

Recalcitrant compound biodegradation coming from crude extra-heavy applying technical ones of bioremediation

Celeste Fernández^{1*}, Henry Labrador^{2*}, Kelly Mendoza¹, Luiceliz Aponte¹,
Luis Medina³, Noja Izzeddin³

¹Centro de Investigaciones Ambientales (CIAUC), ²Laboratorio de Investigación, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología,

³Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC).

Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

celefe@gmail.com, cfernand@uc.edu.ve, hylabrad@uc.edu.ve

Abstract

The investigation had like main intention the evaluation of the bioremediation process asphaltene extracted from an Ayacucho heavy crude of a gravel drilling, which is located in the Orinoco Oil Belt (FPO) in the field of Carabobo, which was applied two types to him of treatments to diminish the amount of asphaltenes presents: one from a culture of depredators microorganisms of isolated extra-heavy petroleum stocks able to asphaltenes degrade (treatment A), and another one using exemplary of *Eisenia foétida* (treatment B), monitored during 49 days by means of bacterial growth, gravimetry, magnetic resonance of carbon thirteen and analysis of variance, establishing the comparisons of averages by means of the test of Tukey and Dunnett. The microbial growth at the end of the monitoring reached a maximum of 1.90×10^6 UFC/g after the treatment to with a removal of a 56% and 2.90×10^5 UFC/g for treatment B with a 92% being significant difference between the treatments and the pattern

Keywords: bioremediation, horse dung, *Eisenia foétida*, asphaltenes.

Biodegradación de compuestos recalcitrantes procedentes de un crudo extrapesado aplicando técnicas de biorremediación

Resumen

La investigación tuvo como propósito principal la evaluación del proceso de biorremediación de asfalteno extraído de un crudo extrapesado Ayacucho de un ripio de perforación, el cual se encuentra ubicado en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO) en el sector Carabobo, al cual se le aplicaron dos tipos de tratamiento para disminuir la cantidad de asfaltenos presentes: uno a partir de un cultivo de microorganismos degradadores de cepas aisladas de petróleo extrapesado capaces de degradar asfalteno (tratamiento A), y otro utilizando ejemplares de *Eisenia foétida* (tratamiento B), monitoreado durante 49 días por medio de crecimiento bacteriano, gravimetría, resonancia magnética de carbono trece y análisis de varianza, estableciendo las comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey y Dunnett. El crecimiento microbioal al final del monitoreo alcanzó un máximo de $1,90 \times 10^6$ UFC/g para el tratamiento A con una remoción de un 56% y $2,90 \times 10^5$ UFC/g para el tratamiento B con un 92% encontrándose diferencia significativa entre los tratamientos y el control.

Palabras clave: biorremediación, estiércol equino, *Eisenia foétida*, asfaltenos.

Introducción

En la actualidad, la contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas de destrucción de los ecosistemas edáficos [1], ya que el uso masivo y el transporte tanto del petróleo como de sus derivados, hace que los derrames de hidrocarburos sean cada vez más frecuentes e incrementada por la presencia de compuestos difícilmente biodegradables, los cuales por su compleja estructura no se degradan fácilmente, haciendo que el suelo pierda su capacidad de depuración e incluso pueda funcionar como fuente de sustancias peligrosas, ya que la composición química de los hidrocarburos es muy variable, en la naturaleza normalmente se encuentran como mezclas de diferentes especies moleculares, que en mayor o menor grado afectan a la flora, a la fauna y a los microorganismos que viven en el suelo [2].

En la actualidad, la contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas de destrucción de los ecosistemas edáficos [1], ya que el uso masivo y el transporte transfronterizo tanto de petróleo crudo como de sus derivados, hace que los derrames de hidrocarburos sean cada vez más frecuentes.

Entre los contaminantes del suelo tenemos, los asfaltenos que son los principales componentes de crudos pesados y extrapesados [2], y debido a su característica de ser no refinables (tienen una alta resistencia a la desintegración) y a su tendencia a precipitar en los procesos de extracción, refinación, transporte y almacenamiento del crudo, son precursores de diversos problemas en su manejo; durante la perforación, las partículas coloidales de los asfaltenos tienden a obstruir la salida del crudo, lo que disminuye su flujo ya que se crean incrustaciones y hacen que el diámetro interior de las tuberías disminuya [3, 4]. Esto se debe al aspecto estructural de los asfaltenos que se componen de fracciones de compuestos agregados de núcleos aromáticos condensados que existen en el crudo, sustituidos por grupos alifáticos y nafténicos, los cuales poseen heteroátomos. Esta compleja estructura molecular que poseen los asfaltenos, ocasiona que sea sumamente resistente a la degradación microbiana, lo que provoca su acumulación en los eco-

sistemas en donde se derrama el petróleo de manera accidental o inducida [5, 6].

Considerando la situación anterior se plantea la posibilidad de evaluar el uso de consorcios bacterianos capaces de biodegradar la fracción recalcitrantes de asfalteno de un crudo extrapesado extraído del área de exploración activa Ayacucho con 10°API, ubicada en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), con el fin de disminuir la acumulación de estos en el sistema y sustituirlos por compuestos menos contaminantes y con bajo impacto ambiental.

Parte experimental

La investigación se llevó a cabo en tres fases: aislamiento de las cepas degradadoras de asfaltenos (ensayo de factibilidad), degradación de la fracción de asfalteno utilizando cepas aisladas del petróleo extrapesado y *Eisenia foétida* (ensayo de tratabilidad) y análisis estadísticos de los resultados.

Selección de bacterias degradadoras del crudo

En un reactor de vidrio con una capacidad de 500mL esterilizado. Se agregó 200 mL de medio mínimo mineral propuesto por Pineda, 2002 [7] a pH 7 y un 1mL de petróleo extrapesado Ayacucho con su respectivo testigo sin fuente de carbono con una aireación constante de 1L min⁻¹, a temperatura ambiente. Cada dos días se determinó la carga heterotrófica a soluciones seriada y se aislaron las colonias en la fase exponencial en caldo nutritivo y se sembraron por estriamiento en placas y cuñas de Agar Nutritivo y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Ensayo de factibilidad

Extracción de asfalteno del crudo extrapesado. El petróleo crudo extrapesado se extrajo de un ripio de perforación, el cual se encuentra ubicado en la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), en el sector Carabobo, el crudo fue pesado y disuelto en n-hexano, luego se filtro y al filtrado se le realizó una extracción Soxhlet, reflujiéndolos con n-hexano hasta tornarse totalmente incoloro el disolvente el filtrado se seco y luego se cargó a

un equipo de reflujo continuo con n-hexano con la finalidad de eliminar completamente las resinas. Una vez conocida la masa de los asfaltenos, se procedió a situarlos en un matraz tipo Schlenk de 50 mL sobre un baño de glicerina caliente y con conexión a "vacío" durante un periodo aproximado de cuatro horas con el fin de eliminar el solvente, los asfaltenos fueron guardados en frascos de vidrio color ámbar en atmósfera de nitrógeno. Su caracterización se efectuó por Norma 8020/8100 (1986) Agencia de Protección Ambiental (EPA) [8]

Obtención del consorcio bacteriano degradador de asfalteno. En un reactor de vidrio con una capacidad de 500 mL con 400 mL de medio mínimo mineral estéril, 2 g de asfalteno y 6 mL del pool de bacterias aisladas en la fase exponencial de la degradación del crudo, se mantuvo una aireación constante, a temperatura ambiente y pH neutro, y se determinó la carga bacteriana a diluciones seriadas a 37°C por 24 horas.

Aislamiento e identificación de las cepas más eficientes en la degradación de asfaltenos. Se aislaron las colonias del ensayo en caldo nutritivo y luego se transfirieron a placas de Agar Nutritivo a partir de las colonias viables y conforme a las características de éstas, se estableció un registro de control y se procedió a purificar las colonias por resiembras sucesivas.

Capacidad biodegradadora de las cepas bacterianas aisladas en asfaltenos a través de parámetros fisicoquímicos en medio acuoso. En este proceso se evaluaron tres reactores que contienen 200 mL de medio mínimo mineral: 1 g de asfalteno y 3 mL de consorcio estabilizado; 1 g de asfalteno y el testigo o blanco que contiene medio mínimo mineral.

Para la mineralización se determinó la concentración de CO₂ en cada sistema según la Norma ISO (1990) ISO9439 [9], que consiste en una trampa de CO₂ del aire atmosférico con 100 mL NaOH 1M, el reactor y el sistema de captación de CO₂ producido por mineralización con 100 mL de KOH 0,1 M. El CO₂ producido se cuantificó por titulación con HCl 0,1 M con alícuotas de 10 mL de solución de KOH 0,1 M más 40 mL de agua destilada, 2 mL BaCl₂ más el indicador fenolftaleína.

Ensayos de tratabilidad

Obtención de las muestras de suelo. El suelo a utilizar para llevar a cabo la fase experimental fue de una parcela perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, ubicada en El Limón, estado Aragua.

Caracterización del suelo y del estiércol.

Variables químicas: potencial de acidez (pH), calcio (Ca), fósforo (P), nitrógeno total (N) potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg), conductividad eléctrica (Ce), porcentaje de materia orgánica (%MO). *Variables físicas:* porcentaje de arcillas (%A), porcentaje de limo (%L) y porcentaje de arena (%Ar). Siguiendo la metodología usada por el laboratorio de Edafología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (Instituto de Edafología, 1993) [10].

Montaje de los microcosmos

Biorremediación del suelo contaminado utilizando consorcio bacteriano. Se instaló cuatro microcosmos de polietileno de 0,038 m² de área cada uno con aproximadamente 500 g de suelo contaminado con asfalteno: M₁ como patrón y tres réplicas denominadas A1, A2 y A3, en donde se adicionaron a las replicas el inóculo degradador de asfalteno y a todos los microcosmos se le adicionaron medio mínimo mineral. La cantidad de medio mineral requerida se calculó a partir de los resultados del ensayo de capacidad de retención del suelo, considerando que el porcentaje de humedad óptimo para el desarrollo del consorcio es del 60% de la capacidad de saturación.

Biorremediación del suelo contaminado utilizando macroorganismos de Eisenia foétida. Para llevar a cabo el tratamiento, se dispuso de cuatro microcosmos de polietileno de 0,038 m² de área cada uno con aproximadamente 500 g de suelo contaminado con asfalteno: M₂ como patrón y tres réplicas denominadas B1, B2 y B3, donde se adicionaron ocho lombrices y 176 g de estiércol sobre el suelo contaminado. La cantidad de lombrices a agregar dentro de los microcosmos se determinó considerando que en cualquier suelo, bajo condiciones naturales pueden encontrarse de 100 a 200 lombrices por metro cuadrado [11]. Esta cantidad de organismos se extrapola tomando en cuenta las dimensiones del microcos-

mo. Las bandejas se colocaron en el laboratorio a temperatura ambiente sin exposición directa de la luz solar y se airearon por 5 minutos mediante una espátula, el valor de humedad se ajusto cada dos días y el monitoreo para cada tratamiento se realizó a los 0, 4, 8, 12, 16, 19, 22 y 49 días.

Las técnicas de Gravimetría, Resonancia Magnética de Carbono (RMN ^{13}C) y Análisis Elemental, se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), la cual se basaron en la obtención de los espectros RMN- ^{13}C de las muestras, empleando un espectrómetro Bruker-AC-200. Los análisis elementales de hidrógeno, carbono, azufre y nitrógeno son analizados en un equipo Analizador Elemental C, H, N, S y O, marca Carlo Erba (actualmente Thermo), modelo EA 1108.

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza para verificar la diferencia significativa entre las variables a monitorear de los resultados obtenidos durante el proceso de biorremediación.

Resultados y eiscusión

Ensayo de factibilidad

En la mineralización de asfalteno del crudo ayacucho el consorcio bacteriano esta integrado por una cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa* no fermentadoras adaptado a utilizar asfalteno como única fuente de carbono y energía en donde su comportamiento se mantuvo en 10^6 UFC/mL. En la Figura 1 se observa el comportamiento de los microorganismos durante el

proceso, en donde existe un crecimiento acelerado y luego un régimen estacionario esto se debe a que los asfaltenos son sustancias pocos solubles en agua y su estructura molecular dificulta el ataque de estos microorganismo, por lo que la actividad varia poco y el escaso incremento puede deberse al aprovechamiento de la proteína dejada por los microorganismos muertos a causa de la poca disponibilidad de carbono o minerales. También se observa en la figura que los tratamientos sin inóculo bacteriano, presentaron los menores promedios de densidades poblacionales.

Ensayos de tratabilidad

En la caracterización del suelo virgen, los análisis reflejaron un suelo de tipo franco con predominancia de limo 46,0%, arena 45,6% y de arcilla 8,4% indicando una textura mediana, apropiada para la aplicación de los biotratamientos, tal como lo especifica la Norma para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos tóxicos y peligrosos de la República Bolivariana de Venezuela en el decreto 2 635 [12].

El suelo presentó un potencial de acidez de 5,66 afectando la actividad microbiana, la solubilización, la adsorción y la absorción de los contaminantes y los iones [13]. Por lo que fue necesario realizar el encalado del suelo virgen aplicando CaCO_3 para elevar el pH a la neutralidad.

Los resultados obtenidos para Conductividad eléctrica indicaron una baja concentración de sales solubles, lo cual permite clasificar el suelo como normal de tipo no salino, debido a

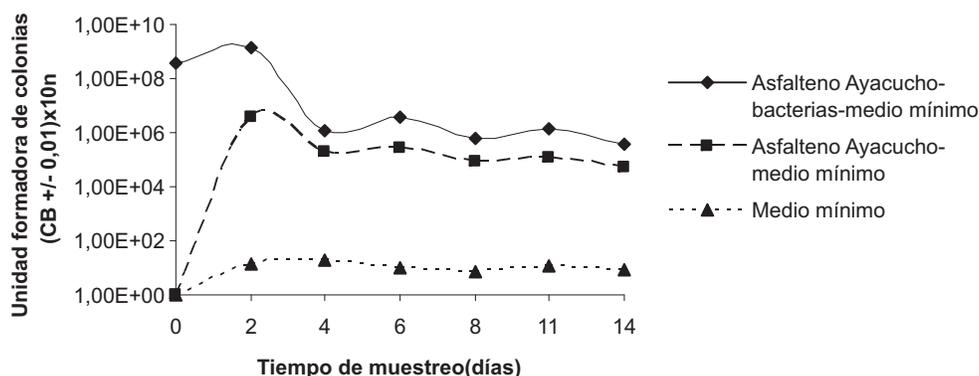


Figura 1. Comportamiento bacteriano en la mineralización de asfalteno a través del tiempo (crudo ayacucho).

que su conductividad eléctrica es inferior a 4 dS/m [14]. Las concentraciones de potasio y magnesio fueron elevadas 168 y 136 ppm condición que resulta beneficiosa, ya que las plantas requieren grandes cantidades de ambos minerales para su desarrollo [15]. En relación con el crecimiento bacteriano, el nitrógeno es esencial para sintetizar aminoácidos y enzimas, mientras que el fósforo ayuda a la formación de compuestos energéticos en la célula que son usados en los procesos de reproducción y degradación [16]. Es importante destacar que dentro de los cationes de cambio (K^+ , Ca^{++} , Na^+ y Mg^{++}), el sodio se detectó en baja proporción de un 33 ppm, lo cual corresponde con lo esperado, pues este catión sólo predomina en suelos de tipo salino-sódicos de acuerdo a los estudios realizados por Mata *et al.*, 1992 [17].

Montaje de los microcosmos con estiércol y bacterias

El fertilizante agregado consistió en una mezcla de estiércol equino y vacuno tratado, con un porcentaje de materia orgánica de 52,37% p/p, condición que resulta favorable para la aplicación del biotratamiento, considerando que el contenido de materia orgánica en el suelo virgen es bajo con un 0,95%.

Álvarez *et al.* (2003) [18] establecen que la proporción óptima de carbono, nitrógeno y fósforo es 120:10:1 en suelos contaminados con hidrocarburos, mientras que Ercoli (2004) [19] señala que las cantidades de nitrógeno y fósforo para estimular la biodegradación son menores que los requerimientos teóricos, debido a que no todo el carbono proveniente del contaminante es incorporado a la biomasa (una fracción es convertido en CO_2).

Por otra parte, Chalarca (2006) [20] establece que la relación C/N en el suelo casi siempre va de 8:1 hasta de 15:1 mientras que C.D.R.T, 2009 [21] sugiere que la relación óptima C/P está comprendida entre 120:1 y 175:1. Estos valores de C/P no concuerdan con los obtenidos en los microcosmos de tratamiento con Bacterias (A); y para el tratamiento con *Eisenia foétida* (B) la relación C/N, C/P no se ajusta (Tabla 1).

No obstante, hay que considerar que una proporción importante del material ingerido y asimilado por la *Eisenia foétida* (lombrices) se excreta como mucus intestinal y cutáneo, el cual aumenta la relación C/N con respecto al material original; asimismo, varios estudios con lombrices demuestran que la selección e ingestión de partículas finas y la mineralización del fósforo orgánico durante el tránsito a través del tracto digestivo tienen un efecto en el incremento de la disponibilidad de fósforo [22]. Por esta razón y con el incremento sustancial de las cantidades de nitrógeno y fósforo en el estiércol se presume que puede haber un cambio en las relaciones C/N y C/P durante el tratamiento.

En la caracterización del crudo Ayacucho se tiene que la fracción de asfaltenos es de un 16%, las resinas de un 29%, mientras que los compuestos aromáticos tienen un 48,5% y los saturados 6,4%.

Con respecto a la degradación de asfaltenos al comparar los diferentes métodos de tratamiento la curva de crecimiento del tratamiento con bacterias A sigue una tendencia similar al tratamiento con lombrices B, pero con una menor carga bacteriana (Figura 2).

No obstante, en los microcosmos con *Eisenia foétida* tratamiento B se logró mayor porcentajes de degradación durante casi todo el trata-

Tabla 1
Porcentaje de macronutrientes presentes en los microcosmos en el día cero

Tratamiento Microcosmo	Porcentaje de macronutrientes (%ME)			Relación carbono nitrógeno (C/N)	Relación carbono fósforo (C/P)
	Nitrógeno	Fósforo	Carbono		
Bacterias-asfalteno- Médio mínimo	0,145	0,007	1,76	12,14	251,43
<i>Eisenia foétida</i> Estiércol-Asfalteno	0,547	0,082	9,31	17,01	113,63

miento, alcanzando un valor máximo de 92% (Figura 3 y 4), en contraste con los obtenidos en los microcosmo con cepas aisladas del crudo tratamiento A con un 56%.

Álvarez *et al.* (2003) [18], sugieren que la habilidad de una comunidad microbiana para descomponer compuestos orgánicos complejos depende primeramente de la versatilidad meta-

bólica de sus miembros individuales, lo cual implica que es necesario disponer de un consorcio apropiado de especies mixtas.

Lo anteriormente expuesto hace pensar que la eficiencia en la degradación fue menor para las bacterias aisladas del crudo por tratarse de un cultivo puro (*Pseudomona aeruginosa*), en contraste con el tratamiento de *Eisenia foétida*,

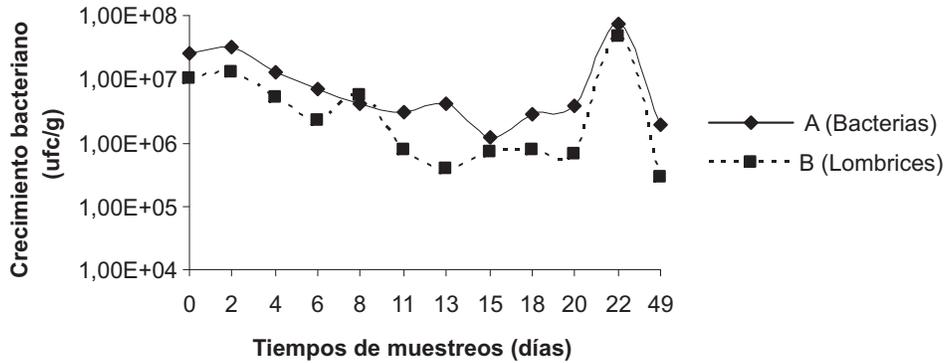


Figura 2. Relación entre el crecimiento bacteriano para el tratamiento A (Bacterias) y para el tratamiento B (*Eisenia foétida*).

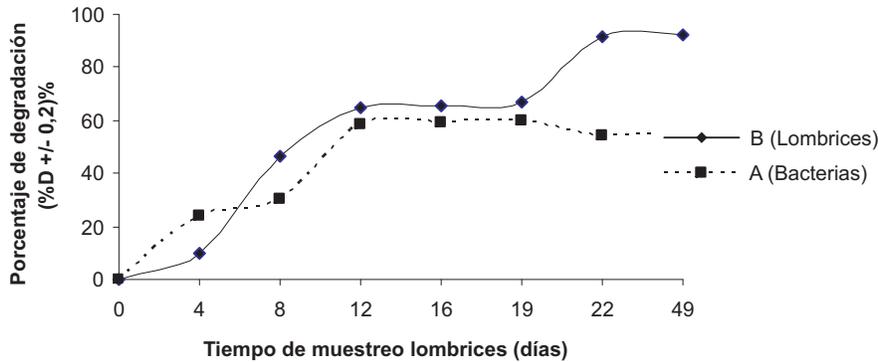


Figura 3. Relación entre la degradación del contaminante para el tratamiento A (Bacterias) y para el tratamiento B (*Eisenia foétida*).

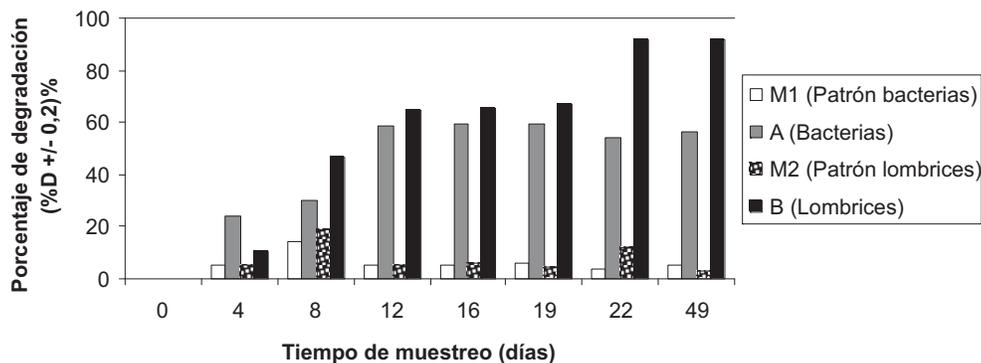


Figura 4. Porcentaje de degradación del contaminante en función del tiempo para cada tratamiento. A: Tratamiento con consorcio Bacteriano; B: Tratamiento con *Eisenia foétida*.

donde se presume que por las condiciones del medio (humus, humedad, aireación y estiércol), existe una comunidad diversa de microorganismos.

Los patrones M_1 (Patrón bacterias) y M_2 (Patrón lombrices), tienen tasas de degradación bajas, comparadas con sus respectivos tratamientos (Figura 4). Esto se debe a que las condiciones de estos microcosmos resultaron favorables para el desarrollo de microorganismos que utilizaron el suelo como sustrato; sin embargo, se infiere que se trata de bacterias poco especializadas en la degradación del contaminante.

Con respecto al análisis elemental efectuado a las muestras de asfaltenos coincide publicaciones reportadas anteriormente para el crudo Hamaca, también conocido como Ayacucho [23], que se utilizó en el presente estudio (Tabla 2).

A partir del análisis elemental se determinó la relación hidrógeno carbono de los asfaltenos al inicio día cero y cuarentinueve para los tratamientos. Al realizar un análisis comparativo de la relación H/C con el día cero (As00), se observa un aumento en las muestras tratada con *Eisenia foétida* a los cuarenta y nueve días B49 y una disminución con la muestra tratada con bacterias A49. Una disminución en la relación H/C representa un mayor grado de insaturación y un mayor contenido aromático en el compuesto.

Lo anterior marca una diferencia entre las muestras analizadas. En el caso del tratamiento A, se presume que ocurrió degradación principalmente sobre las cadenas alifáticas pero también hubo ruptura de algunas estructuras aromáticas, mientras que en el tratamiento B, los microorganismos atacaron los compuestos aromáticos presentando un alto grado de saturación, es decir presenta mayor características alifáticas,

ver el RMN ^{13}C comportamiento en la zona aromática y alifática de la Tabla 2. Con respecto al% de azufre (S) para ambos tratamientos al finalizar el estudio la cantidad de azufre difiere con respecto al día inicial, esto se debe a que los microorganismos presente producen una biodesulfuración (BDS) ruta metabólica en la que los microorganismos actúan como biocatalizadores en el carbón, petróleo y sus diferentes fracciones liberando así el azufre [24], en el tratamiento con *Eisenia foétida* la disminución fue mayor debido a las condiciones del medio (humus, humedad, aireación y estiércol).

En la parte estadística la prueba de Tukey concluye que el porcentaje de degradación del contaminante asfalteno con respecto a las muestras tratadas con bacterias y *Eisenia foétida*, muestra homogeneidad para ambos tratamientos, pero si presenta heterogeneidad con respecto al tratamiento control. Con respecto a la prueba Dunnett se generaron diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de degradación de cada tratamiento con su respectivo control.

Conclusiones

El suelo virgen utilizado en los tratamientos presenta una textura franca con poco contenido de materia orgánica, baja conductividad eléctrica y un pH ligeramente ácido. En la caracterización del crudo indica que corresponde a un crudo extrapesado con una fracción de 6,4% de saturados, 48,5% de aromáticos, 29% de resinas y 16% de asfaltenos.

La caracterización del estiércol equino indica que posee un mayor contenido de macronutrientes; con respecto a los microcosmos con microorganismo al inicio del tratamiento. El máximo porcentaje de degradación alcanzado fue de

Tabla 2
Composición de los asfaltenos a los días cero y cuarentinueve del estudio

Muestra	Porcentaje de elementos %				Relación (adim) H/C	RMN ^{13}C Porcentaje %	
	C	H	N	S		área alifática	área aromática
As00	82,47	8,42	1,71	4,70	1,22	68	32
A49	81,16	8,16	1,74	4,39	1,20	83	17
B49	78,02	8,41	1,79	3,77	1,28	56	44

92% a los cuarenta y nueve días correspondiente al tratamiento con *Eisenia foétida* (B). Los análisis de RMN ¹³C y análisis elemental reflejan cambios en la estructura del asfalto para los tratamientos A y B con respecto al día cero.

Mediante la prueba de Tukey se determina homogeneidad entre los tratamientos para la variable porcentaje de degradación del contaminante y en la prueba de Dunnett se encontró diferencia significativa con respecto al porcentaje de degradación entre los tratamientos y sus respectivos patrones o controles.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC), al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C), al Laboratorio General de Suelos del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV), al Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo (FACYT) y al Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo así como al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo por el financiamiento.

Referencias bibliográficas

- Fontúrbel F. y Achá D.: "Sinopsis de los estudios de biorremediación de petróleo realizados en suelos" del Lago Titikaka" una alternativa social y ambientalmente viable a los problemas de contaminación por hidrocarburos. Propuestas para un desarrollo sostenible: Lago Titikaka por estrategias K. Publicaciones Integrales, La Paz, (2003) 93-100.
- Yen, T. y Chilingarian, G. Development in petroleum science: 40 A, Elsevier, The Netherlands. (1994).
- Rogel E.: "Theoretical estimation of the solubility parameter distribution of asphaltenes, resins and oils from crude oils and related materials". Energy Fuels. 11, (1997) 920-925.
- Shirokoff W.J., Siddiki N.M. y Ali F.M.: Characterization of the structure of Saudi crude asphaltenes by x-ray diffraction. Energy Fuels. 11, (1997) 561-565.
- Atlas R. M. "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". Microbial Rev. 45, (1981) 180-209.
- Guiliano M., Boukir A., Doumenq P. y Mille G.: "Supercritical fluid extraction of 150 crude oil asphaltenes". Energy & Fuel 14, (2000) 89-94.
- Pineda F. G. y Mesta A.: "Biodegradación de asfalto por un consorcio microbiano aislado del petróleo crudo Maya". Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 18 (2), (2002) 67-73.
- Norma 8020/8100.: Agencia de protección ambiental (EPA) "Caracterización de crudos en fracciones SARA". (1986).
- ISO 1990. International Standard ISO (9439): "Water quality evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds". Method by analysis of released carbon dioxide.
- Instituto de Edafología. 1993. Métodos de análisis de suelos y plantas utilizados en el laboratorio general del instituto de edafología. UCV. Facultad de Agronomía, Maracay, Venezuela.
- Alastre E.: "Lumbricultura. Estado actual, potencial y perspectivas de su producción". Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. (1995).
- Norma para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Gaceta Oficial N° 5.245 Extraordinario del 3 de agosto de 1998. Decreto N° 2.635
- Aycachi R.: "Biodegradación del petróleo diesel. Facultad de ciencias biológicas". Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallos. (2008) Documento en línea. Disponible: <http://www.scribd.com/doc/6437940/Bacterias-Degradadoras-de-Petroleo> [Consulta: 2009, marzo 20].
- Plaza G. y López R.: "Estudio de la influencia de la salinidad en la biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos". Universidad Nacional de Salta. (2006). Documento.

- mento en línea. Disponible: <http://www.cricyt.edu.ar/lahv/asades/averma/2006/nuv01.pdf> [Consulta: 2009, febrero 23]
15. Casanova E.: "Introducción a la ciencia del suelo". Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV) de la Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela (2005).
 16. Ercoli E., Gálvez J., Di Paola M., Cantero J., Videla S., Medaura M. y Bauzá J.: "Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo". Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. (2001). Documento en línea. Disponible: <http://www.eco2site.com/informes/biorremediacion.asp> [Consulta: 2008, septiembre 05].
 17. Mata D. y Pla Sentis I.: "Caracterización de los problemas de salinidad de suelos y aguas en cuatro zonas de la cuenca del Lago de Maracaibo". *Agronomía Tropical*. (1992) Volumen 42, número 1-2, pp 85-96. Documento en línea. Disponible: http://ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/tcat_42.htm [Consulta: 2009, marzo 05].
 18. Álvarez P. y Guevara E.: "Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas". Consejo de desarrollo científico y humanístico (CDCH-UC) de la Universidad de Carabobo. Venezuela. (2003).
 19. Ercoli E.: "Tratamientos Biológicos". (2004) Documento en línea. Disponible: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/remediacion/tema11.pdf> [Consulta: 2009, marzo 20].
 20. Chalarca Y.: "Interpretación de análisis de suelos". Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. (2006) Documento en línea. Disponible: <http://kogi.udea.edu.co/Haciendas/documentos/Analisis%20de%20suelo.pdf> [Consulta: 2009, marzo 22].
 21. C.D.R.T.: "Colectivo para el desarrollo rural de tierras de campo". Disponible: <http://www.cdrtc campos.es/lanatural/compostaje.htm> [Consulta: 2009, marzo 22].
 22. López D.: "La actividad de la macrofauna (termitas y oligoquetos) en los suelos de sabana". *Venezuelos. Revista de la sociedad venezolana de la ciencia del suelo y del instituto de edafología de la Universidad Central de Venezuela*. Volumen 11, N° 1-2 (2003)15-25. Disponible: http://www.redpav.avepagro.org.ve/venesuel/v11_1-2/VENESUELOS%20%20VOL%2011.pdf [Consulta: 2009, marzo 22].
 23. Acevedo S. y Borges B.: "Caracterización estructural de las distintas fracciones aisladas del crudo extrapesado Carabobo". *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. (2007) Documento en línea. Disponible en: www.polimeros.labb.usb.ve/RLMM/home.html [Consulta: 2009, febrero 11].
 24. Monticello, D.L. y Finnerty, W.R. (1985): *Microbial desulfuration of fossil fuels: Annals y Reviews of Microbiology*.

Recibido el 12 de Septiembre de 2011

En forma revisada el 18 de Junio de 2012