



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL
ÁREA DE BIOTRATAMIENTO DE SUELO DE LA EMPRESA PETROLERA
“PETROZUATA C.A”.
(Modalidad: Pasantía)

ROSELYS MARIA BERMÚDEZ RINCONES

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, JULIO 2009

OPTIMIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL
ÁREA DE BIOTRATAMIENTO DE SUELO DE LA EMPRESA PETROLERA
“PETROZUATA C.A”.

APROBADO POR:

Prof. Pedro J. López G

Asesor Académico

Ing. Francisco Reyes

Asesor Industrial

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Descripción del área.....	7
Toma de las muestras	7
Aislamiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos	7
Identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos	8
Ensayo de campo.....	9
Enumeración bacteriana (NMP).....	9
Fórmula para el cálculo del número más probable (NMP).....	10
Determinación de parámetros físico – químicos	10
Métodos estadísticos	11
RESULTADOS.....	13
Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos	13
Determinación de parámetros físico-químicos.....	13
DISCUSIÓN	25
pH.....	26
Conductividad eléctrica.....	27
Nitrato y fosfato	28
Humedad	29
Hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA).....	30
Aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP).....	32
Densidad bacteriana	34

CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	46
Hoja de Metadatos	50

DEDICATORIA

Primeramente a Dios y a la Virgen del Valle por darme fuerzas y ganas de seguir adelante

A mis padres: José y Rosa por lo que representan en mi vida.

A mi querida abuela: Victoria y a la memoria de mi tío Armando por confiar en mi.

A mis hermanos: José, Héctor y Robert y a mis sobrinos para que le sirva de ejemplo.

AGRADECIMIENTO

A la Empresa petrolera “Petrozuata C.A” (Complejo petrolero José Antonio Anzoátegui, Zuata, estado Anzoátegui) por haberme proporcionado esta gran oportunidad para culminar mi carrera y a su personal gerencial: Ing. Ramón Ramos, Lic. Marcel Guevara y al Ing. Francisco Reyes, por su amistad y sabios consejos.

Al Centro Regional de Investigaciones Ambientales (CRIA) (Universidad de Oriente; Núcleo de Nueva Esparta) por la colaboración prestada para la realización de los análisis microbiológicos.

Al Profesor Pedro José López por su amistad, asesoría y orientación durante la realización de este trabajo de grado.

Un agradecimiento especial al Msc. Alexander J. Barrios, por su paciencia, consejos, gran ayuda y por hacerme el camino más fácil durante la realización de este trabajo.

A mis amigos José G. Castillo y Iralis B. Villarroel, por su apoyo y amistad.

A todos aquellos que de alguna u otra forma y en diferentes circunstancias me apoyaron y animaron con palabras de aliento y sabios consejos.

Un consejo para todos: el camino es largo y tiene sus dificultades, pero vale la pena transitarlo..... El que persevera alcanza.....

GRACIAS

LISTA DE TABLAS

Tabla. 1. Distribución del n° de cepas bacterianas aisladas en cada una de las parcelas del área de biotratamiento de suelo.....	13
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variación del pH en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	14
Figura 2. Variación de la conductividad eléctrica en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	15
Figura 3. Variación del contenido de nitrato en el tiempo en cada una de la sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	16
Figura 4. Variación del contenido de fosfato en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	17
Figura 5. Variación del porcentaje de humedad en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	18
Figura 6. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos saturados en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	19
Figura 7. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos aromáticos en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	20
Figura 8. Variación del porcentaje de las fracciones de resinas en El tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	21
Figura 9. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos asfaltenicos en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	22
Figura 10. Variación del porcentaje de aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	23
Figura 11. Densidad de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.	24

RESUMEN

La explotación del petróleo y el uso de sus derivados, así como el acelerado desarrollo industrial en el mundo, involucra procesos de explotación a las que están asociadas la liberación de gran cantidad de compuestos contaminantes al ambiente, alguno de los cuales pueden ser carcinogénicos. La biodegradación es una técnica que permite descomponer estos compuestos contaminantes haciéndolos menos tóxicos al ambiente. La contaminación del suelo causada por derrames petroleros es un problema que se ha vuelto muy común en nuestros días. El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de biodegradación de hidrocarburo en el área de biotratamiento de suelo de la empresa petrolera “Petrozuata C.A”. Para ello se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 15 cm en cada una de las cuatro parcelas que conforman el área de biotratamiento de suelo, a las cuales se les aislaron e identificaron las bacterias degradadoras de hidrocarburos. Para el ensayo de campo de las cuatro parcelas que conforman el área de biotratamiento de suelo, se prepararon seis sub-parcelas, de las cuales se tomaron muestras a una profundidad de 15cm cada 15 días durante dos meses. A estas sub-parcelas se les determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: pH, conductividad eléctrica, humedad, contenido de nutrientes (nitrato y fosfato), % de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (SARA), % aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) y se determinó recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y heterótrofas, utilizando el método del Número Más Probable (NMP). Las bacterias degradadoras de hidrocarburos identificadas fueron *Pseudomonas* sp, *P. aeuriginosa*, *P. fluorescens* y *Flavobacterium* sp. Se encontraron variaciones en los parámetros físico-químicos que superaron lo establecidas en el Decreto 2635 que habla sobre las normas para el control y recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos en su artículo nº 53. El pH se encontró dentro de los límites establecidos por el decreto durante todo el periodo de estudio a excepción de la sub-parcela 6 (no tratada), los valores de conductividad eléctrica se encontraron por encima de los intervalos establecido por este decreto, en todas las sub-parcelas durante el desarrollo del estudio, mientras que, el porcentaje humedad presentó valores muy bajo durante el periodo de estudio, el contenido de nutrientes (nitrato y fosfato) fue deficiente ya que no se le agregó ningún tipo de fertilizante dos meses antes y durante el desarrollo de la investigación. Estas variaciones en los parámetros físico-químicos ocasionaron la lenta biodegradación de las fracciones de los hidrocarburos SARA durante el tiempo de estudio, así como, los aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP), en este estudio, también se pudo visualizar un bajo de recuento de bacterias degradadoras y heterótrofas. Se pudo observar que la sub-parcela 4, fue la que presentó las condiciones más adecuada, es decir, donde se observó la más alta tasa de biodegradación de los hidrocarburos SARA y HTP y el mayor crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y heterótrofas. La eficiencia del proceso de

bioremediación requiere de condiciones físico-químicas óptimas y de un tiempo de experimentación mayor de 45 días para que se pueda llevar a cabo satisfactoriamente.

INTRODUCCIÓN

Los avances de la ciencia y la tecnología desde la revolución industrial han aumentado la capacidad del ser humano de explotar los recursos naturales. El petróleo ha sido uno de los recursos naturales no renovables principalmente explotados (Cañizares-Villanueva, 2000). El petróleo (“Aceite de piedra”) es una mezcla compleja no homogénea de hidrocarburos (compuestos formados por hidrógeno y carbono). La industria petrolera en sus procesos de extracción, transporte y refinamiento genera importantes cantidades de residuos oleosos y viscosos (Soriano *et al.*, 1998).

El petróleo se presenta bajo diversas formas, pudiéndose encontrar desde amarillento y líquido hasta negro y viscoso. Estas diferencias son debidas a los tipos de hidrocarburos que lo constituyen. Los hidrocarburos de petróleo representan material de alto volumen, muchos de los cuales pueden ser degradados o transformados por microorganismos. Los microorganismos tienen la capacidad de degradar la mayoría de los componentes de los hidrocarburos naturales especialmente los denominados alcanos saturados e insaturados, los monoaromáticos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular (Ward *et al.*, 2000).

Los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, etc.) son capaces de oxidar todos los tipos de hidrocarburos en forma líquida, gaseosa o sólida de series alifáticas, oleofínicas, aromáticas y nafténicas. Esta habilidad facilita que el compuesto sea dispersado y removido del ambiente (Atlas, 1981). Por lo tanto, la capacidad de los microorganismos de utilizar una variedad de compuestos orgánicos sugiere que la microflora autóctona tenga el potencial de degradar los agentes contaminantes *in situ* (Atlas y Bartha, 1981).

Para metabolizar y utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y

energía, los microorganismos requieren de condiciones físico-químicas y nutricionales óptimas como nitrógeno, fosfato, azufre, vitaminas y otros compuestos (Atlas y Bartha, 1981). Muchas especies bacterianas son sensibles a la acidez y con frecuencia crecen muy poco cuando el pH es menor de 5,0.

La descomposición de los hidrocarburos puede ocurrir a temperaturas desde 0°C hasta 55°C, aunque la oxidación es sensible a elevadas temperaturas, además de requerir concentraciones de oxígeno adecuadas y la participación de enzimas como la mono y la dioxigenasas bacterianas. Se ha determinado que la disponibilidad de otros sustratos carbonados afectan el catabolismo de los hidrocarburos, siendo común una disminución de la velocidad de crecimiento microbiano en presencia de un sustrato fácilmente degradable (Atlas y Bartha, 1981; Madigan *et al.*, 2003). La acción de los microorganismos anaeróbicos en los procesos de biorremediación es más lenta, pero a diferencia de los aerobios, son capaces de degradar compuestos más tóxicos o con escasos lugares atacables enzimáticamente en sus moléculas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, solventes clorados y pesticidas (Berry, 1999). Este grupo de organismos goza de “mala presencia” debido a que están asociados a la producción de olores nauseabundos y gases inflamables, y también debido a que muchos de ellos son patógenos.

La degradación completa de los contaminantes del petróleo en las áreas de biotratamiento de suelo o *landfarming*, generalmente se lleva a cabo por poblaciones microbianas mixtas, más que por una sola especie. En la mayoría de los ecosistemas naturales, el inóculo inicial de microorganismos que utilizan los hidrocarburos limita la tasa de degradación del mismo, pero, posterior a un corto periodo de exposición, aumenta dicha tasa porque las bacterias comienzan a utilizar su maquinaria bioquímica que les permite metabolizarlos (Atlas, 1981).

El biosaneamiento del suelo o tratamiento superficial de tierra es una técnica de

remediación cuya aplicación se utiliza para reducir la concentración de hidrocarburos en suelos contaminados aprovechando su capacidad para ser degradados. La biodegradación es un proceso que conduce a la utilización de sistemas biológicos para la reducción de la contaminación del aire, sistemas acuáticos y terrestres. Los sistemas biológicos que se emplean generalmente son los microorganismos. La meta final de la biodegradación es la mineralización del contaminante, es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO_2 y formas inorgánicas de N, P, S) y compuestos celulares (Alexander, 1994; Eweis *et al.*, 1998).

La práctica de biotratamiento de suelo usualmente involucra movimientos de capas de tierras contaminadas con el propósito de aireación, estimulación de la actividad microbiana y mezcla de minerales y nutrientes (Leahy y Cowell, 1990). Cuando es aplicable, este tratamiento suele ser un medio económico para reestablecer la calidad del ambiente. No obstante, y a pesar de la relativamente larga historia de la investigación en el campo de la bioremediación de vertidos de hidrocarburos, ésta continúa siendo una disciplina esencialmente empírica, en la cual muchos de los factores biológicos que controlan los procesos no han sido completamente comprendidos (Korda *et al.*, 1997).

La biodegradación de los hidrocarburos es la degradación biológica del petróleo y sus derivados, llevada a cabo por bacterias y hongos que poseen la capacidad de oxidarlos y metabolizarlos (transformarlos en bióxido de carbono y agua) o transformarlos en biomasa. Dado que los microorganismos requieren de nitrógeno y fósforo para incorporar en la biomasa, el aprovechamiento de éstos en los suelos con derrames es un factor crítico para su posible degradación. Es posible la aceleración del proceso por adición de urea, fosfato, fertilizante del tipo NPK (Luque *et al.*, 2005).

La contaminación por hidrocarburos tiene un profundo impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas naturales, lo cual se suele traducir en una reducción de la diversidad, la biomasa y la actividad metabólica (MacNaughton *et al.*, 1999). Se ha visto que en los ambientes sometidos a una contaminación crónica tienden a predominar las poblaciones de microorganismos capaces de utilizar los compuestos contaminantes o con capacidad de sobrevivir en su presencia; sin embargo, bajo condiciones normales, dicho grupo de microorganismos está presente a baja densidad. La mayor parte de los conocimientos sobre los efectos ecológicos derivados de un episodio de estas características proviene de los datos obtenidos a partir de microorganismos o grupos de microorganismos aislados a partir de dicho ambiente, con capacidad de degradar hidrocarburos o compuestos similares (Kanaly *et al.*, 2000; Ríos-Hernández *et al.*, 2003). Desde los estudios pioneros de ZoBell (1946), en ambientes marinos, se han aislado diferentes cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos (Atlas, 1981; Leahy y Cowell, 1990; Van Hamme y Ward, 2003). Muchos de estos géneros, tales como *Alcalinivorax* sp. o *Planococcus* sp., usan un número limitado de fuentes de carbono, preferentemente utilizan hidrocarburos de petróleo, y podrían considerarse como especialistas (Dyksterhouse *et al.*, 1995; Engelhardt *et al.*, 2001; Golyshin *et al.*, 2002; Yakimov *et al.*, 1998). No obstante, también se han aislado bacterias que no presentan esta marcada especialización, como aquellas de los géneros *Marinobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* o *Geobacillus* (Gauthier *et al.*, 1992; Gilewicz *et al.*, 1997; Maugeri *et al.* 2002; Zhang *et al.*, 2002).

El conocimiento de la diversidad microbiana es de gran importancia, tanto para evaluar el impacto que supone la contaminación por hidrocarburos, como para determinar cuáles poblaciones microbianas pueden estar implicadas en la degradación de los mismos en el área de biotratamiento. Las metodologías tradicionalmente utilizadas para el estudio de los procesos de bioremediación consistían en la utilización de métodos microbiológicos convencionales para la obtención de cultivos

axénicos o consorcios con capacidad de degradar hidrocarburos. Sin embargo, desde hace tiempo, se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar métodos que no requieren un paso previo de cultivo, dado que una gran parte de los microorganismos presentes en los ambientes naturales no pueden crecer en medios de cultivos sintéticos (Amann *et al.*, 1995).

Las aproximaciones basadas en métodos moleculares, ya sea mediante la construcción de librerías genéticas, la hibridación *in situ* o la electroforesis en gel de gradientes desnaturizantes a partir de una amplificación mediante PCR (PCR-DGGE) han revelado una enorme diversidad bacteriana en los ambientes naturales (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1998). Las bacterias obtenidas a partir de técnicas convencionales de cultivo suelen ser diferentes a las identificadas mediante aproximaciones cultivo-independientes. De hecho, muchas veces las bacterias aisladas en cultivos axénicos representan una baja proporción de las poblaciones microbianas presentes en ambientes naturales (Eilers *et al.*, 2000). En tal sentido, estos métodos han permitido detectar numerosas bacterias no cultivables, algunas de las cuales constituyen poblaciones dominantes. Finalmente, permiten proveer medidas para determinar la influencia de estas poblaciones en la degradación del petróleo y reforzar las prácticas de biosaneamiento basadas en la microbiota autóctona (Whyte *et al.*, 1998).

La biodegradación es un proceso natural, ventajoso no sólo por permitir la degradación de los compuestos del petróleo impidiendo su concentración, sino que también es indispensable para el reciclaje de los elementos de la biosfera. Otra de las ventajas de esta técnica es que el costo de inversión y operación es relativamente bajo, especialmente cuando se trata de eliminar residuos de difícil acceso, como por ejemplo, los derrames de gasolina, u otros componentes del petróleo, esta técnica no requiere de desarrollo tecnológico intenso (Alexander, 1994).

Los conocimientos que se tienen sobre los procesos involucrados en la biodegradación han permitido el avance de las investigaciones en el manejo de áreas impactadas por hidrocarburos. El estudio de la optimización de los parámetros microbiológicos y físico-químicos para alcanzar el óptimo funcionamiento del área de biotratamiento de suelo en la empresa petrolera “Petrozuata C.A”. aportará conocimientos importantes para las empresas petroleras venezolanas. La evaluación de estos parámetros y la comprensión de sus posibles variaciones ayudarán a tomar medidas correctivas para la evaluación del área de biotratamiento.

METODOLOGÍA

Descripción del área

El área de biotratamiento de suelo estuvo constituida por cuatro parcelas que conformaron una extensión total de 2 hectáreas, ubicadas al este de la planta de mejoramiento de la empresa petrolera “Petrozuata” C.A (Complejo petrolero José Antonio Anzoátegui, Zuata, estado Anzoátegui), entre los 10° 04'17'' N y los 64° 53'57'' O, estas parcelas se diseñaron para el tratamiento y la incorporación de lodos petrolizados. Se procesan lodos que contienen 10% de hidrocarburos en la mezcla de material incorporado para luego ser sometidos a tratamiento biológico (biosaneamiento).

Toma de las muestras

Las muestras de suelo de aproximadamente 1 kg, fueron tomadas con una pala pequeña a una profundidad de 15 cm y colocadas en frascos de vidrio previamente esterilizados y etiquetados. Posteriormente fueron colocados en cavas con hielo y trasladados al laboratorio de Microbiología del Centro Regional de Investigaciones Ambientales (CRIA), Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta. Los análisis microbiológicos se realizaron en aproximadamente 4 meses.

Aislamiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se tomaron 10 g de la muestra recolectada en cada una de las parcelas, y se suspendieron en un recipiente que contenía 90 ml de solución buffer fosfato salino

(dilución 10^{-1}). A éstas se les aplicó agitación con un agitador magnético por 20 seg, dejándola reposar con el fin de obtener la separación de fases (líquida-sólida). Seguidamente, a partir de la fase líquida se tomó una alícuota de 1 ml y se prepararon diluciones decimales seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-8} en tubos que contenían 9 ml de solución de buffer fosfato salino. La inoculación se realizó tubos de cultivo con medio mineral Bushnell-Haas (Difco) modificado. Donde se sustituyó el nitrato de amonio por nitrato de potasio. La fórmula final del medio fue: sulfato de magnesio 0,2g; cloruro de calcio 0,02 g; fosfato monopotásico 1 g; fosfato dipotásico 1 g; nitrato de potasio 1 g y cloruro férrico 0,05 g; el pH se ajustó a $7,0 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N. Al medio se le agregó trozos de papel filtro Whatman No 5 impregnados con hexadecano como fuente de carbono. Se sembraron en los tubos las suspensiones de suelo de 10^{-6} a 10^{-1} por triplicado y se incubó a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 15 días. Simultáneamente se sembraron tubos control sin el hexadecano. Una vez pasado el tiempo de incubación y observado turbidez en los tubos con hexadecano, se sembró en placas de Petri con agar Bushnell-Hass (caldo con la adición de agar-agar a 15 g/l) y discos de papel filtro impregnados con hexadecano, y se incubaron a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante siete a diez días. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las colonias desarrolladas fueron aisladas y sembradas nuevamente en tubos de ensayo con medio Bushnell-Hass líquido. Esta siembra efectuada de tubos a placas y viceversa se realizó en tres oportunidades hasta que se obtuvieron colonias puras para su identificación.

Identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Una vez obtenidas las colonias puras se escogieron las más desarrolladas, es decir, las que presentaron mayor tamaño. Se usó la técnica de Gram (American Public Health Association, 1998), con el objetivo de determinar su morfología y reacción a la coloración. Para la identificación de las bacterias a nivel de género y especie se aplicaron las siguientes pruebas bioquímicas convencionales: Producción de indol,

utilización de citrato como única fuente de carbono, reacción de rojo de metilo, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de oxidación y fermentación (glucosa, sacarosa, xilosa, maltosa), descarboxilación de ornitina, lisina y arginina, presencia de pigmento difusible (No Fluorescencia), crecimiento a 42°C, crecimiento en agar cetrimide (Merck) a 35 y 41°C, hidrólisis de gelatina. (Koneman *et al.*, 1992).

Ensayo de campo

De las cuatro parcelas que constituyeron el área de biotratamiento de suelo, se prepararon seis sub-parcelas, cada una de 1m x 1m con la siguiente distribución: en la parcela 1 se ubicó la sub-parcela 1, en la parcela 2 la sub-parcela 2, en la parcela 3 se ubicó la sub-parcela 3 y en la parcela 4 la sub-parcela 4. A estas sub-parcelas se les aplicaron tratamientos diarios, tales como: arado, adición de agua y adición de lodos petrolizados. La sub-parcela 5 (sin lodo) se ubicó en la parcela 1, y sólo se le aplicaba arado y adición de agua diariamente, y la sub-parcela 6 (no tratada) se ubicó en la parcela 2 y diario se le agregaba agua y lodos petrolizados no se le aplicaba el arado. Las muestras de estas sub-parcelas, se tomaron del centro de la sub-parcela a una profundidad aproximada de 15 cm, cada quince días durante dos meses, para realizar análisis físico-químicos; para los análisis microbiológicos sólo se hizo un muestreo para la determinación del NMP de bacterias degradadoras de hidrocarburos y de bacterias heterótrofas

Enumeración bacteriana (NMP)

Se enumeraron bacterias heterótrofas y bacterias degradadoras de hidrocarburos mediante la técnica del Número Mas Probable (APHA, 1998). Se prepararon suspensiones decimales seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-8} que se inocularon por triplicado en caldo peptona-rojo fenol + extracto de carne (Difco) para enumerar bacterias heterótrofas y en medio Bushnell-Haas con hexadecano para enumerar las

degradadoras de hidrocarburos, se incubó a temperaturas de 35-37°C por 7 días para las primeras y 15 días para las segundas. En ambos casos se utilizó como criterio de crecimiento la presencia de turbidez en los medios de cultivo. Los resultados se interpretaron usando la tabla del NMP (APHA, 1998).

Fórmula para el cálculo del número más probable (NMP)

$$NMP = N_{po} * 100 \frac{V_{neg}}{V_{total}}$$

N_{po} = Número de tubos positivos

V_{neg} = Volumen (ml) de tubos negativos

V_{total} = Volumen total

Determinación de parámetros físico – químicos

Para la determinación de los análisis físico-químicos, las muestras recolectadas quincenalmente en cada una de las sub-parcelas fueron colocadas en una cava con hielos y trasladadas hasta la empresa INTERLAB (División de Control Ambiental C.A), el cual es un laboratorio especializado para realizar análisis de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, ubicada en Puerto la Cruz, estado Anzoátegui. A estas muestras se les hicieron los siguientes análisis:

- **pH del suelo:** Por el método SW846 – 9045C, midiendo la actividad de iones hidrógeno de la solución acuosa resultante de la mezcla de suelo y agua con un pH-metro Orion 41.

- **Conductividad eléctrica:** USDA (2004)-4F, midiendo el paso de electricidad a través de un extracto del suelo obtenido de la filtración de una pasta saturada con un Conductímetro WWT-330i.
- **% de humedad:** ISO 11465, método gravimétrico mediante el secado en una estufa a 105°C con una Estufa MEMMERT.
- **% de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA):** Separando las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos contenidos en el hidrocarburo por cromatografía de columna con una Balanza analítica Denver, instruments APX-200.
- **% de aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP):** EPA-3540C, mediante la extracción soxhlet con diclorometano, clean-up con sílica gel y cuantificación gravimétrica con una Balanza analítica Denver, instruments APX-200.
- **Contenido de nitrato:** USDA (2004)-4F2/ SMWW4500-NO₂ B; por determinación colorimétrica en el extracto de saturación, Bureta semiautomática POBEL.
- **Contenido de fosfato:** USDA (2004)-4D5al, por determinación colorimétrica al extracto obtenido con una solución de bicarbonato de sodio con un ICP SPECTRO Ciros visión.

Métodos estadísticos

Inicialmente se aplicó un análisis exploratorio (boxplot) (Boyer *et al.*, 2000),

para observar el comportamiento de todos los parámetros fisico-químicos. Seguidamente se aplicó un análisis no paramétrico Kruskal Wallis (Sokal y Rohlf, 1981) para determinar si existían diferencias en la degradación de hidrocarburos en el tiempo de estudio y establecer el cumplimiento del decreto 2635 establecido por el Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales (MARN), en el artículo 50 que plantea la norma para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Las bacterias aisladas e identificadas fueron: *Pseudomonas* sp (58,33 %), *P. aeruginosa* (16,66%), *P. fluorescens* (12,5%) y *Flavobacterium* sp (12,5%). En la tabla 1 se evidencia el número de cepas bacterianas aisladas para cada especie bacteriana.

Tabla. 1. Distribución del n° de cepas bacterianas aisladas en cada una de las parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Parcelas	Bacterias identificadas			
	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Flavobacterium</i> sp
	n	n	n	n
Parcela 1	2	0	0	0
Parcela 2	3	0	0	0
Parcela 3	3	0	0	0
Parcela 4	6	4	3	3
Total	14	4	3	3

Determinación de parámetros físico-químicos

pH.

Los valores de pH mostraron un comportamiento variado (Fig. 1). Se pudo observar durante el tiempo de estudio una tendencia hacia disminución de los valores del pH en casi todas las sub-parcelas. La excepción se presentó en la sub-parcela 6 (no tratada) que mantuvo valores de pH casi constantes (8,06 a 8,18) durante los cuarenta y cinco días de estudio. Un comportamiento similar a los valores del pH de

la sub-parcela 6 (no tratada) se observaron en la sub-parcela 5 (sin lodo), donde se observó una disminución del pH en los primeros quince días y luego se mantuvo constante durante el resto de los 45 días de tratamiento (7,86 a 8,12). En la sub-parcela 4 se observó un descenso del pH con valores que oscilaron entre 8,24 a 7,62 desde el inicio hasta el final del periodo de estudio. Para la sub-parcela 1, el comportamiento fue similar a la sub-parcela 4. En la sub-parcela 2 se observó un aumento durante los primeros quince días, que luego descendió en el resto del tiempo estudiado, mientras que en la sub-parcela 3, el comportamiento fue diferente a la sub-parcela 2, disminuyendo en los primeros quince días y luego aumentando durante los otros quince días y finalmente fue disminuyendo hasta final del estudio. La distribución de frecuencia del pH en las sub-parcelas analizadas durante el periodo muestreado no presentaron diferencias significativas, es decir, presentó una distribución normal ($p > 0,05$) (Anexos).

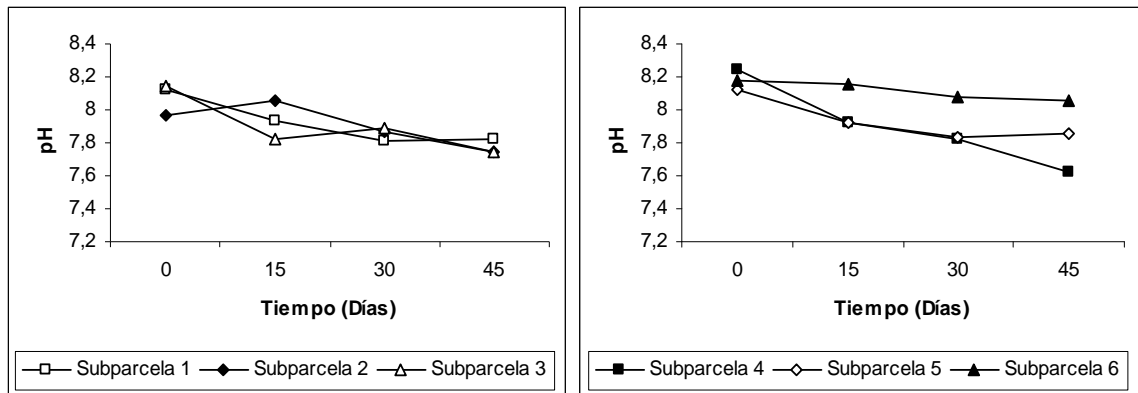


Figura 1. Variación del pH en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Conductividad eléctrica

Las sub-parcelas 5 (sin lodo) y 6 (no tratada), presentaron comportamientos similares en los valores de conductividad. En la sub-parcela 5 (sin lodo) inicialmente

se observó un valor de 17,56 mS/cm hasta disminuir a 14,13 mS/cm a los 15 días de estudio, que luego descendió hasta el final del estudio mostrando un comportamiento poco variable. En la sub-parcela 6 (no tratada) el valor inicial fue de 12,87 mS/cm, mientras que el final fue de 12,20 mS/cm (Fig. 2). En las sub-parcelas 1 y 4 se observó una tendencia monótonica ascendente en los primeros quince días que luego descendió hasta el final del estudio, la sub-parcela 1 presentó un valor inicial de 7,74 mS/cm y para la sub-parcela 4, el valor fue de 8,4 mS/cm, que luego se mantuvieron constantes durante el resto del tiempo estudiado. El valor de conductividad más alto se encontró en la sub-parcela 2 a los treinta días de estudio (19,82 mS/cm). La conductividad eléctrica no presentó diferencias significativa en las sub-parcelas estudiadas, la distribución fue normal ($p > 0,05$) (Anexos).

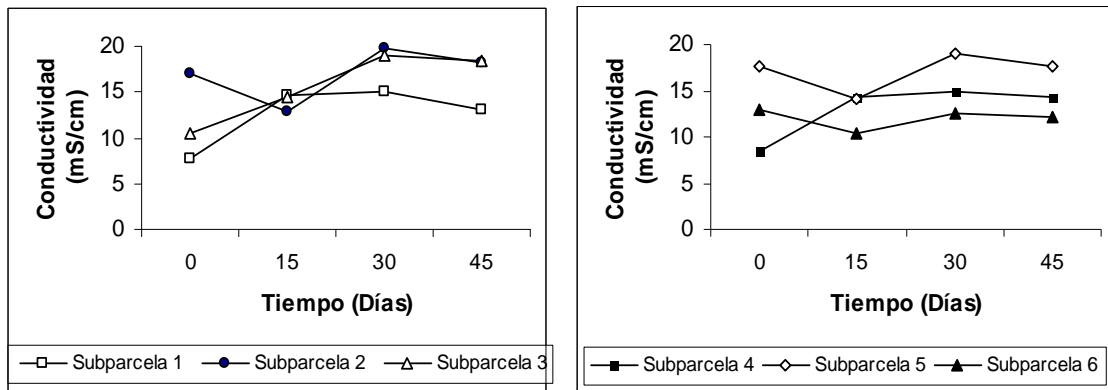


Figura 2. Variación de la conductividad eléctrica en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo

Nitrato

El comportamiento general de los valores de nitrato fue similar en casi todas las sub-parcelas durante el periodo de estudio, observándose un incremento en los primeros quince días y luego una disminución paulatina conforme se incrementaba el tiempo de exposición del lodo petrolizado. Los valores más altos de nitrato fueron

observados en las sub-parcela 2 (3,63 mg/kg), sub-parcela 4 (3,41mg/kg), y en la sub-parcela 5 (sin lodo) (3,66 mg/kg) a los quince días de exposición del lodo petrolizado (Fig. 3). Al iniciar el estudio se pudo notar la baja concentración de nitrato en todas las sub-parcelas con valores entre 0,006 a 0,11 mg/kg, que luego se incrementaron en los primeros quince días, alcanzando un promedio de 3,23 mg/kg, que luego disminuyeron paulatinamente durante el resto del tiempo. La excepción fue en la sub-parcela 1 y 4, donde los valores de nitrato se mantuvieron casi constantes después de los treinta días de exposición del lodo petrolizado. Este parámetro no presentó una distribución normal, por lo tanto se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, encontrándose que no existían diferencias significativas en el contenido de nitrato durante el tiempo de estudio ($p > 0,05$) (Anexos).

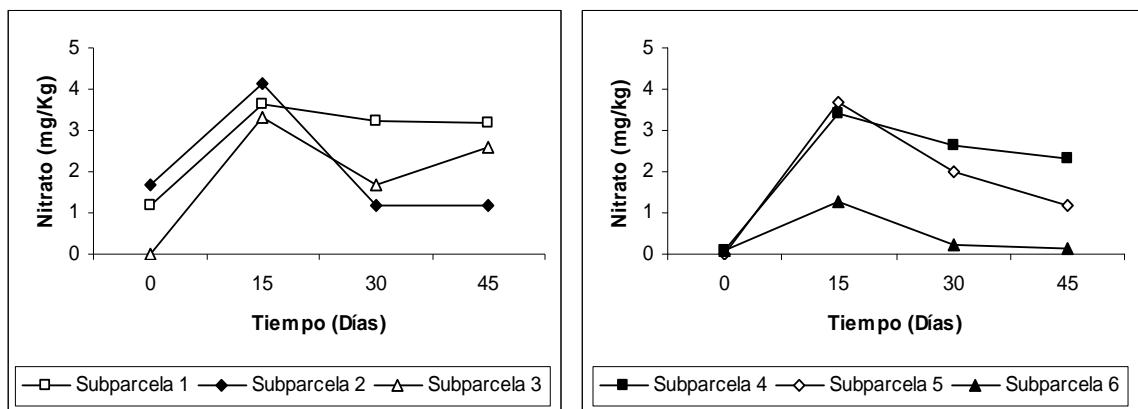


Figura 3. Variación del contenido de nitrato en el tiempo en cada una de la sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Fosfato

El contenido de fosfato en las seis sub-parcelas no mostró una tendencia clara durante los cuarenta y cinco días de estudio, sin embargo se puede visualizar que en las sub-parcelas 3 (530 a 645 mg/kg) y 4 (577 a 812 mg/kg) los **valores del** contenido de fosfato aumentaron paulatinamente durante los primeros quince días de estudio, que luego descendieron pero de una manera muy lenta en donde la

disminución es casi inapreciable (Fig. 4). En las sub-parcelas 1 y 5 (sin lodo) se encontraron valores de contenido de fosfato más altos que oscilaron entre 1275 a 1280 mg/kg, mientras que en la sub-parcela 3 y 4 se observaron los valores de contenido de fosfato más bajo (530 a 577 mg/kg). El contenido de fosfato en el área estudiada presentó una distribución anormal, por lo tanto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, observándose diferencias significativas en el contenido de fosfato ($p < 0,05$) (Anexos).

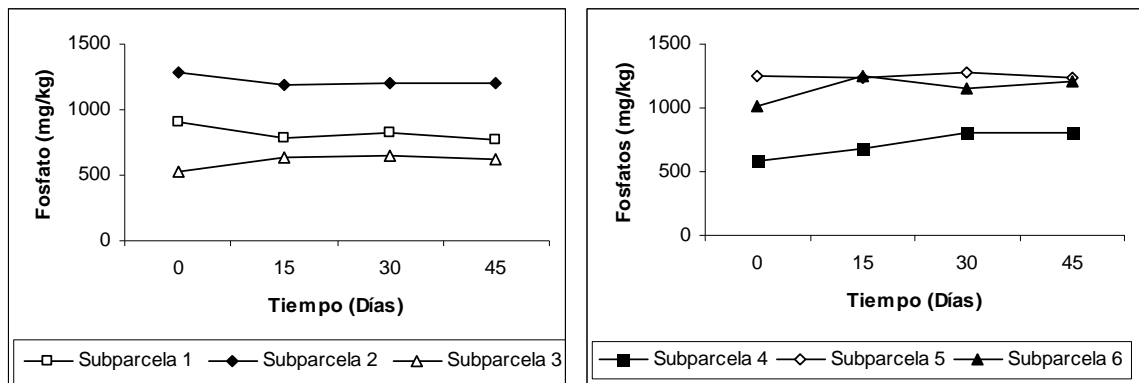


Figura 4. Variación del contenido de fosfato en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Humedad

El porcentaje de humedad observado durante el periodo de estudio tuvo un comportamiento poco variable. En la figura 5 se puede visualizar, que el mayor valor de humedad se encontró en la sub-parcela 6 (no tratada) presentando un aumento desde el inicio del tratamiento hasta los treinta días de exposición del lodo petrolizado (22%) y mostrando un ligero descenso al final del estudio (20%), mientras que el valor más bajo fue hallado en la sub-parcela 4 en los últimos 15 días de exposición del lodo petrolizado (10%). Los valores del porcentaje de humedad descendieron desde el inicio hasta el final del estudio en las sub-parcelas 4 y 5 (sin lodo) con valores entre 17% a 10% y de 20% a 13% respectivamente, conforme transcurría el

tiempo de exposición del lodo petrolizado. En las sub-parcela 2 y 3, se visualizó un comportamiento similar, una disminución en los primeros quince días y luego un ligero aumento a los treinta días y finalmente disminuyeron conforme transcurría el tiempo. El contenido de humedad en las sub-parcelas estudiadas presentó una distribución anormal, por lo tanto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) (Anexos).

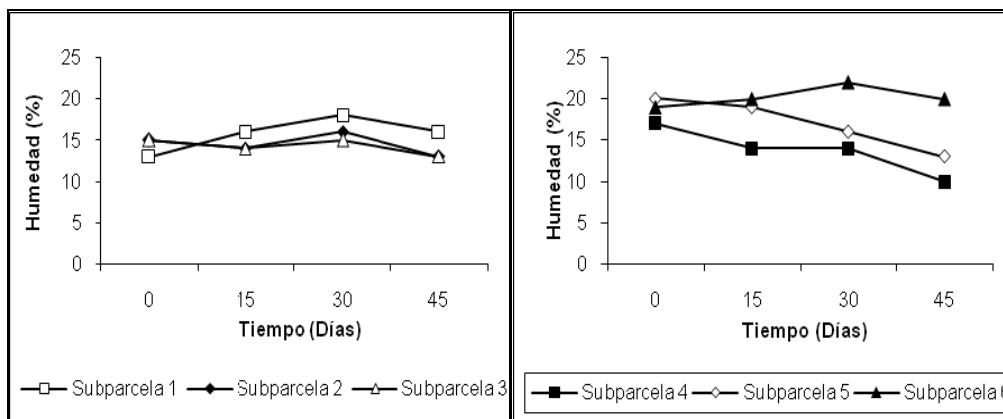


Figura 5. Variación del porcentaje de humedad en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Hidrocarburos saturados

El porcentaje de las fracciones de los hidrocarburos saturados mostró una tendencia variada, disminuyendo éste de manera progresiva en todas las sub-parcelas estudiadas observándose valores entre 10 hasta 30%. La excepción fue la sub-parcela 4, donde se pudo observar un aumento paulatino conforme aumenta el periodo de exposición del lodo petrolizado, tomando valores entre 10 a 21%. El mayor valor de hidrocarburos saturados fue hallado en la sub-parcela 6 (no tratada) al inicio del tratamiento con un valor del 30%. Los valores más bajos fueron encontrados en la sub-parcela 1 y 4, durante la exposición del lodo petrolizados con valores del 10%, presentando estos comportamientos diferentes. En la sub-parcela 2, se observó un descenso en el inicio del estudio hasta los 15 días de exposición para luego mantener un comportamiento estable hasta el final del tratamiento (12%). En la sub-parcela 4,

los hidrocarburos saturados presentaron un aumento progresivo desde el inicio hasta los 30 días del tratamiento (10 a 21%) y luego se observó un ligero descenso al final del estudio (18%). Las fracciones de los hidrocarburos saturados no presentaron diferencias significativa ($p > 0,05$) (Anexos).

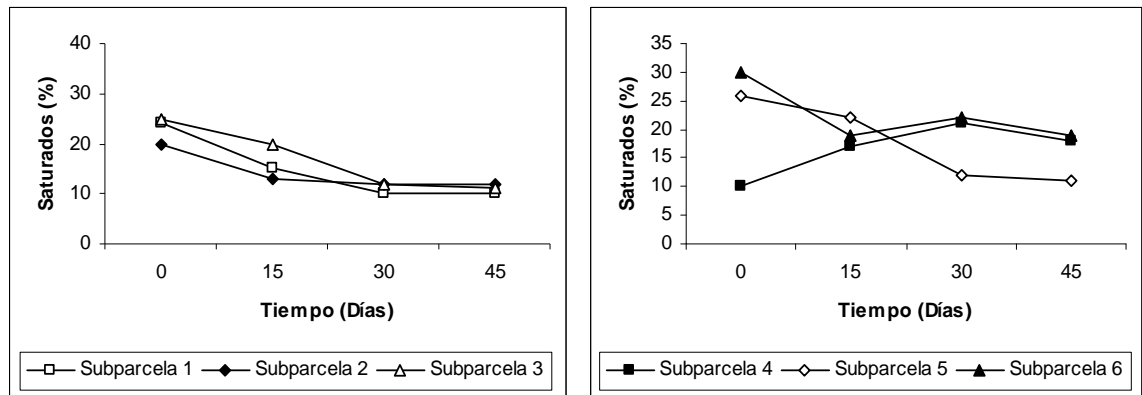


Figura 6. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos saturados en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Hidrocarburos aromáticos

El porcentaje de las fracciones de hidrocarburos aromáticos presentó una tendencia variada (Fig. 7), con valores que variaron entre sub-parcelas y periodo de tiempo expuesto. Los valores más altos del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos aromáticos se observaron en la sub parcela 2, y en la sub-parcela 6 (no tratada) a los 30 días (32 a 33%) de exposición del lodo petrolizado, presentando éstas un incremento desde los 30 días del tratamiento y luego se mantuvo estable hasta el final del tratamiento. En las sub-parcelas 1 y 3, se observaron comportamientos similares de las fracciones de hidrocarburos aromáticos donde se visualizó una disminución paulatina desde el inicio hasta los 15 días de tratamiento y luego aumentó hasta el final del estudio, mientras que, en las sub-parcelas 2 y 5 (sin lodo) el comportamiento fue diferente observándose un incremento constante conforme transcurría el tiempo. El porcentaje de las fracciones de hidrocarburos

aromáticos en estas sub-parcelas presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) (Anexos).

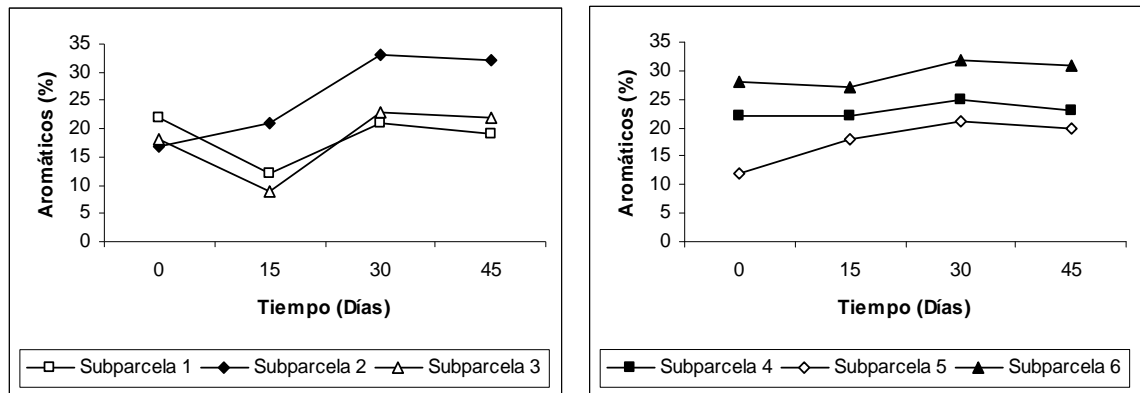


Figura 7. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos aromáticos en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Resinas

El porcentaje de fracciones de resinas presentó un comportamiento variado, observándose los valores más altos fueron observados en las sub-parcelas 1 y 2, con porcentajes que van desde 37 a 44 % respectivamente (Fig. 8). Las sub-parcelas 1 y 5 (sin lodo) mantuvieron un comportamiento estable desde el inicio del estudio, ascendiendo paulatinamente en los primeros 30 días, que luego disminuyó al final del periodo de estudio, mientras que las sub-parcelas 3, 4 y 6 (no tratada) presentaron tendencias similares donde se puede visualizar valores constantes en los primeros quince días que luego descienden levemente durante el resto del tiempo alcanzando los valores más bajos de resina (14 a 18%). En la sub-parcela 2, se observó un comportamiento muy particular, observándose una fuerte disminución en los primeros quince días del estudio (37% a 27%), que luego asciende de 27 a 37% para luego mantenerse constante hasta el final del periodo estudiado. El porcentaje de las fracciones de resinas presentaron diferencias significativas en el área estudiada, ($p <$

0,05), encontrándose la mayor fracción del contenido de este hidrocarburo en la sub-parcela 1 y el más bajo en la sub-parcela 4 (Anexos).

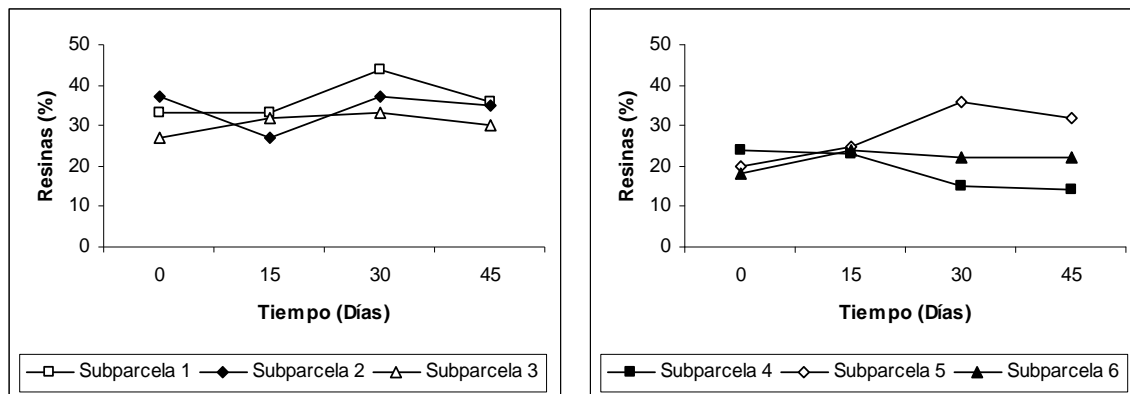


Figura 8. Variación del porcentaje de las fracciones de resinas en El tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Asfaltenos

El porcentaje de las fracciones de los hidrocarburos asfálticos más altos se encontró al inicio del estudio en la sub-parcela 4 (44%), seguida por la sub-parcela 5 (sin lodo) (42%) y la sub-parcela 3 (39%) después de haber transcurrido los primeros 15 días (Fig. 9). Los valores más bajos de las fracciones de los hidrocarburos asfálticos se encontraron en la sub-parcela 6 (no tratada) (20%) al final del periodo de estudio y en la sub-parcela 1, al inicio y final de la exposición del lodo petrolizado (20 y 21%). En las sub-parcelas 1, 2, 3 y 6 (no tratada) se observó una tendencia similar durante todo el periodo de estudio, donde inicialmente aumentan las fracciones de los hidrocarburos asfálticos y luego disminuyen monotónicamente hasta el final; es decir hasta los últimos 45 días, mientras que las sub-parcelas 4 y 5 (sin lodo) disminuyen paulatinamente conforme transcurre el tiempo. Se observó que el porcentaje de las fracciones de hidrocarburos asfálticos no presentó ($p > 0,05$) diferencias significativas (Anexos).

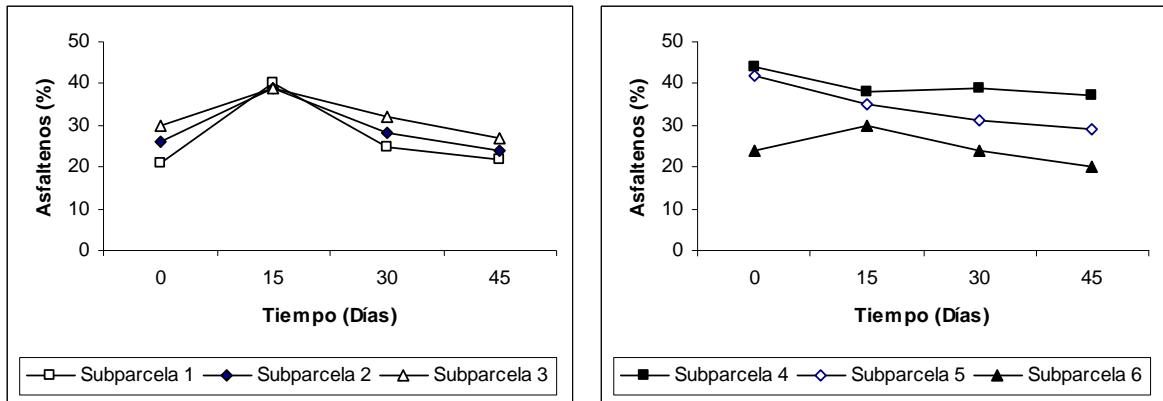


Figura 9. Variación del porcentaje de las fracciones de hidrocarburos asfaltenicos en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

Aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Se observó una disminución progresiva en el porcentaje de HTP en la sub-parcela 1 alcanzando valores entre 8,75 a 5,0% conforme transcurría el tiempo de estudio (Fig. 10). En la sub-parcela 4 se presentó un comportamiento ascendente, alcanzando valores entre 7,4 a 8,98% durante los primeros 30 días y luego presentando un ligero descenso hasta el final del estudio. El valor más alto de (HTP) se observó en la sub-parcela 3 a los primeros 15 días de la exposición del lodo petrolizado y disminuyó hasta el final del tratamiento con valores de 9 a 11%. En las sub-parcelas 2, 3 y 6 (no tratada) se visualizó una tendencia similar durante el periodo de estudio, observándose elevados valores inicialmente que luego descienden hasta hacerse constantes en los últimos días de la exposición del lodo petrolizado. La sub-parcela 5 (sin lodo) se visualizó un aumento progresivo alcanzando un valor de 7,9% HTP a los 30 días que luego disminuyó a 7,2% HTP a los 45 días de tratamiento. El porcentaje de aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) no presentó una distribución normal, por lo tanto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las unidades experimentales (Anexos).

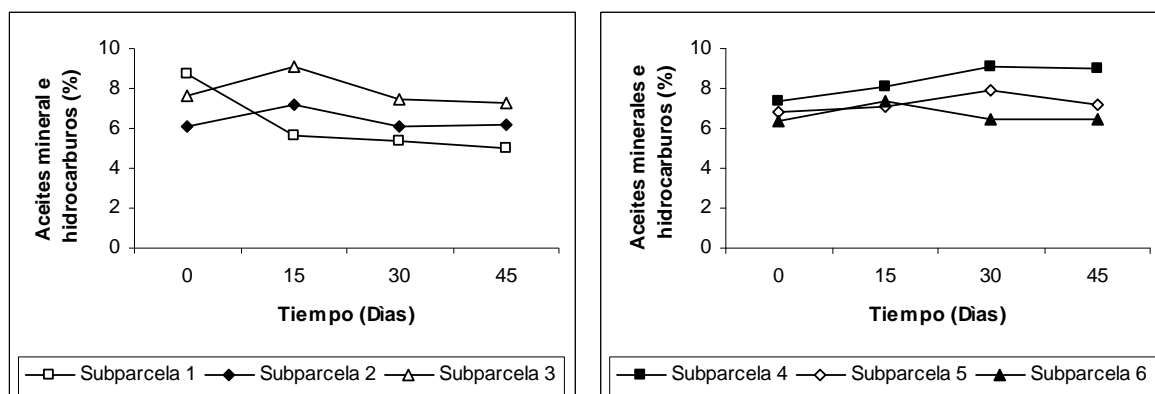


Figura 10. Variación del porcentaje de aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en el tiempo en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo

Número más probable (NMP) de las bacterias degradadoras de hidrocarburos usando el hexadecano como única fuente de carbono.

Se visualizó un aumento de la densidad bacteriana, tanto de bacterias heterótrofas como de degradadoras de hidrocarburos en las sub-parcelas 1, 2, 3, observándose el mayor recuento de células tanto heterótrofas ($9,3 \times 10^9$ ufc/g) como degradadoras de hidrocarburos en la sub-parcela 4 ($1,1 \times 10^9$ ufc/g). El recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos encontrada en la sub-parcela 1 fue aproximadamente de $1,1 \times 10^8$ ufc/g, en la sub-parcela 2, fue de $1,2 \times 10^8$ ufc/g y para la sub-parcela 3, de $2,6 \times 10^8$ ufc/g; mientras la densidad bacteriana heterótrofas para la sub-parcela 1 fue de $2,2 \times 10^9$ ufc/g, para la sub-parcela 2, fue de $3,4 \times 10^9$ ufc/g y para la sub-parcela 3, fue de $5,1 \times 10^9$ ufc/g. Sin embargo, en la sub-parcela 5 (sin lodo), y en la sub-parcela 6 (no tratada) no se observó densidad bacteriana significativo de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos en el área de biotratamiento durante el periodo de estudio. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias degradadora y heterótrofas durante el periodo estudiado ($p > 0,05$). (Anexos).

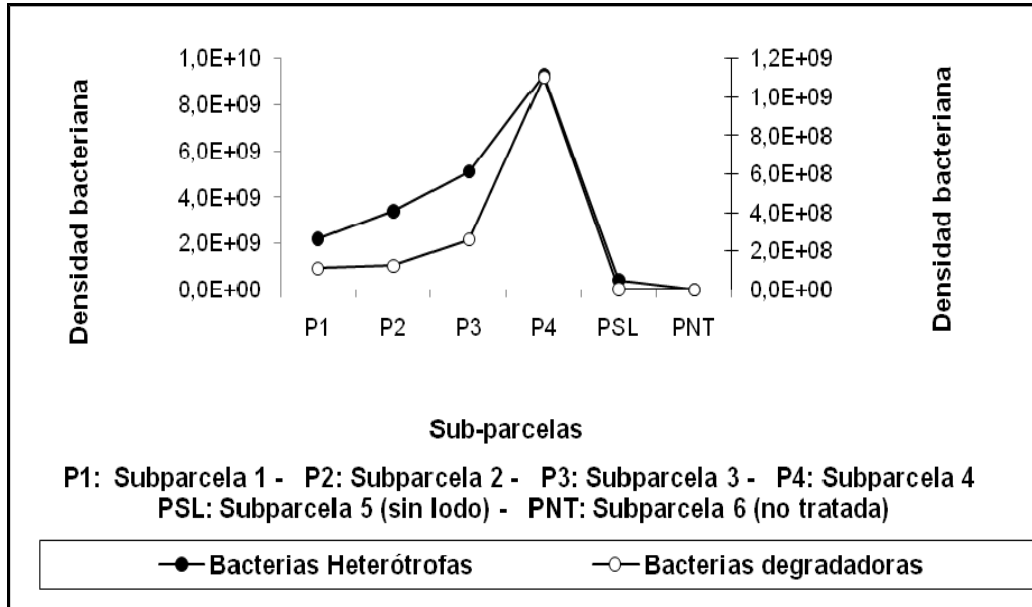


Figura 11. Densidad de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos en cada una de las sub-parcelas del área de biotratamiento de suelo.

DISCUSIÓN

El biosaneamiento de áreas impactadas por derrames de hidrocarburos u otros desechos orgánicos, es la terminología que describe la aplicación práctica de los procesos de biodegradación (Infante, 2001). En el biosaneamiento se utiliza la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su toxicidad; se ha convertido en una alternativa prometedora para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (Atlas, 1981; Bartha, 1986, Ryan *et al.*, 1991). Las bacterias aisladas e identificadas en el área de estudio fueron: *Pseudomonas* sp, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *Flavobacterium* sp, en las parcelas 1, 2 y 3, sólo se aislaron cepas de *Pseudomonas* sp, mientras que, en la parcela 4, se aislaron los 4 tipo de cepas bacterianas. *Pseudomonas* sp fue la que presentó el mayor número de cepas en la parcela 4. La presencia de estas bacterias en esta parcela se atribuye a que esta presentó las condiciones más adecuada para su crecimiento. Es importante mencionar que en las parcelas 1, 2 y 3, se observó una inclinación del terreno, cuyas características no permitieron el absceso a la maquinaria para realizar el tratamiento diario, ya que estas parcelas se encontraban inundadas a causa de las lluvias caídas dos días antes, la excepción fue la parcela 4, que si se le pudo hacer el tratamiento diariamente ya que esta no se inundaba. Esta causa quizás provocó la disminución en el número y diversidad bacteriana en la parcela 1, 2 y 3, por anoxia celular (Kastner *et al.*, 1998), ya que la abundancia de agua en el medio, hizo deficiente el paso del oxígeno a través de los espacios porosos del suelo.

Las bacterias del género *Pseudomonas* pueden utilizar diversos sustratos, incluyendo hidrocarburos del petróleo. *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, aeróbicas, con amplia capacidad metabólica, que pertenecen a la clase gamma de las Proteobacterias. Son productoras de biosurfactantes como los ramnolípidos, involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria conocida como patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o fibrosis quística (Rockne *et al.*, 2000). Estudios realizados en el desempeño metabólico de esta bacteria han permitido identificarla como degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, la mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias (reducción de nitratos), la degradación de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos, así como del pireno en estudios *in vitro* (Fan *et al.*, 2003). *P. fluorescens* es degradadora de naftalenos y fenantrenos, ventaja que tiene sobre otras *Pseudomonas* que sólo metabolizan naftalenos y asfaltenos. *Flavobacterium* sp, es una bacterias gran negativa, aerobia, no móvil, oxidasa positivo, esta bacteria utiliza el nitrato en la respiración anaeróbica, y en los procesos de biosaneamiento se encarga de la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo (Rockne *et al.*, 2000). Se han realizado estudios donde se ha determinado que entre los microorganismos aislados con mayor frecuencia en la fase de degradación de los hidrocarburos se encontraban especies de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Kastner *et al.*, 1998; Rockne *et al.*, 2000; Cantini *et al.*, 2001; Bracho *et al.*, 2004 y Díaz-Borrego *et al.*, 2006.

pH

En este estudio se observó un descenso en los valores de pH en casi todas las sub-parcelas durante el tiempo de estudio. La disminución inicial del pH puede estar atribuida a la baja capacidad amortiguadora del suelo y al metabolismo activo de los microorganismos (Margesin y Shinner, 1997). Este fenómeno no se observó en la sub-parcela 6 (no tratada), donde se observó el mayor valor de pH durante todo el estudio, lo cual puede estar asociado a que está sub-parcela no fue tratada, es decir, no hubo aireación del terreno durante el periodo de estudio, ocasionando una intensa actividad microbiana inicial, que a su vez puede provocar una disminución del oxígeno en el medio, lo cual puede conducir a condiciones de anaerobiosis,

favoreciendo estas reacciones de desnitrificación (reducción de nitrato a amonio/amoniaco e incluso a nitrógeno molecular (Dragun, 1988). Así mismo alto valor de pH también afectan directamente la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo (Volke y Velasco, 2002). Controlar el pH del suelo es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8 (Dragun, 1988; Von Fahnstock *et al.*, 1998; Leahy y Colwell, 1990). Los valores de pH encontrados en este estudio estuvieron dentro del rango óptimo para la biodegradación de hidrocarburos. Cuando el pH disminuye o aumenta se pueden controlar de diferentes formas tales como: la adición de azufre al suelo si los valores de pH son altos (> 9) y la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al suelo cuando los valores de pH son bajos (< 6) (Maroto, 2001).

Conductividad eléctrica

En todas las sub-parcelas estudiadas se determinaron altos valores de conductividad eléctrica. Los resultados indican que estos suelos presentaron un alto contenido de sales y al ser comparados con el intervalo permisible por el MARN (República de Venezuela, 1998), en su decreto 2635 en el artículo 50 que habla sobre la norma para el control y recuperación de materiales y el manejo de desechos, el cual establece un límite máximo de $< 3,5$ mS/cm de la conductividad eléctrica en suelos contaminados con hidrocarburos. En todas las sub-parcelas estudiadas los valores encontrados exceden el límite establecido por dicha norma. Estos resultados son propios del área estudiada, ya que es una zona de características áridas cercana al mar. Como observación personal, al momento del muestreo se podían visualizar cristales de sal adheridos al suelo. Sin embargo aun las fuertes precipitaciones registradas durante los meses de estudio no ayudaron a lixiviar el exceso de sales presentes en la zona. El aumento de la conductividad eléctrica desde el inicio hasta el final del tratamiento en todas las sub-parcelas estudiadas puede atribuirse a que los

lodos petrolizados adicionados a las sub-parcelas podían estar presentando altas concentraciones de sales. Acosta *et al.*, (1995) estudiaron el efecto de lodos petrolizados y lodos de tratamientos de aguas servidas sobre un suelo de la península de Paraguaná, mientras que Araujo *et al.*, (2006) trabajaron en el campo Moga, estado Zulia, con lodos estabilizados y cepas bacterianas, en el biosaneamiento de suelos contaminados por hidrocarburos. Los investigadores anteriormente mencionados en sus diferentes estudios, determinaron valores de conductividad eléctrica por debajo del máximo permitido por las autoridades venezolanas de 3,5 mS/cm y de los encontrados en este estudio, que abarcaron un rango entre 4,13 a 19,82 mS/cm. Si bien se plantea que la conductividad eléctrica no puede identificar un contaminante en particular, es una medición de gran utilidad para determinar la distribución y la concentración de contaminantes como sales, ácidos o bases en un suelo (Margesin y Shinner, 2001).

Nitrato y fosfato

Se observó un aumento en el contenido de nitrato desde el inicio del tratamiento hasta los primeros 15 días de exposición con lodos petrolizados en todas las sub-parcelas estudiadas, que luego disminuyó significativamente hasta el final del tratamiento. El contenido de fosfato mostró un comportamiento poco variable desde el inicio hasta el final del estudio en todas las sub-parcelas estudiadas. Es importante resaltar que a las parcelas donde estaban distribuidas las sub-parcelas no se les agregó ningún tipo de fertilizante (nutrientes) dos meses antes y durante el desarrollo del estudio, ya que estaban en proceso de cambio de fertilizante. El aumento del nitrato durante los primeros 15 días de estudio, pudo atribuirse a la transformación de compuestos orgánicos en sus compuestos inorgánicos (mineralización) que luego disminuyó paulatinamente al consumo natural por parte de las bacterias. Las bajas concentraciones de fosfato observadas en el estudio pudieran ser debido al metabolismo activo de los microorganismos durante el proceso de bioremediación y a

que este elemento es fuertemente absorbido por el complejo del suelo y en parte de ello resulta ser inactivo para ser metabolizado por los microorganismos. Son diversos los estudios que han demostrado que una concentración inadecuada de estos nutrientes trae como consecuencia una lenta biodegradación (Lee y Levy, 1989). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo expuesto por los investigadores anteriormente mencionados, ya que no se usó fertilizante durante el periodo de estudio. Aunque el petróleo es rico en carbono orgánico, es deficiente en los nutrientes minerales necesarios para el crecimiento microbiano (Atlas, 1981). El nitrato le proporciona a los microorganismos el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos y enzimas, mientras que el fosfato interviene en la formación de compuestos energéticos (ATP) dentro de la célula (Atlas, 1981). Vallejo *et al.* (2005) realizaron estudios sobre evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos totales en suelos contaminados por petróleo y determinaron valores iniciales de nitrato entre $14,0 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{kg} \pm 3,6$ y $23,0 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{kg} \pm 7,7$ y de fosfato entre $55,22 \text{ mgP}/\text{kg} \pm 4,16$ y $74,03 \text{ mgP}/\text{kg} \pm 3,76$ de fosfatos. Comparando estos resultados con los obtenidos en esta investigación (nitrato = $1,26 \text{ mg}/\text{kg} \pm 0,54$ a $4,12 \text{ mg}/\text{kg} \pm 1,39$ y fosfato = $530 \text{ mg}/\text{kg} \pm 0,54$ a $1280 \text{ mg}/\text{kg} \pm 41,8$ 5) los valores de nitratos reportados por Vallejo *et al.* (2005) son apreciablemente superiores, mientras que los valores de fosfatos, son inferiores por lo que una posible causa en la lenta degradación de los hidrocarburos sea la deficiencia y la desproporción de estos nutrientes en el área estudiada. Otros investigadores como Margesin y Schinner (1997, 2001), Gutierrez *et al.* (2007), han realizado estudios sobre nutrientes presentes en suelos contaminados por petróleo y han concluido que la disminución o el aumento de los nutrientes se debe a la bioestimulación de suplementos nutritivos lo cual va a intensificar la biodegradación.

Humedad

En todas las sub parcelas se observó un comportamiento poco variable del

porcentaje de humedad durante el periodo de estudio. Observándose que en la sub-parcela 6 (no tratada) fue donde se visualizó mayor porcentaje de humedad desde el inicio hasta los 30 días de estudio. En la sub-parcela 4 se observó el menor porcentaje de humedad descendiendo éste desde el inicio hasta el final del estudio. Los bajos porcentajes de humedad en el área estudiada pueden ser atribuidos a que es una zona de características áridas cercanas al mar. A pesar que vario el porcentaje de humedad en estas sub-parcelas durante el periodo de estudio, presentaron valores muy bajos para que se lleve a cabo con eficiencia el proceso de bioremediación. La baja humedad registrada durante el periodo de estudio pudo haber sido ocasionada a la alta evaporación que se presentó durante el periodo de estudio, a pesar de la presencia de lluvia en los primeros días del tratamiento. Diferentes estudios realizados reportan que la tasa óptima para que se lleve a cabo el proceso de bioremediación se encuentra en el rango de 40 a 60%, valores menores inhiben la degradación (Von Fahnstock *et al.*, 1998 y Madigan *et al.*, 1998). Si comparamos estos resultados con los obtenidos en nuestro estudio, los valores del porcentaje de humedad se encuentra por debajo de lo establecido por Von Fahnstock *et al.* (1998) y Madigan (1998), lo cual es desfavorable para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos degradadores del suelo. Alexander (1994) describe que en suelos ricos en nutrientes y con bajo contenido de humedad las bacterias se multiplican rápidamente, tales condiciones no fueron las observadas en este estudio, ya que se hallaron bajos valores de nutrientes y humedad. Rivera *et al.* (2002) señalan que porcentaje de humedad muy bajos, es desfavorable para las bacterias aeróbicas. Estos autores trabajaron con poblaciones microbianas en perfiles de suelos contaminados, encontraron que en suelos con contenidos de humedad bajos, repercute en el desplazamiento del oxígeno por los espacios porosos conllevando esto a condiciones anoxicas en el suelo.

Hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA)

En las figuras 6, 7, 8, y 9, se muestran las concentración de los componentes del

petróleo (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos). Se observa una degradación significativa de las fracciones de hidrocarburos saturados desde el inicio hasta el final del tratamiento en las sub-parcelas 1, 2, 3, 5 (sin lodo) y 6 (no tratada). La sub-parcela 4 fue la que presentó la menor concentración de este hidrocarburo, a pesar de que hubo un ligero incremento desde el inicio hasta el día 30, que luego decayó hasta el final del estudio. La baja concentración de estos hidrocarburos, se atribuye a que estas fracciones conforman los sustratos más susceptibles de degradar por los microorganismos, confirmándose esta hipótesis por la notable densidad bacteriana observada en esta sub-parcela (Leahy y Colwell, 1990; Whyte *et al.* 1997). Es decir, la optimización de la biodegradación de hidrocarburos fue observada en la sub-parcela 4, por lo anteriormente mencionado. En las sub-parcelas 1 y 3, los hidrocarburos aromáticos mostraron un descenso desde el inicio hasta los primeros 15 días de tratamiento, que luego presentaron un aumento a partir de éste hasta el final del tratamiento. Las sub-parcelas 5 (sin lodo) y 6 (no tratada), mantuvieron un comportamiento poco variable durante todo el estudio, no hubo una degradación significativa de estas fracciones de hidrocarburos. La baja tasa de degradación de los hidrocarburos aromáticos se atribuye a que los procesos de degradación de este tipo de compuesto son muy complejos y se requiere mayor tiempo de tratamiento. Se observó en los gráficos que en comparación con las fracciones de saturados y aromáticos, las de resinas y asfaltenos fueron las que se encontraron en mayores concentraciones, es decir, fueron más difíciles de ser biodegradadas por los microorganismos, debido a que éstas presentan estructuras químicas muy complejas (Atlas y Bartha, 1972; Pineda y Mesta, 2001). Estudios realizados en suelos contaminados con hidrocarburos han demostrado que a medida que un crudo envejece cambia de estructura, de manera que hidrocarburos saturados y aromáticos se disuelven y se evaporan rápidamente y son metabolizados por los microorganismos, mientras que los compuestos más pesados como las resinas y los asfaltenos, que son a su vez menos volátiles y biodegradables, tienden a permanecer, por lo tanto no es posible que un crudo sea completamente biodegradado por los microorganismos

(Leahy y Cowell, 1990, Whyte *et al.*, 1997). Lo expuesto anteriormente coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, donde se puede observar poca biodegradación de SARA. A pesar de que las condiciones físico- químicas no fueron las más estables, la sub-parcela 4 fue la que presentó las condiciones más adecuadas para que los microorganismos llevaran a cabo con eficiencia el proceso de bioremediación, ya que en esta sub-parcela fue donde se visualizó la más baja concentración de los hidrocarburos SARA.

El MARM establece en el decreto 2635 en el artículo 50 la norma para el control y recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desecho. El porcentaje de las fracciones de hidrocarburos SARA, en suelos contaminados por petróleos tiene que ser menor al 10% (República de Venezuela, 1998). Si observamos los valores obtenidos en nuestro estudio estos resultados sobrepasan los límites establecidos por dicha norma. Atlas y Bartha, 1972; Pineda y Mesta, 2001, Araujo *et al.*, 2006 y Gutiérrez *et al.*, 2007. trabajaron con suelos contaminados con petróleo y determinaron que hubo una alta tasa de biodegradación de los hidrocarburos (SARA). Comparando los resultados de estos investigadores con los obtenidos en este estudio se evidencia que hubo una baja degradación de los hidrocarburos por la falta de bioestimulación y por ende el bajo crecimiento microbiano. Los niveles registrados de los parámetros físico-químicos en las áreas estudiadas en esta investigación sugerirían que las condiciones ambientales fueron desfavorables para obtener una alta biodegradación de estas fracciones de hidrocarburos.

Aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

Los aceites minerales y HTP en este estudio mostraron un comportamiento poco variable, visualizándose que en las sub-parcelas 2, 3, 5 (sin lodo) y 6 (no tratada), aumentaron los niveles de HTP durante los primeros 15 días del tratamiento, lo cual nos indica que cuando las concentraciones de estos contaminantes aumenta va

disminuir la actividad microbiana y por ende la tasa de degradación. Estas altas concentraciones de HTP en este corto periodo de tiempo pueden atribuirse a la presencia de compuestos de alto peso molecular difíciles de ser biodegradados por los microorganismos y a la poca densidad bacteriana degradadora presente en estas sub-parcelas, después del día 15 disminuyó la concentración de los HTP, pero de una manera muy lenta, posiblemente debido a la disminución del pH en estas sub-parcelas y al bajo contenido de nutrientes, el cual no fue suficiente para que se lleve a cabo efectivamente la degradación de los HTP por parte de los microorganismos. En la sub-parcela 1 se observó una baja degradación de los HTP desde el inicio hasta los 15 primeros días del tratamiento, que luego paso a un periodo estacionario hasta el final del tratamiento donde la disminución de la concentración de HTP es casi inapreciable, este periodo estacionario se conoce como periodo de saturación, en donde estos contaminantes se vuelven menos disponibles para la biodegradación por su carácter recalcitrante y su limitada biodisponibilidad. La sub-parcela 4, fue donde se observó la mayor degradación de estos hidrocarburos desde el inicio hasta el final del estudio, en comparación con las demás sub-parcelas estudiadas, lo cual puede ser atribuido a la presencia de una diversidad bacteriana diferente al resto de las sub-parcelas.

Según lo establecido por el MARN, la concentración de HTP en esta área de biotratamiento debe ser menor al 1% y los valores de HTP obtenidos en todas las sub-parcelas exceden a los intervalos establecidos en dicha norma. Algunos autores indican que cuando la concentración de contaminantes es alta puede ocurrir la inhibición del crecimiento microbiano (disminuyendo su capacidad de metabolización) o la intoxicación de los microorganismos (LaGrega *et al.* 1996). Ercoli *et al.* (1998) realizaron ensayos de campo en procesos biológicos con concentraciones de HTP hasta 30%, y encontraron poco crecimiento bacteriano y baja biodegradación. En los últimos años se han realizado diversos estudios de restauración de suelos contaminados con HTP (hasta 20,000 ppm) por procesos de

composteo, obteniendo niveles de degradación de 60 a 98% entre 98 y 120 días (Schulz y Poetzsch, 1995; Beaudin *et al.* 1996; Lainer y Jorgensen, 1997). En un estudio realizado con concentraciones mayores de hidrocarburos (20,000-55,000 ppm) con un suelo arcilloso, se demostró una biodegradación de 60 a 70%, entre 2 y 3 años. Otros grupos de trabajo, han estudiado el uso de otros sistemas sólidos para la degradación de HTPs. Colombo *et al.* (1996) estudiaron la degradación de HTP en el suelo, por microorganismos nativos y por hongos filamentosos, y encontraron niveles de degradación significativos (26-35 %) en 90 días de cultivo. Chaineau *et al.* (1995) encontraron un 75% de degradación de HTP en un suelo contaminado (2,000 ppm) inóculado con la flora nativa del mismo suelo. Por las razones aquí presentadas, es importante resaltar que el biosaneamiento en fase sólida es una de las tecnologías de recuperación para suelos contaminados con excelentes perspectivas de aplicación. Quizás la alta concentración de HTP encontrada en esta investigación está relacionada con el bajo consumo de las pocas bacterias desarrolladas en el área de estudio y a los factores físico-químicos del área estudiada, los cuales están afectando el crecimiento y desarrollo de los microorganismos degradadores.

Densidad bacteriana

Durante esta investigación se estudió la densidad bacteriana tanto de bacterias degradadoras de hidrocarburos como heterótrofas. Es importante mencionar que este recuento sólo se determinó al inicio del tratamiento con lodos petrolizados. Se observó que la densidad bacteriana en este estudio no fue abundante. En las sub-parcelas 1, 2 y 3, no se halló una abundancia significativa tanto en el número de bacterias degradadoras como heterótrofas, lo cual se atribuye a la deficiencia de nutriente y a los altos valores de conductividad eléctrica presente en el área estudiada. La sub- parcela 4, fue donde se observó la mayor abundancia bacteriana tanto de heterótrofas como degradadoras, pudo ser ocasionado por la presencia de la diversidad bacteriana. A pesar de que las condiciones físico-químicas no fueron las

más adecuadas en todas las sub-parcelas, la sub-parcela 4 fue la que presentó las condiciones más estables para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos heterótrofos y degradadores. En las sub-parcelas 5 (sin lodo) y 6 (no tratada), fue donde se visualizó la menor densidad bacteriana, lo cual pudo estar relacionado, para la sub-parcela 5 (sin lodo), con la falta de hidrocarburos para ser biodegradados, y en la 6 (no tratada) con la condición restringida del suelo ya que a esta sub-parcela no se le hizo aireación del terreno. Song y Bartha, (1990) observaron que durante el desarrollo de la degradación de hidrocarburos aromáticos y alicíclicos, los niveles de bacterias degradadoras aumentaban mientras que los recuentos de heterótrofos cultivables disminuían en todos los sistemas contaminados. Los resultados de esta investigación fueron diferentes, ya que se encontró un mayor recuento de bacterias heterótrofas que de degradadoras. Por otra parte, MacNaughton *et al.* (1999) reportaron cambios en la estructura de la población bacteriana durante el biosaneamiento de un derrame experimental de petróleo en un suelo costero, al observar diferencias entre poblaciones bacterianas de suelos contaminados y no contaminados. Ellos plantearon que la estructura y diversidad de las comunidades dominantes de bacterias cambia substancialmente tras un evento de contaminación con hidrocarburos. En esta investigación sólo se pudo identificar cuatro tipos de bacterias, según lo expuesto por MacNaughton *et al.*, (1999), quizás la falta de biosaneamiento no permitió encontrar diversidad de bacterias, a pesar de que se le agregaba constantemente hidrocarburos. En tal sentido los bajos recuentos de microorganismos en diferentes estudios de biodegradación están relacionados con las altas concentraciones de HTP o cuando algún factor limita el crecimiento (Margesin y Schinner, 1997; Margesin y Schinner, 2001; Margesin *et al.*, 2003).

La empresa petrolera Petrozuata se rige por el decreto 2635 del MARN, en su artículo 53 que habla sobre las normas para el control y recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos, el cual establece que para que un área de biotratamiento de suelo esté en óptimas condiciones para llevar a cabo con eficiencia

el proceso de bioremediación, sus parámetros físico-químicos deben estar entre los rangos establecidos por este, los cuales son: pH (6-8), conductividad eléctrica ($<3,5$ mS/cm), el porcentaje de humedad (40-60 %) y la adición de nutrientes (fertilizantes) debe ser constantes. También establece que para determinar que los hidrocarburos están siendo biodegradados por los microorganismos autóctonos del suelo estos hidrocarburos se tienen que encontrar en concentraciones bajas; el porcentaje de aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) deben ser $<1\%$ y las fracciones de SARA en el área $<10\%$. En el estudio realizado estos parámetros no se encontraron dentro de los límites establecidos por el MARN, ya que la conductividad eléctrica presentó valores muy altos, no hubo adición de nutrientes, el porcentaje de humedad era muy bajo para que los microorganismos llevaran a cabo con eficiencia el proceso de bioremediación, además las concentraciones de los hidrocarburos en el área eran muy altas, indicándonos esto la baja tasa de degradación de los hidrocarburos presentes en el área estudiada.

CONCLUSIONES

Las cepas identificadas en el área estudiada fueron: *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Flavobacterium sp*, las cuales son ampliamente reconocidas por crecer en suelos contaminados con hidrocarburos.

El porcentaje de humedad y el contenido de nutrientes (nitrato y fosfato) presentaron valores bajos durante el desarrollo del estudio, mientras que, la conductividad eléctrica se hallaron valores altos, los cuales afectaran en gran escala el crecimiento y desarrollo de la flora microbiana degradadora en el suelo.

El bajo recuento de bacterias heterótrofas y degradadoras y la variación de los parámetros físico-químicos, indican una baja actividad biodegradación de los compuestos SARA y TPH en el área estudiada.

A pesar de que las condiciones físico-químicas no fueron las más estables, la sub-parcela 4 fue la que presentó las mejores condiciones para que se llevara a cabo el proceso de bioremediación, ya que fue donde se visualizó una mayor degradación de los hidrocarburos SARA y HTP.

El área de biotratamiento de suelos de la empresa petrolera Petrozuata C.A, durante el desarrollo del estudio no presentaba las condiciones más adecuadas para llevar a cabo un el proceso de bioremediación.

RECOMENDACIONES

Se recomienda elegir medidas biocorrectivas más óptima, así como es necesario llevar a cabo un control y seguimiento del mismo por un periodo más prolongado.

Se recomienda la adición constante de nutrientes orgánicos (fertilizantes) a las parcelas analizadas que constituyen el área de biotratamiento de suelo, permitirá un aumento significativo en el desarrollo de la actividad microbiana y por ende una mayor degradación de los hidrocarburos

La eficiencia del proceso de bioremediación va a requerir de condiciones físico-químicas óptimas y de un tiempo de experimentación mayor de 45 días.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, I.; Infantes, C.; y Lópe, W. 1995. Efecto de lodos petrolizados y lodos de tratamientos de aguas servidas sobre un suelo calciorthids de la Península de Paraguana. *Agronomía Tropical*, 45 (4): 527-537.

Alexander, M. 1994. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, San Diego, California, U.S.A.

Amann, R.; Ludwig, I. y Schleifer, K. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143-169.

American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.

Araujo, I.; Montilla, M.; Cárdenas, C.; Herrera, L.; Angulo, N. y Morillo, G. 2006. Stabilized sludges and bacterial strain for bioremediation of oil contaminated soils. *Interciencia*, 31(4): 268-275.

Atlas, R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiology Reviews*, 45(1): 180-209.

Atlas, R. y Bartha, R. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: Limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnology Bioenergetics*, 14: 309-317.

Atlas, R. y Bartha, R. 1981. *Microbial Ecology. Fundamentos y aplicaciones*. Adison-Wesley Publishing Company. U.S.A.

Bartha, R. 1986. Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. *Microbiology and Ecology*, 12: 155-172

Berry, D. 1999. Anaerobic Bioremediation: Microbiology, Principles and Applications. En: Adriano, D.; Bollag, J.; Frankenberger, W. y Sims, R. (Eds). *Bioremediation of Contaminated Soils*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Pags. 339-396.

Beudin, R.; Caron, R.; Legron, R.; Ramsay, J.; Lawlor, L. y Ramsay, B. 1996. Composting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Science Utilization*, 4: 37-45.

Boyer, J.; Sterling, D. y Joner, R. 2000. Maximizing information from a water quality monitoring network through visualization technique. *Estuarine, Coastland Shelf Science*, 50: 39-48.

Bracho, M.; Diaz, L. y Soto, L. 2004. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo, estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(3): 175-185.

Cantini, L.; Diaz, L.; Davila, S. y Soto, L. 2001. Crecimiento a diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno. *Ciencia*, 9(2): 207-216.

Cañizares-Villanueva, R. 2000. Bioabsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 131-143.

Cheineau, C.; Morel, J. y Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosmos of fuel oil hydrocarbons from drilling cutting. *Environmental Science Technology*, 29: 1615-1621.

Colombo, J.; Cabello, M. y Arambarri, A. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and ligninolytic fungi. *Environmental Pollution*, 94: 355-362.

Díaz-Borrego, L.; Dupontt, J. y Atencio, L. 2006. Perfil plasmático de bacterias aisladas de sedimento contaminado con petróleo, estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 40(2). 133-148.

Dragun, J. 1988. "Microbial degradation of petroleum products in soil". Von Fahnestock, F. y Wickramanayake, B. 1988. *Biopile design, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils*. Battelle Press. Editions.

Dyksterhouse, S.; Gray, J.; Herwig, R.; Lara, J. 1995. *Cyclocasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 116-123.

Eilers, H.; Pernthaler, J.; Glockner, F. y Amann, R. 2000. Culturability and abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3044-3051.

Ercoli, E.; Galvez, J.; Aranzadi, E. y Di Paola, M. 1998. *Total petroleum hydrocarbon monitoring in biodegradation of weathered crude oily residues*. The Fourteenth International Conference on Solid Waste Technology and Management,

Philadelphia, P.A. U.S.A.

Engelhardt, M.; Daly, K.; Swannell, R. y Head, M. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, gram-positive bacterium isolated from intertidal beach sediment and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 90: 237-247.

Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D. y Schroeder, E. 1998. *Bioremediation Principles*. WCB/McGraw-Hill, Malasia.

Fan, C.; Qing, X. y Kwang, J. 2003. Aerobic desnitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H *Fluorescent*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6715-6722

Gauthier, M.; Lafag, B.; Christen, R.; Fernández, L.; Acquaviva, M.; Bonin, P. y Bertrand, J. 1992. *Marinobacterium hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 568-576.

Gilewicz, M.; Ni'matuzahroh, T.; Nadaling, T.; Budzinski, H.; Doumenq, P.; Michotey, V. y Bertr, J. 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 528-533.

Golyshin, P.; Chernikova, T.; Abraham, W.; Lunsdorf, H.; Timmis, K. y Yakimov, M. 2002. *Oleiphilaceas* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 52: 901-911.

Gutiérrez, E.; Caldera, Y.; Fernández, N.; Blanco, E.; Paz, N. y Mármol, Z. 2007. Biodegradabilidad anaerobia termofílica de aguas de producción de petróleo en reactores por carga. *Revista Técnica Ingeniería*. Universidad del Zulia, 30 (2): 111-117.

Infante, C. 2001. Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de Intebios® y Biorize®. *Interciencia*, 26(10): 504-507.

Kanaly, R.; Bartha, R.; Watanabe, K. y Harayama, S. 2000. Rapid mineralization of benzo (a) pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4205-4211.

Kastner, M., Breuer, M. y Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental*

Microbiology, 64(1): 359-362

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, U.; Sommers, H. y Winn, W. 1992. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Mediterráneo Panamá. Buenos Aires. Argentina.

Korda, A.; Santas, P.; Tenete, A. y Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 677-684.

LaGrega, M.; Buckingham, P y Evans, J. 1996. *Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. Editorial Mc Graw Hill/ Interamericana, Madrid, España.

Lainer, M. y Jorgensen, K. 1997. Effective and safe composting of chlorophenol-contaminated soil in pilot scale. *Environmental Science Technology*, 31: 371-378.

Leahy, J. y Colwell, R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the *Environmental Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54(3): 305-315.

Lee, K. y Levy, E. 1989. *Enhancement of the natural biodegradation of condensate and crude oils on beaches of Atlantic Canada*. Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute Pub. No. 4452. Washington DC, USA

Luque, J.; Ciano, N.; Nakamatsu, V.; Amari, M. y Lisoni, C. 2005. *Saneamiento de derrames de hidrocarburos por la técnica de biodegradación "in situ" en Patagonia, Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina

MacNaughton, S.; Stephen, J.; Venosa, A.; Davis, G.; Chang, Y. y White, D. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3566-3574.

Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1998. *Brock: Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Prentice Hall. New Jersey. U.S.A.

Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc. New Jersey. U.S.A.

Maugeri, T.; Gugliandolo, C.; Caccamo, D. y Stackebrandt, E. 2002. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents.

Applied and Systematic Microbiology, 25: 450-455.

Margesin, R y Shinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2660 - 2664.

Margesin, R. y Shinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3127 - 3133.

Margesin, R., Labbé, D., Schinner R., Greer W. y White L. 2003. Characterization of hydrocarbon degradative microbial population in contaminated and pristine alpine soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 6: 3985 – 3992.

Maroto, A. 2001. “Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos”. “Geocisa. División de protección ambiental de suelos”. <http://www.igme.es/internet/web_aguas/igme/publica/con_recu_acuiferos> (12/06/2007).

Olsen, G.; Lane, D.; Giovannoni, S. y Pace, N. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337-365.

Pace, N.; Stahl, D.; Lane, D. y Olsen, G. 1986. The analysis of natural microbial population by ribosomal RNA sequences. *Advances in Applied and Microbiology Research*, 152: 359-365.

Pineda-Flores, G.; Mesta-Howard, A. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(3): 143-150.

República de Venezuela, 1998. Decreto N° 2635 de 1998, *Sobre normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos peligrosos*. Gaceta Oficial N° 5245. 31 pp.

Ríos-Hernández, L.; Gieg, L. y Suflita, J. 2003. Biodegradation alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from a gas condensate-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1): 434-443.

Rivera-Cruz, M.; Ferrera-Cerrato, R.; Volke, V.; Rodríguez, V. y Fernández, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra*, 20: 423-434.

Rockne, K.; Chee-Sanford, R., Brian, P.; James, T. y Staleyand, S. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4) 1595-1601.

Ryan, J.; Loehr, R. y Rucker, E. 1991. Bioremediation of organic contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 28: 159-169.

Schulz-Berendt, V. y Poetzsch, E. 1995. Large-scale experience with biological treatment of soils. En: *Applied Bioremediation of hydrocarbon*. Hinchee, R.E; Kittel, J. y Reisinger, H. (Eds). *Battelle Press*. U.S.A.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1981. *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España.

Song, H. y Bartha, R. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (3): 646-651.

Soriano, A.; Marins, M. y Pereira, J. 1998. Biodegradacao de borra oleosa por microorganismos nativos em reator do tipo CSTR. *En: Reunión Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio-Ambiente*, 1998, Florianópolis (SC). Anais da Ila Reunión Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio-Ambiente Florianópolis, SC, Brasil

Torsvik, V.; Daae, F.; Sanada, R. y Ovreas, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64: 53-62.

Vallejo, V.; Salgado, L. y Roldan, F. 2005. Bioestimulation process during the biodegradation of TPH in oil contaminated soil. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2): 67-78.

Van Hamme, J. y Ward, O. 2003. Influence of chemical surfactant on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2): 130-137.

Von Fahnestock, F.; Wickramanayake, B. Michael, W. y Dratzke, J. 1998. *Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils*. Battelle Press Editions.

Volke, T. y Velasco, J. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México.

Ward, J.; Ahad, J.; Lacrempe-Couloume, G.; Slater, G.; Edwards, E. y Lollar, B. 2000. Hydrogen isolate fractionation during methanogenic degradation of toluene:

potential for direct verification of bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 34: 4577-4581.

Whyte, L.; Hawari, G.; Zhou, L.; Bourbonniere, W.; Inniss, E. y Greer, C. 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperature by a psychotrophic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2578-2584.

Whyte, L.; Bourbonniere, L. y Greer, C. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychotropic *Pseudomonas* strain possessing both alkane (alk) and naphtalene (nah) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3719-3723.

Yakimov, M.; Golyshin, P.; Lang, S.; Moore, E.; Abraham, W.; Lunsdorf, H. y Timmis, K. 1998. *Alcalivorax borkumensis* gen. nov., sp. Nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 339-348.

Zhang, L.; Berg, L.; Schmidt, T. y Haderlein, S. 2002. Compound-specific carbon isotope analysis of volatiles organic in the low-microgram per liter range. *Analytical Chemistry*, 75: 5575-5583.

ZoBell, C. 1946. Actions of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriology Reviews*, 10: 1-49.

ANEXOS

Análisis de varianzas (Anovas) de los parámetros físico-químicos de las sub-parcelas tratadas

pH

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	10,87
Sub-parcela 2	4	10,87
Sub-parcela 3	4	10,12
Sub-parcela 4	4	10,87
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	12,25
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	20,00
Kruskall Wallis=5,607		p= 0,346

Conductividad eléctrica

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	10,00
Sub-parcela 2	4	17,00
Sub-parcela 3	4	15,25
Sub-parcela 4	4	10,00
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	17,25
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	5,00
Kruskall Wallis=8,950		p= 0,111

Nitrato

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	15,75
Sub-parcela 2	4	13,37
Sub-parcela 3	4	12,00
Sub-parcela 4	4	13,25
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	14,12
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	6,50

Kruskall Wallis=4,073

p= 0,538

Fosfato

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	9,50
Sub-parcela 2	4	18,25
Sub-parcela 3	4	3,25
Sub-parcela 4	4	6,75
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	20,50
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	16,50

Kruskall Wallis=19,580 p= 0,001

Humedad

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	13,00
Sub-parcela 2	4	9,12
Sub-parcela 3	4	8,00
Sub-parcela 4	4	8,00
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	15,00
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	21,87

Kruskall Wallis=12,010 p= 0,034

Hidrocarburos saturados

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	9,00
Sub-parcela 2	4	10,37
Sub-parcela 3	4	12,62
Sub-parcela 4	4	11,25
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	13,62
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	18,12

Kruskall Wallis=4,132 p= 0,530

Hidrocarburos aromáticos

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	8,25
Sub-parcela 2	4	15,12
Sub-parcela 3	4	9,12
Sub-parcela 4	4	15,37
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	6,50
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	20,62
Kruskall Wallis=11,822		p= 0,037

Resinas

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	19,62
Sub-parcela 2	4	18,87
Sub-parcela 3	4	14,00
Sub-parcela 4	4	4,62
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	12,25
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	5,62
Kruskall Wallis=16,310		p= 0,006

Asfaltenos

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	8,50
Sub-parcela 2	4	10,75
Sub-parcela 3	4	14,12
Sub-parcela 4	4	19,75
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	16,00
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	5,87
Kruskall Wallis=10,473		p= 0,062

Aceites minerales e hidrocarburos totales (HTP)

Sub-parcelas	n	Mediana
Sub-parcela 1	4	6,75
Sub-parcela 2	4	6,75
Sub-parcela 3	4	18,25
Sub-parcela 4	4	20,25
Sub-parcela 5 (sin lodo)	4	13,25
Sub-parcela 6 (no tratada)	4	9,75
Kruskall Wallis=13,395		p= 0,019

Crecimiento bacteriano

bacterias	n	Mediana
Heterótrofas	6	8,5
Degradadoras	6	4,5
Kruskall Wallis=3,692		p= 0,054

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Optimización de la degradación de hidrocarburos en el área de biotratamiento de suelo de la empresa petrolera "Petrozuata C.A"
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bermúdez Rincones Roselys Maria	CVLAC	13942616
	e-mail	Rosybermudez79@ hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Bioremediación, Petrozuata, degradación microbiana.</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

La explotación del petróleo y el uso de sus derivados, así como el acelerado desarrollo industrial en el mundo, involucra procesos de explotación a las que están asociadas la liberación de gran cantidad de compuestos contaminantes al ambiente, alguno de los cuales pueden ser carcinogénicos. La biodegradación es una técnica que permite descomponer estos compuestos contaminantes haciéndolos menos tóxicos al ambiente. La contaminación del suelo causada por derrames petroleros es un problema que se ha vuelto muy común en nuestros días. El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de biodegradación de hidrocarburo en el área de biotratamiento de suelo de la empresa petrolera “Petrozuata C.A”. Para ello se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 15 cm en cada una de las cuatro parcelas que conforman el área de biotratamiento de suelo, a las cuales se les aislaron e identificaron las bacterias degradadoras de hidrocarburos. Para el ensayo de campo de las cuatro parcelas que conforman el área de biotratamiento de suelo, se prepararon seis sub-parcelas, de las cuales se tomaron muestras a una profundidad de 15cm cada 15 días durante dos meses. A estas sub-parcelas se les determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: pH, conductividad eléctrica, humedad, contenido de nutrientes (nitrato y fosfato), % de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (SARA), % aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP) y se determinó recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y heterótrofas, utilizando el método del Número Más Probable (NMP). Las bacterias degradadoras de hidrocarburos identificadas fueron *Pseudomonas* sp, *P. aeuriginosa*, *P. fluorescens* y *Flavobacterium* sp. Se encontraron variaciones en los parámetros físico-químicos que superaron lo establecidas en el Decreto 2635 que habla sobre las normas para el control y recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos en su artículo nº 53. El pH se encontró dentro de los límites establecidos por el decreto durante todo el periodo de estudio a excepción de la sub-parcela 6 (no tratada), los valores de conductividad eléctrica se encontraron por encima de los intervalos establecido por este decreto, en todas las sub-parcelas durante el desarrollo

del estudio, mientras que, el porcentaje humedad presentó valores muy bajo durante el periodo de estudio, el contenido de nutrientes (nitrato y fosfato) fue deficiente ya que no se le agregó ningún tipo de fertilizante dos meses antes y durante el desarrollo de la investigación. Estas variaciones en los parámetros físico-químicos ocasionaron la lenta biodegradación de las fracciones de los hidrocarburos SARA durante el tiempo de estudio, así como, los aceites minerales e hidrocarburos totales de petróleo (HTP), en este estudio, también se pudo visualizar un bajo de recuento de bacterias degradadoras y heterótrofas. Se pudo observar que la sub-parcela 4, fue la que presentó las condiciones más adecuada, es decir, donde se observó la más alta tasa de biodegradación de los hidrocarburos SARA y HTP y el mayor crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y heterótrofas. La eficiencia del proceso de bioremediación requiere de condiciones físico-químicas óptimas y de un tiempo de experimentación mayor de 45 días para que se pueda llevar a cabo satisfactoriamente.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail								
Pedro López	ROL	CA	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	S	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	U	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	U	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>
	CVLAC								
	e-mail	Pedrojlopezg81@hotmail.com							
	e-mail	Pedro.lopez@ne.udo.edu.ve							
Francisco Reyes	ROL	CA	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	S	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	U	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	U	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>
	CVLAC								
	e-mail	Francisco.Reyes@petrozuata.com							
	e-mail								

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	07	15
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS.RB. doc	Application/word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIATURA EN
BIOLOGÍA

Área de Estudio: **BIOLOGÍA**

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

