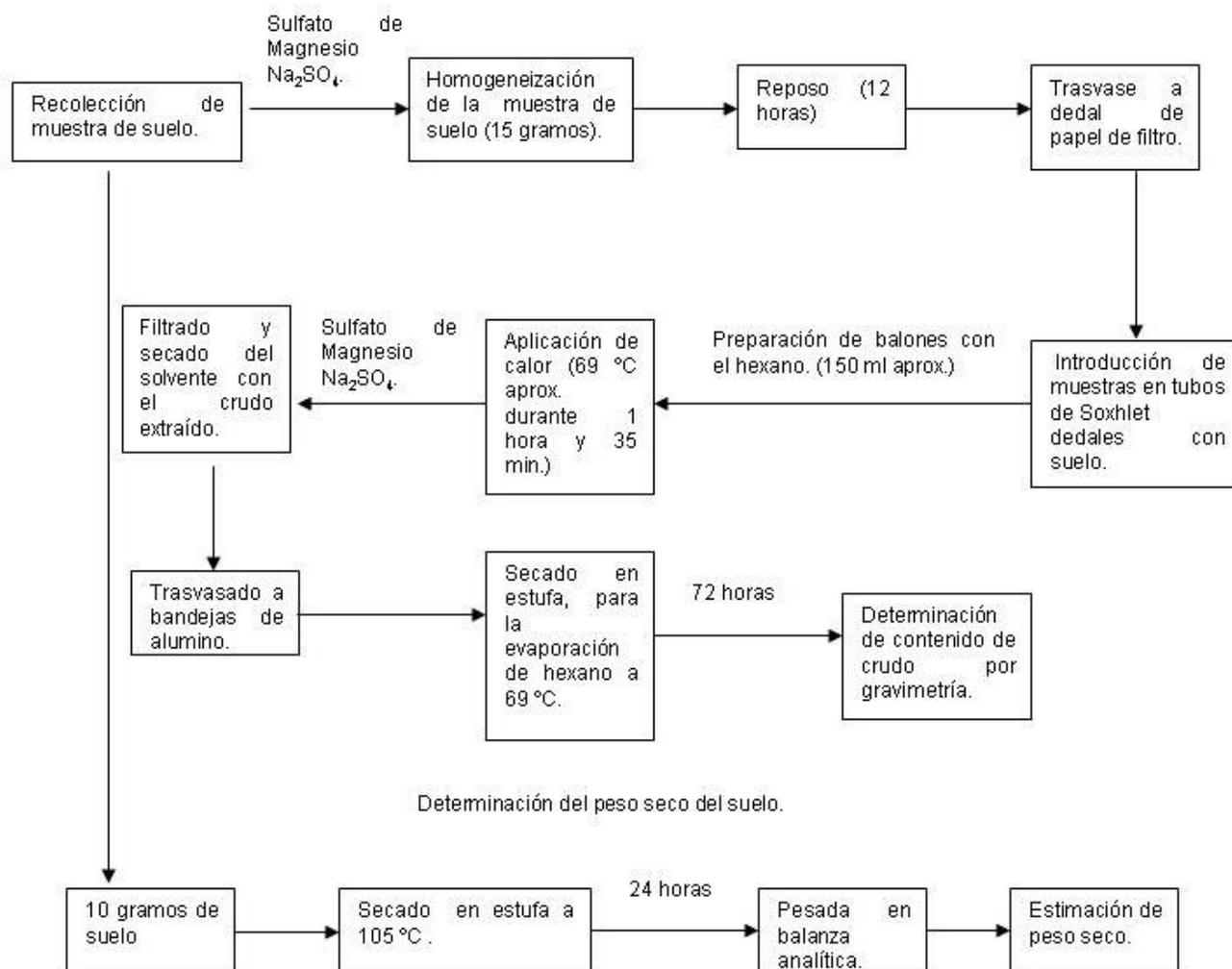


Figura 4. Diagrama del proceso de extracción y determinación de la cantidad de crudo en muestras de suelo.

4.6.2.2 Verificación de recuperación efectiva del solvente.

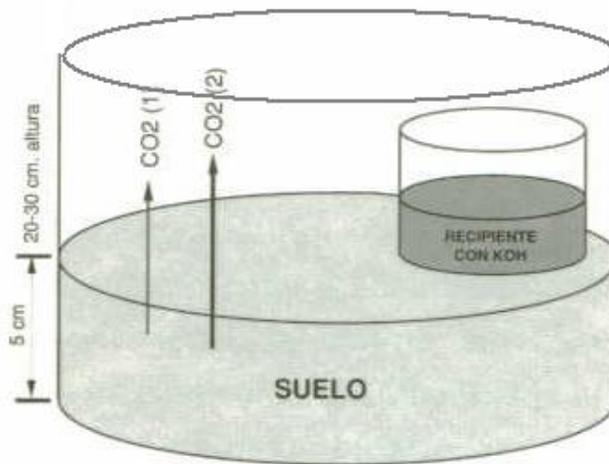
Esta prueba se realizó para verificar la eficiencia en la recuperación de crudo con el solvente (hexano) utilizado en el ensayo

El procedimiento consistió en colocar 1,05 g de crudo, cantidad estimada contenida en los 15 g utilizados para cada de las muestras evaluadas de la mezcla suelo crudo, según lo indicado en el punto 4.6.2.1 Se procedió a introducir la mezcla en el equipo de extracción Soxhlet, durante una hora y 35 minutos, para luego evaporar el solvente en la estufa durante 72 horas, y finalmente a pesarlo por gravimetría para obtener el porcentaje de recuperación efectiva.

4.6.3 Protocolo de medición del Dióxido de Carbono (CO₂).

La efectividad de la biodegradación se determinó a través de la medición de la producción CO₂ llevada a cabo por los microorganismos, como un indicador indirecto de la biodegradación, dado que en los procesos de biotratamiento de desechos y biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, se genera CO₂ y H₂O como productos de la mineralización del carbono del petróleo. Esta medida es un indicador muy efectivo que puede ser correlacionado con la remoción de los aceites y grasas (crudo) y con la disminución de lo saturados y aromáticos (Infante y González, 1993).

En la Figura 5, se aprecia un respirómetro usado para determinaciones del CO₂ producido por la actividad microbiana del suelo.



CO₂ (1) producido por biodegradación de la materia orgánica del suelo.

CO₂ (2) producido por biodegradación del lodo petrolizado.

Figura 5. Respirómetro de campo para la determinación del CO₂, (Fuente: Infante y González, 1995)

Los respirómetros utilizados en el presente ensayo se construyeron con materiales que permitieron la adaptación a las condiciones de los composteros. Las cámaras de retención de CO₂, fueron envases plásticos de aproximadamente tres litros de capacidad. Para la medición se procedió a instalar un recipiente de vidrio de 5 de cm diámetro por 5,5 cm de ancho, con 25 ml de Hidróxido de Potasio (KOH, 0.1 N) en cada compostero, cubriéndolo rápidamente con la cámara invertida para evitar el intercambio de aire con la solución, tal como se aprecia en la Fig. 6.



Figura 6. Cámaras invertidas (respirómetros) para la retención de CO₂

Este dispositivo permaneció por espacio de 18 horas, tiempo en el cual el CO₂ desprendido por la actividad biológica es adsorbido por el KOH, para posteriormente ser valorado con una solución de Acido Clorhídrico (HCl, 0.1 N). La diferencia entre esta valoración y la obtenida de un blanco, permitió conocer los miligramos de CO₂ producidos por m² por hora, mediante la siguiente ecuación (Viale e Infante, 1997):

$$\text{mg CO}_2 = (\text{B} - \text{V}) * \text{N} * \text{Z}$$

Donde:

B= Volumen de HCl gastados en la neutralización del blanco (KOH 0,1 N)

V= Volumen de HCl gastados en la titulación del KOH

N= Normalidad del ácido

Z= Peso miliequivalente del CO₂ = PM/2

Este principio se basa en que el KOH absorbe CO₂ del aire para producir carbonato de potasio (CO₃K₂) y agua. La respirometría se fundamenta en que la velocidad de degradación de un compuesto, como los hidrocarburos, puede seguirse continuamente por la cuantificación del CO₂ producido y/o el O₂ consumido (respirometría). La cantidad de CO₂ producido en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono, es una medida directa de su mineralización (Starnecker y Menner, 1996).

Los muestreos para esta medición, 243 en total, se realizaron semanalmente durante los 60 días de duración del experimento, tal como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6.- Fechas de las mediciones de las respirómetros.

Nº	Fecha de muestreo
1	04 de marzo de 2006
2	11 de marzo de 2006
3	18 de marzo de 2006
4	25 de marzo de 2006
5	01 de abril de 2006
6	08 de abril de 2006
7	15 de abril de 2006
8	22 de abril de 2006
9	29 de abril de 2006

4.6.4 Determinación de los parámetros establecidos en el Decreto 2635 en la mezcla final suelo-crudo.

Los análisis químicos se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en el Manual del Programa de suelos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), (1989), utilizado en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar. Los parámetros que se determinaron fueron los siguientes:

1. Determinación de la Relación de Adsorción de Sodio (RAS).
2. Determinación de pH.
3. Determinación de la Conductividad eléctrica (CE).
4. Determinación de la salinidad.
5. Determinación de Cloruros.
6. Determinación de Aluminio Intercambiable.
7. Determinación de Bases Intercambiables (Ca, Mg, K, Na)
8. Determinación de la CIC.
9. Determinación del Porcentaje de Saturación de Bases (%SB).

La determinación de aceites y grasas se realizó a partir de las cantidades de crudo extraídas con el método Soxhlet, para lo cual se estimó el porcentaje en peso, como se indicó anteriormente en el punto 4.6.2.1

4.6.5 Determinación mediante análisis cromatográfico de fracciones remanentes del crudo Mesa.

Los componentes del petróleo son generalmente agrupados en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad en solventes orgánicos: saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos. Las parafinas de cadenas cortas, son los sustratos del crudo más fáciles y rápidos de biodegradar, dado que son los compuestos con los enlaces más débiles, y por lo tanto más ricos en energía e inestables cinéticamente, seguidos en orden descendiente por las parafinas de cadena larga, isoparafinas, cicloparafinas, aromáticos, heterocíclicos, resinas y asfáltenos (Ercolli et al., 2001). Los compuestos polares y los asfáltenos, son generalmente considerados resistentes o recalcitrantes a los procesos de biodegradación, debido a que poseen enlaces más fuertes y requieren mayor energía para romperlos (Ercolli et al., 2001; Kaplan et al., 1996).

La cromatografía es una herramienta que permite describir cualitativamente la distribución de los hidrocarburos y el grado de degradación del crudo en suelos contaminados. Por lo tanto, la comparación entre los cromatogramas de crudo no degradado y degradado, puede revelar la distribución de hidrocarburos remanentes y la efectividad del proceso de degradación atribuible a la volatilización, la solubilización y/o la degradación biológica experimentada por el crudo en el tiempo (Rodgers, Blumer, Freitas, y Marshall, 2000).

4.6.5.1 Procedimientos utilizados para la determinación cualitativa de las fracciones remanentes del crudo Mesa con el uso de cromatografía.

En el presente experimento se realizaron análisis cromatográficos cualitativos de la distribución de hidrocarburos en las fracciones del crudo Mesa presentes en el suelo de

algunos tratamientos seleccionados, con el fin de determinar la efectividad de la biodegradación por familia de hidrocarburos, es decir, cuáles fracciones desaparecieron y cuáles persisten luego de los 60 días de ensayo.

Para la preparación del extracto se tomó una muestra de 25 gramos de la mezcla suelo-crudo de los composteros de los tratamientos, para posteriormente realizar una extracción con Soxhlet, siguiendo el procedimiento descrito en Método USEPA 3540 (Method 3540c Soxhlet Extraction, Diciembre 1996). La limpieza (clean-up) de la muestra se hizo a través del Método USEPA 3630C (Method 3630c Silica Gel Cleanup, Diciembre, 1996).

Las corridas cromatográficas de los extractos del crudo Mesa obtenidas luego del clean-up, se realizaron con el procedimiento establecido en el Método USEPA 8015 (Method 8015B Nonhalogenated Organics Using GC/FID, Diciembre 1996), que se basa de la cromatografía de gases con detección de ionización a la llama / Caracterización GC-FID.

Se utilizó un cromatógrafo HP5890, provisto de un inyector capilar y un detector de ionización a la llama (Hewlett-Packard, Delaware-USA). Se empleó una columna de 30 metros de longitud, 0,30 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria (polimetilsilicona HP-1 Hewlett-Packard, Delaware-USA). Como gas portador se utilizó nitrógeno, con una presión de 15 psig en la cabeza de la columna.

Se inyectó 1 mL de muestra en modo split (con división de flujos) con una relación de split de 100:1. El inyector se mantuvo a una temperatura de 300°C, el detector a una temperatura de 320°C, y el horno se programó de 50°C, manteniéndose durante 5 minutos, hasta 300°C a una velocidad de 5°C/min. Los cromatogramas se adquirieron con un sistema Xagasoftware v 3.1 (Xagasoftware, Caracas-Venezuela)

4.6.6 Diseño experimental y análisis estadístico.

La obtención de los datos en el presente estudio se hizo a través de un Diseño Completamente Aleatorizado, con nueve (tratamientos) y tres réplicas por tratamiento, cumpliendo con los principios básicos de diseños de experimentos, de reproducción (repetición del experimento), aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y control local para lograr una estimación válida del error experimental (Ferrán, 2003).

Las variables medidas para todos los tratamientos fueron la cantidad de crudo en el suelo para conocer la cinética de remoción y la producción de CO₂ durante 60 días de ensayo. Los tratamientos se especifican en el punto 4.5 y corresponden a:

Tratamientos	
T1	Control Abiótico
T2	Sólo crudo sin fertilizar
T3	N+P+K1 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 200/1)
T4	N+P+K2 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 400/1)
T5	N+P+K3 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 600/1)
T6	K1 C/K, 200/1)
T7	K2 C/K, 400/1)
T8	K3 C/K, 600/1)
T9	P+N (C/N 60/1, C/P 800/1)

El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un análisis de varianza de una vía de clasificación y las comparaciones múltiples se realizaron por medio de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5%, con el fin de determinar el efecto de las distintas dosis de suministro de potasio en el proceso de biodegradación de un crudo mediano. Los resultados fueron analizados mediante el uso del software Statistix versión 8.0. A los datos previamente se les comprobó los supuestos del análisis de varianza. Este análisis permitió comprobar que los resultados obtenidos cumplen con los supuestos de normalidad de los errores, de homogeneidad de varianza de los errores, de aditividad de los efectos del modelo y la independencia de los errores se logró con la aleatorización de los tratamientos.

El modelo lineal aditivo empleado para este experimento fue:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, \dots, t \\ j = 1, \dots, r \end{array}$$

Donde:

y_{ij} : Observación j -ésima del i -ésimo tratamiento.

μ : Media general.

τ_i : Efecto del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} : Error experimental de la j -ésima observación en el i -ésimo tratamiento.

La interacción de los tratamientos con el tiempo fue evaluada estadísticamente por la prueba de análisis multivariado para datos cuantitativos de Willk-Lamda, validando la correlación entre estas dos variables (Tiempo vs. Porcentaje de crudo biodegradado, Tiempo vs. Producción de CO₂) para este análisis se uso el Sistema SAS versión 9.0.

5 Resultados y Discusión.

5.1 Caracterización del suelo.

5.1.1 Análisis fisicoquímicos del suelo.

En la Tabla 7, se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en el laboratorio para la caracterización del suelo utilizado en el experimento.

Tabla 7.-Características fisicoquímicas del suelo utilizado en el ensayo.

Parámetro	Medida	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS)	0,093	mmhos/cm
Bases Intercambiables	16,57	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	17	meq/100 g
Porcentaje de Saturación de Bases (%SB)	> 90	%
Humedad del Suelo	15	%
Salinidad	0,813	mmhos / cm
pH	7,27	
Conductividad Eléctrica	1,27	mmhos / cm
Cloruros	15	ppm
Mg	0,32	meq /100g
Na	0,10	meq /100g
Fe	68	ppm
Cu	0,9	ppm
Zn	2,7	ppm
Mn	6,4	ppm

En la Tabla 8 se muestran algunas características del suelo utilizado en el presente experimento, tomadas del estudio de León et al., (1998), quienes realizaron una investigación de biodegradabilidad con el mismo sustrato.

Tabla 8.- Características fisicoquímicas del suelo utilizado en el ensayo (tomadas de León et al., 1998)

Parámetro	Medida	Unidad
Textura	Franca	
Carbono Orgánico	1,6	%
Nitrógeno Total	0,39	%
P disponible	865	ppm
Calcio	2,00	meq /100g
Potasio	0,29	meq /100g

Los valores observados en las Tablas 7 y 8, demuestran que el suelo ensayado no presenta limitantes químicas ni físicas para el desarrollo de procesos de biodegradación, por lo cual puede considerarse un suelo adecuado para realizar este tipo de estudios (León et al., 1998).

El pH presentó un valor de 7,2, por lo que el suelo se clasifica como ligeramente alcalino según Casanova (1991). Este valor, según la literatura, se encuentra dentro del rango de pH recomendado (5 hasta 9), para una adecuada biodegradación de hidrocarburos en suelos (Dragun, 1988; Von Fahnstock, Wickramanayake, Michael y Dratzke, 1998). La mayoría de las bacterias heterótrofas se desarrollan óptimamente en pH cercanos a la neutralidad, por lo que valores extremos en el medio afectan de manera negativa a las comunidades microbianas inhibiendo su capacidad para degradar hidrocarburos (Leavy y Colwell, 1990).

Los valores de conductividad eléctrica (1,27 mmhos/cm), salinidad (0,10 mmhos/cm) y Relación de Adsorción de Sodio (0,09 mmhos/cm) presentes en el suelo evaluado, demuestran la ausencia de problemas asociados a la salinidad, que pudieran inhibir la actividad microbiana, y en consecuencia la biodegradación (Volke y Velasco, 2003)

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) presenta un valor normal para el suelo franco utilizado (Casanova, 1991). La CIC es la capacidad del suelo de retener e intercambiar diferentes elementos minerales. La misma depende de la textura del suelo y del contenido de materia orgánica. En general, en la mayoría de los suelos la CIC aumenta cuando se presentan incrementos en el pH.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) sirve además como base en el cálculo del porcentaje de saturación de bases, que es un dato ampliamente usado en los estudios de fertilidad de suelos. En este suelo, el porcentaje de saturación de bases es superior al 90%, lo que indica que es adecuado, principalmente por las proporciones en las cuales se encuentran el Ca (66%), el Mg (11%), el K (9%) y el Na (3%) en los sitios de intercambio, características deseables para el normal desarrollo de vida (Casanova, 1991).

La textura franca del suelo, le confiere una adecuada friabilidad, permeabilidad, conductividad hidráulica, aireación (espacio poroso) y buen drenaje, características que favorecen los procesos de biodegradación (Jury, 1989). La lixiviación en este tipo de suelo, tiene una velocidad moderada, que incide en una mayor capacidad de retener los contaminantes y prevenir su alcance a aguas subterráneas (Testa, 1994).

Igualmente, el buen drenaje presente en este suelo y la apropiada porción de agua disponible para los microorganismos, benefician los procesos de biodegradación (Leyva e Iturbe, 2001), asimismo, el adecuado drenaje interno favorece la oxidación de los hidrocarburos (Gutiérrez y Zavala, 2002)

Por otro lado, la utilización de hojarasca contribuyó notablemente a mejorar la estructura y la aireación del suelo. Generalmente, la adición de agentes orgánicos tales como: hojarasca de diferentes especies vegetales, aserrín, suelos con alto contenido de materia orgánica, desechos agroindustriales, melaza, cáscara de arroz y algodón, entre otros, mejoran la biodegradación de desechos petrolizados al proporcionar una mejor calidad nutricional, textura y porosidad en la mezcla suelo- desecho, permitiendo un mayor y mejor contacto microorganismo-contaminante (Devine, 1994; Infante et al.,2001; Peramaki y Blomker, 1991). Este acondicionamiento es recomendable para sitios contaminados con hidrocarburos, a los cuales se les puede ajustar con un 3-15% de material vegetal (verde o seca), dependiendo de la calidad del suelo, de su textura, estructura, clima, y cantidad de materia orgánica existente (Infante et al.,2001).

Por otro lado, es probable que al agregar la materia vegetal verde, se propicie el desarrollo de consorcios bacterianos específicos que contribuyan con el proceso de su descomposición, en tanto que si la materia vegetal ya está seca, se desarrollan otros complejos microbianos dado que la materia orgánica se hace más disponible (Devine, 1994; Infante et al., 2001; Peramaki y Blomker, 1991).

En general, las propiedades del suelo tales como pH, textura y materia orgánica juegan un importante papel en los procesos de adsorción de contaminantes (Ercoli, 1998). Por lo tanto, el suelo evaluado reúne condiciones que favorecen la actividad biológica, es decir la baja salinidad, buena capacidad de intercambio iónico, rango óptimo de pH, textura franca, aireación y humedad adecuada, que conjuntamente con la adición de hojarasca, fueron factores claves que favorecieron el proceso de biodegradación

5.2 Cinética de remoción de crudo.

5.2.1 Determinación de remoción de crudo mediante la técnica de extracción Soxhlet 3540.

Los resultados de las cantidades promedios de crudo extraídas para todos los tratamientos en los cuatro tiempos evaluados (0, 15, 45 y 60 días), se presentan en la Tabla 9.

Inicialmente la cantidad de crudo suministrada a cada compostero fue de 0,07 g de crudo/g de suelo (7 % p/p), en tanto que las cantidades reales extraídas de crudo de los tratamientos estuvieron comprendidas entre 0,034 y 0,041 g de crudo/g de suelo, representando el 3 a 4% p/p aproximadamente. Con base a estos resultados, se tomaron éstos últimos valores como punto de partida para la evaluación de la cinética de remoción de crudo.

La diferencia encontrada entre la cantidad de crudo agregada y la extraída inicialmente puede atribuirse a pérdidas de las fracciones de hidrocarburos, principalmente de los compuestos volátiles, debido a que, como se mencionó anteriormente, el crudo Mesa está formado mayormente por fracciones parafinadas (alcanos lineales y náftenos) degradables fácilmente y en corto tiempo. Esto fue confirmado por medio de una prueba realizada en el laboratorio, cuyo procedimiento se detalla en el punto 4.6.2.2, la cual arrojó un porcentaje efectivo de recuperación con hexano, en el orden promedio del 56,9 %, por lo que se presume un 43 % de pérdidas asociadas a volatilización del crudo. Algunos estudios han demostrado que los cambios más rápidos en la degradación de los hidrocarburos, tipo Mesa, corresponden a la volatilización y a la solubilización, principalmente en las fracciones comprendidas en el rango de C₆ a C₁₆ (Rodgers et al., 2000; McCarthy, Uhler y Stout, 1998).

En la Tabla 9, se muestran los promedios de las cantidades de crudo extraídas en el tiempo (para tres réplicas por tratamiento evaluado), expresados en peso de suelo seco (g de crudo/ g de suelo seco). Asimismo se indican los porcentajes de crudo extraído de los tratamientos, en base al 7 % de crudo suministrado inicialmente a cada compostero.

Igualmente se observa en la Tabla 9, que en la primera (0 días) extracción de crudo, realizada con el método Soxhlet, los porcentajes de extracción variaron entre 48 y 57,8 %, con un promedio de 52% para los tratamientos evaluados. Esto significa que hubo de un 5 a 10 % aproximadamente, de crudo residual, es decir adherido a las partículas de suelo de manera estable y que no pudo ser removido o extraído con el procedimiento (Soxhlet) ni por el solvente orgánico utilizado para tal fin (Velásquez e Iniestra, 1998). Estos residuos pudieron formar interacciones de tipo covalente, por adsorción o por inmovilización en la matriz del suelo (Weller, Simon, Pfortner, Dosch, Niessner, 1998).

Tabla 9. Contenido promedio y porcentajes de crudo Mesa extraído en el tiempo para cada tratamiento.

Tratamientos		0 días		15 días		45 días		60 días	
		g*	%**	g*	%**	g*	%**	g*	%**
T1	Control Abiótico	0,03407	48,67	0,03142	44,89	0,02757	39,39	0,02606	37,23
T2	Sólo crudo sin fertilizar	0,04048	57,83	0,02794	39,91	0,01228	17,54	0,01121	16,01
T3	N+P+K1 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 200/1)	0,03032	43,31	0,02334	33,34	0,01303	18,61	0,00223	3,19
T4	N+P+K2 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 400/1)	0,03923	56,04	0,02934	41,91	0,00547	7,81	0,00143	2,04
T5	N+P+K3 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 600/1)	0,03917	55,96	0,0267	38,14	0,0083	11,86	0,00231	3,30
T6	K1 C/K, 200/1)	0,03356	47,94	0,02658	37,97	0,01208	17,26	0,00619	8,84
T7	K2 C/K, 400/1)	0,03545	50,64	0,02903	41,47	0,00843	12,04	0,00519	7,41
T8	K3 C/K, 600/1)	0,03719	53,13	0,02711	38,73	0,00748	10,69	0,00628	8,97
T9	P+N (C/N 60/1, C/P 800/1)	0,03817	54,53	0,02702	38,60	0,00956	13,66	0,00609	8,70

* g crudo/ g suelo seco

** Porcentaje de crudo extraído.

En la Tabla 10, se indican los valores correspondientes a los porcentajes promedios de crudo removido (degradado), que expresan la disminución de las cantidades de crudo Mesa en el tiempo, atribuibles a pérdidas bióticas y abióticas. En el Anexo B, se presentan los datos originales obtenidos sin promediar, con las cantidades de crudo removido a través del método Soxhlet, en los tratamientos evaluados, con sus respectivos porcentajes de degradación. En el Anexo C, se indican los valores promedios y el cálculo de las desviaciones estándares, para las mediciones independientes de los porcentajes de degradación.

Tabla 10. Promedios de los porcentajes de crudo Mesa removido en los tiempos evaluados.

Tratamientos		Tiempo de muestreo (días)			
		0	15	45	60
		Degradación (%)			
T1	Control Abiótico	0	5,48	14,86	23,52
T2	Sólo crudo sin fertilizar	0	30,97	69,66	72,30
T3	N+P+K1 (C/N 60/1, C/P 800/1; relación 1 C/K, 200/1)	0	23,03	57,03	92,63
T4	N+P+K2 (C/N 60/1, C/P 800/1; relación 2 C/K, 400/1)	0	25,21	86,05	96,35
T5	N+P+K3 (C/N 60/1, C/P 800/1; relación 3 C/K, 600/1)	0	31,83	78,81	94,11
T6	K1 (relación 1 C/K, 200/1)	0	20,82	64,01	81,57
T7	K2 (relación 2 C/K, 400/1)	0	18,13	76,22	83,11
T8	K3 (relación 3 C/K, 600/1)	0	27,10	79,89	85,36
T9	P+N (C/N 60/1, C/P 800/1)	0	29,20	74,96	84,05

En la Tabla 11, se muestran los valores correspondientes a los porcentajes promedios de biodegradación en los tratamientos evaluados, es decir la atribuible a factores bióticos, para los cuales se registran aumentos progresivos en el tiempo.

Tabla 11. Promedios de los porcentajes de biodegradación del crudo Mesa en el tiempo.

Tratamientos		Tiempo de muestreo (días)			
		0	15	45	60
		Biodegradación (%)			
T1	Control Abiótico*	0 a	5,48 a	14,86 c	23,52 e
T2	Sólo crudo sin fertilizar	0 a	25,49 a	54,80 ab	48,78 cd
T3	N+P+K1 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 200/1)	0 a	17,55 a	42,17ab	69,11 ab
T4	N+P+K2 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 400/1)	0 a	19,73 a	71,19 a	72,83 a
T5	N+P+K3 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 600/1)	0 a	26,35 a	63,95 ab	70,59 ab
T6	K1 C/K, 200/1)	0 a	15,34 a	49,15 ab	58,05 cd
T7	K2 C/K, 400/1)	0 a	21,62 a	65,03 ab	59,59 bcd
T8	K3 C/K, 600/1)	0 a	12,65 a	61,36 ab	61,84 abc
T9	P+N (C/N 60/1, C/P 800/1)	0 a	23,72 a	60,10 ab	60,53 bc

a,b,c y d son grupos de medias homogéneas (Medias con la misma letra no son significativamente diferentes).

* Porcentajes de degradación abiótica.

El análisis estadístico realizado a los tratamientos en los tiempos evaluados, y que se presenta en el Anexo E, demostró que existen diferencias significativas entre el control abiótico (**T1**) y los demás tratamientos (**T2**, **T3**, **T4**, **T5**, **T6**, **T7**, **T8** y **T9**). Esto se explica por las altas cantidades de crudo extraído observadas en **T1**, indicador de las bajas tasas de degradación presentes, y que se atribuyen a la inhibición total del crecimiento microbiano en este tratamiento control. Lo anterior permite concluir que los microorganismos actuaron positivamente en los otros tratamientos evaluados, evidenciando el impacto de la actividad microbiana y la fertilización como estimulante en el proceso de degradación del crudo Mesa.

La tasa de pérdida de crudo observada en **T1** al final del experimento, atribuible a factores abióticos, tales como: evaporación, solubilización, fotooxidación, adsorción a partículas, entre otras (Rodgers et al., 2000; McCarthy et al., 1998; Douglas, Bence, Prince, McMillen y Butler, 1996; Atlas, Boehm y Calder, 1981), alcanzó un valor promedio superior al 23 %, según estimaciones realizadas en base a la reducción del crudo presentada en este tratamiento. A partir de este valor se pudo determinar y discriminar la degradación debida a factores bióticos y a abióticos, tal como se muestra en las Tablas 10 y 11. Esto indica la importancia de utilizar controles abióticos, que permitan comparar los cambios en la composición y concentración de crudos resultantes de los procesos no biológicos en los estudios de biorremediación con composteros.

Los tratamientos que presentaron los mejores resultados ($p < 0,05$ y límite de confianza de 95%), en cuanto a remoción de crudo a los 60 días, fueron aquellos fertilizados con NP combinado con K, es decir **T3**, **T4** y **T5**, los cuales tuvieron porcentajes de biodegradación de 69,11; 72,83 y 70,59 %, respectivamente. En los tratamientos **T3**, **T4** y **T5**, por ejemplo, se cuantificaron porcentajes de remoción total de 92,63; 96,35 y 94,1 % respectivamente (Tabla 10), mientras que, como se aprecia en la Tabla 11, la tasa de biodegradación, para estos tres tratamientos, fue en promedio de aproximadamente un 70 %.

Los tratamientos **T8**, **T9**, **T7**, **T6**, **T2** y **T1**, presentaron tasas de degradación menores en orden decreciente comparativamente, tal como se aprecia en la Tabla 11 y en el análisis estadístico (Anexo E).

El comportamiento de la cinética de biodegradación del crudo Mesa para los tratamientos evaluados es ilustrado en la Fig. 7.

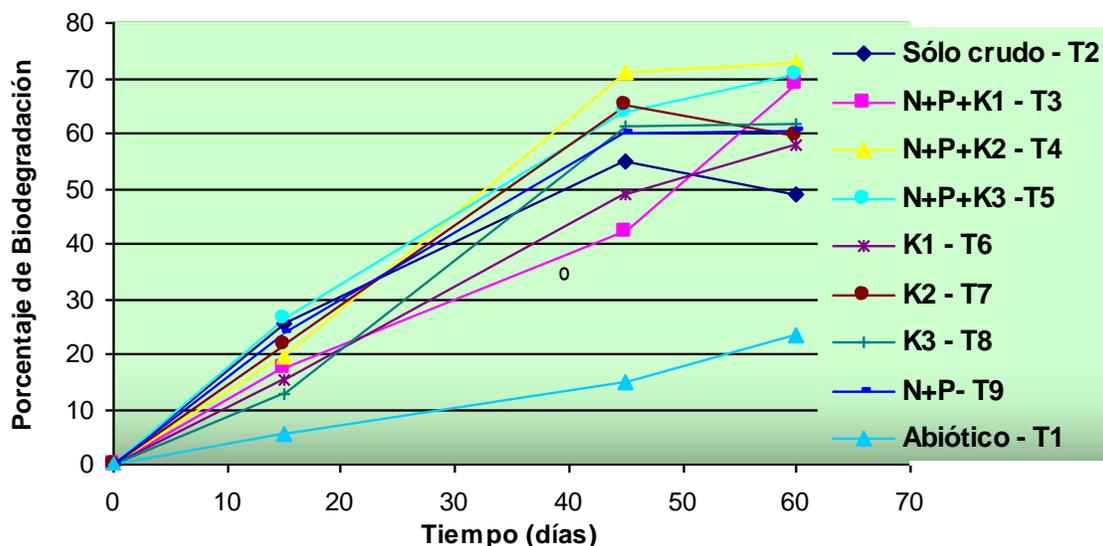


Figura 7. Cinética de degradación del crudo para los tratamientos evaluados.

La cinética de biodegradación observada a los 60 días de experimentación, demuestra que se alcanzaron altas tasas en la mayoría de los tratamientos, exceptuando el tratamiento abiótico (**T1**) como se mencionó anteriormente. Este tiempo (60 días) es menor a los reportados en estudios previos de suelos contaminados con lodos petrolizados, como por ejemplo los realizados por Dibble y Bartha, 1979; CONCAWE, 1980; León et al., 1998, entre otros. Esto es atribuible a la estimulación del proceso de biodegradación y a la existencia de condiciones apropiadas que favorecieron la diversidad y desarrollo de microorganismos autóctonos (hongos, levaduras, bacterias, etc.) preexistentes en el suelo (Infante y Vásquez, 1999), así como a la composición del crudo utilizado, (mayormente fracciones de parafinas y náftenos) que le confieren características de alta biodegradabilidad (González, 1997).

En la Fig. 8 se observa el comportamiento de las curvas de biodegradación para los tratamientos que recibieron la fertilización con la combinación NP y K en las tres relaciones evaluadas (**T3**, **T4**, **T5**) y el **T9**, fertilizado con NP.

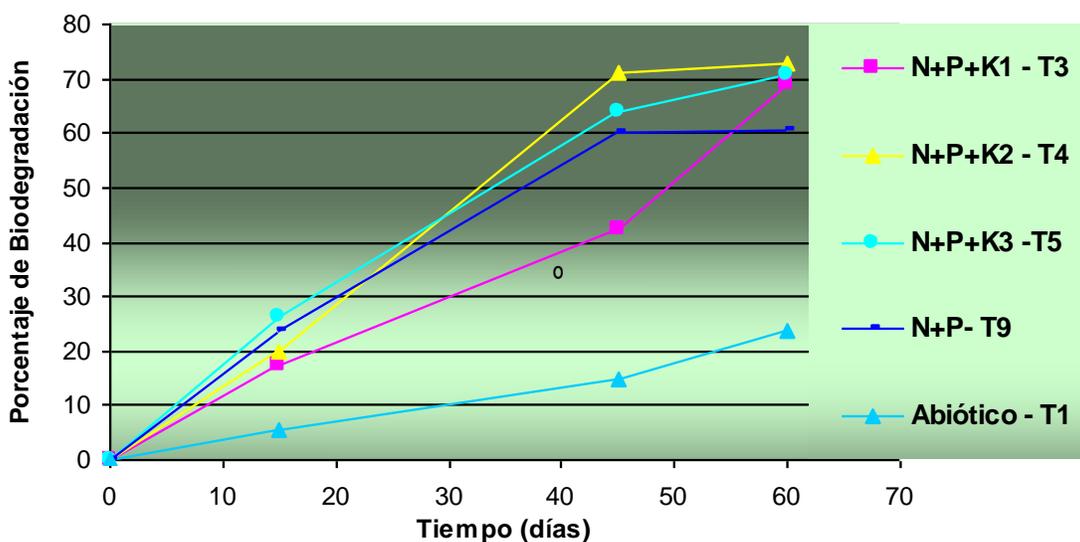


Figura 8. Cinética de degradación del crudo en los tratamientos **T3**, **T4**, **T5** y **T9**.

La prueba de medias (Tukey) aplicada a la cuarta y última extracción, realizada a los 60 días, revela diferencias significativas entre los tratamientos **T3**, **T4**, **T5** y **T9** ($p < 0,05$, para un límite estadístico de 95% de confianza). Específicamente el nivel medio de fertilización con K, **T4** (NP y K (C/K, 400/1)), fue superior a todos los demás tratamientos, incluso a las otras dos combinaciones NPK evaluadas, es decir **T3** y **T5**. En **T4** se presentó la mayor tasa promedio de biodegradación (72,83 %) del crudo Mesa. Los tratamientos **T3**, **T4**, **T5** presentaron altas tasas de biodegradación, evidentemente aumentada con la fertilización, lo que significa que la biodegradación del crudo ensayado es dependiente del contenido de K en combinación con NP añadido al suelo para las relaciones evaluadas.

Es importante destacar que los tratamientos **T3**, **T4** y **T5**, promovieron la biodegradación en más de un 20 %, con respecto al tratamiento que no recibió fertilización (**T2**), y en más de un 10 % con relación al tratamiento fertilizado sólo con NP (**T9**).

Por consiguiente en el presente estudio, se ha demostrado que la adición de fertilización con K combinado con NP, es una variable importante a considerar en la promoción de la biodegradación de suelos contaminados con crudos tipo Mesa. Puesto que convencionalmente se fertiliza con NP, sin incluir el K, en suelos contaminados con hidrocarburos para inducir el proceso de biodegradación (Ercoli et al., 2001), éste resultado permite establecer como recomendación la utilización de potasio.

Es evidente que las tres relaciones C/K, combinadas con NP, ejercieron un efecto positivo en los procesos de biodegradación, por lo menos para el crudo ensayado en este estudio, por lo tanto, y dado que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos evaluados con la combinación NPK, se podría entonces recomendar la utilización de la menor relación de K evaluada, es decir **T5** (NP y K (C/K, 600/1)), la cual representaría el menor costo en fertilización. Asimismo, es recomendable evaluar el comportamiento del efecto de estas relaciones en otros tipos de crudo y suelo.

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre el grupo de los tratamientos **T3**, **T4** y **T5**, y el resto de los tratamientos evaluados **T1**, **T2**, **T6**, **T7**, **T8**, evidencian que ocurrió mayor biodegradación del crudo en los que recibieron la combinación NPK que en aquellos que no, lo que sugiere su efectividad, confirmándose así la necesidad de adicionarla a suelos para mejorar el proceso de biorremediación.

Esto sustenta lo señalado por King, Long y Sheldon (1993), citados por Infante y González, (1995) y por Infante, Vázquez y Lippke (1999), en relación a que la eficiencia en el proceso de biodegradación aumenta con la fertilización con NP y la dosis adecuada de K, lo que se realiza mediante la adición de fertilizantes oleofílicos (Swannell, Lee y McDonagh, 1996), dado que estimula el desarrollo de microorganismos autóctonos presentes en el sitio contaminado (Infante, 2001).

Del mismo modo, los resultados obtenidos en los tratamientos fertilizados con NPK (**T4**, **T3** y **T5**), mostraron superioridad con respecto a los obtenidos por Dibble y Bartha, (1979) para la relación C/K, 400/1, en cuanto a porcentajes y tiempo de biodegradación. Estos autores observaron porcentajes de biodegradación de 33 % en un tiempo de 131 días, mientras que en el presente experimento se midieron porcentajes promedios mayores al 70%, en un tiempo de remoción de 60 días. Estas diferencias muy probablemente se deban a que el estudio de Dibble y Bartha, fue realizado en condiciones de clima templado con un suelo de pobre calidad, al que además le fue removida la capa vegetal, contaminado con lodos petrolizados de una refinería, presentando también una baja diversidad microbiana, por lo que hubo que inocular cepas bacterianas foráneas. En tanto que, en el presente experimento, se utilizó un suelo caracterizado por adecuadas condiciones para el desarrollo de procesos de biodegradación (ver punto 4.6.1) y alta diversidad microbiana nativa, mejorado además con la adición de hojarasca (ver punto 4.4), contaminado con un crudo mediano, con una baja proporción de asfaltenos (2,5 % p/p), y alto porcentaje de parafinas (33,6 %), isoparafinas (37,00 %) y de naftas (superior al 23%), características que le confieren volatilidad y biodegradabilidad.

Otro aspecto que favoreció la superioridad de los resultados, fue el uso de composteros para simular procesos de biorremediación, los cuales resultan más eficientes que las fiolas de laboratorio, principalmente por la mayor capacidad y volumen que permiten una mejor reproducción de condiciones de campo, en cuanto a porosidad de suelo y diversidad de microorganismos.

En otras investigaciones igualmente utilizaron el K en combinación con NP, para evaluar el efecto de la fertilización en la promoción de la biodegradación de hidrocarburos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Mills y Frankerberger (1994), evaluaron seis concentraciones de Fosfato de Potasio (K_2HPO_4) en suelos contaminados con fuel diesel, confirmando la efectividad en la biodegradación de concentraciones del fertilizante comprendidas entre 100 a 500 mg/Kg de suelo, siendo la óptima 500 mg/Kg. No obstante, los investigadores sólo analizaron el efecto del P, y no discriminaron la influencia del K en el proceso.

Algo similar ocurrió en la investigación realizada por Brook, Stiver y Zytner (2001), en la que evaluaron la biodegradación de un combustible diesel en suelos, agregando varios regímenes de N (C/N (20:1 y 40:1)). En el estudio se utilizaron como fuentes de N, el nitrato de potasio, el nitrato de amonio, la urea y oligómeros de urea, el P fue agregado en

la forma de fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4). En el experimento se evaluó el aumento en la tasa de pérdida del hidrocarburo asociada sólo al uso del N, sin embargo, no se consideró el efecto del K en la degradación del hidrocarburo.

En la Fig. 9, se aprecia la cinética de degradación en los tratamientos **T1**, **T2**, **T6**, **T7**, **T8** y **T9**. En ella el tratamiento **T8** (fertilizado sólo con potasio C/K, 600/1), mostró mayor tasa de biodegradación que **T9** (NP), **T7** (C/K, 400/1), **T6** (C/K, 200/1) y **T2** (sin fertilizar), presentando diferencias significativas ($p < 0,05$), con respecto a los demás tratamientos (Ver el análisis estadístico completo en el Anexo E).

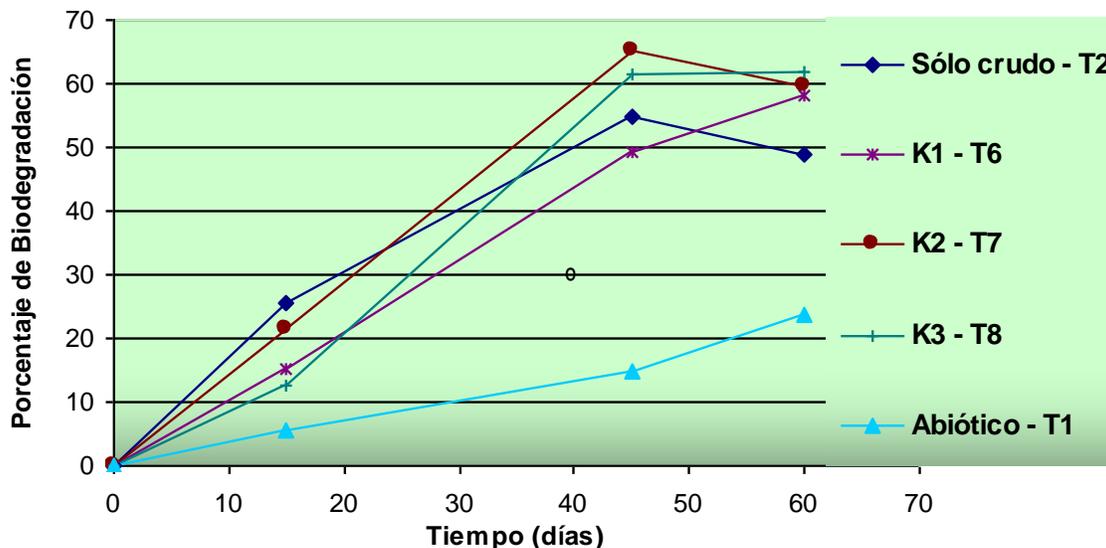


Figura 9. Cinética de degradación del crudo en los tratamientos T1, T2, T6, T7, T8 y T9.

El hecho de que **T8** presentara una mayor tasa de biodegradación que **T9**, no es un resultado esperado de acuerdo a estudios previos, en los que se señala que el N y el P son macroelementos indispensables en los procesos de biorremediación (Brook et al., 2001, Dibble y Bartha, 1979), mientras que, no se asevera que con sólo añadir K (sin NP), la biorremediación tenga mejor comportamiento, desconociéndose entonces aquellos factores o causas que generaron este resultado.

No obstante, los resultados obtenidos en la prueba de medias (Tukey) indican que **T9** presentó una mayor tasa de biodegradación ($p < 0,05$) que **T6**, **T7** y **T2** (ver anexo E). Igualmente para la medición de CO_2 , el **T9** presentó una mayor cinética de producción a los 60 días de experimento con respecto a los tratamientos **6**, **7**, **8** y **2**, lo que indica que efectivamente hubo una actividad microbiana superior en este tratamiento, tal como se indica en la Tabla 11.

En resumen todos estos tratamientos, presentaron tasas de biodegradación menores a los tratamientos con la combinación NPK, lo que ratifica que fertilizar sólo con K o NP por separado, no resulta tan efectivo como cuando se hace con la mezcla

Por otro lado, la tasa promedio de biodegradación de 49 % obtenida en el **T2** (sin fertilizar) al final del experimento, aunque siempre fue menor a los tratamientos fertilizados (**T4**, **T5**,

T6, T7, T8 y T9), sugiere el desarrollo de procesos de atenuación natural, es decir aquellas reacciones físicas, químicas y biológicas que tienen lugar en un suelo, que ocurren espontáneamente en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo. En condiciones favorables, la atenuación natural reduce, sin la intervención humana, la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea. Este proceso incluye diversos mecanismos, tales como dispersión, dilución, adsorción, volatilización, estabilización y transformación o destrucción de contaminantes por vía química o biológica (EPA, 1999b). Este proceso natural pudo ser favorecido por las características del suelo, tales como textura franca, la conductividad hidráulica, el pH y el contenido orgánico adecuado, entre otros.

Sin embargo, es importante destacar que la atenuación natural, en muchos casos, no se produce con la celeridad y eficacia suficientes para evitar los riesgos para la salud humana o al ambiente, derivados de la existencia de un espacio contaminado, por lo que es necesario realizar actuaciones para acelerar el saneamiento o recuperación (EPA, 1999b).

5.3 Medición de la producción de Dióxido de Carbono (CO₂).

La Tabla 12 muestra los promedios de los datos resumidos de la evolución de la producción de CO₂, la cual fue monitoreada semanalmente durante los 60 días de duración del experimento. En el Anexo D se presentan los datos originales obtenidos sin promediar.

Tabla 12. Promedios de la producción CO₂, observados durante los 60 días de experimento (tres réplicas por tratamiento).

Tratamientos		Tiempo (días)								
		0	7	14	21	28	35	45	52	60
		Producción de CO ₂ expresada en mg / m ² .h								
T1	Control Abiótico	1,03 c	1,64 d	2,02 c	1,57 c	1,43 c	3,96 c	3,94 e	3,46 c	2,65 d
T2	Sólo crudo sin fertilizar	7,86 b	11,95 c	20,22 b	25,67 b	19,24 b	18,76 ab	17,39 abcd	10,73 bc	6,66 cd
T3	N+P+K1 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 200/1)	15,57 a	29,78 a	29,99 a	31,46 a	26,01 a	26,28 ab	23,57 a	21,40 a	13,99 ab
T4	N+P+K2 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 400/1)	12,50 ab	26,91 a	27,80 a	32,82 a	29,07 a	28,14 a	23,44 a	21,53 a	16,51 a
T5	N+P+K3 (C/N 60/1, C/P 800/1; C/K, 600/1)	8,68 b	29,58 a	30,64 a	34,11 a	27,30 a	25,56 ab	19,36 abc	19,02 a	11,07 bc
T6	K1 (C/K, 200/1)	11,61 ab	16,67 b	19,40 b	24,72 b	20,09 b	19,22 ab	12,50 ab	8,08 c	7,95 c
T7	K2 (C/K, 400/1)	9,22 ab	17,08 b	20,15 b	25,80 b	17,97 b	16,44 abc	14,20 abc	8,15 c	7,68 c
T8	K3 (C/K, 600/1)	6,69 bc	16,39 b	22,06 b	24,92 b	16,14 b	14,06 bc	12,84 bc	7,74 c	7,40 cd
T9	P+N (C/N 60/1, C/P 800/1)	12,57 ab	30,47 a	30,47 a	34,79 a	27,64 a	24,24 ab	19,50 ab	16,98 ab	16,10 a

a,b,c y d son grupos de medias homogéneas (Medias con la misma letra no son significativamente diferentes).

El análisis estadístico multivariado de los datos (prueba de comparaciones múltiples y de varianza, con el Sistema SAS versión 9.0) realizado para los nueve tratamientos y los nueve tiempos evaluados, se muestra en el anexo F.

La comparación entre los tratamientos realizada a los datos obtenidos en la primera medición (día 0), reveló diferencias significativas en el comportamiento de los tratamientos ($p < 0,05$), lo que evidencia que se presentaron tasas heterogéneas de producción de CO₂ desde el inicio del experimento, confirmando la presencia de microorganismos autóctonos en el suelo de los composteros.

En la Fig. 10, se muestra el comportamiento de la producción de CO₂ para los tratamientos **T1**, **T2**, **T3**, **T4**, **T5**, **T6**, **T7**, **T8** y **T9**, evaluados en el ensayo, observándose patrones típicos de procesos biodegradativos de hidrocarburos. Estos resultados son indicadores positivos de la efectividad del proceso de biodegradación favorecido por la

existencia de microorganismos nativos y la disponibilidad de nutrientes e hidrocarburos degradables y consumibles por lo organismos, según experiencias de autores en trabajos realizados a escala de campo (Álvarez y colaboradores, 2005).

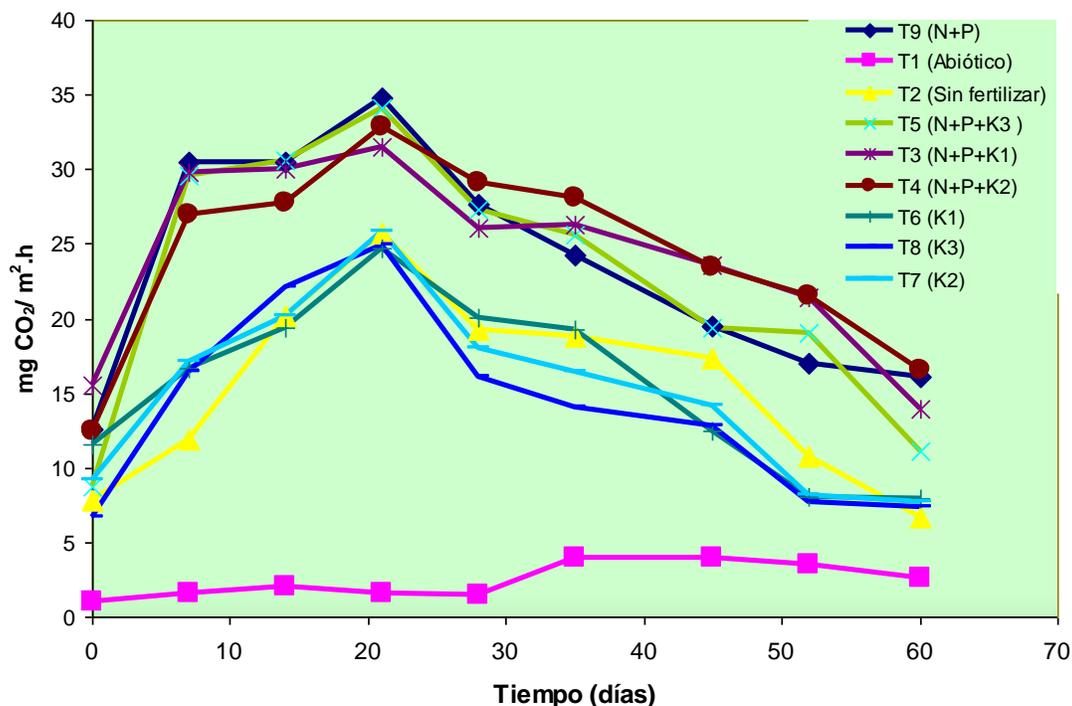


Figura 10. Producción de CO₂ de los tratamientos evaluados durante 60 días de ensayo.

Uno de los elementos que pudo favorecer el rápido crecimiento de la población de microorganismos con capacidad metabólica para degradar el hidrocarburo en este ensayo, fue el pH de la mezcla suelo/crudo (Dibble y Bartha, 1979), que presentó un valor promedio de 7,32 en los tratamientos evaluados (ver resultados de los análisis de la mezclas finales suelo/desecho en las Tablas 13 a la 18), valor en el cual algunos hidrocarburos son fácilmente convertidos en material celular y se acelera la producción de compuestos como las cetonas.

Otros factores que posiblemente contribuyeron a la estimulación del proceso de biodegradación fueron la biodisponibilidad y la adecuada concentración inicial del hidrocarburo, así como el tipo de suelo y la presencia de nutrientes en los composteros (De Jonge, Freijer, Verstraten, Westerveld, y Van der Wielen, 1997).

En la misma Fig. 10, se observa que los tratamientos que recibieron nutrición mineral completa, es decir **T3**, **T4** y **T5** (NP y C/K, igual 200/1, NP y C/K, igual 400/1, NP y C/K, igual 600/1, respectivamente), y el fertilizado con NP (**T9**), produjeron altas tasas de CO₂, durante todo el experimento ($p < 0, 05$). Los mismos alcanzaron sus picos máximos a los 21 días, presentando un comportamiento estadístico homogéneo en este tiempo, con valores comprendidos entre 31 y 35 mg de CO₂ /m².h. Por su parte, los tratamientos con fertilización incompleta **T6**, **T7**, **T8** y el que no fue fertilizado (**T2**), tuvieron una producción de CO₂ intermedia, más baja que los anteriores, mientras que en **T1**, se observó una muy

baja, como era de esperar. Este comportamiento fue similar a los observados a los 7, 14, 21 y 28 días.

Lo anterior permite deducir que es determinante la incorporación de los macronutrientes minerales NPK, para aumentar la actividad de la población microbiana en el suelo, en vez de dosis separadas de cada uno de ellos, que no resultan eficaces para estimular los procesos biodegradativos de crudo, tipo crudo Mesa en suelos.

Es importante destacar que el análisis realizado a los 60 días revela que **T4**, **T3** y **T9** presentaron un comportamiento similar en cuanto a producción de CO₂, sin diferencias significativas ($p > 0,05$), indicando que **T9** (NP) efectivamente presentó una alta actividad microbiana, aunque no se reflejó en una efectiva disminución del crudo remanente en el tiempo.

Igualmente, se aprecia que el comportamiento en cuanto a la producción de CO₂ del tratamiento sin fertilizar (**T2**) fue muy similar a los tres fertilizados con potasio (**T6**, **T7** y **T8**) en la mayoría de los tiempos estudiados ($p < 0,05$). Por lo tanto, se puede concluir que la incorporación de K sólo, no contribuye en gran medida a aumentar la actividad microbiana en el suelo.

No obstante, **T2** siempre presentó una tasa de producción de CO₂ superior a **T1**, evidenciándose la actividad biológica en este tratamiento, y sugiriendo el desarrollo de procesos de atenuación natural del crudo en el suelo.

La producción de CO₂ en el control abiótico (**T1**) presentó un leve incremento a partir de la quinta semana, aunque nunca superó el valor de los 5 mg CO₂/m² h, esta variación no fue significativa estadísticamente ($p > 0,05$), según el análisis realizado para un límite de confianza de 95%. Sin embargo, la producción de CO₂ observada en este tratamiento, puede ser atribuida a reacciones abióticas en el suelo, como por ejemplo transformaciones químicas del hidrocarburo, pero no a la actividad microbiana (León et al., 1998).

En todos los tratamientos se redujo drásticamente la producción CO₂ a los 60 días de experimento, lo que se explica por la disminución de la población microbiana en los composteros originada por el consumo y agotamiento en el tiempo del carbono orgánico, de los aceptores electrónicos y de nutrientes (Martín, González y Blanco, 2004).

5.4 Evaluación de parámetros de la mezcla suelo/desecho establecidos en el Decreto 2635 (Artículos 50).

Una vez culminado el ensayo se realizaron determinaciones en laboratorio a la mezcla suelo/desecho, para algunos tratamientos seleccionados, con el fin de corroborar que los parámetros finales cumplieran con los límites permisibles establecidos en el Decreto 2635 sobre "**Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos**". Para ello se consideraron las medidas establecidas en el Capítulo III, sección II, artículo 50, en el que se señalan las disposiciones técnicas para el manejo de desechos peligrosos generados por la exploración y producción de petróleo, que se deben tomar en cuenta para la práctica de esparcimiento en suelos.

Además, se midieron la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el porcentaje de saturación de bases, criterios relacionados con la química agrícola del suelo, a fin de conocer el efecto del tratamiento en estas dos variables de fertilidad.

En las Tablas 13, 14, 15, 16, 17 y 18 se muestran los resultados de las determinaciones para las mezclas finales suelo/desecho para los tratamientos sin fertilizar (**T2**), con fertilización completa **T3** (NP y K (C/K, 200/1)), **T4** (NP y K (C/K, 400/1)) y **T5** (NP y K (C/K, 600/1)), el fertilizado con la relación C/K, 600/1 (**T8**) y el fertilizado con NP (**T9**).

Debido a que los valores de las cantidades de crudo remanente extraídas a través del método Soxhlet, revelaron bajas cantidades de aceites y grasas presentes en los composteros, no fue necesario realizar los análisis a todos los tratamientos, para lo cual se decidió escoger las muestras a evaluar de forma aleatoria.

Tabla 13. Resultados de los análisis realizados al tratamiento sin fertilización (T2) comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS)	0.4	< 8	
Bases Intercambiables	17,5091	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	18,106	-	meq/100 g
Porcentaje de Saturación de Bases	>90	> 80	%
Salinidad	1,116	-	mmhos/cm
Cloruros	<100	< 2500	ppm
Aluminio Intercambiable	<0,05	< 1,5	meq/100 g
Conductividad Eléctrica (CE)	1,74	< 3,5	mmhos/cm
pH	7,4	5-8	
Aceites y grasas	1,1	≤ 1	% en peso

Tabla 14. Resultados de los análisis realizados al tratamiento (T3) fertilizado con NPK (C/K 200/1) comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS),	0,37	< 8	
Bases Intercambiables	19,9945	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	20,592	-	meq/100 g
Saturación de Bases	> 90	> 80	%
Salinidad	1,679	-	mmhos/cm
Cloruros	451	< 2500	ppm
Conductividad Eléctrica (CE)	2,62	< 3,5	mmhos/cm
Aluminio Intercambiable	<0,05	< 1,5	meq/100 g
pH	7,28	5-8	
Aceites y grasas	0, 223	≤ 1	% en peso

Tabla 15. Resultados de los análisis realizados al tratamiento (T4) fertilizado con NPK (C/K 400/1) comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS),	0,42	< 8	
Bases Intercambiables	21,3392	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	21,937	-	meq/100 g
Saturación de Bases	> 90	> 80	%
Salinidad	300	-	mmhos/cm
Cloruros	451	< 2500	ppm
Aluminio Intercambiable	<0,05	< 1,5	meq/100 g
Conductividad Eléctrica (CE)	2,54	< 3,5	mmhos/cm
pH	7,31	5-8	
Aceites y grasas	0,143	≤ 1	% en peso

Tabla 16. Resultados de los análisis realizados al tratamiento (T5) fertilizado con NPK (C/K 600/1) comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS),	0,35	< 8	
Bases Intercambiables	21,9757	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	22,573	-	meq/100 g
Saturación de Bases	>90	> 80	%
Salinidad	1,670	-	mmhos/cm
Cloruros	150	< 2500	ppm
Aluminio Intercambiable	<0,05	< 1,5	meq/100 g
Conductividad Eléctrica (CE)	2,61	< 3,5	mmhos/cm
pH	7,34	5-8	
Aceites y grasas	0,60	≤ 1	% en peso

Tabla 17. Resultados de los análisis realizados al tratamiento (T8) fertilizado con K (C/K 600/1) comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS)	0,31	< 8	
Bases Intercambiables	20,8339	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	21,431	-	meq/100 g
Saturación de Bases	> 90	> 80	%
Salinidad	1,358	-	mmhos/cm
Cloruros	753	< 2500	ppm
Conductividad Eléctrica (CE)	2,12	< 3,5	mmhos/cm
pH	7,4	5-8	
Aceites y grasas	0,628	≤ 1	% en peso

Tabla 18.- Resultados de los análisis realizados al tratamiento (T9) fertilizado con NP comparados con los parámetros establecidos en el Decreto 2635.

Parámetro	Resultado	Decreto 2635	Unidad
Relación de Adsorción de Sodio (RAS),	0,34	< 8	
Bases Intercambiables	22,1554	-	(meq/100g)
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	22,753	-	meq/100 g
Saturación de Bases	> 90	> 80	%
Salinidad	1,602	-	mmhos/cm
Aluminio Intercambiable	<0,05	< 1,5	meq/100 g
Cloruros	<100	< 2500	ppm
Conductividad Eléctrica (CE)	2,50	< 3,5	mmhos/cm
pH	7,21	5-8	
Aceites y grasas	0,609	≤ 1	% en peso

En las Tablas 13 a la 18, se observa que los valores correspondientes al RAS, a la CE y a la salinidad en los tratamientos analizados (**T2, T3, T4, T5, T8 y T9**) mostraron leves incrementos con respecto al valor original medido en el suelo (ver Tabla 7). Esto puede ser atribuido al aporte de sales y cloruros inorgánicos presentes en el crudo Mesa (Ver Tabla 1), suministrado a cada compostero.

Igualmente, se observó que los valores de los cloruros se mantuvieron por debajo de 100 ppm en los tratamientos **T2** (sin fertilizar) y **T9** (fertilizado con NP), mientras que en los tratamientos que fueron fertilizados con cloruro de potasio (**T3, T4, T5, T8**), como era de esperar, este parámetro se incrementó.

Por su parte la CIC aumentó hasta en 4 unidades promedio, con respecto al valor inicial medido (17 meq/100 g), lo que pudo deberse a la adición de materia orgánica a los composteros. Las bases intercambiables igualmente aumentaron, considerándose ésto un efecto positivo, dado que si la suma de las bases intercambiables es igual o casi igual a la CIC, existe entonces una gran cantidad de cationes disponibles y aprovechables en el sustrato (Casanova, 1991).

Asimismo, pudo observarse que para los casos evaluados, el pH no presentó variación notoria con respecto al valor preliminar en el suelo (7,27), manteniéndose en el rango recomendado para un adecuado proceso de biodegradación de hidrocarburos, es decir entre 5 y 9 (Von Fahnstock, Wickramanayake, Michael y Dratzke, 1998) y en el rango de 5-8 establecido en el Decreto 2635 (artículo 50) para mezclas suelo/desecho.

Es importante destacar entonces que los resultados de los análisis realizados a la mezcla suelo/desecho, una vez culminado el ensayo de biodegradación, indican que los parámetros de pH, conductividad eléctrica, salinidad, RAS, cloruros, porcentaje de saturación de bases, aluminio intercambiable y el porcentaje de aceites y grasas en los tratamientos **T3**, **T4**, **T5**, **T8** y **T9**, cumplen con los criterios de limpieza establecidos en el Decreto 2635, en lo referido a las condiciones para la disposición final a través de la práctica de esparcimiento en suelos. Exceptuándose, el **T2**, tratamiento sin fertilizar, en el que la concentración de aceites y grasas (1,1 % en peso), es ligeramente mayor al valor establecido en la norma (≤ 1 % en peso).

El cumplimiento de los parámetros establecidos en el Decreto 2635 en los tratamientos evaluados, indican que la estimulación del proceso de biodegradación en el presente experimento, resultó efectiva como alternativa para la remoción adecuada y ambientalmente segura del crudo en el suelo.

5.5 Determinación cualitativa de la degradación de las fracciones del crudo Mesa con el uso de cromatografía.

Los cromatogramas obtenidos de los extractos de los tratamientos seleccionados, se muestran a continuación en las Figuras 13 y 14.

El cromatograma de la Fig. 13 corresponde a la muestra sin degradar por lo que refleja las señales de todos los hidrocarburos originalmente presentes en el crudo Mesa. El perfil observado es típico para crudos de naturaleza parafínicos e isoparafínicos (cadenas ramificadas). Se observa que los n-alcenos en el rango de carbón C_{10} - C_{25} dominan la distribución en la muestra. Este tipo de alcanos son los primeros en degradarse, por lo que son los indicadores más sensibles del grado de degradación microbiana inicial de crudo (McCarthy et al., 1998). Vecinos a las señales correspondientes a n-C17 y n-C18 se observan los picos del pristano y fitano, que corresponden a alcanos del tipo isoprenoide de 19 y 20 átomos de carbono, más difíciles de degradar. En muestras moderadamente biodegradadas las relaciones n-C17/pristano y n-C18/fitano son indicativos para la extensión de la biodegradación (Luque, Ciano, Nakamatsu, Amari y Lisoni, 2000).

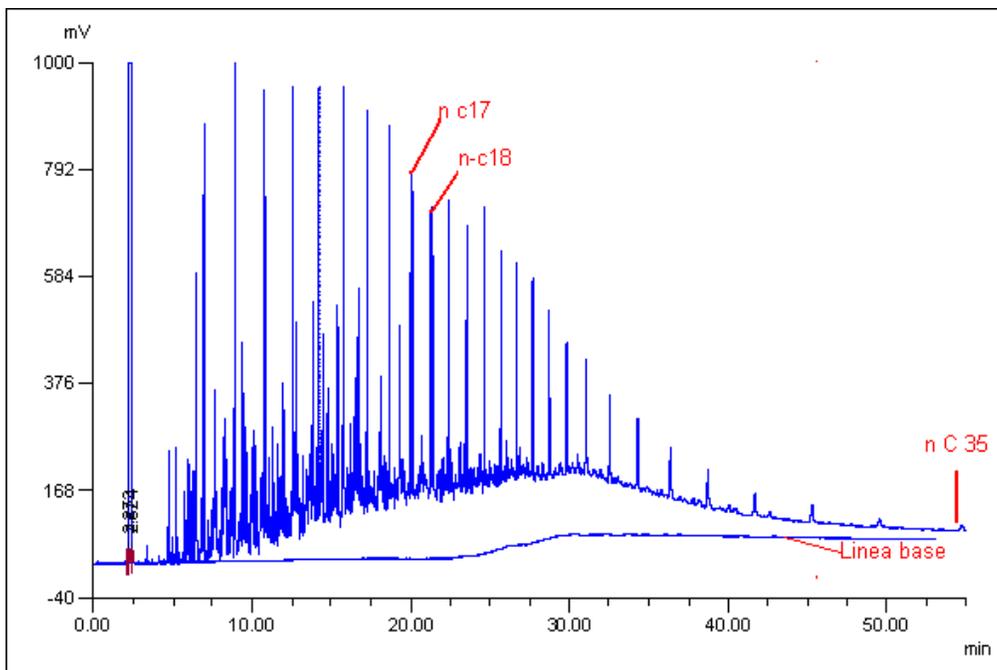


Figura 11. Cromatogramas del crudo Mesa sin degradar.

La Fig. 14 presenta los cromatogramas para las muestras de crudo extraídas de los tratamientos fertilizados con la combinación NPK, con las tres relaciones C/K, evaluadas, (T3, T4 y T5), una vez finalizado el ensayo. En estos cromatogramas se demuestra el efecto de la degradación, notándose que desaparecieron en su totalidad las n parafinas, e inclusive, el pristano y el fitano. Esto refleja los procesos de degradación que ocurrieron

durante el tiempo de ensayo, ya sea por efecto de bacterias, por volatilización, fotólisis y/o por descomposición (National Research Council, 1985).

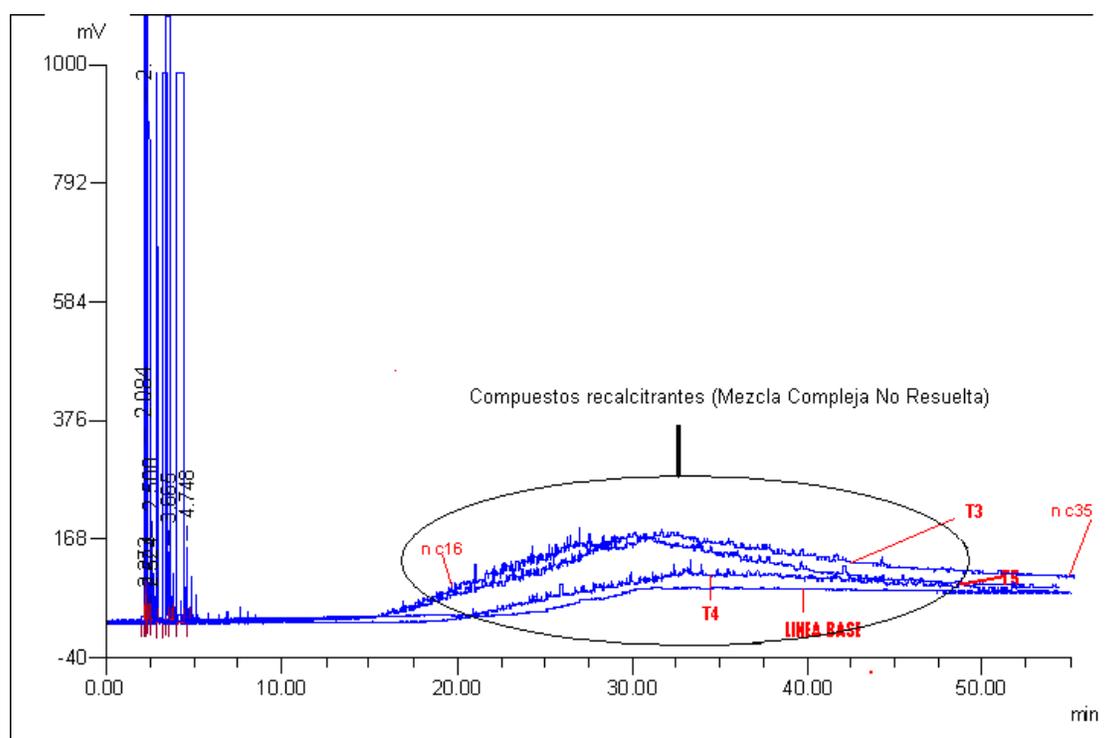


Figura 12. Cromatogramas de las cantidades remanentes de crudo en los tratamientos T3, T4 y T5, una vez finalizado el ensayo.

De la misma forma, es evidente que el remanente de los hidrocarburos más pesados, comprendidos en el rango C16-C35, dominan la distribución en los residuos de petróleo evaluados al final del ensayo, y que estos no corresponden a n-parafinas; es decir, se degradaron todas las parafinas lineales, y los componentes de menor tamaño de los demás hidrocarburos, lo cual es coherente con las observaciones de Ercoli et al., quien apunta que los hidrocarburos saturados son el sustratos más susceptible de degradar por los microorganismos (Ercoli et al.,2001).

En este caso la degradación fue evidente, observándose que solamente permanece una mezcla compleja no resuelta, que representa la totalidad del crudo restante extraíble, es decir fracciones sin degradar (Fig. 14).

Los datos obtenidos de las cantidades de crudo degradadas (con la remoción de aceites y grasas, punto 4.3.1), paralelamente con la validación cromatográfica cualitativa, revelan que los tratamientos evaluados (T3, T4 y T5), degradaron el crudo Mesa. Asimismo, se observa en la figura 14, que el tratamiento T4, presentó las señales menos intensas de fracciones remanentes de hidrocarburos, lo que indica una mayor degradación, comparativamente con T3 y T5. Esto concuerda con los resultados observados para la cinética de remoción de crudo (punto 4.3.1) y para la efectividad de la biodegradación, a través de la medición de la producción de CO₂ (punto 4.3.2), en los cuales éste

tratamiento presentó el mejor comportamiento, en cuanto a tasa de biodegradación del crudo Mesa.

6 Conclusiones

1. El nivel de fertilización con potasio (C/K, 400/1) combinado con nitrógeno (N) y fósforo (P), denominado **T4**, presentó la mayor tasa de biodegradación del crudo Mesa (72, 83 %) a los 60 días de experimentación. Sin embargo, dado que no se aprecian diferencias estadísticas significativas entre los tres tratamientos evaluados con la combinación NPK, **T3** (NP y K (C/K, 200/1)), **T4** y **T5** (NP y K (C/K, 600/1)), se podría entonces recomendar la utilización de la menor relación de potasio evaluada (**T5**), siendo evidente que las tres ejercieron un efecto positivo en los procesos de biodegradación, por lo menos para el crudo y suelo ensayado en este estudio.
2. El aumento promovido en la tasa de biodegradación por los tratamientos **T3**, **T4**, y **T5**, en más de un 20 % con respecto al tratamiento que no recibió fertilización (**T2**), y en más de un 10 % con relación al tratamiento fertilizado sólo con NP (**T9**) permite establecer como recomendación la utilización de K, en combinación con NP, dado que su uso confiere un incremento adicional en la tasa de biodegradación. En este caso se podría recomendar utilizar el tratamiento **T5** (C:K 600:1), que contiene la menor cantidad de potasio, y por tanto representa menos costo en fertilización. Sin embargo, es recomendable evaluar el comportamiento del efecto de esta relación en otros tipos de crudo.
3. Existe un efecto positivo cuando se agregan los tres macronutrientes minerales NPK, sobre la biodegradación del crudo Mesa en el suelo franco ensayado, por lo que se deduce su necesaria incorporación para estimular y aumentar la población microbiana en el suelo, y por ende acelerar los procesos de biodegradación.
4. Las pérdidas del crudo debidas a factores abióticos observadas en el presente estudio, y cuyo valor a los 60 días del experimento, se calcularon en un 23 % aproximadamente, se atribuyen al agotamiento por volatilización, fotólisis u otro elemento diferente a la degradación por intermedio de microorganismos, estimándose por diferencia la tasa de biodegradación. Esto demuestra la importancia de utilizar controles abióticos, que permitan comparar la producción de CO₂ y los cambios en la composición y concentración del crudo resultantes de los procesos no biológicos, en los estudios de biorremediación con composteros.
5. La baja tasa de degradación observada en el control abiótico (**T1**), se corresponde con las altas cantidades de crudo extraído y la baja producción de CO₂ durante todo el ensayo. Asimismo, el análisis estadístico demostró diferencias altamente significativas entre el control abiótico y todos los demás tratamientos, resultando incuestionable que los microorganismos actuaron positivamente en los otros tratamientos, lo que evidencia el impacto de la actividad microbiana y de la fertilización, como estimulante del desarrollo de microorganismos en el proceso de degradación del crudo Mesa.
6. Las mediciones de la producción de CO₂, permitieron validar la presencia de microorganismos en los composteros, tomando en cuenta que la misma fue

mínima en el tratamiento abiótico, la cual se atribuye a reacciones abióticas en el suelo.

7. La disponibilidad de nutrimentos y crudo aprovechable en los composteros (microcosmos) desde el inicio del ensayo, estimuló el desarrollo de los microorganismos autóctonos presentes, el cual fue disminuyendo en el tiempo por el agotamiento del sustento nutricional, corroborado por las bajas cantidades de crudo extraído y la mínima producción de CO₂ obtenidas en la última medición.
8. El porcentaje de biodegradación alcanzado al final del experimento en el tratamiento que no recibió fertilización (**T2**), aunque siempre fue menor que los tratamientos que recibieron fertilización completa e incompleta, sugiere la presencia natural, en el suelo utilizado, de los nutrimentos necesarios para el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, favoreciendo así actividad microbiana en este tipo de suelo.
9. Las altas tasas de biodegradación que se presentaron en la mayoría de los tratamientos evaluados en el ensayo pudieron ser influenciadas por la presencia de factores favorables para el proceso, tales como el tipo de hidrocarburos con abundancia de fracciones alifáticas lineales, escasa presencia de resinas y asfáltenos, concentración baja de crudo, presencia de poblaciones microbianas diversas, adecuada oxigenación, pH entre 7 y 9 temperaturas superiores a 15° C, porosidad de suelo media, permeabilidad adecuada y homogeneidad del sustrato.
10. Los cromatogramas realizados a los tratamientos (**T3**, **T4** y **T5**), corroboraron la efectividad del proceso de biodegradación. Igualmente mostraron que el tratamiento **T4**, presentó los picos más bajos de fracciones remanentes de hidrocarburos, y por lo tanto la mayor degradación, comparativamente con **T3** y **T5**, demostrando el mejor comportamiento, en cuanto a tasa de biodegradación del crudo Mesa de este tratamiento.
11. Los resultados de los análisis realizados a mezcla final suelo- crudo Mesa, confirman que la estimulación del proceso de degradación del petróleo, en los tratamientos evaluados, resultó efectiva, cumpliéndose con los límites establecidos en el Decreto 2635 sobre "**Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos**". Por lo tanto, se puede concluir que la práctica es recomendable como alternativa de tratamiento en el manejo de desechos peligrosos generados por las actividades de exploración y producción de petróleo.
12. Se recomienda realizar ensayos similares, siendo necesario experimentar con otros tipos de crudos y suelos a diferentes escalas de tiempo y espacio, a fin de validar el efecto positivo en la biorremediación de las relaciones C/K, 200/1, 400/1 y 600/1 con la combinación NP.
13. El ensayo mostró que bajo condiciones favorables de temperatura, humedad y nutrimentos, la biodegradación aeróbica puede recuperar el suelo contaminado por derrames de petróleo, resultando la biorremediación una tecnología de fácil aplicación y con beneficios económicos importantes.

7 Recomendaciones

El objetivo principal del presente trabajo es contribuir a la búsqueda de propuestas y soluciones para la gestión ambiental y segura de problemas, como el de la contaminación generada por la actividad petrolera.

Resulta concluyente que el potasio en combinación con NP ejerce un efecto positivo en la biodegradación del crudo ensayado en este estudio. El aumento promovido en la tasa de biodegradación, por las relaciones C/K combinadas con NP evaluadas, en más un 10 % con relación a la fertilización con NP, permite establecer como recomendación la utilización de potasio. Por lo tanto, es necesario evaluar desde el punto de vista económico y de los beneficios asociados al cumplimiento de las normativas ambientales establecidas, la utilización de K a la combinación NP para incrementar la biodegradación. Sin embargo, es conveniente evaluar si se obtiene el mismo efecto para otros tipos de crudos y suelos.

Por otro lado, es importante destacar que, aunque en un laboratorio se pueden realizar numerosas pruebas, análisis y evaluaciones con diversidad de parámetros, en un ambiente controlado y en relativamente corto tiempo, existen limitaciones en cuanto a la reproducción de situaciones en campo, como por ejemplo, la labranza, el drenaje, las fluctuaciones de temperaturas, entre otros factores que no pueden ser probados exactamente en un laboratorio.

Consecuentemente los resultados obtenidos en el presente experimento, podrían requerir la validación y posibles ajustes en campo, sin embargo, el estudio en laboratorio puede reducir y simplificar considerablemente experimentos en campos, proporcionando los datos experimentales que se pueden utilizar en pruebas futuras.

8 Referencias bibliográficas.

Abboud, S. (2000). Toxicity Evaluation of Muds and Cements in Drilling Operations, Curso de postgrado. MINBAS. Habana, Cuba.

Acosta I, Infante C, López W. (1995). Efecto de petrolizados y lodos de tratamientos de aguas servidas sobre un suelo Calciorthids de la Península de Paraguaná. Agronomía Tropical. 45 (4) 527-537.

Albornoz, A., Christensen, N, Lindemann, W y Gil, L. (1993). Evaluación de fertilizantes líquidos de base ácida en un sistema de producción de sorgo bajo labranza mínima. I. fertilizantes nitrogenados. Agronomía Tropical. 43 (1-2).

Álvarez, J., Novoa, G., Romero, R., Núñez, A., Díaz, M., Millar, S., López, A., López, I., Laffita, C. y Sánchez, E. (2007). Utilización de fangos digeridos en el proceso de biorremediación de residuos sólidos petrolizados. Centro de Investigaciones del Petróleo. Ciudad de la Habana, Cuba. [Homepage]. Consultado el día 16 de julio de 2007 de la World Wide Web: <http://www.ecoport.net/content/view/full/67113>.

Álvarez, J., Ramos, E., Fernández, B., Núñez, A., Díaz, M., Novoa, G y Millar, S. (2005). Métodos para la disposición de residuos sólidos petrolizados. Centro de Investigaciones del Petróleo. Ciudad de la Habana, Cuba. [Homepage]. Consultado el día 20 de julio de 2007 de la World Wide Web: <http://www.ecoport.net>.

Atlas, R. M. y Bartha, R. (1992). Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Can. J. Microbiol. 18: 1851-1855.

Atlas, R. M. y Bartha, R. (1993). Microbial Ecology. Fundamentals and applications. Third edition. The Benjamin/cummings publishing company. INC. 547 PG.

Atlas, R. M., Boehm, P. D. and Calder, J. A. (1981). Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cadiz spillage within the littoral zone. Estuarine, Coastal and Shelf Science 12, 589-608.

Baheri, H. y Meysami, P. (2002). Feasibility of fungus bioaugmentation in composting a flare pit soil. Journal of Hazardous Materials. 89 : 279-286.

Berkelaar, E. (2001). Efecto del aluminio en suelos ácidos sobre el crecimiento de las plantas. Echo Notas de desarrollo. N°71 (Julio).

Bouwer, J. E. Y J.B, Zehnder. (1993) Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. Bioremediation. 11: 320 – 367.

Brook, T., Stiver, W and Zytner, R. (2001). Biodegradation of Diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. Soil and Sediments Contamination. 10(5):539-553.

Casanova, E. (1991). Introducción a la Ciencia del suelo. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

Chacín, F. (1998). Comparaciones teóricas y prácticas y análisis en tiempo y/o espacio de los diseños de superficie de respuesta. Revista de la Facultad de Agronomía (UCV). Alcance 54.

CONCAWE. (1980). Sludge Farming: A technique for the disposal of oily refinery waste. Report N° 3/80. Concauwe. Der Hoog.

Cochran, W. y Cox, G. (1997). Diseños experimentales. Ediciones Trillas. México. 661 p.

De Jonge, H; Freijer, J.I.; Verstraten, J.M.; Westerveld, J. y Van der Wielen. (1997). Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 31 (3): 771 - 775

De Rojas, I. L. (1974). Evaluación de métodos químicos para determinar requerimientos de cal en suelos ácidos del país. Agronomía Tropical 24(4): 259-278.

Diblle, J. and Bartha, R. (1979). Effect of Enviromental Parameters on the Biodegradation of oil sluge. Journal Applied and Enviromental Microbiology. Apri: 729-739

Douglas, G. S., Bence, A. E., Prince, R. C., McMillen, S. J., and Butler, E. (1996). Environmental stability of selected petroleum hydrocarbon source and weathering ratios. Envi. Sci & Tech. 30, 2332-2339.

Dragun, J. (1988). "Microbial Degradation of Petroleum Products in soil" In Von Fahnestock, F.; Wickramanayake. 1998. Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Battelle Press. Editions. 163 pp.

Enviromental Protection Agency (1986). Test methods for evaluating solid waste. Method 3540. Soxhlet Extraction. USEPA. Washington D.C.

Enviromental Protection Agency. (1995). Método de medición de metales pesados y no pesados. Washington D.C.

Enviromental Protection Agency. (1996). Test methods for extracting nonvolatile and semivolatile organic compounds from solids such as soils, sludges, and wastes. Method 3540c. Soxhlet Extraction. USEPA. Washington D.C.

Enviromental Protection Agency. (1996). Silica Gel Cleanup. USEPA. Method 3630 C. Washington D.C.

Enviromental Protection Agency. (1996). Nonhalogenated Organics using GC/FID. Method 8015 B. USEPA. Washington D.C.

Enviromental Protection Agency. (1992). Bioremediation of Hazardous wastes. Progres in the field applications of bioremediation Office of Research and development. Washington DC. pg 23-27.

Environmental Protection Agency. (1999a). Remedial Technology Fact Sheet. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons, EPA/600/ F-98/021.

Environmental Protection Agency. (1999b). Activities in Region 10, Alaska Operations. Oil Spill Program Update. The U.S. EPA's Oil Program Center Report. Vol 3. N° 1. [Online]. Available: <http://www.epa.gov/oilspill/pdfs/epaupd9.pdf>

Ercoli, E. (1998, Nov). Tratamientos Biológicos. Presentado en el Curso Latinoamericano de Especialización de Técnicas de Remediación Ambiental. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Buenos Aires, Argentina. [Online]. Disponible: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/remediacion/tema11.pdf>

Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., Bauzá, J. (2001). Biorremediación de suelos altamente contaminados. Revista de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. Año XIX, N° 42. [Online]. Disponible: fing.uncu.edu.ar/noticias/archivos/revista42.pdf

Eweis, J., Ergas, S., Chang y E. Schroeder. (2000). Principios de Biorrecuperación. WBC/McGaw-Hill. Madrid, España.

Ferrán, M. (2003). SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Ediciones McGaw Gill. España. 421 pp.

Gaceta Oficial de la República de Venezuela, año CXXV- mes V de Fecha 12 de Febrero de 1998, N° 5212, Extraordinario Decreto N° 2635, medio ante el cual se dictan las Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos.

Gates, A., Siegist, R. and Cline, L. (2001). Comparison of Potassium Permanganate and Hydrogen Peroxide as Chemical Oxidants for Organically Contaminated Soils. Journal of Environmental Engineering .Vol. 127, No. 4, April 2001, pp. 337-347.

Gibson, D. (1984). Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker 525 pg.

González, L. (1997). Estudio del Grado de biodegradación de crudo con diferentes gravedades API de la región sur central de la cuenca oriental de Venezuela. Tesis de grado Universidad Central de Venezuela. PDVSA INTEVEP. Los Teques, Venezuela.

Guiz, K., and Kriston, E. (1995). *In Situ* Bioremediation of Hydrocarbon in Soil. Journal of Soil Contamination. 4, 163 – 173.

Gutiérrez, M y Zavala J. (2002). Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados l suelo con hidrocarburos. Universidad Autónoma de Chapingo. Terra Latinoamericana. Abr-Jun. Vol 20. Num 002. Mexico. Pp 101-111.

Hinchee, R., Alleman B., Hoepfel R., Miller R. (1994). Hydrocarbon Bioremediation- Lewis Publishers 469 pg

Infante C. (1999). Tecnología INTEBIOS®. Biodegradation technology for treating organic wastes from oil industry operations. Visión tecnológica. 7 (1): 5-6

Infante, C. (2001). Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de INTEBIOS® y BIORIZE®. Interciencia. 26(10)503-507.

Infante, C., Arias, M., Sánchez G., León, N and Sanchez, L. (2001). In situ biostimulation. A key factor in bioremediation. Sixth International in situ and on site bioremediation symposium. Ex Situ Biological Treatment Technologies, Magar, von Fahnestock and Leeson, editors, Battelle 6:(6)257-261

Infante, C., Gonzalez, O.(1995). Comparación del proceso de biodegradación de lodos petrolizados en bioreactores y en suelos. Visión tecnológica. 3.(1): 29-33

Infante, C., Romero, A., Arocha, D., Gilbert and Brito, F. (1999). In situ Bioremediation of pits from Puerto La Cruz Refinery. Fifth International in situ and on site bioremediation. 5 (3):215-219

Infante C., Vásquez, P. y Lippke, M. (1999). Petróleo y Ambiente. Visión Tecnológica. Vol 144. 99-104

Infante, C, Viale-Rigo, M Salcedo M, J.Rodriguez. A. Melchor. (1997). In situ bioremediation of oil sludges. In situ and On site Bioremediation. Vol 4. Aleman and Leeson Editores. Battelle Press. pg 409

Infante G, y Zárate, G. (1990). Métodos estadísticos. 2ª edición. Trillas. México, D.F. 643p.

Instituto Colombiano Agropecuario. (1989). Manual de Análisis de Suelos, plantas y aguas para riego. ICA. Manual de Asistencia Técnica No. 47. Bogotá. 236 pp.

Jury, W. A. (1989). Chemical Movement through Soil. Vadose Zone Modeling of Organic Pollutants. Stephen C. Hern, Susan M. Melancon. Lewis Publishers Inc. USA.

Kamprath, E. J. (1967). Acidez del suelo y su respuesta a encalado. Boletín Técnico del Proyecto Internacional de Análisis de Suelos, N° 4.

Kanaebel, D.B., Federle, T., McAvoy, D., and Vestal, R. (1994). Effect of Mineral and Organic soil Constituents on Microbial Mineralization of Organic Compounds in Natural Soil. Applied and Environmental Microbiology. 60, 4500 – 4508.

Kaplan, I., Galperin, Y., Alimi, H., Lee, Ru-Po; Lu, Shan-Tan. (1996). Patterns of chemical changes during environmental alteration of hydrocarbon fuels. Ground Water Monitoring and Remediation. Vol. 16, no. 4, pp. 113-124.

LaGreca, M.D., Buckingham, PL. and J.C. Evans. (2001). Environmental Resources Management. Hazardous Waste Management. McGaw-Hill.

Leavitt, M.E., and Brow, K. (1994). Bioestimulation versus Bioaugmentation- Three cases studies. Hidrocarbon Bioremediation. Lewis. Pp 72-79.

Leavy, J y Colwell, R.(1990). Microbial Degradation of Hidrocarbons in the Enviroment. Microbiological Reviews. p. 305-315.

León, N., Infante, C., Arias, M., Márquez, M., Mcmillen, S and Smart. R.(1998). Biodegadability of Venezuelan crude oils. Society of petroleum engineers SPE . International Conference on Health, Safety and Environment in oil and gas exploration and production held in Caracas, Venezuela. 7-10 jun 1998.

Levin, M. y Gealt. M. (1998). Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Madrid, España . WBC/McGaw-Hill.

Leyva, O. y Iturbe, R. (2001). Comparación de técnicas de saneamiento en un suelo contaminado con petróleo crudo de Tabasco. México, D.F Instituto de Ingeniería, UNAM.

Lieth, H. and Markert, B. (1990). Element Concentration Cadasters in Ecosystems. Methods of Assessment and Evaluation. VCH. Weinheim 448 pp.

Luque, J. (1995). Características edáficas de suelos afectados por derrames de petróleo. BIP (Junio): 10-16.

Luque, J., Amari, M., Nakamatsu, V., Ciano, C., Lisoni, C., Quinteros, J., y Mackeprang, O. (2006). Utilización de nutrimentos en la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Luque, J., Ciano, N., Nakamatsu, V., Amari, M., Lisoni, C. (2000, octubre). Saneamiento de derrames de hidrocarburos por la técnica de biodegradación "in situ" en Patagonia, Artículo presentado en la Conferencia Internacional de la Conservación del Suelo. Buenos Aires, Argentina.

Malpartida, A. *La Ciencia de los Suelos*. [Homepage] Consultado el 14 de mayo de 2005, de la World Wide Web:
<http://www.ambiente-ecologico.com/revist37/AlejandroMalpartida037.htm>

Marín, C. (2000). Tratamiento de rípos. Seminarios de Introducción a Ingeniería Ambiental. Postgrado Ingeniería Ambiental Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, Venezuela.

Martín, C., González, A. y Blanco, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoam Micol 21: 103-120.

Mata, J.C. Korn, J and Torrents A. (2000). The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. Rev. Int. Contam. Ambient. 16(4): 193-203.

McCarthy, K. J., Uhler, A. D., and Stout, S. A. (1998). Weathering affects petroleum identification. Soil and Groundwater Cleanup, Aug/Sept.

Michigan State University. (2004, 11 de enero). Microbial Strain Databases and Culture Collections. [Homepage]. Consultado el día 4 de julio de 2007 de la World Wide Web: (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>)

Mills, S.A., and Frankenberg, W.T. (1994). Evaluation of Phosphorus Sources Promoting Biorremediation of diesel fuel in soil. Environmental Contamination and Toxicology. January. 53:280-284.

Morelli, I., Del Pano, M., De Antoni, G y Paineira, M. (2005). Laboratory study en la biorremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. International biodeterioration & biodegradation. 55 271-278.

National Research Council. (1985). "Oil In The Sea: Inputs, Fates, and Effects." Washington, DC: National Academy Press.

Pankhurst, C., Yu, S., Hawke, B., Harch, B. (2001). Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. Biol. Fertil. Soil 32: 204-217.

Payne, J. R., Clayton, J. R., McNabb, G. D. and Kirstein, B. E. (1991). Exxon Valdez oil weathering fate and behavior: Model predictions and field observations. Proceeding of the Oil Spill Conference, 641-654.

Pentti, R. (2005,01 de febrero). Ética de la Investigación. [Homepage] Consultado el día 15 de mayo de 2005 de la World Wide Web: <http://usuarios.iponet.es/casinada/arteolog> y <http://www2.uiah.fi/projects/metodi/>

Petróleos de Venezuela, S.A, Manufactura y Mercadeo. (2006). Características de crudos. Caracas, Venezuela.

Reineke, W. (2001). Biodegradation and Persistence. Handbook of Environmental Chemistry. 2, 1-161.

Rocha C , Infante C. (1997). Enhanced oily sludge biodegradation by a tension-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 615-619

Rodgers, R., Blumer, E. N., Freitas, M. A. and Marshall, A.G. (2000). Complete compositional monitoring of the weathering of transportation fuels based on elemental composition from Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Envi. Sci & Tech. 34, 1671-1678.

Rodríguez, J.L y Sánchez, J. (2002). Biorremediación. Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. Universidad de Oviedo 2002. España.

Salas, A y Casanova, E. (1995). Evaluación de la disponibilidad de fósforo y transformación de fertilizantes fosfatados en suelos evolucionados de importancia agrícola en Venezuela i. Parámetros de suelo. UCV, Maracay. Agronomía Trop. 45(2):247-264.

Sellers K. (1999). Fundamentals of hazardous waste site remediation. Lewis Publishers. 319 pp.

Song, H., Wang, X y Bartha, R. (1990). Biorremediation potencial of terrestrial fuel spills. Applied and Environmental Microbiology. 56: 652-656.

Spiegel, M., Schiller, J. y Srinivasan R. (2003). Probabilidad y Estadística. Serie Shaum. Mexico. Ediciones Mc Graw Hill. 416.p.

Stauwer, R., Lewis, J. and Philopks M. (1989). Oil medium biodegradation. Journal of Ecology Environment. 5 (3) 89-96.

Swannell, R., Lee, K. y McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiol Rev 60: 342-365.

Tan CK, Gómez G, Ríos Y, Guentzel MN and Hudson J. 1990. Degradation of diesel fuel with in situ microorganisms. Superfund '90. Proceedings of the 11th. National Conference. November 26-28; 776-779

Testa, M. (1994). Geological Aspects of Hazardous Waste Management. Lewis Publishers. USA.

Thompson, L. y Troeh. F. (1982). Los suelos y su fertilidad. Barcelona, Ediciones Reverte, 633 p.

Velandrino, A., y Romero, A. (2001). Normas APA sobre Material Numérico, Estadístico y Matemático a partir de la Publication manual of the American Psychological Association. (5th ed). Washington, DC: American Psychological Association. [Homepage] Consultado el día 15 de julio de 2006 de la World Wide Web: <http://www.um.es/analesps/apaestad/index.html#26>.

Velásquez, A., e Iniestra, S.(1998). "Estudio del comportamiento de hidrocarburos en suelos del tipo adosol en columnas empacadas a nivel de laboratorio". Tesis de grado para obtener el Título de Ingeniera Química. Fac. Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Viale, R. e Infante, C. (1997). Protocolo para medir producción de CO₂ en suelo. Venezuela. Documento Técnico. INTEVEP.

Volke, T. y Velasco, J. (2003). Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. México. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana de México. 36 p.

Volke, T. y Velasco, J. (2003). El composteo: Una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Gaceta ecológica 066. Instituto Nacional de Ecología. D.F. Mexico. 41-53 pp.

Von Fahnstock, F., Wickramanayake , B. Michael, W. y Dratzke, R. (1998). Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Battelle Press. Editions. 163 pp.

Weller, M., Simon, E., Pfortner, P., Dosch, M., Niessner, R. (1998) Detection of bound residues by enzyme immunoassay. En: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH, DFG Publ, Report No. 2.

9 Anexos

Anexo A. Registro fotográfico de la extracción de crudo con el método Soxhlet

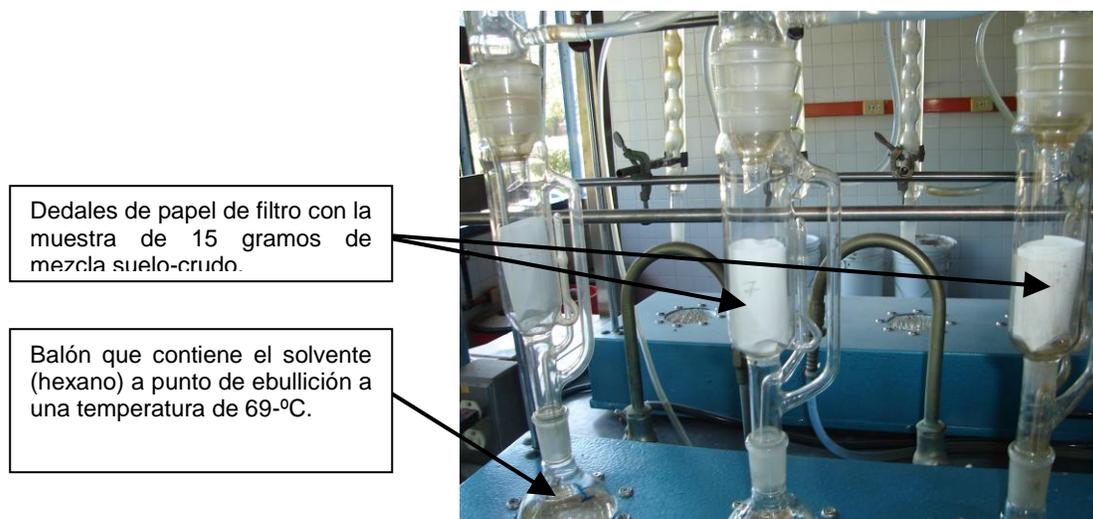


Figura A1. Aspecto de los dedales con la muestra de suelo pulverizada, preparado para comenzar el proceso de extracción con hexano.

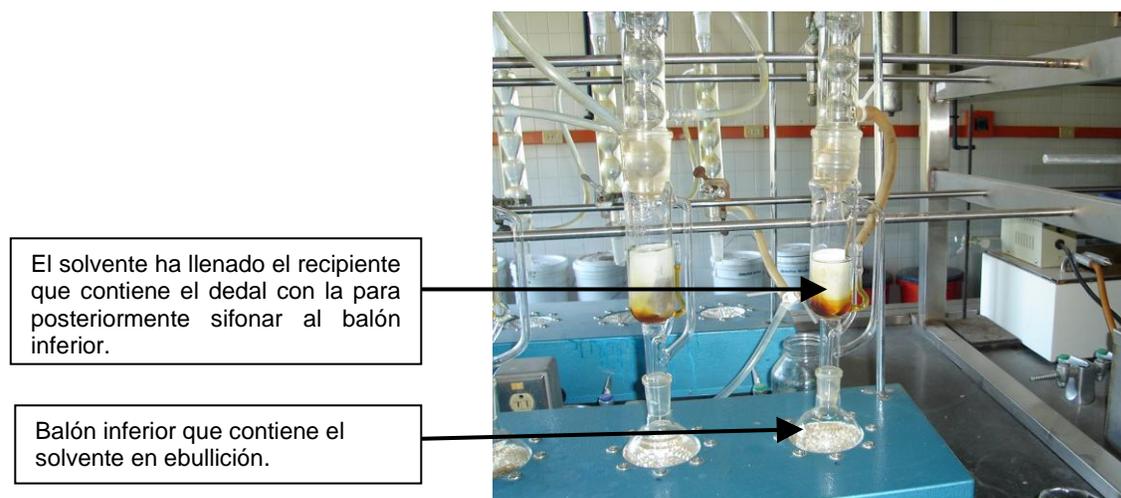


Figura A2.- Proceso de extracción con hexano.

El solvente ha llenado el recipiente que contiene el dedal con la para posteriormente sifonar al balón inferior.

Balón inferior que contiene el solvente que ha pasado por la muestra.

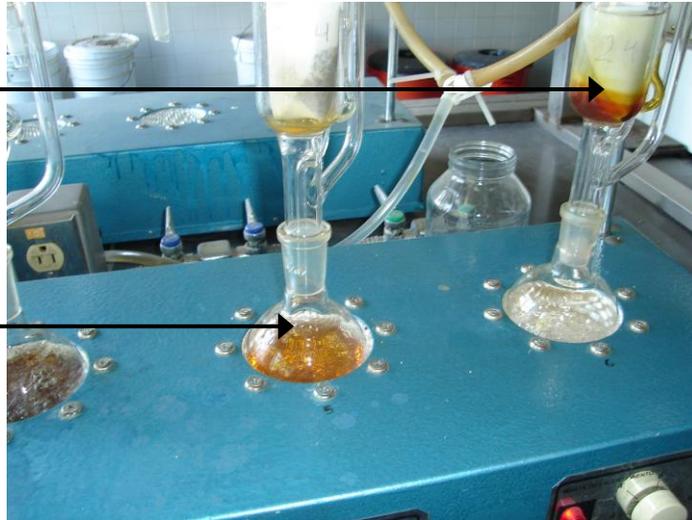


Figura A3- Proceso de extracción continua.

Solvente sin color indicando la culminación del proceso de extracción de crudo.

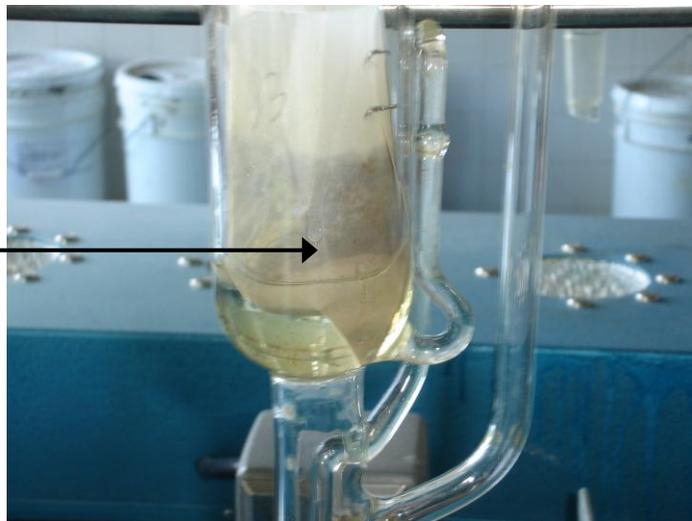


Figura A4. Solvente incoloro luego de una hora y treinta cinco minutos (1:35 min).

Filtro con sulfato de magnesio para eliminar partículas de agua

Balón con el solvente (hexano) y el crudo extraído de la muestra

Bandeja para coleccionar y secar la muestra de solvente y crudo extraído



A5. Proceso de filtrado del solvente con el crudo extraído de las muestras de suelo.



A6.- Introducción del solvente en la estufa para recuperar el crudo extraído.

Anexo B. Cantidades de crudo removido con el método Soxhlet en los tratamientos evaluados y porcentajes de degradación.

	Tratamiento	0 días		15 días				45 días				60 días			
		(1)	(2)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
T1	abiótico	0,03333	0	0,03127	0,00206	5,48	5,76	0,03024	0,00309	11,75	14,86	0,02666	0,00667	20,02	23,5
T1	abiótico	0,03336	0	0,03045	0,00250	8,70		0,03309	0,00027	16,74		0,02692	0,00644	19,31	
T1	abiótico	0,03333	0	0,03254	0,00079	2,38		0,03329	0,00005	10,21		0,02460	0,00873	26,20	
T2	Sin fertilizar	0,04274	0	0,02758	0,01516	35,46	30,71	0,01041	0,03233	75,65	69,33	0,01285	0,02988	69,93	72,29
T2	Sin fertilizar	0,04167	0	0,02848	0,01319	31,65		0,01247	0,02919	70,06		0,00720	0,03446	82,71	
T2	Sin fertilizar	0,03704	0	0,02777	0,00926	25,01		0,01397	0,02307	62,29		0,01359	0,02345	63,31	
T3	N+P+K1	0,03065	0	0,02377	0,00688	22,46	22,98	0,01464	0,01601	52,22	57,06	0,00237	0,02828	92,26	92,67
T3	N+P+K1	0,03101	0	0,02284	0,00817	26,36		0,01273	0,01828	58,95		0,00273	0,02828	91,19	
T3	N+P+K1	0,02930	0	0,02341	0,00589	20,11		0,01172	0,01759	60,02		0,00160	0,02771	94,55	
T4	N+P+K2	0,03831	0	0,02676	0,01156	30,16	25,26	0,00909	0,02922	76,28	85,94	0,00249	0,03582	93,50	96,35
T4	N+P+K2	0,03968	0	0,02836	0,01132	28,53		0,00419	0,03549	89,43		0,00054	0,03915	98,65	
T4	N+P+K2	0,03968	0	0,03290	0,00679	17,10		0,00313	0,03655	92,11		0,00126	0,03842	96,82	
T5	N+P+K3	0,04878	0	0,02723	0,02155	44,18	29,77	0,00759	0,04119	84,44	77,84	0,00217	0,04661	95,55	94,10
T5	N+P+K3	0,02996	0	0,02437	0,00560	18,68		0,00830	0,02167	72,31		0,00180	0,02816	93,98	
T5	N+P+K3	0,03876	0	0,02850	0,01026	26,46		0,00901	0,02975	76,75		0,00295	0,03581	92,39	
T6	K1	0,03831	0	0,02248	0,01584	41,33	19,25	0,01858	0,01974	51,51	64,94	0,00576	0,03255	84,95	81,56
T6	K1	0,03137	0	0,02807	0,00330	10,52		0,00743	0,02394	76,32		0,00601	0,02537	80,86	
T6	K1	0,03101	0	0,02918	0,00183	5,89		0,01023	0,02077	66,99		0,00679	0,02422	78,10	
T7	K2	0,03831	0	0,02610	0,01221	31,88	27,03	0,01054	0,02778	72,50	80,00	0,00602	0,03229	84,29	83,09
T7	K2	0,03663	0	0,02782	0,00881	24,05		0,00909	0,02754	75,19		0,00628	0,03035	82,85	
T7	K2	0,03663	0	0,02741	0,00922	25,16		0,00282	0,03381	92,31		0,00655	0,03008	82,13	
T8	K3	0,03101	0	0,02949	0,00151	4,88	17,32	0,00781	0,02320	74,82	76,26	0,00484	0,02616	84,38	85,28
T8	K3	0,03704	0	0,02910	0,00794	21,43		0,00440	0,03264	88,12		0,00598	0,03106	83,85	
T8	K3	0,03831	0	0,02848	0,00983	25,66		0,01309	0,02523	65,85		0,00475	0,03356	87,60	
T9	P+N	0,03876	0	0,02544	0,01332	34,36	28,89	0,00797	0,03079	79,43	74,75	0,00588	0,03288	84,84	84,06
T9	P+N	0,04065	0	0,02781	0,01284	31,58		0,00973	0,03092	76,06		0,00677	0,03388	83,34	
T9	P+N	0,03509	0	0,02781	0,00728	20,74		0,01097	0,02412	68,75		0,00561	0,02947	84,00	

(1) g crudo/g de suelo, (2) Cantidad de crudo removido, (3) Porcentaje de degradación del crudo (4) Promedio de los porcentajes

Anexo C. Valores promedios y desviaciones estándar para tres mediciones independientes de los porcentajes de biodegradación.

		Porcentaje de biodegradación															
		0 días				15 días				45 días				60 días			
Tratamiento		%	μ	DT (SD)	$\mu \pm$ DT (SD)	%	μ	DT (SD)	$\mu \pm$ DT (SD)	%	μ	DT (SD)	$\mu \pm$ DT (SD)	%	μ	DT (SD)	$\mu \pm$ DT (SD)
T1	Abiótico	0	0	0	0	6,19	7,64	6,12	13,75	9,275	5,45	4,74	10,20	20,02	23,51	3,17	26,67
T1	Abiótico	0			0	14,35			1,52	6,937			0,71	24,30			20,34
T1	Abiótico	0				2,38				0,143				26,20			
T2	Sin fertilizantes	0	0	0	0	35,46	30,71	5,29	36,00	75,648	69,33	6,71	76,04	69,93	71,98	9,86	81,84
T2	Sin fertilizantes	0			0	31,65			25,42	70,064			62,62	82,71			62,12
T2	Sin fertilizantes	0				25,01				62,288				63,31			
T3	N+P+K1	0	0	0	0	22,46	22,98	3,15	26,13	52,221	57,06	4,23	61,29	92,26	92,67	1,72	94,39
T3	N+P+K1	0			0	26,36			19,82	58,950			52,84	91,19			90,95
T3	N+P+K1	0				20,11				60,016				94,55			
T4	N+P+K2	0	0	0	0	30,16	25,26	7,11	32,38	76,276	85,94	8,48	94,42	93,50	96,32	2,61	98,93
T4	N+P+K2	0			0	28,53			18,15	89,435			77,46	98,65			93,71
T4	N+P+K2	0				17,10				92,115				96,82			
T5	N+P+K3	0	0	0	0	44,18	29,77	13,07	42,84	84,443	77,84	6,14	83,97	95,55	93,97	1,58	95,55
T5	N+P+K3	0			0	18,68			16,70	72,313			71,70	93,98			92,39
T5	N+P+K3	0				26,46				76,755				92,39			
T6	K1	0	0	0	0	41,33	19,25	19,27	38,51	51,509	64,94	12,53	77,47	84,95	81,30	3,45	84,75
T6	K1	0			0	10,52			-0,02	76,317			52,41	80,86			77,85
T6	K1	0				5,89				66,995				78,10			
T7	K2	0	0	0	0	31,88	27,03	4,23	31,26	72,499	80,00	10,75	90,75	84,29	83,09	1,10	84,19
T7	K2	0			0	24,05			22,80	75,190			69,25	82,85			81,99
T7	K2	0				25,16				92,314				82,13			
T8	K3	0	0	0	0	4,88	17,32	10,98	28,30	74,817	76,26	11,21	87,47	84,38	85,28	2,03	87,31
T8	K3	0			0	21,43			6,35	88,122			65,05	83,85			83,25
T8	K3	0				25,66				65,845				87,60			
T9	P+N	0	0	0	0	34,36	28,89	7,20	36,09	79,430	74,75	5,46	80,21	84,84	84,06	0,75	84,81
T9	P+N	0			0	31,58			21,69	76,058			69,29	83,34			83,31
T9	P+N	0				20,74				68,749				84,00			

% = Porcentaje de biodegradación

μ = Media

DT (SD) = Desviación típica (Standard deviation)

$\mu \pm$ DT (SD) = Media +/- Desviación típica (Standard deviation)

Anexo D. Resultados totales de la producción de CO₂ por tratamiento durante los 60 días del experimento.

Respirómetros (mg CO ₂ /m ² .h = (B-V)*N*Z)										
	Días/ Muestra	0	7	14	21	28	35	45	52	60
T1	Control Abiótico	0,82	2,05	1,95	1,84	1,23	4,51	4,89	2,65	2,24
T1	Control Abiótico	1,23	1,43	2,87	1,43	1,43	3,07	4,48	4,08	2,65
T1	Control Abiótico	1,02	1,43	1,23	1,43	1,64	4,30	2,45	3,67	3,06
T2	Sólo crudo sin fertilizar	8,20	12,30	18,85	27,57	20,90	17,82	16,10	12,43	8,76
T2	Sólo crudo sin fertilizar	10,25	14,35	20,90	24,10	16,60	19,87	18,75	11,41	5,91
T2	Sólo crudo sin fertilizar	5,12	9,22	20,90	25,33	20,22	18,59	17,32	8,36	5,30
T3	N+P+K1 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 1 C:K 200:1)	15,98	29,92	29,31	33,29	24,92	27,37	23,23	20,58	15,08
T3	N+P+K1 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 1 C:K 200:1)	13,94	29,31	29,10	30,43	26,35	25,33	23,64	21,60	14,06
T3	N+P+K1 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 1 C:K 200:1)	16,80	30,12	31,56	30,64	26,76	26,14	23,84	22,01	12,84
T4	N+P+K2 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 2 C:K 400:1)	8,20	29,10	27,26	31,66	30,03	28,53	24,25	25,27	12,84
T4	N+P+K2 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 2 C:K 400:1)	13,94	28,90	28,28	32,48	27,78	25,74	21,19	21,81	18,54
T4	N+P+K2 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 2 C:K 400:1)	15,37	29,10	27,87	34,32	29,41	30,16	24,86	17,53	18,14
T5	N+P+K3 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 3 C:K 600:1)	12,50	29,10	31,76	34,32	27,78	24,05	13,04	19,16	11,00
T5	N+P+K3 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 3 C:K 600:1)	7,38	30,12	29,10	31,86	26,55	27,92	20,99	19,97	11,41
T5	N+P+K3 (C:N 60:1, C:P 800:1; dosis 3 C:K 600:1)	6,15	29,51	31,05	36,15	27,57	24,72	24,05	17,93	10,80
T6	K1 dosis 1 C:K 200:1	8,20	16,60	19,26	24,51	20,22	20,17	13,45	7,54	7,95
T6	K1 dosis 1 C:K 200:1	14,35	16,80	19,67	23,69	18,38	15,90	13,86	7,74	7,34
T6	K1 dosis 1 C:K 200:1	12,30	16,60	19,26	25,94	21,65	21,60	10,19	8,97	8,56
T7	K2 dosis 2 C:K 400:1	8,20	17,42	19,06	24,72	18,38	18,34	13,86	7,95	6,32
T7	K2 dosis 2 C:K 400:1	9,02	17,21	19,88	26,96	17,36	13,65	12,63	7,34	6,52
T7	K2 dosis 2 C:K 400:1	10,45	16,60	21,52	25,74	18,18	17,32	16,10	9,17	10,19
T8	K3 dosis 3 C:K 600:1	8,20	16,80	22,13	24,10	17,97	11,62	12,84	11,82	6,72
T8	K3 dosis 3 C:K 600:1	6,15	15,98	20,70	25,94	14,91	14,27	13,25	7,13	8,76
T8	K3 dosis 3 C:K 600:1	5,74	16,39	23,36	24,72	15,52	16,30	12,43	4,28	6,72
T9	P+N (C:N 60:1)	13,12	29,72	28,49	32,89	28,60	9,40	20,17	23,03	18,54
T9	P+N (C:N 60:1)	12,09	31,76	31,15	36,56	29,62	33,09	18,75	14,47	14,88
T9	P+N (C:N 60:1)	12,50	29,92	31,76	34,93	24,72	30,23	19,56	13,45	14,88

Anexo E. Análisis estadístico para la cinética de remoción de crudo de los nueve tratamientos evaluados durante los 60 días de ensayo.

Para el caso de las cantidades de crudo degradado por tratamiento expresadas en mg, el experimento fue repetido en cuatro tiempos (0, 15, 45 y 60 días), según lo establecido en el método para series de experimentos repetidos en el tiempo (Chapín, 1998). Asimismo, se aplicó el Procedimiento GLM para el análisis de medidas repetidas de la varianza, con el Tests de esfericidad en la que el Criterio de Mauchly, que permitió definir la significancia entre los valores de tiempo y tratamiento. De esta forma se demostró la interacción tiempo – tratamiento, dado que los tratamientos evaluados no presentaron el mismo comportamiento en el tiempo, lo cual fue afirmado con el Test de hipótesis univariante para efectos de Within.

El análisis estadístico con software STATISTIX versión 8.0, aplicado a los datos de los porcentajes de degradación del crudo a los 0 y 15 días, que se muestra en la Tablas E1 y E2, demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en estos tiempos, presentando un $P = 0.0946$ ($p > 0,05$), y un coeficiente de variación (CV) de 6,83, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados.

Tabla E1. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los porcentajes de degradación a primer día de tratamiento (3 repeticiones).

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
1	0	a
2	0	a
3	0	a
4	0	a
5	0	a
6	0	a
7	0	a
8	0	a
9	0	a

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Tabla E2. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los porcentajes de degradación a los 15 días de tratamiento (3 repeticiones).

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
2	30,707	a
5	29,773	a
9	28,893	a
7	27,030	a
4	25,263	a
3	22,977	a
6	19,247	a
8	17,323	a
1	7,640	a

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

La Tabla E3 muestra las comparaciones de medias de los datos de la tercera medición, realizada a los 45 días, revelan diferencias significativas entre los porcentajes de degradación de los tratamientos, ($P= 0.0000$ para un $\alpha =0, 05$, $p <0,05$) y un CV 26, 27, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados.

Se diferencian claramente tres grupos de medias, el de mayor degradación conformado por el T4 presenta la mayor tasa de degradación con un 85, 94%, el segundo grupo de tratamientos (T7, T5, T8, T9, T2, T6, T3), no revela estadísticamente diferencias en cuanto a las tasas de degradación, cuyos porcentajes oscilan entre 57 y 80 %; y finalmente el tratamiento con menor degradación, T1, con 5,45 %.

Tabla E3. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los porcentajes de degradación a 45 días de tratamiento (3 repeticiones).

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	85.940	a
7	80.000	ab
5	77.833	ab
8	76.263	ab
9	74.747	ab
2	69.333	ab
6	64.940	ab
3	57.063	ab
1	5.453	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

El análisis estadístico para la cuarta y última extracción realizada a los 60 días (Tabla E4), indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0.0000$, $\alpha =0, 05$, $p <0,05$), notándose que para este tiempo, el tratamiento con mayor tasa de degradación fue el T4, con una tasa de 96,3 %. T3 y T5 presentaron estadísticamente un comportamiento similar. Finalmente la menor tasa aparece para el T1.

Tabla E4. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los porcentajes de degradación a 60 días de tratamiento (3 repeticiones).

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	96,323	a
5	93,973	ab
3	92,667	ab
8	85,277	abc
9	84,060	bc
7	83,090	bcd
6	81,303	cd
2	71,983	cd
1	23,507	e

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Anexo F. Análisis estadístico para la producción de CO₂ en los nueve tratamientos durante los 60 días de ensayo

Las mediciones de cantidad de CO₂ producida por compostero, (prueba de respirometría) se realizaron en nueve tiempos cada semana durante dos meses, por lo tanto fue necesario analizar el factor tiempo en cada experimento, según el método para series de experimentos repetidos en el tiempo (Chacín, 1998).

Asimismo, se aplicó el Procedimiento GLM para el análisis de medidas repetidas de la varianza, con el Tests de esfericidad en la que el Criterio de Mauchly, permitió definir la significancia entre los valores de tiempo y tratamiento. e esta forma se demostró la interacción tiempo – tratamiento, dado que los tratamientos evaluados, tanto para las mediciones de cantidad de crudo degradado como para las de respirometría no presentaron el mismo comportamiento en el tiempo, lo cual fue afirmado con el Test de hipótesis univariante para efectos de Within.

En la Tabla F1, se observa el análisis realizado a los datos obtenidos en primera medición, revela que para todos los tratamientos hay diferencias significativas en el comportamiento de los tratamientos ($P= 0.000$, $\alpha= 0,05$, $p <0,05$), para un coeficiente de variación de 24,4, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados.

Se evidencia la formación de tres grupos de medias (Tabla F1), uno con mayores promedios de producción de CO₂, en el que se incluyen los tratamientos 3, 9, 4, 6 y 7; otro grupo en el que la producción de CO₂ es intermedia (T5, T2 y T8); y el otro con el promedio más bajo correspondiente al T1. El mayor promedio de producción de CO₂ se presentó en el T3, seguido por los tratamientos T9 y T4.

Tabla F1. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida al día cero del experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
3	15,575	a
9	12,569	ab
4	12,501	ab
6	11,613	ab
7	9,2220	ab
5	8,6757	b
2	7,8557	b
8	6,6943	bc
1	1,0250	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los resultados de la prueba de medias (Tukey), mostrados en la Tabla F2, para los datos tomados a los siete días, indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P= 0.0000$, $p <0,05$), el CV fue de 4,89, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados. A partir de este tiempo comienza a diferenciarse la producción de CO₂, en

cuatro grupos de medias. Uno con la producción más alta, representado por los tratamientos T3, T4, T5 y T9, luego, un segundo con una producción intermedia (T7, T6 y T8), el tercero con una producción baja (T2) y un último grupo de medias que presentó la más baja, es decir el tratamiento abiótico (T1).

Tabla F2. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a los 7 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Media	Grupos homogéneos
9	30,466	a
3	29,783	a
5	29,578	a
4	29,032	a
7	17,077	b
6	16,667	b
8	16,395	b
2	11,954	c
1	1,6397	d

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los resultados presentados en la Tabla F3, para los catorce días de medición), en la que la prueba de medias (Tukey) indica que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0.0000$, $p<0,05$, CV de 5,24, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados), diferenciándose tres grupos de medias. Los tratamientos T3, T4, T5 y T9, presentaron un comportamiento muy similar, con una producción alta de CO₂, siendo la más alta para el T5. Otro grupo de tratamientos (T2, T6, T7 y T8) presentó una producción intermedia de CO₂, y finalmente el T1 con una producción muy baja.

Tabla F3. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a la 14 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
5	30,637	a
9	30,467	a
3	29,988	a
4	27,803	a
8	22,064	b
2	20,220	b
7	20,152	b
6	19,400	b
1	2,0153	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

En la Tabla F4, se presentan los resultados de la prueba de medias (Tukey) 21 días de medición), la que indica que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0.0000$, $p<0,05$, para un CV de 5,24, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados). Se

mantienen los tres grupos de medias de los tiempos anteriores. Los tratamientos T3, T4, T5 y T9, presentaron una alta producción de CO₂ comparados con los otros tratamientos. Los tratamientos T2, T6, T7 y T8 una producción intermedia y T1 una baja producción muy baja.

Tabla F4. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a los 21 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
9	34,792	a
5	34,111	a
4	32,817	a
3	31,456	a
7	25,804	b
2	25,668	b
8	24,919	b
6	24,715	b
1	1,5660	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los análisis estadísticos para los datos obtenidos para 2 días de medición (Tabla F5) a través de la prueba de medias (Tukey) indican que hubo diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.0000$, $p<0,05$, CV 7.33, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados). Se aprecian los tres grupos homogéneos de medias, una producción de CO₂ alta para los tratamientos T3, T4, T5 y T9, otro grupo de tratamientos (T2, T6, T7 y T8) con una producción media de CO₂, y el de producción baja (T1).

Tabla F5. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a 28 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	29,073	a
9	27,643	a
5	27,303	a
3	26,009	a
6	20,085	b
2	19,239	b
7	17,975	b
8	16,137	b
1	1,4340	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

La prueba de medias (Tukey) para los datos obtenidos para 35 días (Tabla F6) indica que hubo diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.0002$, $p<0,05$, CV 24.00). Se muestran cuatro grupos de medias, sin embargo, el mejor tratamiento, es decir el que presentó la mayor producción de CO₂ es el T4. Luego los tratamientos 2, 3, 5, 6 y 9, presentaron una producción media. Mientras T7 y T8, presentaron un comportamiento

muy similar (menos producción de CO₂) y el T1 con la menor producción de todos los tratamientos.

Tabla F6. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a 35 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	28,142	a
3	26,281	ab
5	25,560	ab
9	24,239	ab
6	19,224	ab
2	18,762	ab
7	16,439	abc
8	14,061	bc
1	3,9610	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los análisis estadísticos para los datos obtenidos para 45 días la prueba de medias (Tukey), presentados en la Tabla F7, indican que hubo diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.0000$, $p<0,05$), CV 14,09, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados). Se distinguen 5 grupos de medias. Los tratamientos 3 y 4 presentan la mayor producción de CO₂, luego los promedios de producción presentan un orden decreciente para los tratamientos T9, T5, T2, T9, T7. Los tratamientos 6, 7 y 8 presentan una producción muy similar, mas baja que los tratamientos mencionados anteriormente, mientras la menor producción de CO₂, se mantiene para el T1.

Tabla F7. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a los 45 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
3	23,571	a
4	23,436	a
9	19,496	ab
5	19,360	abc
2	17,390	abcd
7	14,197	bcd
8	12,839	cd
6	12,499	d
1	3,9397	e

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los análisis estadísticos para los datos obtenidos para la 52 días de medición), indican que hubo diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.0002$, $p<0,05$), CV 20,7, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados). En la Tabla F8 se observan tres grupos de medias los tratamientos 3, 4 y 5, presentan la mayor producción de CO₂, luego se

produce un comportamiento similar para los tratamientos 9 y 2, producción con una producción menor que los anteriores, y un grupo conformado por los demás tratamientos cuya producción es estadísticamente homogénea y menor (T1, T2, T6, T7 y T8).

Tabla F8. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida a los 52 días de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	21,534	a
3	21,398	a
5	19,020	a
9	16,982	ab
2	10,733	bc
7	8,1513	c
6	8,0837	c
8	7,7443	c
1	3,4643	c

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.

Los resultados de la 60 días de medición), presentados en la Tabla F9, revela que hay diferencias significativas en la producción de CO₂ entre los tratamientos ((P= 0.0000, p<0,05), un CV 17.02, indicando esto el acertado control de las posibles fuentes de variación ajenas al experimento y la confiabilidad de los resultados). En la Tabla F9 se evidencia un descenso en la producción de CO₂ en todos los tratamientos, sin embargo se mantienen tres grupos. Uno que presenta la mayor producción de CO₂ conformado por los tratamientos 3, 4 y 5, luego se produce un comportamiento similar para los tratamientos 9 y 2, con una producción intermedia, y el tratamiento 1 mantiene su baja producción de CO₂.

Tabla F9. Resultados de la Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) aplicada a los datos de la cantidad de CO₂ producida 60 días de de experimento para tres repeticiones.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
4	16,507	a
9	16,100	a
3	13,993	ab
5	11,073	bc
6	7,9477	c
7	7,6757	c
8	7,4043	cd
2	6,6570	cd
1	2,6493	d

Fuente: Software Statistix 8.0, Alfa 0.05.