

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE INGENIERIA
DOCTORADO INDIVIDUALIZADO EN CIENCIAS DE LA
INGENIERIA**

**BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ASFALTENO
PROVENIENTE DE LOS CRUDOS HAMACA Y GUAFITA**

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela para optar
al título de Doctor en Ciencias de la
Ingeniería por la Lic. **Fernández González
Celeste Katarina**

Caracas, junio 2012.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE INGENIERIA
DOCTORADO INDIVIDUALIZADO EN CIENCIAS DE LA
INGENIERIA**

**BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ASFALTENO
PROVENIENTE DE LOS CRUDOS HAMACA Y GUAFITA**

Tutor académico: Dr. Henry Labrador Sánchez

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela para optar
al título de Doctor en Ciencias de la
Ingeniería por la Lic. **Fernández González
Celeste Katarina**

Caracas, junio 2012.

Celeste Fernández, 2012

Hecho el Depósito de Ley

Depósito Legal lft4872012620693



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE INGENIERÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Comisión de Estudios
de Postgrado

VEREDICTO

[Handwritten signature]
Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ingeniería y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: **CELESTE KATARINA FERNÁNDEZ GONZÁLEZ** C.I. **5385887**, bajo el título **“BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ASFALTENO PROVENIENTE DE LOS CRUDOS HAMACA Y GUAFITA”**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**, dejan constancia de lo siguiente:

[Handwritten signature]
1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día lunes 11 de junio del 2012 a las 11 am, para que la Lic. Celeste Katarina Fernández González lo defendiera en forma pública, lo que se hizo en la Auleta de Postgrado ubicada en la escuela básica de la Facultad de Ingeniería, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió aprobarlo, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado presenta una contribución importante al estado de la biodegradación de los asfaltos provenientes de crudos venezolanos. Lo más relevante es el aislamiento e identificación de los microorganismos degradadores provenientes de los crudos Ayacucho y Guafita.

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los once días del mes de junio del año 2012, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como presidente del jurado Dr. Henry Labrador Sánchez.

Carlos E Canelón M C.I. 12.851.881
Institución: PDVSA Intevep.
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

Miguel Ángel Luís C.I. 7.221.077
Institución: Universidad de Carabobo
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

Manuel Caetano Sousa
C.I. 4360691
Institución: Universidad Central de
Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado

Aniello Rizzo C.I.6.265.089
Institución: Universidad Nacional
Experimental Politécnica
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado

Henry Labrador Sánchez C.I. 6.728.079
Institución: Universidad de Carabobo
Tutor

HL/11/06/2012



Dedicatoria

A Dios

A mi esposito y mis lindas hijas

A nuestras familias

**A todos aquellos que participaron activamente en la
culminación de esta investigación.**

Fernández G Celeste K.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera general a las siguientes personas e instituciones:

En primer lugar a mi tutor Dr. Henry Labrador por transmitir toda su experiencia así como su conocimiento científico.

Al Comité doctoral integrado por los Profesores: Dr. Héctor Bastardo, Dr. Luís García, y la Dra. Zulay Niño, por compartir sus conocimientos, excelente atención y colaboración.

También quisiera agradecer al personal de Postgrado, en forma especial a la señora Ana Colarusso por su ayuda, comprensión y su sentido humano en toda la carrera.

Al Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC): Dr. Luis Medina, Dr. Oscar Valbuena, Lic. Noja Izzeddin y a todo el personal del centro por su amable receptividad y por los conocimientos impartidos.

Al Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ingeniería: al personal docente en especial al Lic. Mario Rossi por su colaboración durante la fase experimental y transmitir toda su experiencia.

También al Laboratorio de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología: Dr. Juan Carlos Pereira y al Lic. Víctor Pérez quienes compartieron y cooperaron en la investigación.

A todos los que forman parte del Instituto de Edafología de la Universidad Central de Venezuela en especial a la profesora Deyanira Lobo.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C): Sr. Alberto Fuentes, Dra. Sara Peckerar, gracias por su excelente atención y colaboración.

Al Lumbricario de la Universidad Central de Venezuela por compartir sus conocimientos con dedicación y buena disposición.

Muy especialmente agradezco al profesor Alberto Mieres Pitre, por su respaldo en todo momento y a todos aquellos que hayan hecho posible la realización de esta investigación, y que por razones ajenas a mi voluntad, hayan sido omitidos, a todos mis más sincera gratitud.

Fernández G Celeste K.

Fernández G Celeste K.

BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ASFALTENO PROVENIENTE DE LOS CRUDOS HAMACA Y GUAFITA

Tutor Académico: Prof. Henry Labrador Sánchez.

**Tesis Doctoral. Caracas, Universidad Central Venezuela UCV. Facultad de
Ingeniería. Doctorado Individualizado en Ciencias de la Ingeniería. Año 2012,
283p.**

Palabras clave: Asfalteno, Biorremediación, *Eisenia foétida*, Microorganismos

Resumen.

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el proceso de degradación de los asfaltenos provenientes de los crudos Hamaca (Ayacucho) y Guafita presentes en un suelo, mediante la implementación de las técnicas de biorremediación y lombricultura.

Este estudio fue monitoreado durante 49 días y se manejó básicamente dos tipos de tratamientos con dos agentes bioestimulantes distintos: microorganismos aislados de cada crudo degradador de asfalteno y macroorganismos de *Eisenia foétida*, la biorremediación se llevó a cabo en cuatro microcosmos, con tres réplicas y un patrón como control por tratamiento y se realizó el seguimiento de las siguientes variables, carga bacteriana (UFC/g), potencial de acidez (pH), porcentaje de humedad del suelo (%H), porcentaje de degradación del contaminante y producción de CO₂. Los cambios estructurales del asfalteno en el suelo se determinaron mediante análisis elementales, espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 RMN-¹³C, espectro de infrarrojo con transformada de Fourier FTI, comparándolo con el día cero. Para la evaluación estadística de los resultados se empleó el software Statistix 8.0, con el cual se realizó un análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar, y se aplicaron las pruebas de Tukey y de Dunnett, para verificar la homogeneidad entre los tratamientos y establecer comparaciones entre cada tratamiento y su patrón.

Entre los resultados más relevantes está el aislamiento e identificación de los microorganismos degradadores de asfalteno, como son la *Pseudomonas aeruginosa* para el crudo Hamaca (Ayacucho) y *Citrobacter freundii*, *Citrobacter spp*,

Enterobacter agglomerans, *Pseudomonas spp* y *Pseudomonas aeruginosa*, para el crudo Guafita.

El porcentaje de degradación obtenido en los tratamientos con *Eisenia foétida* para el asfalteno Hamaca (Ayacucho), fue de 92% m/m en comparación con el tratamiento de microorganismos aislados 56 % m/m, y en el asfalteno Guafita, la fracción degradada con lombrices fue de 83 % m/m, y con bacterias de un 76 % m/m. Estos resultados coinciden con los estudios espectroscópicos y análisis elemental, que indican que la estructura promedio de los asfaltenos Hamaca (Ayacucho) y Guafita presentan diferencias con respecto al patrón.

El análisis estadístico reflejó diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a los porcentajes de degradación, humedad en el suelo y producción de CO₂

Con los tratamientos la prueba de Tukey se concluye que los valores de degradación de asfalteno, humedad, respiración celular y potencial de acidez, para el tratamiento con *Eisenia foétida* y con cepas bacterianas aisladas, muestra homogeneidad para ambos crudos, no arrojando ninguna diferencia significativa en cada tratamiento, pero si presenta en algunos casos heterogeneidad con respecto a los microcosmos controles.

La prueba de Dunnet, mediante la cual se tomaron en cuenta las diferencias significativas de cada tratamiento con respecto a su microcosmo patrón o control. Al aplicar la prueba se determinó que existen diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de degradación y respiración celular de cada tratamiento, con su respectivo control para ambos crudos.

INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
INDICE	v
LISTA DE TABLA	ix
LISTA DE FIGURAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	6
EL PROBLEMA	7
1.1. Planteamiento del problema.....	7
1.2. Objetivos, Objetivo General, Objetivos Específicos.....	7,8
1.3. Justificación.....	8
1.4. Alcance.....	9
1.5. Aporte al conocimiento.....	9
CAPÍTULO II	10
MARCO TEÓRICO	11
2.1. Antecedentes.....	11
2.2 Bases teóricas.....	22
2.2.1 Generalidades del Petróleo.....	22
2.2.2 Biorremediación.....	25
2.2.3. Tratamiento biológico de suelos contaminados con petróleo.....	29
2.2.4. Biodegradabilidad del sustrato.....	31
2.2.5. Lombricultura.....	34
CAPÍTULO III	37
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	38
3.1. Materiales y Equipos.....	38
3.2. Métodos.....	39
3.2.1. Selección de un pool de bacterias a partir de diferentes crudos.	39
3.2.1.1. Preparación del medio de cultivo mineral.....	39
3.2.1.2. Preparación de los reactores con los crudo a diferentes grados API.....	39
3.2.2. Estudio de la capacidad degradadora de los distintos consorcios bacterianos provenientes de los diferentes crudos sobre asfaltenos, (Ensayo de factibilidad).....	40

INDICE GENERAL

	Página
3.2.2.1. Extracción de asfaltenos de los diferentes crudos extrapesado(Ayacucho) y mediano (Guafita).....	40
3.2.2.2. Obtención de un consorcio bacteriano degradador de asfalto.....	41
3.2.2.3. Aislamiento e identificación de las cepas más eficientes en la degradación de los asfaltenos.....	42
3.2.2.4. Capacidad biodegradadora de las cepas bacterianas aisladas en asfaltenos a través de parámetros fisicoquímicos en medio acuoso.....	42
3.2.3. (Fase metodológica 1). Ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio de la eficiencia de los consorcios bacterianos aislados y de <i>Eisenia foétida</i> en la degradación de suelos contaminados con asfalto	44
3.2.3.1. Determinación de las características fisicoquímicas del suelo, crudo y estiércol con el fin de conocer sus propiedades.....	44
3.2.3.1.1. Obtención de las muestras de suelo.....	44
3.2.3.1.2. Caracterización del suelo.....	45
3.2.3.1.3. Obtención del petróleo crudo.....	47
3.2.3.1.4. Propiedades fisicoquímicas del estiércol.....	51
3.2.3.2. (Fase metodológica 2). Estudio de los microcosmos con consorcios bacterianos aislados y <i>Esenia Foétida</i>	51
3.2.3.2.1. Proceso de encalado del suelo.....	51
3.2.3.2.2. Montaje de los microcosmos para los diferentes crudos.....	53
3.2.3.3. Evolución del crecimiento bacteriano en muestras de suelos contaminados con los diferentes asfalto y la relación entre fracción biodegradada a través del tiempo.....	57
3.2.3.3.1. Determinación del crecimiento bacteriano.....	57
3.2.3.3.2. Concentración de asfalto y degradación.....	57
3.2.4. Evaluación de la eficiencia del sistema de tratamiento biológico empleando las técnicas cromatográficas, infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C), relación de H/C y producción de CO ₂ respirometría.....	58
3.2.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos, con la finalidad de establecer las diferencias más significativas entre los diferentes tratamientos.....	60

INDICE GENERAL

		Página
	CAPÍTULO IV	62
	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
4.1.	Selección del pool de bacterias a partir de diferentes crudos.....	63
4.1.1.	Selección de bacterias degradadoras del crudo con diferentes grados API.....	63
4.2.	Estudio de la capacidad degradadora de los distintos consorcios bacterianos provenientes de diferentes crudos sobre asfaltenos, (Ensayo de factibilidad).....	64
4.2.1.	Extracción de asfaltenos de los diferentes crudos extrapesado (Ayacucho) y medianos (Guafita).....	64
4.2.2.	Obtención de un consorcio bacteriano degradador de asfalteno.....	64
4.2.3.	Aislamiento e identificación de las cepas más eficiente en la degradación de los asfaltenos.....	65
4.2.4.	Capacidad biodegradadora de las cepas bacterianas aisladas en asfaltenos a través de parámetros fisicoquímicos en medio acuoso.....	65
4.2.4.1.	Crudo Ayacucho.....	65
4.2.4.1.1.	Caracterización del asfalteno Ayacucho.....	67
4.2.4.1.1.1.	Espectros de FTIR.....	67
4.2.4.1.1.2.	Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C).....	69
4.2.4.1.1.3.	Análisis elemental.....	72
4.2.4.2.	Crudo Guafita.....	73
4.2.4.2.1.	Caracterización del asfalteno Guafita.....	74
4.2.4.2.1.1.	Espectros de FTIR.....	74
4.2.4.2.1.2.	Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C).....	76
4.2.4.2.1.3.	Análisis elemental.....	79
4.3.	Eficiencia de los consorcios bacterianos aislados y de <i>Eisenia foétida</i> en la degradación de suelos contaminados con asfalteno.....	80
4.3.1.	Determinación de las características fisicoquímicas del suelo, crudo y estiércol con el fin de conocer sus propiedades.....	80
4.3.1.1.	Caracterización del suelo.....	80
4.3.1.1.2.	Determinación de la capacidad de saturación del suelo ó capacidad de retención de agua (CRA).....	84
4.3.1.2.	Caracterización del crudo.....	84
4.3.1.3.	Caracterización del estiércol.....	85
4.3.2.	Estudios de los microcosmos con bacterias aisladas y <i>Esenia foétida</i>	85

INDICE GENERAL

	Página
4.3.2.1. Proceso de encalado del suelo.....	85
4.3.2.2. Montaje de los microcosmos para los diferentes crudos.....	87
4.3.2.3. Biorremediación del suelo contaminado utilizando consorcio bacteriano.....	87
4.3.2.4. Biorremediación del suelo contaminado utilizando macroorganismos de <i>Eisenia foétida</i>	88
4.3.2.5. Caracterización de los macronutrientes empleados en la biorremediación del suelo contaminado utilizando bacterias y crías de <i>Eisenia foétida</i> en el día cero.....	89
4.3.2.6. Potencial de acidez a través del tiempo.....	92
4.3.2.7. Humedad	92
4.3.2.8. Aireación.....	93
4.3.3. Evolución del crecimiento bacteriano en muestras de suelos contaminados con los diferentes asfaltos y la relación entre fracción biodegradable a través del tiempo.....	93
4.3.3.1. Crudo Guafita.....	93
4.3.3.2. Crudo Ayacucho.....	98
4.4. Evaluación de la eficiencia del sistema de tratamiento biológico empleando las técnicas cromatográficas, FTIR, RMN ¹³ C, relación de H/C y producción de CO ₂ respirometría.....	102
4.4.1. Análisis de FTIR de los asfaltos al final de cada tratamiento.....	102
4.4.2. Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN ¹³ C) de los asfaltos al final de cada tratamiento.....	109
4.4.3. Análisis elemental de los asfaltos al final de cada tratamiento.....	111
4.4.4. Producción de CO ₂ (respirometría)	114
4.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos entre los diferentes tratamientos.....	118
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	124
GLOSARIO.....	127
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	128
APÉNDICES.....	139
APÉNDICE A.....	139
APÉNDICE B.....	198
APÉNDICE C.....	213
APÉNDICE D.....	219
APÉNDICE E.....	245
APÉNDICE F.....	259

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
	CAPÍTULO II	
2.1	Pozo de origen y características de los crudos de petróleo.....	22
2.2	Fuentes primarias de carbono y energía para diversas clases de microorganismos.....	30
2.3	Intervalos de temperatura óptimas para el desarrollo de diversos géneros de bacterias.....	33
	CAPÍTULO III	
3.1	Variables necesarias para determinar la capacidad de retención de agua.....	47
3.2	Encalado del suelo virgen con Carbonato de Calcio (CaCO ₃).....	52
3.3	Composición de los microcosmos y sus respectivos controles asfalteno Ayacucho.....	55
3.4	Composición de los microcosmos y sus respectivos controles asfalteno Guafita.....	55
3.5	Codificaciones utilizadas para la introducción de las variables de salida a ser analizadas por el programa statistix 8.0 asfalteno Guafita.....	60
	CAPÍTULO IV	
4.1	Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Ayacucho en los días cero y catorce	72
4.2	Composición elemental del asfalteno Ayacucho en el ensayo de factibilidad.....	73
4.3	Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Guafita en los días cero y catorce.....	79
4.4	Composición elemental del asfalteno Guafita en el ensayo de factibilidad	80
4.5	Análisis textural del suelo virgen.....	81
4.6	Análisis fisicoquímicos del suelo virgen empleado en el proceso de biorremediación.....	83
4.7	Porcentajes de la caracterización del estiércol utilizado en la experimentación.....	85
4.8	Porcentajes de macroelementos presentes en los microcosmo y su relación	91
4.9	Peso total de la cantidad de lombrices en los microcosmos del asfalteno Guafita al inicio y al final del tratamiento	98
4.10	Peso total de la cantidad de lombrices en los microcosmos del asfalteno Ayacucho al inicio y al final del tratamiento.....	101

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
4.11	Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Guafita al inicio y al final del tratamiento.....	109
4.12	Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Ayacucho al inicio y al final del tratamiento	111
4.13	Composición del asfalteno Guafita al inicio y al final del tratamiento	112
4.14	Composición del asfalteno Ayacucho al inicio y al final del tratamiento.....	114
4.15	Comparación de los valores de significancia calculada y predefinida para las diversas variables de salida determinadas.....	119
4.16	Parámetros de eficiencia del diseño en bloques completos al azar para cada variable de salida determinada	120
4.17	Valores de la significancia calculada en la verificación del supuesto de normalidad mediante la prueba de shapiro-wilk.....	122
A.1	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de asfaltenos presentes en el crudo Ayacucho.....	140
A.2	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos saturados presentes en el crudo Ayacucho.....	140
A.3	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos aromáticos presentes en el crudo Ayacucho.....	141
A.4	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de resinas presentes en el crudo Ayacucho.....	141
A.5	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de asfaltenos presentes en el crudo Guafita.....	142
A.6	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos saturados presentes en el crudo Guafita.....	142
A.7	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos aromáticos presentes en el crudo Guafita.....	143

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
A.8	Variables necesarias para la determinación del porcentaje de resinas presentes en el crudo Guafita.....	143
A.9	Determinación de la mineralización de asfalteno ayacucho en el ensayo de factibilidad.....	144
A.10	Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalteno Ayacucho.....	145
A.11	Determinación de la mineralización de asfalteno Guafita en el ensayo de factibilidad.....	147
A.12	Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalteno Guafita.....	148
A.13	Encalado del suelo y control de pH de la muestra total de suelo para su neutralización.....	150
A.14	Porcentajes de los macroelementos presentes en los microcosmo.....	151
A.15	Seguimiento del potencial de acidez en los microcosmos durante el muestreo crudo Ayacucho.....	152
A.16	Seguimiento del potencial de acidez en los microcosmos durante el muestreo crudo Guafita...	153
A.17	Asfalteno Guafita. Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cero	154
A.18	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuatro.....	154
A.19	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día ocho.....	155
A.20	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día doce.....	155
A.21	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día dieciséis.....	156
A.22	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día diecinueve.....	156
A.23	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día veintidós.....	157
A.24	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuarenta y nueve.....	157
A.25	Asfalteno Ayacucho. Determinación de la humedad del suelo en los microcosmos el día cero.	158

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
A.26	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuatro..... 158
A.27	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día ocho..... 159
A.28	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día doce..... 159
A.29	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día dieciséis..... 160
A.30	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día diecinueve..... 160
A.31	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día veintidós..... 161
A.32	Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuarenta y nueve..... 161
A.33	Asfalteno Guafita. Carga bacteriana en los microcosmos de tratamiento durante el muestreo... 162
A.34	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado en el día cero inicio..... 163
A.35	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuatro y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.... 164
A.36	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día ocho y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero..... 165
A.37	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día doce y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero..... 166
A.38	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día dieciséis y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero..... 167
A.39	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día diecinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero. 168
A.40	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día veintidós y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero..... 169
A.41	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuarentinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero..... 170

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
A.42	Asfalteno Ayacucho. Carga bacteriana en los microcosmos de tratamiento durante el muestreo..	171
A.43	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado en el día cero al inicio.....	172
A.44	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuatro y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero....	173
A.45	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día ocho y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.....	174
A.46	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día doce y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.....	175
A.47	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día dieciséis y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.....	176
A.48	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día diecinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.	177
A.49	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día veintidós y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.....	178
A.50	Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuarentinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero.....	179
A.51	Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Guafita al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda.....	180
A.52	Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Ayacucho al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda.....	183
A.53	Asfalténico Guafita. Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de CO ₂ producido en los microcosmos.....	186
A.54	Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de <i>Eisenia foétida</i>	188
A.55	Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias.....	190

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
A.56	Asfalteno Ayacucho. Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de CO ₂ producido en los microcosmos.....	192
A.57	Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de <i>Eisenia foétida</i>	194
A.58	Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias.....	196
C.3	Pruebas bioquímicas de identificación de microorganismo degradadores de asfalteno.....	218
C.4	Características microscópicas de microorganismos degradadores de asfalteno.....	218
E.1	Clasificación textural de la muestra de suelo analizada de acuerdo al tamaño de las partículas primarias.....	248

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
	CAPÍTULO II	
2.1	Estructura hipotética de algunos asfaltenos.....	24
	CAPÍTULO III	
3.1	Muestras de suelo.....	45
3.2	Adición de sílica gel a la columna. Maltenos añadidos a la columna.....	49
	CAPÍTULO IV	
4.1	Comportamiento de la carga bacteriana en los crudos Ayacucho y Guafita.....	63
4.2	Comportamiento bacteriano de las fracciones de asfalteno Ayacucho y Guafita a través del tiempo....	64
4.3	Comportamiento bacteriano en la mineralización de asfalteno Ayacucho a través del tiempo.....	66
4.4	Comportamiento de CO ₂ de asfalteno Ayacucho - bacterias y asfalteno Ayacucho- medio mínimo mineral.....	66
4.5	Espectro FTIR de asfalteno Ayacucho sin tratar crudo Ayacucho.....	68
4.6	Espectro FTIR de asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del tratamiento(asfalteno+bacterias+ medio mínimo).....	68
4.7	Espectro FTIR de asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo).....	69
4.8	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho sin tratar	70
4.9	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).....	71
4.10	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo).....	71
4.11	Comportamiento bacteriano en la mineralización de asfalteno Guafita a través del tiempo	73
4.12	Comportamiento de CO ₂ de asfalteno Guafita - bacterias y asfalteno Guafita - medio mínimo mineral.....	74
4.13	Espectro FTIR del asfalteno Guafita sin tratar	75
4.14	Espectro FTIR del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).....	75

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
4.15	Espectro FTIR del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno + medio mínimo).....	76
4.16	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Guafita sin tratar.....	77
4.17	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).....	78
4.18	Análisis de RMN ¹³ C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo).....	78
4.19	Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con bacterias asfalteno Guafita.....	95
4.20	Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con lombrices asfalteno Guafita.....	95
4.21	Porcentaje de degradación del contaminante en función del tiempo para cada tratamiento del asfalteno Guafita.....	96
4.22	Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con bacterias asfalteno Ayacucho.....	99
4.23	Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con lombrices asfalteno Ayacucho.....	100
4.24	Porcentaje de degradación del contaminante en función del tiempo para cada tratamiento del crudo Ayacucho.....	101
4.25	Espectro FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Gpatrón-bact al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo) día 49.....	103
4.26	Espectro FTIR del Guafita asfalteno en el microcosmo Gpatrón-lomb al final del tratamiento (asfalteno+ agua) día 49.....	104
4.27	Espectro FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Glomb al final del tratamiento (asfalteno+ estiércol-lombriz) día 49.....	104
4.28	Espectro FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Gbact al final del tratamiento (asfalteno+ bacterias + medio mínimo) día 49.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
4.29	Espectro FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hpatrón-bact al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo) día 49.....	106
4.30	Espectro FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hbact al final del tratamiento (asfalteno+ bacteria-medio mínimo) día 49.....	107
4.31	Espectro FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hpatrón-lomb al final del tratamiento (asfalteno+ agua) día 49.....	108
4.32	Espectro FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hlomb al final del tratamiento (asfalteno+ lombriz-estiércol) día 49.....	108
4.33	Respiración celular de los tratamientos con bacterias y patrón del asfalteno Guafita en el tiempo.....	116
4.34	Respiración celular en los tratamientos con lombrices y patrón del asfalteno Guafita en el tiempo.....	116
4.35	Respiración celular en los tratamientos con bacterias del asfalteno Ayacucho en el tiempo.....	117
4.36	Respiración celular en los tratamientos con lombrices del asfalteno Ayacucho en el tiempo.....	118
B.1	RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho sin tratar día cero.....	199
B.2	RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+medio mínimo).....	200
B.3	RMN ¹³ C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+medio mínimo).....	201
B.4	RMN ¹³ C del asfalteno sin tratar crudo Guafita día cero.....	202
B.5	RMN ¹³ C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+medio mínimo).....	203
B.6	RMN ¹³ C del asfalteno en medio acuoso al final del estudio crudo Guafita (asfalteno+medio mínimo).....	204
B.7	RMN ¹³ C del asfalteno Guafita al final del estudio día 49 Gpatrón-lomb (asfalteno+suelo+ agua).....	205

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
B.8	RMN ¹³ C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 lomb (asfalto+suelo+agua+estiércol+lomb).....	206
B.9	RMN ¹³ C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 Gpatrón-bact (asfalto+suelo+medio mínimo).....	207
B.10	RMN ¹³ C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 Gbact (asfalto+suelo+medio mínimo+bacterias).....	208
B.11	RMN ¹³ C de asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hpatrón-bact (asfalto+suelo+medio mínimo).....	209
B.12	RMN ¹³ C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hbact (asfalto+suelo+medio mínimo+bacteria).....	210
B.13	RMN ¹³ C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hpatrón-lomb (asfalto+suelo+agua).....	211
B.14	RMN ¹³ C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 lomb (asfalto+suelo+agua+estiércol+lomb).....	212
C.1	Parámetros de caracterización del suelo virgen.....	214
C:2	Parámetros de caracterización del estiércol.....	217
F.1	Resultados del análisis de varianza de la respiración celular asfalto ayacucho.....	260
F.2	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la respiración celular asfalto ayacucho.....	260
F.3	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de respiración celular asfalto ayacucho.....	261
F.4	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de respiración celular asfalto ayacucho.....	261
F.5	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para respiración celular asfalto ayacucho.....	262
F.6	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para respiración celular asfalto ayacucho.....	262
F.7	Resultados del análisis de varianza de la degradación de asfalto ayacucho.....	263
F.8	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la degradación de asfalto ayacucho.....	263

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
F.9	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de la degradación de asfalto ayacucho.....	264
F.10	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de la degradación de asfalto ayacucho.....	264
F.11	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control en la degradación de asfalto ayacucho.....	265
F.12	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control en la degradación de asfalto ayacucho.....	265
F.13	Resultados del análisis de varianza del potencial de acidez asfalto ayacucho.....	266
F.14	Resultados de la prueba de Tukey aplicada al potencial de acidez asfalto ayacucho.....	266
F.15	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de potencial de acidez asfalto ayacucho.....	267
F.16	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados del potencial de acidez asfalto ayacucho.....	267
F.17	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para potencial de acidez asfalto ayacucho.....	268
F.18	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para potencial de acidez asfalto ayacucho.....	268
F.19	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la humedad asfalto ayacucho	269
F.20	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la humedad asfalto ayacucho.....	269
F.21	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de humedad asfalto ayacucho	270
F.22	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados humedad asfalto ayacucho.....	270
F.23	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la humedad asfalto ayacucho.....	271
F.24	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la humedad asfalto ayacucho.....	271
F.25	Resultados del análisis de varianza de la respiración celular asfalto Guafita.....	272
F.26	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la respiración celular asfalto Guafita.....	272

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
F.27	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno Guafita.....	273
F.28	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno Guafita.....	273
F.29	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la respiración celular asfalteno Guafita.....	274
F.30	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la respiración celular asfalteno Guafita.....	274
F.31	Resultados del análisis de varianza de la degradación de asfalteno Guafita.....	275
F.32	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la degradación de asfalteno Guafita.....	275
F.33	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de degradación de asfalteno Guafita.....	276
F.34	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de degradación de asfalteno Guafita.....	276
F.35	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la degradación de asfalteno Guafita.....	277
F.36	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la degradación de asfalteno Guafita.....	277
F.37	Resultados del análisis de varianza del potencial de acidez asfalteno Guafita.....	278
F.38	Resultados de la prueba de Tukey aplicada al potencial de acidez asfalteno Guafita.....	278
F.39	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados al potencial de acidez asfalteno Guafita.....	279
F.40	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de potencial de acidez asfalteno Guafita.....	279
F.41	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control aplicada al potencial de acidez asfalteno Guafita.....	280
F.42	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para el potencial de acidez asfalteno Guafita.....	280
F.43	Resultados del análisis de varianza de la humedad asfalteno Guafita.....	281
F.44	Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la humedad asfalteno Guafita.....	281

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
F.45	Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de humedad asfalteno Guafita.....	282
F.46	Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de humedad asfalteno Guafita.....	282
F.47	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la humedad asfalteno Guafita.....	283
F.48	Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la humedad asfalteno Guafita.....	283

INTRODUCCIÓN

El petróleo en nuestro país al igual que sus derivados entre los cuales se tiene la gasolina, plásticos, fibras sintéticas, representa la mayor fuente de ingresos económicos. Para obtener este valioso recurso natural no renovable es necesaria la perforación de pozos petroleros y su posterior extracción. A través del proceso, además de producirse derrames de crudo, ocurre contaminación de suelos y agua subterránea. Por lo que es necesario realizar la investigación con el fin de implementar alternativas de solución al problema, como la biorremediación, cuyo proceso reduciría la contaminación de suelo y de esta manera se cuidaría la vegetación, la fauna y la salud del ecosistema.

El petróleo es considerado como la fuente energética por excelencia y desafortunadamente, la gran demanda energética en todo el mundo ha propiciado la explotación masiva de los yacimientos de petróleo, lo cual, provoca que el ambiente se deteriore progresivamente, condición por la cual hace que se apliquen medidas efectivas que transformen los efectos negativos del avance tecnológico Bredehoeft (1994). Una de las medidas, cómo se ha mencionado, que ha tenido un éxito revelador es la aplicación de técnicas de biorremediación. Este proceso consiste en el uso de microorganismos, plantas o enzimas para detoxificar diversos contaminantes en los diferentes ambientes: mares, estuarios, lagos, ríos y suelos. Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho.

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a métodos físicos y químicos: son sencillas de implementar; efectivas y ambientalmente seguras; los contaminantes se

destruyen o transforman; generalmente no se requieren tratamientos adicionales y son económicos.

En la actualidad, la contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas de destrucción de los ecosistemas edáficos (Fontúrbel y Achá, 2003), ya que el uso masivo y el transporte transfronterizo, tanto de petróleo crudo como de sus derivados, hace que los derrames de hidrocarburos sean cada vez más frecuentes. La composición química de los hidrocarburos es muy variable: en la naturaleza normalmente se encuentran como mezclas de diferentes especies moleculares, que en mayor o menor grado afectan a la flora, a la fauna y a los microorganismos del suelo (Madigan *et al.* 1999).

Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen cantidad de microorganismos, que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de energía (Sutherland, 1992), los cuales representan 1% de la población total de aproximadamente 10^4 a 10^6 células por gramo de suelo. Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos, que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida. Bossert y Compeau (1995), Messarch y Nies (1997)

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993). Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación (Alexander, 1999). El crudo de petróleo se caracteriza, por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación. Los microorganismos que normalmente participan en este tipo de proceso, son parte de la flora natural de los sustratos orgánicos, así como de los microorganismos nativos del suelo, por lo que, su incorporación no causa efectos adversos al ecosistema.

Por otra parte los compuestos contaminantes en los suelos por largos periodos, mejor conocidos como intemperizados, llegan a ser inaccesibles para los microorganismos nativos debido a las fuertes interacciones que se producen entre dichos compuestos y la materia orgánica del suelo (De Jonge *et al.*, 1997). La restauración de un suelo contaminado, se inicia con la desorción del contaminante de la fase sólida en la que se encuentra alojado, dicha desorción de contaminantes, en suelos intemperizados, se ha resuelto mediante la incorporación de surfactantes sintéticos y biológicos (Volkering *et al.*, 1995; Harms y Zehnder, 1995). Otra alternativa ha sido el uso de disolventes no polares que incrementan la solubilidad de los contaminantes y aparentemente, su biodisponibilidad (Jiménez y Bartha, 1996; Chen y Taylor, 1995).

La contaminación de los suelos por efecto de los hidrocarburos en las zonas de producción petrolera en el país se ve incrementada por la presencia de compuestos difícilmente biodegradables, los cuales por su compleja estructura no se degradan fácilmente, haciendo que el suelo pierda su capacidad de depuración e incluso pueda funcionar como fuente de sustancias peligrosas, para los organismos que viven en éste.

Entre los contaminantes del suelo tenemos, los asfaltenos que son los principales componentes de crudos pesados y extrapesados Yen y Chilingarian (1994), y debido a su característica de ser no refinables (tienen una alta resistencia a la desintegración) y a su tendencia a precipitar en los procesos de extracción, refinación, transporte y almacenamiento del crudo, son precursores de diversos problemas en su manejo; durante la perforación, las partículas coloidales de los asfaltenos tienden a obstruir la salida del crudo, lo que disminuye su flujo ya que se crean incrustaciones y hacen que el diámetro interior de las tuberías disminuya; además cuando un crudo pesado presenta concentraciones elevadas de estos compuestos, aumenta los costos para su refinación y disminuye su aprovechamiento económico en general (Rogel 1997, Shirokoff *et al.* 1997).

En el aspecto estructural se ha comprobado que los asfaltenos, se componen de fracciones de compuestos agregados de núcleos aromáticos condensados que existen en el crudo, sustituidos por grupos alifáticos y nafténicos, los cuales poseen heteroátomos como nitrógeno (N), azufre (S) y oxígeno (O), que se encuentran localizados en la estructura. Además se ha detectado la presencia de metales como el vanadio (V), níquel (Ni), hierro (Fe); estos se encuentran concentrados en estructuras de anillos grandes denominados petroporfirinas. González y Méndez. (2003).

Así, la compleja estructura molecular que poseen los asfaltenos, ocasiona que sea sumamente resistente a la degradación microbiana, lo que provoca su acumulación en los ecosistemas en donde se derrama el petróleo de manera accidental o inducida (Atlas 1981, Guiliano *et al.* 2000)

Considerando la situación anterior, se plantea la posibilidad de evaluar el uso de consorcios bacterianos capaces de biodegradar las fracciones recalcitrantes de asfalteno de diferentes crudos, como son extrapesado extraído del área de exploración activa Ayacucho, ubicada en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO) y mediano proveniente del estado Apure (Guafita), con el fin de disminuir la acumulación de estos en el sistema y sustituirlos por compuestos menos contaminantes y con bajo impacto ambiental.

La investigación a desarrollar presenta una alternativa en el marco ambiental, ya que plantea la biodegradación de las fracciones recalcitrantes de asfaltenos en diferentes crudos en suelos contaminados, cuando se aplican técnicas de biorremediación reduciendo con esto el impacto ambiental que provoca al derramarse el petróleo. También ofrecerá un aporte metodológico, ya que se establezcan los métodos más apropiados para realizar la biorremediación a partir de la aplicación de diversas técnicas fisicoquímicas y biológicas, que conduzcan a un proceso eficiente dado que el problema de los asfaltenos tiene un impacto económico significativo, sobre las

operaciones de producción del petróleo, así como también un importante impacto ambiental.

Esta investigación está estructurada de la siguiente manera. En el capítulo I, se plantea el problema en particular que da lugar a esta investigación y se definen los objetivos que se persiguen, así como el alcance. El capítulo II hace referencia a los antecedentes y las bases teóricas que respaldan la investigación. El capítulo III, contempla la metodología seguida para el logro de los objetivos y el capítulo IV enmarca el análisis de los resultados experimentales. Por último, se presentan las conclusiones y recomendaciones generales derivadas de la investigación.

CAPÍTULO I
EL PROBLEMA

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1.- Planteamiento del problema

La contaminación de los suelos por efecto de los hidrocarburos en las zonas de producción petrolera en el país, se ve incrementada por la presencia de compuestos difícilmente biodegradables, los cuales por su compleja estructura no se degradan fácilmente, haciendo que el suelo pierda su capacidad de depuración e incluso pueda actuar como fuente de sustancias peligrosas, para los organismos que viven en éste.

Los asfaltenos, principales componentes de los crudos pesados y extrapesados, debido a su compleja estructura molecular provocan acumulación en los ecosistemas donde se derrama el petróleo pues son muy resistentes a la degradación microbiana.

Debido a lo anterior, se pretende evaluar el uso de consorcios bacterianos y lombricultura, capaces de biodegradar las fracciones recalcitrantes de los asfaltenos de diferentes crudos como son: extrapesado extraído del área de exploración activa Hamaca (Ayacucho), ubicada en la Faja Petrolífera del Orinoco y mediano proveniente del estado Apure (Guafita), con el fin de disminuir el impacto ambiental que estas generan en el ecosistema.

1.2.-Objetivos

-Objetivo General

1.- Evaluar la biodegradación de asfaltenos procedentes de los crudos extrapesado y mediano a través de consorcios bacterianos y lombricultura.

-Objetivos Específicos

- 1.- Seleccionar un pool de bacterias a partir de diferentes crudos.
- 2.- Estudiar la capacidad degradadora de los distintos consorcios bacterianos provenientes de diferentes crudos sobre asfaltenos. (Ensayo de factibilidad).
- 3.- Plantear ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio de la eficiencia de los consorcios bacterianos aislados y *Eisenia foétida* en la degradación de suelos contaminados con asfalto.
- 4.- Evaluar la eficiencia del sistema de tratamiento biológico, en cuanto al porcentaje de remoción de asfalto, mediante el empleo de técnicas cromatográficas, resonancia magnética nuclear de carbono RMN¹³C, relación de H/C y producción de dióxido de carbono (CO₂) respirometría.
- 5.- Realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos, con la finalidad de establecer las diferencias más significativas entre los diferentes tratamientos.

1.3.- Justificación

En Venezuela como en muchos de los países productores de petróleo se producen grandes cantidades de desechos con contenidos de hidrocarburos, los cuales es necesario que sean dispuestos (Eweis *et al.*, 1999) en sitios seguros como fosas o recipientes para su almacenamiento hasta que sean reutilizados o tratados. Los accidentes en la industria petrolera originan derrames de petróleo sobre los ecosistemas afectando las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo impidiendo el aprovechamiento de los recursos naturales. (Levin y Gealt, 1997 Eweis *et al.*, 1999). Para que estos sitios recobren nuevamente sus características naturales, es necesario el transcurso de cientos de años de atenuación natural de los contaminantes. Para acelerar este proceso, existen técnicas tanto físicas como químicas y las más novedosas y amigables desde el punto de vista económico y

ambiental son las técnicas biológicas, que reducirían la contaminación del suelo y de esta manera se cuidaría la vegetación, la fauna y la salud del ecosistema.

1.4.- Alcance

Se pretende implementar el uso de consorcios bacterianos, capaces de biodegradar las fracciones recalcitrantes de asfalto de diferentes crudos, con el fin de disminuir la acumulación de estos en el sistema y sustituirlos por compuestos menos contaminantes y con bajo impacto ambiental, mejorando las condiciones en el área contaminada.

1.5.- Aporte al conocimiento

Ofrecerá un aporte metodológico que establecerá procedimientos apropiados para realizar la biorremediación a partir de la aplicación de diversas técnicas fisicoquímicas y biológicas, que conduzcan a un proceso eficiente dado que el problema de los asfaltos tiene un impacto económico significativo sobre las operaciones de producción del petróleo, así como también un importante impacto ambiental.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- Antecedentes

En la siguiente sección se presentan los antecedentes relacionados con el tema en estudio que permiten comprender y sustentar la investigación.

Bastardo en el 2000. Estudió la biodegradación de bifenilos policlorinados (PCB's) por actividad bacteriana. En este trabajo se usaron colonias de bacterias asociadas a suelos contaminados con PCB's. Se aislaron y se caracterizaron 4 grupos de bacterias, las cuales se ubicaron en grupos funcionales con la capacidad de soportar niveles altos de salinidad 1, 5, 10 y 50 partes por millón de NaCl, además de presentar capacidad para degradar PCB's por liberación de iones cloruros en el agua. La cinética de crecimiento del grupo funcional P1, fue estudiada durante 30 días en un set de concentraciones de PCB's, que oscilaba entre 10, 15 y 30 mg/L. Los resultados obtenidos señalan que las bacterias son capaces de degradar las moléculas de PCB' s, lo cual fue reportado como un aumento de los iones cloruro en disolución acuosa. De estos resultados, se puede deducir que para concentraciones de 15 ppm de PCB's en la disolución acuosa, se observa la mayor cinética de crecimiento, así como la mayor concentración de iones cloruro en el medio acuoso.

Este antecedente presenta similitud con el trabajo a desarrollar en cuanto a la metodología empleada, en la utilización de consorcios bacterianos capaces de degradar compuestos contaminantes en el ambiente de baja solubilidad en el agua.

Pineda y Mesta en el 2001. Tuvieron como propósito principal mostrar la estructura química de los asfaltenos, los problemas que ocasionan y proponer algunos mecanismos de biodegradación posibles, basados en los procesos conocidos para

otros hidrocarburos de estructura compleja. La eliminación de la estructura micelar por la aplicación de disolventes no polares y la fragmentación de los asfaltenos por fotooxidación, son los procesos iniciales necesarios para poder degradar a estos compuestos. Las estructuras producidas como los hidrocarburos lineales y ramificados, heteropoliaromáticos y aromáticos podrían degradarse en este orden, a través de reacciones bioquímicas como oxidaciones omega, beta y aromáticas respectivamente, que son procesos distribuidos en una variedad importante de microorganismos. El tiempo de eliminación puede variar de una semana para las estructuras más simples, hasta 990 días para aquéllas con varios anillos aromáticos condensados.

La semejanza entre dicha investigación y la actual, es el estudio de las estructuras de los asfalteno biodegradados mediante análisis fisicoquímicos.

La investigación de Pineda *et al*, en el 2002. Se fundamentó en determinar la oxidación y la mineralización de asfalteno a través de un consorcio microbiano aislado del crudo Maya, utilizando asfalteno como única fuente de energía. El consorcio microbiano se aisló de una muestra de crudo y se estudió su degradación a través del crecimiento bacteriano y la cantidad generada de dióxido de carbono CO₂. El crecimiento del consorcio se estabilizó 1×10^6 UFC/mL, el consumo de dióxido de carbono y oxígeno disuelto fueron significativamente mayores a 800 μ mol de CO₂ y 100% de oxígeno disuelto. Lo que demuestra que los asfaltenos son la única fuente de carbono y energía que utilizan los microorganismos produciéndose la mineralización.

Este antecedente presenta similitud con el trabajo a desarrollar en cuanto a la metodología, ya que se estudió su degradación a través del crecimiento bacteriano y dióxido de carbono CO₂ y la diferencia radica en el hecho que la técnica de biorremediación empleada fue para crudos con diferentes grados API, en donde se realizaron ensayos de factibilidad y tratabilidad a escala de laboratorio.

León en el 2003. Evaluó la biorremediación de un suelo contaminado con crudo en la zona de Carabobo (antiguamente Cerro Negro). Para ello recogió muestras de suelos contaminados con 25% m/m de crudo y se inoculó un consorcio bacteriano con nutrientes y agua. Se empleó particularmente la bacteria 5A1 para efectuar la degradación.

Entre los resultados más relevantes del experimento están la disminución exponencial del contenido de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en los suelos a través del tiempo y un porcentaje de degradación de 86,4% de saturados, 80% de aromáticos, 89,3% de resinas y 65,2% de asfaltenos.

La semejanza entre este antecedente y la actual investigación radica en la aplicación de consorcios bacterianos en el suelo y la degradación de asfalteno.

Álvarez *et al*, en el 2004. Aplicó la técnica de biorremediación a un área impactada (20 m³) con 58 barriles de petróleo crudo de 14° API (petróleo pesado), aledaña a un pozo petrolero situado en la república de Cuba. El seguimiento de los tratamientos se realizó mediante análisis químicos y microbiológicos, utilizando técnicas de valoración gravimétrica y espectrofotométrica, mensualmente durante 369 días. El área fue humectada y aireada periódicamente mediante un tractor con arado de disco.

Como resultados se obtuvo una disminución en la concentración de hidrocarburos totales del petróleo, hasta obtener valores inferiores al 1%, recomendado por las normas internacionales, logrando recuperar el suelo impactado en un periodo de un año y se identificaron las especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el suelo tratado. No se encontró toxicidad por ninguno de los métodos empleados en el suelo tratado y en el área tratada sembraron plantas (Piñón de jardín), donde esto no fue efectivo, ya que las plantas autóctonas de la zona resultaron más efectivas, de acuerdo con las condiciones existentes en el suelo. El análisis económico del proceso de biorremediación arrojó valores dentro del intervalo internacional estipulado para este tratamiento.

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

Araujo *et al*, en el 2005. Aislaron cepas bacterianas autóctonas de suelos contaminados con hidrocarburos y éstas se sometieron a una prueba de eficiencia para la remoción de gasoil (fuente de carbono). Se realizaron contajes bacterianos de heterótrofos mesófilos, las cepas 16, 14, 11, 18 y 1, presentaron los mayores porcentajes de remoción de hidrocarburos totales, 90, 63, 56, 49 y 45% respectivamente; se seleccionaron para su utilización como cultivos mixtos en la prueba piloto. Se realizó una prueba piloto aplicando los tratamientos: cultivo mixto, compostaje y fertilización en unidades experimentales que contenían suelo contaminado. Se analizaron los hidrocarburos totales (HT), saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), y metales totales (Cd, Cr, Ni y Zn). La correlación entre los heterótrofos mesófilos con los hidrocarburos totales, nitrógeno (N) y fósforo (P), resultó negativa y altamente significativa ($p < 0,001$), lo que establece que el aumento de los heterótrofos mesófilos provoca la disminución de los hidrocarburos totales, del nitrógeno y del fósforo. La prueba de Tukey, estableció que los tratamientos con cultivo mixto + fertilización (CM+N/P), compostaje + fertilización (Comp+N/P), compostaje + cultivo mixto + fertilización (Comp+CM+N/P) y compostaje + cultivo mixto (Comp+CM), no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos y en los cuales se obtuvo una remoción de los hidrocarburos totales del 95, 94, 93 y 86% respectivamente, durante los tres meses del estudio. La aplicación simultánea de la técnica de compostaje, fertilización y consorcio bacteriano, demostró ser una buena alternativa para la recuperación de suelos

contaminados con hidrocarburos. Esta investigación tiene similitud ya que estudia la degradación de hidrocarburos y la correlación con las cepas aisladas y sus nutrientes.

Canals, en el 2005. Estudio la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, y al disponer de distintos consorcios microbianos, planteó caracterizar catabólicamente estos consorcios para su posible inoculación (bioaumentación) en suelos contaminados por distintos productos petrolíferos. Caracterizaron catabólicamente tres consorcios microbianos adaptados a diferentes familias de hidrocarburos: gasoil, fracción saturada de crudo de petróleo pesado y una mezcla de 5 HAPs respectivamente. Se utilizó petróleo ligero como representante de una matriz compleja de hidrocarburos, que incluye todas las familias de hidrocarburos de interés. Se caracterizó el tipo de biodegradación llevada a cabo en las diferentes fracciones químicas del crudo, por cada uno de los tres consorcios, simulando o no, condiciones de bioaumentación, empleando para ello diversas pruebas.

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

Araujo *et al*, en el 2006. Realizaron la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando lodos estabilizados y cepas bacterianas autóctonas, la investigación se basó en cuatro etapas: aislamiento de cepas bacterianas, ensayo de factibilidad, tratabilidad y análisis estadísticos de los resultados.

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

tres ensayos: factibilidad, tratabilidad y análisis estadísticos, así como el aislamiento de las cepas autóctonas.

Schaefer *et al*, en el 2007. Identificaron los efectos de la utilización de organismos vivos como: *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* y *Eisenia foétida*, en las comunidades microbianas de los suelos contaminados con petróleo. El enfoque de este estudio fue caracterizar la dinámica microbiana y la comunidad bacteriana en el suelo contaminado por petróleo incubado con y sin las lombrices. Se empleó un suelo contaminado con 10 000 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). En dichos suelos, la respiración y la concentración de la biomasa microbiana fueron incrementadas perceptiblemente por la presencia de las lombrices alimentadas con estiércol del ganado, y las concentraciones de HTP disminuyeron perceptiblemente. Los resultados demostraron que las lombrices pueden contribuir positivamente al biorremediación del suelo contaminado con petróleo, pero que el efecto puede ser especie-dependiente, obteniéndose mayor degradación con el empleo de la *Eisenia foétida*.

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

López *et al*, en el 2006. Enfatizaron que el manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos, ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua. Entre las más severas contaminaciones se destacan las que se produjeron y todavía se producen a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos. En nuestro país, el transporte de crudo y sus derivados se ha visto afectado considerablemente durante los últimos 18 años, por una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones

petroleras. En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser mas o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento. Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados. En la presente revisión se analiza la biorremediación como una alternativa saludable. Frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de crudos, ya esta problemática genera una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales.

La similitud con el trabajo de investigación es que se utiliza la biorremediación como una alternativa, a la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos

Bastardo *et al*, 2007. Establece que la biorremediación es un proceso de saneamiento ambiental, empleado en la rehabilitación de zonas deterioradas por la contaminación, derivada de actividades antrópicas. Basada en la utilización de microorganismos con características particulares, capaces de producir compuestos que eliminan los contaminantes causantes de daños al ambiente. En este trabajo se pretendió conocer la frecuencia de aparición de los diferentes grupos funcionales de bacterias degradadoras de hidrocarburos antes y después de aplicar la tecnología de biorremediación en diferentes áreas afectadas, con la aplicación de nuevas metodologías para la extracción de crudo impregnado en el suelo. Para ello se ubicaron dos áreas impactadas por derrames de crudo de diferente origen. El Complejo Muscar y la Estación SBEF-1, ambos pertenecientes a PDVSA en el estado Monagas. Se tomaron muestras de cuatro suelos impactados por derrames de crudo liviano del Complejo Muscar. Y muestras de diferentes zonas impactadas de la

Estación SBEF-1. En Muscar, se obtuvo 15 grupos funcionales para cada período de muestreo estudiado tanto en suelo como en el agua del morichal. Los resultados señalan que existe una estrecha relación entre los grupos funcionales presentes en el suelo y aquellos provenientes de aguas cercanas a sitios con mayor actividad petrolera. Para la estación SBEF-1, se dividió en dos terrazas y tres drenajes, para la extracción del suelo, allí se aislaron 36 grupos funcionales de bacterias degradadoras con capacidad de producir tensoactivos, a los cuales además de determinar su frecuencia de aparición a lo largo de la zona en estudio, se observó la penetración del crudo en el suelo y se aplicó una metodología de inyección de surfactante con el objeto de activar la presencia de microorganismos hidrocarbonoclasticos y permitir una mayor extracción del crudo impregnado en el suelo.

En este estudio los procedimientos de muestreo y tratamiento del suelo se realizaron de forma diferente, puesto que se trata de un suelo ya contaminado con crudo en donde se tomaron muestras de suelos y se aislaron las bacterias degradadoras de hidrocarburos y se aplicó una metodología de inyección de surfactante, con el fin de activar la presencia de microorganismos, mientras que en la actual investigación se limitó únicamente a aislar bacterias degradadoras de asfalteno realizando ensayos de factibilidad y luego extrapolando dicho ensayo a un suelo contaminado con asfalteno, utilizando bacterias degradadoras de asfaltenos y *Eisenia foétida*.

Fernández *et al*, en el 2008. Basó su investigación en la recuperación de un suelo de uso agrícola y ganadero contaminado con crudo mediano, proveniente de derrames de pozos abandonados, que presentan brotes naturales de crudo aplicando la técnica de biorremediación. La metodología consistió en seleccionar el área impactada y realizar tomas de muestras a una profundidad de 15 cm. Estas muestras se homogenizaron y se colocaron en cuatro biorreactores para su posterior tratamiento, uno como suelo control o blanco y el resto tratado con medio mínimo surfactante (MMS), que aporta nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias. La concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se determinó por gravimetría, y para un

tiempo de 30 días de tratamiento, se lograron valores de 41 y 61% en suelos no tratados y tratados, respectivamente, valores que están aún por encima de lo establecido en la normativa ambiental venezolana. Con respecto a la fracción de asfalteno, se registraron cambios en las réplicas, mientras que el suelo control se conservó estable, debido a que las bacterias en presencia del MMS alcanzan los requerimientos necesarios para atacar la fracción del petróleo. En las fracciones de resinas también se obtuvo un decrecimiento en el tiempo, siendo más significativo en las réplicas que en el suelo control.

En esta investigación los procedimientos y el tratamiento del suelo se realizaron de forma diferente, puesto que se trata de un suelo contaminado con crudo, que proviene de una localidad ya contaminada y se utilizaron las bacterias autóctonas del suelo contaminado, mientras que la actual se limita a contaminar un suelo con asfalteno a través de una bioaumentación

Silva *et al*, en el 2008. Estudiaron los asfaltenos de los crudos brasileños que fueron sometidos a tratamientos oxidativo con el fin de cambiar su estructura. Los hidrocarburos liberados fueron comparados con los obtenidos del crudo original, y utilizados para evaluar la alteración de los aceites, como resultado de la biodegradación. Los aceites crudos se degradan a n-alcano, un efecto relacionado generalmente con la biodegradación. Los fragmentógrama de m/z 191, demostraron diversas intensidades relativas para los terpenos tricíclicos en crudos asociados y aceites liberados. Son menos abundantes que los hopanos en los m/z 191 de los hidrocarburos liberados de los asfaltenos.

La similitud del trabajo que se presenta y la investigación utilizada como antecedente, radica únicamente en la degradación de asfalteno

Yuhong *et al*, en el 2009. Estudiaron el depósito de dos columnas (Es3 y Es1) del campo petrolífero de Lengdong en Liaohe, NE China y analizaron las composiciones elementales (C, H, N, O, S) e isotópicas (d13C y d15N), FT-IR para estudiar la

oxidación de ambas resinas y asfaltenos, y utilizaron a Py-GC-MS, para aclarar de cómo las cadenas laterales alquílicas de los asfaltenos fueron alterados durante la biodegradación. Concluyeron que los productos de la biodegradación, tales como ácidos carboxílicos, fenoles y alcoholes, no sólo es contribución de la resina, sino que también están vinculados las resinas y los asfaltenos. La cantidad de asfaltenos, aumenta porque se agrandan algunas moléculas de la resina y su polaridad aumenta de manera tal que pueden ser precipitadas por el n- hexano como asfaltenos nuevamente generados.

La similitud del antecedente que se presenta son los análisis fisicoquímicos empleados para visualizar la degradación de la fracción de asfalto.

Fernández *et al*, (2009). Estudió un suelo contaminado con petróleo pesado proveniente de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), al cual se le aplicaron tres tipos de tratamientos, empleando los agentes bioestimulantes: estiércol equino, humus líquido y ejemplares de *Eisenia foetida*; para lograr disminuir su nivel de contaminación. En esta investigación se analizaron hidrocarburos totales de petróleo (HTP), fracciones del crudo, porcentaje de humedad relativa, potencial de acidez, conteo de aerobios mesófilos, de acuerdo a los procedimientos descritos en las normas ASTM, COVENIN y por la agencia de protección ambiental (EPA). Los resultados reportaron diferencias significativas ($p=0,0191$) para el tratamiento con *E. foetida* de un $(54,48 \pm 0,02)$ % de degradación de los HTP, con una carga bacteriana de $(2,30 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g; mientras que para el tratamiento con humus líquido no se registraron diferencias significativas ($p=0,7959$) en la prueba de Dunnett. Los tratamientos con *E. foetida* y estiércol equino, presentaron un alto porcentaje de remoción de hidrocarburos saturados y resinas; mientras que las fracciones de aromáticos y asfaltenos no variaron significativamente en la prueba de Tukey HSD ($p>0,05$), siendo el tratamiento con *E. foetida* el más eficaz en la descontaminación del suelo impactado.

La metodología de esta investigación presenta similitud con el trabajo a desarrollar en el proceso de biorremediación, sin embargo, se diferencia en cuanto a las características del contaminante y el aislamiento de las bacterias degradadoras de asfaltenos.

2.2- Bases Teóricas

2.2.1- Generalidades del Petróleo.

El petróleo, es una mezcla compleja en la que coexisten partes sólidas, líquidas y gaseosas. Lo forman, por una parte, unos compuestos denominados hidrocarburos, formados por carbono e hidrógeno y, por otra, pequeñas proporciones de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales. Su color es variable, entre el ámbar y el negro y el significado etimológico de la palabra petróleo es aceite de piedra, por tener la textura de un aceite y encontrarse en yacimientos de roca sedimentaria (Chow, 1987). Se encuentra en grandes cantidades bajo la superficie terrestre y se emplea como combustible y materia prima para la industria química. Su origen es de tipo orgánico y sedimentario.

1.-Composición del crudo según el origen.

Usualmente, todos los crudos no degradados contienen alcanos de cadena lineal y ramificada, de C1 a C40 aproximadamente, cicloalcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las fracciones de punto de ebullición menor, están formadas por alcanos en todos los casos, mientras que la composición de las fracciones superiores varía según la fuente del petróleo. Se denomina crudo parafínico o ligero, cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (*n*-alcanos y alcanos ramificados), y asfáltico o pesado si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C30 a C45) y HAPs (Howe- Grant, 1996). La composición de un crudo varía según

su localización (Müller, 1987), según el origen, tenemos crudos parafínicos o asfálticos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Pozo de origen y características de los crudos de petróleo (Müller, 1987).

Pozo de origen	Tipo de crudo
Pensilvania	Parafínico
Irán	Parafínico
Irak	Parafínico
Rumanía	Parafínico
México	Parafínico
Venezuela	Asfáltico
Baku	Asfáltico
Texas	Intermedio
Oklahoma	Intermedio

En general, los constituyentes del petróleo se pueden agrupar en cuatro grandes grupos orgánicos conocidos: a) Saturados, b) Aromáticos, c) Resinas y d) Asfaltenos; este conjunto es conocido como SARA. El estudio de la fracción pesada del crudo (asfaltenos), se ha incrementado en los últimos años debido a los problemas que estos representan en los procesos producción y conversión (Speight, 1984).

2.-Asfaltenos.

Los asfaltenos y resinas son las fracciones más pesadas y polares del petróleo. Tienen estructura poliaromática con cadenas alquílicas, heteroátomos y trazas de algunos metales. Los asfaltenos son la fracción de mayor polaridad y masa molecular, y contienen el mayor porcentaje de heteroátomos (O, S, N) y metales (Fe, Ni, V, entre otros). Actualmente, la distinción entre asfaltenos y resinas se basa en sus características de solubilidad en *n*-alcanos. Los asfaltenos son operacionalmente definidos como la fracción del petróleo soluble en disolventes aromáticos como tolueno o benceno, pero insoluble en *n*-alcanos como *n*-heptano o *n*-pentano, mientras

que las resinas si son solubles en estos alcanos [Marczewski y Szymula, 2002; Speight, 1999; Pietraru y Cramb, 2003].

3.-Composición química de los asfaltenos.

De tal manera que, por la amplia variedad de estructuras moleculares que pueden presentar los asfaltenos, es común caracterizar estos materiales por la relación atómica H/C, así como por el contenido de nitrógeno, azufre y oxígeno.

Relaciones atómicas entre 1,0 y 1,2; y bajos contenidos de N, S, y O sugieren que el asfalteno consiste de carbonos aromáticos unidos e intermezclados con grupos funcionales que contienen de 5 a 7 heteroátomos por molécula. La orientación específica de los grupos polares y aromáticos en la estructura interna del asfalteno aun es sujeta a debate (Spiecker *et al.*, 2003)

La estructura de las moléculas de asfaltenos, muestra que son hidrocarburos con partes relativamente polares dadas por los anillos aromáticos y los grupos funcionales y partes apolares constituidas por las cadenas alifáticas; lo cual permite presentar una dualidad polar apolar dándole propiedades interfaciales (Yang *et al.*, 2001).

La unidad estructural de los asfaltenos es una lámina formada por anillos poliaromáticos y compuestos heterocíclicos. La molécula de asfalteno está formada por varias láminas paralelas que se mantienen juntas por interacciones moleculares. Se ha sugerido que las moléculas de los asfaltenos en disolución están asociadas en partículas, las cuales en su movimiento pueden formar agregados más grandes llamados micelas (Speight, 1980). Sin embargo, la estructura elemental de los asfaltenos es muy variada y depende del crudo del cual provienen.

El alto contenido de heteroátomos permite establecer ciertas similitudes entre los asfaltenos y el kerógeno (producto de la degradación de la materia orgánica por microorganismos) hasta el punto de que una de las hipótesis que intentan explicar el

origen de los asfaltenos, los presentan como un estado de maduración intermedio entre el kerógeno y los hidrocarburos livianos. Muchos estudios han determinado que la mayoría de los asfaltenos poseen relaciones C/H y N/C similares sin importar el crudo de donde provienen, lo que sugiere que pueden tener una composición relativamente definida.

Con el incremento de la masa molecular de la fracción de asfaltenos, se incrementa también la aromaticidad y el número de heteroátomos. En general, se considera que la estructura de los asfaltenos consiste en un núcleo aromático condensado con cadenas alquílicas laterales y heteroátomos incorporados en muchas de las estructuras cíclicas; el sistema aromático condensado puede tener desde 4 hasta 20 anillos bencénicos. En la Figura 2.1 se muestran algunas estructuras hipotéticas de los asfaltenos.

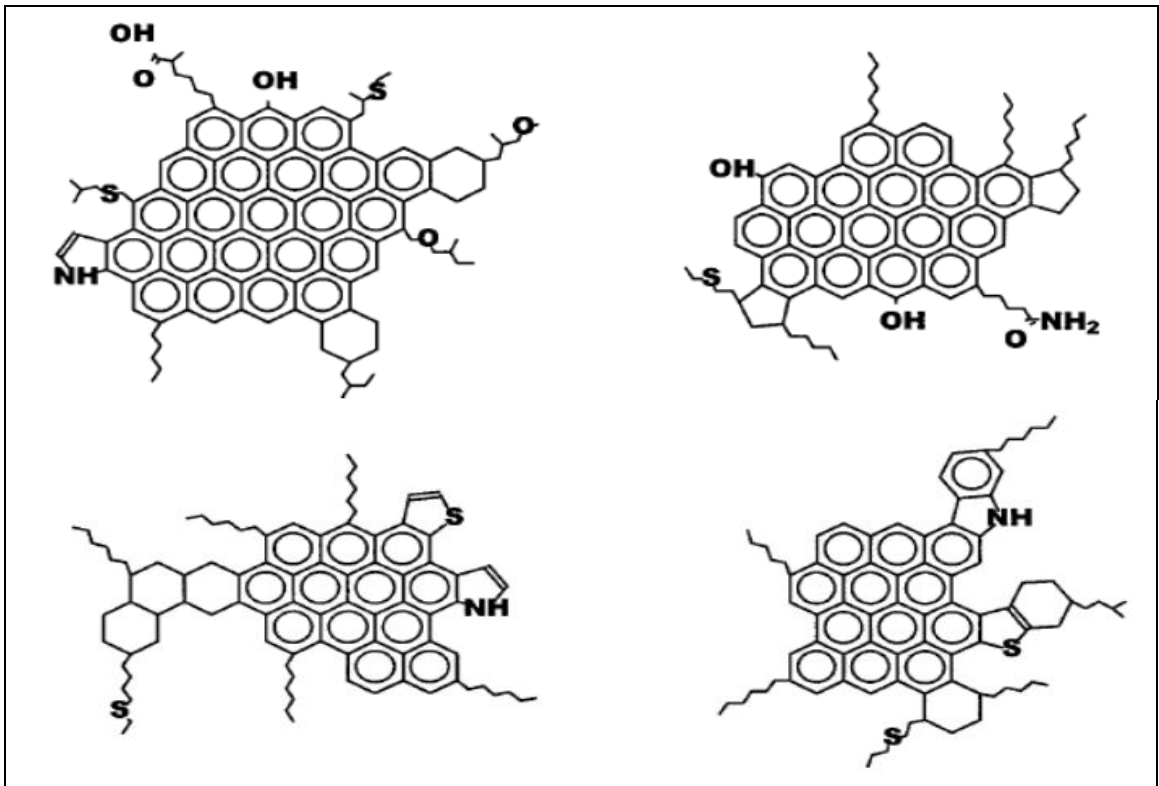


Figura 2.1: Estructura hipotética de algunos asfaltenos.

La determinación de la estructura molecular de los asfaltenos se realiza mediante diversas técnicas analíticas, entre las más importantes se tiene difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, absorción óptica, espectroscopia molecular de fluorescencia, difracción de neutrones a pequeños ángulos, espectroscopia de masas, ultracentrifugación, microscopía de sonda de barrido, hidrogenación, oxidación, entre otras (Groenzin y Mullins 1999; Branco et al., 2001). Los resultados de muchas de estas técnicas, indican que los asfaltenos contienen de 4 a 10 anillos aromáticos (Groenzin y Mullins 1999).

Los diferentes tipos de heteroátomos presentes en los asfaltenos están organizados en grupos funcionales como: carboxilo, cetonas, aldehídos, benzotiofenos, dibenzotiofenos, naftenobenzotiofenos, sulfuros alquílicos, sulfuros alquil-arílicos y sulfuros arílicos (Speight , 1984). Los metales, como Ni y V, aunque han sido detectados en las fracciones asfálticas en cantidades importantes, son difíciles de integrar a la estructura del asfalto. Estos metales se encuentran comúnmente en las petroporfirinas, pero aún se desconoce si estas son parte o no de la estructura de los asfaltenos.

2.2.2- Biorremediación.

La biorremediación puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización (compuesto blanco + CO₂ + H₂O), una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de metales. Otras definiciones otorgadas a este término son las siguientes:

- 1.-El uso de organismos vivos para degradar contaminantes ambientales o para impedir la contaminación tratando los desechos (Atlas, 1981).
- 2.-La aplicación del tratamiento biológico para eliminar sustancias químicas tóxicas (Cookson, 1995).

La eficiencia de la biorremediación depende del sitio, del contaminante y del daño causado, en ocasiones se llega hasta sustancias que se reintegran al ambiente, mientras que en otras, la complejidad química de los contaminantes supera a la capacidad de los microorganismos para metabolizar los hidrocarburos. En estos casos, la biorremediación tarda varios años, y a veces no se logra la completa degradación de los agentes nocivos. (Saval, 1995)

2.2.2.1.- Tecnologías de la biorremediación.

Entre las tecnologías de biorremediación se cuenta con: (Saval, 1995)

1.-Bioaugmentación.

Es aquella en la cual al medio contaminado se adicionan microorganismos (además de los que de manera natural contienen) con la capacidad de degradar los hidrocarburos existentes. Las bacterias pueden ser autóctonas (de la misma microflora de la zona) y exógenas, es decir, que son traídos de otro ecosistema y que se adaptan a nuevas condiciones. Esta tecnología se llega a emplear cuando la microflora del suelo no tiene los elementos suficientes para degradar los contaminantes.

2.-Bioestimulación.

En esta tecnología se introduce al sistema (que también puede ser en un medio acuoso) nutrientes o fuentes de nitrógeno o fósforo necesarios para que el microorganismo active su metabolismo. Esta técnica puede ser aplicada en combinación con la anterior.

3.-Bioventeo.

Surge de una tecnología fisicoquímica denominada venteo, en la que se inyecta oxígeno (ya sea por aireación mecánica o manual) al suelo afectado y se arrastra al contaminante hacia fuera. Aquí, las bacterias aeróbicas requieren oxígeno para degradar a los contaminantes.

4.-Fitorremediación.

Es una de las tecnologías más innovadoras del mundo, y en la que con el uso de plantas verdes se efectúa la biorremediación. Esta puede ser enfocada a compuestos orgánicos e inorgánicos. En ambas, las plantas verdes absorben los contaminantes, los mantienen en su estructura y los degradan. De aquí se desprende la fitofiltración para limpiar mantos acuíferos, donde la raíz absorbe los contaminantes y los acumula en el cuerpo de la planta. En la misma clasificación se encuentra la fitovolatilización (también para compuestos orgánicos), donde la planta absorbe el contaminante, lo transporta por su estructura y por medio de sus hojas lo volatiliza. Así mismo, se encuentra la rizorremediación, donde no es precisamente la planta la que efectúa la biorremediación, sino sus raíces. El radio que en el subsuelo abarca la raíz es llamado rizosfera, hábitat adecuado para ciertos microorganismos, ya que la raíz va a excretar enzimas, polisacáridos y demás nutrientes que aprovecha la bacteria que degrada los hidrocarburos.

5.-Landfarming.

También conocido como el tratamiento de la tierra o uso de la tierra, es una tecnología de biorremediación de los suelos, que reduce concentraciones de los componentes del petróleo con la biodegradación. Esta tecnología implica generalmente colocar el suelo contaminado en capas delgadas en la superficie de la tierra y estimular la actividad microbiana aerobia dentro de los suelos a través de la aireación y/o de la adición de minerales, de alimentos y de la humedad. La actividad microbiana realizada da lugar a la degradación de los componentes fijados por adsorción del producto de petróleo con la respiración microbiana. Si el área contaminada es menos de un metro de superficie subterránea, puede ser posible estimular con eficacia la actividad microbiana sin la excavación de los suelos, si por el contrario el suelo contaminado es más profundo de metro y medio, los suelos se deben excavar y reaplicar en la superficie de la tierra.

2.2.2.2- Ventajas de la tecnología de biorremediación (Fernández et al., 1998).

Algunas ventajas que presenta esta tecnología de biorremediación son las siguientes:

- 1.-Puede hacerse en el mismo sitio.
- 2.-Eliminación permanente de la contaminación (limitando el riesgo).
- 3.-Aceptación por el público.
- 4.-Mínima alteración del lugar.
- 5.-Elimina los costos de transporte y obligaciones.
- 6.-Puede acoplarse con otros procedimientos descontaminantes.

La principal ventaja del método de biorremediación, está asociada a que las transformaciones son generalmente llevadas a cabo por los microorganismos que habitan en el sitio de contaminación (proceso natural). Los residuos o subproductos del proceso biológico (bióxido de carbono y agua), son usualmente integrados geoquímicamente en el ambiente como productos inocuos. Las bacterias y los hongos tienen una gran habilidad para metabolizar, (transformar) diferentes compuestos químicos. Cuando es posible, se utilizan y se aumentan la producción microbiana presente en el sitio contaminado, con el fin de acelerar su actividad para transformar los componentes tóxicos, mediante la adición de nutrientes o por la introducción de otros microorganismos al sistema a tratar.

La transformación por métodos biológicos está sujeta al tiempo que se le dé al proceso y las condiciones químicas y biológicas. La biorremediación depende de la tolerancia de los microorganismos a la concentración del contaminante y de las características del suelo, por lo que no se recomienda su aplicación en sitios que contengan compuestos radiactivos, metales pesados y cuando las condiciones ambientales sean desfavorables. Para determinar el empleo de la biorremediación en la eliminación de contaminantes se consideran:

- El objetivo de la acción de restauración (remediación) tomando en cuenta el tipo y grado de contaminación.
- La amenaza que representa la contaminación.
- El uso futuro del suelo.
- La disposición de una solución técnica a los objetivos planteados.
- Los factores económicos y sociales involucrados.

2.2.3.- Tratamiento biológico de suelos contaminados con petróleo

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

El término biotransformación, se refiere a la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar. En la mineralización se produce la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y se incorpora el resto a las estructuras de los microorganismos. Se puede decir que la biotransformación es una degradación parcial y la mineralización es completa. Se puede realizar el tratamiento biológico de casi todos los residuos orgánicos peligrosos, porque esencialmente, todas las sustancias químicas se degradan si se establecen, mantiene y controlan las poblaciones microbianas apropiadas (LaGrega *et al.*, 1996).

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

Parámetros microbiológicos.

1.-Fuentes de energía y sustrato.

Todo ser vivo necesita energía y carbono para desarrollarse, la fuente de energía donde los microorganismos obtienen su energía y carbono celular proporciona una base para su clasificación, como se muestra en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2: Fuentes primarias de carbono y energía para diversas clases de microorganismos

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

Fuente: LaGrega *et al.*, (1996).

2.-Procesos enzimáticos.

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

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

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

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

2.2.4- Biodegradabilidad del sustrato.

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

1.-Inhibición y toxicidad.

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

2.-Población microbiana.

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

3.-Parámetros técnicos.

El tratamiento biológico consiste en promover y mantener una población microbiana que metaboliza un determinado residuo. Existen una serie de parámetros que influyen

en la velocidad en la que se tiene lugar el metabolismo y por lo tanto, en la biodegradación. Se puede identificar, establecer y controlar las condiciones favorables, que aseguren el crecimiento y desarrollo de la biomasa a través de las investigaciones y aplicaciones de estos parámetros.

4.-Aceptor electrónico.

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

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

5.-Humedad.

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

6.-Temperatura.

La temperatura tiene una mayor influencia sobre la velocidad de crecimiento. La actividad celular, específicamente de los sistemas enzimáticos, responde al calor, produciéndose, al ir aumentando la temperatura, un brusco aumento de la velocidad de crecimiento, hasta que se alcanza el óptimo. Un aumento de unos pocos grados por encima del óptimo hace disminuir drásticamente el crecimiento, por inactivación de los sistemas enzimáticos y reduce la capacidad reproductora. Véase Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Intervalos de temperatura óptimas para el desarrollo de diversos géneros de bacterias

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

Fuente: LaGrega *et al.*, 1996

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

7.-Potencial de acidez (pH).

La actividad de una determinada enzima varía en función del pH, coincidiendo la máxima actividad con el óptimo de este. El crecimiento bacteriano en consecuencia, también depende del pH. La mayoría de las bacterias crecen mejor en un estrecho intervalo próximo a la neutralidad.

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

8.-Nutrientes.

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

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

2.2.5- Lombricultura.

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

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

1.-La roja californiana.

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

2.-La roja africana.

(*Fudrillus ssp*): es de color oscuro, su engrosamiento (clitelo) se encuentra más craneal, su cola es redonda y de color blanquecino y mide aproximadamente de 15 a 20 cm. No son muy resistentes a condiciones adversas cuando no se les da su medio o hábitat recomendado, ellas emigran y por lo general mueren. Pero en condiciones óptimas se reproduce más rápido que la californiana y genera más abono, por lo que son menos utilizadas. (Infoagro, 2005).

3.-El sustrato o estiércol.

El manejo de estiércol o sustrato, es el elemento de mayor importancia dentro del cultivo de lombrices, si colocamos el estiércol estabilizado o maduro a las lombrices, se asegura que nuestro pie de cría se reproduzca aceleradamente y en poco tiempo. (Legall *et al.*, 2000)

En el manejo del estiércol o sustrato se tienen que tener en cuenta 3 factores muy importantes: humedad, temperatura y pH

4.-Humedad.

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

5.-Temperatura.

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

6.-Potencial de acidez (pH).

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

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

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1.- Materiales y Equipos.

3.1.1.-Reactivos y Disolventes.

Los reactivos y los disolventes para extracción, titulación y reacciones son de grado analítico para análisis de diferentes casas: ácido clorhídrico (HCl) - Riedel de Haën, agua destilada (H₂O), carbonato de calcio (CaCO₃) - Riedel de Haën, cloruro de amonio (NH₄Cl) – Merck, cloruro de bario (BaCl₂) – Riedel de Haën, cloruro de calcio (CaCl₂) – Merck, cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) - Riedel de Haën, fosfato ácido de potasio (K₂HPO₄) – Riedel de Haën, fosfato ácido de sodio dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) – Riedel de Haën, fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) – Riedel de Haën, glicerina (C₃H₈O₃), n-hexano (C₆H₁₄), hidróxido de potasio (KOH) - Riedel de Haën, indicador fenoltaleina, metanol (CH₃OH) – Merck, nitrógeno (N₂), sílice gel – Riedel de Haën, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O)– Riedel de Haën, tetrahidrofurano (C₄H₈O) – Merck, tolueno (C₇H₈) – Riedel de Haën.

3.1.2.-Medios de cultivos.

Todos los medios y disoluciones se esterilizarán en una autoclave a 121°C y 1,5 atmosfera de presión durante 15 min, los medios y su composición utilizado en esta investigación son: Agar Nutritivo, Caldo Nutritivo (Nutrient Broth), Agar Mac Conkey, Citrato, Cetramide, Ureasa, Vogues Proskauer, Lisien iron agar, Of basal médium, Malonato broth, Glucose phosphate broth, Sulfuro indol motilidad, Cristal de violeta, Lugol, Fucsina básica, Aceite mineral, Cetona y disolución salina.

3.1.3.-Crudo de petróleo.

El crudo extrapesado extraído del área de exploración activa Ayacucho, ubicada en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO) y el mediano proveniente del estado Apure (Guafita).

3.1.4.-Equipos.

Analizador Elemental (C, H, N, S y O) marca Carlo Erba (actualmente Thermo), modelo EA 1108. Autoclave, Marca P selecta, Modelo Presoclave -11. Balanzas analíticas digitales: Marca Gibertini, modelo TM 4600 AR, N° 38256, Capacidad máxima 4000 g (d=0,1 g). Marca Mettler Toledo, Modelo: AB204, Capacidad máxima 210 g, Capacidad mínima 10 mg. Marca Ohaus, Modelo I-10, Serial: 23358, Capacidad máxima: 10 000 g. Marca Sartorius AG Göttingen, Modelo: LC221S. Serial: 50906028, Capacidad máxima: 220 g. Espectrómetro de infrarrojo, Marca: Shimadzu, Modelo FTIR – 8400S, Dimensiones del compartimiento: 620(ancho) x580(largo) x240(alto) mm, Sistema óptico: Óptica de un solo haz. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear: Marca Bruker-Avance 300 MHz. Estufa, Marca Digiheat. Limpiador por ultrasonido, Marca Fisher Scientific, modelo FS110H. intervalo: 0 a 60. Medidor de pH, pH M61 Laboratory pHmeter radio meter, Copenhage, Escala: (0-14) mV, Apreciación: 0,1 mV, Error: 0,005 mV. Rotoevaporador Baño de agua: Marca Llamato, modelo BM100, intervalo: 0 a 100°C, Apreciación: 5 °C, Error: 2,5 °C. Incubador IC600 marca yamato. Contador de colonia (colony Counter 560 Suntex)

3.2.-Métodos.

3.2.1.- Selección de un pool de bacterias a partir de diferentes crudos.

3.2.1.1.- Preparación del medio de cultivo mineral.

Se preparó el medio mínimo propuesto por Pineda (2002) en donde se utilizó medio de cultivo mineral ISO9493 y su composición química es $0.085\text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.21\text{K}_2\text{HPO}_4$, $0.33\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.005\text{NH}_4\text{Cl}$, $0.0225\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0275CaCl_2 , $2.5 \times 10^{-3}\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

3.2.1.2.- Preparación de los reactores con los crudo a diferentes grados API.

Se prepararon dos reactores de vidrio con una capacidad de 500 mL esterilizados en autoclave. Se agregó 200 mL de medio mínimo mineral y se normalizó el pH a 7.

A los reactores se adicionaron 1 mL de petróleo extrapesado Ayacucho para el reactor 1 y 1 mL de petróleo mediano Guafita al reactor 2, como única fuente de carbono. El ensayo se realizó con una aireación constante de $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura ambiente por catorce días. Cada dos días se realizó la carga heterotrófica a diluciones seriada con agua esterilizada de 10^2 , 10^4 y 10^6 , tomando muestra de cada reactor de 100 μL y el conteo se realizó con un contador de colonia (colony Counter 560 Suntex) mediante la técnica de placa vertida, que consiste en colocar la carga en la placa y dispersar inmediatamente agar nutritivo.

Se tomó un 1mL de cada reactor y se aislaron las colonias en 5mL de caldo nutritivo y luego se sembraron por estriamiento en placas y cuñas de Agar Nutritivo y se incubaron por 24 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior ensayo.

3.2.2.- Estudio de la capacidad degradadora de los distintos consorcios bacterianos, provenientes de los diferentes crudos sobre asfaltenos, (Ensayo de factibilidad).

3.2.2.1.- Extracción de asfaltenos de los diferentes crudos extrapesado (Ayacucho) y mediano (Guafita).

Para la realización de la caracterización, se siguió el procedimiento de determinación gravimétrica de la fracción de asfaltenos, propuesta por la Norma Agencia de Protección Ambiental (EPA), 8020/8100 EPA - 1986

Inicialmente se pesó a temperatura ambiente en un vaso de precipitado 10 g de crudo y se disolvieron en 300 mL de hexano, luego la mezcla se agitó en una plancha constantemente por espacio de 6 horas mediante una barra magnética. Posteriormente la mezcla se dejó en reposo por 12 h.

Al transcurrir el tiempo de reposo la mezcla se filtró por gravedad, empleando papel filtro Whatman N° 1 hasta separar la suspensión de los asfaltenos (sólido color negro) de los demás compuestos, la disolución obtenida se guardó para análisis posteriores,

mientras que el sólido adherido al papel de filtro (asfaltenos), se envolvió empleando papel de filtro para formar una especie de envoltorio y situarlos en un equipo de extracción Soxhlet, reflujiéndolos con n-hexano hasta tornarse totalmente incoloro el disolvente. Una vez logrado esto, se sacaron los asfaltenos y se dejaron secar a temperatura ambiente por 1 hora, la disolución que quedó del reflujo en el equipo de extracción Soxhlet, se incorporó a la disolución filtrada obtenida anteriormente (maltenos). Al tener los asfaltenos completamente secos, se raspó y se agregó en un vaso precipitado y se adicionó aproximadamente 100 mL de n-hexano, luego se cargó a un equipo de reflujo continuo.

Posteriormente se re-filtraron los asfaltenos obtenidos y se volvió a raspar tal como se explicó anteriormente, sobre otro papel filtro previamente pesado. Una vez conocida la masa de los asfaltenos, se procedió a situarlos en un matraz tipo Schlenk de 50 mL sobre un baño de glicerina a 110 °C y con conexión a “vacío” durante un periodo aproximado de cuatro horas, los asfaltenos fueron guardados en frascos de vidrio color ámbar en atmósfera de nitrógeno. El modelo matemático asociado para el cálculo de la fracción viene dado por la ecuación III-1.

$$\%Asf = \frac{M_{PFA} - M_{PFV}}{M_C} \times 100 \quad (\text{III} - 1) \quad (\text{Carbognani } et \text{ al.}, 1997)$$

Donde:

$\%Asf$: Porcentaje de asfaltenos en el crudo, %.

M_{PFA} : Masa del papel de filtro con los asfaltenos, g.

M_{PFV} : Masa del papel de filtro vacío, g.

M_C : Masa inicial del crudo, g.

3.2.2.2.- Obtención de un consorcio bacteriano degradador de asfalto.

Se realizaron ensayos a escala de laboratorio utilizando un reactor de vidrio con una capacidad de 500 mL y se agregaron 400 mL de medio mínimo mineral estéril, 2 g

de asfalteno y 6 mL del pool de bacterias aisladas en la degradación del crudo, la aireación se mantuvo constante, a temperatura ambiente y pH neutro y se determinó la carga bacteriana cada dos días por catorce días a diluciones seriada con agua esterilizada de 10^2 , 10^4 y 10^6 , tomando una muestra de cada reactor de 100 μ L.

Los sistemas a evaluar fueron aplicados a los diferentes crudos y el contaje de heterótrofos mesófilos, se realizó mediante la técnica en placa vertida utilizando un contador de colonias (Colony Counter 560 Suntex).

3.2.2.3.- Aislamiento e identificación de las cepas más eficientes en la degradación de los asfaltenos.

Se tomaron un 1cc de cada reactor y se aislaron las colonias en 5 cc de caldo nutritivo y luego se sembraron por estriamiento en placas y cuñas de Agar Nutritivo y se incubaron por 24 h a 37°C y conforme a las características de éstas, se estableció un registro de control y se procedió a purificar las colonias marcadas por resiembras sucesivas en placas de agar nutritivo.

a.-Identificación taxonómica

Para conocer los grupos morfológicos bacterianos se empleó la prueba de Tinción de Gram. Se realizaron crecimiento en Agar Nutritivo, Agar Mc Conkey, Agar Cetrimide. Posteriormente se identificaron a través de pruebas bioquímicas: Ureasa, Vogues Proskauer, Fermentador de Glucosa (LIA), Citrato (CIT), Of Basal Medium (OF), Malonato Broth (Mal), Glucose Phosphate Broth (Vp RM), Sulfuro Indol Motilidad (SIM) y la aplicación de galería Automatizadas API.

3.2.2.4.-Capacidad biodegradadora de las cepas bacterianas aisladas en asfaltenos a través de parámetros fisicoquímicos en medio acuoso.

Este proceso consistió en evaluar tres reactores, los cuales contienen: 1g de asfalto, 3 mL del pool de bacterias identificadas y 200 mL de medio mínimo mineral; 1 g de asfalto y 200 mL de medio mínimo mineral; y el testigo o blanco que contiene solamente 200 mL de medio mínimo mineral.

Para determinar la mineralización se mide la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en cada sistema, según la norma International Standard ISO9439 ISO1990, que consiste en una trampa de CO₂ del aire atmosférico con 100 mL NaOH 1M, el reactor y el sistema de captación de CO₂ producido por mineralización con 100 mL de KOH 0.1 M.

Todas las conexiones son por tuberías de vidrio y de hule látex. El CO₂ producido por la mineralización se cuantifica por titulación con HCl 0.1 M de alícuotas de 10 mL de la disolución de KOH 0.1 M más 40 mL de agua destilada, 2 mL BaCl₂ más el indicador fenolftaleína (Pineda *et al.*2002). La producción de CO₂ se obtiene sustituyendo los datos en la ecuación III -2.

$$\mu\text{mol CO}_2 = [(B-P) \times M_{\text{HCl}} \times 1000] / 2 \quad (\text{III -2}) \quad (\text{Pineda } et al., 2002)$$

Donde:

$\mu\text{mol CO}_2$: micromoles de dióxido de carbono producidos

B: gasto del sistema blanco (medio mínimo mineral)

P: gasto muestra problema

M_{HCl} : molaridad del HCl

Al finalizar el estudio las disoluciones de los sistemas o reactores, se filtraron y se lavaron con agua destilada una vez logrado esto, se dejó secar a temperatura ambiente, al tener los asfaltenos completamente secos, se raspó y se agregó en un vaso precipitado y se adicionó aproximadamente 100 mL de n-hexano, luego se cargó a un equipo de reflujo continuo, se filtró y la masa de los asfaltenos se procedió a situarlos en un matraz tipo Schlenk sobre un baño de glicerina caliente y

con conexión a “vacío” durante un periodo aproximado de cuatro horas, los asfaltenos fueron guardados en frascos de vidrio color ámbar en atmósfera inerte (nitrógeno). se secaron para sus posteriores análisis: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), análisis elemental de hidrógeno (H), carbono (C), nitrógeno (N), azufre (S), resonancia magnética nuclear de carbono (RMN- ^{13}C). Al inicio y al final de tratamiento.

3.2.3.-Ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio de la eficiencia de los consorcios bacterianos aislados y de *Eisenia foétida* en la degradación de suelos contaminados con asfalto.

Fase metodológica 1

3.2.3.1.- Determinación de las características fisicoquímicas del suelo, crudo y estiércol, con el fin de conocer sus propiedades.

3.2.3.1.1.-Obtención de las muestras de suelo.

El suelo para llevar a cabo la fase experimental, fue tomado de una parcela perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV), ubicada en El Limón, estado Aragua. La razón de su elección se fundamenta en que esa zona, el suelo es de tipo franco arenoso/arcilloso y presenta características similares a las del suelo no alterado virgen ubicado en Apure y en la FPO.

Estas muestras fueron obtenidas a 20 cm de profundidad, según lo recomendado por Pardo *et al.* 2004, además, el área delimitada para este procedimiento fue aproximadamente de 1 m².

Las muestras de suelo se sometieron a un proceso de limpieza, en la cual se retiró cualquier material ajeno (piedras, paja), que pudo ser tomado durante el muestreo. (Véase Figura 3.1)



Figura 3.1: muestras de suelo

Posteriormente, las muestras de suelo fueron expuestas en una estufa marca Selecta modelo DIGITHEAT a 105 °C por 24 h. Este proceso se realizó con la finalidad de esterilizar el suelo, además de retirar la humedad presente, lo cual facilitó la etapa de tamizado. Finalmente, el suelo fue cernido utilizando un tamiz de bronce N° 20, para retener materiales como piedras pequeñas, raíces y hojas secas, entre otros.

3.2.3.1.2.-Caracterización del suelo.

Se dispuso aproximadamente de 1 kg de suelo en una bolsa plástica debidamente identificada, para ser caracterizado en el Laboratorio General de Suelos del Instituto de Edafología (UCV) (véase metodología apéndice E, E.1). Los análisis requeridos para la caracterización del suelo virgen comprenden:

-Variables químicas.

Capacidad de intercambio catiónico (CIC) [Agronomy, 1986], potencial de acidez (pH) [SW 846 9045 C, 1996], calcio (Ca) [3500-Ca, 1998], fósforo total (P) [4500 - P E, 1983], nitrógeno total (N) [SM 4500-Norg B, 1996], potasio (K) [3500-K B, 1998], sodio (Na) [3500-Na B, 1998], magnesio (Mg) [3500-Mg, 1998], conductividad eléctrica (C.E) [SW 846 9050 A, 1996], porcentaje de materia orgánica (%MO) [Walkley Black 9045C, 1995] y aluminio intercambiable (Al_{INT}^{+3}) [Agronomy, 1986].

-Variables físicas.

Porcentaje de arcilla, porcentaje de limo y porcentaje de arena [Agronomy, 1986] para determinar la clasificación textural.

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

El procedimiento está basado en la norma ASTM D2216 (1998) y consiste en pesar aproximadamente 200 g de suelo virgen en un vaso de precipitado, a los cuales se le añadió gradualmente un volumen de 1 mL de agua destilada, hasta observar una ligera capa sobrenadante de agua en la superficie del suelo. Este procedimiento se realizó por triplicado. Siguiendo la ecuación (III - 3), se obtuvo la cantidad de agua necesaria para saturar una determinada cantidad de suelo, véase Tabla 3.1 la cantidad de agua retenida.

$$\bar{C}_R = \frac{\sum_i^n \left(\frac{V_{\text{AguaRet}}}{m_s} \right)}{n} \quad (\text{III -3})$$

Donde:

\bar{C}_R : Capacidad de retención promedio del suelo, g/mL

i: Medición inicial, adim

n: Número de mediciones, adim

m_s : Masa de suelo pesada, g

V_{AguaRet} : Volumen de agua retenida por la muestra de suelo, mL

Tabla 3.1: Variables necesarias para determinar la capacidad de retención de agua

Masa del beacker vacío ($M_{BV} \pm 0,01$) g	Masa del beacker con suelo ($M_{BS} \pm 0,01$) g	Volumen de agua retenida ($V_{AR} \pm 0,01$) mL
140,42	340,42	110,00
121,02	321,02	110,00
139,30	339,30	106,00

-Determinación de la humedad en el suelo.

Este procedimiento se basó en la norma ASTM D2216-1998 y consistió en pesar una cápsula de Petri con tapa, donde se colocó una muestra de suelo de aproximadamente 20 g. Seguidamente se llevó a la estufa por 12 horas y se dejó enfriar, la cápsula se pesó nuevamente y la humedad se determinó mediante la ecuación III – 4.

$$\%H_S = \left(\frac{M_{CPSH} - M_{CPS}}{M_{CPS} - M_{CPV}} \right) \times 100 \quad (\text{III - 4}) \quad (\text{Himmelblau, 1998})$$

Donde:

$\%H_S$: Porcentaje de humedad del suelo.

M_{CPSH} : Masa de la cápsula de Petri con el suelo húmedo, g.

M_{CPS} : Masa de la cápsula de Petri con el suelo seco, g.

M_{CPV} : Masa de la cápsula de Petri vacía, g.

3.2.3.1.3.-Obtención del petróleo crudo.

El asfalto utilizado como contaminante provienen de dos crudos: uno extrapesado extraído del área de exploración activa Ayacucho, ubicada en la FPO y el otro mediano Guafita proviene de una subcuena del estado Apure, la cual se encuentra ubicada a 45 km al suroeste de Guasgualito a 3 km al norte del río Arauca y 25 km al norte del campo Caño Limón en Colombia.

Para la realización de la caracterización inicial del crudo, se seguirá el procedimiento de determinación gravimétrica de las fracciones de saturados, aromáticos y resinas, propuesta por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), 8020/8100 EPA – 1986.

-Obtención de los maltenos.

El sobrenadante obtenido (disolución filtrada) de la precipitación de los asfaltenos en la sección 3.2.2, llamado maltenos (Canals V., 2005), está constituida por las fracciones de saturados, aromáticos y resinas. Esta mezcla, se ubicó en un rotaevaporador para destilación al vacío y se recuperó el disolvente contenido en los maltenos.

Para la separación de los maltenos, se activó la sílice gel 60 de Merck [63-200 μ m (70-230 mesh ASTM)], este procedimiento consistió en tomar la cantidad en gramos de la misma en una relación 1:30 con respecto a la cantidad de maltenos, tomada para efectuar la elución en la columna sometiénola durante 24 horas a calentamiento en una estufa a 120 °C.

Para llevar a cabo el empaquetamiento, se colocó al final de la columna lana de vidrio, y se llenó la columna de vidrio hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con n-hexano, luego se agregó la sílice gel lentamente vigilando de no dejar gotas de aire a lo largo de la columna, dando pequeños golpes a la columna con una manguera de goma, para así lograr un empaquetamiento uniforme mientras se agregó el disolvente, véase la Figura 3.2, este procedimiento se realizó hasta agregar toda la cantidad de sílice gel pesada.

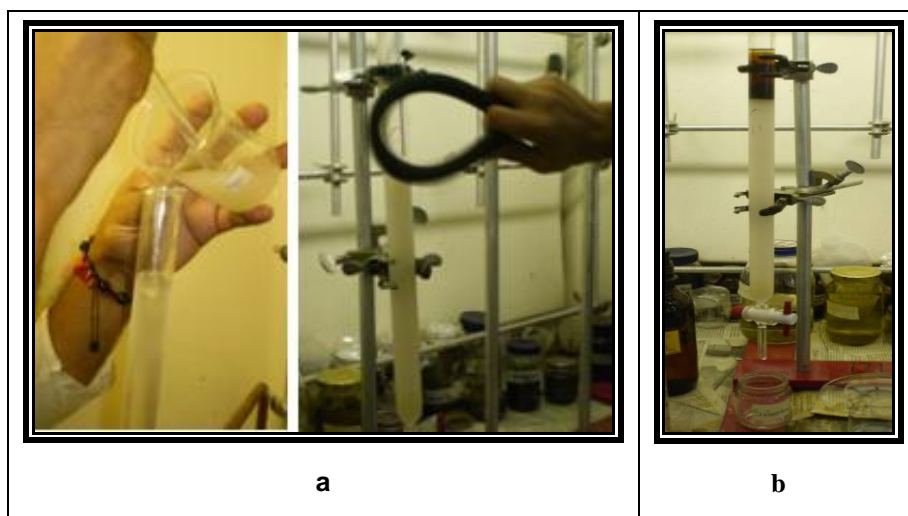


Figura 3.2: a.- Adición de sílica gel a la columna. b.- Maltenos añadidos a la columna.

-Obtención de la fracción saturada.

Se pesó aproximadamente un gramo de los maltenos obtenidos, se disolvió en una pequeña cantidad de n-hexano, esta se agregó a la columna por la parte superior del empaque y con la llave abierta, continuamente se siguió agregando n-hexano en una cantidad aproximada de 50 mL por gramo de muestra comenzando la separación en la columna cromatográfica de la fracción saturada, la cual es totalmente incolora. En la recolección de saturados se utilizó una lámpara manual UV-Visible el cual es usada para poder identificar la fracción aromática que es incolora pero flúorese con la luz UV-Vis, y así podemos saber hasta cuando recolectamos los saturados. La fracción recolectada fue colocada en el rotoevaporador para purificarla y el modelo matemático asociado para el cálculo de la fracción esta dada por la ecuación III – 5.

$$\%Sat = \frac{\left(1 - \frac{\%Asf}{100}\right) \times (M_{BSA} - M_{BV})}{M_{MT}} \times 100 \quad \text{(III - 5) (Carbognani et al., 1997)}$$

Donde:

$\%Sat$: Porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo.

M_{BSA} : Masa del balón lleno con la fracción saturada, g.

M_{BV} : Masa del balón vacío, g.

M_{MT} : Masa tomada de maltenos, g.

Asf : Porcentaje de asfalteno, %.

-Obtención de la fracción aromática.

Después de extraer los saturados, se agregó 50 mL de una mezcla hexano-tolueno 50:50 y posteriormente 50 mL de tolueno en varias porciones.

La fracción recolectada fue colocada en el rotoevaporador para purificarla y el modelo matemático asociado para el cálculo de la fracción esta dada por la ecuación III – 6.

$$\%Aro = \frac{\left(1 - \frac{\%Asf}{100}\right) \times (M_{BARO} - M_{BV})}{M_{MT}} \times 100 \quad \text{(III - 6) (Carbognani et al., 1997)}$$

Donde:

$\%Aro$: Porcentaje de hidrocarburos aromáticos presente en el crudo, %.

M_{BARO} : Masa del balón lleno de la fracción aromática, g.

M_{BV} : Masa del balón vacío, g.

M_{MT} : Masa tomada de maltenos, g.

Asf : Porcentaje de asfalteno, %.

-Obtención de la fracción resina.

Al separar la fracción de aromáticos, se agregaron 40 mL de una mezcla tolueno-metanol 50:50 y luego 40 mL de metanol. Cuando empezó a caer un líquido de color pardo, se cambió el recipiente rápidamente; esta sección oscura representa las resinas del crudo

La fracción recolectada fue colocada en el rotoevaporador para purificarla y el modelo matemático asociado para el cálculo de la fracción esta dada por la ecuación III – 7.

$$\% Re_s = 100 - \% Asf - \% Sat - \% Aro \quad (III - 7) \quad (\text{Carbognani } et al., 1997)$$

Donde:

% Re_s: Porcentaje de resinas presentes en el crudo.

3.2.3.1.4.-Propiedades fisicoquímicas del estiércol.

En la preparación del alimento de las lombrices (sustrato) mejor conocido como estiércol, se empleó una mezcla de estiércol de ganado vacuno y de caballo (estiércol equino) previamente madurado, ya que el mismo posee un pH cercano a la neutralidad. Se adicionó este sustrato, ya que estos macroorganismos no sobreviven de los nutrientes que posea el suelo, al mismo tiempo se realizó la caracterización química del estiércol como: carbono, fósforo, nitrógeno y materia orgánica, con el fin de saber la concentración inicial de nutrientes que posee.

Fase metodológica 2

3.2.3.2.- Estudio de los microcosmos con consorcios bacterianos aislados y *Esenia foétida*

3.2.3.2.1.-Proceso de encalado del suelo.

Los resultados de la caracterización del suelo, reflejaron que el pH inicial fue de 5,66; por lo tanto, fue necesario realizar el encalado del suelo que consistió en agregar carbonato de calcio para corregir la acidez. Según Casanova (2005), la cantidad de carbonato de calcio a añadir, está relacionada con la masa de cal (necesaria para elevar el pH) con el valor de aluminio intercambiable en el suelo. Los análisis de laboratorio reportan (véase apéndice C. Figura C.1) que no existe aluminio intercambiable en el suelo, debido a que el pH fue superior a 5,50 unidades, valor en el que, teóricamente, todo el aluminio ha sido neutralizado.

Por lo que el procedimiento de encalado, se basó en un método de ensayo y error, en donde se tomaron 5 muestras patrones de aproximadamente 150 g de suelo y se añadieron a cada una de ellas, diferentes cantidades de carbonato de calcio (véase Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Encalado del suelo virgen con Carbonato de Calcio (CaCO₃)

Masa de suelo (Ms ± 0,001) g	Masa CaCO₃ (M_{CaCO₃}±0,001)g	Potencial de acidez (pH ± 0,05) mV
150,161	1,500	7,55
150,068	1,000	7,50
150,990	0,500	7,20
150,002	0,453	6,90
150,003	0,401	6,80

Para verificar el potencial de acidez, se colocó en un vaso de precipitado aproximadamente 5 g de suelo y 25 mL de agua destilada (relación 1:5), se agitó durante 30 minutos y se decantó el sobrenadante. El pH-metro se calibró con dos disoluciones buffer de pH 4 y 7. Una vez calibrado, se introdujo el electrodo en la disolución decantada y se realizó la medición por triplicado.

Luego de una semana se repitió el procedimiento para verificar que el pH permaneciera neutro. Al verificar la estabilidad del pH, se encaló la masa total de suelo destinada para los microcosmos.

El encalado se realizó por separado para cada tratamiento usando como medio líquido el medio mineral a pH 7, para el suelo sometido a tratamiento con consorcios bacterianos y agua destilada para el suelo sometido a tratamiento con crías de *Eisenia foétida*

Es importante señalar que según el artículo 53 del decreto 2635: “Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos” publicado en gaceta oficial extraordinaria N° 5.245 del 3 de agosto de 1998, se aplica tratamientos de biorremediación a suelos cuyo intervalo de pH se encuentre entre 6 y 8.

3.2.3.2.2.-Montaje de los microcosmos para los diferentes crudos

a.-Biorremediación del suelo contaminado utilizando consorcio bacteriano.

Para aplicar este tratamiento, se instalaron ocho microcosmos de polietileno de 0,038 m² de área cada uno con aproximadamente 500 g de suelo, cuatro utilizando asfalto Ayacucho: **Hpatrón-bact** como patrón y tres réplicas denominadas **Hbact-1, Hbact-2, Hbact-3** y cuatro utilizando asfalto Guafita: **Gpatrón-bact** como patrón y tres réplicas denominadas **Gbact-1, Gbact-2, Gbact-3**, el cual se adicionó a las replicas el inóculo o bacterias degradadoras de asfalto y a todos los microcosmos se adicionó medio mínimo mineral esterilizado propuesto por Pineda et al., (2002). La cantidad de medio mineral requerida, se calculó a partir de los resultados del ensayo de capacidad de retención del suelo, considerando que el porcentaje de humedad óptimo para el desarrollo del consorcio es del 60% de la capacidad de saturación y la cantidad a agregar de inóculo o bacterias degradadoras según ensayo de factibilidad (véase Tablas 3.3 y 3.4).

b.-Biorremediación del suelo contaminado utilizando macroorganismos de *Eisenia foétida*.

Para llevar a cabo el tratamiento, se instalaron ocho microcosmos de polietileno de 0,038 m² de área, cada uno con aproximadamente 500 g de suelo: cuatro utilizando asfalto Ayacucho: **Hpatrón-lomb** como patrón y tres réplicas denominadas **Hlomb-1, Hlomb-2, Hlomb-3** y cuatro utilizando asfalto Guafita: **Gpatrón-lomb** como patrón y tres réplicas denominadas **Glomb-1, Glomb-2, Glomb-3**, donde se adicionó lombrices y estiércol sobre el suelo contaminado.

La cantidad de lombrices a agregar dentro de los microcosmos, se determinó considerando que en cualquier suelo, bajo condiciones naturales pueden encontrarse de 100 a 200 lombrices por metro cuadrado (Alastre, 1995). Esta cantidad de organismos se extrapola, tomando en cuenta las dimensiones del microcosmo dando un total de ocho lombrices, según Ferruzzi (2004). Las lombrices comen diariamente

una cantidad de materia orgánica igual a su peso (Edwards et al., 1996). Dando un promedio de 2,6 para el microcosmo con asfalto Ayacucho y 2,8 g de sustrato para el microcosmo con asfalto Guafita que ingerirían diariamente por 49 días, dando un total de 127 g y 137 g a lo largo de los cuarenta y nueve días. Para mantener las mismas proporciones de materia orgánica y sus macroelementos en los tratamientos, se decidió colocar la cantidad 176 g por encima a la calculada en los diferentes tratamientos véase Tablas 3.3 y 3.4

Antes de realizar el montaje de los microcosmos, el agua a utilizar para humedecer las muestras en el tiempo así como el medio mínimo, fueron sometido a un proceso de esterilización en un equipo autoclave marca P Selecta, modelo presoclave – 11 durante 20 min, el suelo y los asfaltos se esterilizaron en una estufa, con el fin de eliminar cualquier microorganismo que pueda interferir en el experimento. El proceso de contaminación del suelo con asfaltos se efectuó de manera que la cantidad de contaminante fuera aproximadamente al 1 % utilizando la ecuación III-8.

$$\% \text{Asf}_{MS} = \frac{m_{\text{Asf}}}{m_{\text{Asf}} + m_{MS}} \times 100\% \quad (\text{III-8})$$

Donde:

$\% \text{Asf}_{MS}$: Porcentaje de asfaltos presentes en la muestra de suelo, %

$m_{\text{AsfAñadida}}$: Masa de asfaltos presentes, g

m_{MS} : Masa de la muestra de suelo, g

Los microcosmos se colocaron en el laboratorio a temperatura ambiente y sin exposición directa de la luz solar. El proceso de aireación se efectuó por 5 min mediante una espátula y se ajustó el valor de humedad al 5 % cada dos días.

Posteriormente se tomaron muestras de suelo para cada tratamiento, realizando un monitoreo a los 0, 4, 8, 12, 16, 19, 22 y 49 días.

**Tabla 3.3: Composición de los microcosmos y sus respectivos controles
Asfalteno Ayacucho**

Microcosmo	Masa de suelo ($M_S \pm 0,01$) g	Masa de asfaltenos ($M_A \pm 0,001$) g	Porcentaje de contaminación del suelo ($S_c \pm 0,002$) %	Masa de estiércol ($M_E \pm 0,001$) g	Inóculo de bacterias ($V_{IB} \pm 0,02$) mL	Cantidad de lombrices (N_L)	Masa de las lombrices agregadas ($M_L \pm 0,001$) g
Hpatrón-bact	533,60	7,601	1,404	-----	-----	-----	-----
Hbact-1	500,60	7,547	1,485	-----	10,00	-----	-----
Hbact-2	500,60	7,201	1,418	-----	10,00	-----	-----
Hbact-3	500,40	7,203	1,419	-----	10,00	-----	-----
Hpatrón-lomb	534,60	7,857	1,448	-----	-----	-----	-----
Hlomb-1	501,50	7,203	1,416	176,084	-----	8	2,553
Hlomb-2	500,90	7,206	1,418	176,025	-----	8	2,813
Hlomb-3	500,60	7,206	1,419	176,018	-----	8	2,324

Nota: H: asfalteno Ayacucho, bact: bacterias, lomb: lombriz

**Tabla 3.4: Composición de los microcosmos y sus respectivos controles
Asfalteno Guafita**

Microcosmo	Masa de suelo ($M_S \pm 0,01$) g	Masa de asfaltenos ($M_A \pm 0,001$) g	Porcentaje de contaminación del suelo ($S_c \pm 0,002$) %	Masa de estiércol ($M_E \pm 0,001$) g	Inóculo de bacterias ($V_{IB} \pm 0,02$) mL	Cantidad de lombrices (N_L)	Masa de las lombrices agregadas ($M_L \pm 0,001$) g
Gpatrón-lomb	501,70	5,202	1,026	-----	-----	-----	-----
Glomb-1	501,60	5,201	1,026	176,011	-----	8	2,834
Glomb-2	500,10	5,207	1,030	176,009	-----	8	2,764
Glomb-3	500,60	5,200	1,028	176,037	-----	8	2,713
Gpatrón-bact	500,00	5,207	1,031	-----	-----	-----	-----
Gbact-1	500,20	5,202	1,029	-----	10,00	-----	-----
Gbact-2	501,60	5,203	1,027	-----	10,00	-----	-----
Gbact-3	502,40	5,202	1,025	-----	10,00	-----	-----

Nota: G: Guafita, bact: bacterias, lomb: lombriz

c.- Caracterización de los macronutrientes empleados en la biorremediación del suelo contaminado utilizando bacterias y crías de *Eisenia foétida* en el día cero.

El carbono orgánico presente se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\%CO = \frac{\%MO}{f_{MO}} \quad (\text{III - 9}) \quad (\text{Marín } et al., 2002)$$

Donde:

$\%CO$: Porcentaje carbono orgánico, adim

$\%MO$: Materia orgánica, adim

f_{MO} : Factor (1,7 adim)

Los macroelementos analizados al inicio del tratamiento fueron: carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), estos valores se determinaron en el apéndice D y los datos fueron tomados del apéndice C, Figura C.1 y C.2 y del medio mínimo mineral de cultivo . Como no fue posible realizar la caracterización del suelo contaminado, se determinó el porcentaje de macroelementos siguiendo la ecuación (III - 10):

$$\%M_E = \frac{m_{MS} \times \%ME_S + m_{AE} \times \%ME_{AE}}{m_{MS} + m_{AE}} \quad (\text{III - 10}) \quad (\text{Brown } et al., 2004)$$

Donde:

$\%M_E$: Porcentaje del macroelemento en el microcosmo, adim

m_{MS} : Masa de la muestra de suelo agregada en el microcosmo, g

$\%ME_S$: Porcentaje del macroelemento presente en la muestra de suelo, adim

$\%ME_{AE}$: Porcentaje del bioestimulante agregado al microcosmo, g

m_{AE} : Masa del bioestimulante agregado en el microcosmo, g

3.2.3.3.- Evolución del crecimiento bacteriano en muestras de suelos contaminados con los diferentes asfaltos y la relación entre fracción biodegradada a través del tiempo.

3.2.3.3.1.-Determinación del crecimiento bacteriano

Para determinar esta variable se pesó aproximadamente 10 g de suelo contaminado por microcosmo en cada tiempo muestral (muestra compuesta), los cuales se ubicaron en envases esterilizados y son mantenidos bajo refrigeración hasta su posterior análisis. La metodología a empleada se encuentra en el apéndice E (E-2)

3.2.3.3.2.- Concentración de asfalto y degradación

a.-Extracción de asfalto en suelo de los diferentes crudos extrapesados y medianos.

Esta variable se determinó según la normativa como METHOD 3540C SOXHLET EXTRACTION-1996 propuesta por la Agencia de Protección Ambiental (EPA).

Primeramente se recolectó una muestra compuesta de suelo de aproximadamente 5 g, la cual se confinará en papel de filtro sujetándola firmemente.

Por otro lado, se instaló el equipo de extracción Soxhlet, se añadió al balón de destilación tetrahidrofurano (THF) y se procedió a realizar la extracción, refluendo el disolvente hasta observar transparencia del mismo en la parte superior del equipo. Transcurrido el periodo de extracción, se deja enfriar el sistema, se rota evapora y al sólido obtenido, se le agrega aproximadamente 100mL n-hexano y se carga a un equipo de reflujo continuo. Se filtra, se seca y se pesa.

Para la obtención de asfalto se siguió el procedimiento de Determinación Gravimétrica propuesta por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) ,8020/8100-1986 véase punto 3.2.2

El porcentaje y la fracción biodegradada de los mismos se determinó a través de las siguientes ecuaciones:

Porcentaje de asfalteno:

$$\%As_T = \frac{m_{Asf_E}}{m_{Asf_E} + m_{MS}} \times 100\% \quad (\text{III - 11}) \quad (\text{Carbognani } et al., 1997)$$

Donde:

$\%As_T$: Porcentaje de asfaltenos en la muestra a través del tiempo, adim

m_{Asf_E} : Masa de asfaltenos extraídos, g

m_{MS} : Masa de la muestra de suelo, g

Porcentaje de degradación de asfalteno

$$\%D = \left(1 - \frac{\%As_T}{\%As_0} \right) \times 100 \quad (\text{III-12}) \quad (\text{Carbognani } et a.l, 1997)$$

Donde:

$\%D$: Porcentaje de degradación de los asfaltenos, %.

$\%As_T$: Porcentaje de asfaltenos presentes en un tiempo de muestreo, %.

$\%As_0$: Porcentaje de asfaltenos presentes en el día cero de tratamiento, %.

3.2.4.- Evaluación de la eficiencia del sistema de tratamiento biológico empleando las técnicas cromatográficas, infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C), relación de H/C y producción de CO₂ respirometría.

Las pruebas se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), la cual se basaron en la obtención de los espectros RMN-¹³C de las muestras, empleando un espectrómetro BRUKER-AC-200. Los valores de los desplazamientos químicos se obtuvieron en (ppm) y las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los análisis elementales de hidrógeno, carbono, azufre y nitrógeno, son analizados en un equipo Analizador Elemental C, H, N, S y O, marca Carlo Erba (actualmente Thermo), modelo EA 1108, los infrarrojos se realizó en la

FACYT en un Espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier. Marca: Shimadzu. Modelo FTIR – 8400S. Serial A21274300191.

La producción de CO₂ originada por la biorremediación, será monitoreada en todas las unidades experimentales cada 24 h, a través del método de la trampa de álcali reseñado por Martínez (2007). El procedimiento consistió en colocar una cápsula de Petri con disolución de hidróxido de potasio (KOH) 0,1 N sobre la superficie del suelo y otra cápsula de mayor diámetro invertida que sirve para mantener el sistema cerrado. El CO₂ liberado es atrapado por la disolución de álcali y al transcurrir 24 h, el exceso de base se valoró mediante titulación ácido-base con una disolución de HCl de 0,1 N, a esta disolución se le agregó 2mL de cloruro de bario (BaCl₂), para lograr la precipitación de los carbonatos y se utilizó azul de bromofenol o fenoltaleína como indicador. Los moles de dióxido de carbono se determinaron de acuerdo a la expresión III- 13.

$$\text{CO}_2 = (\text{Vb}-\text{Vm}) \times \text{N} \times \text{Z}/\text{A}_{\text{cápsula}} \times \text{Día} \quad \text{III- 13 (Martínez, 2007)}$$

Donde:

CO₂: Cantidad de CO₂ producido, $\frac{\text{mg}_{\text{CO}_2}}{(\text{día} \times \text{cm}^2)}$

Vb: Volumen de HCl gastado en el blanco o patrón P, mL

Vm: Volumen de HCl gastado al titular la disolución de los microcosmo de los tratamientos, mL

N: Concentración de HCl para titular la muestra, eq/mL

Z: Peso equivalente del CO₂, mg/eq

A: Área delimitada para la respiración celular, cm²

Para comparar las condiciones del suelo virgen con la del suelo contaminado sometido a ambos tratamientos, se colocó una unidad experimental como patrón que contenga suelo sin contaminar y se midió la respiración como único parámetro.

3.2.5.- Análisis estadístico de los resultados obtenidos, con la finalidad de establecer las diferencias más significativas entre los diferentes tratamientos.

Para realizar la estimación de las principales variables estadísticas de interés se empleó el software analítico STATISTIX 8.0 para Windows. Con el cual se verificó la diferencia significativa entre las diversas variables monitoreadas durante el proceso de biorremediación, tomando como factor de bloque a los tiempos muestrales en donde se tomaron las muestras para su posterior análisis.

Antes de introducir los valores a analizar en el programa estadístico, los mismos fueron vaciados en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2003, utilizando el comando *Copiar* , en donde la primera columna refleja el tiempo de muestreo, la segunda columna se refiere a los tratamientos aplicados y la última a los valores obtenidos de la fracción degradada (Fd). Esto puede visualizarse en la tabla

Tabla 3.5: Codificaciones utilizadas para la introducción de las variables de salida a ser analizadas por el programa statistix 8.0 asfalteno Guafita

Tiempo de muestreo	Día Cero (0) = 1
	Día Cuatro (4) = 2
	Día Ocho (8) = 3
	Día Doce (12) = 4
	Día Dieciséis (16) = 5
	Día Diecinueve (19) = 6
	Día Veintidós (22) = 7
	Día Cuarenta y nueve (49) = 8
Microcosmo	Tratamiento patrón lombriz Gpl = 1
	Tratamiento lombriz Gl = 2
	Tratamiento patrón bacterias Gpb = 3
	Tratamiento bacterias Gb = 4

Análisis de varianza

Para estimar las posibles diferencias significativas se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA TWO-WAY) a través de los siguientes pasos: *Linear Models -- Análisis of Variance -- Randomized Complete Block*. Esto permitió comparar variables entre los dos tratamientos aplicados con bacterias y lombriz. Es importante resaltar que para esto, se debió introducir al programa el tiempo de muestreo, la variable dependiente, en este caso la fracción biodegradada, además de la variable independiente que no es más que los tratamientos aplicados.

Normalidad y homogeneidad

Para concluir acerca de la normalidad de los tratamientos, se utilizó la prueba de Shapiro Wilks, a través de los siguientes comandos *Results -- Plots -- Normal Probability Plot*. Además se realizó la prueba de homogeneidad utilizando el figura de los residuos fijos, siguiendo los siguientes comandos *Results -- Plots -- Resids by Fitted Values*.

Comparación entre tratamientos

Para realizar una comparación entre los tratamientos aplicados, se aplicó la prueba diferencia honestamente significativa (Tukey HSD), ejecutando los siguientes comandos *Results -- Multiple Comparison -- All-Pairwise Comparisons*.

También se realizó una comparación de cada tratamiento con su patrón (Prueba de Dunnet); es decir que cada variable de los tratamientos se comparó con el patrón control de él, siguiendo los siguientes comandos *Results -- Multiple Comparison -- Comparisons with a Control*.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.- Selección del pool de bacterias a partir de diferentes crudos.

4.1.1.-Selección de bacterias degradadoras del crudo con diferentes grados API.

En la Figura 4.1 se puede observar el crecimiento bacteriano de las cepas degradadoras de crudos Ayacucho y Guafita.

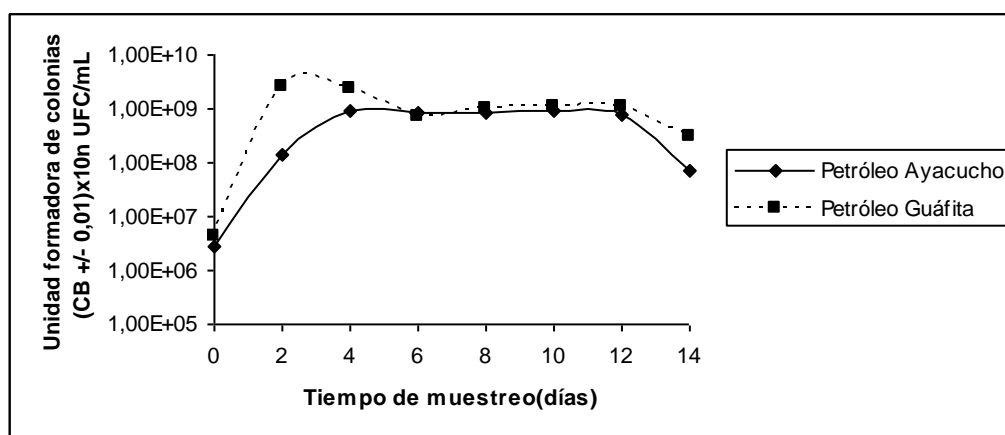


Figura 4.1: Comportamiento de la carga bacteriana en los crudos Ayacucho y Guafita.

También se distingue que la fase estacionaria tiende a extenderse, esto se caracteriza porque la velocidad de crecimiento es igual a la de muerte, en esta fase las bacterias compiten unas con otras por sobrevivir consumiéndose entre ellas para subsistir, ya que se ha agotado el medio nutritivo y así pasar a la fase de muerte. Iañez, (2005)

4.2. Estudio de la capacidad degradadora de los distintos consorcios bacterianos, provenientes de diferentes crudos sobre asfaltenos, (Ensayo de factibilidad).

4.2.1.- Extracción de asfaltenos de los diferentes crudos extrapesado Hamaca (Ayacucho) y mediano Guafita.

Obtención de la fracción de asfaltenos.

Al aplicar la técnica SARA para la obtención de la fracción de asfalteno descrita en la metodología, se obtuvo un 4 % m/m de asfaltenos presentes en el crudo Guafita, lo cual es bajo, pero típico de un crudo mediano en cambio en el crudo Ayacucho, se obtuvo un alto contenido de asfaltenos 16 % m/m, estos fueron almacenados en frascos ámbar en atmósfera de nitrógeno para su posterior degradación (véase apéndice A, Tabla A.1 a la A.8).

4.2.2.- Obtención de un consorcio bacteriano degradador de asfalteno.

Se observa, que en los sistemas evaluados a escala de laboratorio los reactores de vidrio aplicados a las diferentes fracciones de asfalteno de los crudos a estudiar, presentan un ligero incremento entre los días dos y cuatro alcanzando densidades poblacionales de 10^8 UFC/mL en ambos sistemas, lo cual disminuyó a medida que avanzaba el estudio, conservándose en una densidad poblacional de 10^5 UFC/mL, se ha de resaltar que los asfaltenos constituye la única fuente de energía como carbono necesaria para que se mantenga (véase Figura 4.2).

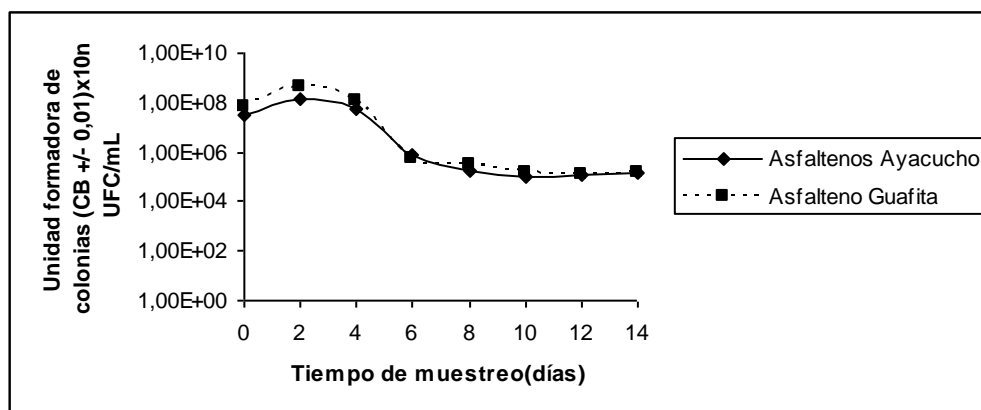


Figura 4.2: Comportamiento bacteriano de las fracciones de asfalteno Ayacucho y Guafita a través del tiempo.

4.2.3.- Aislamiento e identificación de las cepas más eficientes en la degradación de los asfaltenos.

Del tratamiento anterior (4.2) se obtuvieron cinco microorganismos para el crudo mediano Guafita y uno para el crudo extrapesado Ayacucho. Se realizó Gram a todas las muestras, todas se tiñeron, dando bacilos Gram negativo (-). Una vez realizado el Gram y sabiendo el grupo morfológico correspondiente a cada microorganismo, se realizaron pruebas bioquímicas manuales y posteriormente confirmación por galerías API (las cuales son galerías que poseen micropozos con sustratos deshidratados) y la lectura se realizó mediante un software API. (véase anexo C, Tabla C.3). Para los diferentes crudos se identificaron las siguientes bacterias. Crudo Ayacucho: *Pseudomonas aeruginosa*, Crudo Guafita: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas spp* y *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.4.-Capacidad biodegradadora de las cepas bacterianas aisladas en asfaltenos a través de parámetros fisicoquímicos en medio acuoso.

4.2.4.1.-Crudo Ayacucho

En la mineralización de asfalteno Ayacucho la bacteria está integrada por una cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, no fermentadora adaptada a utilizar asfalteno como única fuente de carbono y energía, en donde su comportamiento se mantuvo en 10^6 UFC/mL, esta cepa es reportada por Todar, (2000) como bacterias degradadoras de hidrocarburos, encontradas en el pool de microorganismos en suelos contaminados con petróleo.

En la Figura 4.3 se observa la actividad de los microorganismos durante el proceso, en donde existe un crecimiento acelerado y luego un régimen estacionario, esto se debe a que los asfaltenos son insolubles en agua y su estructura molecular dificulta el ataque de estos microorganismos, por lo que la actividad varía poco y el escaso

incremento puede deberse al aprovechamiento de la proteína dejada por los microorganismos muertos a causa de la poca disponibilidad de carbono o minerales Iañez (2005). También se observa en la Figura 4.3 que los tratamientos sin inóculo bacteriano, presentaron los menores promedios de densidades poblacionales.

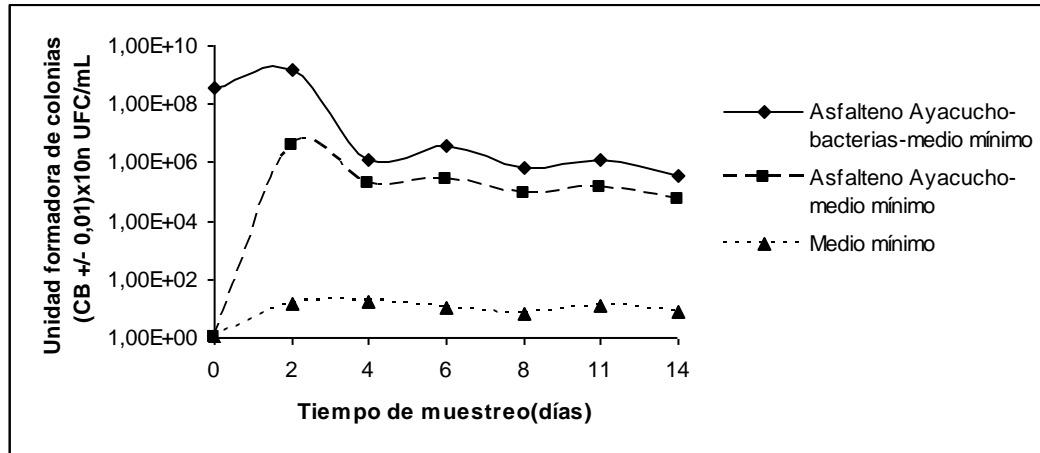


Figura 4.3: Comportamiento bacteriano en la mineralización de asfalteno Ayacucho a través del tiempo.

Con respecto a la mineralización (véase Figura 4.4), la mayor producción de CO₂ es en asfalteno con bacterias (cepa bacteriana aislada) con respecto al asfalteno sin bacterias.

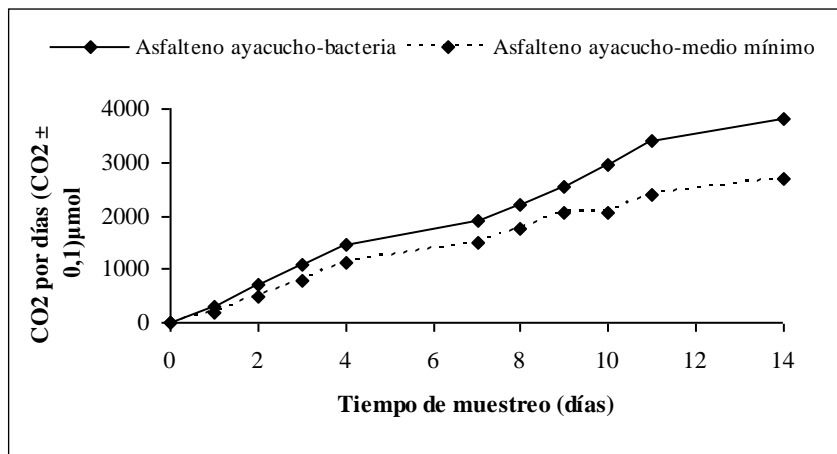


Figura 4.4: Comportamiento de CO₂ de asfalteno Ayacucho -bacterias y asfalteno Ayacucho -medio mínimo mineral.

Los valores obtenidos para la producción de CO_2 , se relacionan con las concentraciones de microorganismo para cada tratamiento, garantizando la degradación de asfalteno como única fuente de carbono ver figura 4.3. (En el Apéndice A, Tabla A.9 se encuentran los datos y resultados del muestreo).

4.2.4.1.1.-Caracterización del asfalteno Ayacucho

4.2.4.1.1.1-Espectros de FTIR.

Al realizarles análisis de FTIR a los diferentes tratamientos (véase Figuras 4.5, 4.6 y 4.7), muestran las bandas típicas para hidrocarburos: se identificaron una serie de grupos funcionales, en donde las bandas comprendidas entre 3600 y 3200 cm^{-1} podría ser una señal del grupo OH, con tipo de vibración de tensión, también son atribuidas por ser una banda de humedad de la muestra.

Entre 3000 y 2800 cm^{-1} , existen vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica de enlaces C-H alifáticos $\text{Csp}^3\text{-H}$, el mayor de estos es asimétrico y el otro es simétrico, en 1735 cm^{-1} se presenta una pequeña banda característica del grupo carbonilo, para 1690 y 1500 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de estiramiento de carbonos aromáticos C=C, con vibración de tipo tensión.

Entre 1300 y 1500 cm^{-1} , existen dos señales muy cercanas, que indican la presencia de alcanos, con una vibración de deformación angular asimétrica y simétrica respectivamente, que son las bandas de deformación de los grupos metilo y metileno, $-\text{CH}_3\delta_{\text{as}}$ ($1470\text{-}1430\text{cm}^{-1}$), $-\text{CH}_2\delta$ ($1475\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$) y $-\text{CH}_3 \delta_{\text{sim}}$ ($1395\text{-}1365 \text{ cm}^{-1}$)

En las figuras 4.6 y 4.7, se observa una banda en 1037 cm^{-1} , indicando la presencia de azufre (S) como R-SO-R, la cual no aparece en la figura 4.5, la señal de 1163 cm^{-1} posiblemente estiramiento C-O de ácidos carboxílicos ó éster en el asfalteno sin tratar y desaparece en los asfaltenos tratados, y las formas de las curvas entre 1400 y 600

cm^{-1} , indican cambios estructurales producto de la degradación. (En el apéndice A, Tabla A.10 se encuentran tabuladas las señales al inicio y al final del tratamiento)

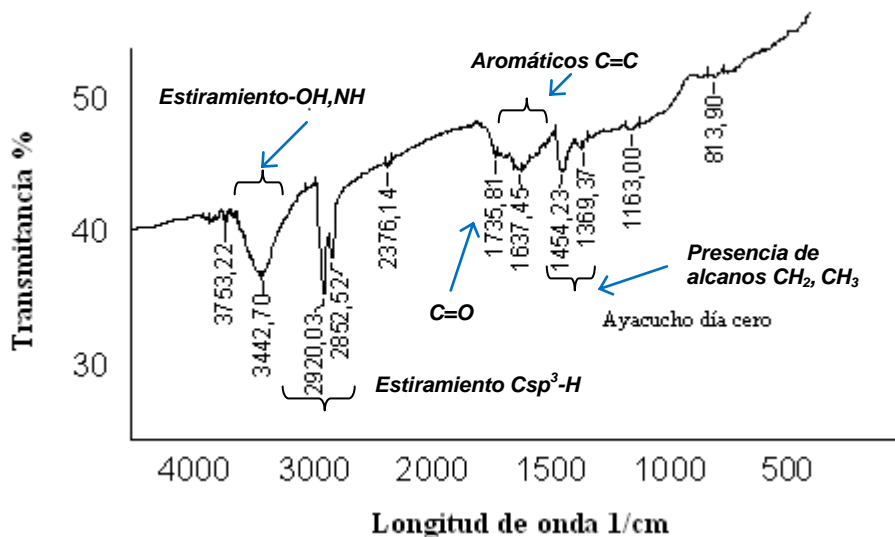


Figura 4.5: Espectro de FTIR de asfalteno Ayacucho sin tratar

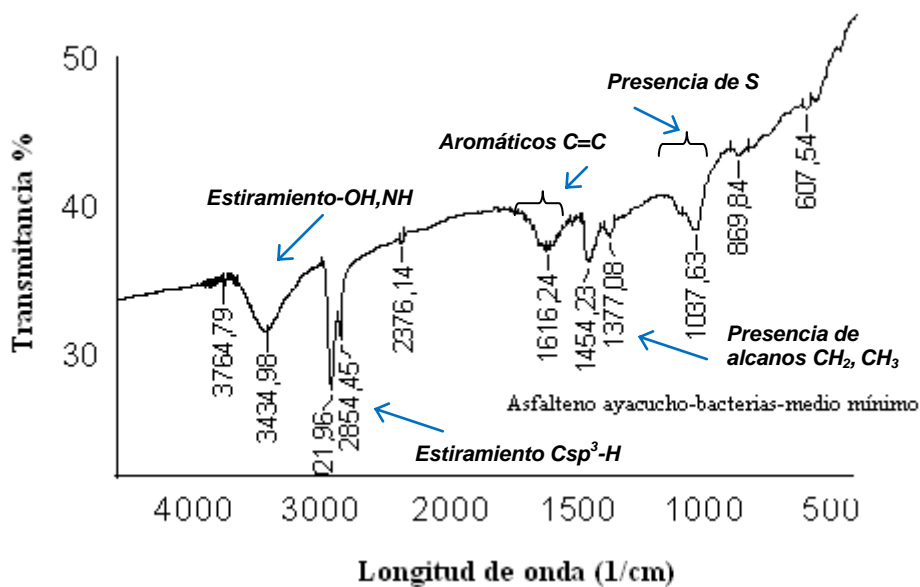


Figura 4.6: Espectro de FTIR de asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno+bacterias+ medio mínimo)

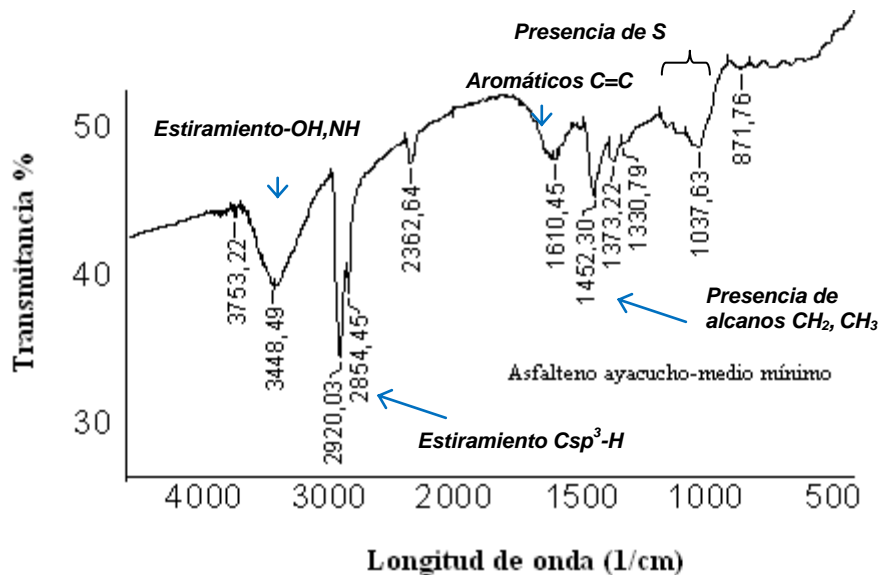


Figura 4.7: Espectro de FTIR de asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo)

4.2.4.1.1.2-Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C).

En la Figura 4.8 el espectro de RMN ¹³C de asfalteno Ayacucho en el día cero se evidencia señales en la zona alifática comprendida entre 0 y 60 ppm, indicando la presencia de cadenas alquílicas entre 14 y 35 ppm y manteniendo la señal de carbono CH₂ en 30 ppm.

Al compararla con las muestras tratadas Figuras 4.9 y 4.10, se observó que la cantidad de señales presentes en la zona alifática disminuye en comparación con la muestra del día cero (ver Figura 4.8). La cual sugiere un cambio en la estructura del asfalteno producto de la degradación.

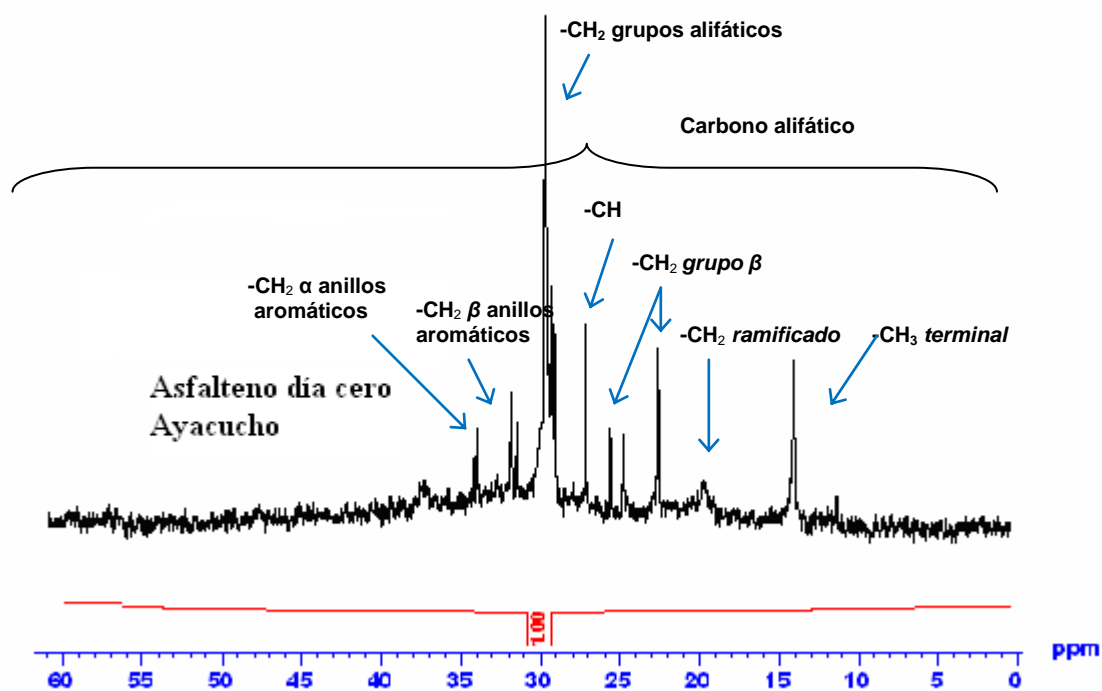


Figura 4.8: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Ayacucho sin tratar.

Otro indicador de este cambio es el área bajo la curva de los carbonos alifáticos comprendida entre 0 y 60 ppm, y los carbonos aromáticos comprendida entre 110 y 160 ppm, a través de los cuales se calculó los porcentajes de los mismos, al inicio y al final del tratamiento, (ver apéndice B, desde la Figura B.1 a la B.3 se localizan todos los análisis de RMN ^{13}C , con sus respectivas zonas alifáticas y aromáticas).

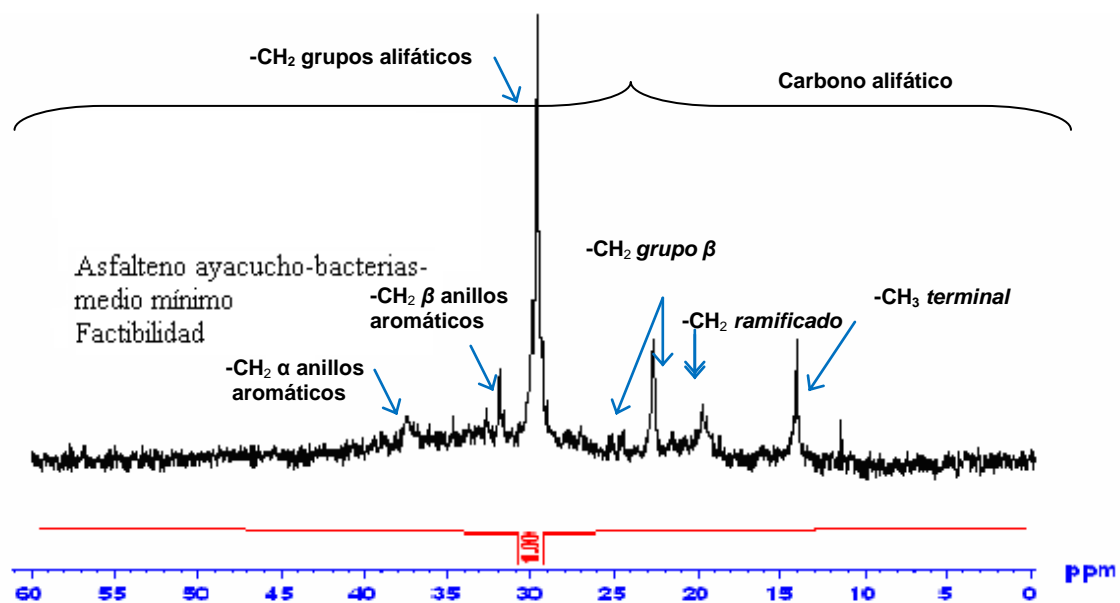


Figura 4.9: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).

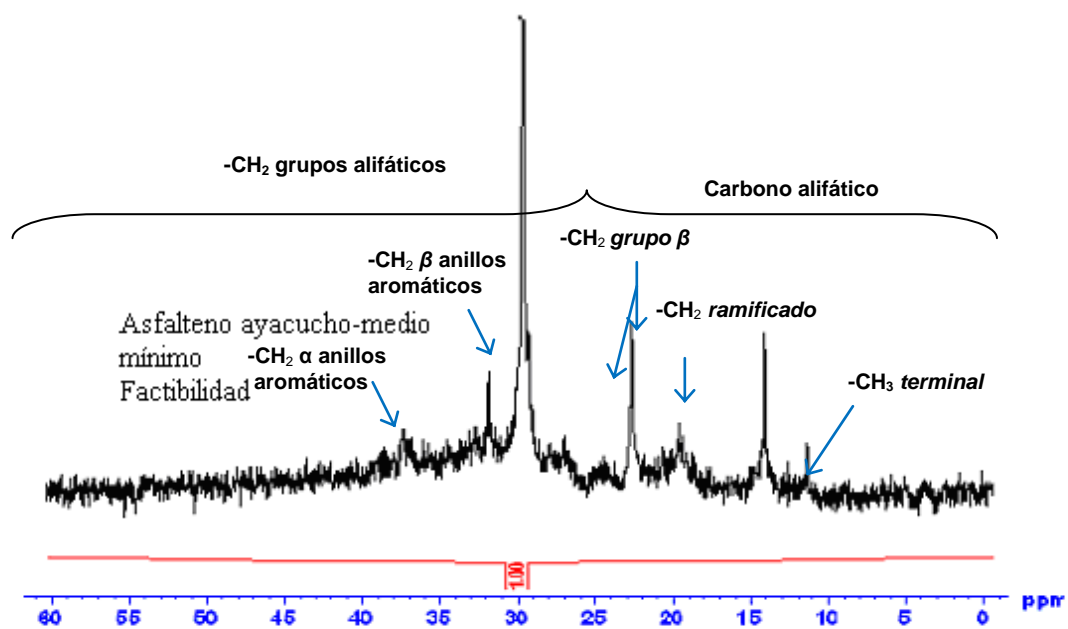


Figura 4.10: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo).

En donde la muestra correspondiente al día cero (ver Tabla 4.1), presentó una mayor área de carbonos alifáticos con un 68 %, cuando se contrastó con el tratamiento del día catorce que fue de 58 %, obteniéndose la mayor diferencia con respecto a la muestra del día cero.

Tabla 4.1: Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Ayacucho en los días cero y catorce.

Muestras	Área de la zona aromática	Área de la zona alifática	Porcentaje de área alifática (Ali ± 1) %	Porcentaje de área aromática (Aro ± 1) %
Asfalteno día cero	0,48	1	68	32
Asfalt-bacterias-medio mínimo día catorce	0,71	1	58	42
Asfalt - medio mínimo día catorce	0,70	1	59	41

Estos valores indican que los microorganismos presentes en el tratamiento, son capaces de degradar las cadenas alifáticas, que están como sustituyentes en los anillos aromáticos de los asfaltenos al transcurrir el tiempo, resultando una estructura más aromática del contaminante, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis elemental (véase Tabla 4.2).

4.2.4.1.1.3.-Análisis elemental.

Al realizar un análisis comparativo de la relación H/C con el día cero, se observa una disminución en la relación, esto representa un mayor grado de insaturación y un mayor carácter aromático en el asfalteno, lo que sustenta una degradación.

Tabla 4.2: Composición elemental del asfalto Ayacucho en el ensayo de factibilidad.

Muestra	Porcentaje de elementos ($E_A \pm 0,01$) %					Relación (H/C $\pm 0,01$)
	C	H	N	S	O	H/C
Asfalto día cero	82,47	8,42	1,71	4,70	2,70	1,22
Asfalt-bacterias-medio mínimo día catorce	82,56	8,13	1,88	4,71	2,72	1,17
Asfalt - medio mínimo día catorce	82,85	8,26	1,87	4,67	2,94	1,19

4.2.4.2.- Crudo Guafita

Con respecto a la mineralización del crudo Guafita las cepas están integradas por: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas spp*, *Pseudomonas aeruginosa* fermentadoras y no fermentadoras. Adaptadas a utilizar el asfalto como única fuente de carbono y energía, en donde su comportamiento se mantuvo entre 10^6 y 10^5 UFC/mL. En la Figura 4.11, se observar la actividad microbiana durante el proceso y tiene el mismo comportamiento que el estudio realizado con el asfalto Ayacucho anteriormente descrita, así como la mineralización (véase Figura 4.12).

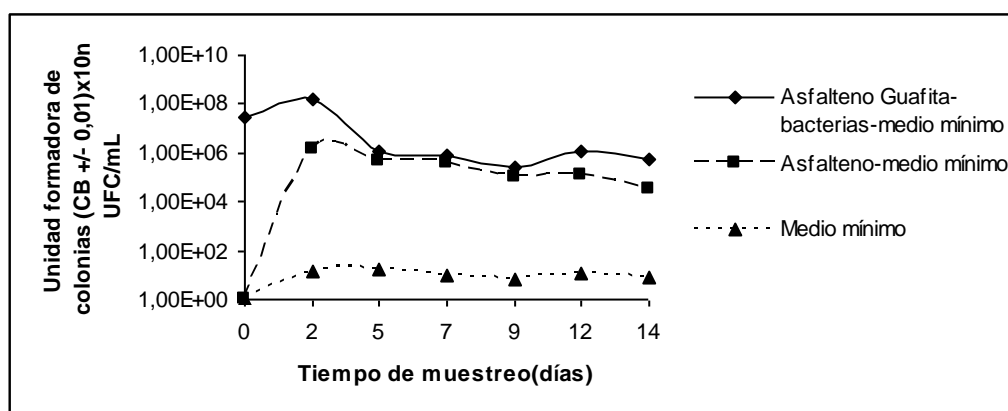


Figura 4.11: Comportamiento bacteriano en la mineralización de asfalto Guafita a través del tiempo

La mayor producción de CO₂ fue con asfalto con bacterias (cepas bacterianas aisladas), con respecto al asfalto sin bacterias, esto cuantifica que existe la degradación del asfalto. (En el Apéndice A, Tabla A.11, se encuentran los datos y resultados del muestreo).

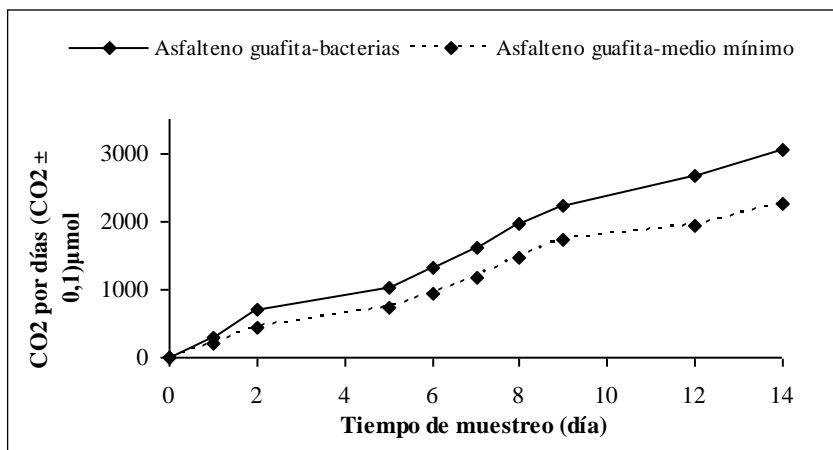


Figura 4.12: Comportamiento de CO₂ del asfalto Guafita -bacterias y asfalto Guafita - medio mínimo mineral

4.2.4.2.1.-Caracterización del asfalto Guafita

4.2.4.2.1.1.-Espectros de FTIR

Al realizarles análisis de FTIR a los mismos, se determinó en la Figura 4.13 una serie de grupos funcionales presentes en ellos, en donde las bandas comprendidas entre 3600 y 3200 cm⁻¹ podría ser una señal del grupo OH, con tipo de vibración de tensión, también son atribuidas por ser una banda amplia a la humedad de la muestra. Entre 3000 y 2800 cm⁻¹ se observan vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica de enlaces C-H alifáticos Csp³-H, el mayor de estos es asimétrico y el otro es simétrico, otra banda aproximadamente en 1740 cm⁻¹ que sugiere la presencia de grupo carbonilo, para 1690 y 1500 cm⁻¹ se atribuyen a vibraciones de estiramiento de carbonos aromáticos C=C con vibración de tipo tensión. Entre 1300 y 1500 cm⁻¹, existen dos señales muy cercanas, que indican la presencia de alcanos, con una vibración de deformación angular asimétrica y simétrica respectivamente, que son las

bandas de deformación de los grupos metilo y metileno, $-\text{CH}_3\delta_{\text{as}}$ ($1470\text{-}1430\text{cm}^{-1}$), $-\text{CH}_2\delta$ ($1475\text{-}1450\text{cm}^{-1}$) y $-\text{CH}_3\delta_{\text{sim}}$ ($1395\text{-}1365\text{cm}^{-1}$) y en 1037cm^{-1} una pequeña banda indicando la presencia de azufre.

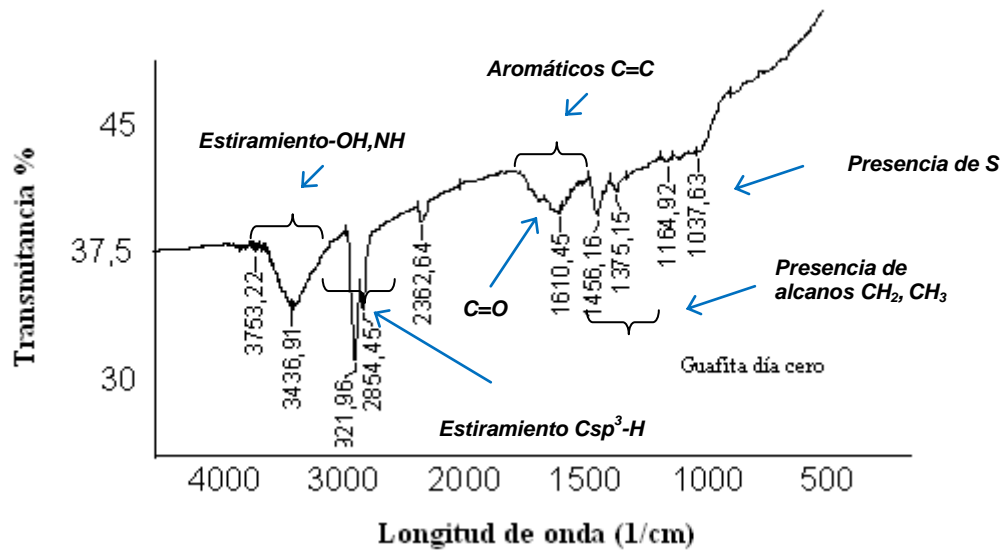


Figura 4.13: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita sin tratar

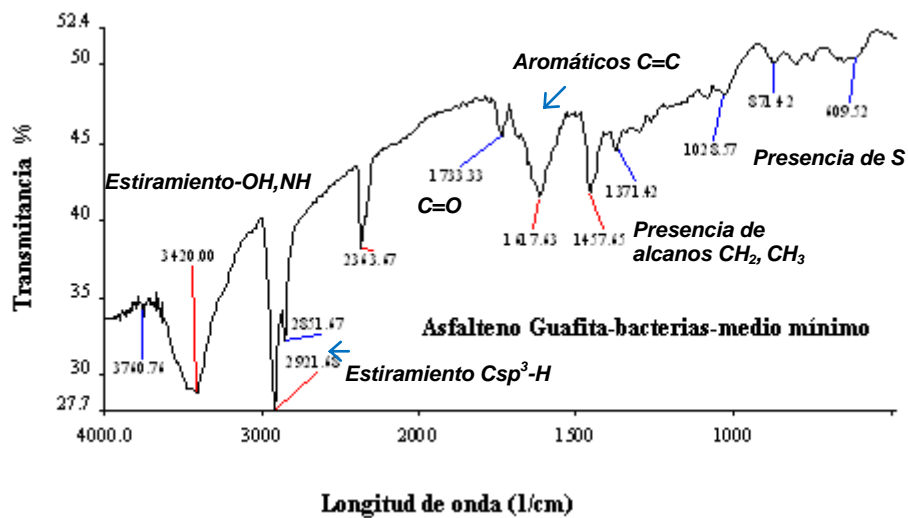


Figura 4.14: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno+bacterias+ medio mínimo)

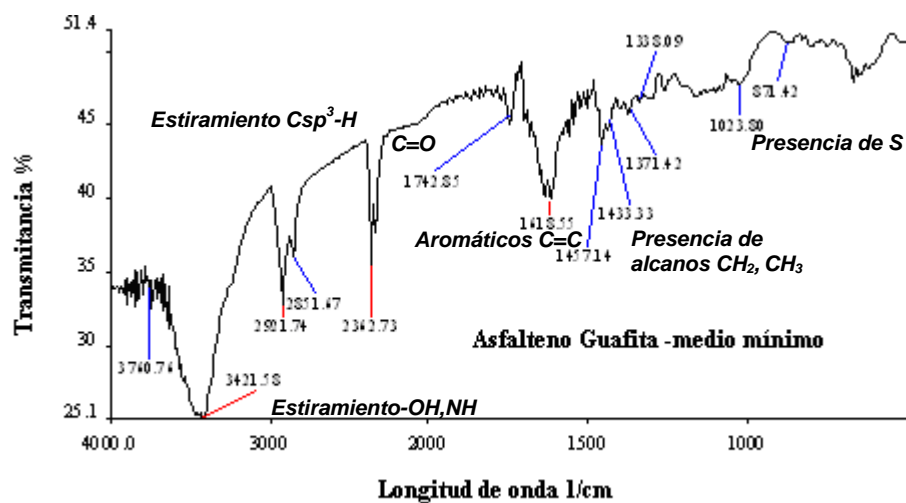


Figura 4.15: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del tratamiento (asfalteno + medio mínimo)

Se ha de resaltar que al comparar las tres Figuras, en la zona de la huella dactilar que se encuentra por debajo de 1400 cm^{-1} , se observó algunos cambios en la huella (ver figuras 4.14 y 4.15) con respecto al día cero. Estas diferencias observadas en la huella dactilar, es producto de los tratamientos y son un indicio de cambios estructurales en los asfaltenos. Este hecho se refuerza con los resultados de los análisis de RMN ^{13}C y el análisis elemental, (En el apéndice A, Tabla A.12 se encuentran tabuladas las señales al inicio y al final del tratamiento).

4.2.4.2.1.2.-Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

En las Figuras 4.16, 4.17 y 4.18, se puede apreciar los espectros de RMN ^{13}C de los asfaltenos, donde se evidencia una gran cantidad de señales entre 14 y 35 ppm, que representa la zona alifática.

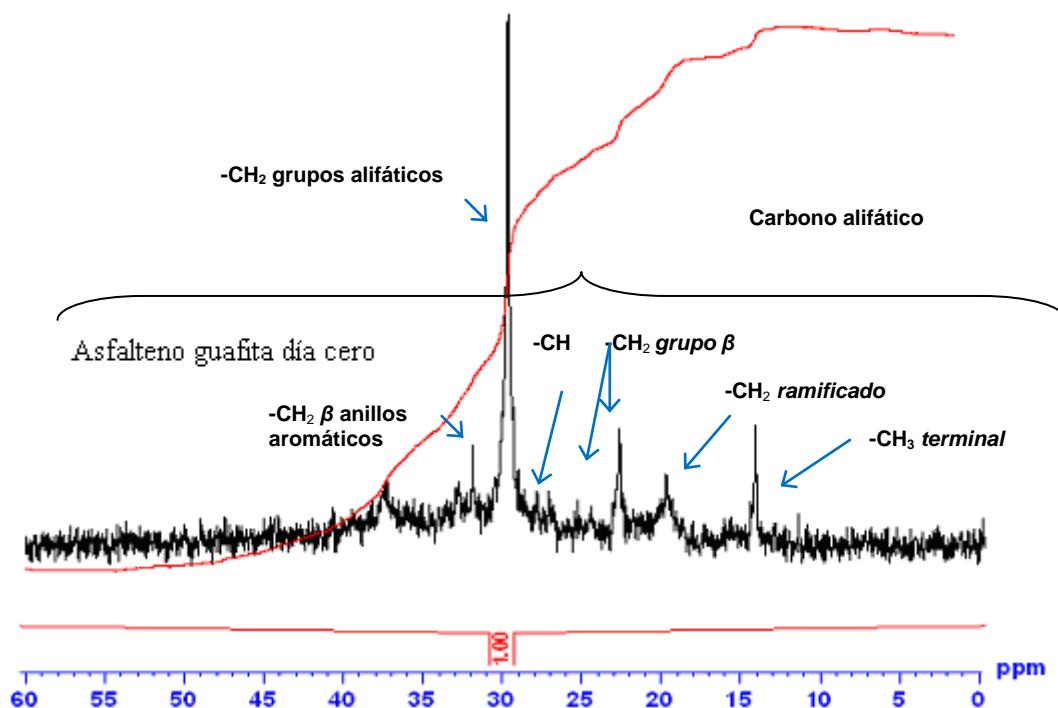


Figura 4.16: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Guafita sin tratar

En cambio en las Figuras 4.17 y 4.18 después del tratamiento, no se aprecia con exactitud la desaparición de las señales, pero al calcular el porcentaje bajo la curva de los carbonos alifáticos y aromáticos, en cada muestra al inicio y al final del tratamiento, se tiene que la muestra correspondiente al día cero presentó un área de carbonos alifáticos de 56% y en el tratamiento utilizando bacterias degradadoras de 49%, tal como se indica en la Tabla 4.3. (En el apéndice B, desde las Figuras B.4 a la B.6 se encuentran todos los análisis de RMN ^{13}C con sus respectivas zonas alifáticas y aromáticas)

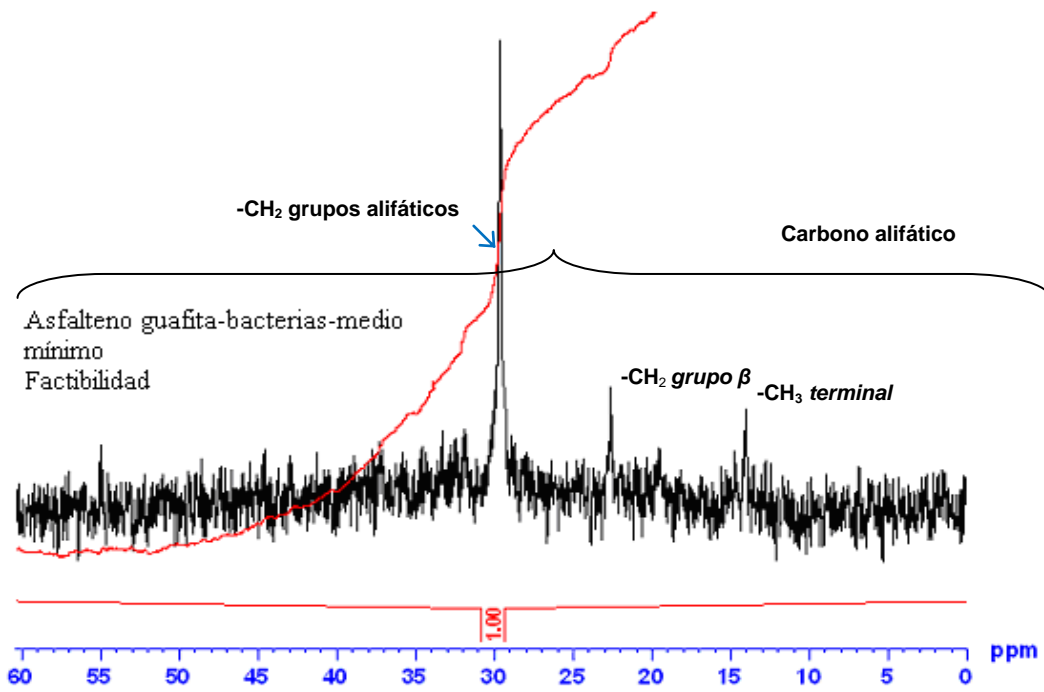


Figura 4.17: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo)

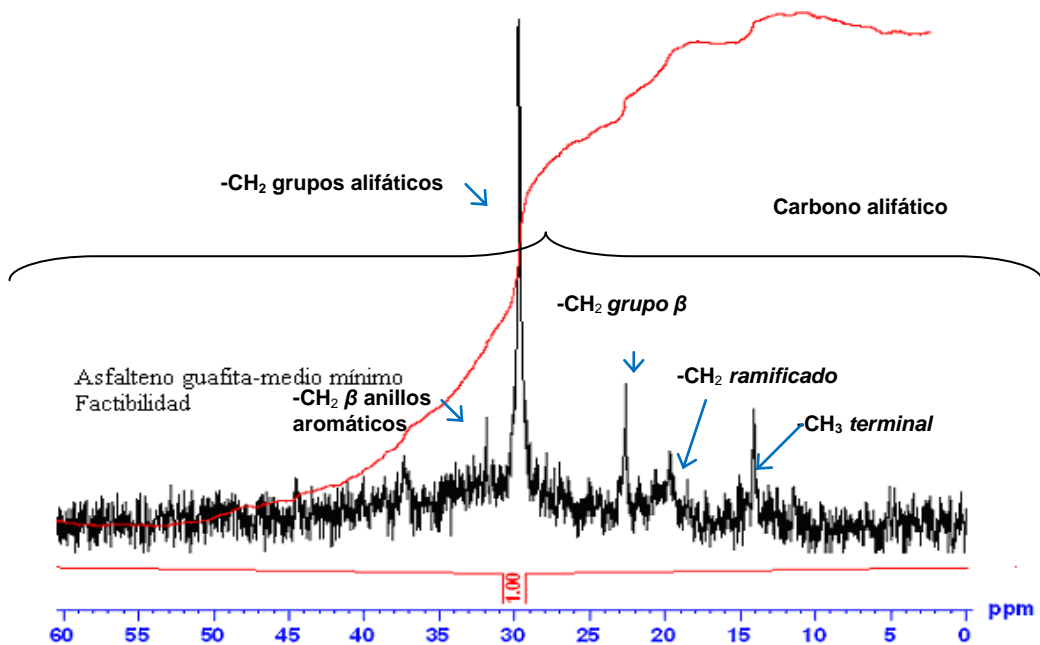


Figura 4.18: Análisis de RMN ^{13}C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo)

Tabla 4.3: Porcentajes de área alifática y aromática del asfalteno Guafita en los días cero y catorce

Muestras	Área de la zona aromática	Área de la zona alifática	Porcentaje de área alifática (Ali ± 1) %	Porcentaje de área aromática (Aro ± 1) %
Asfalteno día cero	0,79	1	56	44
Asfalt-bacterias-medio mínimo día catorce	1,03	1	49	51
Asfalt - medio mínimo día catorce	0,95	1	51	49

Estos valores revelan que los microorganismos presentes en el tratamiento son capaces de degradar las pocas cadenas alifáticas, que están sustituyendo los anillos poliaromáticos de los asfaltenos, en contraste con el tratamiento en el día cero, resultando una estructura más aromática del contaminante.

4.2.4.2.1.3.-Análisis elemental.

Con respecto al análisis elemental la relación H/C día cero presentó un valor de 1,10, indicando que los asfaltenos Guafita presentan una alta aromaticidad en relación con el crudo Ayacucho. En la Tabla 4.4 se observa que no existe variación en la relación en el tiempo con bacterias, también se observa cambios en los heteroátomos lo que sustenta una pequeña degradación. En el caso de Guafita la degradación es más difícil posiblemente por ser una estructura más aromática que el Ayacucho.

Tabla 4.4: Composición elemental del asfalteno Guafita en el ensayo de factibilidad

Muestra	Porcentaje de elementos (E _A ± 0,01) %					Relación (H/C±0,01)
	C	H	N	S	O	H/C
Asfalteno día cero	85,96	7,90	2,88	1,28	1,98	1,10
Asfalt-bacteria-medio mínimo día catorce	84,23	7,81	1,73	1,48	4,75	1,11
Asfalt - medio mínimo día catorce	85,59	7,91	1,81	1,40	3,29	1,10

4.3.- Eficiencia de los consorcios bacterianos aislados y de *Eisenia foétida* en la degradación de suelos contaminados con asfalteno.

Fase 1 (Tratabilidad)

4.3.1.-Determinación de las características fisicoquímicas del suelo, crudo y estiércol, con el fin de conocer sus propiedades.

4.3.1.1.-Caracterización del suelo.

De acuerdo con el triangulo textural el suelo usado, es franco con predominancia de limo (45,6±0,1) %, el cual favorece el proceso de biorremediación, según lo establecido en la norma para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos tóxicos y peligrosos de la República Bolivariana de Venezuela en el Decreto 2 635, que establece que un suelo, para biorremediar tiene que tener la siguiente caracterización: franca, franco arenosa, franco limosa y franco arcillosa. (véase apéndice C, Tabla C.1).

Según Thompson y Troeh (1988), los suelos de tipo franco contienen una mezcla de arena, limo y arcilla en tales proporciones, que exhibe propiedades de las tres fracciones de modo equilibrado. La cantidad de arcilla que posee este tipo de suelo,

tiene la capacidad de almacenar agua y nutrientes de forma adecuada, las partículas más grandes del suelo, en este caso la arena, ayudan a conseguir una buena aireación y permeabilidad (véase Tabla 4.5). Estas son las características que un suelo debe tener para que la biorremediación sea más efectiva.

Tabla 4.5: Análisis textural del suelo virgen.

Parámetro	Porcentaje (P ± 0,1) %
Arena	45,6
Arcilla	8,4
Limo	46,0

El suelo presentó un potencial de acidez de 5,66 (véase Tabla 4.6), según Ercoli *et al.* (2001), este parámetro es importante para los microorganismos degradadores, siendo los valores más recomendables aquellos comprendidos entre 6 y 8 unidades. Por lo que fue necesario realizar el encalado del suelo virgen, aplicando carbonato de calcio (CaCO₃) para elevar el pH a la neutralidad. En el apéndice A, Tabla A.13 se encuentran el encalado y el control de pH del suelo.

Los resultados obtenidos para conductividad eléctrica del suelo indicaron una baja concentración de sales solubles, lo cual permite clasificar el suelo como normal de tipo no salino, debido a que su conductividad eléctrica es inferior a 4 dS/m (Plaza y López 2006).

Las concentraciones de los elementos (K) y (Mg) dando valores altos a 168 y 136 ppm condición que resulta beneficiosa, ya que las plantas requieren grandes cantidades de ambos minerales para su desarrollo: el K permite llevar a cabo las actividades catalíticas y el Mg es importante en la activación de varios sistemas enzimáticos en las plantas (Casanova, 2005).

Adicionalmente, la presencia de estos minerales en grandes cantidades es fundamental para la nutrición bacteriana, ya que el K interviene en la activación de enzimas, mientras que el Mg además de estabilizar ribosomas y ácidos nucleicos, participa como cofactor en reacciones que involucran transferencia de grupos fosfato.

Otros minerales como el calcio (Ca) presentó un valor de 920 mg/kg en la caracterización, lo cual resulta apropiado para el crecimiento vegetal, debido a que el Ca contribuye a la formación de nuevas células y al aumento de la absorción de nitrógeno (N) en las plantas y además es un cofactor de muchas enzimas producidas por las bacterias.

En relación con el crecimiento bacteriano, el N es esencial para sintetizar aminoácidos y enzimas, mientras que el P ayuda a la formación de compuestos energéticos en la célula, que son usados en los procesos de reproducción y degradación (Chalarca, 2006).

Es importante destacar que dentro de los cationes de cambio (K^+ , Ca^{++} , Na^+ y Mg^{++}), el sodio (Na) se detectó en baja proporción de 33 mg/ kg., lo cual corresponde con lo esperado, este catión sólo predomina en suelos de tipo salino-sódicos de acuerdo a los estudios realizados por Mata y Pla (1992).

De igual forma, la baja concentración de Na no es limitante para el crecimiento de los microorganismos, pues este elemento no es considerado un requerimiento esencial para las bacterias, según Iañez (2005).

Tabla 4.6: Análisis fisicoquímicos del suelo virgen empleado en el proceso de biorremediación.

Parámetro	Caracterización
Capacidad de intercambio catiónico (CIC $\pm 0,01$) cmol/kg	10,70
Conductividad eléctrica (Ce $\pm 0,01$) dS/m	0,09
Potencial de acidez (pH $\pm 0,05$) mV	5,66
Calcio total (Ca ± 1) mg/kg	920
Potasio total (K ± 1)mg/kg	168
Sodio total (Na ± 1) mg/kg	33
Magnesio total (Mg ± 1)mg/kg	136
Fósforo total (P ± 1)mg/kg	32
Nitrógeno total (N $\pm 0,001$)%	0.145
Materia orgánica (Mo $\pm 0,01$) %	0.95

La materia orgánica en los suelos, se expresa generalmente como porcentaje de carbono en base al peso del suelo (Casanova, 2005). Conociendo una aproximación de la cantidad de carbono orgánico presente en la muestra de suelo, es posible realizar una estimación del porcentaje de materia orgánica en él. El porcentaje de materia orgánica es menor de 1,6 %, esto indica la deficiencia de este parámetro (Casanova, 2005), trae como desventaja la aplicación del biotratamiento, pues no favorece el incremento de la actividad biológica. Por otra parte, la materia orgánica tiene incidencia sobre la capacidad de intercambio catiónico (CIC), que se refleja en una mayor capacidad para retener y aportar nutrientes esenciales tales como P, N, S y otros en menor proporción, como cobre (Cu) y boro (B) (Blanco, 2003). El bajo contenido de materia orgánica también influye sobre la capacidad amortiguadora del suelo, haciéndolo menos resistente a los cambios bruscos de pH.

Cabe destacar, que al adicionar el contaminante (asfalteno), estiércol y medio mínimo mineral al suelo para los tratamientos, estos podrían aportar la cantidad de carbono orgánico suficiente y completar por lo menos el mínimo requerido que favorece a un vigoroso crecimiento microbiano, obteniéndose una cantidad de materia orgánica de tal manera que disminuya la movilidad de los compuestos orgánicos y aumente la eficiencia del tratamiento (Volke y Velasco, 2004).

4.3.1.1.2.-Determinación de la capacidad de saturación del suelo ó capacidad de retención de agua (CRA).

La capacidad de retención de suelo fue de 0,54 mL/g en el apéndice D, se encuentra los cálculos de dicha determinación. Según lo recomendado por LaGrega *et al.*, (1996), el suelo debe poseer una saturación mayor al 40 %, por lo que se estableció que el mismo debía mantenerse experimentalmente entre un 40 y 70% de su capacidad de saturación o retención. Con esto se logró que la humedad se encontrara en condiciones óptimas, para el buen desarrollo de los organismos presentes en los microcosmo, como lo son las bacterias y la lombriz *Eisena foétida*, ya que era necesario mantener las condiciones de vida de los organismos aplicados a los tratamientos, para asegurar que los mismos procedan a la degradación de los asfaltenos presentes en el medio.

4.3.1.2.-Caracterización del crudo.

De acuerdo con los valores obtenidos en la caracterización del crudo Ayacucho, se pudo apreciar su alto contenido de asfaltenos 16 %, así como su elevado porcentaje en resinas 29 %, mientras que los compuestos aromáticos tienen un 48 % y los saturados 6 %, y en el crudo Guafita se obtuvo una cantidad de 61 % de saturados, 20 % de aromáticos, 15 % de resinas y 4 % de asfalteno (véase apéndice A, Tabla A.1 a la A.8).

4.3.1.3.-Caracterización del estiércol.

El fertilizante agregado consistió en una mezcla de estiércol equino y vacuno tratado. Los resultados de la caracterización se muestran en la Tabla 4.7. Como se puede apreciar, el porcentaje de materia orgánica es elevado 52,37% m/m (véase apéndice C, Figura C.2), condición que resulta favorable para la aplicación del biotratamiento, considerando que el contenido de materia orgánica en el suelo virgen fue bajo. El N y el P presentes en el estiércol, tienen un efecto positivo incrementando, las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados, según lo propuesto por Viñas (2005).

Tabla 4.7: Porcentajes de la caracterización del estiércol utilizado en la experimentación

Tratamiento	Porcentaje de m/m macronutrientes		
	Nitrógeno Total (NT $\pm 0,002$)%	Fósforo (P ₂ O ₅ $\pm 0,57$)%	Materia Orgánica (MO $\pm 0,57$)%
Estiércol	1,690	1,40	52,37

Fase 2

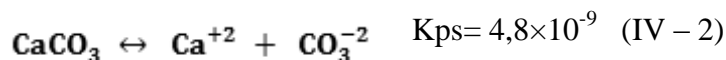
4.3.2.- Estudios de los microcosmos con bacterias aisladas y *Esenia foétida*.

4.3.2.1.-Proceso de encalado del suelo

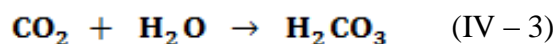
Para llevar a cabo la biorremediación, fue necesario realizar el encalado del suelo virgen aplicando CaCO₃ para elevar el pH de 5,66 a valores cercanos a la neutralidad. De acuerdo a la metodología descrita, de los 5 patrones preparados para determinar la cantidad de CaCO₃ a añadir, se determinó que por cada (150,000 \pm 0,001) g de suelo, se requieren (0,450 \pm 0,001) g de la sal para lograr un pH próximo a 7. Este resultado se extrapoló a la masa total de suelo a encalar para cada biotratamiento.

Las reacciones que describen el proceso de neutralización ocurren de la siguiente manera:

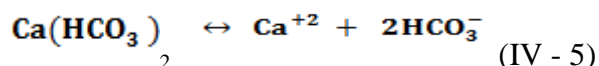
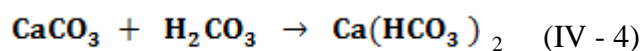
Al entrar en contacto con el agua, ocurre la disociación lenta del CaCO_3 en medio acuoso, dada su baja solubilidad Meithes (1963), (véase ec. IV – 2).



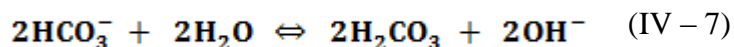
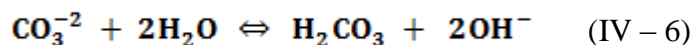
La actividad de los microorganismos en el suelo produce CO_2 (véase ec. IV – 3), el cual genera ácido carbónico (Casanova, 2005):



El H_2CO_3 formado puede reaccionar con el CaCO_3 presente produciendo bicarbonato de calcio (véase ec. IV-4 y IV-5), el cual es más soluble y se disocia más rápidamente (Casanova, 2005):



Los iones carbonato y bicarbonato, pueden hidrolizarse generando iones hidronios (OH^-), (véase ecuaciones IV-6 y IV-7), que luego neutralizarán los iones protónicos (H^+), responsables de la acidez (Casanova, 2005).



Una vez ocurridas estas reacciones, el pH del suelo aumentó hasta valores cercanos a 7. El potencial de acidez medido después de la aplicación de la enmienda durante una semana, reportó valores constantes y próximos a la neutralidad.

De acuerdo con Glynn *et al.*, 1999, el encalado permite desarrollar condiciones amortiguadoras en el suelo para neutralizar los cambios de pH producidos por las actividades metabólicas de las bacterias y así garantizar que el crecimiento continúe, durante un período largo.

4.3.2.2.-Montaje de los microcosmos para los diferentes crudos

La contaminación del suelo con asfalto se realizó de manera, que la cantidad de contaminante fuera aproximadamente 1 %, la cual entra en el intervalo permisible visualizado en el artículo 53 del decreto 2635, la misma señala que el contenido de hidrocarburos biodegradables en el desecho debe estar entre 1 y 10%.

La mezcla se realizó en cada microcosmo de tipo compuesta (Pardo *et al.*, 2004), la cual garantiza una homogeneidad de los compuestos de la misma, permitiendo el uso de un muestreo de tipo probabilístico aleatorio simple (Méndez, 2005), lográndose con todo esto igualdad entre los elementos, que se van a analizar durante el proceso experimental.

4.3.2.3.-Biorremediación del suelo contaminado utilizando consorcio bacteriano.

El suelo inicialmente presenta una relación C/N muy baja véase Tabla 4.8, por lo que la materia orgánica presente es poco estable, según Schuldt (2006), para este tratamiento fue necesario establecer un medio como fuente de nutrientes para el crecimiento bacteriano. Se aplicó el medio mínimo estudiado en la fase de factibilidad. Las cantidades empleadas de cada sustancia necesaria para la preparación de este medio se pueden visualizar en la sección 3.2.1.

4.3.2.4.-Biorremediación del suelo contaminado utilizando macroorganismos de *Eisenia foétida*.

La adición de estiércol equino en los microcosmo para este tratamiento, proporcionó un medio nutritivo para la lombriz *Eisenia foétida*, el cual es indicado para construir el sustrato inicial, según lo refleja Ferruzzi (2004). Este agente bioestimulante, adicionó al medio cantidades considerables de macronutrientes necesarios para que la relación de los mismos con respecto a la carga orgánica, fuera óptima para el consumo de las lombrices, y así garantizar una mayor degradación del contaminante.

La cantidad de lombrices a añadir en cada microcosmo, se determinó siguiendo lo establecido por el Centro de Estudios Agropecuarios (2001), el cual indica que en condiciones normales, se encuentran alrededor de 200 lombrices por metro cuadrado. Con esta relación y sabiendo que cada microcosmo tenía un área de 0,038 m², se estableció que la cantidad de especies a añadir son ocho lombrices.

Es importante tomar en cuenta que el estiércol aporta una cantidad de macronutrientes, que mejoran las condiciones del suelo (véase Tabla 4.7), la relación carbono/nitrógeno (C/N) de los residuos orgánicos afecta la velocidad de descomposición, cuando no hay suficiente N para el crecimiento óptimo, la degradación de los compuestos orgánicos es más lenta. La relación ideal C/N para el compost es 30/1 y la presente en él es aproximadamente 20/1, éste es un valor medio aceptable (véase Tabla 4.8). Según Schuldt (2006), la materia orgánica puede considerarse estable cuando la relación C/N se aproxima a 10/1, como el valor del estiércol utilizado se encuentra por encima de dicho valor, se dice que la materia orgánica presente en el estiércol es estable y contribuye de manera positiva al desarrollo de las lombrices.

4.3.2.5.-Caracterización de los macronutrientes empleados en la biorremediación del suelo contaminado utilizando bacterias y crías de *Eisenia foétida* en el día cero.

La adición de estiércol a los microcosmos del tratamiento con lombrices y de medio mínimo a los microcosmos del tratamiento con bacterias, cambiaron la relación C/N y C/P tal como se señala en la Tabla 4.8 y en el apéndice A, Tabla 14.

Para el tratamiento con lombrices, hubo un aumento considerable la concentración del N y P, debido a que ellos se encuentran de forma abundante en el estiércol, esto mejora las condiciones de nutrimento de la *Eisenia foétida*, para su óptimo desarrollo. Véase en el apéndice A, Tabla 14.

En la Tabla 4.8, se muestra los valores de materia orgánica presente en los microcosmos de cada tratamiento. Se observa que el tratamiento con bacterias posee 0,97% para Guafita y 0,99% para Ayacucho de la misma, lo cual hace que el suelo tratado se encuentre aproximadamente en el intervalo promedio, que según Thompson (1988), esta entre 1 y 6%, por otra parte, el tratamiento con lombrices posee 14,44 % crudo Guafita y 14,48% crudo Ayacucho, este valor se encuentra fuera del intervalo, ya que el estiércol añadido aporta gran cantidad de carbono orgánico al sistema.

La relación C/N de los microcosmos se pueden visualizar en la Tabla 4.8, donde se tiene que para los tratamientos con lombrices es 16,63 (Guafita), 17,01 (Ayacucho) y para el tratamiento con bacterias es 10,00 (Guafita), 12,14 (Ayacucho).

Según Steubing *et al.*, 2002, estos valores de relación C/N, pudieron haber generado poca degradación de la materia orgánica presente en los microcosmos, sin embargo, los resultados de degradabilidad de los asfaltenos al final del tratamiento corroboraron la existencia de degradación en el medio.

Álvarez y Guevara (2003), establecen que la proporción óptima de C, N y P es 120:10:1, en suelos contaminados con hidrocarburos, mientras que Ercoli, 2004 señala, que las cantidades de N y P, necesarios para estimular la biodegradación, son menores que los requerimientos teóricos, debido a que no todo el carbono proveniente del contaminante es incorporado a la biomasa (una fracción es convertido en CO₂).

Por otra parte, Chalarca, 2006 establece que la relación C/N en el suelo casi siempre va de 8:1 hasta de 15:1, mientras que C.D.R.T (2009) sugiere que la relación óptima C/P está comprendida entre 120:1 y 175:1.

Estos valores concuerdan con los obtenidos en los microcosmos de tratamiento con bacterias; sin embargo, en el tratamiento con lombrices, las relaciones se encuentran fuera de los intervalos citados, debido a la contribución del estiércol que incrementa sustancialmente las cantidades de N y P (véase Tabla 4.8).

No obstante, hay que considerar que una proporción importante del material ingerido y asimilado por las lombrices se secreta como mucus intestinal y cutáneo, el cual tiene una mayor relación C/N que el material original; asimismo, varios estudios con lombrices demuestran que la selección e ingestión de partículas finas y la mineralización del fósforo orgánico durante el tránsito a través del tracto digestivo, tienen un efecto en el incremento de la disponibilidad de fósforo (López, 2003).

Por esta razón, se presume que puede haber un aumento de las relaciones C/N y C/P durante el tratamiento. Una relación C/N menor a 10, indica una alta mineralización y da lugar a fenómenos de autorregulación, que conduce a la pérdida del N sobrante en forma de amoníaco.

Las pérdidas de amoníaco deben evitarse porque implica pérdidas de un elemento fertilizante y además es un contaminante atmosférico (C.D.R.T, 2009). Sin embargo,

cuando la relación es baja, indica que el suelo da buenos suministros de algunos nutrimentos (Chalarca, 2006).

Tabla 4.8: Porcentajes de los macroelementos presentes en los microcosmos y su relación

Macroelementos	Suelo virgen	Estiércol Equino	Microcosmo Guafita <i>Eisenia foétida</i>	Microcosmo Guafita Bacterias	Microcosmo Ayacucho Bacterias	Microcosmo Ayacucho <i>Eisenia foétida</i>
Materia orgánica (MO±0,01)	0,95	52,37	14,44	0,97	0,99	14,48
Relación (C/N±0,01)	3,85	18,23	16,63	10,00	12,14	17,01
Relación (C/P±0,01)	174,38	100,81	111,10	207,14	251,43	113,63

4.3.2.6.-Potencial de acidez a través del tiempo.

Los resultados obtenidos reflejaron un adecuado control del potencial de acidez durante toda la fase experimental, reportando valores cercanos a la neutralidad, de acuerdo a lo determinado en el ensayo de factibilidad en el aislamiento de la cepa degradadora del asfalteno en medio acuoso y en el ensayo de tratabilidad en los tratamientos con suelos. Los valores del potencial de acidez para cada tiempo muestral se presentan en la Tablas A.15 y A.16 del apéndice A.

4.3.2.7.-Humedad

Esta variable se midió cuantitativamente a través del tiempo, pero la adición de agua o medio mínimo se hizo según las condiciones y necesidades de la misma, sin crear excesos acuosos y tratando de mantener las condiciones de humedad iniciales de la muestra. Los valores de este parámetro, se encuentran alrededor de 40% (véase apéndice A Tabla A.17 a la A.32 para ambos crudos), lo cual garantizaba la humedad en las muestras. Dibble y Bartha (1979), describieron un intervalo de humedad

óptimo del 30 al 90% de la capacidad de campo, para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, mientras que Lajoie y Strom (1994) y Pramer y Bartha (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (Menn *et al.*, 2000).

La humedad ejerce un efecto regulador sobre las poblaciones de microorganismos, ya que determina el contenido de agua entre los intersticios del suelo, la cual es requisito fundamental para las transformaciones enzimáticas, ya que las bacterias la utilizan como medio de transporte de los nutrientes hacia el interior de la célula y fuera de ella, si ésta baja, los microorganismos no se desarrollan por no tener el agua suficiente para su metabolismo, disminuyendo la actividad microbiana esencial en éste tipo de proceso. Y si, por el contrario, es muy alta, desplaza el aire saturando de agua los intersticios dejados por el material, presentándose circunstancias propicias para el desarrollo de condiciones anaerobias. (Orozco, 1980). Debido a lo expuesto, esta variable fue de vital importancia durante el tratamiento, ya que mantenerla, es una condición óptima para el desarrollo microbiológico, lo que aseguró las bacterias y por ende la degradación de los asfaltenos.

4.3.2.8.-Aireación.

Cada microcosmo fue aireado constantemente para garantizar la presencia de oxígeno, el cual facilita el crecimiento microbiológico, la presencia de éste es imprescindible para llevar a cabo actividades microbianas en condiciones aeróbicas y así agilizar su vida metabólica. La aireación de los microcosmos se realizó cada 3 días, con el propósito de proveer el oxígeno requerido para la respiración aeróbica de los microorganismos, limitando la posibilidad de que se originara respiración de tipo

anaeróbica. Krebs (2003), propone que la descomposición anaeróbica de sustratos orgánicos generalmente es reducida y es menos completa que la descomposición aeróbica. A partir de los porcentajes de degradación obtenidos principalmente en el tratamiento con lombrices, se puede deducir que la frecuencia y las condiciones de oxigenación fueron adecuadas durante la aplicación de los tratamientos.

4.3.3.- Evolución del crecimiento bacteriano en muestras de suelos contaminados con los diferentes asfalteno y la relación entre fracción biodegradada a través del tiempo

4.3.3.1.-Crudo Guafita

Según LaGrega *et al.*, (1996), las bacterias son las responsables de las reacciones de biodegradación. En el microcosmo **Gbact**, se introdujo bacterias degradadoras obtenidas del crudo, mientras que en el tratamiento **Glomb** se generaron bacterias procedente del estiércol y de los excrementos de la *Eisenia foétida*, a ambos; se les estudió el desarrollo de las mismas a través del tiempo; los resultados se visualizan en la Figura 4.19.

En dichos tratamientos la carga bacteriana se mantuvo relativamente constante, durante todo el proceso de biorremediación, mientras que los suelos patrones presentaron un incremento de las mismas, posiblemente por la presencia de microorganismos provenientes del medio ambiente donde se encontraban los microcosmos.

A pesar de la presencia de estos microorganismos en los microcosmo patrones, la fracción biodegradada es poca, esto porque dichas bacterias no son suficientes para degradar compuestos de estructuras tan complejas como los asfaltenos. El mantenimiento de la carga bacteriana a través del tiempo, permitió que la degradación de los contaminantes sea efectiva, ya que las bacterias logran utilizar en mayor

cantidad los asfaltenos como sustrato alimenticio, transformándolos en biosurfactantes más fáciles de degradar y menos tóxicos según Araujo *et al.*, (2008).

En las Figuras 4.19 y 4.22, se observa el crecimiento celular bacteriano de los diferentes microcosmos, utilizando las bacterias aisladas de los asfalteno Guafita y Ayacucho, ambas curvas tiende a tener el mismo comportamiento realizado en el ensayo de factibilidad, la fase latencia no se observa, lo que hace presumir que las bacterias se adaptan bien al medio.

El hecho de una prolongada fase estacionaria significa que ellas compiten en un medio complejo, lo que genera que el número de organismos que nacen sean igual al número de microorganismos que mueren.

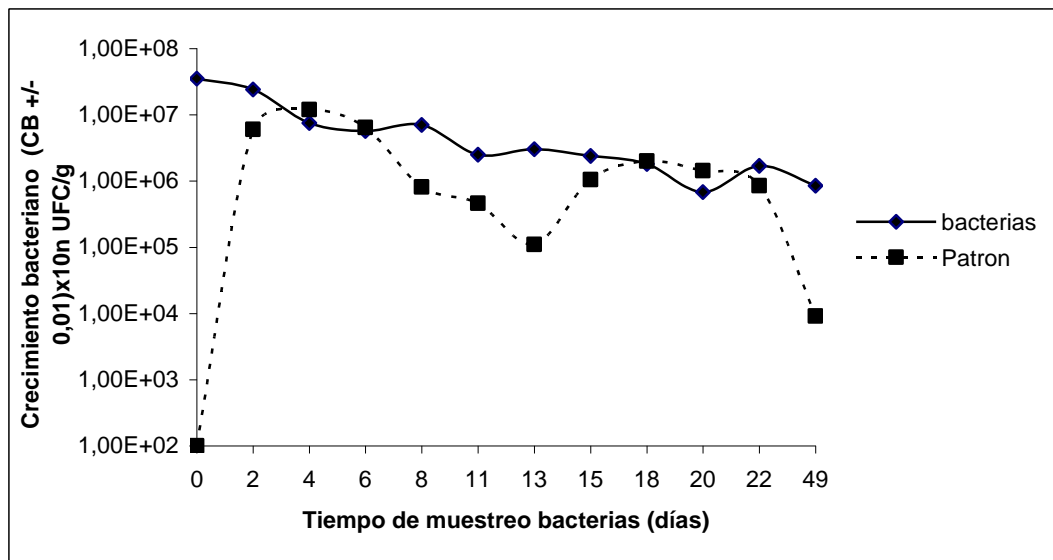


Figura 4.19: Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con bacterias asfalteno Guafita.

En cambio en los microcosmos con *Eisenia foétida* (véase Figuras 4.20 y 4.23) de ambos crudos, se observa el crecimiento bacteriano celular, pero con una menor carga bacteriana al inicio de tratamiento ya que en estas, no se realizaron la siembra o inoculación de bacterias aisladas en la degradación de los asfaltenos en el ensayo de factibilidad (se visualizan los valores en el apéndice A, Tabla A.33).

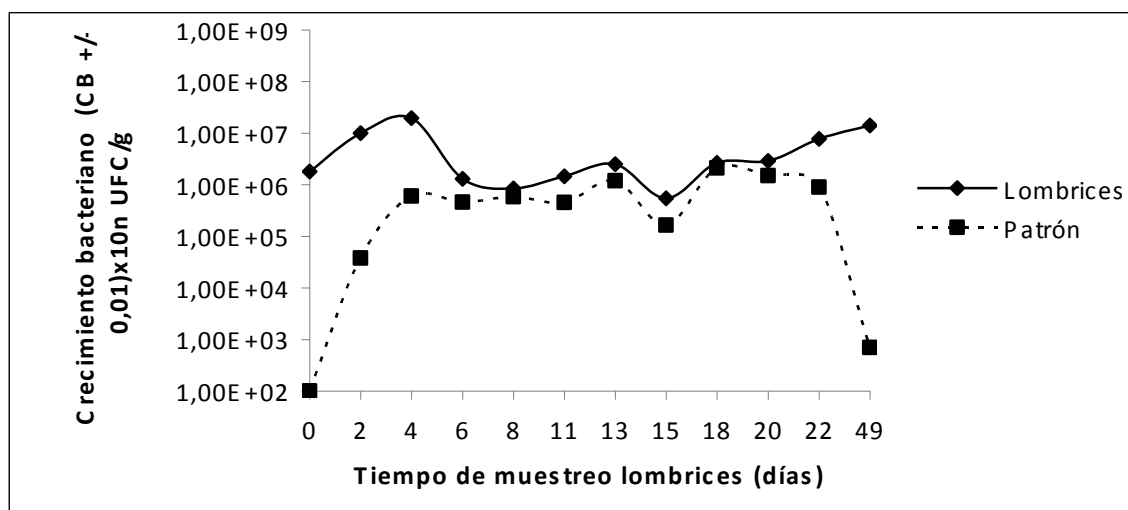


Figura 4.20: Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con lombrices asfalteno Guafita.

Al comparar las curvas de crecimiento bacteriano tanto de bacterias como de lombrices del asfalteno Guafita, con el porcentaje de degradación (véase Figura 4.21), se observa que para los diferentes tratamiento, la fracción biodegradada aumentó progresivamente a través del tiempo y las curvas de crecimiento bacteriano mantuvieron prolongada la fase estacionaria, además, en ambos tratamientos la degradación es mayor en comparación al microcosmo patrón correspondiente.

Esto acentúa la presencia de organismos degradadores en los microcosmos de los diferentes tratamientos, los cuales inducen una disminución de la cantidad de asfaltenos presentes en el medio.

Estos valores de porcentaje de degradación, revelan la eficiencia de los tratamientos aplicados.

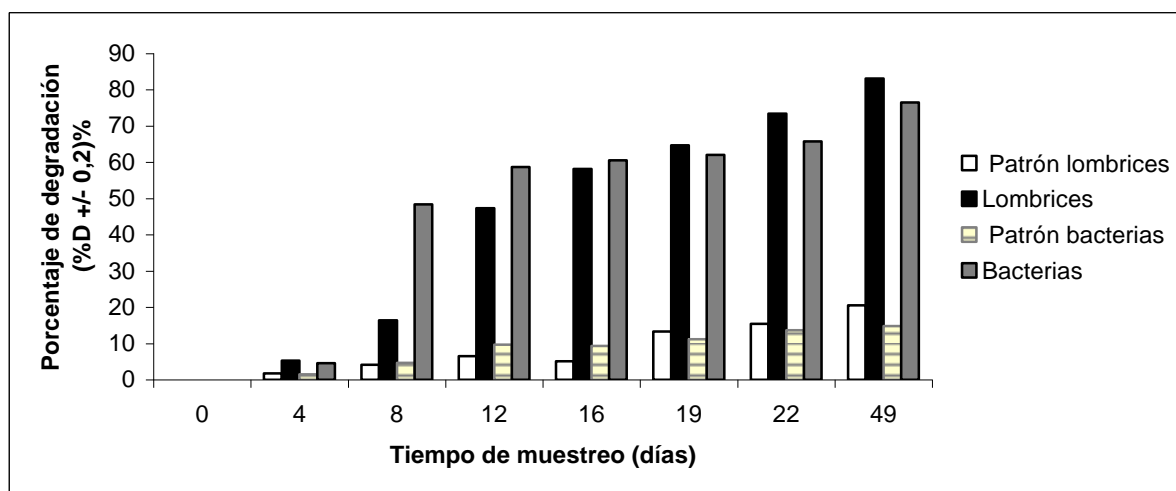


Figura 4.21: Porcentaje de degradación del contaminante en función del tiempo para cada tratamiento del asfalto Guafita

Es evidente que el tratamiento control, presenta una variación muy pequeña en el porcentaje de degradación a través del tiempo de muestreo. Según Álvarez y Guevara (2003), las moléculas orgánicas sufren normalmente un proceso de hidrólisis y de oxidación, que hacen posible la degradación de una pequeña parte del contaminante, por lo que se observa que la misma es menor a la tasa de degradación de los microcosmos, donde se aplicaron los tratamientos.

Al final de la experimentación, se observó que hubo mayor degradación en los microcosmos con lombrices que era de esperarse, una vez que las lombrices han producido humus, este tratamiento se hace más eficiente. Lo cual se explica porque según Ferruzzi (2004), diariamente las lombrices excretan el 60% de lo que comen, adquiriéndose por lo menos 1,5 g de humus líquido diario y el porcentaje de degradación aumenta, aportando mayor actividad microbiana.

Los microcosmos con *Eisenia foétida* alcanzaron porcentajes de degradación de un 83 %, en contraste con los obtenidos por las cepas aisladas del crudo de un 76 %.

También se observa en la Figura 4.21, que a partir del día 4 hasta 17 aproximadamente, la fracción biodegradada en el tratamiento con bacterias es mayor,

esto es debido a que se inicio con una cantidad de inóculo aumentando la actividad microbiana en este intervalo.

Inmediatamente después del día 15, el porcentaje de tratamiento con lombrices fue aumentando de manera progresiva hasta el final de la experimentación, este cambio se percibió reflejado en la degradación de asfaltenos en los últimos días, esto debido a la aireación originada por las lombrices, humedad y los nutrientes del estiércol.

En la Tabla 4.9 se observar que la cantidad de lombrices como su peso, reflejó un aumentó y no hubo mortalidad, es decir los macroorganismos se adaptaron al suelo contaminado.

Tabla 4.9: Peso total de la cantidad de lombrices en los microcosmos del asfalto Guafita al inicio y al final del tratamiento

Tiempo de tratamiento Días	Microcosmo Guafita	Peso total de las lombrices ($m_{lomb} \pm 0,001$) g	Cantidad de lombrices ($C \pm 1$)
0	Glomb.1	2,834	8
	Glomb.2	2,764	8
	Glomb.3	2,713	8
49	Glomb.1	4,253	9
	Glomb.2	4,328	11
	Glomb.3	4,902	10

4.3.3.2.-Crudo Ayacucho

Las curvas de crecimiento no presentan fases de retardo ni de crecimiento exponencial (véase Figuras 4.22 y 4.23); por el contrario, la tendencia seguida se corresponde con la fase estacionaria.

La subsistencia de la fase estacionaria en ambos tratamientos, se atribuye a una condición de adaptación particular de las bacterias al medio contaminado con asfaltenos.

La curva de crecimiento del tratamiento con lombriz, sigue una tendencia similar a la del tratamiento con bacterias, pero con una menor carga bacteriana (véase Figura 4.23)

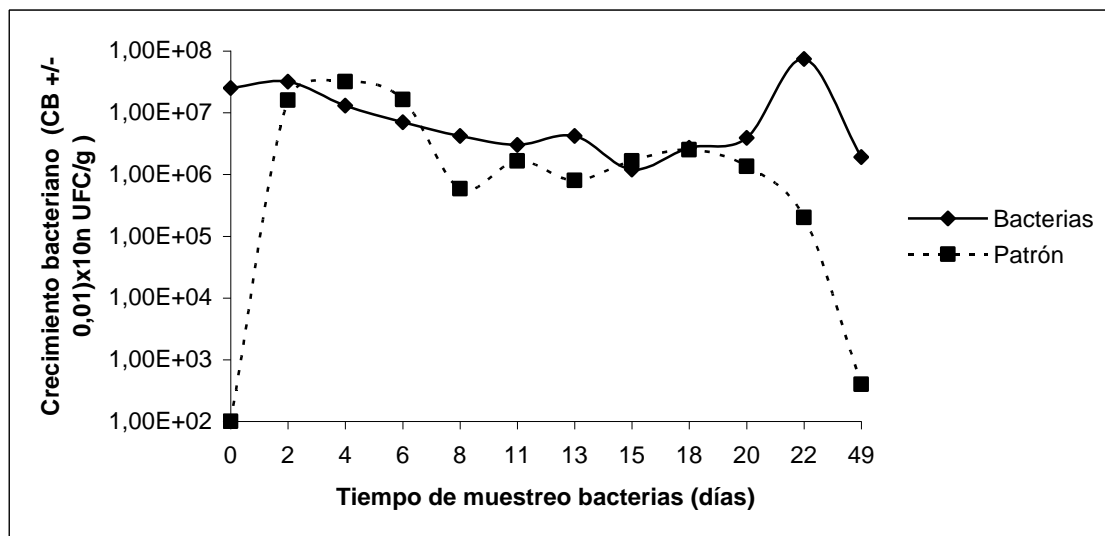


Figura 4.22: Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con bacterias asfalteno Ayacucho.

En el caso particular de los patrones, las Figuras 4.22 y 4.23 toma un comportamiento diferente, observándose un crecimiento acelerado entre el día cero igual al crudo Guafita ($\sim 10^2$ UFC/g de suelo) y el día cinco ($\sim 10^7$ UFC/g de suelo) por la disponibilidad de nutrientes en el medio; a continuación, comienza la fase estacionaria entre los días nueve y dieciocho en la cual ocurre la división celular sin incremento de biomasa y posteriormente se inicia la fase de muerte exponencial entre los días dieciocho y cuarenta y nueve, debido al agotamiento de reservas de energía y posiblemente por la poca adaptabilidad de estas bacterias al medio contaminado.

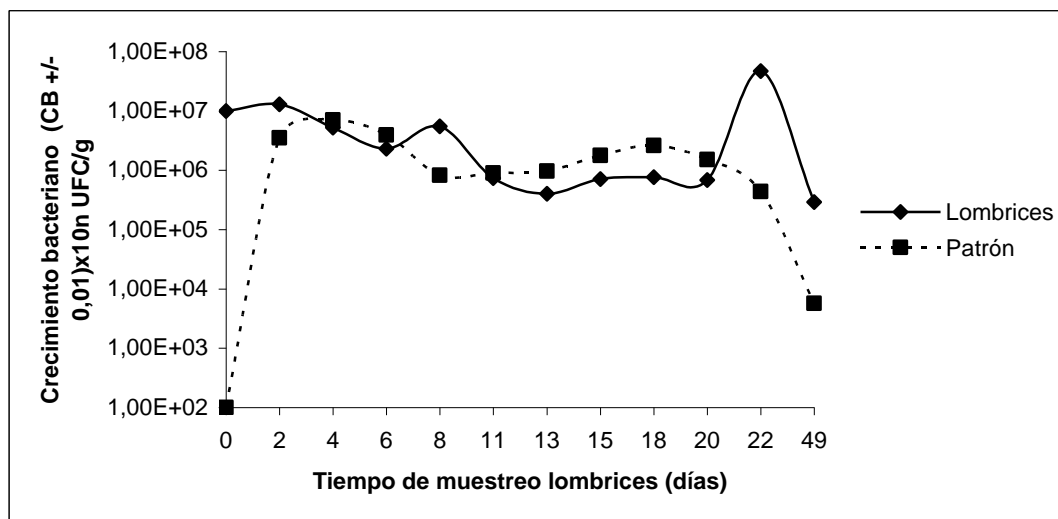


Figura 4.23: Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para el tratamiento con lombrices asfalteno Ayacucho.

En la Figura 4.24, los microcosmos con *Eisenia foétida* alcanzaron mayores porcentajes de degradación durante casi todo el tratamiento, logrando un valor máximo de 92 %, en contraste con los obtenidos por las cepas aisladas del crudo de un 56 %. Lo anteriormente expuesto hace pensar que la eficiencia en la degradación fue menor para las bacterias aisladas del crudo por tratarse de un cultivo puro (*Pseudomonas aeruginosa*), en contraste con el tratamiento de *Eisenia foétida*, donde se presume que por las condiciones del medio (humus, humedad, aireación y estiércol), existe una comunidad diversa de microorganismos.

Los patrones, tienen tasas de degradación bajas, comparadas con sus respectivos tratamientos a pesar de tener una carga bacteriana. Esto se debe a que las condiciones de estos microcosmos resultaron favorables para el desarrollo de microorganismos que utilizaron el suelo como sustrato; sin embargo, se infiere que se trata de bacterias poco especializadas en la degradación del contaminante.

Otro factor importante a considerar es la heterogeneidad de la mezcla de suelo y contaminante, que tiene influencia en la tendencia irregular de algunos valores en

cuanto al porcentaje de degradación. En el apéndice A, desde la Tabla A.42 a la 50 se visualizan los valores

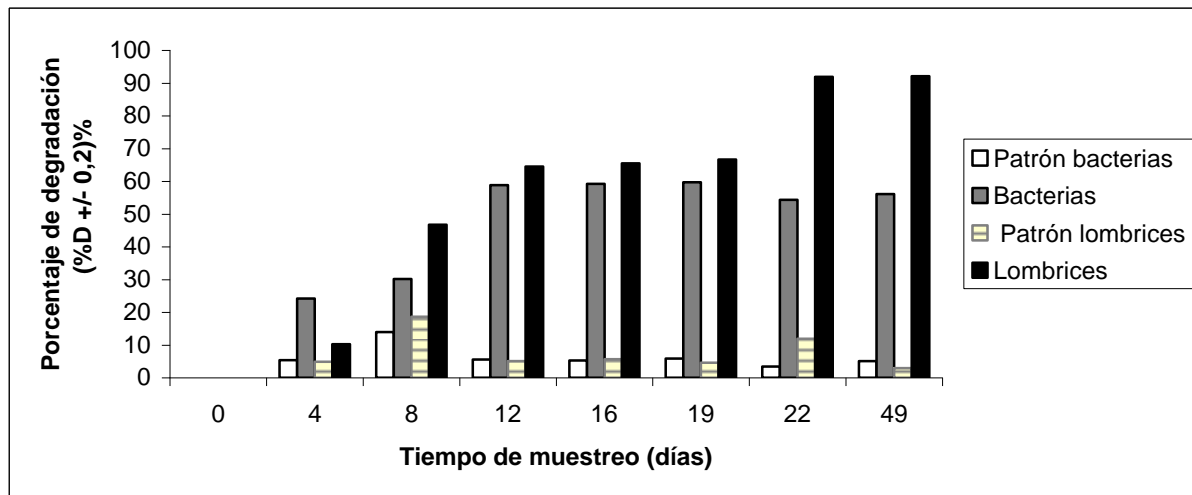


Figura 4.24: Porcentaje de degradación del contaminante en función del tiempo para cada tratamiento del crudo Ayacucho

En la Tabla 4.10, se observa que la cantidad de lombrices al final del tratamiento se conservó y su peso aumento sin ocurrir mortalidad, es decir los macroorganismos se adaptaron al suelo contaminado.

Tabla 4.10: Peso total de la cantidad de lombrices en los microcosmos del asfalteno Ayacucho al inicio y al final del tratamiento

Tiempo de tratamiento Días	Microcosmo Hamaca (Ayacucho)	Peso total de las lombrices ($m_{lomb} \pm 0,001$) g	Cantidad de lombrices ($C \pm 1$)
0	Hlomb.1	2,553	8
	Hlomb.2	2,813	8
	Hlomb.3	2,324	8
49	Hlomb.1	3,697	8
	Hlomb.2	3,404	8
	Hlomb.3	3,697	8

4.4.-Evaluación de la eficiencia del sistema de tratamiento biológico empleando las técnicas cromatográficas, FTIR, RMN ¹³C, relación de H/C y producción de CO₂ respirometría.

La evaluación del proceso de degradación del contaminante en el suelo comprende la realización de cuatro análisis, que permitieron evidenciar los cambios ocurridos durante la aplicación de cada tratamiento.

El primero de ellos fue el análisis FTIR, empleado para determinar los cambios en los grupos funcionales; el segundo tipo de análisis fue RMN ¹³C, mediante el cual se determinó el entorno magnético de los átomos de carbono y se evaluaron los desplazamientos químicos; el análisis elemental que permitió determinar la relación H/C y los porcentajes de los elementos C, H, N, S y O en los asfaltenos y la respirometría que determinó la producción de CO₂ derivados por los microorganismos en la degradación de la materia orgánica.

4.4.1.-Análisis de FTIR de los asfaltenos al final de cada tratamiento.

Al analizar los espectros de los asfaltenos Guafita y Ayacucho obtenidos al final de cada tratamiento a los 49 días, la identificación de los grupos funcionales se puede interpretar dividiendo la Figura en varias zonas de absorción, características de los compuestos.

En el Apéndice A, Tabla A.51 y A.52 aparecen los principales grupos funcionales encontrados en los espectros de cada muestra, de acuerdo al número de onda de las señales más destacadas (Pretsch, 1976).

Al comparar los microcosmos patrones **Gpatrón-bact** y **Gpatrón-lomb** del asfalteno Guafita al final del tratamiento (véase Figuras 4.25 y 4.27), se mantienen

los grupos funcionales, sin embargo al contrastarlo con el asfalteno Guafita día cero sin tratar Figura 4.13, se verifica que hubo un cambio en dichos grupos, lo que hace inferir que hubo una degradación de los mismos.

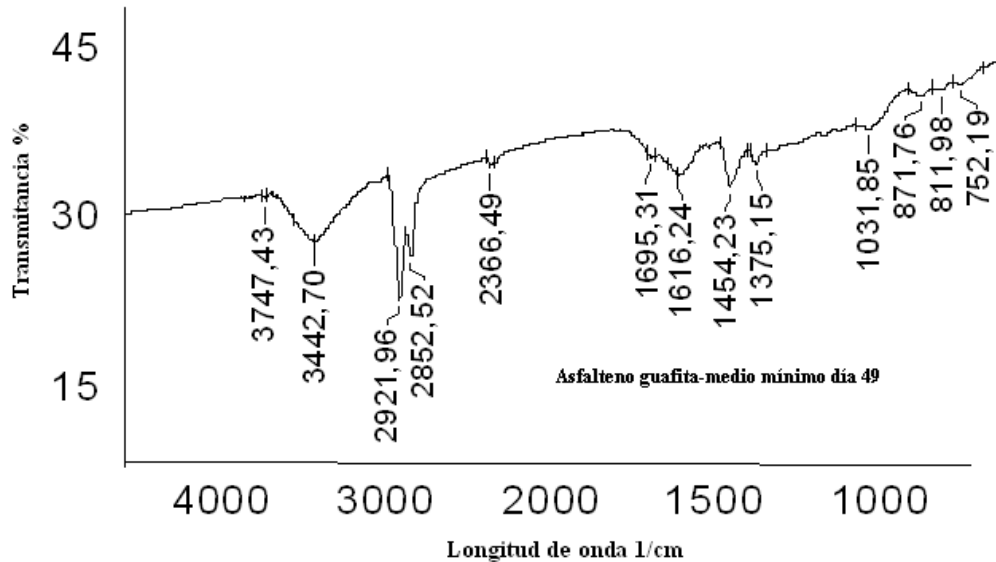


Figura 4.25: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Gpatrón-bact al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo) día 49

En los microcosmos con tratamientos **Gbact (bacterias)** y **Glomb (lombriz)** al final de la investigación, se observa que en la zona entre 1500 a 700 cm^{-1} , cambios muy leves en la huella dactilar, llamada así porque a partir de este intervalo la señal emitida por el espectro es única para cada estructura (véase Figuras 4.26 y 4.28). Entre esos valores el espectro es diferente, lo cual se explica por la degradación de los asfaltenos.

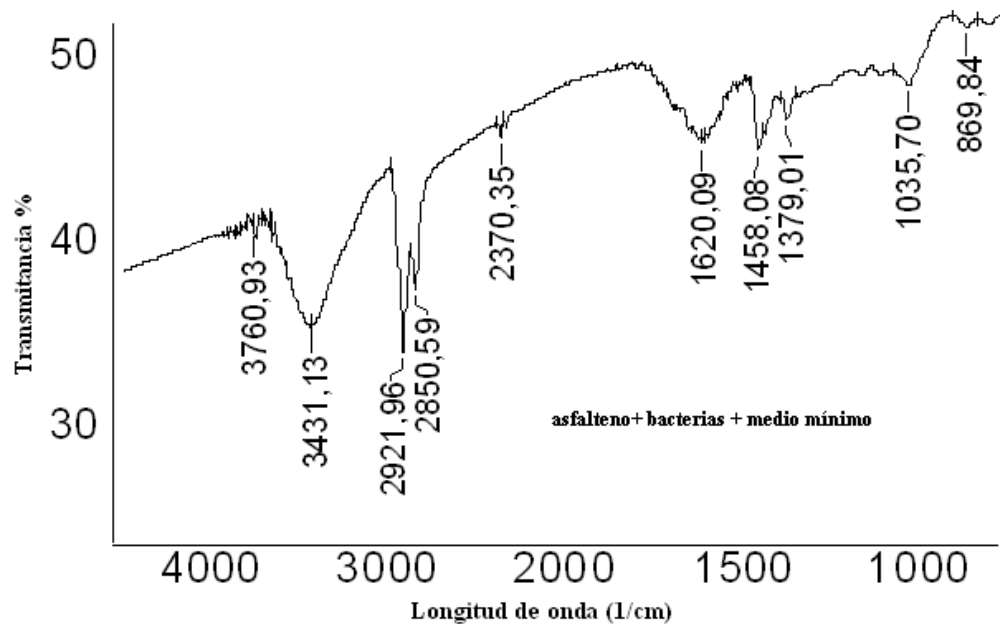


Figura 4.26: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Gbact al final del tratamiento (asfalteno+ bacterias + medio mínimo) día 49

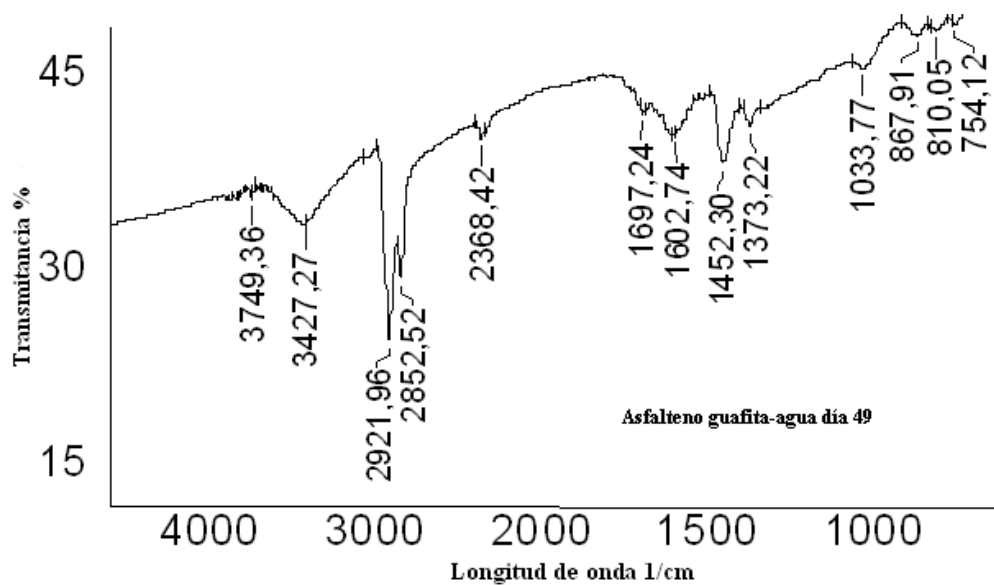


Figura 4.27: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Gpatrón-lomb al final del tratamiento (asfalteno+ agua) día 49

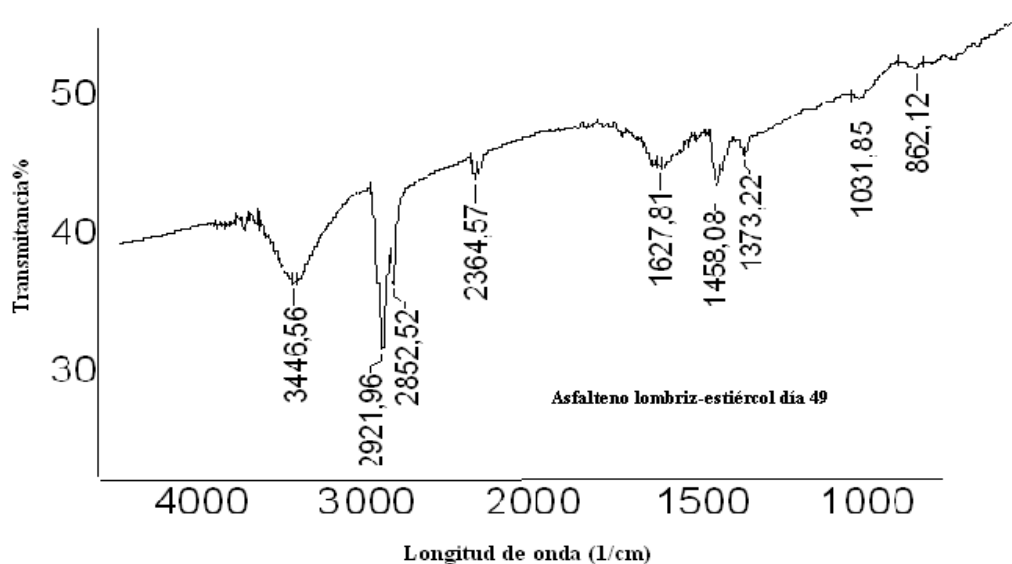


Figura 4.28: Espectro de FTIR del asfalteno Guafita en el microcosmo Glomb al final del tratamiento (asfalteno+ estiércol-lombriz) día 49

Con respecto a la identificación de los grupos funcionales en los asfaltenos del crudo Ayacucho. En la Figura 4.5 se presentan los resultados del análisis de FTIR del día cero. Al evaluar el espectro de la Figura 4.29 **Hpatrón-bact**, se identificaron una serie de grupos funcionales en donde las bandas comprendidas entre 3600 y 3200cm^{-1} podría ser una señal del grupo OH, con tipo de vibración de tensión, también puede ser atribuida a la humedad de la muestra.

Entre 3000 y 2800 cm^{-1} , se observan vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica de enlaces C-H alifáticos $\text{Csp}^3\text{-H}$, el mayor de estos es asimétrico y el otro es simétrico, para 1625 y 1500 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de estiramiento de carbonos aromáticos C=C, con vibración de tipo tensión.

Entre 1480 y 1300 cm^{-1} , existen dos señales muy cercanas, que indican la presencia de alcanos, con una vibración de deformación angular asimétrica y simétrica

respectivamente, que son las bandas de deformación de los grupos metilo y metileno, $-\text{CH}_3\delta_{\text{as}}$ ($1470\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$), $-\text{CH}_2\delta$ ($1475\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$) y $-\text{CH}_3\delta_{\text{sim}}$ ($1395\text{-}1365\text{ cm}^{-1}$).

Al analizar la región que se encuentra por debajo de 1500 cm^{-1} “huella dactilar” y comparar las Figuras entre sí, se observó lo siguiente: el patrón del tratamiento con bacterias **Hpatrón-bact** presentó pocas diferencias en el comportamiento de las señales con respecto al día inicial (véase Figura 4.5), observándose sólo una variación alrededor de 1400 cm^{-1} correspondiente a los alcanos.

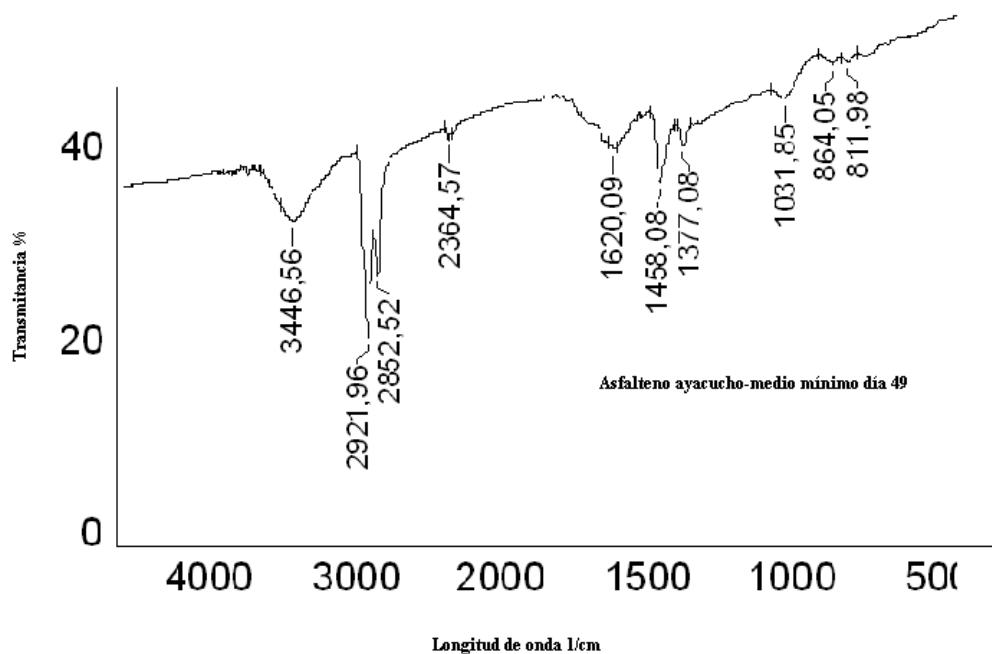


Figura 4.29: Espectro de FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hpatrón-bact al final del tratamiento (asfalteno+ medio mínimo) día 49

Por otra parte, las diferencias entre la muestra **Hbact** día 49 (véase Figura 4.30) y el día cero (véase figura 4.5) fueron más notables, principalmente en tres zonas: alrededor de 1400 cm^{-1} (alcanos), cerca de 1031 cm^{-1} (compuestos de azufre) y por debajo de 1000 cm^{-1} hidrógenos fuera del plano aromático.

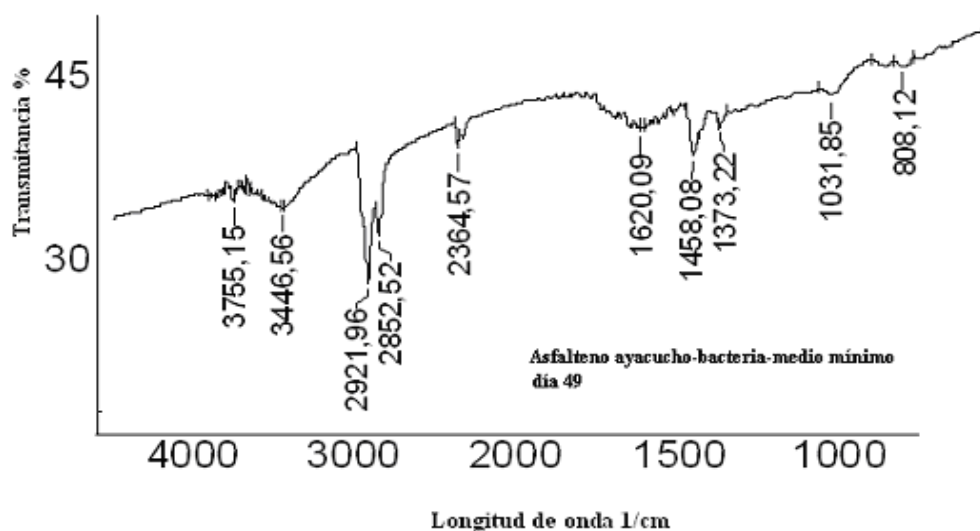


Figura 4.30: Espectro del FTIR de asfalto Ayacucho en el microcosmo Hbact al final del tratamiento (asfalto+ bacteria-medio mínimo) día 49.

En relación al tratamiento **Hlomb** día 49 y su patrón **Hpatrón-lomb**, se distinguen variaciones muy leves con respecto al día cero; la más significativa se observó en la zona comprendida entre 1000 y 800cm^{-1} donde cambia la forma de la curva, sugiriendo variación en los hidrógenos fuera del plano producto de la degradación (véase Figura 4.31 y 4.32).

Las diferencias observadas en la huella dactilar de los asfaltos Guafita y Ayacucho, son un indicio de cambios estructurales de la molécula promedio en cada tratamiento. Este hecho se refuerza con los resultados de los análisis de RMN ^{13}C , análisis elemental y el porcentaje de degradación en ambos asfaltos que indican que hubo disminución, producto de los tratamientos aplicados en los microcosmos acentuando la hipótesis de que ocurrió degradación del asfalto.

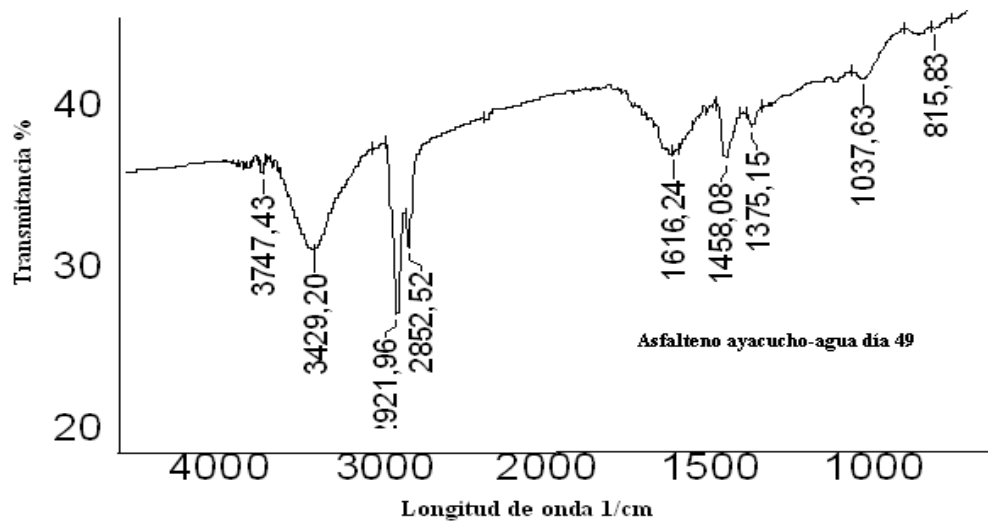


Figura 4.31: Espectro de FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hpatrón-lomb al final del tratamiento (asfalteno+ agua) día 49

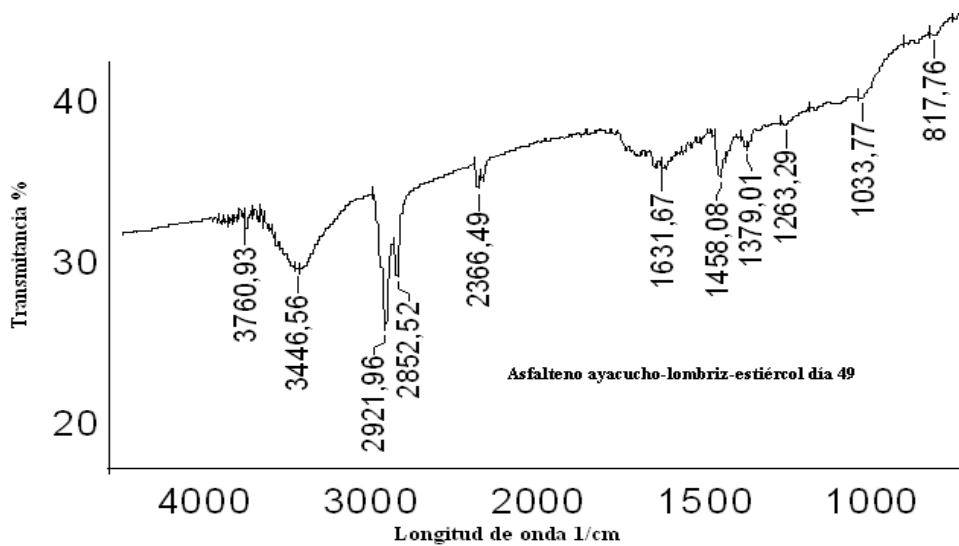


Figura 4.32 Espectro de FTIR del asfalteno Ayacucho en el microcosmo Hlomb al final del tratamiento (asfalteno+ lombriz-estiércol) día 49

4.4.2.-Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN ¹³C) de los asfaltenos al final de cada tratamiento.

Con respecto a los RMN ¹³C de asfalto Guafita, se observa en algunas Figuras (véase apéndice B, desde la B.7 hasta la B.10) la disminución de las señales en la región alifática en relación con la muestra inicial, lo cual sugiere un cambio en la estructura promedio del contaminante.

A través de las Figuras (véase cálculos apéndice D) se obtuvo el área bajo la curva de los carbonos alifáticos y aromáticos, de cada RMN, donde la zona alifática está comprendida entre 0 y 60 ppm y la aromática 110 y 160 ppm, los cuales se logró estimar los porcentajes de cada muestra al final del tratamiento (véase Tabla 4.11)

Tabla 4.11: Porcentajes de área alifática y aromática del asfalto Guafita al inicio y al final del tratamiento

Muestras	Área de la zona aromática	Área de la zona alifática	Porcentaje de área alifática (Ali ± 1) %	Porcentaje de área aromática (Aro± 1) %
Asfalto día cero	0,79	1	56	44
Gpatrón-bact día 49	0,91	1	52	48
Gbact día 49	0,25	1	80	20
Gpatrón-lomb día 49	0,87	1	54	47
Glomb día 49	0,75	1	57	43

Estos valores señalan que transcurridos los días de tratamiento, el contenido aromático en las muestras extraídas de los microcosmos patrones **Gpatrón-bact** y **Gpatrón-lomb** aumentó en una pequeña cantidad, lo que indica la degradación de los carbonos alifáticos, en cambio el tratamiento con lombrices **Glomb** y bacterias

Gbact, aumentó el porcentaje de carbonos alifáticos, lo que se traduce en la degradación de los carbonos aromáticos presentes en los asfaltenos.

En los espectros de RMN ^{13}C del asfalto Ayacucho (véase apéndice B, Figuras desde la B.11 hasta la B.14), la muestra patrón **Hpatrón-bact** presentó una gran cantidad de picos en la zona alifática, similares a los del día cero de tratamiento (véase figura 4.8), evidenciando la presencia de cadenas alquílicas entre 14 y 29 ppm y manteniendo la señal de carbono CH_2 en 30 ppm. La zona entre 110 y 160 ppm, corresponde a los carbonos aromáticos. La señal con forma de curvatura es característica de los asfaltenos.

Al estudiar el espectro de la muestra **Hbact**, se observó que la cantidad e intensidad de las señales presentes en la zona alifática disminuyeron en comparación con las muestras del día cero y **Hpatrón-bact**. En la región de carbonos sp^3 se mantuvieron sólo tres de los picos presentes en el día cero y en el patrón (14,06 ppm, 22,64 ppm y 30 ppm), los cuales corresponden a cadenas de carbonos saturados.

El patrón de control del tratamiento **Hpatrón-lomb**, presentó variación en las señales con respecto al día cero, tal como se muestra en la Figura 4.8. Se mantuvieron las cadenas de alcanos (CH_3 y CH_2) entre 14 y 30 ppm, pero con una menor cantidad e intensidad en los picos.

En el espectro de RMN ^{13}C del tratamiento **Hlomb** en el día cuarentinueve, se observó una disminución considerable de las señales de ambas regiones en relación con las muestras del día cero y **Hpatrón-lomb**, lo cual sugiere un cambio en la estructura del contaminante.

Un parámetro de comparación en los espectros de RMN ^{13}C , que permite evaluar los cambios estructurales del contaminante es el porcentaje de los diferentes tipos de átomos carbono presentes en la muestra, el cual se obtuvo a partir de la integración o

cálculo del área bajo la curva de las dos regiones: aromática y alifática. Este valor permite predecir en términos generales la estructura final de los asfaltenos, luego de la aplicación cada tratamiento al compararla con el día cero.

En la Tabla 4.12, las muestra correspondiente al día cero presentó un mayor contenido de carbonos alifáticos en su estructura 68 %, cuando se contrastó con los tratamientos y sus patrones en el último día de tratamiento **Hpatrón-bact día 49**, **Hpatrón-lomb día 49** y **Hlomb día 49** (véase cálculos apéndice D).

Tabla 4.12: Porcentajes de área alifática y aromática del asfalto Ayacucho al inicio y al final del tratamiento

Muestras	Área de la zona aromática	Área de la zona alifática	Porcentaje de área alifática (Ali ± 1) %	Porcentaje de área aromática (Aro ± 1) %
Asfalto día cero	0,48	1	68	32
Hpatrón-bact día 49	0,72	1	58	42
Hbact día 49	0,20	1	83	17
Hpatrón-lomb día 49	0,53	1	65	35
Hlomb día 49	0,79	1	56	44

En cambio el tratamiento con bacterias **Hbact**, aumentó el porcentaje de carbonos alifáticos, lo que se traduce en la degradación de los carbonos aromáticos presentes en los asfaltenos.

4.4.3.-Análisis elemental de los asfaltenos al final de cada tratamiento

Una vez obtenidos los porcentajes de cada elemento presente en las muestras de asfalto Guafita y Ayacucho, se calculó la relación H/C al final de los tratamientos y al comparar la relación al inicio de la experimentación del asfalto Guafita, se observa que en los tratamientos hay un aumento en la relación, esto debido al

aumento del contenido alifático producto de la degradación del contenido aromático del asfalteno, estos valores obtenidos nos indican que en tiempos prolongados los microorganismos presentes en el microcosmo, están degradando la parte mas recalcitrante de los asfaltenos, que son la parte aromática.

Cabe destacar que esta relación es mayor en el tratamiento con lombrices **Glomb**; es decir que con el mismo hubo mayor degradación de los aromáticos presentes. Véase Tabla 4.13

Tabla 4.13: Composición del asfalteno Guafita al inicio y al final del tratamiento

Muestra	Porcentaje de elementos ($E_A \pm 0,01$) %					Relación H/C ($H/C \pm 0,01$) adim
	C	H	N	S	O ^d	
Asfalteno día cero	85,96	7,90	2,88	1,28	1,98	1,10
Gpatrón-bact día 49	86,05	8,01	2,20	1,28	2,46	1,11
Gbact día 49	83,61	8,11	1,74	1,76	4,78	1,16
Gpatrón-lomb día 49	86,52	8,17	2,36	1,27	1,68	1,13
Glomb día 49	83,03	8,51	1,67	1,32	5,47	1,22

Se tiene que al disminuir o degradar el contenido de carbono de los hidrocarburos, una parte del carbono se degrada biológicamente produciendo CO₂, que se desprende y puede ser usado por los microorganismos como fuente de energía para su crecimiento (Berradre *et al.* 2009).

Otros de los elementos que se observa es la variación de nitrógeno y azufre, los elementos conformados por el nitrógeno se degradan primeramente, que los conformados por azufre (Meyer y Steinhart, 2000).

El análisis elemental realizado a las muestras de asfaltenos del crudo Ayacucho (véase Tabla 4.14). Señalan los valores obtenidos para la relación H/C en asfaltenos, al realizar un análisis comparativo de esta relación con el día cero, se observa una disminución en las muestras **Hpatrón-bact** y **Hbact**, un aumento en **Hlomb** y ningún cambio en el patrón **Hpatrón-lomb**.

Una disminución en la relación H/C nos proporciona un mayor contenido aromático en el compuesto. Este cambio es posible ya que partimos de un asfalteno más alifático y son más susceptibles a ser atacadas por los microorganismos degradadores.

Cabe destacar que lo anterior marca una diferencia entre las muestras analizadas. En el caso del tratamiento con bacterias, se presume que ocurrió degradación principalmente sobre las cadenas alifáticas llegando a degradar las aromáticas en pequeñas proporciones, mientras que en el tratamiento con lombriz los microorganismos fueron más eficaz, atacaron los compuestos alifáticos y los aromáticos en mayor proporción, aumentando la relación H/C, esto se debe a que existe mayor aireación, húmeda y nutrientes en el tratamiento con lombrices **Hlomb**.

El incremento nitrógeno pudiera asociarse al uso del nitrógeno por parte de los microorganismos para sintetizar el protoplasma celular, y al hecho los microorganismo al morir incrementa la concentración de nitrógeno reciclable durante el proceso. Con respecto al % de azufre (S) para ambos tratamientos al finalizar el estudio la cantidad de azufre difiere con respecto al día inicial, esto se debe a que los microorganismos presentes producen una biodesulfuración (BDS) ruta metabólica en la que los microorganismos actúan como biocatalizadores en el carbón, petróleo y sus diferentes fracciones liberando así el azufre (Monticello y Finnerty, 1985). En el tratamiento con *Eisenia foétida* la disminución fue mayor debido a las condiciones del medio (humus, humedad, aireación y estiércol).

El porcentaje de oxígeno en las muestra presenta un valor superior con respecto al día cero; esto puede atribuirse a un mayor contenido de oxígeno en la estructura, el cual puede sugerir procesos de oxidación de la molécula de asfalteno y también a que en estos tratamientos hubo mayor humedad .

Es de hacer notar, que la cantidad de oxígeno se determina por diferencia y en el análisis no se reportan los metales vanadio (V), níquel (Ni) que están presentes en trazas en los asfaltenos, pues no se conoce con exactitud el porcentaje donde estos factores inciden de manera desfavorable sobre los resultados obtenidos experimentalmente.

Tabla 4.14: Composición del asfalteno Ayacucho al inicio y al final del tratamiento

Muestra	Porcentaje de elementos (E _A ± 0,01) %					Relación H/C (H/C±0,01) adim
	C	H	N	S	O ^d	
Asfalteno día cero	82,47	8,42	1,71	4,70	2,70	1,22
Hpatrón-bact día 49	82,05	8,27	1,78	4,61	3,19	1,20
Hbact día 49	81,16	8,16	1,74	4,39	4,55	1,20
Hpatrón-lomb día 49	77,92	7,99	1,69	4,08	8,32	1,22
Hlomb día 49	78,02	8,41	1,79	3,77	8,01	1,28

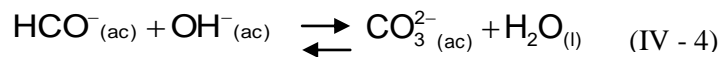
d: se determina por diferencia.

4.4.4.-Producción de CO₂ (respirometría)

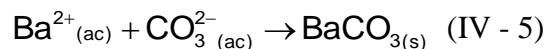
Una herramienta para evaluar la velocidad de biodegradación se basa en técnicas respirométricas, ya que proporciona un rápido indicador de la actividad microbiana, según lo referido por LaGrega *et al.*, 1996. Se trata de conocer la tasa de respiración que tiene lugar en el suelo contaminado y que puede servir para determinar la

posibilidad de éxito al estimular el crecimiento biológico en ese medio, Moreno *et al* (2004).

La técnica aplicada se basó en los experimentos realizados por Martínez (2007), en el que se recoge el CO₂ en una disolución de KOH, y se valoró con HCl, y de esa manera determinó la respiración celular. El CO₂ producto de dicha respiración, presente en cada microcosmo, reaccionó con los iones oxidrilo, que se encuentran atrapados en la trampa de álcali según las ecuaciones IV-3 y IV-4 expuestas por Montes (2001):



Para evitar interferencias debido a la reversibilidad de la reacción representada en la ecuación anterior, se adicionó cloruro de bario acuoso con el fin de precipitar los iones carbonatos presente en la disolución, según la ecuación IV-5, Montes (2001):



Con la variación de iones OH⁻ en la disolución de hidróxido de potasio se conoce la cantidad de CO₂ que se produjo. Este CO₂ en los microcosmo fue producido por los microorganismos y por el aire del medio ambiente, por tal razón fue necesario colocar una trampa de álcali en un microcosmo con suelo virgen (patrón P), el cual recogiera el CO₂ proveniente del ambiente y haciendo uso de la ecuación III-8, se determinó la cantidad producida solo por los microorganismos presentes en los tratamientos, estos valores se visualizan en el apéndice A en las Tablas A.53 y A.55 de resultados.

En las Figuras 4.33 y 4.34, se observa como varía la respiración celular a través del tiempo en los tratamientos con asfalteno Guafita, en ambos se manifiesta que la

producción de CO₂ es menor en el caso de los microcosmo patrones, esto porque hay menor actividad microbiana.

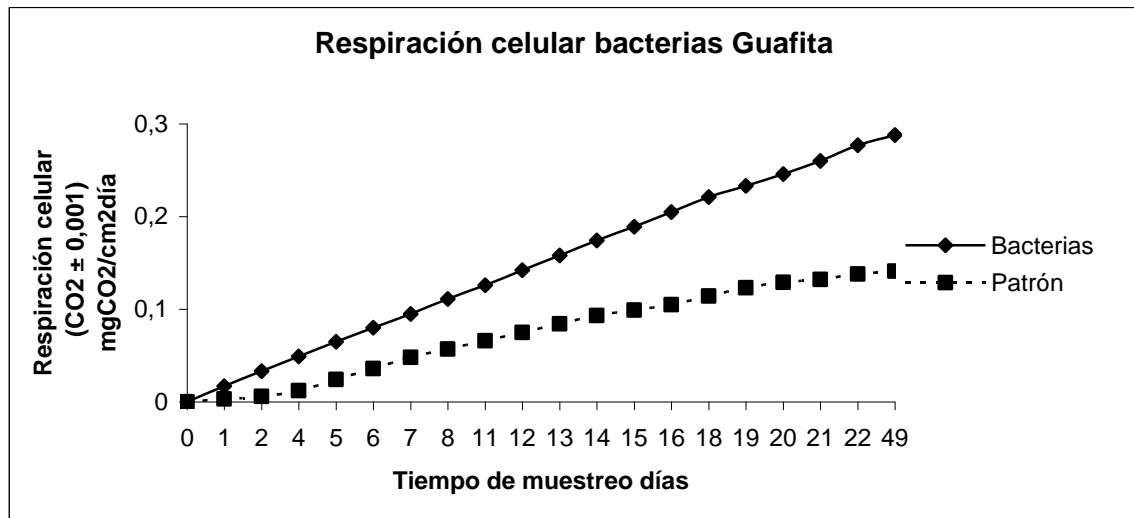


Figura 4.33: Respiración celular de los tratamientos con bacterias y patrón del asfalto Guafita en el tiempo.

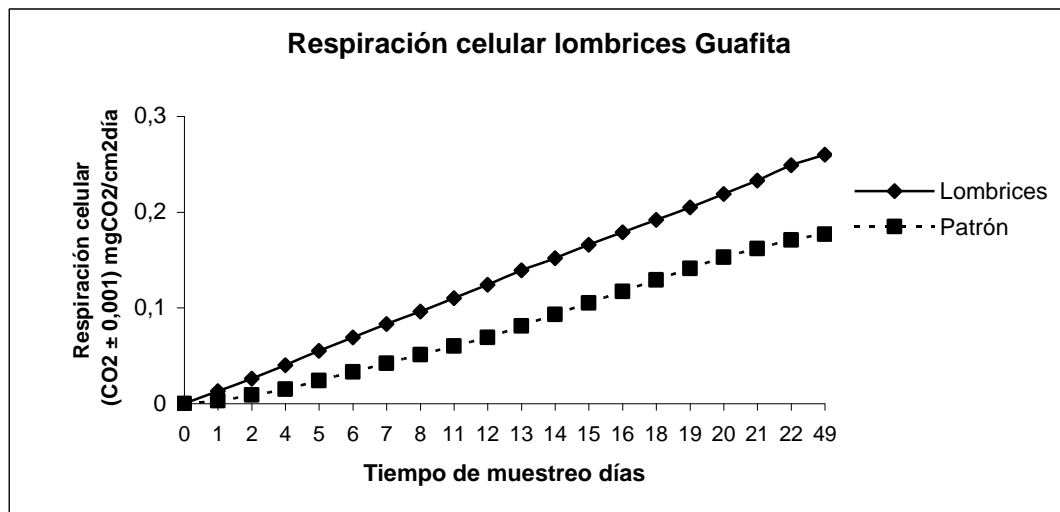


Figura 4.34: Respiración celular en los tratamientos con lombrices y patrón del asfalto Guafita en el tiempo.

En las Figuras 4.35 y 4.36, se observan las curvas de respiración de los tratamientos y sus patrones. Estos valores se visualizan en el apéndice A en las Tablas A.56 y A.58 de resultados.

La producción de CO₂ fue prácticamente igual durante el tiempo de muestreo entre los microcosmos, por lo cual las curvas exhiben la misma tendencia. Este resultado tiene relación directa con el mantenimiento de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano durante los días de seguimiento, pues la respiración se considera un índice de la actividad de los microorganismos en el suelo (Krebs, 2003).

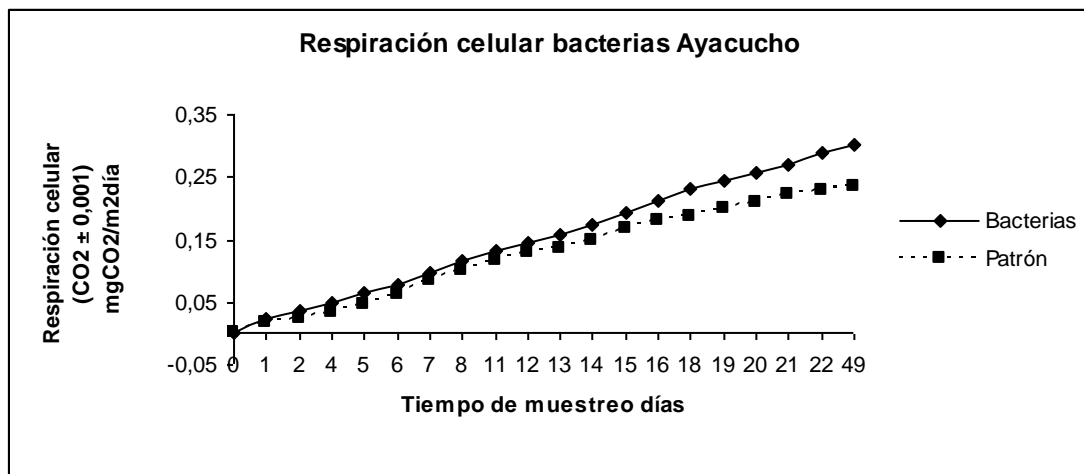


Figura 4.35: Respiración celular en los tratamientos con bacterias del asfalto Ayacucho en el tiempo.

Cabe destacar que en los microcosmos del tratamiento con lombrices, se esperaba una tasa de respiración superior a la obtenida en las demás unidades experimentales por la presencia de la *Eisenia foétida*, que contribuye a aumentar la producción de CO₂ por efecto de la respiración cutánea que realiza; sin embargo no hubo diferencia en este aspecto. Esta semejanza en la tasa de respiración puede ser consecuencia de la saturación del álcali utilizado para capturar el CO₂ producido.

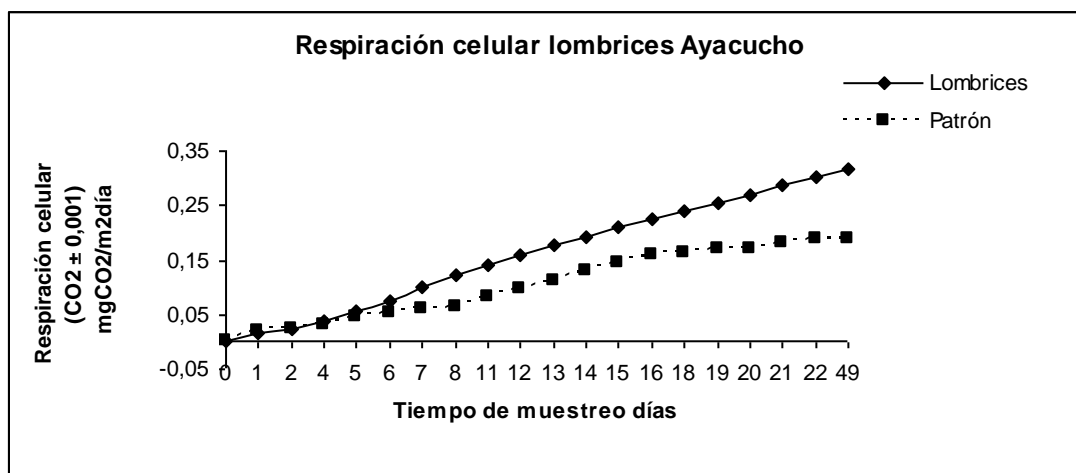


Figura 4.36: Respiración celular en los tratamientos con lombrices del asfalteno Ayacucho en el tiempo.

4.5.- Análisis estadístico de los resultados obtenidos entre los diferentes tratamientos.

La necesidad de contar con un material homogéneo para llevar a cabo este tipo de diseño experimental se asegura en vista a que se seleccionó una muestra de suelo compuesta al azar considerando varios zonas puntuales de muestreo dentro del microcosmo, Volké T., 2005.

Para cada tratamiento se estableció un mismo número de unidades experimentales de tres réplicas, esto es debido a que se esperaba que hubiese una diferencia significativa entre los tratamientos efectuados ya que los mismos fueron corridos bajo las mismas condiciones lo que disminuye su error aleatorio; mientras que el tratamiento control sólo se corrió una vez porque los resultados de las variables de respuesta en él, se usan sólo como un patrón de referencia (Infante, 2001). Además considerando el costo y el tiempo de experimentación global se tomó un número impar de réplicas tal como lo sugieren Pulido y De la Vara 2004.

Para validar los resultados experimentales obtenidos se aplicó la herramienta estadística haciendo uso del programa Statistix 8.0, tal como lo sugieren Vallejo *et*

al., 2005. En base al diseño experimental seleccionado (diseño en bloques completos al azar) y de acuerdo a la metodología descrita, se analizan los valores calculados por el programa.

Los valores del ANOVA mediante el cual se evaluaron diferencias significativas entre tratamientos se presentan en la Tabla 4.15. Los parámetros evaluados fueron: humedad, degradación de contaminante, pH y respiración celular.

Tabla 4.15: Comparación de los valores de significancia calculada y predefinida para las diversas variables de salida determinadas

Variable de salida	Significancia calculada ($p \pm 0,0001$)adim	Análisis estadístico
Respiración celular (CO ₂) Ayacucho	0,0000	Existe diferencia significativa entre los resultados
Degradación de asfalto(%) Ayacucho	0,0000	
Potencial de acidez (pH) Ayacucho	0,0110	
Humedad (%) Ayacucho	0,0042	
Respiración celular (CO ₂) Guafita	0,0000	
Degradación de asfalto(%)Guafita	0,0000	
Humedad (%) Guafita	0,0036	No existe diferencia significativa
Potencial de acidez (pH) Guafita	0,2415	

Los valores de significancia calculados por el programa fueron comparados con la significancia predefinida ($\alpha=0,05$) (Shaefer *et al*, 2006), que representa el intervalo de rechazo de la hipótesis nula (H_0) referida a la igualdad de las medias entre tratamientos de esta manera, si la significancia calculada es mayor a la predefinida, las medias entre los tratamientos son iguales (Gutiérrez *et al*, 2004).

Al comparar los valores de significancia calculada entre las variables respiración celular, degradación y humedad en cada tratamiento (véase Tabla 4.15) se concluye que se produjeron resultados estadísticamente diferentes, por esta parte se rechaza la hipótesis nula que no existe diferencia entre los tratamientos, en cambio el potencial de acidez no existe diferencia significativa en el microcosmo Guafita, lo cual es lógico ya que el pH es solo una variable de monitoreo para asegurarse que en los microcosmos son las adecuadas.

En cambio las variables de respiración, fracción degradada y humedad cambian, las dos primeras por los microorganismos y la última porque es difícil de mantener los microcosmos en un mismo porcentaje.

Dentro del reporte del análisis de varianza, se destacó uno de los valores de interés que es el coeficiente de variación (CV), en la tabla 4.16 se resumen los valores obtenidos de este parámetro

Tabla 4.16: Parámetros de eficiencia del diseño en bloques completos al azar para cada variable de salida determinada

Variable de salida	Coefficiente de variación (CV ± 0,01)%
Respiración celular (CO ₂) Ayacucho	28,09
Degradación de asfalto(%) Ayacucho	62,61
Potencial de acidez (pH) Ayacucho	1,09
Humedad (%) Ayacucho	26,33
Respiración celular (CO ₂) Guafita	19,36
Degradación de asfalto(%)Guafita	55,62
Humedad (%) Guafita	12,55
Potencial de acidez (pH) Guafita	0,27

El Coeficiente de Variación (CV) indica, en términos porcentuales, la dispersión de una serie de datos respecto al valor medio. El valor del CV es igual a 0 cuando no

existen diferencias entre los puntos, resultando entonces una distribución totalmente homogénea.

En la Tabla 4.16 se puede apreciar que se obtuvo coeficientes más elevados para aquellas variables que, de acuerdo al ANOVA, presentaron diferencias significativas entre sí. Existiendo mayor variabilidad con respecto al porcentaje de degradación, el contenido de humedad y la producción de CO₂ que con respecto al pH.

En términos generales, algunos valores de CV obtenidos concuerdan con los reportados (Carrasquero 1999) cercanos al 30%. Por otra parte, de acuerdo a los estudios realizados por González y Tompson 2007, se consideran excelentes los cercanos al 10%, lo que establece que el pH, la humedad y la producción de CO₂ son muestras homogéneas, en cambio el porcentaje de degradación es muy variable el cual proporciona una idea de la heterogeneidad del suelo según Carrasquero, 1999, el diseño experimental esta muy restringida en los experimentos de campo, debido a la poca homogeneidad del suelo, lo que se traduce en coeficientes de variación elevados.

La aplicación del análisis de varianza requiere de un proceso de validación que consistió en verificar los tres supuestos del modelo estadístico: normalidad, homogeneidad e independencia.

El supuesto de normalidad fue evaluado a través de la prueba de Shapiro Wilks, para comprobar si las variables de respuesta presentaban distribución normal. Los resultados arrojados por el programa indican que las variables cumplen con el supuesto de normalidad, pues la significancia calculada es menor que la predefinida en todos los casos (véase Tabla 4.17).

El valor de significancia calculada representa la pendiente de la línea de tendencia normal que supone el modelo y que idealmente debería ser igual a la unidad, por lo cual éste se tomó como valor de significancia predefinida.

Adicionalmente, es posible la comprobación de este supuesto mediante la observación de la curva de probabilidad normal: si la tendencia seguida por los residuos es una línea recta, se garantiza la normalidad (véase apéndice F). Es importante señalar que el ajuste lineal no debe ser perfecto, ya que el análisis de varianza resiste pequeñas y medianas variaciones con respecto al supuesto de normalidad (Pulido y De la Vara, 2004).

Tabla 4.17: Valores de la significancia calculada en la verificación del supuesto de normalidad mediante la prueba de shapiro-wilk

Variable de salida	Significancia calculada ($p \pm 0,0001$)adim	Análisis estadístico
Respiración celular (CO ₂) Ayacucho	0,5181	Se cumple el supuesto de normalidad
Degradación de asfalteno(%) Ayacucho	0,4978	
Potencial de acidez (pH) Ayacucho	0,4518	
Humedad (%) Ayacucho	0,3010	
Respiración celular (CO ₂) Guafita	0,9738	
Degradación de asfalteno(%)Guafita	0,0915	
Humedad (%) Guafita	0,0599	
Potencial de acidez (pH) Guafita	0,2246	

El segundo supuesto corresponde a la homogeneidad de varianzas, el cual puede interpretarse de acuerdo a la forma como se distribuyen los residuos del análisis de varianza en función de los valores fijos. Si los puntos se distribuyen alrededor de una banda horizontal sin un orden o arreglo definido, esto implica que los tratamientos tienen igual varianza. Una razón frecuente que hace que no se cumpla el supuesto es

que algunas variables tienen una dispersión que es proporcional a su magnitud, de tal manera que si los valores son pequeños, tienden a ser más homogéneos, comparados con la variabilidad que tienen entre sí los valores grandes (Pulido y De la Vara, 2004).

Supuesto de independencia: La verificación de este supuesto se garantiza porque se está trabajando con un suelo, el cual, por naturaleza es heterogéneo; de manera tal que cada resultado obtenido en el ANOVA es independiente. Aunado a esto, la independencia de los resultados está directamente vinculada con la forma aleatoria en la que fue realizada la toma de muestras de acuerdo con Martínez, 2005.

Ahora bien, en el análisis estadístico obtenido anteriormente se refleja que alguna de las variables determinadas son significativamente diferentes, por lo tanto se recurre a la prueba de Tukey (HSD) para determinar cuáles variables son distintas y en qué tratamiento, por ejemplo si en dos microcosmos de distintos tratamientos se obtienen valores de degradación estadísticamente iguales a ambos se les asigna una misma letra, mientras que si son diferentes se les asignan letras distintas para realizar la comparación efectiva.

De la prueba de Tukey se concluye que los valores de degradación de asfalto, humedad, respiración celular y potencial de acidez, para el tratamiento con la *Eisenia foétida* y con cepas bacterianas muestra homogeneidad para ambos cruos, no arrojando ninguna diferencia significativa en cada tratamiento, pero si presenta en algunos casos heterogeneidad con respecto a los microcosmos control.

En el caso del potencial de acidez para el crudo Guafita se observó homogeneidad entre los microcosmos de tratamientos con *Eisenia foétida* y con cepas bacterianas y los microcosmos control, y también se observó que el potencial de acidez, humedad para el control y tratamiento con bacterias para ambos cruos se mantienen homogéneas

Otra de las pruebas realizadas consistió en la prueba de Dunnett, mediante la cual se tomaron en cuenta las diferencias significativas de cada tratamiento con respecto a su microcosmo patrón o control, verificando si el valor calculado por tratamiento era mayor al valor crítico de Dunnett, para así rechazar la hipótesis nula (Pulido y De la Vara, 2004). Al aplicar la prueba se determinó que existen diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de degradación y respiración celular de cada tratamiento con su respectivo control para ambos crudos; Para los valores de humedad el tratamiento con bacterias para el crudo Guafita se comporta igual que el tratamiento control o patrón, y con respecto al potencial de acidez tanto para el tratamiento con bacterias y lombriz el crudo Guafita no tiene diferencia significativa con el control, en cambio el potencial de acidez en el tratamiento con bacterias del crudo ayacucho tiene el mismo comportamiento.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. El suelo virgen utilizado en los tratamientos presenta una textura franca, poco contenido de materia orgánica, baja conductividad eléctrica y pH ligeramente ácido.
2. El proceso de encalado permite alcanzar y mantener condiciones de neutralidad en el suelo durante todo el tratamiento.
3. El estiércol utilizado posee un alto contenido de materia orgánica y proporciona cantidades adicionales de fósforo y nitrógeno, favorables para el crecimiento bacteriano.
4. Los microorganismos degradadores de asfalteno fueron, para el Crudo Ayacucho la *Pseudomonas aeruginosa* y para el Crudo Guafita, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas spp* y *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Los análisis de RMN ^{13}C , análisis elemental y FTIR reflejan cambios en la estructura promedio de los asfaltenos Guafita y Ayacucho, para los tratamientos con respecto al día cero.
6. El porcentaje de degradación obtenido en los tratamientos con *Eisenia foétida* para el asfalteno Ayacucho fue de 92% m/m en comparación con el tratamiento de microorganismos aislados fue de 56 % m/m, y el crudo Guafita, la fracción degradada de asfaltenos en el tratamiento con lombrices fue de 83 % m/m, y con bacterias de un 76 % m/m.
7. En los tratamientos aplicados, incluyendo los biorreactores patrón, se observó diferencia significativa entre las variables: fracción biodegradada, respiración celular y humedad.

8. De la prueba de Tukey se concluye que los valores de degradación de asfalteno, humedad, respiración celular y potencial de acidez, para el tratamiento con la *Eisenia foétida* y con cepas bacterianas muestra homogeneidad para ambos crudos, no arrojando ninguna diferencia significativa en cada tratamiento, pero si presenta en algunos casos heterogeneidad con respecto a los microcosmo control.

9. Al aplicar la prueba se Dunnett, se determinó que existen diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de degradación y respiración celular de cada tratamiento, con su respectivo control para ambos crudos.

RECOMENDACIONES

1. Proporcionar una relación de nutrientes adecuada para el crecimiento bacteriano, adicionando y realizando un seguimiento del contenido de nutrientes en los microcosmos en el tiempo.

2. Aislar e identificar las bacterias presentes en el tratamiento con *Eisenia foétida*, para comprender el proceso de degradación sobre el contaminante.

3. Extender el tiempo de muestreo para evaluar las transformaciones sucesivas que ocurren en relación con el crecimiento bacteriano y la estructura del asfalteno en el suelo.

4. Realizar resonancia magnética de protones y contenidos de metales trazas de vanadio y níquel, para tener una mejor comprensión estructural de los asfaltenos.

GLOSARIO

Aerobios: crecimiento exclusivo en presencia de oxígeno.

Biodegradable. Referido a una sustancia o producto industrial que puede descomponerse por la acción biológica de microorganismos.

Biodegradación. Proceso a través del cual una sustancia orgánica puede descomponerse en otras más simples por la acción de los microorganismos.

Biomasa. Masa de materia seca en una zona o *hábitat*, que suele expresarse por unidad de superficie de terreno o por unidad de volumen de agua.

Contaminación. Cambio indeseable de las propiedades físicas, químicas y biológicas que puede provocar efectos negativos en los diferentes componentes del medio ambiente.

Conorcios. Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás.

Daño ambiental. Acción negativa o perjudicial ejercida por un factor o varios ajenos al medio.

Desechos peligrosos. Sustancias provenientes de diversas actividades y en cualquier estado físico que, por la magnitud o modalidad de sus características corrosivas, tóxicas, venenosas, nocivas, explosivas, inflamables, biológicamente perjudiciales, infecciosas, irritantes u otras, representan un peligro para la salud humana y el medio ambiente.

Desechos tóxicos. Residuos de un proceso productivo o investigativo peligrosos por su alto grado de toxicidad para las personas, plantas o animales.

Heterótrofo. Organismo capaz de derivar carbono y energía para el crecimiento y la síntesis celular, utilizando compuestos orgánicos.

Hidrocarburos. Compuestos formados por hidrógeno y carbono en diversas combinaciones que se encuentran presentes en los productos derivados del petróleo y del gas natural.

Humus. Elemento que resulta de la descomposición avanzada de seres vivos, en especial de las plantas, que ayuda a retener el agua y a mejorar sus características físicas y agroproductivas.

Impacto ambiental. Repercusión en el medio ambiente provocada por la acción antrópica o un elemento ajeno a dicho medio, que genera consecuencias notables en él.

Lombricultura. Cultivo y manejo de la lombriz de tierra en condiciones controladas, mediante la ingestión y procesamiento de la materia orgánica o desechos biodegradables.

Materia orgánica. Conjunto de materiales vegetales y animales total o parcialmente descompuestos por la acción de los microorganismos presentes en el suelo.

Microorganismos. Organismos microscópicos, tales como virus, bacterias, hongos y protozoos que pueden resultar perjudiciales o beneficiosos al hombre, según el caso.

Mineralización. Conversión de un elemento en forma orgánica a un estado inorgánico como resultado de la actividad microbiana

Oxidación. 1. Combinación de una sustancia con oxígeno. 2. Proceso natural de descomposición de minerales a través de reacciones químicas en presencia de oxígeno. 3. Utilización de oxígeno para descomponer desechos o productos químicos orgánicos presentes en las aguas cloacales, tales como cianuros, fenoles y compuestos de azufre orgánicos, por medios bacterianos y químicos.

Pool. La suma de todos los organismos

Suelo. Capa superficial de la corteza terrestre que sirve de substrato a plantas, animales y al hombre y que posee características de fertilidad, debido al proceso de meteorización y descomposición de las rocas durante un tiempo geológico determinado.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Agronomy. (1986). "Methods of soil analysis". American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, EEUU. pp. 363-375.
2. Alastre, E. (1995). "*Lombricultura (estado actual, potencial y perspectivas de su producción)*". Maracay. Venezuela.
3. Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego.
4. Alvarez, P. y Guevara, E. (2003). "Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas". Consejo de desarrollo científico y humanístico (CDCH-UC) de la Universidad de Carabobo. Venezuela.
5. Alvarez, J. A; Nuñez, C. y Díaz, Miguel A. (2004). "Biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos". Centro de Investigaciones del Petróleo. La Habana. Cuba.
6. Araujo, I., Angulo, N., Cardenas, C., Méndez, M., Morante, M. y Machado, M. (2005). "Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización". Centro de Investigación del Agua. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
7. Araujo, Ismenia; Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Angulo, N. y Morillo, G. (2006). "Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos" *Interciencia*, 31 (004), 268-275.
8. Araujo, I., Gómez, A; Morillo, G., Cárdenas, C. y Herrera, L. (2008). "Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano". *Revista Interciencia* Vol. 33 N° 4 pp. 245-250. Caracas. Venezuela.
9. Atlas, R. (1981). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An Environmental perspective*.
10. Bastardo, Hector. (2000). Biodegradación de bifenilos policlorinados por actividad bacteriana. *Acta Biológica Venezolana.*, Vol.20 (4). 35-42. "Los bifenilos policlorinados (PCB's).

11. Bastardo, Héctor; Bermúdez, D; Betancourt, L. y Guerra, Pedro. (2007). Técnicas microbiológicas y su aplicación en biorremediación. . VII Congreso Venezolano de Ecología. Simposio I. Ambiente y Petróleo: La nueva Dimensión Ambiental dentro de la Industria Gasífera y de Hidrocarburos de Venezuela
12. Berradre, M. Mejías, M. Ferrer, J. Chandler, C. Páez, G. Mármol, Z. Ramones, E y Fernández, V. 2009 Fermentación en estado sólido del desecho generado en la industria vinícola. *Rev. Fac. Agron.*, vol.26, no.3, p.398-422. ISSN 0378-7818
13. Branco, V., Mansoori, G., De Almeida X, L., Park, S. y Manafi, H. (2001). *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 32, 217.
14. Brown, T; LeMay, H; Bursten, E. y Burdge, J. (2004). “Química, la ciencia central”. Novena edición. México D.F. Pearson. Prentice Hall.
15. Bossert, I. D. y Compeau, G. C. (1995) Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil, in L. Young and C. E. Cerniglia (eds), *Microbial Transformation and degradation of Toxic Organic Chemicals*. Wiley – Liss, New York, and John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 77-125.
16. Bredehoeft, J. D. (1994). Hazardous waste remediation: A 21st century problem. *Groundwater Monit.and Remediation* 14:95-100.
17. Canals, Viñas Marc. (2005). “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica”. Tesis Doctoral publicada. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de microbiología. Barcelona. España. (en línea) <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0920105-085623/>. Acceso: 30 Agosto (2008).
18. Carbognani, L. y Espidel, Y. (1997). “Separación y caracterización preliminar de grupos de hidrocarburos neutros, ácidos, básicos y anfotéricos provenientes de crudos de la faja petrolífera del Orinoco”. Trabajo de ascenso publicado. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela.
19. Carrasquero, A. (1999). “Determinación de los procesos químicos asociados a la contaminación con cadmio en las almendras de cacao. Ocumare de la costa. Estado Aragua”. Tesis doctoral, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado en ciencias del suelo.
20. Casanova, E. (2005). “Introducción a la ciencia del suelo”. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV) de la Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

21. C.D.R.T. (2009). Colectivo para el desarrollo rural de tierras de campo. Disponible: <http://www.cdrtcamos.es/lanatural/compostaje.htm> [Consulta: 2009, marzo 22].
22. Centro de Estudios agropecuarios. (2001). “Lombricultura”. Grupo editorial Iberoamericana de México.
23. Chalarca, Y. (2006). “Interpretación de análisis de suelos”. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. Documento en línea. Disponible: <http://kogi.udea.edu.co/Haciendas/documentos/Analisis%20de%20suelo.pdf> [Consulta: 2009, marzo 22].
24. Chen, Ch. y Taylor, R. T. (1995). *Biotechnol. Bioeng.* 48: 614-624.
25. Chow Pangtay, Susana. (1987). “Petroquímica y Sociedad”. México: Fondo de Cultura Económica, S. A. de C. V 1^{era} edición.
26. Cookson, J. (1995). *Engineering Design and application*, Ed. McGraw-Hill
27. Dávila, A. (1997). “Floculación de los asfaltenos. Parte III”. Tesis de pregrado, Laboratorio FIRP. Universidad de los Andes.
28. 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.
29. Dibble, J. R. y R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl.Env. Microbiol.* **37**:729-739.
30. Ercoli, E; Gálvez, J; Di Paola, M; Cantero, J; Videla, S; Medaura, M. y Bauzá, J. (2001). “Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo”. Facultad de ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. Documento en línea. Disponible: <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp> [Consulta: 2008, septiembre 05].
31. Ercoli, E. (2004). “Tratamientos biológicos”. Documento en línea. Disponible: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/remediacion/tema11.pdf> [Consulta: 2009, marzo 20].
32. Edwards, C.A. y P.J, Bohlen. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*. London, Chapman & Hall. 425 págs.
33. Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D. Y Schroeder, E. (1999). *Principios de Biorrecuperación*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A. España.

34. Fernández, C; Llobregat, María J; Bastidas, Henry. y Sien, Bonnie. (2009). “Influencia de la *Eisenia foetida* y de Sustratos Orgánicos como Agentes Bioestimulantes en la Biodegradación de un Suelo Contaminado con Petróleo Pesado” Revista Internacional “información tecnológica”, Vol. 20, N° 5.
35. Fernández, C; Llobregat, M; Bernys, J; Altomare, V. y Labrador, H. (2008). “Biodegradación de Asfaltos y Resinas por Microorganismos presentes en Suelo Contaminado con Hidrocarburo” Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V., Vol. 23, N° 4, pp. 5–13.
36. Fernández, J., Ruiz, G. y Rodríguez, R. (1998). La Biorremediación como alternativa al tratamiento suelos contaminado, documento en línea: www.hemerodigital.unam.mx/anules/ipn/avnpers/sept98/biorre/biorre.html
37. Ferruzzi, C., (2004). “*Manual de lombricultura*”. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid. España.
38. Fontúrbel, F. y Achá, D. (2003). Sinopsis de los estudios de bioremediación de petróleo realizados en suelos del Lago Titikaka: una alternativa social y ambientalmente viable a los problemas de contaminación por hidrocarburos. pp. 93-100. En: F. Fontúrbel & G. García (eds.). *Propuestas Para Un Desarrollo Sostenible: Lago Titikaka Por Estrategias K*. Publicaciones Integrales, La Paz.
39. García, A (1994). “Contaminación de suelos por metales pesados”. Curso dictado en la UCV. Facultad de Agronomía. Maracay.
40. Glynn, J; Heinke, G. y Escalona, H. (1999). “Ingeniería Ambiental”. Editorial Pearson Educación. Segunda edición. México. Disponible: <http://books.google.co.ve/books?id=ToQmAKnPpzIC&printsec=frontcover> [Consulta: 2009, marzo 20].
41. González C, y Thompson Y, (2007) “Determinación del contenido de cadmio en función del tamaño de las partículas de un suelo de la cuenca del lago de Valencia” Trabajo especial de grado no publicado, Universidad de Carabobo. Valencia-Venezuela.
42. González, M. y Méndez, D. (2003). Desmetalización de asfáltos vía reactivo Fenton.
43. Groenzin, H. y Mullins, O. (1999). *J. Phys. Chem. A.*, 103, 50, 11237.

44. Guiliano, M., Boukir, A., Doumenq, P. y Mille, G. (2000). Supercritical fluid extraction of bal 150 crude oil asphaltenes. *Energy & Fuels* 14, 89-94.
45. Harms, H. y Zehnder, A. J. B. (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 27-33.
46. Himmelblau, D. (1998). "Balances de materia y energía". Cuarta edición. Editorial Prentice Hall. México D.F.
47. Howe-Grant, M. (1996). Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology 4th ed.* Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480.
48. Iañez, E. (2005). "Curso de microbiología general". Documento en línea. Disponible: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm> [Consulta: 2009, marzo 21]
49. Infante, Carmen (2001). "Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de intebios® y biorize®". Asociación Interciencia. Caracas-Venezuela.
50. Infoagro. Introducción a la lombricultura. (2005). Documento en línea. Disponible en: <http://www.infoagro.com/abonos/lombricultura.asp>. [Consulta: 2007, Octubre 01].
51. Jiménez, I. Y. y Bartha, R. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2311-2316.
52. Krebs, L. (2003). "Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono". Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. Documento en línea. Disponible: http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/maestria/2003_1/lkrebs.pdf [Consulta: 2009, marzo 21].
53. Kuehl, R (2001). "Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación". Segunda edición. Editorial Thomson Learning. México.
54. LaGrega, M., Buckingham, P. y Evans, J. 1996. *Gestión de Residuos Tóxicos: Tratamiento, Eliminación y Recuperación de Suelos Vol. II.* McGraw Hill. España.
55. Lajoie, C. A. y P. F. Strom. 1994. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar oil contaminated soil. En *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil.* Wise, D. L. y D. J. Trantolo (Eds). New York: Marcel Dekker. pp. 149-162.
56. Legall, J; Dicoyskiy, L y Valenzuela, Z. (2000). "Manual básico de lombricultura en climas tropicales". Estelí. Nicaragua.

57. León, V. (2003). Seguimiento microbiológico de la biorremediación. Unidad de Biotecnología del Petróleo. Fundación instituto de estudios avanzados (IDEA). Venezuela.
58. Levin, M y Gealt, M (1997). "Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos". Editorial Mc Graw Hill. Primera edición. Madrid.
59. López, D. (2003). "La actividad de la macrofauna (termitas y oligoquetos) en los suelos de sabana". Venezuelos. Revista de la sociedad venezolana de la ciencia del suelo y del instituto de edafología de la Universidad Central de Venezuela. Volumen 11, N° 1-2, pp 15-25. Disponible: http://www.redpav.avepagro.org.ve/venesuel/v11_1-2/VENESUELOS%20%20VOL%2011.pdf [Consulta: 2009, marzo 22].
60. López, Benavides J., Quintero, G., Guevara, L., Jaimes, D., Gutiérrez, S. y García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova - Publicación Científica Vol.4 no. 5.1-116.
61. Madigan M., Martinko, J. y Parker, J. (1999). Brock: Biología de los microorganismos. 8° edición. Prentice Hall, Madrid. : 150-155, 405-408, 465, 523-524, 582-584, 698, 712-713, 774-777.
62. Marczewski, A.W., Szymula, M. (2002) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 208.
63. Marín, M., Aragón, P. y Gómez, C. (2002). "Análisis químico de suelos y aguas: Manual de laboratorio". Editorial illustrated. Universidad Politécnica de Valencia. España. Libro disponible en Web: <http://books.google.co.ve/books?id=2oOINXrtfbkC>. [Consulta: 2008, Agosto].
64. Mata, D. y Pla, Sentis I. (1992): "Caracterización de los problemas de salinidad de suelos y aguas en cuatro zonas de la cuenca del Lago de Maracaibo". *Agronomía Tropical*. Volumen 42, número 1-2, pp 85-96. Documento en línea. Disponible: http://ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/tcat_42.htm [Consulta: 2009, marzo 05].
65. Martínez, Y (2005). "Fraccionamiento de metales pesados en suelos tratados con diferentes dosis de un lodo residual y biodisponibilidad en un cultivo". Tesis doctoral sin publicación. Universidad Central de Venezuela. Facultad de agronomía.

66. Martínez, J. (2007). "Uso del humus de lombriz como un acondicionador orgánico para el proceso de biorremediación de suelos mezclados con rípios de perforación base en aceite mineral impregnado con crudo pesado". Intevep. Los Teques.
67. Meithes, L. (1963). "Handbook of analytical chemistry". Primera edición. Editorial Mc Graw Hill. Estados Unidos de América.
68. Méndez, C. (2005). "Metodología. Diseño y desarrollo del proceso de investigación". McGraw-Hill. Bogotá. Colombia.
69. Menn, F-M., J. P. Easter y G. S. Sayler. 2000. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination. Wiley-VCH. Weinheim. pp. 425-439.
70. Meyer, S. and Steinhart, H. 2000. Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture. Chemosphere 40: 359-367.
71. Messarch, M. B. y Nies, L. (1997). Modification of heterothropic plate counts for assessing the bioremediation potencial of petroleum –contaminated soils. Environ. Technol., 18, 639 -646.
72. Método 3500-Ca (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20TH edition.
73. Método 3500-K B. (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20TH edition.
74. Método 3500-Na B (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20TH edition.
75. Método 3500-Mg (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20TH edition.
76. Método 4500- P E. (1983). Colorimétrico estándar. Fósforo total por espectrofotometría UV-VIS, (método del ácido ascórbico). UNE. Unión Nacional Europea.77047.
77. Montiel, A y Blanco, R (2001) "Métodos de optimización de muestreo en los estudios de las propiedades físicas del suelo". Edafología. Sociedad Venezolana de la ciencia del suelo. Volumen 8, pp 41-49. Documento en línea. Disponible: <http://edafologia.ugr.es/revista/tomo8/art6t8t.htm> [Consulta: 2009, marzo 20].

78. Montes, J. (2001). "Determinación del calor de respiración de frutas por el método de titulación". Revista Amazónica de investigación alimentaria. Vol 2. pp 27-37. UNAP Perú.
79. Monticello, D.L. y Finnerty, W.R. (1985): Microbial desulfuration of fossil fuels: Annals y Reviews of Microbiology
80. Moreno, C; Becerra, A; y Santos, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev. Iberoamericana Micología; 21,103-120. Madrid. España
81. Müller, H. (1987). Hydrocarbons in the freshwater environment: a literature review. Arc. Hydrobiol. Adv. Limnol. 24:1-69
82. Norma Agencia de protección ambiental (EPA) 8020/8100. (1986). – Caracterización de crudos en fracciones SARA.
83. Norma method 3540C. (1996). Soxhlet Extraction. Determinación de HTP.
84. Norma ASTM D2216. (1998). "Determinación del Contenido de Humedad", documento disponible en: www.geotecnia.edu.bo/administrador/manual/Humedad.pdf [Consulta: 2007, Agosto 10].
85. Norma International Standard ISO9439. (ISO1990). Water quality evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds, method by análisis of released carbon dioxide.
86. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Gaceta oficial n° 5.245 extraordinario del 3 de agosto de 1998. Decreto n° 2.635
87. Orozco A. Desechos sólidos 1980,420p.
88. Pardo, J., Perdomo, M. y Benavides, J. (2004). "Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en el suelo contaminados con petróleos". Revista Nova Vol. 2 N° 2. pp. 40-49. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá. Colombia.
89. Pietraru, G. M., Cramb, D. T. (2003) *Langmuir*, 19, 1026.
90. Pineda, Flores G. y Mesta, A. (2001). Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. Revista latinoamericana de microbiología. 43 (3): 143-150

91. Pineda, Flores G. y Mesta, A. (2002). Biodegradación de asfalteno por un consorcio microbiano aislado del petróleo crudo Maya. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 18(2). 67-73. México.
92. Plaza, G. y López R. (2006). “Estudio de la influencia de la salinidad en la biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos”. Universidad Nacional de Salta. Documento en línea. Disponible: <http://www.cricyt.edu.ar/lahv/asades/averma/2006/nuv01.pdf> [Consulta: 2009, febrero 23]
93. Pramer, D. y R. Bartha. 1972. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environ. Lett.* 2:217-224
94. Prince, R. C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19, 217-242.
95. Pulido, H y De la Vara (2004) “Análisis y diseño de experimentos” Primera edición. México. Mc Graw-Hill.
96. Rogel, E. (1997). Theoretical estimation of de solubility parameter distribution of asphaltenes, resins and oils form crude oils and related materials. *Energy Fuels*. 11, 920-925
97. Saval, B. S. (1995). Acciones para le Remediación de Suelos en México. II Mini simposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM
98. Schaefer, Maike. y Filser J. (2005). “Efectos de la Lumbricus terrestris, Allolobophora chlorotica y Eisenia foétida sobre las comunidades dinámicas microbianas en los suelos contaminados por petróleo”. *Applied Soil Ecology*. 36, 53-62
99. Schuldt, M. (2006). “*Lombricultura: Teoría y práctica*”. Editorial Mundi-Prensa Libros. Libro disponible en Web: <http://books.google.co.ve/books?id=-XOQU3F25S8C>. [Consulta: 2008, Agosto].
100. Shirokoff, W.J., Siddiki, N.M. y Ali F.M. (1997). Characterization of the structure of Saudi crude asphaltenes by x- ray diffraction. *Energi Fuels* 11,561-565.
101. Silva, F. T; Azevedo, A. D; Rangel, D. M. y Fontes, A. R. (2008). “Effect of biodegradation on biomarkers released fom asphaltenes”. *Organic geochemistry*. 39, 1249-1257.

102. Steubing, A., Godoy, R. y Alberdi, M. (2002). "Métodos de Ecología Vegetal". Editorial Universitaria. Universidad Nacional de Chile. Chile. Libro disponible en Web: <http://books.google.co.ve/books?id=MJFLjwhXxJ0C>
103. Spiecker, P. M. Gawrys, Keith L y Kilpatrick, Peter. K. (2003). *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 267,178.
104. Speight, J. G. (1980). "The Chemistry and Technology of Petroleum," Marcel Dekker, (pp. 401 – 471), New York.
105. Speight, J. (1984). "Characterization of Heavy Crude Oils and Petroleum Residues," Symposium International, pp. 32 – 41, Éditions Technip.
106. Speight, J.G. (1999) *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 22, 3.
107. STATISTIX 8.0 FOR WINDOWS (2003). Analytical software. Tallahassee, Florida. Estados Unidos de América.
108. Sutherland, J. B. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind Microbiol.*, 9, 53-62.
109. Todar, K. (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad del departamento de Wisconsin-Madison de la bacteriología.
110. Thompson, L. y Troeh, F. (1988). "Los suelos y su fertilidad". Cuarta Edición. Editorial Reverté. Disponible en: <http://books.google.co.ve/books?id=AegjDhEIVAQC> [Consulta: 2008, octubre 25].
111. Thompson, Y y González C, (2007) "Determinación del contenido de cadmio en función del tamaño de las partículas de un suelo de la cuenca del lago de valencia" Trabajo especial de grado no publicado, Universidad de Carabobo. Valencia-Venezuela.
112. Yang, *et al.* (2001). *Encyclopedic Handbook of Emulsion Tecnology*, Marcel Dekker, Inc, New York. Cap. 23.
113. Yen, T. y Chilingarian, G. (1994). *Development in petroleum science: 40 A*, Elsevier, The Netherlands.

114. Yuhong, Liao; Ansong, Geng. y Haiping, Huang. (2009). influencia de la biodegradación de resinas y asfalto en Liaohe Basin. *Organic Geochemistry*. 40, 312–320.
115. Volkering, F., Breure, A. M., van Andel, J. G. y Rulkens, W. H. (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1699-1705.
116. Volké, T. y Velasco, J. (2004). “Tecnologías de remediación para suelos contaminados”. Instituto Nacional de Ecología. Libro disponible en Web: <http://books.google.co.ve/books?id=mj9rVEScHCcC>. [Consulta: 2008, Agosto].
117. Volké, T. y Velasco, J. (2005). El composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, documento en línea disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/381/volke.html>[Consulta: 2007, Agosto 15].
118. Viñas, M. (2005). “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica”. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. Documento en línea. Disponible: www.tesisenxarxa.net/TDX-0920105-085623/index.html [Consulta: 2008, septiembre 26].

APENDICE A

TABLAS DE DATOS Y RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS
CRUDO AYACUCHO

Tabla A.1

Variables necesarias para la determinación del porcentaje de asfaltenos presentes en el crudo Ayacucho

Masa del crudo ($M_C \pm 0,0002$)kg	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Masa de asfaltenos en la muestra ($M_A \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos del crudo (%As ± 3) %
0,1045	5,1601	22,2239	17,0638	16

Tabla A.2

Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos saturados presentes en el crudo Ayacucho

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Saturados ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de saturados (P%Sa $\pm 0,2$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de saturados	
1,1800	60,1352	60,2255	0,0903	6,4
1,2400	60,5598	60,6569	0,0971	
1,1800	60,2236	60,3132	0,0896	

Tabla A.3

VARIABLES NECESARIAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COMPUESTOS AROMÁTICOS PRESENTES EN EL CRUDO AYACUCHO

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Aromáticos ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de aromáticos ($P\% Ar \pm 0,2$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de aromáticos	
1,1800	58,9865	59,6698	0,6833	48,5
1,2400	59,0235	59,7423	0,7188	
1,1800	58,6598	59,3459	0,6861	

Tabla A.4

VARIABLES NECESARIAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RESINAS PRESENTES EN EL CRUDO AYACUCHO

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Resinas ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de resinas ($P\% Re \pm 3$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de resinas	
1,1800	50,5986	51,0050	0,4064	29
1,2400	50,9875	51,4119	0,4244	
1,1800	51,0356	51,4399	0,4043	

CRUDO GUAFITA

Tabla A.5

VARIABLES NECESARIAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ASFALTENOS PRESENTES EN EL CRUDO GUAFITA

Masa del crudo ($M_C \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Masa de asfaltenos en la muestra ($M_A \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos del crudo (%As $\pm 0,002$) %
87,8290	1,2230	4,9270	3,7040	4,217

Tabla A.6

VARIABLES NECESARIAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COMPUESTOS SATURADOS PRESENTES EN EL CRUDO GUAFITA

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Saturados ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de saturados (P%Sa $\pm 0,03$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de saturados	
1,0001	115,9630	116,5962	0,6332	60,64
1,0023	115,9630	116,5932	0,6302	
1,0120	115,9630	116,5945	0,6315	

Tabla A.7**Variables necesarias para la determinación del porcentaje de compuestos aromáticos presentes en el crudo Guafita**

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Aromáticos ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de aromáticos ($P\% Ar \pm 0,03$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de aromáticos	
1,0001	115,9630	116,1721	0,2091	20,03
1,0023	115,9630	116,1734	0,2104	
1,0120	115,9630	116,1801	0,2171	

Tabla A.8**Variables necesarias para la determinación del porcentaje de resinas presentes en el crudo Guafita**

Masa de la muestra de maltenos ($M_M \pm 0,0001$) g	Resinas ($M_{SAT} \pm 0,0001$) g			Promedio de resinas ($P\% Re \pm 0,1$) %
	Balón vacío	Balón lleno	Masa de resinas	
1,0001	115,9630	116,1250	0,1620	15,1
1,0023	115,9630	116,1259	0,1629	
1,0120	115,9630	116,1234	0,1604	

ENSAYO DE FACTIBILIDAD

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A.9

Determinación de la mineralización de asfalteno ayacucho en el ensayo de factibilidad

Tiempo de muestreo (día)	Asfalteno Ayacucho-bacteria-medio mínimo ($C_B \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC/mL	Asfalteno Ayacucho-bacteria-medio mínimo ($CO_2 \pm 0,1$) μ mol	Asfalteno Ayacucho-bacteria-medio mínimo ($pH \pm 0,05$) mV	Asfalteno Ayacucho-medio mínimo ($C_B \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC/mL	Asfalteno Ayacucho – medio mínimo ($CO_2 \pm 0,1$) μ mol	Asfalteno Ayacucho-medio mínimo ($pH \pm 0,05$) mV
0	3,84E+08	0	7,10	1,00E+00	0	7,00
1	-----	310,5	-----	-----	204,7	-----
2	1,45E+09	388,1	7,30	3,88E+06	289,5	7,00
3	-----	393,3	-----	-----	300,3	-----
4	1,18E+06	362,3	7,50	1,80E+05	337,9	7,10
6	3,76E+06	-----	7,50	2,50E+05	-----	7,10
7	-----	445,1	-----	-----	350,0	-----
8	6,50E+05	310,5	7,35	8,64E+04	280,0	6,90
9	-----	341,6	-----	-----	285,0	-----
10	-----	408,8	-----	-----	222,5	-----
11	1,30E+06	435,0	7,50	1,27E+05	331,2	7,10
14	3,80E+05	420,4	7,60	5,20E+04	303,7	7,20

Tabla A.10 Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalto Ayacucho empleando FTIR

Día	Tratamiento	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
0	Sin tratar	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		~ 1735	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1163	C-O	Tensión
		813,90	Aromáticos	Deformación angular
14	Asfalto Ayacucho-bacteria-medio mínimo	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1037	R-SO-R	Deformación angular
		813,90	Aromáticos	Deformación Angular

Tabla A.10 (continuación)

Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalto Ayacucho empleando FTIR

Día	Tratamiento	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
14	Asfalto Ayacucho-medio mínimo	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1037	R-SO-R	Deformación angular
		813,90	Aromáticos	Deformación Angular

ASFALTENO GUAFITA

Tabla A.11

Determinación de la mineralización de asfalteno Guafita en el ensayo de factibilidad

Tiempo de muestreo (día)	Asfalteno Guafita-bacteria-medio mínimo ($C_B \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC/mL	Asfalteno Guafita-bacteria-medio mínimo ($CO_2 \pm 0,1$) μ mol	Asfalteno Guafita-bacteria-medio mínimo (pH $\pm 0,05$) mV	Asfalteno Guafita-medio mínimo ($C_B \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC//mL	Asfalteno Guafita – medio mínimo ($CO_2 \pm 0,1$) μ mol	Asfalteno Guafita-medio mínimo (pH $\pm 0,05$) mV
0	3,00E+07	0	7,00	1,00E+00	0	7,00
1	-----	301,2	-----	-----	204,3	-----
2	1,63E+08	390,3	7,40	1,49E+06	230,1	7,10
5	1,24E+06	329,5	7,50	4,96E+05	300,3	7,20
6	-----	296,0	-----	-----	200,9	-----
7	7,40E+05	311,5	7,30	3,71E+05	246,0	6,90
8	-----	330	-----	-----	280,0	-----
9	2,40E+05	280,5	7,10	1,01E+05	260,0	7,00
12	1,13E+06	425,4	7,20	1,10E+05	222,5	6,90
14	5,70E+05	399,5	7,20	3,30E+04	331,2	6,90

Tabla A.12

Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalto Guafita empleando FTIR

Día	Tratamiento	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
0	Sin tratar	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1740	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1037	R-SO-R	Deformación angular
14	Asfalto Guafita-bacteria-medio mínimo	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1733	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular

Tabla A.12 (continuación)

Identificados de los grupos funcionales al inicio y final del tratamiento en el ensayo de factibilidad del asfalto Guafita empleando FTIR

Día	Tratamiento	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
14	Asfalto Guafita-medio mínimo	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1742	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular

ENCALADO DEL SUELO Y POTENCIAL DE ACIDEZ

Tabla A.13

Encalado del suelo y control de pH de la muestra total de suelo para su neutralización

Tratamiento	Masa de suelo ($m_s \pm 0,0001$) Kg	Masa de carbonato de calcio ($m_{CaCO_3} \pm 0,03$) g	Volumen de agua o medio mínimo ($V_{sol} \pm 10$) mL	Día	Potencial de acidez ($pH \pm 0,05$) mV	Potencial de acidez ($pH \pm 0,05$) mV	Potencial de acidez ($pH \pm 0,05$) mV	Potencial promedio de acidez ($pH \pm 0,05$) mV
BACTERIAS	4,5000	13,59	980 medio mínimo	1	6,85	6,90	6,85	6,87
				2	6,90	7,00	7,00	6,97
				3	7,00	7,00	7,00	7,00
				4	7,00	7,05	7,00	7,02
				5	7,00	7,00	7,05	7,02
LOMBRICES	4,5000	13,59	980 agua	1	6,90	6,90	6,90	6,90
				2	6,90	7,00	7,05	6,98
				3	7,00	7,00	7,00	7,00
				4	7,00	7,00	7,05	7,02
				5	7,00	7,00	7,00	7,00

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Tabla A 14: Porcentajes de los macroelementos presentes en los microcosmo

Macroelementos	Suelo virgen	Estiércol Equino	Medio mínimo	Carbonato de calcio	Microcosmo Guafita <i>Eisenia foétida</i>	Microcosmo Guafita Bacterias	Microcosmo Ayacucho Bacterias	Microcosmo Ayacucho <i>Eisenia foétida</i>
Fósforo (P±0,0001)	0,0032	0,3056	0,0042	---	0,0800	0,0100	0,0100	0,0800
Calcio (Ca±0,0001)	0,0920	---	0,0003	0,1200	0,2100	0,2100	0,2100	0,2100
Potasio (K±0,0001)	0,0168	---	0,0029	---	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200
Magnesio (Mg±0,0001)	0,0136	---	0,0001	---	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
Nitrógeno (N±0,001)	0,145	1,690	0,000	---	0,550	0,145	0,145	0,550
Carbono (C±0,4)	0,6	30,8	---	---	9,1	1,5	1,8	9,3
Sodio (Na±0,0001)	0,0033	---	0,0014	---	0,0033	0,0235	0,0235	0,0033
Materia orgánica (MO±0,01)	0,95	52,37	---	---	14,44	0,97	0,99	14,48
Relación (C/N±0,01)	3,85	18,23	---	---	16,63	10,00	12,14	17,01
Relación (C/P±0,01)	174,38	100,81	---	---	111,10	207,14	251,43	113,63

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A.15

Seguimiento del potencial de acidez en los microcosmos durante el muestreo crudo Ayacucho

Microcosmo	Potencial de acidez (pH \pm 0,05) mV							
	0	4	8	12	16	19	22	49
Hpatrón-bact	6,80	7,00	7,00	6,98	6,90	6,90	6,90	6,85
Hbact-1	6,80	7,30	7,20	7,20	7,00	6,85	6,80	6,80
Hbact-2	6,80	7,30	7,20	7,20	7,00	6,85	6,80	6,85
Hbact-3	6,95	7,29	7,20	7,20	7,00	6,85	6,80	6,85
Hpatrón-lomb	6,95	7,10	7,10	6,90	6,90	6,85	6,80	6,82
Hlomb-1	6,95	7,21	7,20	7,18	7,10	6,90	6,90	6,90
Hlomb-2	6,95	7,20	7,20	7,20	7,10	6,90	6,90	6,90
Hlomb-3	6,80	7,20	7,20	7,20	7,10	6,95	6,90	6,90

ASFALTENO GUAFITA

Tabla A.16
Seguimiento del potencial de acidez en los microcosmos durante el muestreo crudo Guafita

Microcosmo	Potencial de acidez (pH ± 0,05) mV							
	0	4	8	12	16	19	22	49
Gpatrón-lomb	6,98	7,00	7,02	7,02	7,02	7,00	6,97	6,95
Glomb-1	7,02	7,03	6,98	7,02	7,03	7,03	7,00	7,00
Glomb-2	7,00	7,03	6,95	7,02	7,02	6,98	7,02	7,05
Glomb-3	7,00	7,02	7,00	7,03	7,00	7,02	7,02	7,05
Gpatrón-bact	7,03	6,98	7,03	7,00	7,00	7,03	7,02	7,00
Gbact-1	7,00	7,02	7,00	7,05	7,00	7,03	6,98	7,00
Gbact-2	7,02	7,00	7,02	7,00	7,02	7,03	7,02	7,02
Gbact-3	6,98	7,00	6,98	7,03	7,02	7,02	7,02	7,00

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

ASFALTENO GUAFITA

Tabla A.17

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cero

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	43,338	39,953	29,4
Glomb 1,2,3	35,579	50,582	46,254	40,5
Gpatrón-bact	36,567	51,957	47,965	35,0
Gbact 1,2,3	36,915	51,918	47,932	36,2

Tabla A.18

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuatro

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	43,438	39,650	33,8
Glomb 1,2,3	35,579	50,582	46,290	40,1
Gpatrón-bact	36,567	51,570	47,610	35,9
Gbact 1,2,3	36,915	51,918	47,840	37,3

Tabla A.19

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día ocho

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía (M _{CPV} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo (M _{CPSH} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo seco (M _{CPSS} ± 0,001)g	Humedad del suelo (H _S ± 0,2)%
Gpatrón-lomb	28,435	43,890	40,014	33,5
Glomb 1,2,3	35,579	50,543	46,651	35,2
Gpatrón-bact	36,567	52,546	48,430	34,7
Gbact 1,2,3	36,915	51,997	48,243	33,1

Tabla A.20

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día doce

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía (M _{CPV} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo (M _{CPSH} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo seco (M _{CPSS} ± 0,001)g	Humedad del suelo (H _S ± 0,2)%
Gpatrón-lomb	28,435	43,834	40,343	29,3
Glomb 1,2,3	35,579	51,261	45,467	58,6
Gpatrón-bact	36,567	52,143	48,356	32,1
Gbact 1,2,3	36,915	50,434	46,567	40,1

Tabla A.21

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día dieciséis

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	44,878	40,642	34,7
Glomb 1,2,3	35,579	50,612	45,651	49,4
Gpatrón-bact	36,567	50,543	46,982	34,2
Gbact 1,2,3	36,915	52,805	48,452	37,7

Tabla A.22

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día diecinueve

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	42,500	38,402	37,4
Glomb 1,2,3	35,579	51,983	47,349	39,4
Gpatrón-bact	36,567	49,768	46,372	34,6
Gbact 1,2,3	36,915	51,943	47,843	37,5

Tabla A.23

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día veintidós

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	43,432	39,532	35,1
Glomb 1,2,3	35,579	50,517	46,494	36,9
Gpatrón-bact	36,567	51,689	47,723	35,6
Gbact 1,2,3	36,915	51,956	48,063	34,9

Tabla A.24

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuarenta y nueve

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Gpatrón-lomb	28,435	44,390	40,642	30,7
Glomb 1,2,3	35,579	51,820	46,661	46,6
Gpatrón-bact	36,567	49,668	46,112	37,3
Gbact 1,2,3	36,915	51,743	47,359	42,0

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A.25

Determinación de la humedad del suelo en los microcosmos el día cero

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía (M_{CPV} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo (M_{CPSH} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo seco (M_{CPSS} ± 0,001)g	Humedad del suelo (H_S ± 0,2)%
Hpatrón-bact	33,265	53,428	49,328	25,5
Hbact 1,2,3	34,434	54,428	50,410	25,2
Hpatrón-lomb	31,742	56,811	51,256	28,5
Hlomb 1,2,3	37,327	57,383	53,050	27,6

Tabla A.26

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuatro

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía (M_{CPV} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo (M_{CPSH} ± 0,001)g	Masa de la cápsula con el suelo seco (M_{CPSS} ± 0,001)g	Humedad del suelo (H_S ± 0,2)%
Hpatrón-bact	61,665	70,966	68,866	29,2
Hbact 1,2,3	31,475	42,567	39,411	39,8
Hpatrón-lomb	62,036	71,980	69,315	36,6
Hlomb 1,2,3	43,809	50,879	49,005	36,1

Tabla A.27

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día ocho

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_S \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	40,547	46,930	45,254	35,6
Hbact 1,2,3	35,673	39,804	38,412	50,8
Hpatrón-lomb	39,289	43,622	42,436	37,7
Hlomb 1,2,3	36,733	39,390	38,430	56,6

Tabla A.28

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día doce

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_S \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	35,629	45,600	43,202	31,7
Hbact 1,2,3	31,485	42,580	39,345	41,2
Hpatrón-lomb	36,509	46,830	44,276	32,9
Hlomb 1,2,3	30,502	41,823	37,890	53,2

Tabla A.29

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día dieciséis

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_S \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	43,810	53,863	51,894	24,4
Hbact 1,2,3	30,499	41,043	38,890	25,7
Hpatrón-lomb	32,314	42,575	40,567	24,3
Hlomb 1,2,3	31,521	42,690	37,969	73,2

Tabla A.30

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día diecinueve

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_S \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	39,895	43,360	42,302	43,9
Hbact 1,2,3	32,675	36,580	35,345	46,3
Hpatrón-lomb	31,439	38,730	37,276	50,4
Hlomb 1,2,3	40,632	47,624	44,790	68,2

Tabla A.31

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día veintidós

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	50,496	64,335	60,955	32,3
Hbact 1,2,3	32,313	42,581	39,703	38,9
Hpatrón-lomb	31,478	42,436	39,703	33,2
Hlomb 1,2,3	43,811	53,642	49,258	80,5

Tabla A.32

Determinación de la humedad del suelo de los microcosmos el día cuarenta y nueve

Microcosmo	Masa de la cápsula vacía ($M_{CPV} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo húmedo ($M_{CPSH} \pm 0,001$)g	Masa de la cápsula con el suelo seco ($M_{CPSS} \pm 0,001$)g	Humedad del suelo ($H_s \pm 0,2$)%
Hpatrón-bact	32,474	39,398	37,239	45,3
Hbact 1,2,3	26,928	31,659	29,865	61,1
Hpatrón-lomb	29,301	35,361	33,498	45,9
Hlomb 1,2,3	31,275	38,971	36,712	41,6

EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO Y LA FRACCIÓN BIODEGRADA A TRAVÉS DEL TIEMPO

ASFALTENO GUAFITA

Tabla A.33

Carga bacteriana en los microcosmos de tratamiento durante el muestreo

Días	Unidades formadoras de colonias ($C_B \pm 0,01$) $\times 10^n$ UFC/g			
	Gpatrón-bact	Gbact-1,2,3	Gpatrón-lomb	Glomb-1,2,3
0	1,00E+02	3,50E+07	1,00E+02	1,80E+06
2	6,00E+06	2,40E+07	3,80E+04	1,00E+07
4	1,20E+07	7,50E+06	6,00E+05	1,90E+07
6	6,41E+06	5,70E+06	4,60E+05	8,40E+05
8	8,10E+05	7,00E+06	5,80E+05	2,70E+05
11	4,60E+05	2,50E+06	4,50E+05	1,00E+06
13	1,10E+05	3,00E+06	1,20E+06	1,30E+06
15	1,06E+06	2,40E+06	1,65E+05	3,80E+05
18	2,00E+06	1,80E+06	2,10E+06	5,60E+05
20	1,43E+06	6,80E+05	1,50E+06	1,40E+06
22	8,50E+05	1,70E+06	9,00E+05	6,80E+06
49	9,10E+03	8,50E+05	7,00E+02	1,40E+07

Tabla A.34

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado en el día cero inicio

Microcosmo	Masa de suelo ($M_S \pm 0,01$) g	Masa de asfaltenos ($M_A \pm 0,001$) g	Porcentaje de asfaltenos ($\%As \pm 0,002$) %	Porcentaje de degradación ($\%D \pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	501,70	5,202	1,026	0,0
Glomb 1	501,60	5,201	1,026	0,0
Glomb 2	500,10	5,207	1,030	
Glomb 3	500,60	5,200	1,028	
Gpatrón-bact	500,00	5,207	1,031	0,0
Gbact 1	500,20	5,202	1,029	0,0
Gbact 2	501,60	5,203	1,027	
Gbact 3	502,40	5,202	1,025	

Tabla A.35

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuatro y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,027	5,074	5,125	1,015	1,7
Glomb 1	5,012	5,109	5,158	0,978	3,7
Glomb 2	5,047	4,945	4,992	0,931	
Glomb 3	5,076	4,962	5,014	1,063	
Gpatrón-bact	5,011	5,119	5,170	1,018	1,3
Gbact 1	5,078	5,100	5,152	1,024	4,0
Gbact 2	5,061	1,585	1,635	0,989	
Gbact 3	5,084	5,248	5,296	0,944	

Tabla A.36

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día ocho y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,045	1,576	1,626	0,991	3,4
Glomb 1	5,017	5,283	5,331	0,951	15,9
Glomb 2	5,050	5,200	5,240	0,792	
Glomb 3	5,006	5,241	5,283	0,839	
Gpatrón-bact	5,080	5,502	5,552	0,984	4,6
Gbact 1	5,020	5,023	5,052	0,578	48,3
Gbact 2	5,009	5,230	5,257	0,539	
Gbact 3	5,044	5,110	5,134	0,476	

Tabla A.37

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día doce y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,076	5,177	5,226	0,965	5,9
Glomb 1	5,043	1,578	1,607	0,575	47,4
Glomb 2	5,090	5,752	5,778	0,511	
Glomb 3	5,012	5,715	5,742	0,539	
Gpatrón-bact	5,044	1,550	1,597	0,932	9,6
Gbact 1	5,039	1,592	1,610	0,357	61,2
Gbact 2	5,018	1,595	1,616	0,399	
Gbact 3	5,027	1,569	1,591	0,439	

Tabla A.38

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día dieciséis y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,000	1,293	1,342	0,980	4,5
Glomb 1	5,030	1,372	1,388	0,318	58,7
Glomb 2	5,016	1,333	1,357	0,478	
Glomb 3	5,081	1,256	1,281	0,492	
Gpatrón-bact	5,018	1,353	1,400	0,937	9,1
Gbact 1	5,025	1,454	1,474	0,398	59,3
Gbact 2	5,034	1,310	1,332	0,437	
Gbact 3	5,014	1,267	1,288	0,419	

Tabla A.39

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día diecinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,032	1,260	1,305	0,894	12,9
Glomb 1	5,036	1,359	1,373	0,278	64,7
Glomb 2	5,055	1,293	1,313	0,396	
Glomb 3	5,064	1,258	1,279	0,415	
Gpatrón-bact	5,018	1,300	1,346	0,917	11,1
Gbact 1	5,015	1,274	1,293	0,379	61,4
Gbact 2	5,058	1,280	1,300	0,395	
Gbact 3	5,068	1,292	1,313	0,414	

Tabla A.40

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día veintidós y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,041	1,349	1,393	0,873	14,9
Glomb 1	5,029	1,388	1,400	0,239	73,6
Glomb 2	5,075	1,283	1,298	0,296	
Glomb 3	5,010	1,369	1,383	0,279	
Gpatrón-bact	5,053	1,298	1,343	0,891	13,6
Gbact 1	5,026	1,339	1,358	0,378	65,2
Gbact 2	5,075	1,356	1,374	0,355	
Gbact 3	5,006	1,285	1,302	0,340	

Tabla A.41

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuarentinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Gpatrón-lomb	5,123	1,252	1,294	0,813	20,8
Glomb 1	5,007	1,291	1,300	0,179	83,3
Glomb 2	5,014	1,292	1,301	0,179	
Glomb 3	5,013	1,306	1,314	0,159	
Gpatrón-bact	5,004	1,294	1,338	0,872	15,4
Gbact 1	5,092	1,232	1,244	0,235	76,6
Gbact 2	5,043	1,286	1,299	0,257	
Gbact 3	5,234	1,342	1,354	0,229	

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A.42
Carga bacteriana en los microcosmos de tratamiento durante el muestreo

Días	Unidades formadoras de colonias (C_B ± 0,01) × 10ⁿ UFC/g			
	Hpatrón-bact	Hbact-1,2,3	Hpatrón-lomb	Hlomb-1,2,3
0	1,00E+02	2,50E+07	1,00E+02	1,00E+07
2	1,60E+07	3,20E+07	3,50E+06	1,30E+07
4	3,20E+07	1,30E+07	7,00E+06	5,20E+06
6	1,63E+07	7,00E+06	3,91E+06	2,30E+06
8	5,90E+05	4,20E+06	8,20E+05	5,50E+06
11	1,65E+06	3,00E+06	8,95E+05	7,40E+05
13	8,00E+05	4,20E+06	9,70E+05	4,00E+05
15	1,65E+06	1,20E+06	1,79E+06	7,10E+05
18	2,50E+06	2,70E+06	2,60E+06	7,60E+05
20	1,35E+06	3,90E+06	1,52E+06	6,80E+05
22	2,00E+05	7,40E+07	4,40E+05	4,70E+07
49	4,00E+02	1,90E+06	5,7E+03	2,9E+05

Tabla A.43

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado en el día cero al inicio

Microcosmo	Masa de suelo ($M_S \pm 0,01$) g	Masa de asfaltenos ($M_A \pm 0,001$) g	Porcentaje de asfaltenos ($\%As \pm 0,002$) %	Porcentaje de degradación ($\%D \pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	533,60	7,601	1,404	0,0
Hbact 1	500,60	7,547	1,485	0,0
Hbact 2	500,60	7,201	1,418	
Hbact 3	500,40	7,203	1,419	
Hpatrón-lomb	534,60	7,857	1,448	0,0
Hlomb 1	501,50	7,203	1,416	0,0
Hlomb 2	500,90	7,206	1,418	
Hlomb 3	500,60	7,206	1,419	

Tabla A.44

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuatro y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,193	1,2980	1,3670	1,329	5,4
Hbact 1	5,073	4,9616	5,0210	1,171	24,2
Hbact 2	5,102	5,0778	5,1330	1,082	
Hbact 3	5,074	5,2070	5,2590	1,025	
Hpatrón-lomb	5,662	1,2870	1,3650	1,378	4,9
Hlomb 1	5,086	5,1840	5,2510	1,317	10,2
Hlomb 2	5,052	5,0020	5,0640	1,227	
Hlomb 3	5,022	1,5810	1,6450	1,274	

Tabla A.45

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día ocho y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,0500	69,266	69,327	1,208	14,0
Hbact 1	5,1252	32,0990	32,1435	0,868	30,1
Hbact 2	5,1252	1,5700	1,6350	1,268	
Hbact 3	5,0825	31,3596	31,4041	0,876	
Hpatrón-lomb	5,0910	70,983	71,043	1,179	18,6
Hlomb 1	5,5137	1,6050	1,6480	0,780	46,7
Hlomb 2	5,0296	30,9891	31,0466	1,143	
Hlomb 3	5,1773	30,8878	30,9055	1,342	

Tabla A.46

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día doce y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,2060	1,2520	1,3210	1,325	5,6
Hbact 1	5,0780	30,8096	30,8352	0,504	58,8
Hbact 2	5,1330	31,3616	31,3961	0,672	
Hbact 3	5,0240	31,6546	31,6878	0,661	
Hpatrón-lomb	5,2390	1,2380	1,3100	1,374	5,1
Hlomb 1	5,0150	31,8057	31,8312	0,508	64,5
Hlomb 2	5,1250	31,3128	31,3383	0,498	
Hlomb 3	5,0730	30,8663	30,8918	0,503	

Tabla A.47

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día dieciséis y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,0350	1,2530	1,3200	1,331	5,3
Hbact 1	5,0580	1,1973	1,2260	0,567	59,2
Hbact 2	5,0910	1,2186	1,2498	0,613	
Hbact 3	5,1120	1,3333	1,3630	0,581	
Hpatrón-lomb	5,1260	1,2330	1,3030	1,366	5,7
Hlomb 1	5,2360	1,3369	1,3690	0,613	65,5
Hlomb 2	5,0940	1,3504	1,3715	0,414	
Hlomb 3	5,0770	1,2902	1,3126	0,441	

Tabla A.48

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día diecinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,146	1,2990	1,3670	1,321	5,9
Hbact 1	5,010	1,1803	1,2063	0,519	59,7
Hbact 2	5,076	1,2838	1,3125	0,565	
Hbact 3	5,007	70,4640	70,4967	0,653	
Hpatrón-lomb	5,210	1,2920	1,3640	1,382	4,6
Hlomb 1	5,039	71,8112	71,8304	0,381	66,6
Hlomb 2	5,057	70,0747	70,0966	0,433	
Hlomb 3	5,032	1,2367	1,2673	0,608	

Tabla A.49

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día veintidós y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,0100	1,2990	1,3670	1,357	3,4
Hbact 1	5,1122	1,3187	1,3523	0,658	54,3
Hbact 2	5,9670	1,2890	1,3276	0,648	
Hbact 3	5,6180	1,3221	1,3585	0,649	
Hpatrón-lomb	5,0140	1,2920	1,3640	1,436	11,9
Hlomb 1	5,3680	1,3409	1,9528	0,114	91,9
Hlomb 2	5,3570	1,3180	1,9329	0,115	
Hlomb 3	5,3790	1,3706	1,9886	0,115	

Tabla A.50

Determinación del porcentaje de asfaltenos en el suelo contaminado al día cuarentinueve y promedio del porcentaje de degradación respecto al día cero

Microcosmo	Masa de muestra de suelo ($M_{MS} \pm 0,0001$)g	Masa del papel de filtro vacío ($M_{PFV} \pm 0,0001$)g	Masa del papel con asfaltenos ($M_{PFA} \pm 0,0001$)g	Porcentaje de asfaltenos (%As $\pm 0,002$)%	Porcentaje de degradación (%D $\pm 0,2$) %
Hpatrón-bact	5,0990	1,2990	1,3670	1,334	5,1
Hbact 1	5,1122	1,3017	1,3340	0,6318	56,1
Hbact 2	5,9670	1,2980	1,3357	0,6320	
Hbact 3	5,6180	1,3091	1,3446	0,6320	
Hpatrón-lomb	5,1240	1,2920	1,3640	7,512	2,9
Hlomb 1	5,0297	1,2891	1,2948	0,113	92,1
Hlomb 2	5,3234	1,2564	1,2623	0,111	
Hlomb 3	5,5827	1,1289	1,1352	0,113	

IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES AL FINAL DEL TRATAMIENTO PARA LOS DIFERENTES ASFALTENO

Tabla A. 51

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Guafita al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
0	---	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1740	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
49	Gpatrón-lomb	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		867,91- 810,05 - 754,12	Aromáticos	Deformación Angular

Tabla A. 51 (continuación)

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Guafita al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
49	Glomb	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		862,12	Aromáticos	Deformación Angular
49	Gpatrón-bact	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		871,76 - 811,98 - 752,19	Aromáticos	Deformación Angular

Tabla A. 51 (continuación)

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Guafita al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
49	Gbact	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		869,84	Aromáticos	Deformación Angular

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A. 52

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Ayacucho al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
0	---	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		~ 1735	C=O	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1163	C-O	Tensión
		813,90	Aromáticos	Deformación angular
49	Hpatrón-lomb	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		815,83	Aromáticos	Deformación Angular

Tabla A. 52 (continuación)

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Ayacucho al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
49	Hlomb	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		817,76	Aromáticos	Deformación Angular
49	Hpatrón-bact	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		864,05	Aromáticos	Deformación Angular

Tabla A. 52 (continuación)

Grupos funcionales identificados en los asfaltenos Ayacucho al inicio y final del tratamiento, de acuerdo a la longitud de onda empleando FTIR

Día	Microcosmo	Longitud de onda	Grupo Funcional	Tipo de vibración
49	Hbact	3600-3200	OH o NH	Tensión
		3000-2800	C-H alifáticos Csp ³ -H,	Tensión
		1690-1500	Carbonos aromáticos C=C	Tensión
		1375-1365	Alcanos δCH ₃	Deformación angular
		1460-1440	δCH ₃ -CH ₂	Deformación angular
		1060-1015	R-SO-R	Deformación angular
		808,12	Aromáticos	Deformación Angular

DETERMINACIÓN DE CO₂

ASFALTENO GUAFITA

Tabla A.53

Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de co₂ producido en los microcosmos

Día	Volumen de ácido clorhídrico (V_{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico (V_{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico Suelo virgen (V_P ± 0,05)mL
	Gpatrón- lomb	Glomb1	Glomb 2	Glomb 3	Gpatrón-bact	Gbact 1	Gbact 2	Gbact 3	Patrón P
1	10,55	10,35	10,40	10,40	10,40	10,20	10,30	10,20	10,60
2	10,50	10,40	10,25	10,50	10,50	10,25	10,45	10,45	10,60
4	10,45	10,40	10,40	10,30	10,35	10,20	10,30	10,20	10,60
5	10,50	10,30	10,30	10,30	10,40	10,35	10,35	10,35	10,60
6	10,50	10,35	10,25	10,25	10,50	10,35	10,30	10,30	10,60
7	10,40	10,40	10,30	10,30	10,35	10,35	10,35	10,35	10,60
8	10,40	10,20	10,25	10,15	10,35	10,35	10,35	10,25	10,60
11	10,50	10,30	10,40	10,40	10,60	10,30	10,45	10,50	10,60
12	10,45	10,25	10,30	10,25	10,45	10,30	10,40	10,35	10,60

Tabla A. 53 (continuación)

Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de CO₂ producido en los microcosmos

Día	Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico Suelo virgen (V _P ± 0,05)mL
	Gpatrón-lomb	Glomb1	Glomb 2	Glomb 3	Gpatrón-bact	Gbact 1	Gbact 2	Gbact 3	P
13	10,55	10,35	10,40	10,40	10,55	10,35	10,30	10,30	10,60
14	10,50	10,40	10,25	10,50	10,55	10,35	10,35	10,30	10,60
15	10,50	10,40	10,40	10,30	10,50	10,30	10,35	10,35	10,60
16	10,45	10,35	10,35	10,35	10,40	10,35	10,30	10,35	10,60
18	10,45	10,35	10,35	10,40	10,40	10,35	10,35	10,35	10,60
19	10,45	10,40	10,35	10,35	10,40	10,35	10,35	10,35	10,60
20	10,45	10,35	10,40	10,40	10,45	10,35	10,30	10,35	10,60
21	10,45	10,30	10,40	10,40	10,45	10,30	10,35	10,40	10,60
22	10,45	10,40	10,35	10,35	10,45	10,30	10,35	10,35	10,60
49	10,5	10,35	10,45	10,45	10,40	10,35	10,45	10,45	10,60

Diámetro de la cápsula pequeña: (6,60± 0,05) cm, Diámetro de la cápsula grande: (9,50± 0,05) cm, Volumen de hidróxido de potasio (10,00 ± 0,03) mL Concentración de HCl de los días (1-16): (0,1024± 0,0001) N, Volumen de cloruro de bario (2,00± 0,01) mL, Concentración de HCl de los días (17-49): (0,1034± 0,0001) N

Tabla A..54
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de *Eisenia foétida*

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen lombrices (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Gpatrón-lomb	Glomb1	Glomb 2	Glomb 3	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,003	0,015	0,012	0,012	0,013
2	0,006	0,012	0,022	0,006	0,013
4	0,006	0,012	0,012	0,018	0,014
5	0,009	0,015	0,015	0,015	0,015
6	0,009	0,015	0,015	0,012	0,014
7	0,009	0,012	0,015	0,015	0,014
8	0,009	0,015	0,012	0,012	0,013
11	0,009	0,018	0,012	0,012	0,014
12	0,009	0,012	0,015	0,015	0,014

Tabla A..54 (continuación)
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de *Eisenia foétida*

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen lombrices (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Gpatrón-lomb	Glomb1	Glomb 2	Glomb 3	
13	0,012	0,018	0,015	0,012	0,015
14	0,012	0,015	0,012	0,012	0,013
15	0,012	0,025	0,006	0,012	0,014
16	0,012	0,016	0,009	0,016	0,013
18	0,012	0,016	0,012	0,012	0,013
19	0,012	0,012	0,016	0,012	0,013
20	0,012	0,016	0,012	0,016	0,014
21	0,009	0,012	0,016	0,016	0,014
22	0,009	0,016	0,012	0,019	0,016
49	0,006	0,016	0,009	0,009	0,011

Tabla A. 55
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen bacterias (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Gpatrón-bact	Gbact 1	Gbact 2	Gbact 3	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,003	0,015	0,018	0,018	0,017
2	0,003	0,015	0,015	0,018	0,016
4	0,006	0,018	0,015	0,015	0,016
5	0,012	0,015	0,018	0,015	0,016
6	0,012	0,015	0,015	0,015	0,015
7	0,012	0,015	0,015	0,015	0,015
8	0,009	0,015	0,018	0,015	0,016
11	0,009	0,018	0,015	0,012	0,015
12	0,009	0,018	0,015	0,015	0,016
13	0,009	0,018	0,012	0,018	0,016

Tabla A. 55 (continuación)
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen bacterias (CO₂ ± 0,001) mg/cm²día
	Gpatrón-bact	Gbact 1	Gbact 2	Gbact 3	
14	0,009	0,022	0,009	0,018	0,016
15	0,006	0,015	0,015	0,015	0,015
16	0,006	0,012	0,022	0,012	0,016
18	0,009	0,016	0,016	0,016	0,016
19	0,009	0,009	0,016	0,012	0,012
20	0,006	0,012	0,009	0,019	0,013
21	0,003	0,016	0,012	0,016	0,014
22	0,006	0,019	0,016	0,016	0,017
49	0,012	0,016	0,009	0,009	0,011

ASFALTENO AYACUCHO

Tabla A..56
Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de CO₂ producido en los microcosmos

Día	Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico Suelo virgen (V _P ± 0,05)mL
	Hpatrón-lomb	Hlomb1	Hlomb 2	Hlomb 3	Hpatrón-bact	Hbact 1	Hbact 2	Hbact 3	Patrón P
1	10,3	10,5	10,5	10,05	10,3	10,25	10,25	10,25	10,60
2	10,5	10,5	10,4	10,4	10,5	10,3	10,4	10,4	10,60
4	10,5	10,35	10,35	10,4	10,45	10,35	10,45	10,4	10,60
5	10,3	10,3	10,2	10,5	10,4	10,4	10,3	10,3	10,60
6	10,5	10,3	10,3	10,3	10,3	10,4	10,3	10,4	10,60
7	10,5	10,2	10,2	10,1	10,15	10,35	10,25	10,2	10,60
8	10,53	10,25	10,25	10,25	10,35	10,3	10,3	10,3	10,60
11	10,3	10,25	10,25	10,3	10,3	10,3	10,35	10,35	10,60
12	10,35	10,3	10,3	10,35	10,4	10,35	10,4	10,35	10,60

Tabla A..56 (continuación)

Volumen de ácido clorhídrico gastado durante la medición de CO₂ producido en los microcosmos

Día	Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico (V _{BT} ± 0,05)mL				Volumen de ácido clorhídrico Suelo virgen (V _P ± 0,05)mL
	Hpatrón-lomb	Hlomb1	Hlomb 2	Hlomb 3	Hpatrón-bact	Hbact 1	Hbact 2	Hbact 3	P
13	10,35	10,35	10,25	10,35	10,45	10,4	10,45	10,3	10,60
14	10,3	10,3	10,3	10,3	10,4	10,4	10,3	10,35	10,60
15	10,35	10,35	10,35	10,35	10,3	10,25	10,3	10,3	10,60
16	10,35	10,4	10,3	10,25	10,4	10,25	10,35	10,3	10,60
18	10,55	10,55	10,3	10,25	10,45	10,3	10,3	10,3	10,60
19	10,5	10,5	10,35	10,3	10,4	10,35	10,4	10,35	10,60
20	10,55	10,35	10,35	10,35	10,45	10,35	10,45	10,4	10,60
21	10,45	10,3	10,3	10,3	10,4	10,3	10,4	10,4	10,60
22	10,5	10,5	10,35	10,35	10,5	10,35	10,3	10,25	10,60
49	10,55	10,30	10,35	10,35	10,45	10,4	10,45	10,3	10,60

Diámetro de la cápsula pequeña: (6,60± 0,05) cm, Diámetro de la cápsula grande: (9,50± 0,05) cm, Volumen de hidróxido de potasio (10,00 ± 0,03) mL Concentración de HCl de los días (1-16): (0,1024± 0,0001) N, Volumen de cloruro de bario (2,00± 0,01) mL, Concentración de HCl de los días (17-49): (0,1034± 0,0001) N

Tabla A. 57
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de *Eisenia foétida*

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmos que contienen lombrices (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Hpatrón-lomb	Hlomb1	Hlomb 2	Hlomb 3	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,018	0,006	0,006	0,034	0,015
2	0,006	0,006	0,012	0,012	0,010
4	0,006	0,015	0,015	0,012	0,014
5	0,018	0,018	0,025	0,006	0,016
6	0,006	0,018	0,018	0,018	0,018
7	0,006	0,025	0,025	0,031	0,027
8	0,004	0,022	0,022	0,022	0,022
11	0,018	0,022	0,022	0,018	0,020
12	0,015	0,018	0,018	0,015	0,017

Tabla A. 57 (continuar)
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento de *Eisenia foétida*

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmos que contienen lombrices (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Hpatrón-lomb	Hlomb1	Hlomb 2	Hlomb 3	
13	0,015	0,015	0,022	0,015	0,017
14	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
15	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
16	0,016	0,012	0,019	0,022	0,018
18	0,003	0,003	0,019	0,022	0,014
19	0,006	0,006	0,016	0,019	0,013
20	0,003	0,016	0,016	0,016	0,016
21	0,009	0,019	0,019	0,019	0,019
22	0,006	0,006	0,016	0,016	0,012
49	0,003	0,016	0,016	0,016	0,016

Tabla A. 58
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias

Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen bacterias (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Hpatrón-bact	Hbact 1	Hbact 2	Hbact 3	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,018	0,022	0,022	0,022	0,022
2	0,006	0,018	0,012	0,012	0,014
4	0,009	0,015	0,009	0,012	0,012
5	0,012	0,012	0,018	0,018	0,016
6	0,018	0,012	0,018	0,012	0,014
7	0,021	0,015	0,022	0,025	0,020
8	0,015	0,018	0,018	0,018	0,018
11	0,018	0,018	0,015	0,015	0,016
12	0,012	0,015	0,012	0,015	0,014
13	0,009	0,012	0,009	0,018	0,013

Tabla A. 58 (continuación)
Respiración celular en los microcosmos relacionados con el tratamiento con bacterias

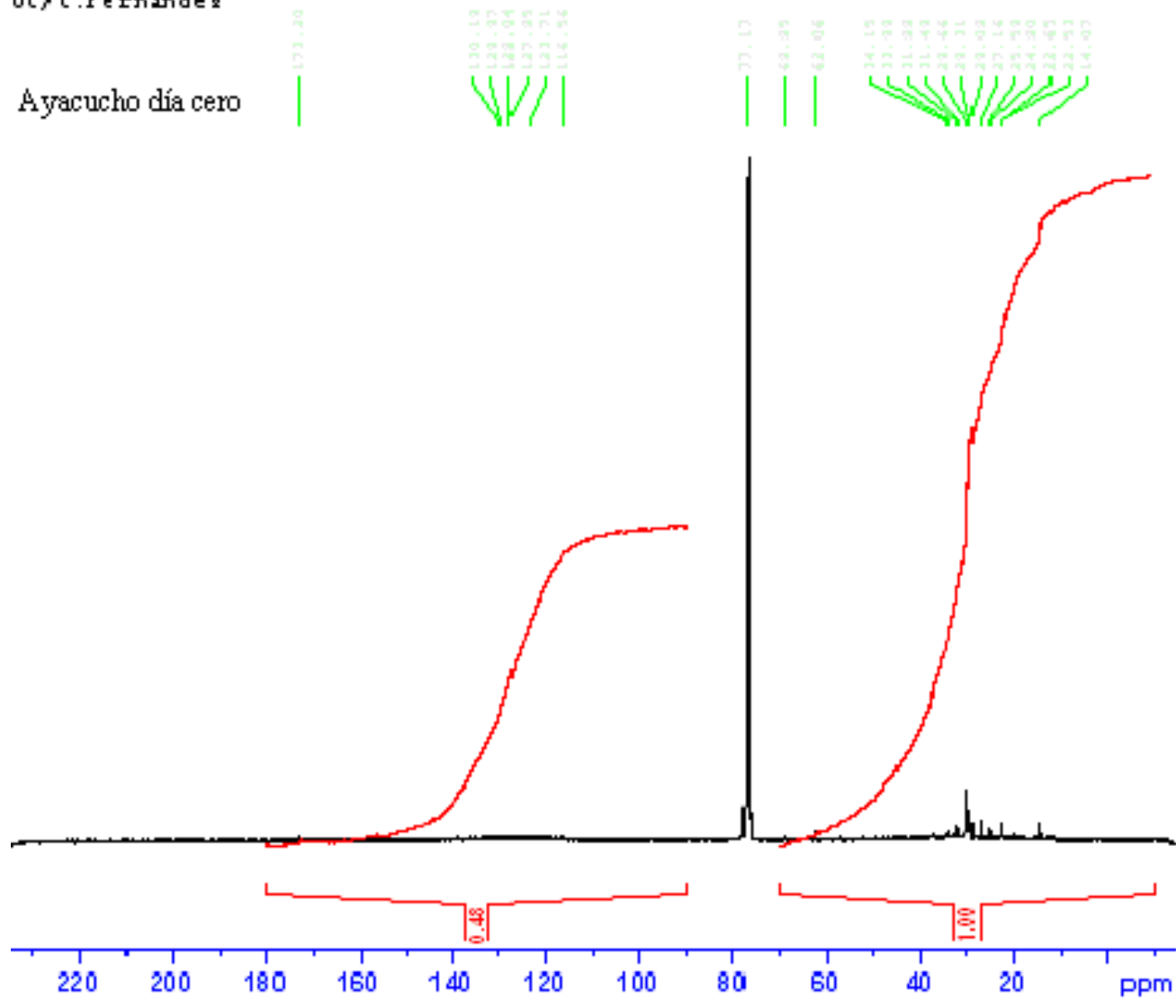
Día	Respiración celular en cada microcosmo (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día				Promedio del CO₂ producido por los microcosmo que contienen bacterias (CO₂ ± 0,001) mg/cm².día
	Hpatrón-bact	Hbact 1	Hbact 2	Hbact 3	
14	0,012	0,012	0,018	0,015	0,015
15	0,018	0,022	0,018	0,018	0,019
16	0,012	0,022	0,016	0,019	0,019
18	0,009	0,019	0,019	0,019	0,019
19	0,012	0,016	0,012	0,016	0,014
20	0,009	0,016	0,009	0,012	0,012
21	0,012	0,019	0,012	0,012	0,014
22	0,006	0,016	0,019	0,022	0,019
49	0,009	0,012	0,009	0,018	0,013

APENDICE B

RESULTADOS CROMATOGRAMAS RESONANCIA MAGNÉTICA.

UC/C.Fernandes

Ayacucho día cero



Current Data Parameters
NAME uc04g.as00
EXPNO 22
PROCNO 1

F2 = Acquisition Parameters
Date_ 20090113
Time 17.05
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT cdc13
NS 16384
DS 4
SWH 18832.303 Hz
FIDRES 0.287360 Hz
AQ 1.7400308 sec
RG 13004
IM 26.550 usec
IE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.80000008 sec
TD0 1

===== CHANNEL F1 =====
NUC1 13C
P1 6.70 usec
PL1 5.00 dB
SFO1 75.4760200 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 19.17 dB
PL13 19.00 dB
SFO2 300.1312000 MHz

F2 = Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677537 MHz
MDM 8M
SSB 0
LB 2.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Figura B.1. RMN ¹³C del asfalto Ayacucho sin tratar día cero.

JC/C. Fernandez,

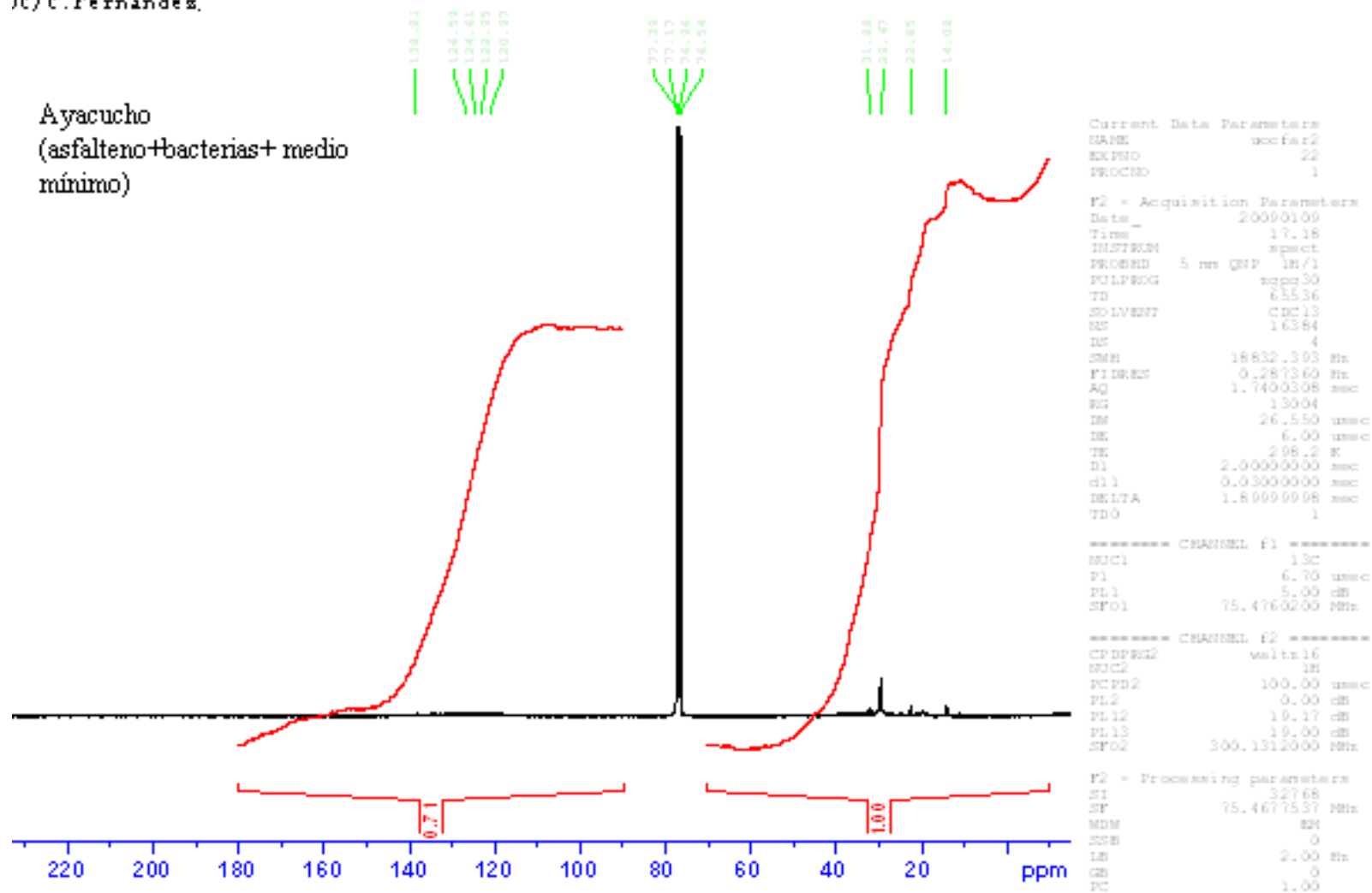


Figura B.2. RMN ^{13}C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).

UC/ C. Fernandez

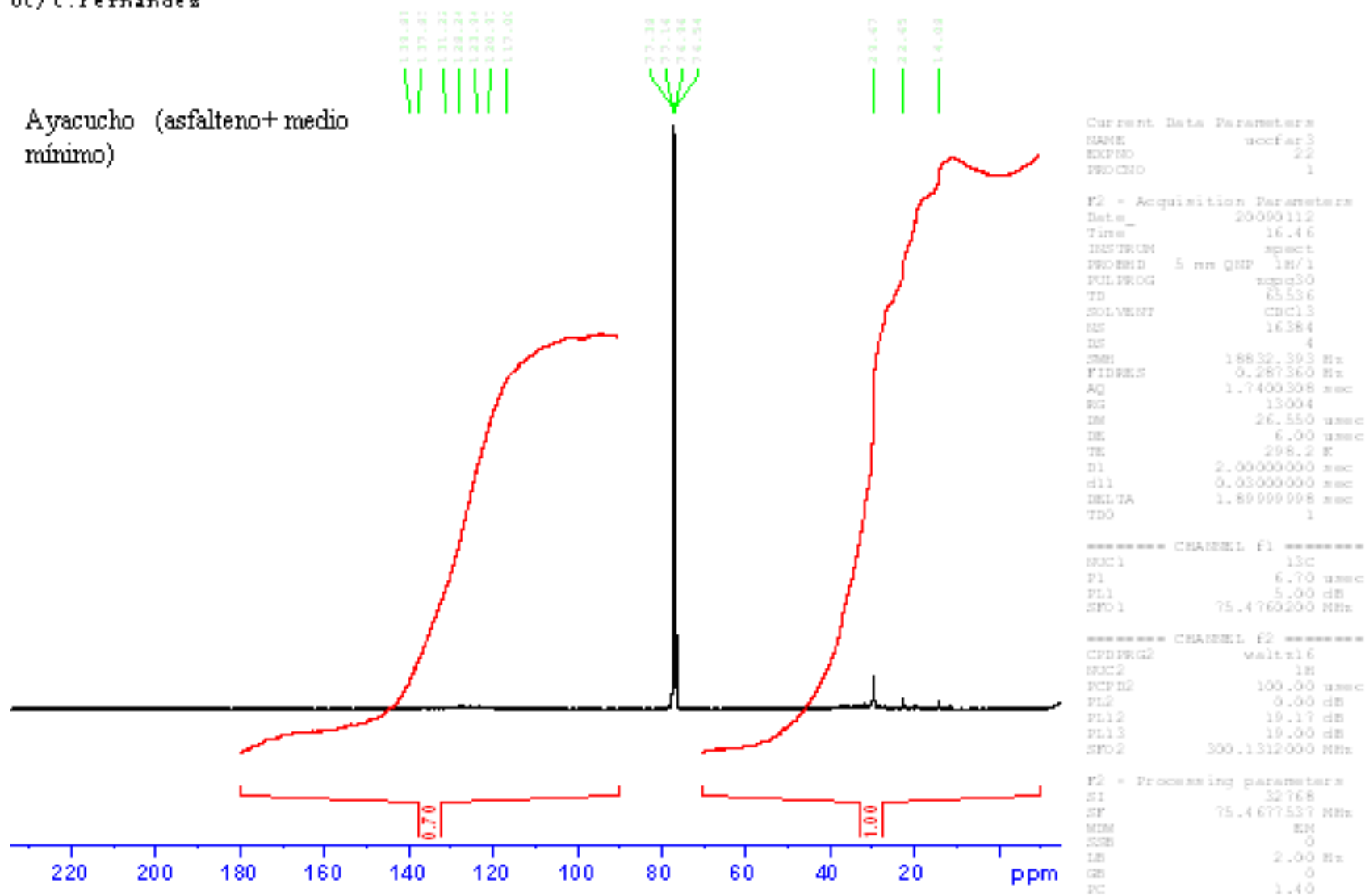


Figura B.3. RMN ^{13}C del asfalteno Ayacucho en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo).

Guafita día cero

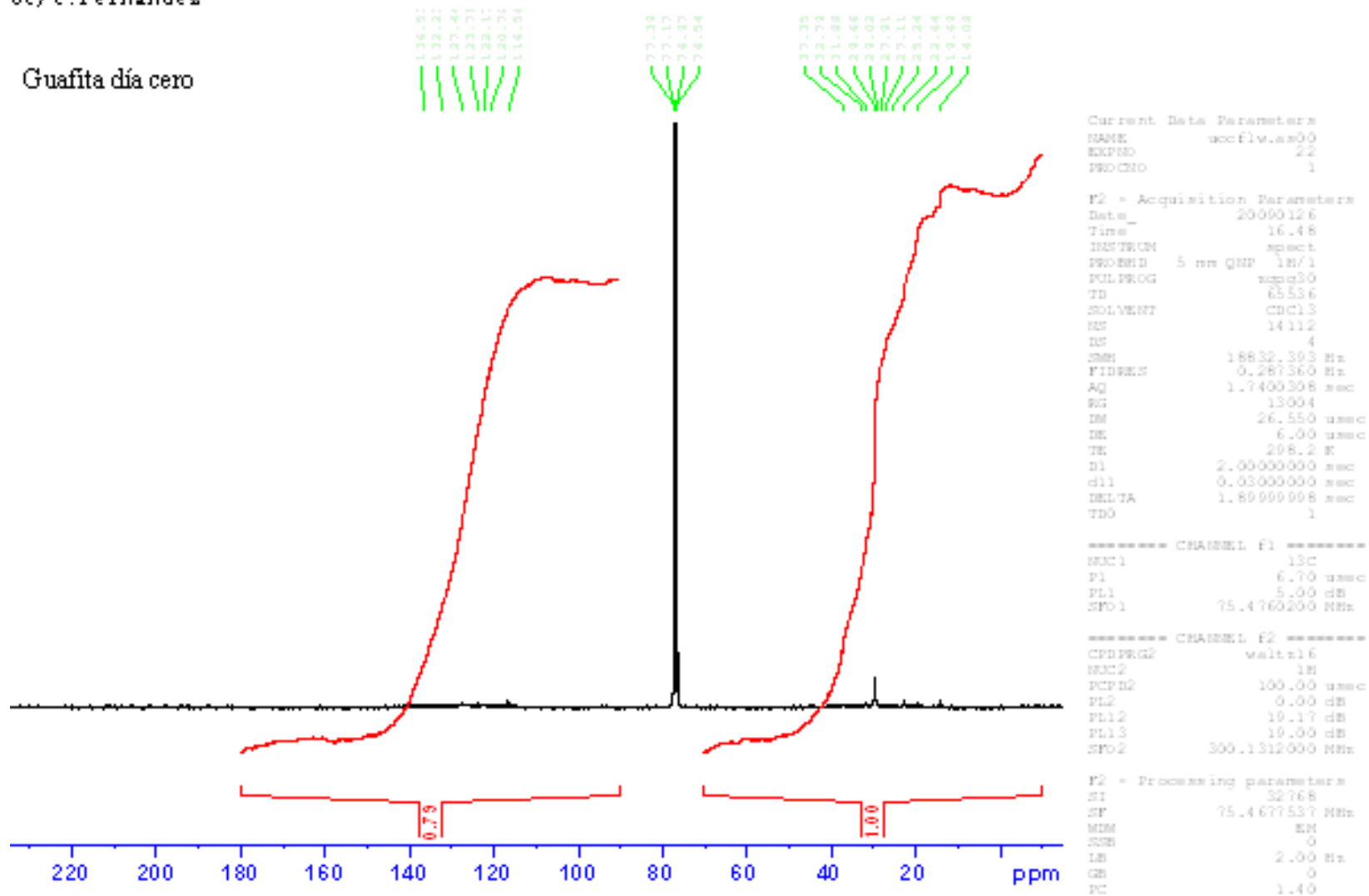


Figura B.4. RMN ¹³C del asfalto Guafita sin tratar día cero.

UC/C .Fernandes.

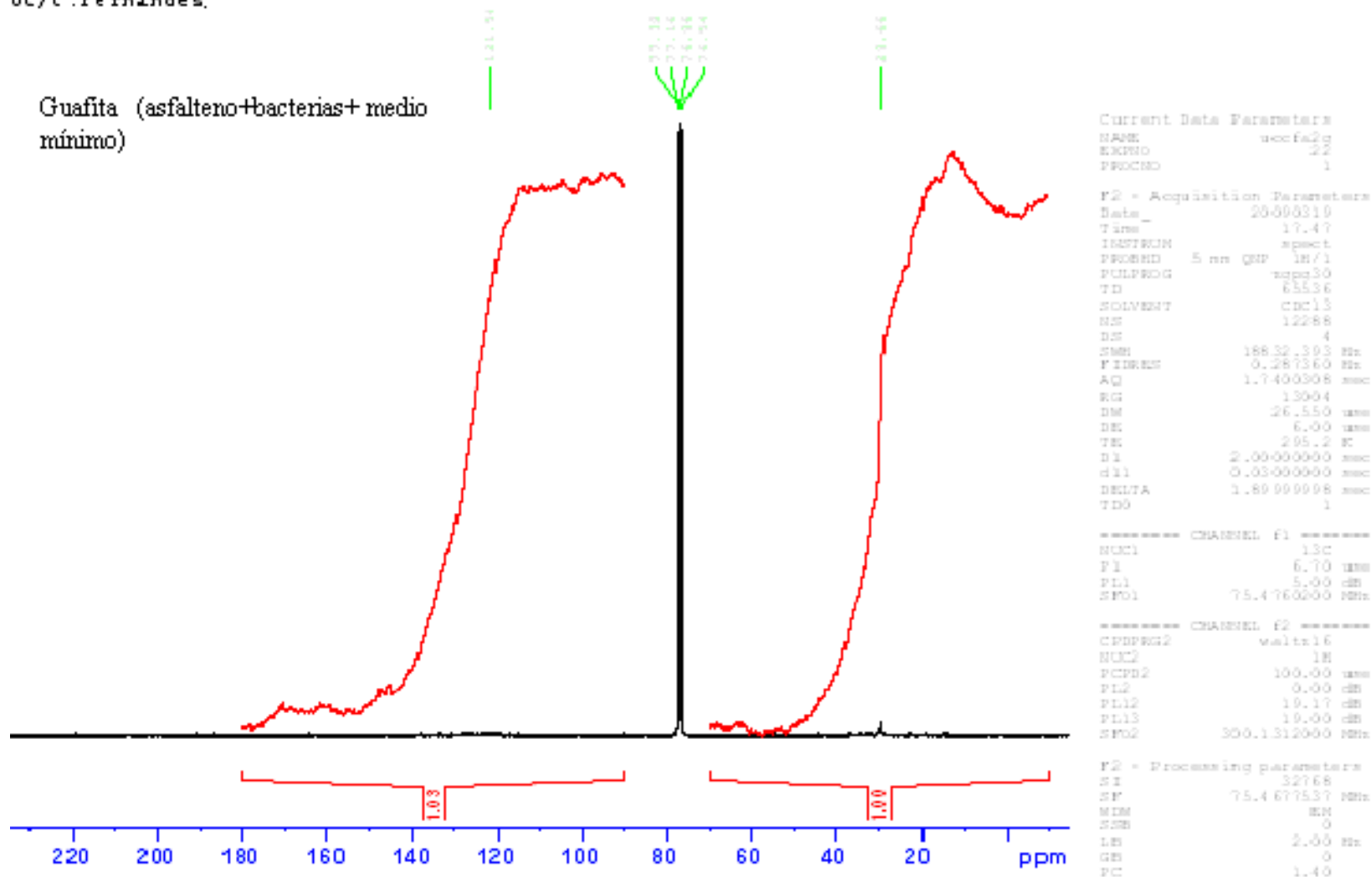


Figura B.5. RMN ^{13}C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+bacterias+ medio mínimo).

Guafita (asfalteno+ medio mínimo)

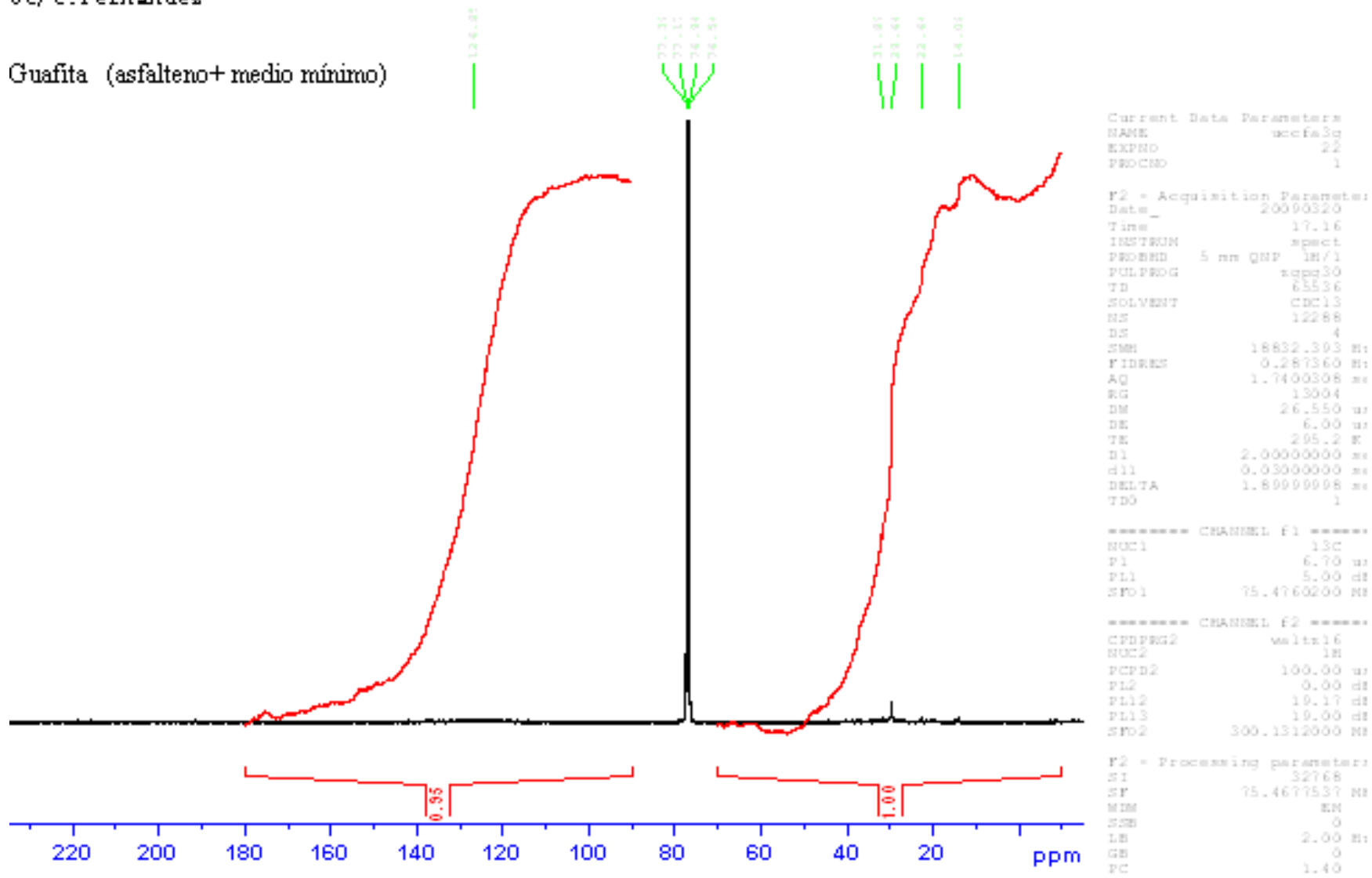


Figura B.6. RMN ¹³C del asfalteno Guafita en medio acuoso al final del estudio (asfalteno+ medio mínimo).

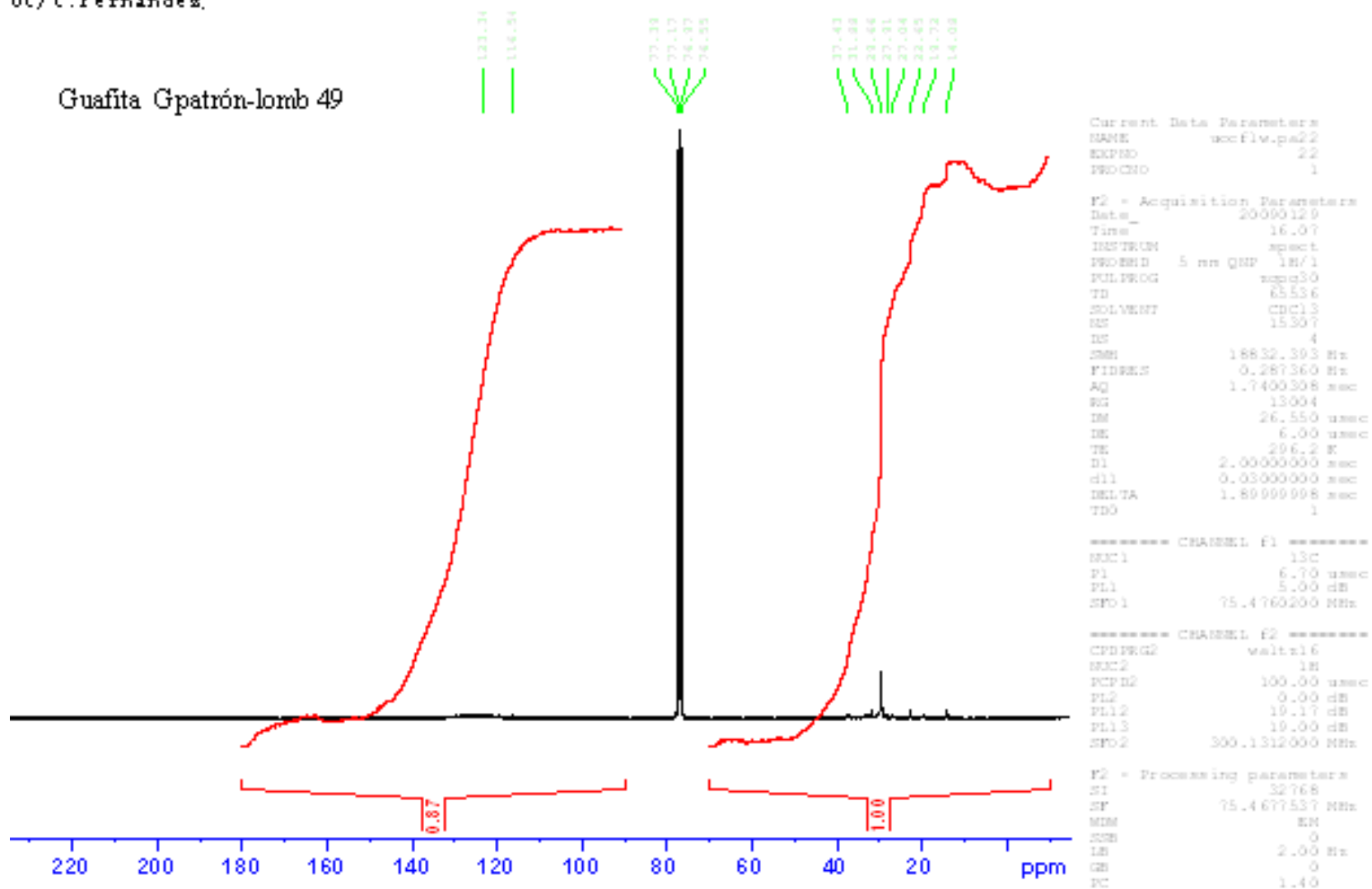


Figura B.7. RMN ^{13}C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 Gpatrón-lomb (asfalto+suelo+ agua).

UC/ C. Fernandez

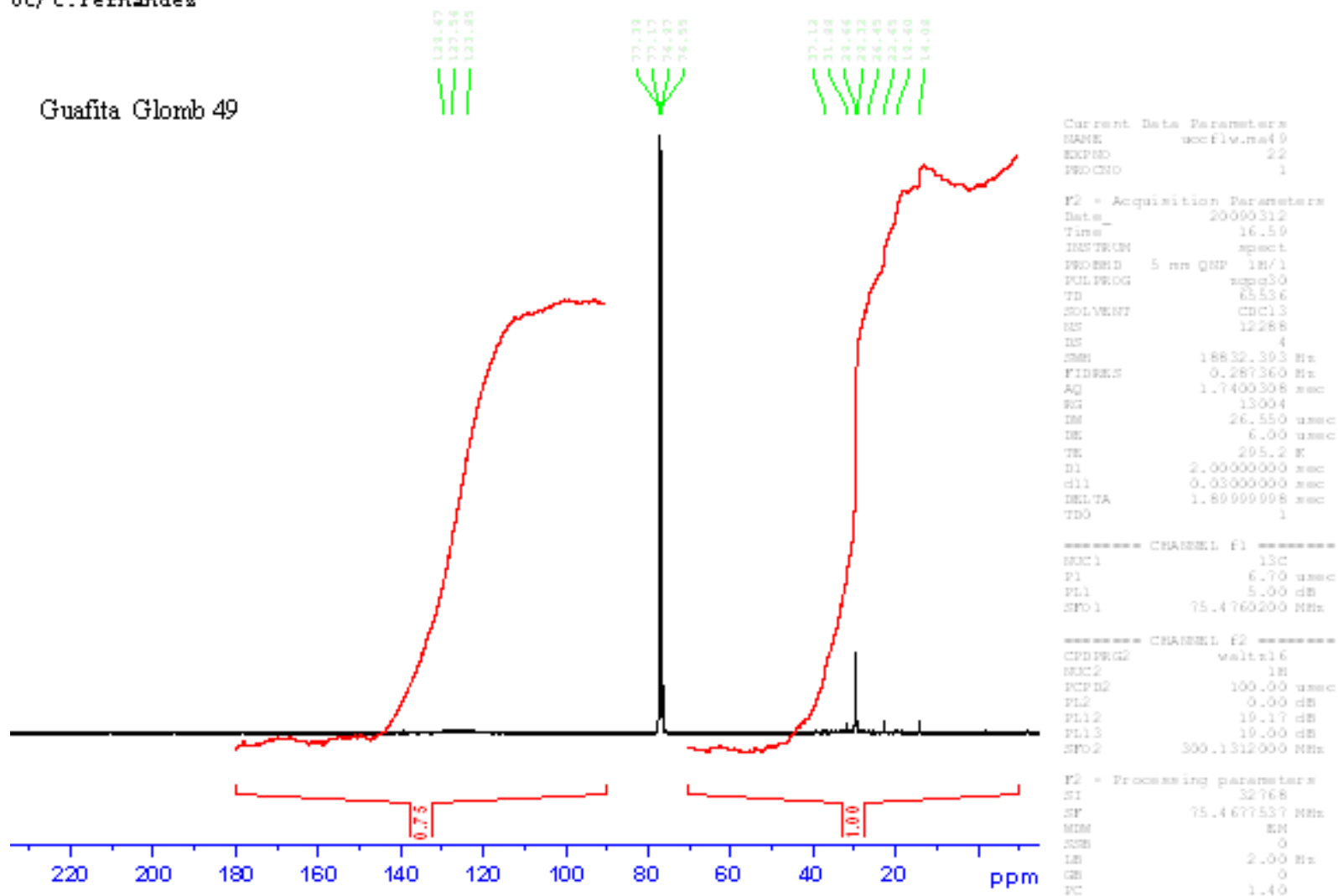


Figura B.8. RMN ^{13}C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 Glomb (asfalto+suelo+ agua+estérol+lomb).

UC/ C.Fernandez

Guafita Gpatrón-bact 49

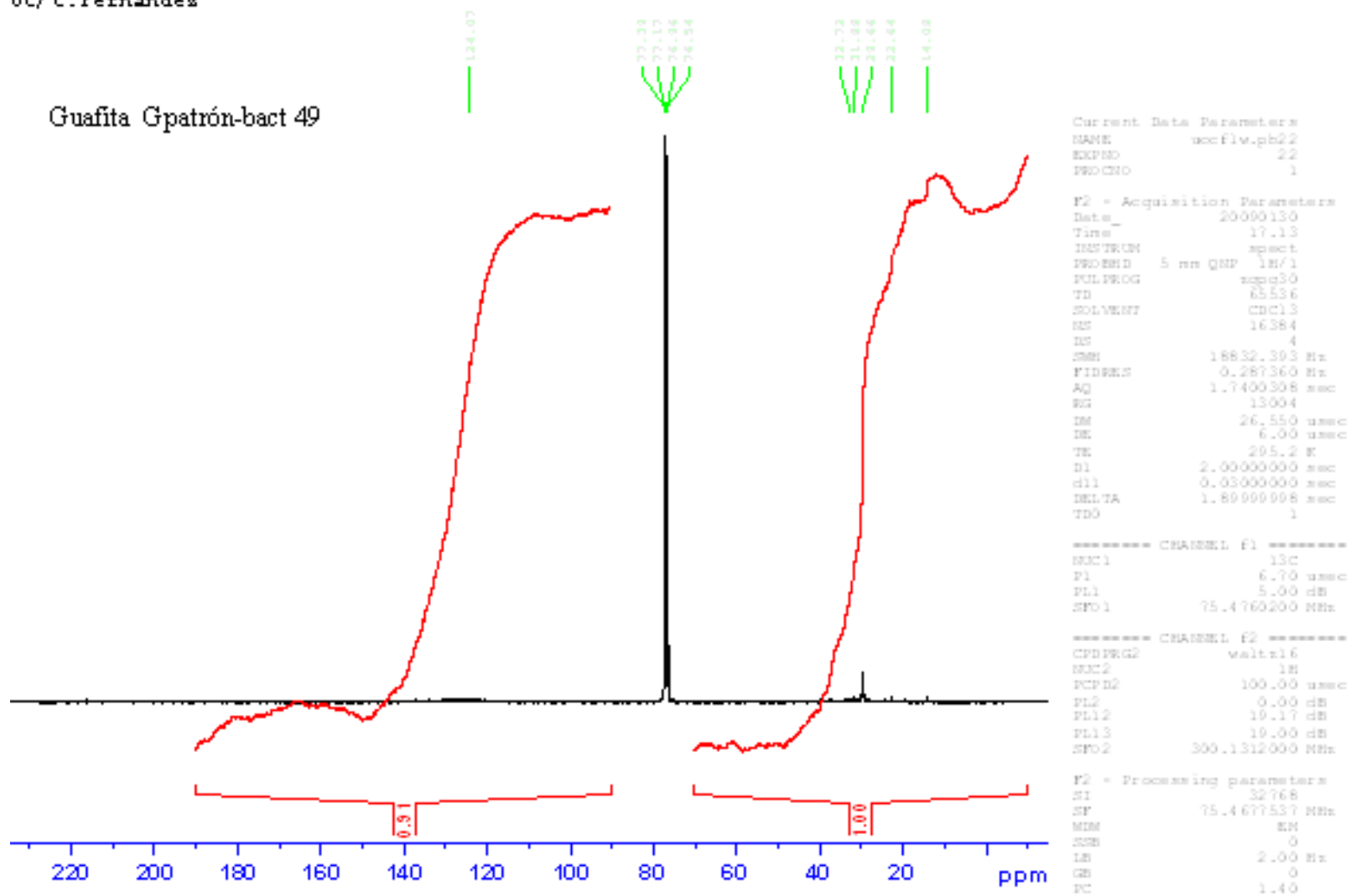


Figura B.9. RMN ^{13}C del asfalto Guafita al final del estudio día 49 Gpatrón-bact (asfalto+suelo+ medio mínimo).

UC/ C. Fernandez.

Guafita Gbact 49

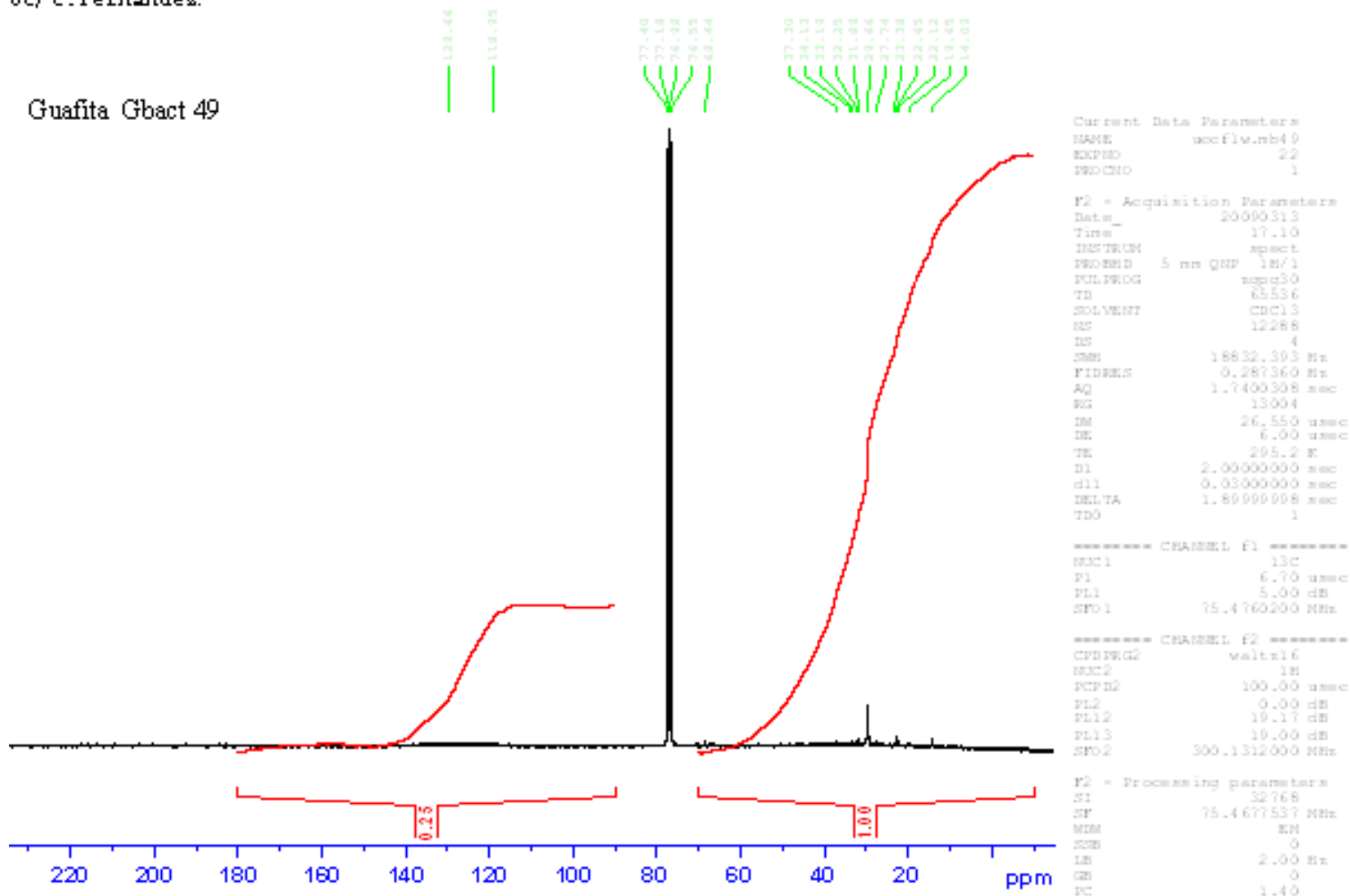


Figura B.10. RMN ^{13}C del asfalteno Guafita al final del estudio día 49 Gbact (asfalteno+suelo+ medio mínimo+bacterias).

UC/ C.Fernandez

Ayacucho Hpatrón-bact 49

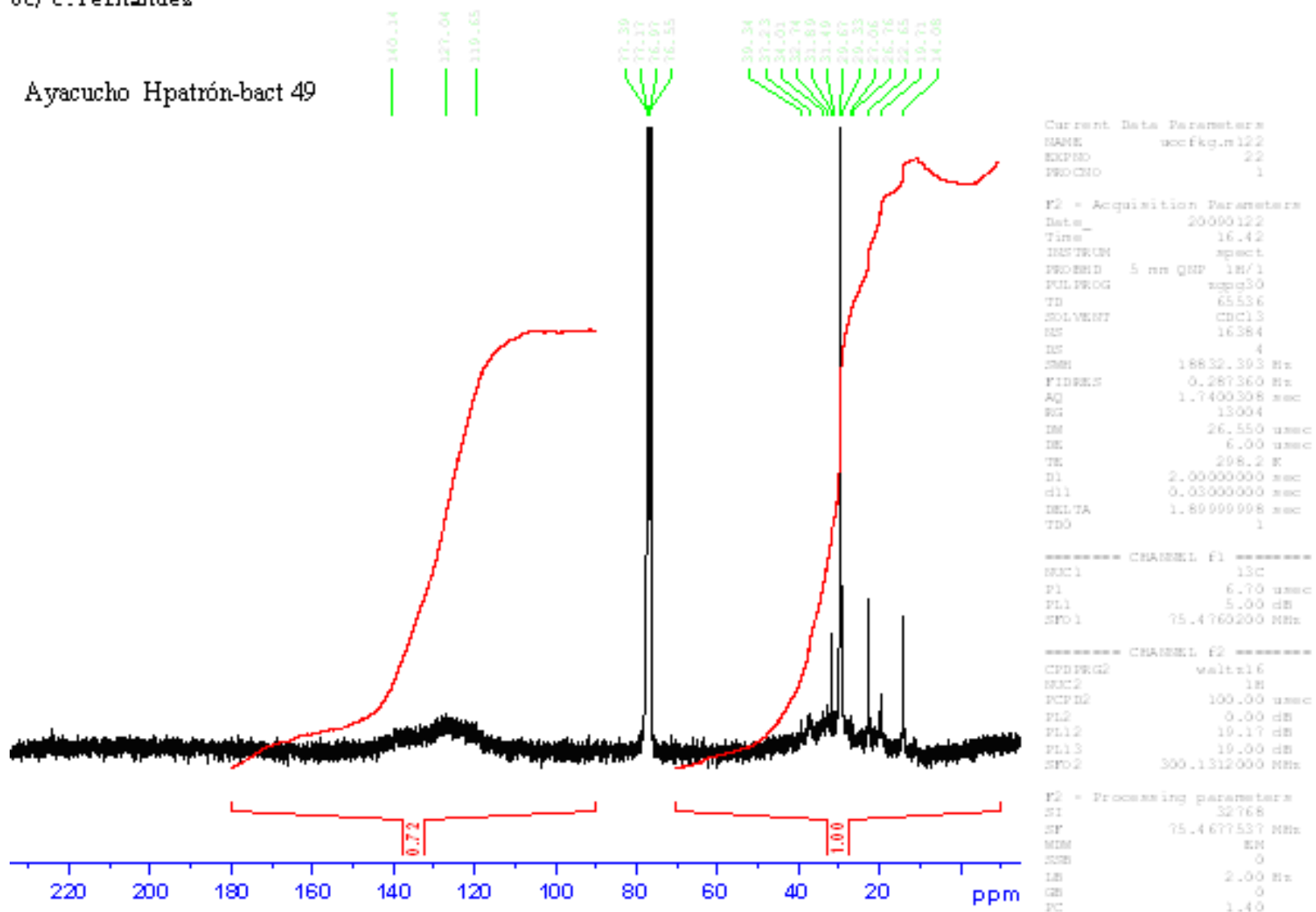


Figura B.11. RMN ¹³C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hpatrón-bact (asfalto+suelo+ medio mínimo).

Ayacucho Hbact 49

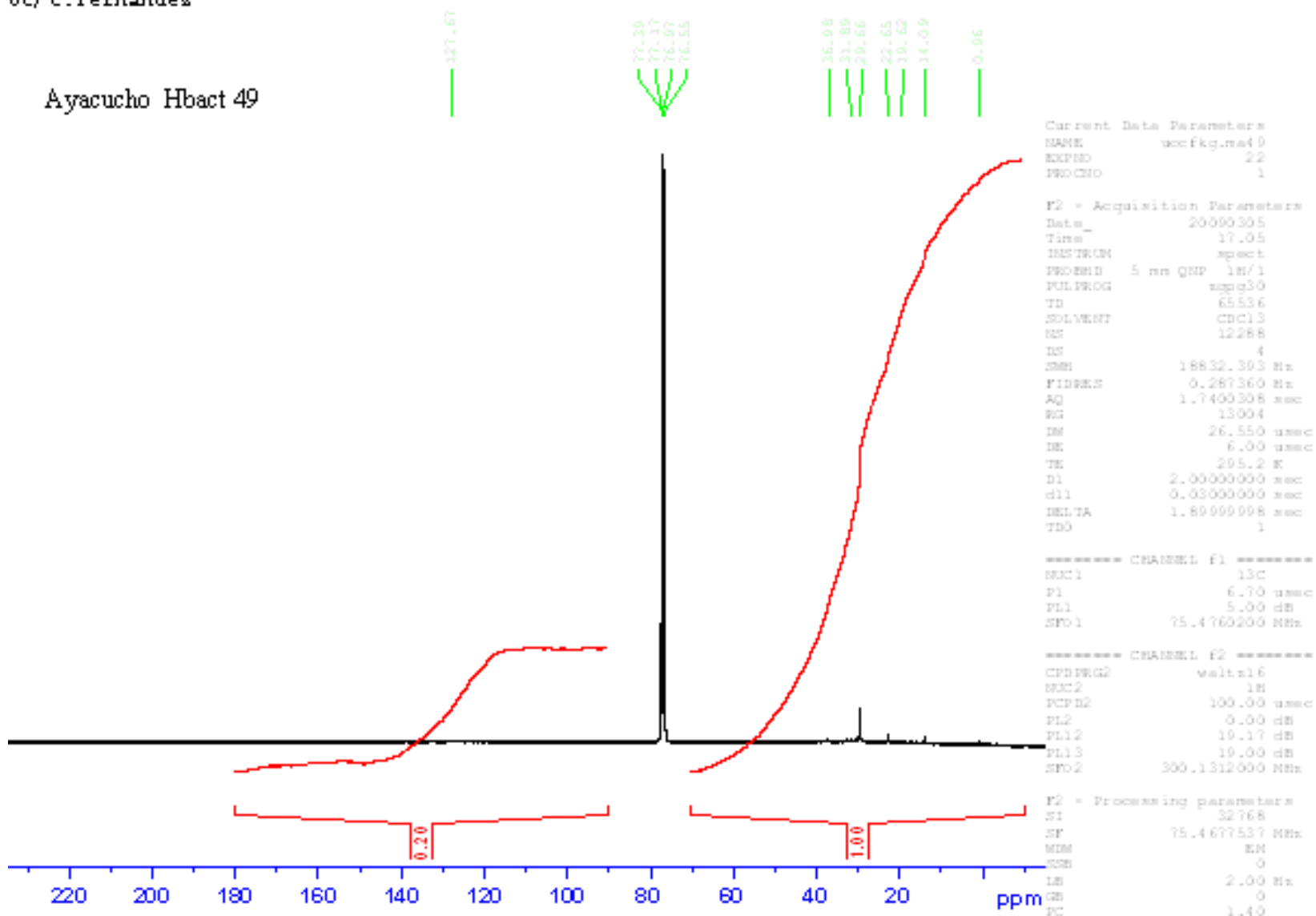


Figura B.12. RMN ¹³C del asfalteno Ayacucho al final del estudio día 49 Hbact (asfalteno+suelo+ medio mínimo+bacteria).

Ayacucho Hpatrón-lomb 49

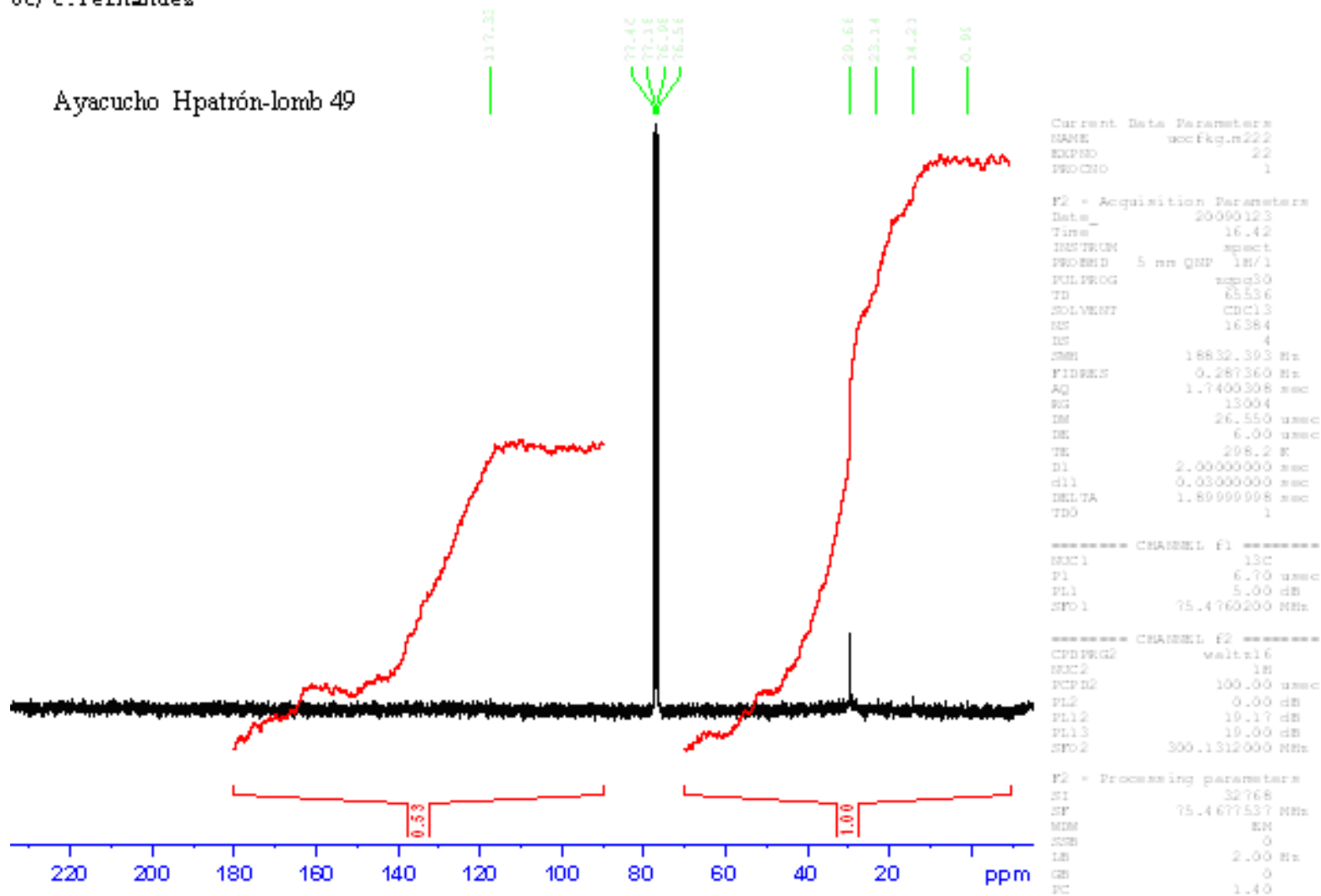


Figura B.13. RMN ¹³C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hpatrón-lomb (asfalto+suelo+ agua).

UC/ C. Fernandez

Ayacucho Hlomb 49

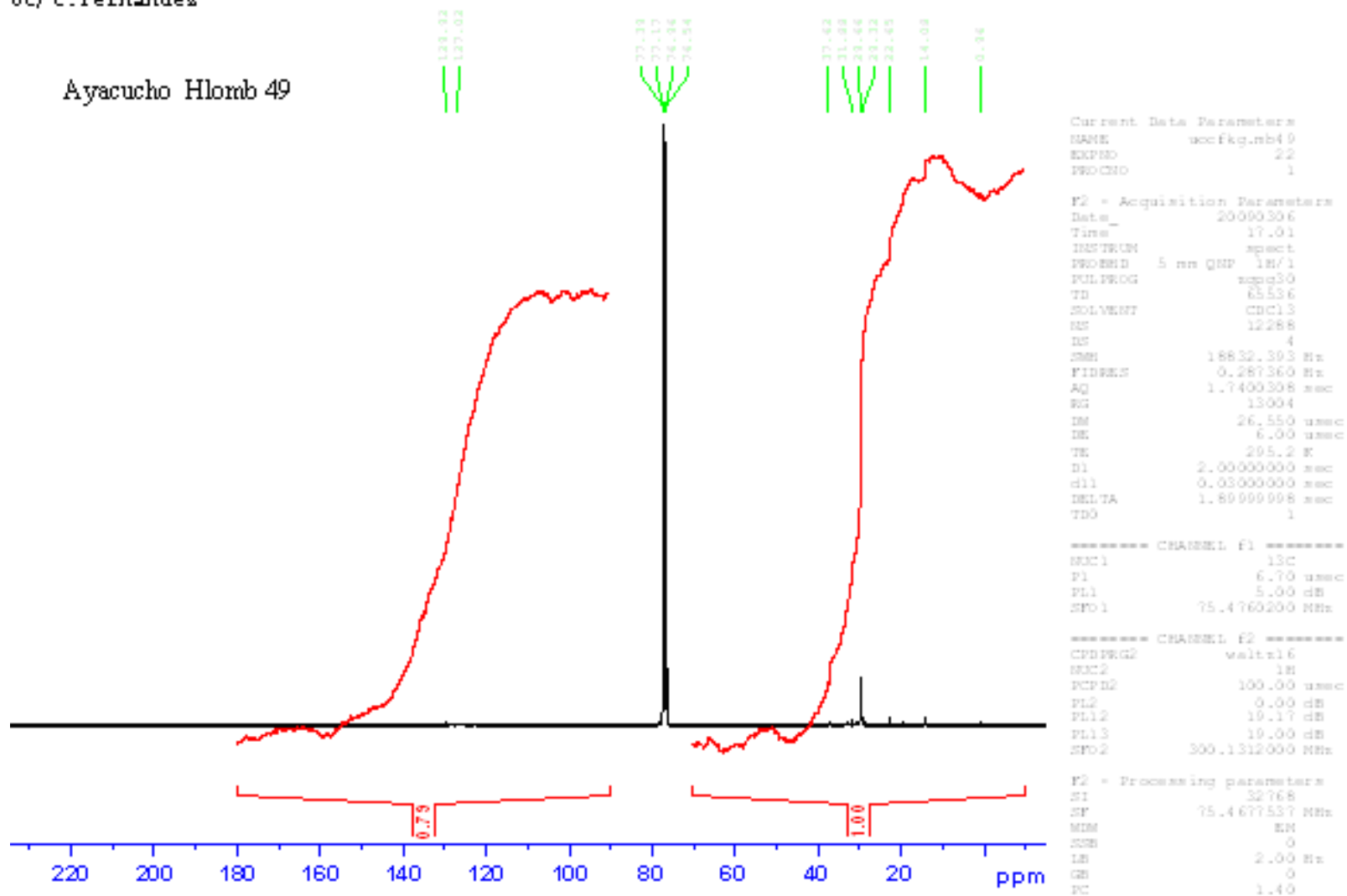


Figura B.14. RMN ¹³C del asfalto Ayacucho al final del estudio día 49 Hlomb (asfalto+suelo+ agua+estiercol+lomb).

APÉNDICE C

CARACTERIZACIÓN Y RESULTADOS DE LOS

ANALISIS

Resultados de los Análisis de Laboratorio

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA
LABORATORIO GENERAL DE SUELOS





NUMERO DE SOLICITUD: 10811002
FECHA: 15/12/08

SOLICITADO POR: Celeste Fernandez

FABRO -UCV AGRONOMIA -M.B.I - -ARAGUA

RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE: FERTILIDAD

CODIGO	IDENTIFICACION	TEXTURA				PH 1:1 AGUA	CONDUCTIVIDAD ELECT. (dS/m)	MAT.ORG. (%)	concentracion. en ppm.				
		ARCILLA (%)	LIMO (%)	ARENA (%)	F				P	K	Ca	Na	Mg
108110130	M-UNICA	8.4	46.0	45.6	F	5.66	0.090	0.95	32	168	920	33	136



DIRECTORA DEL INSTITUTO
Zenaida Lozano





ENCARGADA DEL LABORATORIO
Linda Marilyn Aular

Nota: 1 ppm equivale a 1 mg . kg⁻¹

Lab 3

Apartado Postal 4579 – Telefax: (0243) 550.71.69 – Teléfono: (0243) 550.71.66
Av. Universidad. El Limón, Maracay – Edo. Aragua – Venezuela. Correo-e: edafo@agr.ucv.ve – labsuelo@agr.ucv.ve
www.agr.ucv.ve

0243-5507169

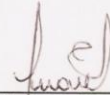
Figura C.1. Parámetros de caracterización del suelo virgen.

Solicitado por: Celeste Fernández

DIAGNÓSTICO

Código	Identificación	pH 1:1 en agua	Con Eléct ds/m	% M.O	P	K	Ca	Na	Mg
108110130	M-UNICA	Moderadamente Ácido	B	B	M	MA	M	B	MA

MA= Muy Alto A=Alto M=Medio B=Bajo



Linda Marilyn Aular
ENCARGADA DEL LABORATORIO

Figura C.1. Parámetros de caracterización del suelo virgen (continuación).



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA
LABORATORIO GENERAL DE SUELOS



NUMERO DE SOLICITUD: 108110002
FECHA: 15/12/08

SOLICITADO POR: CELESTE FERNANDEZ
FAGRO UCV AGRONOMIA ARAGUA

RESULTADO DE LOS ANALISIS DE: SUELOS

CODIGO	IDENTIFICACIÓN	%	CIC	Ca	Mg	Na	K
		Nitrógeno Total	cmol.kg ⁻¹	cmol.kg ⁻¹	cmol.kg ⁻¹	cmol.kg ⁻¹	cmol.kg ⁻¹
108110130	M-UNICA	0.145 M	10.70 M	11.55	1.34	3.10	0.75

M = Medio.

Apartado Postal 4579 – Telefax: (0243) 550.71.69 – Teléfono: (0243) 550.71.66
Av. Universidad. El Limón, Maracay – Edo. Aragua – Venezuela. Correo-e: edafo@agr.ucv.ve – labsuelo@agr.ucv.ve
www.agr.ucv.ve

Figura C.1. Parámetros de caracterización del suelo virgen (continuación).

Fecha de Emisión: 12/02/09

Solicitado por: **Celeste Fernández**

Dirección: Universidad de Carabobo- Facultad de Ingeniería

Número de Rif. 17.807.322

Solicitud N° :50811002

Resultados de Análisis de Compost

Código	Identificación	% p/p					
		NT	Ds	P ₂ O ₅	Ds	MO	Ds
50811028	Única	1,69	0,02	1,40	0,05	52,37	0,57

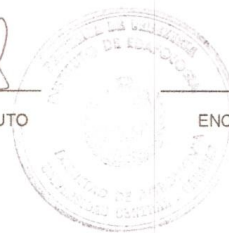
DS = Desviación Estándar

Métodos: - Determinación de Nitrógeno total: Método de destilación Micro Kjeldahl
- Determinación de P₂O₅: Método Espectrofotométrico Molibdato-Vanadato
- Determinación de Materia Orgánica Método Oxido Reducción

Observaciones: 1- La muestra no fue tomada por el laboratorio General de suelos
2- Estos resultados corresponden a la muestra ingresada al Laboratorio



Zenaida Lozano
DIRECTORA DEL INSTITUTO





Linda Marilyn Aular
ENCARGADA DEL LABORATORIO

Figura C.2. Parámetros de caracterización del estiércol.

Tabla C.3. Pruebas bioquímicas de identificación de microorganismo degradadores de asfalteno

Microorganismo	Agar nutritivo 44°C	MCK 37°C	Kligler 37°C	Agar cetrimide	CIT	VP	RM	S	I	M	Urea	Malonato	0	F	LYA
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	A/A G ⁺	Nr	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Citrobacter spp</i>	-	+	A/A	Nr	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	+	AL/A	Nr	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas spp</i> ^(*)	-	+	AL/AL	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^(*)	+	+	AL/AL	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-

^(*) A estos microorganismos se les realizó la prueba galería API 20 E confirmando la presencia de las mismas.

A/A: fermenta Glucosa y Lactosa, AL/AL: no fermenta ni glucosa ni lactosa, AL/A: fermenta Glucosa.

G⁺: produce gas, Nr: no se realizó.

Tabla C.4. Características microscópicas de microorganismos degradadores de asfalteno.

Familia	Género	Especie	Forma	Tinción Gram
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	Bacilo	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. spp</i>	Bacilo	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>E. agglomerans</i>	Bacilo	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. spp</i>	Bacilo	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Bacilo	-

APÉNDICE D
CÁLCULOS TÍPICOS

1.-Obtención de la fracción de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA)

Porcentaje de asfaltenos presentes en el crudo “Guafita y Ayacucho”

Para su cálculo se utiliza la ecuación III-1, capítulo III.

$$\%Asf = \frac{M_{PFA} - M_{PFV}}{M_C} \times 100 \quad (\text{Carbognani } et al, 1997)$$

Donde:

$\%Asf$: Porcentaje de asfaltenos en el crudo, %.

M_{PFA} : Masa del papel de filtro con los asfaltenos, g.

M_{PFV} : Masa del papel de filtro vacío, g.

M_C : Masa inicial del crudo, g.

Sustituyendo los datos de la Tabla A.5 del apéndice A, se tiene:

$$\%Asf = \frac{4,927g - 1,223g}{181,024g - 93,195g} \times 100\% = 4,2172\%$$

Luego se calcula la incertidumbre asociada al cálculo:

$$\Delta\%Asf = \left| \frac{\partial\%Asf}{\partial M_{PFA}} \right| \times \Delta M_{PFA} + \left| \frac{\partial\%Asf}{\partial M_{PFV}} \right| \times \Delta M_{PFV} + \left| \frac{\partial\%Asf}{\partial M_C} \right| \times \Delta M_C$$

Derivando la expresión se tiene:

$$\Delta\%Asf = \left| \frac{100 \times \Delta M_{PFA}}{M_C} \right| + \left| -\frac{100 \times \Delta M_{PFV}}{M_C} \right| + \left| -\frac{100 \times (M_{PFA} - M_{PFV}) \times \Delta M_C}{M_C^2} \right|$$

Donde:

$\Delta\%Asf$: Incertidumbre del porcentaje de asfaltenos en el crudo, %.

ΔM_{PFA} : Incertidumbre de la masa del papel de filtro con los asfaltenos, g.

ΔM_{PFV} : Incertidumbre de la masa del papel de filtro vacío, g.

ΔM_C : Incertidumbre de la masa inicial del crudo, g.

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta\%Asf = \left| \frac{100}{181,024g - 93,195g} \right| \times 0,001g + \left| -\frac{100}{181,024g - 93,195g} \right| \times 0,001g + \dots$$

$$\dots + \left| -\frac{(4,927g - 1,223g) \times 100}{(181,024g - 93,195g)^2} \right| \times 0,001g + \left| \frac{(4,927g - 1,223g) \times 100}{(181,024g - 93,195g)^2} \right| \times 0,001g = 0,002\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\%Asf = (4,217 \pm 0,002)\%$$

Cálculo del porcentaje de compuestos saturados presentes en el crudo.

Para el cálculo de esta variable se utiliza la ecuación III-5, capítulo III.

$$\%Sat = \frac{\left(1 - \frac{\%As}{100}\right) \times (M_{BSA} - M_{BV})}{M_{MT}} \times 100 \quad (\text{Carbognani } et al., 1997)$$

Donde:

$\%Sat$: Porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo, %.

M_{BSA} : Masa del balón lleno con la fracción saturada, g.

M_{BV} : Masa del balón vacío, g.

M_{MT} : Masa tomada de la solución de maltenos, g.

Sustituyendo los datos de la Tabla A.6 del apéndice A, se tiene:

$$\%Sat = \frac{\left(1 - \frac{4,217}{100}\right) \times (116,5962\text{g} - 115,9630\text{g})}{1,0001\text{g}} \times 100\% = 60,6437\%$$

Luego se calcula la incertidumbre asociada al cálculo:

$$\Delta\%Sat = \left| \frac{\partial\%Sat}{\partial\%Asf} \right| \times \Delta\%Asf + \left| \frac{\partial\%Sat}{\partial M_{BSA}} \right| \times \Delta M_{BSA} + \left| \frac{\partial\%Sat}{\partial M_{BV}} \right| \times \Delta M_{BV} + \left| \frac{\partial\%Sat}{\partial M_{MT}} \right| \times \Delta M_{MT}$$

Derivando la expresión se tiene:

$$\Delta\%Sat = \left| \frac{(M_{BSA} - M_{BV}) \times \Delta\%Asf}{M_{MT}} \right| + \left| \frac{100 \times \left(1 - \frac{\%Asf}{100}\right) \times \Delta M_{BSA}}{M_{MT}} \right| + \left| \frac{100 \times \left(1 - \frac{\%Asf}{100}\right) \times \Delta M_{BV}}{M_{MT}} \right| + \dots$$

$$\dots + \left| \frac{100 \times \left(1 - \frac{\%Asf}{100}\right) \times (M_{BSA} + M_{BV}) \times \Delta M_{BV}}{M_{MT}^2} \right|$$

Donde:

$\Delta\%Sa$: Incertidumbre del porcentaje de hidrocarburos saturados en el crudo, %.

ΔM_{BSA} : Incertidumbre de la masa del balón lleno con la fracción saturada, g.

ΔM_{PFV} : Incertidumbre de la masa del balón vacío, g.

ΔM_C : Incertidumbre de la masa tomada de la solución de maltenos, g.

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta\%Sat = \left| -\frac{(116,5962g - 115,9630g)}{1,0001g} \right| \times 0,002\% + \left| \frac{\left(1 - \frac{4,217}{100}\right)}{1,0001g} \times 100\% \right| \times 0,0001g + \dots$$

$$\dots + \left| -\frac{\left(1 - \frac{4,217}{100}\right)}{1,0001g} \times 100\% \right| \times 0,0001g + \left| -\frac{\left(1 - \frac{4,217}{100}\right) \times (116,5962g - 115,9630g)}{(1,0001g)^2} \times 100\% \right| \times 0,0001g = 0,03\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\%Sat = (60,64 \pm 0,03)\%$$

Cálculo del porcentaje de aromáticos presentes en el crudo

Para este cálculo se utiliza la ecuación III-6, capítulo III.

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$\%Aro = \frac{\left(1 - \frac{4,217g}{100}\right) \times (116,1721g - 115,9630g)}{1,0001g} \times 100\% = 20,026\%$$

El error asociado a la medición se determinó de igual forma que para el cálculo de la fracción saturada, esto por la similitud entre las ecuaciones, lo que nos permite reportar el valor de la manera siguiente:

$$\%Aro = (20,03 \pm 0,03)\%$$

Cálculo del porcentaje de de resinas presentes en el crudo

Para este cálculo se utiliza la ecuación III-7, capítulo III.

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

Donde:

%Res : Porcentaje de resinas presentes en el crudo, %.

%Aro : Porcentaje de hidrocarburos aromáticos presentes en el crudo, %.

Sustituyendo los datos de la Tabla A.8, se tiene:

Sustituyendo los valores, se obtiene que:

$$\%Res = 100\% - (4,2172\% + 60,64\% + 20,03\%) = 15,113\%$$

Por ser una sumatoria, calculamos el error de la fracción de resinas presentes en el crudo como la suma de los errores asociados a cada medición:

$$\Delta\% Res = \Delta\% Asf + \Delta\% Sat + \Delta\% Aro$$

Donde:

$\Delta\%Res$: Error asociado al cálculo de la fracción de resinas presentes en el crudo, %
Sustituyendo los valores asociados, se tiene:

$$\Delta\%Res = 0,002\% + 0,03\% + 0,03\% = 0,1\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\%Res = (15,1 \pm 0,1)\%$$

2.-Capacidad de retención promedio del suelo

Haciendo uso de la ecuación III-3 y tomando en cuenta los datos que se encuentran en la tabla 3.1 del capítulo 3:

$$\bar{C}_R = \frac{\sum_i^n \left(\frac{V_{\text{AguaRet}}}{m_S} \right)}{n}$$

Donde:

\bar{C}_R : Capacidad de retención promedio del suelo, g/mL

i: Medición inicial, adim

n: Número de mediciones, adim

m_s : Masa de suelo pesada, g

V_{AguaRet} : Volumen de agua retenido por la muestra de suelo, mL

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$\bar{C}_R = \frac{\frac{110,00\text{mL}}{200,000\text{g}} + \frac{110,00\text{mL}}{200,000\text{g}} + \frac{106,00\text{mL}}{200,000\text{g}}}{3} = \frac{108,666666\text{mL}}{200,000\text{g}}$$

Determinando el error asociado a cada medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta C_R = \left| \frac{\partial C_R}{\partial V_{\text{AguaRet}}} \right| \times \Delta V_{\text{AguaRet}} + \left| \frac{\partial C_R}{\partial m_s} \right| \times \Delta m_s$$

Donde:

ΔC_R : Error asociado a la capacidad de retención del suelo, g/mL

$\Delta V_{\text{AguaRet}}$: Error asociado al volumen de agua retenido por la muestra de suelo, mL

Δm_s : Error asociado a la masa de suelo pesada, g

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta C_R = \left| \frac{1}{200,000\text{g}} \right| \times 0,01\text{mL} + \left| -\frac{110,00\text{mL}}{(200,000\text{g})^2} \right| \times 0,001\text{g} = 0,0001 \frac{\text{mL}}{\text{g}}$$

Por ser una sumatoria, calculamos el error de la capacidad de retención promedio como la suma de los errores asociados a cada medición:

$$\Delta \bar{C}_R = \sum_i^n \left(\left| \frac{\partial C_R}{\partial V_{\text{AguaRet}}} \right| \times \Delta V_{\text{AguaRet}} + \left| \frac{\partial C_R}{\partial m_S} \right| \times \Delta m_S \right)_i$$

Donde:

$\Delta \bar{C}_R$: Error asociado al calcular la capacidad de retención promedio del suelo, g/mL

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error de la capacidad de retención promedio, nos queda:

$$\Delta \bar{C}_R = 0,0001 \frac{\text{mL}}{\text{g}} + 0,0001 \frac{\text{mL}}{\text{g}} + 0,0001 \frac{\text{mL}}{\text{g}} = 0,0003 \frac{\text{mL}}{\text{g}}$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\bar{C}_R = \left(\frac{108,6666}{200} \pm 0,0003 \right) \text{mL/g}$$

3.-Masa de carbonato de calcio necesaria para encalar el total de la muestra de suelo.

Haciendo uso de la ecuación y tomando en cuenta los datos que se encuentran en el capítulo 3 en la tabla 3.2 de datos:

$$m_{\text{CaCO}_3} = \frac{m_m \times Fc_1 \times (m_{\text{CaCO}_3})_{\text{PE}}}{(m_m)_{\text{PE}}}$$

Donde:

m_{CaCO_3} : Masa de carbonato de calcio, g

m_m : Masa de la muestra de suelo a encalar, Kg

$(m_{CaCO_3})_{PE}$: Masa de $CaCO_3$ utilizada para encalar el suelo a pequeña escala, g

$(m_m)_{PE}$: Masa de la muestra de suelo encalada a pequeña escala, g

Fc_1 : Factor de conversión (1000 g/Kg)

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$m_{CaCO_3} = \frac{4,5000Kg \times \frac{1000g}{Kg} \times 0,453g}{150,002g} = 13,5898g$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta m_{CaCO_3} = \left| \frac{\partial m_{CaCO_3}}{\partial m_m} \right| \times \Delta m_m + \left| \frac{\partial m_{CaCO_3}}{\partial (m_{CaCO_3})_{PE}} \right| \times \Delta (m_{CaCO_3})_{PE} + \left| \frac{\partial m_{CaCO_3}}{\partial (m_m)_{PE}} \right| \times \Delta (m_m)_{PE}$$

Donde:

$\Delta m_{CaCO_3}, \Delta (m_{CaCO_3})_{PE}$: Error asociado al cálculo de la cantidad de $CaCO_3$, g

$\Delta m_m, \Delta (m_m)_{PE}$: Error asociado a la medición de la masa de suelo, g

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta m_{CaCO_3} = \left| \frac{Fc_1 \times (m_{CaCO_3})_{PE}}{(m_m)_{PE}} \right| \times \Delta m_m + \left| \frac{m_m \times Fc_1}{(m_m)_{PE}} \right| \times \Delta (m_{CaCO_3})_{PE} + \left| \frac{m_m \times Fc_1 \times (m_{CaCO_3})_{PE}}{[(m_m)_{PE}]^2} \right| \times \Delta (m_m)_{PE}$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta m_{CaCO_3} = \left| \frac{\frac{1000g}{Kg} \times 0,453g}{150,002g} \right| \times 0,0001Kg + \left| \frac{4,5000Kg \times \frac{1000g}{Kg}}{150,002g} \right| \times 0,001g + \dots$$

$$\dots + \left| \frac{4,5000Kg \times \frac{1000g}{Kg} \times 0,453g}{(150,002g)^2} \right| \times 0,001g = 0,01g$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$m_{CaCO_3} = (13,59 \pm 0,03)g$$

Los valores que fueron necesarios para encalar el suelo y lograr su neutralización, se encuentran en la tabla de datos A.13 del apéndice A.

4.-Cantidad de contaminante presente en el suelo

Haciendo uso de la ecuación III- 8 y tomando en cuenta los datos que se encuentran en el capítulo 3 en la tabla 3.4:

$$\%Asf_{MS} = \frac{m_{Asf}}{m_{Asf} + m_{MS}} \times 100\%$$

Donde:

$\%Asf_{MS}$: Porcentaje de asfaltenos presentes en la muestra de suelo, %

$m_{AsfAñadidos}$: Masa de asfaltenos presentes, g

m_{MS} : Masa de la muestra de suelo, g

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$\% \text{Asf}_{MS} = \frac{5,202g}{5,202g + 501,70g} \times 100\% = 1,02623\%$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta(\% \text{Asf}_{MS}) = \left| \frac{\partial(\% \text{Asf}_{MS})}{\partial m_{\text{Asf}}} \right| \times \Delta m_{\text{Asf}} + \left| \frac{\partial(\% \text{Asf}_{MS})}{\partial m_{MS}} \right| \times \Delta m_{MS}$$

Donde:

$\Delta(\% \text{Asf}_{MS})$: Error asociado al cálculo del porcentaje de asfaltenos presentes en la muestra de suelo, %

Δm_{Asf} : Error asociado a la medición de la masa de asfaltenos, g

Δm_{MS} : Error asociado a la medición de la masa de la muestra de suelo, g

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta(\% \text{Asf}_{MS}) = \left| \frac{(m_{MS})}{(m_{\text{Asf}} + m_{MS})^2} \times 100\% \right| \times \Delta m_{MS} + \left| -\frac{m_{\text{Asf}}}{(m_{\text{Asf}} + m_{MS})^2} \times 100\% \right| \times \Delta m_{\text{Asf}}$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta(\% \text{Asf}_{MS}) = \left| \frac{(501,7g)}{(5,202g + 501,7g)^2} \times 100\% \right| \times 0,01 + \dots$$

$$\dots + \left| -\frac{5,202g}{(5,202g + 501,70)^2} \times 100\% \right| \times 0,001g = 0,002\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\%Asf_{MS} = (1,026 \pm 0,002)\%$$

El porcentaje de asfaltenos de los diferentes crudos presentes en el suelo a través del tiempo para los tratamientos con bacterias y lombrices, se encuentran en las tablas 3.3 y 3.4 del capítulo III.

5.-Porcentaje de carbono orgánico

Haciendo uso de la ecuación III-9 del capítulo 3 y tomando en cuenta los datos que se encuentran en la figura c.4 del apéndice C:

$$\%CO = \frac{\%MO}{f_{MO}} \text{ (III - 9) (Marín et al, 2002)}$$

Donde:

$\%CO$: Porcentaje carbono orgánico, %

$\%MO$: Materia orgánica, %

f_{MO} : Factor (1,7 adim)

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$\%CO = \frac{52,37\%}{1,7} = 30,80588\%$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta\%CO = \left| \frac{\partial\%CO}{\partial\%MO} \right| \times \Delta\%MO$$

Donde:

$\Delta\%CO$: Error asociado a la medición del porcentaje de materia orgánica, %

$\Delta\%MO$: Error asociado a la medición del porcentaje de materia orgánica, %

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta\%CO = \left| \frac{1}{f_{MO}} \right| \times \Delta\%MO$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta\%CO = \left| \frac{1}{1,7} \right| \times 0,6\% = 0,4\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como y se encuentra en la tabla 4.8:

$$\%CO = (30,8 \pm 0,4)\%$$

6.-Porcentaje de macroelementos en cada microcosmo

Haciendo uso de la ecuación III-10 y tomando para cada microcosmo del tratamiento con lombrices un aproximado de 500 g de suelo y 176 g de estiércol equino y el porcentaje de nitrógeno en el suelo 0,145% (apéndice C, figura c.1):

$$\%M_N = \frac{m_{MS} \times \%N_S + m_{AE} \times \%ME_{AE}}{m_{MS} + m_{AE}} \quad (\text{III - 10}) \quad (\text{Brown } et \text{ al, 2005})$$

Donde:

$\%M_N$: Porcentaje de nitrógeno en el microcosmo, %

m_{MS} : Masa de la muestra de suelo agregada en el microcosmo, g

$\%N_S$: Porcentaje de nitrógeno presente en la muestra de suelo, %

m_{AE} : Masa del bioestimulante agregada al microcosmo, g

$\%ME_{AE}$: Porcentaje del macroelemento presente en el bioestimulante utilizado, %

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$\%M_N = \frac{500,000g \times 0,145\% + 176,000g \times 1,69}{500,000g + 176,000g} = 0,547\%$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta \%M_E = \left| \frac{\partial \%M_E}{\partial m_{MS}} \right| \times \Delta m_{MS} + \left| \frac{\partial \%M_E}{\partial \%ME_S} \right| \times \Delta \%ME_S + \left| \frac{\partial \%M_E}{\partial m_{AE}} \right| \times \Delta m_{AE} + \left| \frac{\partial \%M_E}{\partial \%ME_{AE}} \right| \times \Delta \%ME_{AE}$$

Donde:

$\Delta \%M_E$: Error asociado al porcentaje del macroelemento presente en el microcosmo, %

Δm_{MS} : Error asociado a la masa de la muestra de suelo agregada en el microcosmo, g

$\Delta \%ME_S$: Error asociado al porcentaje de nitrógeno presente en la muestra de suelo, %

Δm_{AE} : Error asociado a la masa del bioestimulante agregada al microcosmo, g

$\Delta \%ME_{AE}$: Error asociado al porcentaje del macroelemento presente en el bioestimulante utilizado, %

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta \%M_E = \left| \frac{m_{AE} (\%ME_S - \%ME_{AE})}{(m_{MS} + m_{AE})^2} \right| \times \Delta m_{MS} + \left| \frac{m_{MS}}{m_{MS} + m_{AE}} \right| \times \Delta \%ME_S + \dots$$

$$\dots + \left| \frac{m_{MS} (\%ME_S - \%ME_{AE})}{(m_{MS} + m_{AE})^2} \right| \times \Delta m_{AE} + \left| \frac{m_{AE}}{m_{MS} + m_{AE}} \right| \times \Delta \%ME_{AE}$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta \%M_E = \left| \frac{176,000g \times (0,145\% - 1,69)}{(500,000g + 176,000g)^2} \right| \times 0,001g + \left| \frac{500,000g}{500,000g + 176,000g} \right| \times 0,001\% + \dots$$

$$\dots + \left| \frac{500,000g \times (0,145\% - 1,69)}{(500,000g + 176,000g)^2} \right| \times 0,001g + \left| \frac{176,000g}{500,000g + 176,000g} \right| \times 0,02\% = 0,001\%$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$\%M_N = (0,550 \pm 0,001)\%$$

El cálculo de cada macroelemento debe hacerse tomando en cuenta todos los bioestimulantes añadidos al microcosmo, nótese que a los microcosmo del tratamiento con bacterias se les añadió una cantidad de medio mínimo mineral de

cultivo capítulo 3, el cual contiene Ca, Mg, P, K y N, los cuales se tomaron en cuenta para determinar los porcentajes de estos macronutrientes.

7.- Cálculo del porcentaje de degradación de los asfaltenos

Haciendo uso de la ecuación III-12 y tomando en cuenta los valores que se encuentran en las tablas de resultados del apéndice A, tabla A.43 **Hpatrón-bact** al inicio y tabla A.44 **Hpatrón-bact** en el día 4, se tiene:

$$\%D = \left(1 - \frac{\%As_T}{\%As_0} \right) \times 100 \quad \text{(III-12) (Carbognani *et al*, 1997)}$$

Donde:

$\%D$: Porcentaje de degradación de los asfaltenos, %.

$\%As_T$: Porcentaje de asfaltenos presentes en un tiempo de muestreo, %.

$\%As_0$: Porcentaje de asfaltenos presentes en el día cero de tratamiento, %.

Sustituyendo los valores:

$$\%D = \left(1 - \frac{1,329}{1,404} \right) \times 100 = 5,351880342\%$$

Luego se calcula la incertidumbre asociada al cálculo:

$$\Delta\%D = \left| \frac{\partial\%D}{\partial\%As_T} \right| \times \Delta\%As_T + \left| \frac{\partial\%D}{\partial\%As_0} \right| \times \Delta\%As_0$$

Derivando la expresión se tiene:

$$\Delta\%D = \left| \frac{100 \times \Delta\%As_T}{\%As_0} \right| + \left| -\frac{100 \times \%As_T \times \Delta\%As_0}{As_0^2} \right|$$

Donde:

$\Delta\%D$: Incertidumbre asociada al porcentaje de degradación de los asfaltenos, %.

$\Delta\%AS_T$: Incertidumbre del porcentaje de asfaltenos presentes en un tiempo de muestreo, %.

$\%AS_0$: Incertidumbre del porcentaje de asfaltenos presentes en el día cero de tratamiento, %.

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta\%D = \left| \frac{100 \times 0,002\%}{1,404\%} \right| + \left| - \frac{100 \times 1,329\% \times 0,002\%}{(1,404\%)^2} \right| = 0,155934204\% \cong 0,2\%$$

Finalmente el porcentaje de degradación de los asfaltenos en el día 4 del tratamiento **Hpatrón-bact** es $(5,4 \pm 0,2)$ %.

8.-Cálculo del área delimitada y respiración celular producida por los microcosmos (CO₂)

Área delimitada:

$$A = \frac{\pi}{4} \times (D_{\text{CápG}}^2 - D_{\text{CápP}}^2)$$

Donde:

A: Área delimitada para la respiración celular, cm²

$D_{\text{CápG}}$: Diámetro de la cápsula que delimita el área, cm

$D_{\text{CápP}}$: Diámetro de la cápsula que contiene la solución donde se recoge el CO₂, cm

π : Constante (3,1416 adim)

Sustituyendo los datos de apéndice A que se encuentran en la tabla A.51, se obtiene que:

$$A = \frac{3,1416}{4} \times [(9,50\text{cm})^2 - (6,6\text{cm})^2] = 36,67032\text{cm}^2$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta A = \left| \frac{\partial A}{\partial D_{\text{CápG}}} \right| \times \Delta D_{\text{CápG}} + \left| \frac{\partial A}{\partial D_{\text{CápP}}} \right| \times \Delta D_{\text{CápP}}$$

Donde:

ΔA : Error asociado al cálculo del área que delimita la respiración celular, cm^2

$\Delta D_{\text{CápG}}$: Error asociado a la medición del diámetro de la cápsula en posición invertida, cm

$\Delta D_{\text{CápP}}$: Error asociado a la medición del diámetro de la cápsula que contiene la solución para recoger CO_2 , cm

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta A = \left| \frac{\pi}{2} \times D_{\text{CápG}} \right| \times \Delta D_{\text{CápG}} + \left| \frac{\pi}{2} \times D_{\text{CápP}} \right| \times \Delta D_{\text{CápP}}$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta A = \left| \frac{\pi}{2} \times 9,50\text{cm} \right| \times 0,05\text{cm} + \left| \frac{\pi}{2} \times 6,6\text{cm} \right| \times 0,05\text{cm} = 0,2\text{cm}^2$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$A = (36,7 \pm 0,2)\text{cm}^2$$

Respiración celular (CO₂)

Haciendo uso de la ecuación III-13 y tomando en cuenta los datos que se encuentran en la tabla de datos:

$$\text{CO}_2 = (\text{VB}-\text{VM}) \times \text{N} \times \text{Z}/\text{A}_{\text{cápsula}} \times \text{Día} \quad \text{III- 13 (Martínez, 2007)}$$

Donde:

CO₂: Cantidad de CO₂ producido, $\frac{\text{mg}_{\text{CO}_2}}{(\text{día} \times \text{cm}^2)}$

VB: volumen de HCL gastado en el blanco o patrón P, mL

VM: Volumen de HCl gastado al titular la solución de los microcosmo de los tratamientos, mL

N: concentración de HCL para titular la muestra, eq/mL

Z: peso equivalente del CO₂, mg/eq

A: Área delimitada para la respiración celular, cm²

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtiene que:

$$CO_2 = (10,60mL - 10,35mL) \times \frac{0,1024N \times 22}{1 \times 36,67cm^2} = 0,0153585 \frac{mg}{cm^2 \text{ día}}$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales y despreciando el error ocasionado por el peso equivalente de CO₂ y la cantidad de días que la muestra se expuso a la recolección, se tiene:

$$\Delta CO_2 = \left| \frac{\partial CO_2}{\partial V_P} \right| \times \Delta V_P + \left| \frac{\partial CO_2}{\partial V_{BT}} \right| \times \Delta V_{BT} + \left| \frac{\partial CO_2}{\partial N_{\text{ácido}}} \right| \times \Delta N_{\text{ácido}} + \left| \frac{\partial CO_2}{\partial A} \right| \times \Delta A$$

Donde:

ΔCO_2 : Error asociado al cálculo de la respiración celular de los microcosmos,

ΔV_P : Error asociado a la medición del volumen de HCl gastado al titular la solución patrón, mL

ΔV_{BT} : Error asociado a la medición del volumen de HCl gastado al titular la solución de los microcosmos es de los tratamientos, mL

$\Delta N_{\text{ácido}}$: Error asociado a la concentración de HCl, N

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta CO_2 = \left| \frac{N_{\text{ácido}} \times PE_{CO_2}}{\text{día} \times A} \right| \times \Delta V_P + \left| -\frac{N_{\text{ácido}} \times PE_{CO_2}}{\text{día} \times A} \right| \times \Delta V_{BT} + \dots$$

$$\dots + \left| (V_P - V_{BT}) \times \frac{PE_{CO_2}}{\text{día} \times A} \right| \times \Delta N_{\text{ácido}} + \left| - (V_P - V_{BT}) \times \frac{N_{\text{ácido}} \times PE_{CO_2}}{\text{día} \times A^2} \right| \times \Delta A$$

Sustituyendo los valores necesarios para la estimación del error, nos queda:

$$\Delta CO_2 = \left| \frac{0,1024N \times 22}{1 \times 36,67cm^2} \right| \times 0,05mL + \left| -\frac{0,1024N \times 22}{1 \times 36,67cm^2} \right| \times 0,05mL + \left| (10,60mL - 10,35mL) \times \frac{22}{1 \times 36,67cm^2} \right| \times 0,0001N + \dots$$

$$\dots + \left| - (10,60mL - 10,35mL) \times \frac{0,1024N \times 22}{1 \times (36,67cm^2)^2} \right| \times 0,2cm^2 = 0,001 \frac{mg}{cm^2 \text{ día}}$$

Finalmente el valor puede ser reportado como:

$$CO_2 = (0,015 \pm 0,001) \frac{mL}{cm^2 \text{ día}}$$

La respiración celular de los microorganismos presentes en cada microcosmo para los diferentes crudos a través del tiempo, se encuentran en el apéndice A en las tablas A.54, A.55, A.57 y .58.

9.-Humedad presente en el suelo

Haciendo uso de la ecuación III-4 del capítulo III y tomando en cuenta los datos que se encuentran en el apéndice A desde la tabla A.17 a la 32 se tiene:

$$\%H_S = \left(\frac{M_{CPSH} - M_{CPS}}{M_{CPS} - M_{CPV}} \right) \times 100 \quad (\text{III - 4}) \quad (\text{Himmelblau, 1998})$$

Donde:

$\%H_S$: Porcentaje de humedad del suelo, %.

M_{CPSH} : Masa de la cápsula de Petri con el suelo húmedo, g.

M_{CPS} : Masa de la cápsula de Petri con el suelo seco, g.

M_{CPV} : Masa de la cápsula de Petri vacía, g.

Sustituyendo los valores de la tabla A.25 del día cero **Hbact 1,2,3** en la ecuación, se tiene que:

$$\%H_s = \frac{54,428\text{g} - 50,410\text{g}}{50,410\text{g} - 34,434\text{g}} \times 100 = 25,15022534\%$$

Luego se calcula la incertidumbre asociada al cálculo:

$$\Delta\%H_s = \left| \frac{\partial\%H_s}{\partial M_{\text{CPSH}}} \right| \times \Delta M_{\text{CPSH}} + \left| \frac{\partial\%H_s}{\partial M_{\text{CPS}}} \right| \times \Delta M_{\text{CPS}} + \left| \frac{\partial\%H_s}{\partial M_{\text{CPV}}} \right| \times \Delta M_{\text{CPV}}$$

Derivando la expresión se tiene:

$$\Delta\%H_s = \left| \frac{100 \times \Delta M_{\text{CPSH}}}{M_{\text{CPS}} - M_{\text{CPV}}} \right| + \left| \frac{100 \times (M_{\text{CPV}} - M_{\text{CPSH}}) \times \Delta M_{\text{CPS}}}{(M_{\text{CPS}} - M_{\text{CPV}})^2} \right| + \left| \frac{100 \times (M_{\text{CPSH}} - M_{\text{CPS}}) \times \Delta M_{\text{CPV}}}{(M_{\text{CPS}} - M_{\text{CPV}})^2} \right|$$

Donde:

$\Delta\%H_s$: Incertidumbre asociada al porcentaje de humedad del suelo, %.

ΔM_{CPSH} : Incertidumbre de la masa de la cápsula de Petri con el suelo húmedo, g.

ΔM_{CPS} : Incertidumbre de la masa de la cápsula de Petri con el suelo seco, g.

ΔM_{CPV} : Incertidumbre de la masa de la cápsula de Petri vacía, g.

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta\%H_s = \left| \frac{100 \times 0,001\text{g}}{(50,410 - 34,434)\text{g}} \right| + \left| \frac{100 \times (34,434 - 54,428)\text{g} \times 0,001\text{g}}{((50,410 - 34,434)\text{g})^2} \right| + \dots$$

$$\dots \left| \frac{100 \times (54,428 - 50,410) \text{g} \times 0,001 \text{g}}{((50,410 - 34,434) \text{g})^2} \right| = 0,156511864\% \cong 0,2\%$$

Finalmente la humedad del suelo es $(25,2 \pm 0,2) \%$.

10.-Contenido alifático

Haciendo uso de la ecuación:

$$\% Al = \frac{A_{AL}}{A_{AR} + A_{AL}} \times 100 \quad (\text{B-3}) \quad (\text{Acevedo, 2009})$$

Donde:

$\% Al$: Porcentaje de área alifática del asfalto, %.

A_{AL} : Área de la zona alifática del asfalto, m^2 .

A_{AR} : Área de la zona aromática del asfalto, m^2 .

Sustituyendo los datos correspondientes, se tiene:

$$\% Al = \frac{1 \text{m}^2}{0,72 \text{m}^2 + 1 \text{m}^2} \times 100 = 58,134\%$$

Finalmente el porcentaje de área alifática presente en los asfaltos es 58 %.

Luego se calcula la incertidumbre asociada al cálculo:

$$\Delta \% Al = \left| \frac{\partial Al}{\partial A_{AL}} \right| \times \Delta A_{AL} + \left| \frac{\partial Al}{\partial A_{AR}} \right| \times \Delta A_{AR}$$

Derivando la expresión se tiene:

$$\Delta \% Al = \left| \frac{100 \times \Delta A_{AL} \times A_{AR}}{(A_{AL} + A_{AR})^2} \right| + \left| \frac{100 \times \Delta A_{AR} \times A_{AL}}{(A_{AL} + A_{AR})^2} \right|$$

Donde

$\Delta\% Al$: Incertidumbre asociada al porcentaje de contenido alifático del asfalteno, %.

ΔA_{AL} : Incertidumbre del área de la zona alifática del asfalteno, m^2 .

ΔA_{AR} : Incertidumbre del área de la zona aromática del asfalteno, m^2 .

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta\% Al = \left| \frac{100 \times 0,01m^2 \times 0,72m^2}{(1m^2 + 0,72m^2)^2} \right| + \left| -\frac{100 \times 0,01m^2 \times 1m^2}{(1m^2 + 0,72m^2)^2} \right| = 0,5817\% \cong 1\%$$

Finalmente el porcentaje de área alifática presente en los asfaltenos es $(58 \pm 1) \%$.

El porcentaje de contenido aromático se determina de igual forma que el alifático, estos valores, se encuentran en el capítulo 4 en la tabla 4.11 y 4.12.

11.-Relación hidrógeno carbono

Para la relación hidrógeno carbono se tiene:

$$H / C = \frac{\frac{\% H}{ma_H}}{\frac{\% C}{ma_C}} \quad (\text{Acevedo, 2009})$$

Donde:

H / C : Relación hidrógeno carbono, adim

$\% H$: Porcentaje de protones presentes en la muestra, %

ma_H : Masa atómica del hidrógeno, g/mol

$\% C$: Porcentaje de carbono presente en la muestra, %

ma_C : Masa atómica del carbono, g/mol

Sustituyendo los valores en la ecuación, se tiene que:

$$H / C = \frac{\frac{7,9}{1,0079}}{\frac{85,96}{12,011}} = 1,0952$$

Determinando el error asociado a la medición, utilizando el método de las derivadas parciales, se tiene:

$$\Delta H / C = \left| \frac{\partial H / C}{\partial \% H} \right| \times \Delta \% H + \left| \frac{\partial H / C}{\partial \% C} \right| \times \Delta \% C$$

Donde:

$\Delta H / C$: Error asociado a la relación hidrógeno carbono, adim

$\Delta \% H$: Error asociado al porcentaje de protones presentes en la muestra, %

$\Delta \% C$: Error asociado al porcentaje de carbono presente en la muestra, %

Derivando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta H / C = \left| \frac{ma_C}{ma_H \times \% C} \right| \times \Delta \% H + \left| -\frac{\% H \times ma_C}{ma_H \times \% C^2} \right| \times \Delta \% C$$

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\Delta H / C = \left| \frac{12,011}{1,0079 \times 85,96} \right| \times 0,01 + \left| -\frac{7,9 \times 12,011}{1,0079 \times (85,96)^2} \right| \times 0,01 = 0,01$$

Finalmente, el valor puede ser reportado como: $H / C = (1,10 \pm 0,01)$ adim.

APÉNDICE E

MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

E.1 Métodos para la caracterización del suelo

Los análisis fisicoquímicos del suelo se realizaron en el laboratorio general de suelos del Instituto de Edafología de la Universidad Central de Venezuela siguiendo las normas citadas en la metodología.

E.1.1 Determinación de pH en suspensiones suelo:agua 1:1

Materiales y equipos:

Potenciómetro y electrodo de vidrio

Fiolas de 250 ml

Agitador mecánico

Varillas de agitación.

Reactivos:

Solución de cloruro de potasio (KCl) 1N

Soluciones buffer de pH4 y pH7

Procedimiento:

pH en agua 1:1: En una fiola de 250 mL se colocan 60,0 g de suelo y 60 mL de agua destilada. Se coloca un agitador mecánico durante 30 minutos. Se enciende el aparato por 30 minutos y luego se calibra utilizando las soluciones buffer. Una vez calibrado el aparato, se procede a la lectura, agitando la suspensión con la varilla antes de introducir el electrodo. Esto puede hacerse 3 ó 4 veces para lograr mayor precisión, tomando como pH un valor promedio.

E.1.2 Determinación de la conductividad eléctrica (sales solubles)

Materiales y equipos:

Conductímetro provisto de celda de conductividad

Procedimiento: En la solución preparada para medir pH 1:1 se mide conductividad eléctrica o salinidad total del suelo.

E.1.3 Clasificación textural por el método de los Bouyoucos

Metodología: Método de Bouyoucos modificado

Materiales y equipos:

Densímetro ASTM Soil hydrometer 152H Temp. 68°F con escala en g/l

Probeta graduada de 1L, con señal de enrase de 1000 mL a unos 50 cm del fondo

Reactivos:

Dispersante: Metafosfato de sodio y carbonato de sodio

Alcohol etílico

Procedimiento:

Se pesan 50,0g de suelo seco provenientes de la muestra preparada. Se coloca en frascos grandes de boca ancha y se añaden 10,0mL de dispersante, más aproximadamente 400,0mL de agua destilada. Se deja reposar durante 30 minutos.

Terminado el reposo se agita por 10 minutos. Muestras de suelos arenosos pueden requerir sólo 5 minutos, mientras que los suelos arcillosos deben agitarse durante 30 minutos. El material se pasa a una probeta de 1000mL procurando que no queden en el frasco restos de suelo.

Con el densímetro en la probeta, se enrasa con agua destilada a 1000mL. Si se observa algo de espuma en el borde superior del líquido, se añaden unas gotas de alcohol.

Lecturas:

A los 40 segundos de introducido el densímetro, se procede a leer. Además, se toma nota de la temperatura que marca el termómetro introducido en la probeta. Esta lectura corresponde a la cantidad de limo y arcilla en suspensión. Se retira el densímetro y se coloca en una probeta con agua limpia

A las 5 horas se incorpora de nuevo el densímetro y se procede a efectuar la segunda lectura e igualmente se lee la temperatura de la solución. Esta lectura, corresponde a la cantidad de arcilla en suspensión.

Cálculos:

$$\% \text{ de arena} = 100 - (\text{lectura corregida a los } 40s \times 2)$$

$$\% \text{ de arcilla} = \text{lectura corregida a las } 5h \times 2$$

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

Para la clasificación textural se toman los resultados y se compara con el triángulo textural o con la tabla presentada a continuación:

Tabla E.1

Clasificación textural de la muestra de suelo analizada de acuerdo al tamaño de las partículas primarias

Textura	Límite de partículas primarias		
	Arena	Limo	Arcilla
Arenosa (a)	85-100	0-15	0-10
Arenoso franca (aF)	70-90	0-30	0-15
Franco arenosa (Fa)	43-85	0-50	0-20
Franca (F)	23-52	28-50	7-27
Franco limosa (FL)	0-50	50-88	0-27
Limosa (L)	0-20	80-100	0-12
Franco arcillo arenosa (FAa)	45-80	0-28	20-35
Franco arcillosa (FA)	20-45	15-53	27-40
Franco arcillo limosa (FAL)	0-20	40-73	27-40
Arcillo arenosa (Aa)	45-65	0-20	35-55
Arcillo limosa (AL)	0-20	40-60	40-60
Arcillosa (A)	0-45	0-40	40-100

E.1.4 Determinación de la materia orgánica (carbono orgánico)

Metodología: Walkley – Black. Por oxidación de la materia orgánica usando ácido crómico y H_2SO_4 .

Materiales y equipos:

Fotoclorímetro Klett con filtro color caramelo 56-59

Centrífuga

Tubos de ensayos

Mortero de porcelana

Reactivos:

Solución de glucosa al 2,7525%

Dicromato de potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado

Procedimiento:

Preparación de la muestra: Se pesan 0,1g de suelo previamente macerado. Se coloca en un tubo de ensayo y se añade 0,1mL de agua destilada.

Preparación del blanco: En un tubo de ensayo se coloca 1,0mL de agua destilada.

El siguiente procedimiento se aplica por igual a la muestra, a los patrones y al blanco: a cada tubo se añaden 2,0mL de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) al 8% y 3,0mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (96% aproximadamente). Se deja enfriar y se añade a cada tubo 10,0mL de agua destilada.

La muestra se transfiere (parcialmente) a un tubo de centrífuga colocado en el aparato de centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. La muestra centrifugada, los patrones y el blanco se pasan a unos tubos Klett y se hace la lectura en el fotocolorímetro (filtro color caramelo).

Cálculos:

Para cada patrón se calcula una constante (K).

$$K = \frac{C_p}{L_p}$$

$$\%CO = L_m \times \bar{K} \times 1,32$$

$$\%MO = \%CO \times 1,724$$

Donde:

K: Constante de cada patrón

C_p: Concentración del patrón

L_p: Lectura del patrón

L_m: Lectura de la muestra

\bar{K} : Promedio de las constantes

%CO: Porcentaje de carbono orgánico

%MO: Porcentaje de materia orgánica

E.1.5 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico

Metodología: Uso del cloruro de bario trietanolamina pH 8,2

Materiales y equipos:

Embudo para CIC

Balón aforado de 100mL

Frascos de 250mL con tapa

Centrífuga y tubos de centrífuga

Estufa

Fotoclorímetro y tubos Klett

Espectrofotómetro de absorción atómica

Reactivos:

Acetato de amonio (CH₃COONH₄) 1N, pH 7

Ácido clorhídrico 0,1 N

Cloruro de bario puro

Cloruro de bario (BaCl_2) al 2,5% trietanolamina pH 2

Cloruro de calcio (CaCl_2) al 5%

Cromato de potasio (KCrO_4) al 10%

Cromato de bario (BaCrO_4) saturado

Ácido clorhídrico (HCl) 1:4

Patrones para la determinación de Ca, K, Mg y Na

Procedimiento:

Se pesan 5,0 g de suelo y se colocan en un embudo para CIC (embudo de vidrio con papel triturado en el fondo, y sobre éste, papel de filtro). Sobre el suelo se coloca papel de filtro de modo de evitar el impacto directo al hacer los lavados.

Se lava la muestra con cinco (5) porciones de 20mL de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y se recoge en un balón aforado de 100mL, haciendo un lavado de las paredes del embudo con la última porción de 20 mL de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Se afora con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1N y se hace la lectura de las bases en el fotómetro de llama y el equipo de absorción atómica

Capacidad de intercambio catiónico: la muestra en el embudo se lava con cinco (5) porciones de 20mL de BaCl_2 en TEA pH 8,2, luego con 25mL de BaCl_2 al 2,5% y después con 4 porciones de 25mL de agua destilada. Se descartan los lavados.

Se lava con cinco (5) porciones de 20mL de CaCl_2 y se recoge el filtrado en frascos de 250mL. Se hace un blanco con 100mL de CaCl_2 5%.

El siguiente procedimiento se sigue por igual para las muestras, los patrones y el blanco:

Se toma una alícuota de 10mL y se lleva a un tubo de centrifuga. Se añade 1,0mL de K_2CrO_4 al 10% y se coloca en un “baño de María” durante 30 minutos. Se deja enfriar y se coloca en la centrifuga a 2500rpm por 30 minutos.

Se elimina el sobrenadante y se añaden 10mL de BaCrO₄ saturado y se lleva a centrífuga a 2500rpm por 30 minutos. Este paso se repite por triplicado.

Se elimina el sobrenadante y se lava con 10mL de agua destilada. Se lleva a centrífuga a 2500rpm durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante y se coloca en la estufa a 80°C por 24h. Se añaden 5,0mL de HCl 1:4 y se agita a mano; se añaden 5,0mL más de HCl 1:4 y se pasa a un tubo Klett. Se lee en el fotocolorímetro con filtro azul N°42.

Cálculos:

Capacidad de intercambio catiónico: Se aplican la siguiente ecuación

$$K = \frac{Cp}{Lp}$$
$$Cm = \bar{K} \times Lm$$

Donde:

Cm: Concentración de la muestra en meq Ba/100g de suelo

Lm: Lectura de la muestra

K: Constante de cada patrón

Cp: Concentración del patrón en meq Ba/100g de suelo

Lp: Lectura del patrón

\bar{K} : Promedio de las constantes

E.1.6 Determinación de nitrógeno total

Metodología: Kjeldhal modificado, semi-micro

Materiales y equipos:

Balanza analítica

Unidad de digestión marca tecator (40 tubos de 100mL)

Unidad de destilación semi-micro Kjeldhal

Erlenmeyers de 125mL

Bureta

Probetas

Balones Kjeldhal de 300mL

Reactivos:

Catalizador: (HgO, Se, CuSO₄·5H₂O, Na₂SO₄)

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,05N (Titrizol)

Hidróxido de sodio (NaOH) al 50%

Cloruro de bario puro

Alcohol etílico 100%

Mezcla de indicadores (verde bromocresol y rojo de metilo) y ácido bórico (H₃BO₃) al 2%

Piedra pómez

Procedimiento

Digestión: Se pesan 0,5g de la muestra de suelo y se colocan en el tubo. Se agregan 1,5g del catalizador, 5mL de ácido sulfúrico concentrado y se coloca en la unidad de digestión durante cuatro (4) h.

Destilación: Se transfiere el contenido del tubo a un balón Kjeldhal de 100mL. Se lava el tubo con 4 porciones de 10mL de agua destilada, vertiendo las aguas de lavado en el balón. Se coloca en el extremo del refrigerante un erlenmeyer de 125mL con mezcla H₃BO₃ e indicadores. Se coloca el balón en la unidad de destilación y se le agregan 25mL de NaOH al 50%. Se hace la destilación completa hasta aproximadamente 75mL de la fiola. Se retira y se titula el amoníaco destilado con ácido sulfúrico 0,05N hasta obtener el punto final (violeta pálido).

Cálculos

$$\%Nitrógeno\ total = 0,14 \times V$$

Donde:

V: volumen (mL) gastado de H₂SO₄ 0,05N durante la titulación del amoníaco.

E.1.7 Determinación de fósforo

Método colorimétrico (formación del color amarillo por el complejo vanadomolibdo-fosfórico, en un sistema acidificado con solución “Carolina del Norte”).

Materiales y equipos:

Fotocolorímetro con filtro azul N°2

Tubos para fotocolorímetro

Reactivos:

Reactivo vanadato-molibdato

Solución extractora Carolina del Norte (CN: HCl 0,05N y H₂SO₄ 0,025N)

Solución madre de 100 ppm de fósforo (a partir de KH₂PO₄) en H₂O

Ácido nítrico (HNO₃) concentrado (65%)

Procedimiento:

Se preparan los patrones.

Preparación del blanco y la muestra: A partir del extracto de suelo (obtenido con solución extractora CN) se toman 4,0mL y se colocan en un tubo para fotocolorímetro. El blanco consiste en 4,0mL de solución extractora CN.

Tratamiento de patrones, blanco y muestra: a cada tubo se añade 1,0mL del reactivo vanadato-molibdato. Se agitan bien manualmente y se dejan en reposo durante 30 minutos. Se ajusta el fotocolorímetro con el blanco y se hacen las lecturas con filtro azul #42.

Cálculos

$$K = \frac{C_p}{L_p}$$
$$C = \bar{K} \times L_m$$

Donde:

Cm: Concentración de fósforo en la muestra en ppm

Lm: Lectura de la muestra

K: Constante de cada patrón

C: Concentración de fósforo del patrón

Lp: Lectura del patrón

\bar{K} : Promedio de las constantes

E.1.8 Determinación de calcio, potasio, sodio y magnesio

Metodología: Lectura directa en el espectrofotómetro de absorción atómica, a partir del extracto de suelo obtenido con solución extractora Carolina del Norte.

Materiales y equipos:

Espectrofotómetro de absorción atómica

Reactivos:

Patrones para cada elemento

Solución Carolina del Norte

El aparato es calibrado usando el blanco y los patrones. La lectura de la muestra se hace siguiendo las instrucciones del equipo.

Cálculos:

$$\text{ppm del elemento en el suelo} = \text{lectura} \times A$$

La lectura viene expresada en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$), pero se utilizó una relación suelo: solución extractora de 1:4, la lectura se multiplica por 4 a fin de reportar los resultados.

E.2 Métodos para análisis microbiológico

Los ensayos para la determinación de la carga bacteriana presente en el suelo se efectuaron en el Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC). La metodología seguida se fundamenta en los “Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (1992)”.

Materiales y equipos:

Cápsulas o placas de Petri

Pipeta

Tubos de ensayo

Incubadora

Reactivos:

Agua peptonada al 0,1%

Agar nutritivo

Dilución de la muestra de suelo: Se toma una muestra de aproximadamente 15g de suelo y se diluye en agua peptonada al 0,1% en proporción 1:10. El agua peptonada se utiliza para las diluciones de microorganismos en grandes cantidades para su conteo. Posteriormente se prepara una solución 1:100 (10^{-2}) colocando en un tubo de ensayo una alícuota de 1 mL de la solución 1:10 (10^{-1}) y completando con 9 mL de agua destilada; seguidamente, se toma 1mL de la solución 1:100 (10^{-3}) y se completa con agua destilada hasta 10 mL y así sucesivamente se hace el montaje hasta alcanzar diluciones de 10^{-7} ó 10^{-8} .

Recuento heterótrofo de placa: La determinación de la carga bacteriana se realizó de acuerdo al método de placa fluida descrito en la sección 9215-B de la norma.

Siembra:

Vertido en las placas con agar nutritivo: Se elige un número de muestras para la siembra de tal manera que no transcurran más de 20 min (preferiblemente 10) entre la dilución de la primera muestra y la adición del medio a la última placa de la serie. Se vierten al menos 10 -12 mL de medio licuado, mantenido a 44 – 46°C en cada cápsula de Petri, levantando suavemente la tapa lo suficiente para introducir el medio evitando el vertido fuera del envase o en los bordes del disco. Una vez añadido el medio, se mezcla cuidadosamente el líquido con la porción de muestra en estudio previamente colocada en la placa, cuidando de no proyectar la mezcla contra el borde, girando primero el disco en una dirección y luego en la contraria o rotando e inclinando a la vez.

Se dejan solidificar las placas por 10 minutos, se invierten y se colocan en la incubadora. Los valores reportados por el análisis corresponden a la cantidad de aerobios mesófilos presentes en la muestra.

E.3 Método para la realización de análisis elemental

Descripción general: El principio del análisis es la combustión completa de la muestra para generar CO₂ (carbono), H₂O (hidrógeno), N₂ (nitrógeno) y SO₂ (azufre). Estos gases son separados mediante una columna cromatográfica y se determinan las cantidades de los elementos por integración de las señales.

Es conveniente destacar que el nitrógeno no sale en formando óxidos de nitrógeno, que son más difíciles de cuantificar, sino como nitrógeno elemental, debido a que el equipo dispone de una columna de reducción que logra esto sin afectar los demás gases. El equipo utilizado en el proceso es un analizador elemental C, H, N, S y O, marca Carlo Erba (actualmente grupo Thermo), modelo EA 1108.

E.4 Método para la realización de análisis espectroscópicos

E.4.1 Realización de la técnica de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Descripción general del procedimiento: Por tratarse de una muestra sólida, la técnica consiste en la preparación de una pastilla prensada. Para ello se coloca en un pequeño mortero bien seco 100 mg bromuro de potasio (KBr) y aproximadamente 1 mg de la muestra de asfalteno y se tritura. La finalidad de usar bromuro de potasio se basa en la propiedad que posee esta sal de formar discos transparentes cuando el material en polvo y seco es sometido a presión con aplicación simultánea de vacío.

Estos discos translúcidos tienen excelente transmisión en la zona IR y las bandas de absorción corresponden exclusivamente a la muestra, excepto cuando existen bandas debidas a agua residual. Esta condición se evita secando la muestra y controlando la humedad en el lugar donde se realiza el análisis.

Una vez triturado el material, se pasa a un disco el cual se introduce en un porta – prensa que hace las veces de un alicate de presión y forma la pastilla. El disco se retira y se coloca en el espectrómetro de infrarrojo FTIR – 8400S, donde se procesa la muestra y se registra el espectro en una computadora acoplada al equipo.

E.4.2 Realización de la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN ¹³C)

Descripción general del procedimiento: Para obtener los valores de desplazamiento químico se diluye aproximadamente 1 mg de la muestra de asfalteno en cloroformo deuterado (CDCl₃-*d*) y se coloca en el espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker-Avance 300MHz durante 4 horas. El espectro obtenido es registrado en una computadora acoplada al equipo.

APÉNDICE F
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1.-Estadística de los diferentes tratamientos de asfalteno ayacucho (hamaca).

-Respiración celular (CO₂)

```

Statistix 8.0
Randomized Complete Block AOV Table for RESPIRACI

Source      DF      SS      MS      F      P
D           19     0.00139  7.330E-05
MICROCOSM   3     0.00052  1.729E-04  12.77  0.0000 ←
Error       57     0.00077  1.354E-05
Total       79     0.00268

Grand Mean 0.0131    CV 28.09    ←

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity
Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity 1     2.031E-06  2.031E-06  0.15  0.7022
Remainder    56     7.699E-04  1.374E-05

Relative Efficiency, RCB 2.06 ←

Means of RESPIRACI for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean
1           0.0096
2           0.0159
3           0.0119
4           0.0152
Observations per Mean          20
Standard Error of a Mean       8.229E-04
Std Error (Diff of 2 Means)   1.163E-03
    
```

Figura F.1. Resultados del análisis de varianza de la respiración celular asfalteno ayacucho

```

Statistix 8.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of RESPIRACI for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean   Homogeneous Groups
2           0.0159   A
4           0.0152   A
3           0.0119   B
1           0.0096   B

Alpha          0.05    Standard Error for Comparison 1.163E-03
Critical Q Value 3.743    Critical Value for Comparison 3.080E-03
Error term used: D*MICROCOSM, 57 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura F.2. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la respiración celular asfalteno ayacucho

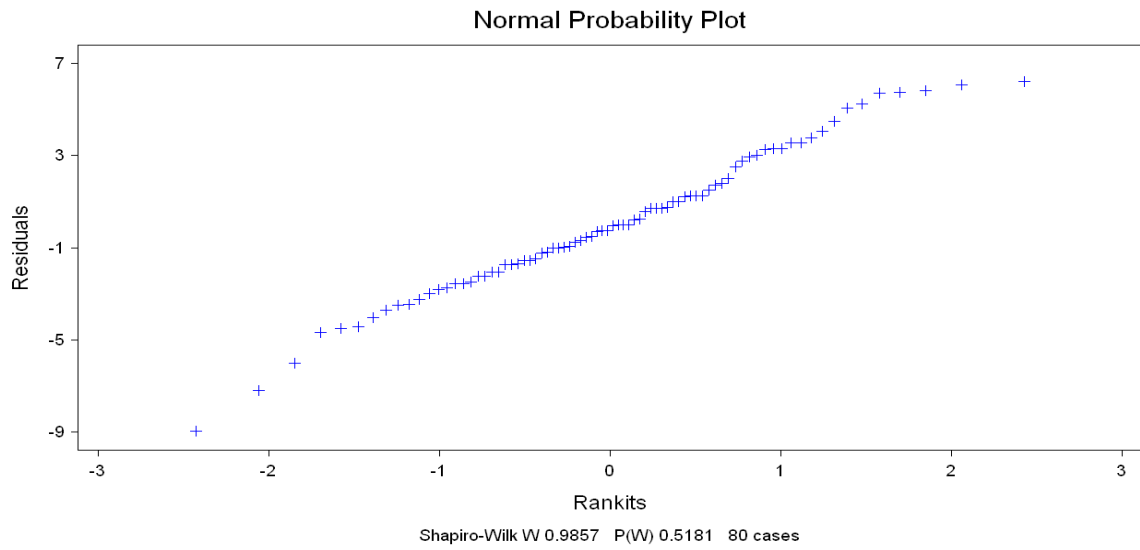


Figura F.3. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno ayacucho

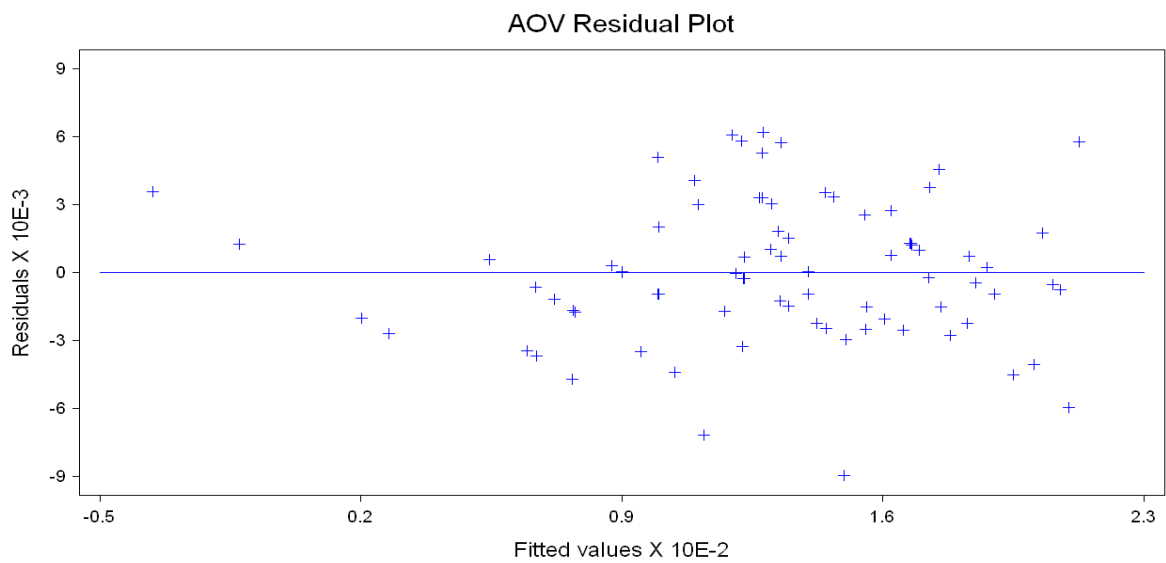


Figura F.4. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno ayacucho

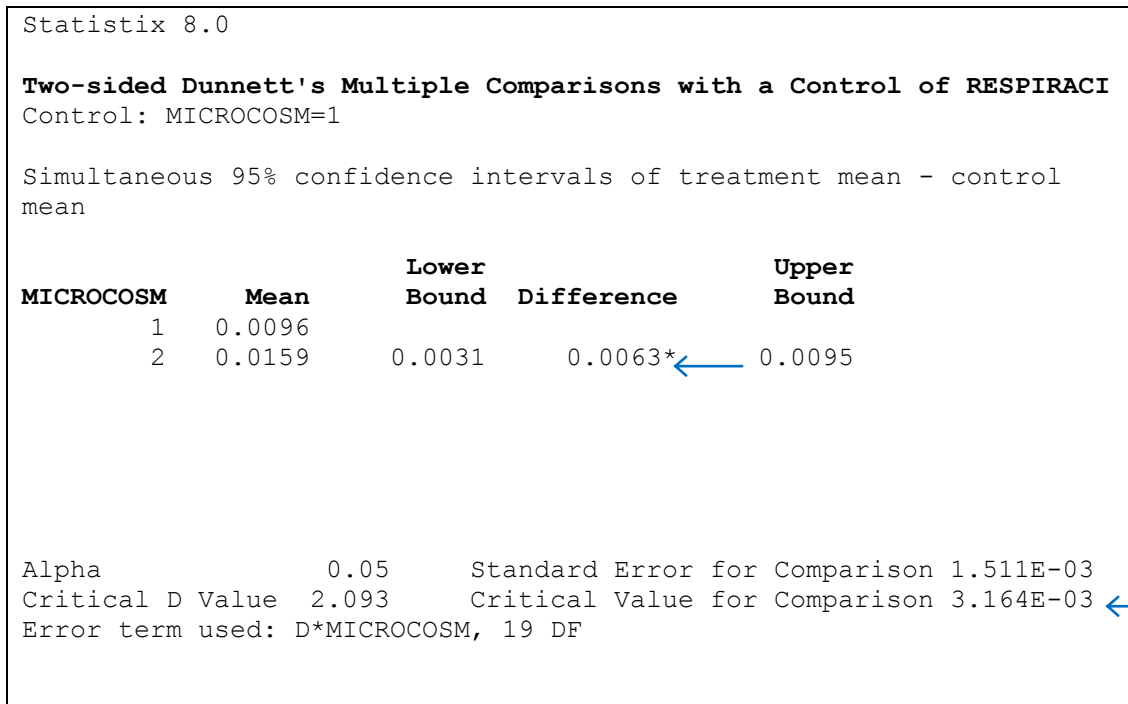


Figura F.5. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para respiración celular asfalteno ayacucho

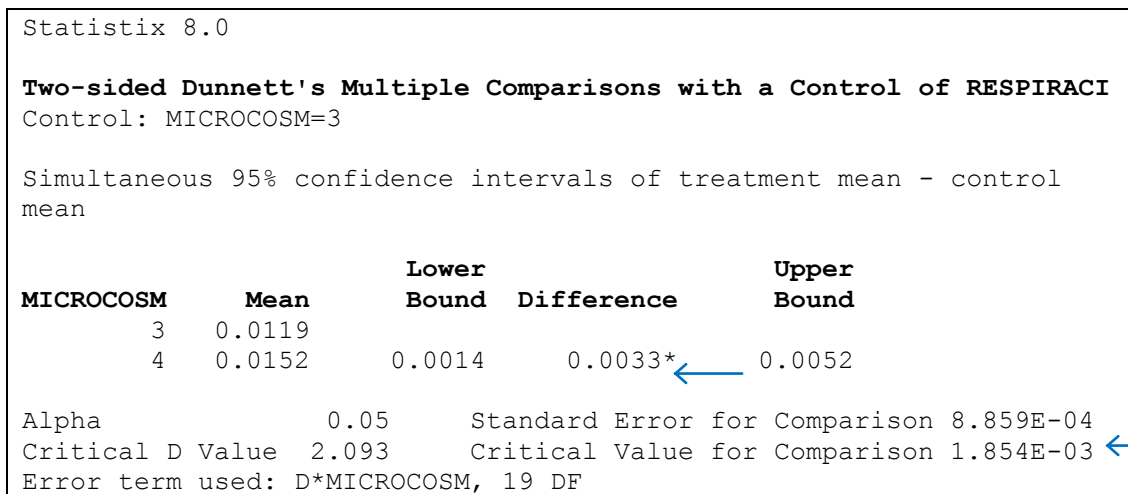


Figura F.6. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para respiración celular asfalteno ayacucho

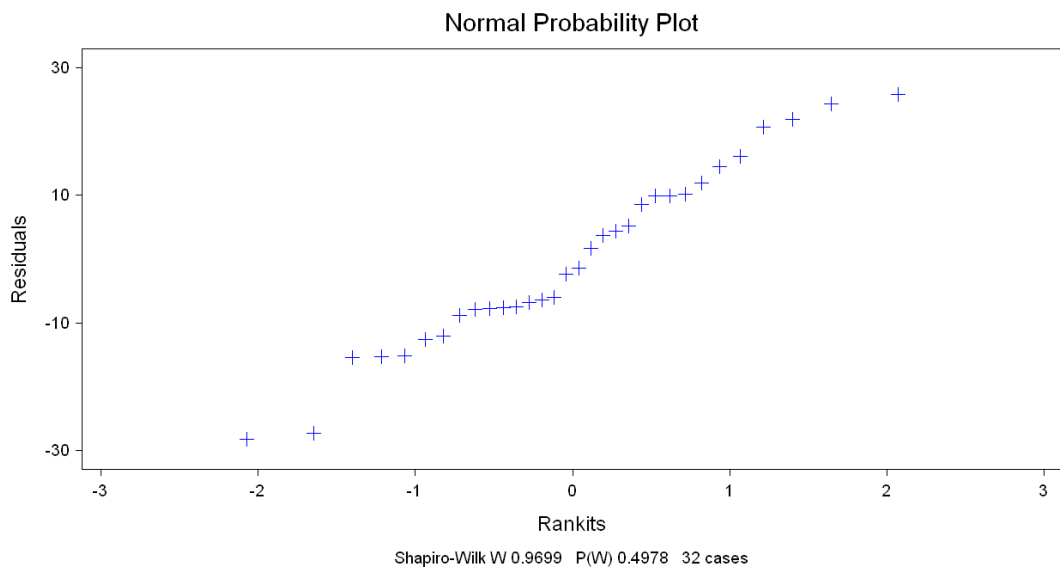


Figura F.9. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de la degradación de asfalto ayacucho

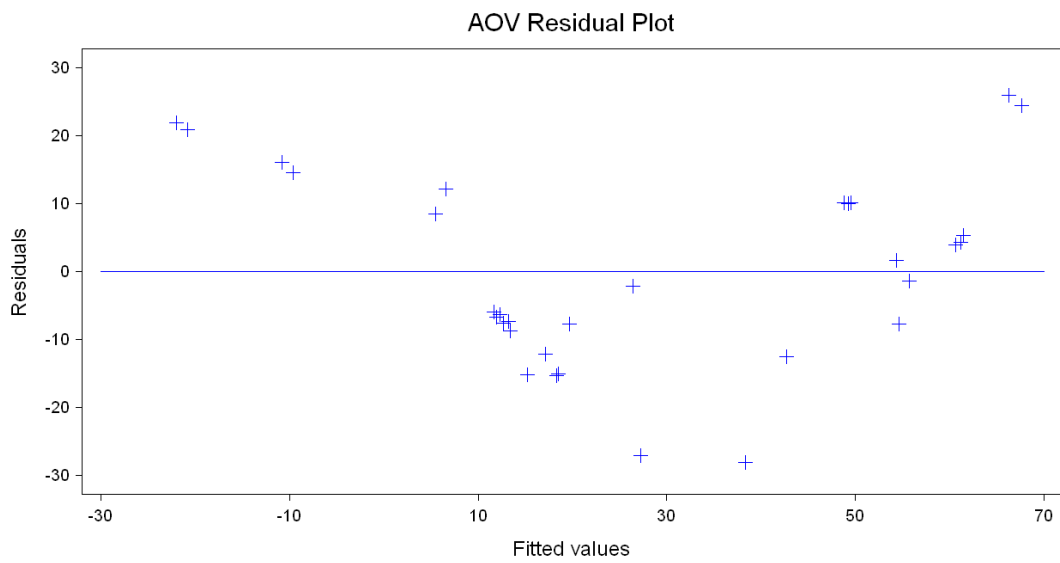


Figura F.10. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de la degradación de asfalto ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of DEGRADACI
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	6.713			
2	54.688	20.210	47.975*	75.740

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 11.734
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 27.765
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.11. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control en la degradación de asfalteno ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of DEGRADACI
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	5.588			
4	42.800	18.894	37.213*	55.531

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 7.7416
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 18.318
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.12. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control en la degradación de asfalteno ayacucho

- Potencial de acidez.

```

Statistix 8.0

Randomized Complete Block AOV Table for PH

Source      DF      SS      MS      F      P
D           7      0.45120  0.06446
MICROCOSM  3      0.08176  0.02725  4.76  0.0110
Error      21      0.12032  0.00573
Total      31      0.65327

Grand Mean 6.9709    CV 1.09

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity 1      0.04610  0.04610  12.42  0.0021
Remainder   20      0.07422  0.00371

Relative Efficiency, RCB 3.31

Means of PH for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean
1      6.9275
2      7.0363
3      6.9162
4      7.0038

Observations per Mean      8
Standard Error of a Mean    0.0268
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0378
    
```

Figura F.13. Resultados del análisis de varianza del potencial de acidez asfalteno ayacucho

```

Statistix 8.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PH for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean  Homogeneous Groups
2      7.0363  A
4      7.0038  AB
1      6.9275  B
3      6.9162  B

Alpha      0.05      Standard Error for Comparison 0.0378
Critical Q Value 3.943      Critical Value for Comparison 0.1055
Error term used: D*MICROCOSM, 21 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura F.14. Resultados de la prueba de Tukey aplicada al potencial de acidez asfalteno ayacucho

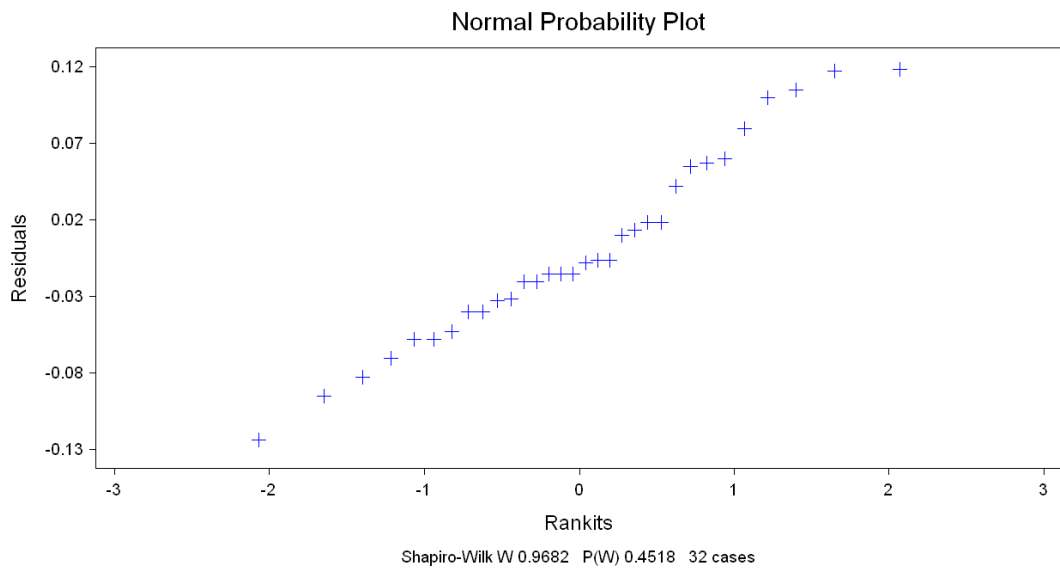


Figura F.15. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de potencial de acidez asfalteno ayacucho

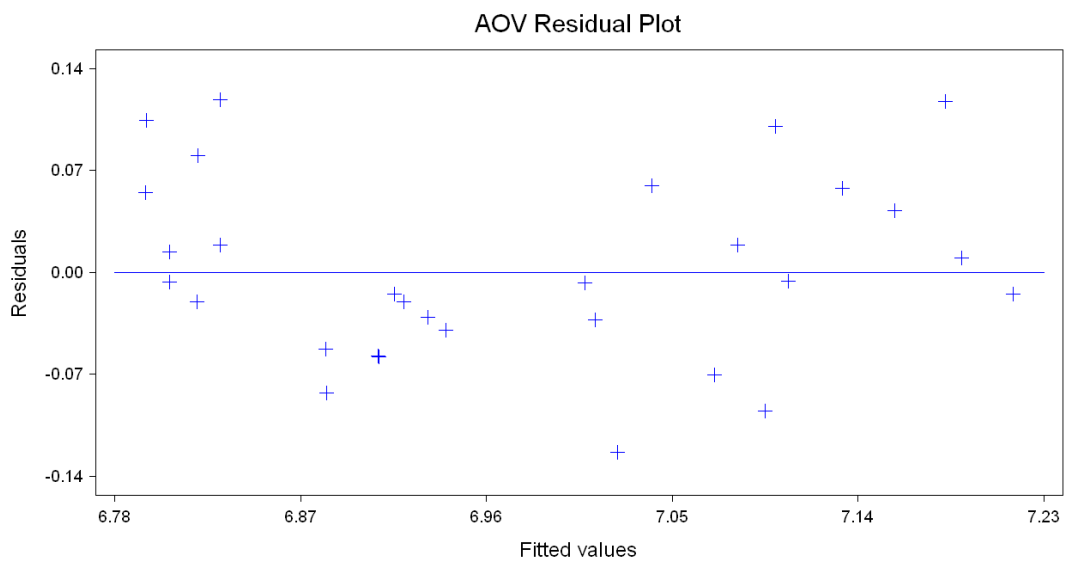


Figura F.16. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados del potencial de acidez asfalteno ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of PH
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	6.9275			
2	7.0363	0.0246	0.1088*	0.1929

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0356
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 0.0842
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.17. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para potencial de acidez asfalteno ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of PH
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	6.9163			
4	7.0038	-0.0319	0.0875	0.2069

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0505
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 0.1194
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.18. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para potencial de acidez asfalteno ayacucho

- Humedad.

```

Statistix 8.0

Randomized Complete Block AOV Table for HUMEDAD

Source      DF      SS      MS      F      P
D           7    1915.90  273.700
MICROCOSM   3    2117.97  705.990  5.95  0.0042
Error       21    2490.39  118.590
Total       31    6524.26

Grand Mean 41.356    CV 26.33

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity 1     71.28  71.279  0.59  0.4517
Remainder   20    2419.11  120.956

Relative Efficiency, RCB 1.30

Means of HUMEDAD for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean
    1    36.188
    2    54.625
    3    33.487
    4    41.125
Observations per Mean          8
Standard Error of a Mean      3.8502
Std Error (Diff of 2 Means)  5.4450
    
```

Figura F.19. Resultados del análisis de varianza de humedad asfalteno ayacucho

```

Statistix 8.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HUMEDAD for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean   Homogeneous Groups
    2    54.625   A
    4    41.125   AB
    1    36.188   B
    3    33.487   B

Alpha          0.05    Standard Error for Comparison  5.4450
Critical Q Value 3.943    Critical Value for Comparison  15.180
Error term used: D*MICROCOSM, 21 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura F.20. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la humedad asfalteno ayacucho

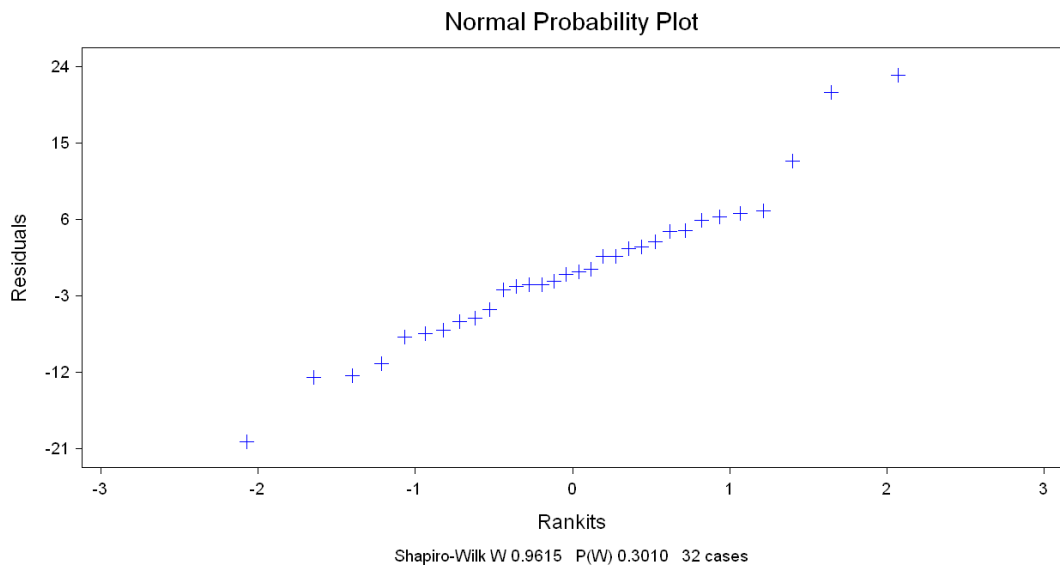


Figura F.21. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de humedad asfalteno ayacucho

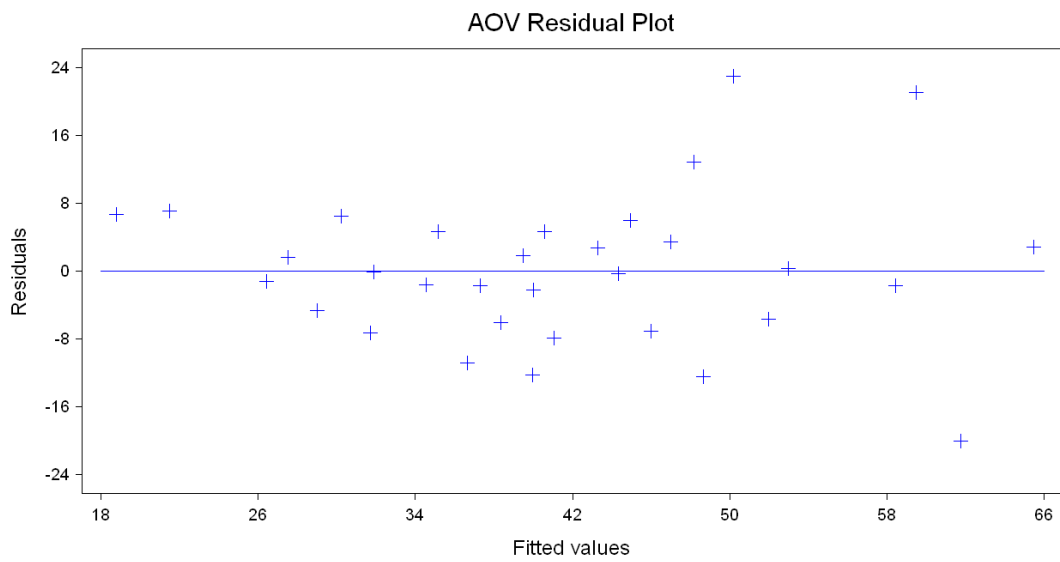


Figura F.22. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados humedad asfalteno ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of HUMEDAD
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	36.188			
2	54.625	1.076	18.438*	35.799

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 7.3371
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 17.361
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.23. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la humedad asfalto ayacucho

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of HUMEDAD
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	33.488			
4	41.125	2.464	7.638*	12.811

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.1866
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 5.1739
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.24. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la humedad asfalto ayacucho

1.-Estadística de los diferentes tratamientos de asfalteno Guafita

-Respiración celular (CO₂)

```

Statistix 8.0
Randomized Complete Block AOV Table for RESPIRACI

Source      DF      SS      MS      F      P
D           19     0.00064  3.369E-05
MICROCOSM   3     0.00071  2.377E-04  54.15  0.0000
Error       57     0.00025  4.390E-06
Total       79     0.00160

Grand Mean 0.0108    CV 19.36

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity
Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity 1     4.285E-06  4.285E-06  0.98  0.3275
Remainder    56     2.460E-04  4.392E-06

Relative Efficiency, RCB 2.60

Means of RESPIRACI for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean
1  0.0089
2  0.0130
3  0.0071
4  0.0144

Observations per Mean      20
Standard Error of a Mean   4.685E-04
Std Error (Diff of 2 Means) 6.626E-04
    
```

Figura F.25. Resultados del análisis de varianza de la respiración celular asfalteno Guafita

```

Statistix 8.0
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of RESPIRACI for MICROCOSM

MICROCOSM   Mean   Homogeneous Groups
4  0.0144   A
2  0.0130   A
1  0.0089   B
3  0.0071   C

Alpha      0.05      Standard Error for Comparison 6.626E-04
Critical Q Value 3.743      Critical Value for Comparison 1.754E-03
Error term used: D*MICROCOSM, 57 DF
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura F.26. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la respiración celular asfalteno Guafita

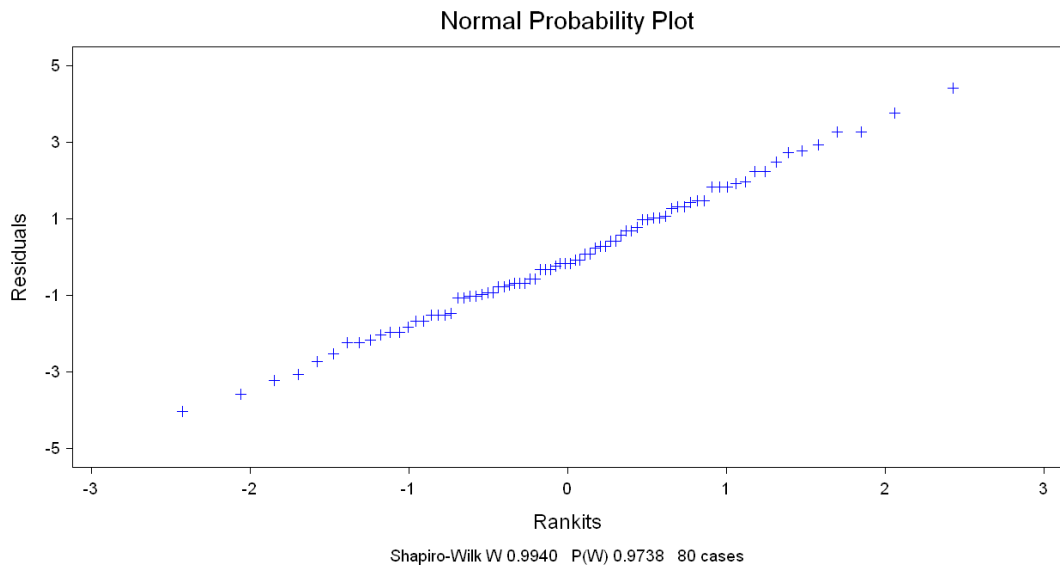


Figura F.27. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno Guafita

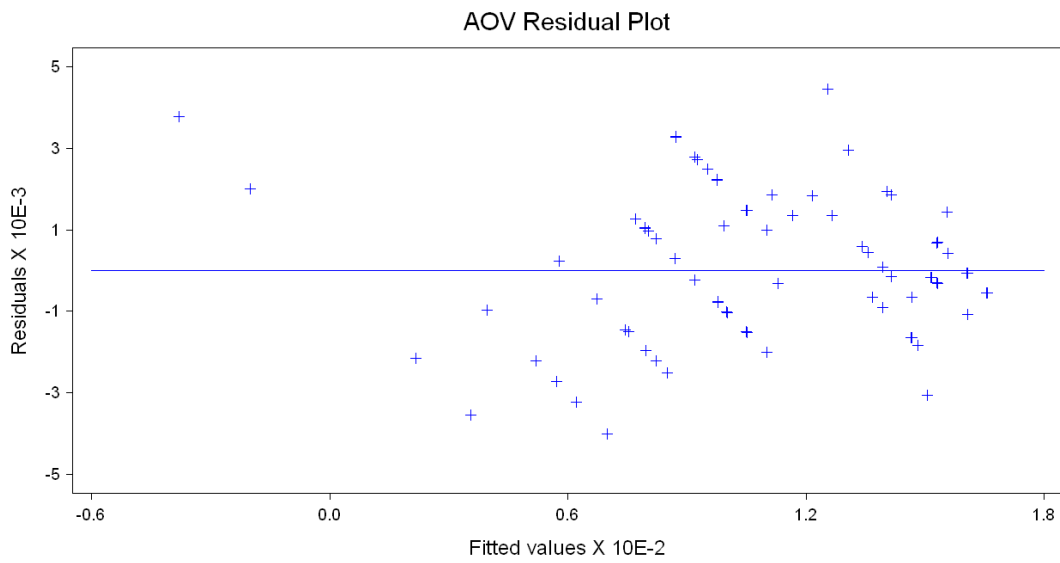


Figura F.28. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de respiración celular asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of RESPIRACI
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	0.0089			
2	0.0130	0.0029	0.0042*	0.0054

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.082E-04
Critical D Value 2.093 Critical Value for Comparison 1.272E-03
Error term used: D*MICROCOSM, 19 DF

Figura F.29. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la respiración celular asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of RESPIRACI
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	0.0071			
4	0.0144	0.0057	0.0074*	0.0090

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.022E-04
Critical D Value 2.093 Critical Value for Comparison 1.679E-03
Error term used: D*MICROCOSM, 19 DF

Figura F.30. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la respiración celular asfalteno Guafita

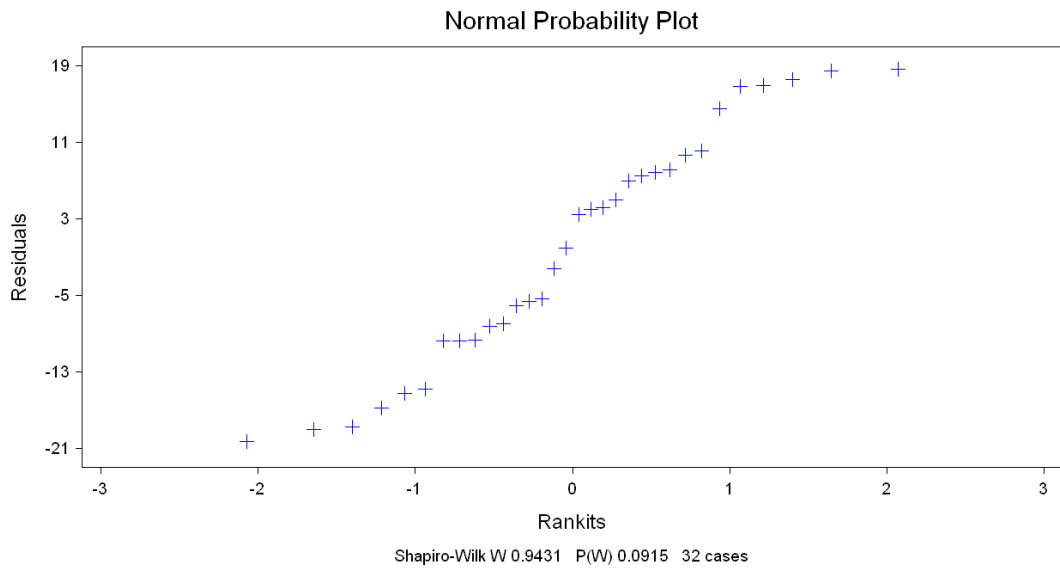


Figura F.33. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de degradación de asfalto Guafita

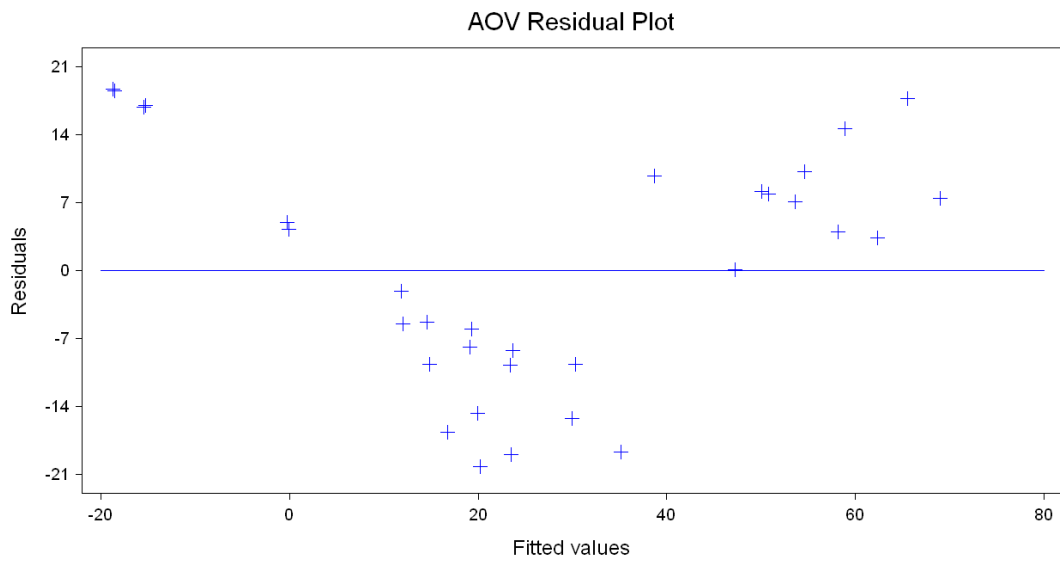


Figura F.34. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de degradación de asfalto Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of DEGRADACI
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	8.338			
2	43.550	13.643	35.213*	56.782

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.1155
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 21.569
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.35. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la degradación de asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of DEGRADACI
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	8.112			
4	47.088	19.199	38.975*	58.751

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.3577
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 19.776
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.36. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la degradación de asfalteno Guafita

- Potencial de acidez.

```

Statistix 8.0

Randomized Complete Block AOV Table for PH

Source      DF      SS      MS      F      P
D           7      0.00195  2.786E-04
MICROCOSM  3      0.00168  5.583E-04  1.51  0.2415
Error      21      0.00778  3.702E-04
Total      31      0.01140

Grand Mean 7.0075    CV 0.27

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity
Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity  1      0.00152  0.00152  4.87  0.0391
Remainder   20      0.00625  0.00031

Relative Efficiency, RCB 0.94

Means of PH for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean
1  6.9950
2  7.0113
3  7.0112
4  7.0125
Observations per Mean      8
Standard Error of a Mean    6.803E-03
Std Error (Diff of 2 Means) 9.621E-03
    
```

Figura F.37. Resultados del análisis de varianza del potencial de acidez asfalteno Guafita

```

Statistix 8.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PH for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean  Homogeneous Groups
4  7.0125  A
2  7.0113  A
3  7.0112  A
1  6.9950  A

Alpha      0.05      Standard Error for Comparison 9.621E-03
Critical Q Value 3.943      Critical Value for Comparison 0.0268
Error term used: D*MICROCOSM, 21 DF
There are no significant pairwise differences among the means.
    
```

Figura F.38. Resultados de la prueba de Tukey aplicada al potencial de acidez asfalteno Guafita

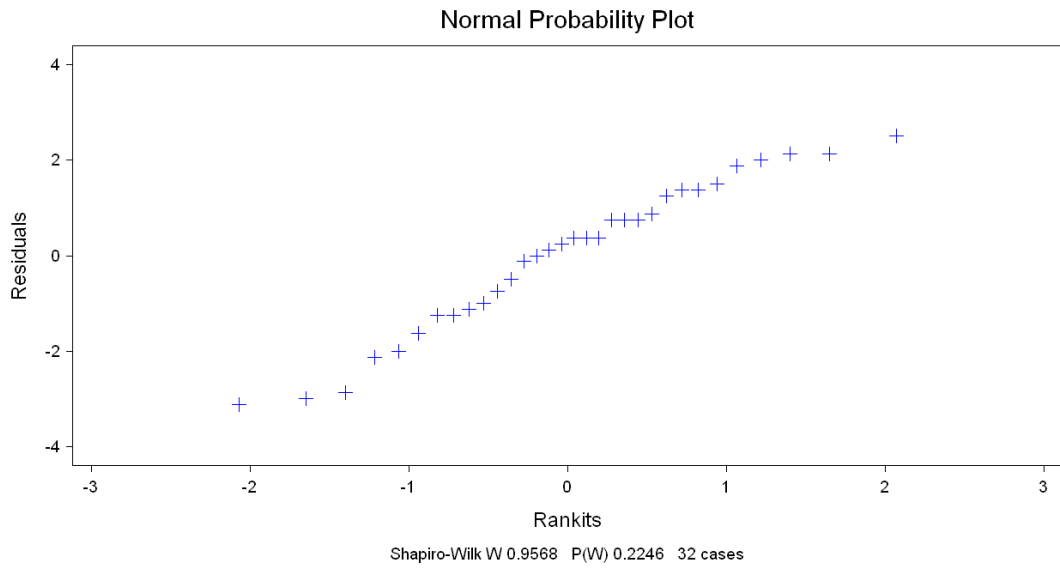


Figura F.39. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados al potencial de acidez asfalteno Guafita

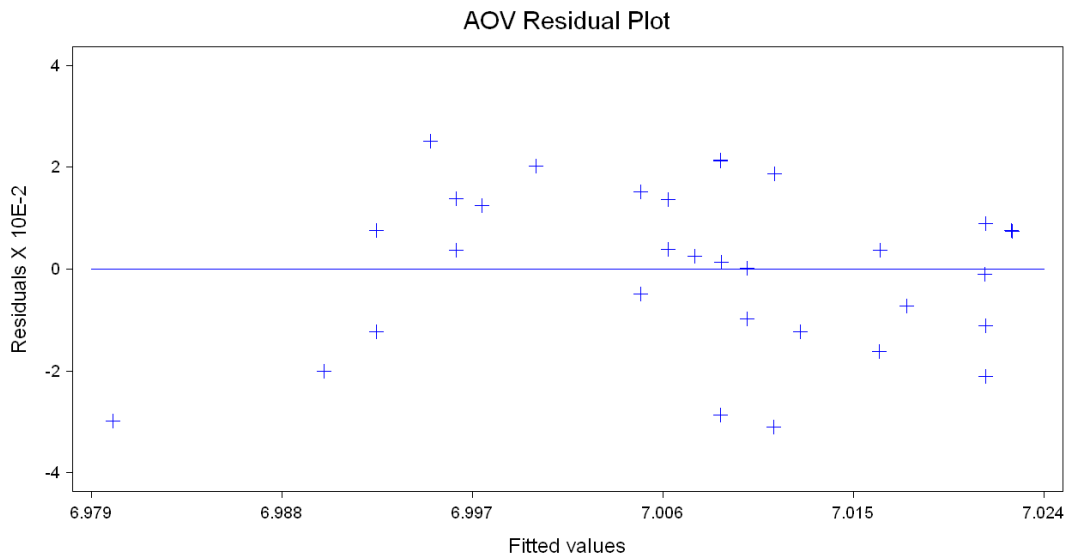


Figura F.40. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de potencial de acidez asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of PH
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	6.9950			
2	7.0113	-0.0094	0.0163	0.0419

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0108
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 0.0257
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.41. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control aplicada al potencial de acidez asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of PH
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	7.0113			
4	7.0125	-0.0185	0.0013	0.0210

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.332E-03
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 0.0197
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.42. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para el potencial de acidez asfalteno Guafita

- Humedad.

```

Statistix 8.0

Randomized Complete Block AOV Table for HUMEDAD

Source      DF      SS      MS      F      P
D           7      96.705   13.815
MICROCOSM  3      398.418  132.806   6.15   0.0036
Error      21      453.158   21.579
Total      31      948.280

Grand Mean 37.025    CV 12.55

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity
Source      DF      SS      MS      F      P
Nonadditivity 1      268.795  268.795  29.16  0.0000
Remainder   20      184.362   9.218

Relative Efficiency, RCB 0.92

Means of HUMEDAD for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean
1  33.238
2  42.588
3  34.925
4  37.350
Observations per Mean      8
Standard Error of a Mean    1.6424
Std Error (Diff of 2 Means) 2.3227
    
```

Figura F.43. Resultados del análisis de varianza de la humedad asfalteno Guafita

```

Statistix 8.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HUMEDAD for MICROCOSM

MICROCOSM  Mean  Homogeneous Groups
2  42.588  A
4  37.350  AB
3  34.925  B
1  33.238  B

Alpha          0.05    Standard Error for Comparison  2.3227
Critical Q Value 3.943    Critical Value for Comparison  6.4752
Error term used: D*MICROCOSM, 21 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura F.44. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a la humedad asfalteno Guafita

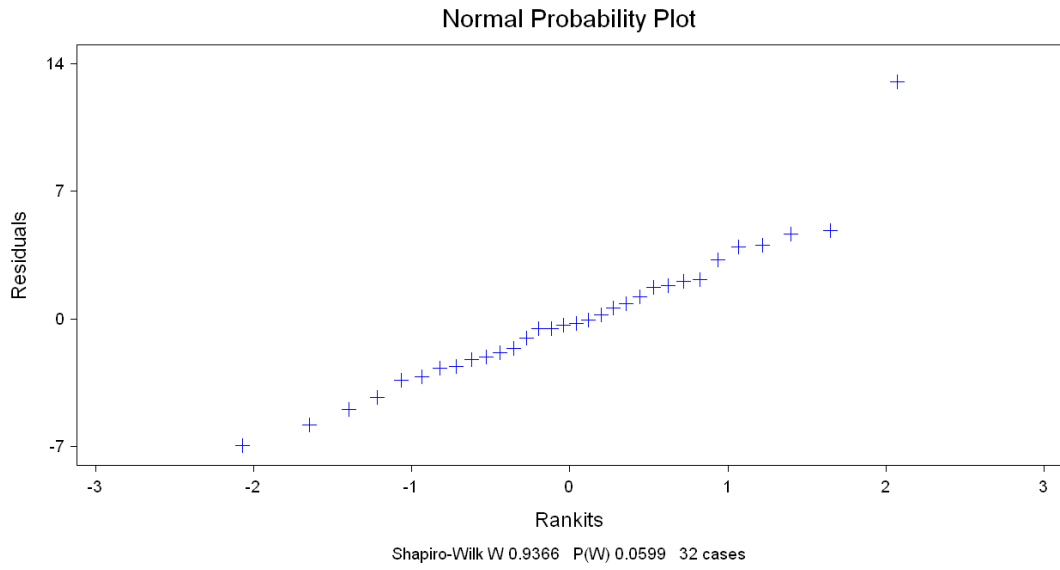


Figura F.45. Prueba de Shapiro Wilk aplicada a los resultados de humedad asfalteno Guafita

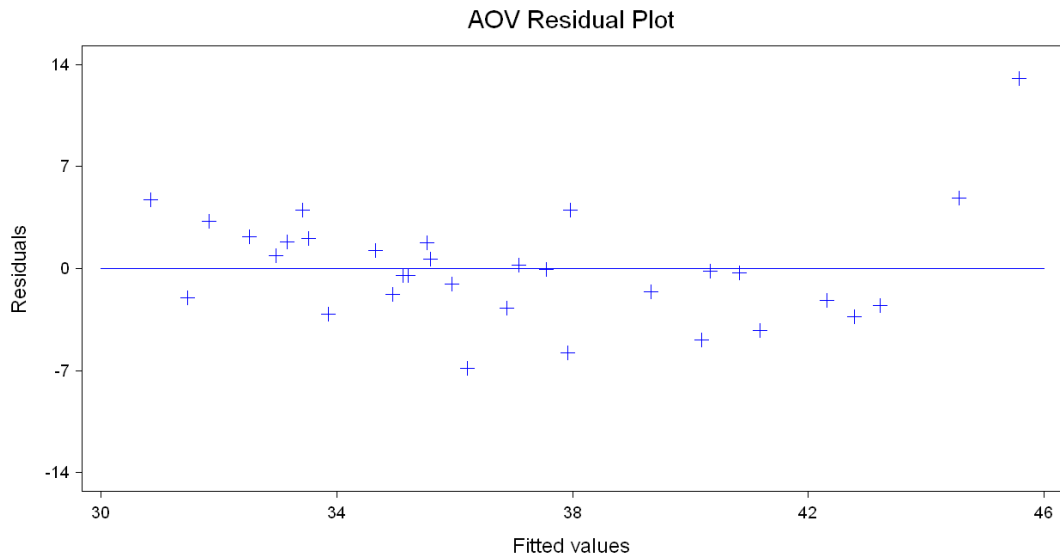


Figura F.46. Prueba de homogeneidad aplicada a los resultados de humedad asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of HUMEDAD
Control: MICROCOSM=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	33.238			
2	42.588	1.329	9.350*	17.371

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.3897
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 8.0208
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.47. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con lombriz y su microcosmo control para la humedad asfalteno Guafita

Statistix 8.0

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of HUMEDAD
Control: MICROCOSM=3

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

MICROCOSM	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
3	34.925			
4	37.350	-0.147	2.425	4.997

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.0869
Critical D Value 2.366 Critical Value for Comparison 2.5719
Error term used: D*MICROCOSM, 7 DF

Figura F.48. Resultados de la prueba de Dunnett aplicada al tratamiento con bacterias y su microcosmo control para la humedad asfalteno Guafita