

BIODEGRADACIÓN DE UN CRUDO MEDIANO EN SUELOS DE DIFERENTE TEXTURA CON Y SIN AGENTE ESTRUCTURANTE

María Gabriela García¹, Carmen, Infante¹ y Liliana López¹

RESUMEN

La textura del suelo y los agentes estructurantes juegan un papel importante en la biorremediación de hidrocarburos. En este sentido, se estudió la biodegradación de un crudo mediano en dos suelos de diferentes texturas, con y sin la adición de un agente estructurante (hojarasca). Los suelos ensayados fueron de textura arenosa constituida por cuarzo e illita, y franco-arcillo-arenoso compuesto por cuarzo y caolinita. Se evaluaron cuatro tratamientos por triplicado en microcosmos con un contenido de crudo inicial de 5 % (m/m) y se añadió fertilizantes a base de N y P para obtener las relaciones C/N=60 y C/P= 800. Periódicamente se airearon los microcosmos y se ajustó la humedad entre 40 y 60 % de la capacidad de retención del recipiente. La concentración de hidrocarburos totales del petróleo se determinó a los 1, 15, 30, 45 y 90 días mediante la extracción Soxhlet y las concentraciones de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos mediante precipitación de los asfaltenos y cromatografía de adsorción en columna para los maltenos (hidrocarburos saturados, aromáticos y resinas). Los biomarcadores se determinaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se encontró que la textura franco-arcillo-arenosa favoreció el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales, particularmente en los componentes saturados. Asimismo, el agente estructurante influyó positivamente en el porcentaje de biodegradación de saturados, por lo que estos factores deben ser considerados en la aplicación de la técnica de biorremediación para restaurar suelos y tratar desechos contaminados con crudos medianos.

Palabras clave adicionales: Biorremediación, hidrocarburo, hojarasca

ABSTRACT

Biodegradation of a medium crude oil in soils of different texture with and without bulking agents

Soil texture and bulking agents play an important role in the bioremediation of hydrocarbons. In this sense, we study the biodegradation of a medium crude oil in two soils of different texture, with and without the addition of bulking agents (litter). The soils tested were a sandy-textured soil composed of quartz and illite, and a sandy-clay-loam composed of quartz and kaolinite. Four treatments were evaluated in triplicate in microcosms with initial oil content of 5 % (m/m) to which N and P fertilizers were added to obtain C/N = 60 and C/P = 800 ratios. The microcosms were raked periodically for aeration and humidity was adjusted to 40 - 60% of moisture pot capacity. Total petroleum hydrocarbons concentration was obtained for 1, 15, 30, 45 and 90 days through Soxhlet extraction and the concentration of saturated, aromatic, resins and asphaltene fractions was obtained through precipitation for asphaltene and by adsorption chromatography for maltenes (saturated, aromatic and resins). Saturated biomarkers analyses were performed by gas chromatography - mass spectrometry. We found that the sandy-clay-loam texture favored the process of biodegradation of total hydrocarbons, particularly of the saturated components. The bulking agents also positively influenced the rate of biodegradation of saturated hydrocarbons, so these factors should be considered in the application of bioremediation techniques to restore soils and treating wastes polluted with medium crude oil.

Additional key words: Bioremediation, hydrocarbon, litter

INTRODUCCIÓN

La biorremediación es una técnica para la recuperación de los suelos contaminados que se ha empleado en Venezuela desde 1990 (Infante, 2005). Ésta se basa en la estimulación y aplicación

del proceso de biodegradación para disminuir o suprimir las fracciones tóxicas presentes en el crudo, utilizando la capacidad de los microorganismos presentes en el suelo para transformar los compuestos orgánicos del petróleo (Infante, 2001; Infante, 2005; Erdogan y Karaca,

Recibido: Diciembre 18, 2011

Aceptado: Mayo 29, 2012

¹ Instituto de Ciencias de La Tierra, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 1202. Caracas. Venezuela. e-mail: carmeninfante66@gmail.com

2011). El proceso puede ser mejorado conociendo y controlando los factores abióticos y bióticos, por lo que cada vez, se hace más necesario conducir investigaciones que conlleven a entender y hacer más efectiva la técnica de biorremediación. Dentro de los factores abióticos la textura y los agentes estructurantes pueden jugar un papel preponderante. La textura está íntimamente relacionada con la composición mineral, el área superficial específica y el espacio de poros del suelo. Esto afecta prácticamente a todos los factores que influyen en un proceso de biodegradación de hidrocarburos, el cual es aeróbico y requiere de un hábitat con adecuada disponibilidad de agua e hidrocarburo para los microorganismos (Andreas et al., 2010).

Los suelos que contienen partículas de arcillas, las cuales son de menor tamaño que las partículas de arena, tienen una mayor superficie específica y en consecuencia un mayor contacto microorganismo-crudo, lo que mejora la biodegradación del hidrocarburo (Atlas, 1977). No obstante, el hidrocarburo puede adsorberse a las partículas del suelo particularmente en suelos muy arcillosos haciéndolo poco disponible a los microorganismos, limitando la biodisponibilidad del hidrocarburo y por ende la biodegradación (Amellal et al., 2001). Los hidrocarburos por ser hidrofóbicos tienen baja solubilidad en agua y tienden a ser adsorbidos fuertemente en el suelo con alto contenido de arcilla, por lo que es necesario agregar agentes estructurantes para proporcionar una mejor estructura y porosidad a los suelos. Asimismo, en suelos de textura arenosa los agentes estructurantes tienden a mejorar la retención del contaminante al minimizar la infiltración, y a su vez generan una mejor estructura modificando la difusión de oxígeno y disponibilidad del hidrocarburo a los microorganismos (Scherr et al., 2007; Infante et al., 2010a).

En Venezuela una alta proporción de la explotación petrolera se encuentra en el oriente del país donde predominan suelos de textura arenosa. Por otra parte, en el Decreto 2635 (República de Venezuela, 1998) se indica en su artículo 53 que una de las condiciones para aplicar la biorremediación (señalada como biotratamiento en el Decreto) es que los suelos posean una textura franca o sus variantes, por lo que la mayoría de los suelos de esta región del país no

cumplen con esta condición. Los trabajos o publicaciones específicas acerca del estudio de la influencia de la textura del suelo y agentes estructurantes en el proceso de biodegradación de un hidrocarburo son escasos, particularmente en zonas tropicales. Considerando que la biorremediación es una tecnología de saneamiento ambiental de alta aplicabilidad en Venezuela por ser un país petrolero, se presenta este estudio, con el objetivo de comparar la biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferentes texturas con y sin la adición de un agente estructurante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron dos tipos de suelos del estado Anzoátegui, Venezuela. Uno proveniente de El Tigre, municipio Simón Rodríguez (suelo A) y el otro de un sector ubicado entre las poblaciones de San Diego de Cabrutica y Mapire, en el municipio José Gregorio Monagas (suelo B). Estos tipos de suelos son característicos de la zona de influencia de explotación petrolera en el Oriente venezolano. En general se caracterizan por ser suelos ácidos (pH 4 a 5), con aumento de arcilla en profundidad (Luque, 1983), presentando severas limitaciones de fertilidad, baja capacidad de intercambio catiónico, porcentaje de saturación con bases, y de contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio. (Chacon et al., 2005).

Para los ensayos de biorremediación se obtuvieron muestras representativas de los primeros 20 cm de profundidad de ambas localidades a los que se le determinaron los siguientes parámetros: textura (método de Bouyucos), composición mineralógica (difracción rayos X en un difractómetro Bruker, AXS Siemens D-8 Advance) y las concentraciones de carbono orgánico total (COT) en un equipo Leco C-144.

Se usó crudo Guafita 1X (subcuenca de Barinas) el cual presenta una gravedad API de 27,33°, correspondiente a un crudo mediano. La composición SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) muestra el predominio de los hidrocarburos saturados y aromáticos (83 %) sobre el resto de las fracciones (16 %). Del análisis del crudo original por cromatografía de gases (n-alcanos e isoprenoides acíclicos; Figura 1) y por cromatografía de gases acoplado a masas (n-alcanos, isoprenoides terpanos y esteranos) se

observó una distribución normal de n-alcanos, isoprenoides acíclicos pristano y fitano ($m/z=113$), esteranos ($m/z=191$) y terpanos ($m/z=217$ y 218) (López et al., 1998).

Se realizó la simulación a escala de laboratorio de un derrame de crudo en los dos tipos de suelo para evaluar posteriormente el proceso de biorremediación del suelo.

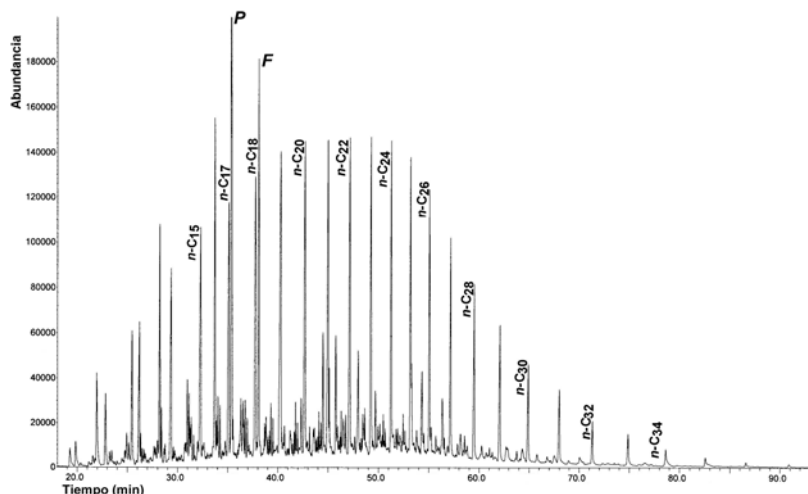


Figura 1. Cromatograma de masas ($m/z=113$) que muestra la distribución de n-alcanos y de los isoprenoides pristano (P) y fitano (F) para el crudo empleado

Se evaluaron cuatro tratamientos con 3 repeticiones cada uno para un total de 12 microcosmos, los cuales se construyeron en bandejas rectangulares de plástico de 35 cm de largo por 25 de ancho y 15 de profundidad, dispuestos mediante un diseño al azar. Se ensayaron dos suelos (1,1 kg por cada bandeja o microcosmo) de diferente textura: suelo de El Tigre (A) y suelo de Mapire (B) evaluados con y sin la adición de un agente estructurante (AE). Los tratamientos fueron T1: Suelo A sin agente estructurante; T2: Suelo B sin agente estructurante; T3: Suelo A con agente estructurante; T4: Suelo B con agente estructurante. Como agente estructurante se usó hojarasca (13 % m/m por cada microcosmo) de especies de gramíneas, fabáceas y bignoniáceas caracterizadas por un contenido de carbono del 52 %, fósforo de 1,3 % y nitrógeno de 0,77% (Infante et al., 2010b).

A cada uno de los microcosmos se les adicionó el crudo a fin de obtener una concentración teórica inicial de 5 % m/m (50 g·kg⁻¹). Se añadieron urea y superfosfato triple, como fuentes de N y P, para satisfacer las relaciones carbono/nitrógeno = 60 y carbono/fósforo = 800 (Dibble y Bartha, 1979; Infante et al., 2010b). Cada microcosmo fue rociado con agua con la ayuda de un atomizador a fin de ajustar el valor de humedad entre un 40 y

60 % de la capacidad de campo en el recipiente. Ésta se obtuvo previamente saturando una muestra de cada uno de los suelos con agua y dejándola que percolara el exceso (protegiéndola de la evaporación) acorde el método reseñado en Wilke (2005). Para el control de la humedad durante el experimento se repuso el agua evaporada pesando los microcosmos cada 3 días. Cada vez que se retiraba una muestra para un análisis se restaba dicha masa de la masa total que la bandeja o microcosmo debió alcanzar luego de ser regada, a fin de mantener la humedad constante.

Las pérdidas de hidrocarburo por foto-oxidación se minimizaron colocando los microcosmos durante todo el experimento fuera de la incidencia directa de luz.

Cada 2 días se aireó el suelo de cada microcosmo con un rastrillo manualmente para facilitar la transferencia de oxígeno del aire circundante al suelo.

Los experimentos tuvieron una duración de 90 días y se mantuvieron a temperatura de laboratorio entre 25-29 °C.

Se realizó la determinación del contenido de aceites y grasas o hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en los suelos de los diferentes tratamientos a los 1, 15, 30, 45 y 90 días de montado el experimento o avance de la

biodegradación, mediante una extracción sohxlet, empleando como solvente diclorometano, siguiendo el método EPA 3540 (USEPA, 1986). Se asume que TPH es equivalente a aceites y grasas porque la contribución de lípidos carbohidratos y otros compuestos orgánicos de origen no petrolero es despreciable, (mucho menos del 0,01 %) en este tipo de muestras (León et al., 1998; Infante et al., 2010b). El porcentaje de biodegradación se expresó como el cambio en el contenido de crudo (HTP) extraíble respecto al contenido inicial a los diferentes tiempos de medición. El valor usado como contenido inicial fue el obtenido al día 1 experimentalmente para cada tratamiento y no el valor de 5 % (m/m) teórico calculado, para la preparación del suelo contaminado en los microcosmos, ya que se conoce que con el método EPA 3540, no se extrae el 100 % de los HTP, empleando diferentes tipos de solventes (Córdova, 2011). Las pérdidas por volatilización durante el experimento, no se midieron; sin embargo, se asumieron en el orden de 7 % acorde a los resultados de otras investigaciones realizadas con crudos de similar gravedad API al empleado en el presente estudio (León et al., 1998). A los 1, 30 y 90 días se determinó la composición SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) mediante la precipitación de los asfaltenos, utilizando n-heptano en una relación 1/40 (crudo/solvente). El sobrenadante correspondiente a los maltenos fue separado por cromatografía de adsorción en columna, para lo cual se usó alúmina neutra como fase estacionaria. Los hidrocarburos saturados fueron eluidos utilizando n-hexano y los hidrocarburos aromáticos con tolueno. Para las resinas se usó una mezcla tolueno/metanol (70/30 v/v). Para garantizar la pureza de la fracción de hidrocarburos saturados, a la cual se le analizarían posteriormente los biomarcadores, estos fueron eluidos nuevamente con n-hexano para eliminar posible contaminación con hidrocarburos aromáticos.

Para el estudio de los biomarcadores, los hidrocarburos saturados fueron analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un equipo Agilent Technologies (6890N) acoplado a un espectrómetro de masas MS Agilent (5973 Network Mass Selective Detector). Mediante esta técnica se obtuvieron los cromatogramas de masas de los n-

alcanos e isoprenoides pristano (P) y fitano (F) ($m/z=113$), terpanos ($m/z=191$) y esteranos ($m/z=217$ y 218). A partir de las áreas se calcularon las relaciones Pristano/n- C_{17} , Fitano/n- C_{18} y C_{23-3}/C_{30} -Hopano para ser usadas como índices de biodegradación, ya que comparan compuestos con diferentes grados de resistencia. En este sentido, pristano y fitano son resistentes a la biodegradación respecto a n- C_{17} , y n- C_{18} (Peters et al., 2005), y el terpano tricíclico de 23 átomos de carbono (C_{23-3}) es más resistente a la biodegradación respecto al hopano de 30 átomos (C_{30}), por lo que todas las relaciones deben aumentar a medida que avanza un proceso de biodegradación.

La biodegradación se expresó en porcentaje, en base al cambio en el tiempo, en el contenido de hidrocarburos totales (HTP) y de saturados (S) con respecto al contenido inicial y corregido por las pérdidas abióticas. Los resultados para los diferentes tiempos y tratamientos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Statistix versión 8.0., a través de un análisis de varianza por medio de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5 %. A los datos previamente se les comprobó los supuestos del análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los suelos utilizados: El suelo A (El Tigre) posee una textura arenosa, con total predominio de partículas de grano grueso, y el B (Mapire) una textura franco-arcillo-arenosa, con notable influencia de partículas de grano fino (Cuadro 1). La composición mineralógica del suelo A, es de cuarzo e illita y la del suelo B, cuarzo y caolinita; ambas mineralogías son poco reactivas por tratarse de cuarzo y una arcilla tipo 2:1 no expansiva y tipo 1:1, respectivamente. Se puede inferir que la composición mineralógica de los suelos en estudio, no debe ser un factor que ejerza una influencia dominante en las diferencias que se presenten en el proceso de biodegradación del crudo en los dos tipos de suelo, ya que contienen arcillas no expansivas que no deberían interactuar fuertemente con el crudo.

Las concentraciones de carbono orgánico total (COT) son superiores para el suelo B (2,2 %) con respecto al suelo A (0,3 %), lo que era de esperarse, ya que en suelos y sedimentos con altos

contenidos de arcillas ocurre una mayor acumulación de materia orgánica debido a las interacciones de las partículas de menor tamaño o de mayor área superficial con la materia orgánica (Baldock et al., 2004).

Cuadro 1. Características de los suelos utilizados

Características	Suelo A	Suelo B
Arena %	90,1	63,5
Limo %	6,8	10
Arcilla %	3,1	26,5
Textura	Arenosa	Franco-arcillo-arenosa
Composición mineralógica	Cuarzo, Ilita	Cuarzo, Caolinita
COT (% m/m)	0,3	2,2

Influencia de la textura y agentes estructurantes sobre la biodegradación: En el Cuadro 2 se muestran los resultados del porcentaje de biodegradación en el tiempo expresada en función del contenido de hidrocarburos totales y del contenido de saturados. En todos los tratamientos se registró un aumento del porcentaje de biodegradación, indicativo de la biodegradabilidad de este tipo de hidrocarburo. El mayor porcentaje de biodegradación expresada en función de la disminución de los HTP se obtuvo en el suelo B o franco arcillo arenoso (T2 y T4) y la mayor remoción de saturados resulta en este

mismo suelo B con el agente estructurante (T4). El mejor y mayor contacto microorganismo hidrocarburo, y en general las mejores condiciones físicas de los suelos franco-arcillo-arenoso (mayor capacidad de retención de humedad, entre otras) posiblemente contribuyeron a mejorar el proceso de biodegradación con respecto al suelo de textura arenosa. Al respecto, Andreas et al. (2010) demuestran que la disponibilidad y contacto microorganismo hidrocarburo es clave en un proceso de biorremediación, por ello la textura franca y sus variantes pueden resultar mejor para la aplicación de esta técnica. Cabe señalar que en el artículo 53 del Decreto 2636 (República de Venezuela, 1998), se establece que la textura recomendada para un proceso de biorremediación es la franca y sus variantes, de lo contrario debe ser mejorada como es el caso de una textura arenosa. En dicho artículo se señala que el suelo debe ser acondicionado y aunque no explica como es el acondicionamiento, éste se refiere a emplear agentes estructurantes, “retenedores o adsorbentes” de la humedad y del hidrocarburo, que a su vez sean biodegradables y favorezcan las propiedades físicas del suelo, a fin de minimizar la lixiviación y mejorar el contacto microorganismo-crudo y por ende la biorremediación (Infante et al., 2010a).

Cuadro 2. Porcentaje de biodegradación en diferentes lapsos de tiempo de los hidrocarburos totales (HTP) y de saturados (S) con respecto al contenido inicial

Tratamiento	1 días		15 días		30 días		45 días		90 días	
	HTP	S	HTP	S	HTP	S	HTP	S	HTP	S
T1 (suelo A)	0	0	8,8 b	ND	11,0 d	31,5 b	13,0 f	ND	33,3 i	44,1 g
T2 (suelo B)	0	0	21,0 c	ND	26,0 e	51,3 c	36,8 g	ND	49,1 j	72,7 h
T3 (suelo A +AE)	0	0	6,3 b	ND	9,2 d	39,0 d	11,4 f	ND	31,6 i	52,0 i
T4 (suelo B +AE)	0	0	20,0 c	ND	21,0 e	55,0 f	23,0 h	ND	45,0 j	76,6 j

Suelo A: textura arenosa; Suelo B: textura franco arcillo arenosa; AE: agente estructurante. Medias en un mismo tiempo seguidas por letras distintas son diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). ND: no determinado o no analizado

En relación al efecto de los agentes estructurantes no hubo una tendencia clara en cuanto a los resultados de disminución de hidrocarburos totales, por el contrario si fue evidente el efecto positivo en la biodegradación de los componentes saturados (T1 vs. T3 y T2 vs. T4; Cuadro 2). La fracción de saturados fue la primera en ser degradada por ser la de menor complejidad y de rápida metabolización por los microorganismos (Peters et al., 2005). El resto de las fracciones (aromáticos, resinas y asfaltenos) aumentó por

enriquecimiento relativo al disminuir la fracción de saturados (datos no presentados). Los agentes estructurantes, como su nombre lo indica mejoran la estructura y dan volumen, permitiendo un mejor contacto microorganismo hidrocarburo, incrementando la población microbiana y actividad enzimática (Chien et al., 2010; Kauppi et al., 2011; Vasudevan y Rajaram, 2001) además en situaciones de campo minimizan considerablemente la lixiviación de contaminantes, mejorando así, la aplicación de la técnica de

biorremediación (Boodoosingh et al., 2007; Infante et al., 2010b).

Los análisis cromatográficos mostraron que para el T1, correspondiente al suelo arenoso sin agente estructurante, no hubo variación en la distribución de n-alcanos y de los isoprenoides pristano (P) y fitano (F) durante el avance de la biorremediación (Figura 2), lo que concuerda con el hecho que este tratamiento es uno de los que presentó menor porcentaje de biodegradación para los HTP y su fracción de hidrocarburos saturados (Cuadro 2). Para el T2, constituido por el suelo franco-arcilloso-limoso sin agente estructurante, si se observaron variaciones en las distribuciones de n-alcanos e isoprenoides en el tiempo, evidenciándose la biodegradación de estos tipos de hidrocarburos. A los 30 días no se

observó la señal de n-C₁₅ y disminuyó la señal de los n-alcanos en el rango de n-C₁₇ a n-C₃₅, sin alteración de los isoprenoides, y a los 90 días no se observaron los n-alcanos <n-C₂₁ y los isoprenoides; adicionalmente, disminuyó la señal de los >n-C₂₅ (Figura 2). Por otra parte, para los cromatogramas de masa a los 30 y 90 días incrementó la línea base del mismo, lo cual corresponde a compuestos productos de la biodegradación que no pueden ser resueltos bajo las condiciones de análisis, denominados mezcla de compuestos no resueltos (Peters et al., 2005). Para el T2 ocurrió la biodegradación de los isoprenoides, previo a los n-alcanos >n-C₂₅, el cual no es el orden normal de biodegradación propuesto para crudos en yacimientos de petróleo (Peters et al., 2005).

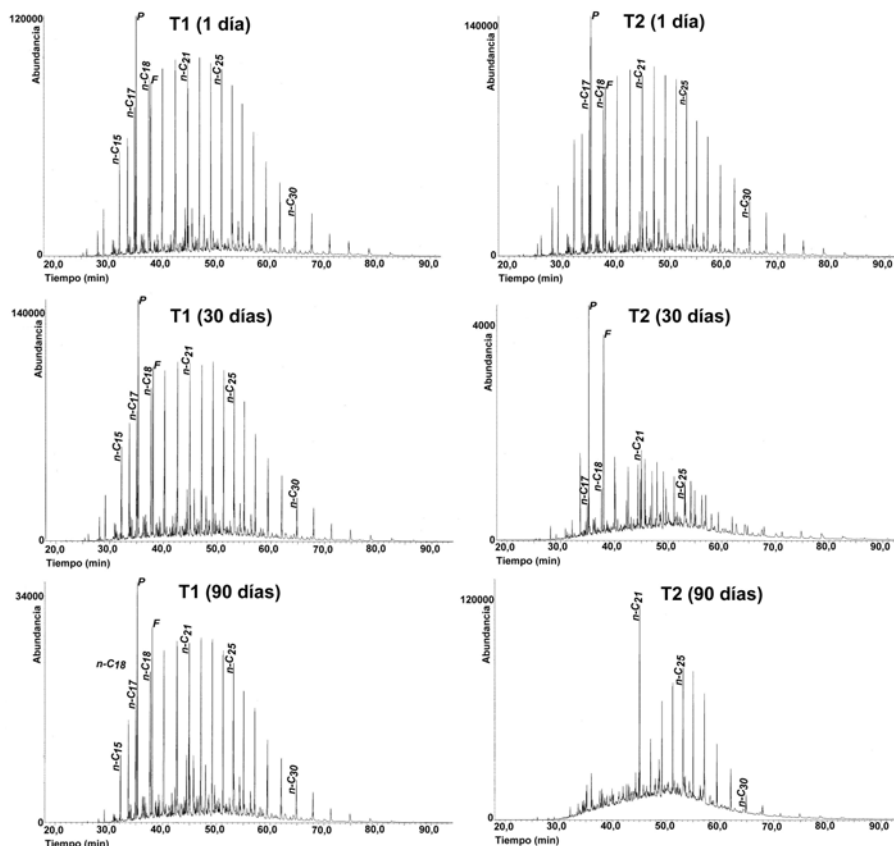


Figura 2. Cromatogramas de masas de los n-alcanos e isoprenoides ($m/z=113$) para los tratamientos sin agente estructurante T1 (suelo A) y T2 (suelo B). P: Pristano, F: Fitano

Para el suelo arenoso con agente estructurante correspondiente al T3, a los 30 días ocurrió una disminución en la intensidad de la señal de los n-alcanos, y a los 90 días la biodegradación fue efectiva con alteración de los

n-alcanos <n-C₂₁, presencia de UCM (mezcla de compuestos no resueltos) y sin alteración de los isoprenoides (Figura 3). La presencia de agente estructurante en el suelo de textura arenosa favorece el proceso de biorremediación, ya que

facilita la alteración de los *n*-alcanos, no ocurriendo así para los isoprenoides, lo que si se observó para el suelo franco-arcilloso-limoso sin agente estructurante T2 (Figura 2). La presencia de minerales de arcilla mejora la

biodegradación, en comparación al suelo A de textura arenosa con agente estructurante, ya que el área superficial de estos minerales probablemente generan un mejor contacto crudo-organismos.

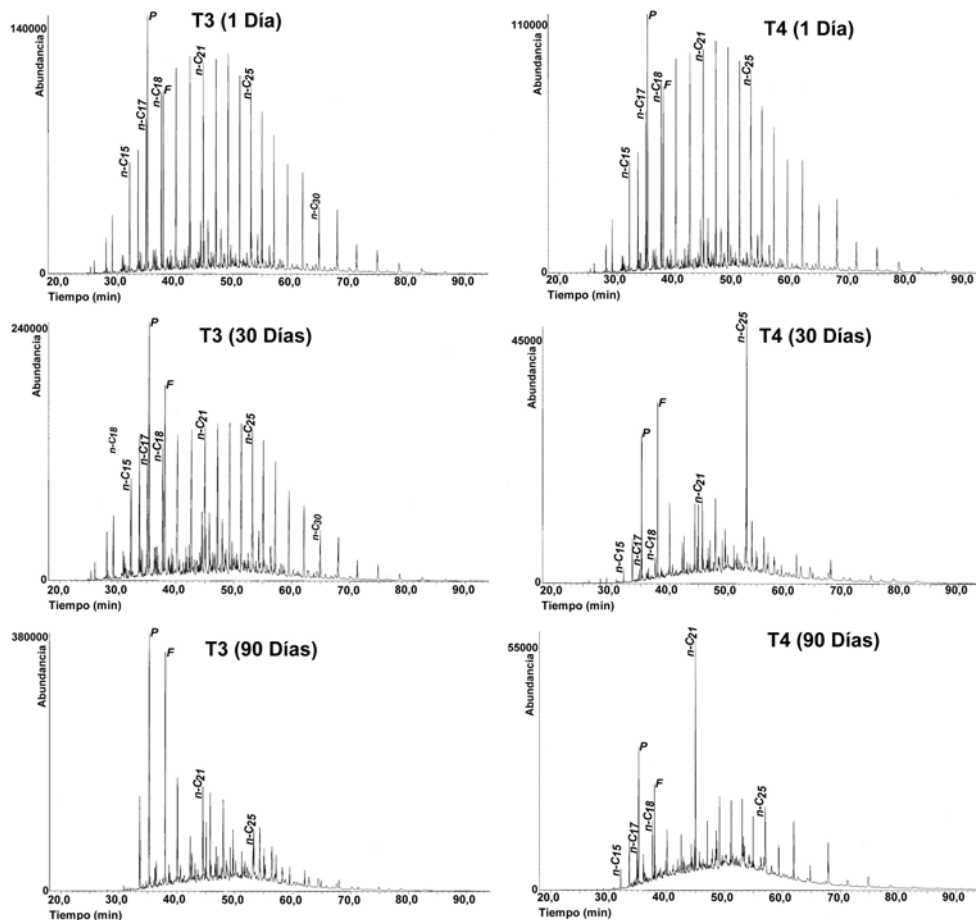


Figura 3. Cromatogramas de masas de los *n*-alcanos e isoprenoides ($m/z = 113$) para los tratamientos con agente estructurante T3 (suelo A) y T4 (suelo B). P: Pristano, F: Fitano.

Para el T4 (suelo franco-arcilloso-limoso con agente estructurante) se observó a nivel de *n*-alcanos e isoprenoides, pristano (P) y fitano (F) el mayor grado de alteración (Figura 3). A los 30 días no se observaron algunos de los *n*-alcanos <n-C₂₁ y disminuyeron las señales de P y F y de n-C₁₇ y n-C₁₈ con incremento de la línea base (UCM). Esto sugiere que la combinación de un suelo de textura franco-arcilloso-limoso y de agente estructurante favorece en mayor grado el proceso de biorremediación, ya que incluso a los 30 días la biodegradación de los *n*-alcanos fue superior en comparación al resto de los tratamientos. Sin embargo, nuevamente no se sigue el orden de biodegradación que se ha sugerido para los *n*-

alcanos y los isoprenoides, ya que a pesar de haber ocurrido la biodegradación de *n*-alcanos >n-C₁₉, aun se observan n-C₁₇ y n-C₁₈. En el T4 se observó, a los 30 días, un incremento en la intensidad de la señal correspondiente a n-C₂₅ (Figura 4) lo que puede ser atribuido a la presencia de otro compuesto que coeluye al mismo tiempo de retención que n-C₂₅ y cuya señal disminuye a los 90 días. Dicho compuesto no pudo ser identificado a través de las técnicas de análisis utilizadas.

Las relaciones pristano/n-C₁₇ y fitano/n-C₁₈ para cada uno de los tratamientos se muestran en el Cuadro 3. Se observa que aumentan con el tiempo, en todos los tratamientos, lo que indica

que se está llevando a cabo el proceso de biodegradación. Sin embargo, puede notarse la diferencia en la intensidad dependiendo del tratamiento aplicado donde la menor variación en estas relaciones se observó en los tratamientos con el suelo arenoso (T1 y T3) en comparación a los tratamientos en el suelos franco-arcilloso-arenoso

(T2 y T4) y éstas resultaron menores frente a los tratamientos con agente estructurante (T3 y T4). Estos resultados fueron consistentes con los porcentajes de biodegradación y efectivamente indican un claro efecto de la textura del suelo y de la presencia de un agente estructurante en la efectividad del proceso de biodegradación.

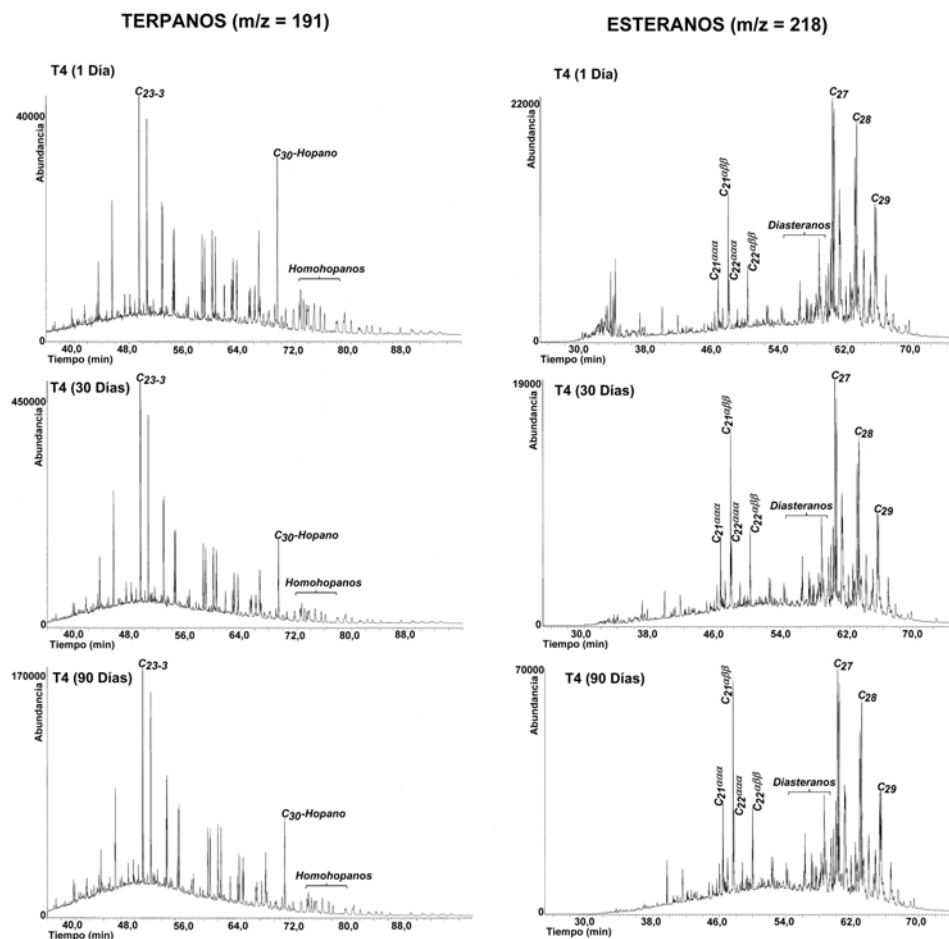


Figura 4. Cromatogramas de masas para los terpanos ($m/z=191$) y esteranos ($m/z=218$) para el tratamiento del suelo franco-arcilloso-limoso con agente estructurante (T4)

En los cromatogramas de masas correspondientes a los terpanos ($m/z=191$), los cambios observados por efecto de la biodegradación para los cuatro tratamientos sólo ocurrieron para el terpano pentacíclico C₃₀-hopano donde la intensidad relativa de la señal disminuyó con el tiempo (Figura 4, T4). Como una medida del grado de alteración de este compuesto se calculó la relación entre el terpano tricíclico de 23 átomos de carbono (C₂₃₋₃) al hopano C₃₀-hopano (C₂₃₋₃/C₃₀-hopano (Cuadro 3) basado en la

mayor resistencia a la biodegradación del C₂₃₋₃ respecto al C₃₀-hopano (Peters et al., 2005). Como se puede observar de estos resultados, el cambio C₂₃₋₃/C₃₀-hopano incrementó de forma similar para los cuatro tratamientos a los 30 y 90 días, independientemente del tipo de suelo o la presencia del agente estructurante. Por otra parte, también ocurrió la disminución en la señal correspondiente a los homohopanos (C₃₁ a C₃₅). En yacimientos de hidrocarburos, la biodegradación de los homohopanos ocurre por

pérdida de un grupo metilo, originándose los 25-norhopanos u hopanos demetilados (Peters et al., 2005), los cuales pueden ser detectados a través del cromatograma de masas $m/z=177$. Para las

muestras en estudio estos compuestos no fueron observados, indicando que si bien pudo ocurrir biodegradación de los homohopanos, no fue vía demetilación con formación de 25-norhopanos.

Cuadro 3. Relaciones de biomarcadores obtenidas para los distintos tratamientos a los 1, 30 y 90 días

Tratamiento	Días	Pristano/n-C ₁₇	Fitano/n-C ₁₈	C ₂₃₋₃ /C ₃₀ -Hopano
Crudo original	-----	1,8	1,2	0,7
	1	1,8	1,1	0,7
T1(suelo A)	30	1,8	1,1	1,4
	90	2,1	1,3	1,6
T2 (suelo B)	1	1,8	1,1	0,8
	30	8,6	7,9	1,4
	90	ND*	ND*	1,7
T3 (suelo A +AE)	1	1,8	1,0	0,7
	30	1,9	1,1	1,5
	90	ND*	ND*	1,7
T4 (suelo B +AE)	1	1,8	1,1	0,7
	30	16,8	15,0	1,4
	90	19,5	17,2	1,7

ND*: no determinado por la ausencia de alguno de los componentes

Por otra parte, en los cromatogramas de masas correspondiente a los esteranos ($m/z=217$ y 218), no se observaron cambios apreciables en ninguno de los tratamientos, es decir, los esteranos (C₂₁, C₂₂, C₂₇, C₂₈ y C₂₉) y los diasteranos no fueron alterados (Figura 4). La alteración incipiente de los terpanos y la ausencia de biodegradación de los esteranos posiblemente se pueda relacionar al tiempo en el cual se llevaron a cabo los experimentos con un máximo 90 días, tiempo en el cual aún se observaron n-alcenos.

CONCLUSIONES

En todos los tratamientos ocurrió biodegradación del crudo mediano, con mayores porcentajes en el suelo de textura franco-arcillo-arenosa en comparación con el de textura arenosa.

La presencia de un agente estructurante favoreció la biodegradación, particularmente en el suelo de textura franco-arcillosa.

Los componentes saturados fueron los principalmente biodegradados y el orden de biodegradación correspondió a n-alcenos<n-C₂₁, seguido de los n-alcenos>n-C₂₅ y de los isoprenoides acíclicos pristano y fitano. En los terpanos ocurrió la biodegradación del C₃₀-hopano y de los homohopanos, sin la formación de los 25-norhopanos. Los esteranos no fueron alterados durante el tiempo de los experimentos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV por el financiamiento del proyecto Estudio de la biodegradación de crudos livianos y pesados en suelos de diferente textura y composición (PI-03-00-7178-2008). Al Prof. Ismael Hernández-Valencia por su apoyo en el análisis de textura del suelo; a la Prof Noemí Chacón por el suministro de las muestras del suelo B y a la Prof. Anna Gann por revisión de parte del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. Amellal, N., J. Portal y J. Berthelin. 2001. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry* 16(14): 1611-1619.
2. Andreas, H., K. Kaj Henriksen, L. Mortensen, K. Scow y P. Moldrup. 2010. Soil physical constraints on intrinsic biodegradation of petroleum vapors in a layered subsurface. *Vadose Zone Journal* 9(1): 137-147.
3. Atlas, R. 1977. Stimulated petroleum biodegradation. *Critical Reviews in Microbiology* 5: 371-386.
4. Baldock, J., C. Masiello, Y. Gélinas y J. Hedges. 2004. Cycling and composition of

- organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry* 92: 39- 64.
5. Boodoosingh, R., S. Christopher, A. Desmarais y B. Denise. 2007. The effect of bulking agent and initial contaminant concentration on the biodegradation of total petroleum hydrocarbons. *In: Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy* Vol. 12, Article 23.
 6. Córdova, A. 2011. Comparación de la eficiencia de extracción con solventes de diferente polaridad, para un crudo mediano a dos concentraciones en un suelo sometido a biorremediación Trabajo de Grado Geoquímica. UCV. 90 p.
 7. Chacón, N., N. Dezzio y S. Flores. 2005. Effect of particle-size distribution, soil organic carbon content and organo-mineral aluminium complexes on acid phosphatases of seasonally flooded forest soils. *Biol. Fert Soil* 41: 69-72.
 8. Chien, H., C. Kao, J. Liu, K. Takagi y Y. Surampalli. 2010. Clean up of petroleum-hydrocarbon contaminated soils using enhanced bioremediation system: Laboratory feasibility study. *Journal of Environmental Engineering* 136(6): 597-606.
 9. Dibble, J. y R. Bartha. 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of oil sludge. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 37(4): 729-739.
 10. Erdogan, E. y A. Karaca. 2011. Bioremediation of crude oil polluted soils. *Asian Journal of Biotechnology* 3(3): 206-213.
 11. Infante, C. 2001. Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de Intebiosr y Biorizer. *Interciencia* 26(10): 503-507.
 12. Infante, C. 2005. Contaminación de suelos y recuperación ecológica en Venezuela. *Acta Biológica Venezolana* 25(1-2): 43-49.
 13. Infante, C., F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y N. León. 2010a. Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. *In: G. Plaza (ed.). Trends in Bioremediation and Phytoremediation. Research Signpost. Kerala, India.* pp. 429-451.
 14. Infante, C., C. Ortega, F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y R. Pérez. 2010b. Efecto del potasio sobre el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con un crudo mediano. *Bioagro* 22(2): 145-152.
 15. Kauppi, S., A. Sinkkonen y M. Romantschuk. 2011. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(2): 359-368.
 16. León, N., C. Infante, M. Arias, M. Márquez, S. Mcmillen y R. Smart. 1998. Biodegradability of Venezuelan crude oils. *SPE/HSE Health, Safety and Environment in Oil and Gas E&P Proceedings SPE 48921*. Caracas. pp. 1-7.
 17. López, L., S. Lo Mónaco y M. Richardson. 1998. Use of molecular parameters and trace elements in oil-oil correlation studies, Barinas sub-basin, Venezuela. *Advances in Organic Geochemistry* 29(1-3): 613-629.
 18. Luque, O. 1983. Efectos del mezclado de horizontes sobre las propiedades físicas de suelos de las mesas orientales de Venezuela. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. UCV. Maracay. Venezuela 171 p.
 19. Peters, K., C. Walters y J. Moldowan. 2005. *The Biomarker Guide. Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History.* Cambridge University Press, Cambridge.
 20. República de Venezuela. 1998. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos peligrosos. Decreto 2635. Gaceta Nº 5245. Caracas.
 21. Scherr, K., H. Aichberger, R. Braun y A. Loibner. 2007. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43(5-6): 341-350.
 22. USEPA. 1986. Test methods for extracting nonvolatile and semivolatile organic compounds from solids such as soils, sludges, and wastes. Method 3540. Soxhlet Extraction. USEPA. Washington D.C.
 23. Vasudevan, N. y P. Rajaram. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil *Environment International* 26(5-6) 409-411.
 24. Wilke, B. 2005. Determination of chemical and physical soil properties *In: Margesin, R y F. Schinner (eds.). Manual for Soil Analysis-monitoring and Assessing Soil Bioremediation.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 47-93.