



Universidad Nacional del Comahue
Facultad de Ingeniería

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos: estudio de los efectos y eficacia de la técnica utilizando enmiendas orgánicas

Tesis para optar por el título de **Magíster en Intervención Ambiental** con **Orientación Ingeniería Ambiental**

Autora: Ing. Ailen Gabriela Ferrando

Dirección: Dra. Adela María Bernardis

Co-Dirección: Mg. María Belén Aguiar

Junio 2023

AGRADECIMIENTOS

A Jonathan, a mi familia, por su acompañamiento y apoyo;

A mis directoras por su dedicación, por enseñarme, asistirme y orientarme;

Al personal de INTA IPAF Patagonia, FaCiAyS, laboratorio de Cromatografía LIBIQUIMA y laboratorio LASAF por su predisposición y colaboración;

A las empresas que me proporcionaron los suelos y a Myrian Barrionuevo de INTA por facilitarme las enmiendas;

A los proyectos de investigación que posibilitaron la realización de este trabajo: “Indicadores de ambientes sustentables y servicios ecosistémicos en el periurbano neuquino” (U017 FACIAS) dirigido por la Lic. M. C. Navarro, y “Remediación de suelos y aguas y restauración ecológica de sistemas degradados por uso agropecuario, agroindustrial y actividades extractivas” (Código: 2019-PD-E2-I039-002 INTA) dirigido por la Dra. M. C. Sasal;

A la Universidad Nacional del Comahue por permitirme una vez más formarme como profesional;

ÍNDICE

Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	6
Abreviaturas.....	7
Resumen y palabras clave.....	9
Abstract and key words	10
Glosario Técnico.....	11
1. Introducción.....	16
1.1 Marco Teórico y Antecedentes.....	16
1.1.1 ¿Qué son los hidrocarburos?.....	16
1.1.2 Problemática de la contaminación con hidrocarburos.....	20
1.1.3 Tratamiento de suelos por biorremediación.....	21
1.1.4 Eficacia de la biorremediación.....	25
1.1.5 Aplicación de enmiendas orgánicas en procesos de biorremediación.....	28
1.2 Objetivos.....	32
1.2.1 General.....	32
1.2.2 Específicos.....	32
1.3 Hipótesis.....	33
2. Materiales y Métodos.....	34
2.1 Suelo.....	34
2.2 Enmiendas.....	37
2.3 Caracterización del suelo y las enmiendas.....	38
2.3.1 Análisis fisicoquímicos.....	38
2.3.2 Cuantificación de la población microbiana.....	41
2.4 Diseño Experimental.....	42
2.5 Ensayo de biorremediación.....	44
2.5.1 Aireación y homogeneización.....	44
2.5.2 Control de temperatura.....	44
2.5.3 Control de humedad.....	44
2.5.4 Determinación del pH.....	45
2.5.5 Cuantificación de bacterias heterótrofas totales.....	45
2.5.6 Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	46

2.6	Análisis estadístico y representación de resultados.....	50
3	Resultados y Discusión	52
3.1	Caracterización del suelo y las enmiendas.....	52
3.2	Ensayo de biorremediación.....	54
3.2.1	Control de temperatura.....	55
3.2.2	Determinación del pH.....	55
3.2.3	Cuantificación de bacterias heterótrofas totales.....	56
3.2.4	Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo.....	57
4	Conclusiones.....	68
5	Referencias.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química de algunos hidrocarburos alifáticos y aromáticos	17
Figura 1.2 Estructura química de los BTEX.....	17
Figura 1.3. Estructura de los HAPs prioritarios.....	18
Figura 1.4 A y B Ejemplos de estructura química de resinas y asfaltenos.....	19
Figura 1.5 Degradación aerobia de hidrocarburos por bacterias heterótrofas.....	24
Figura 1.6 Proceso de compostaje y factores intervinientes.....	29
Figura 1.7 Compost de estiércol de cerdo maduro.....	29
Figura 2.1 Muestras de suelo de los yacimientos “A” y “B”.....	34
Figura 2.2 Mapa de ubicación de la región este de la provincia de Neuquén.....	35
Figura 2.3 Sitio de extracción del suelo dentro del yacimiento “B”.....	36
Figura 2.4 Recolección del suelo en yacimiento “B”.....	36
Figura 2.5 Elaboración de Bocashi en la chacra de Ruth Rivera.....	37
Figura 2.6 Zona de extracción del suelo y las enmiendas.....	38
Figura 2.7 Tamización del suelo.....	39
Figura 2.8 Determinación de la clase textural del suelo por método del tacto.....	39
Figura 2.9 Diagrama para determinación de la clase textural del suelo.....	39
Figura 2.10 Medición de pH sobre suspensión de suelo.....	40
Figura 2.11 Ensayo para determinación de capacidad de campo.....	40
Figura 2.12 Preparación de suspensión de suelo.....	42
Figura 2.13 Recuento en placa con lupa.....	42
Figura 2.14 Unidades experimentales del ensayo de biorremediación.....	42
Figura 2.15 Esquema ilustrativo de la ubicación de las unidades experimentales.....	42
Figura 2.16 A y B Toma de muestras de los tratamientos.....	44
Figura 2.17 Secado de suelo en estufa para determinación de humedad gravimétrica....	45
Figura 2.18 A y B Preparación de extractos para determinación de HTP.....	46
Figura 2.19 A y B. Realización de clean-up de los extractos.....	47

Figura 2.20 Extractos realizados para la prueba de aporte de enmiendas.....	48
Figura 2.21 Espectrofotómetro FT-IR y software empleado.....	49
Figura 3.1 Análisis de componentes principales para la caracterización de suelo y enmiendas.....	53
Figura 3.2 Evolución del pH durante la biorremediación.....	55
Figura 3.3 Recuento de bacterias heterótrofas totales durante la biorremediación.....	56
Figura 3.4 Comparación de BHT totales en los tratamientos.....	57
Figura 3.5 Espectros IR del ensayo de estiércol de cerdo y sílica.....	58
Figura 3.6 Espectros IR del ensayo de guano de gallina y sílica.....	59
Figura 3.7 Espectros IR del ensayo de Bocashi y sílica.....	59
Figura 3.8 Espectros IR de las enmiendas con agregado de 0,3 g de sílica gel.....	60
Figura 3.9 A y B Curvas de calibración (0-300 mg/kg HTP).....	61
Figura 3.10 A y B Curvas de calibración (300-750 mg/kg HTP).....	61
Figura 3.11 A-B-C-D Espectros IR a los 102 días para las unidades experimentales.....	62
Figura 3.12 Evolución de la concentración de HTP durante la biorremediación.....	63
Figura 3.13 Comparación de la concentración de HTP de los distintos tratamientos.....	64
Figura 3.14 Comparación del porcentaje de remoción de HTP.....	65
Figura 3.15 A-B-C-D Comparación de la evolución de la concentración de HTP y pH.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.I Parámetros analizados y métodos empleados por los laboratorios externos.....	41
Tabla 2.II Composición de los tratamientos.....	43
Tabla 3.I Caracterización inicial de suelo y enmiendas.....	52
Tabla 3.II Caracterización inicial del suelo.....	53
Tabla 3.III Análisis de metales y metaloides en suelo.....	54
Tabla 3.IV Recuento inicial de bacterias heterótrofas totales.....	54
Tabla 3.V Aporte de las enmiendas a la señal del equipo IR.....	60
Tabla 3.VI Porcentaje de remoción de HTP al final del ensayo.....	64

ABREVIATURAS

%R	Porcentaje de remoción
AIC	Criterio de Información de Akaike
BTEX	Benceno, Etilbenceno, Tolueno y Xilenos
BHT	Bacterias heterótrofas totales
BOC	Bocashi
C:N:P	Relación carbono-nitrógeno-fósforo
CO	Carbono orgánico
CTL	Control sin enmienda
EC	Estiércol de cerdo compostado
FaIn	Facultad de Ingeniería
FaCiAS	Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud
FT-IR	Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier
GC-FID	Cromatógrafo gaseoso con detector de ionización de llama
GG	Guano de gallina compostado
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HC	Hidrocarburos
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPAF	Instituto Para la Agricultura Familiar
LC	Límite de cuantificación
ML	Modelo Lineal General
MLG	Modelo Lineal Generalizado
MO	Materia orgánica
ND	No detectado
NTK	Nitrógeno Total Kjeldahl

RAS	Relación de absorción de sodio
S+BOC	Suelo con agregado de Bocashi
S+EC	Suelo con agregado de compost de estiércol de cerdo
S+GG	Suelo con agregado de compost de guano de gallina
TNRCC	Comisión de Conservación de Recursos Naturales del Estado de Texas
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNCo	Universidad Nacional del Comahue
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar y comparar la eficacia del proceso de biorremediación al aplicar tres enmiendas orgánicas (guano de gallina compostado, estiércol de cerdo compostado y Bocashi) a un suelo contaminado con hidrocarburos, proveniente de un yacimiento de la Patagonia Norte. Se realizó una experiencia a escala de laboratorio, durante 102 días. Se ensayaron 3 tratamientos: biorremediación de suelo con cada una de las enmiendas seleccionadas y un control sin enmienda, con 3 réplicas cada uno. Periódicamente se realizó la aireación, homogeneización y ajuste de humedad al 15% (p/p) de cada unidad experimental. Durante la experiencia se determinó el pH, concentración de hidrocarburos totales de petróleo y bacterias heterótrofas totales de los tratamientos. Al finalizar el ensayo se observó que los tratamientos con agregado de enmiendas alcanzaron porcentajes de remoción (%R) de hidrocarburos totales de petróleo estadísticamente superiores respecto del control sin enmienda. El %R más alto se obtuvo para el tratamiento con agregado de Bocashi (93,7%). Se encontró que la aplicación de enmiendas orgánicas adicionó nutrientes al suelo para la reactivación de los microorganismos autóctonos con capacidad metabólica de degradar hidrocarburos y aumentó la eficacia del proceso de biorremediación en el suelo ensayado.

PALABRAS CLAVE: Bioestimulación; degradación del petróleo; contaminación; Patagonia Norte.

ABSTRACT

The major objective of this work was to evaluate and compare the efficacy of the bioremediation process by applying three organic amendments (composted chicken manure, composted pig manure and Bocashi) to a soil contaminated with hydrocarbons (HC), from a deposit in North Patagonia. An experiment was carried out on a laboratory scale, for 102 days. Three treatments were tested: soil bioremediation with each of the selected amendments and a control (without amendment), with 3 replicates each. Periodically, aeration, homogenization and humidity adjustment to 15% (p/p) were carried out for each experimental unit. During the experience, pH, concentration of total petroleum hydrocarbons and total heterotrophic bacteria were determined for the treatments. At the end of the test, it was observed that the treatments to which amendments were added reached statistically higher HC removal percentages (%R) in relation to the control. The highest %R was obtained for the treatment with added Bocashi (93.7 %). It was found that the application of organic amendments incorporate nutrients to the soil for the reactivation of autochthonous microorganisms with metabolic capacity to degrade hydrocarbons. In addition to this, the efficacy of the bioremediation process in the soil tested was increased.

KEY WORDS: Biostimulation; oil degradation; pollution; North Patagonia.

GLOSARIO TÉCNICO

Análisis de Componentes Principales: método estadístico utilizado para analizar y simplificar conjuntos de datos multidimensionales con variables cuantitativas.

Asfaltenos: compuestos aromáticos de alto peso molecular, que precipitan del crudo luego de agregarle un exceso de 40 o 60 volúmenes de una parafina de bajo peso molecular (usualmente n-heptano).

Benceno: hidrocarburo aromático de fórmula química C_6H_6 .

Biorremediación: Metodología que utiliza el potencial metabólico de microorganismos para eliminar o transformar contaminantes de diferentes ambientes.

Bocashi (o Bokashi): enmienda orgánica de origen japonés que resulta de la descomposición de materia orgánica vegetal y/o animal. Se diferencia del compost porque pasa por un proceso de descomposición más acelerado y puede realizarse en ausencia o presencia de oxígeno.

Capacidad de campo: cantidad máxima de agua (expresada en valores de humedad) que es capaz de retener el suelo en el momento que llega al estado de saturación. Se determina como el contenido de agua que tiene un suelo después que se saturó y drenó libremente por espacio de 24 a 72 horas.

Carcinógeno (o cancerígeno): sustancia o agente con capacidad de producir cáncer.

Ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarboxílicos): consiste en una serie de reacciones bioquímicas que forma parte de la respiración celular en todas las células aerobias, donde se libera energía almacenada a través de una secuencia de oxidaciones y reducciones.

Clean-up: Etapa de purificación del extracto de manera previa a su análisis, con el objeto de minimizar las interferencias.

Compost (o composta): enmienda orgánica constituida por materia orgánica estable y madura y restos minerales, resultado de un proceso de compostaje.

Compostaje: proceso controlado de transformación biológica de la materia orgánica bajo condiciones aeróbicas y termófilas.

Consortio microbiano: grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como una comunidad, para la degradación de distintos compuestos.

Contaminación: agregado de materiales o energía residuales al entorno, o cuando éstos por su sola presencia o actividad provocan directa o indirectamente una pérdida reversible o irreversible de la condición normal de un ecosistema o de sus componentes en general. En otros términos, es la alteración de origen antropogénico a la integridad física, biológica, química y radiológica del ambiente.

Devianza: medida de la bondad de ajuste de los modelos lineales generalizados.

Eficacia: capacidad de alcanzar el objetivo o resultado que se propone en el tiempo indicado.

Enmienda: sustancia o mezcla de sustancias de carácter inorgánico, orgánico o biológico que incorporada al suelo modifique favorablemente sus caracteres físicos, fisicoquímicos, químicos o biológicos.

Enmienda orgánica: sustancia o mezcla de sustancias de carácter orgánico, que se aplican a los suelos con el principal objetivo de mejorar sus propiedades físicas, fisicoquímicas, químicas o biológicas.

Estiércol: excrementos sólidos y líquidos de los animales, mezclados con los residuos vegetales que se han utilizado como cama.

Fermentación: proceso mediante el cual las sustancias orgánicas sufren una serie de cambios químicos que producen energía, en el que el hidrógeno pasa a un aceptor orgánico y el oxígeno no interviene.

Fermentación láctica: fermentación donde la glucosa se degrada y se convierte en ácido láctico.

Fertilidad: capacidad que posee el medio edáfico para proporcionar a las plantas los elementos y condiciones esenciales que demandan para su metabolismo. Se

refiere tanto a nutrientes necesarios para su desarrollo como a los factores que condicionan la nutrición: las condiciones físicas e hídricas, las condiciones de aireación y la presencia de sustancias perjudiciales para las plantas.

Fertilizante: todo producto que incorporado al suelo o aplicado a los vegetales o sus partes, suministre en forma directa o indirecta sustancias requeridas por aquéllos para su nutrición, estimular su crecimiento, aumentar su productividad o mejorar la calidad de la producción. Pueden ser de naturaleza orgánica, inorgánica o biológica. Según la normativa nacional, la sumatoria de los porcentajes de los macroelementos primarios (Nitrógeno-Fósforo-Potasio) debe ser igual o superior al 12% (p/p) (todos como elemento).

Guano: excrementos parcialmente descompuestos de origen animal, principalmente de aves, murciélagos, focas u otros animales.

Hidrocarburos: compuestos orgánicos constituidos solamente por los elementos carbono e hidrogeno. Pueden ser alifáticos, alicíclicos o aromáticos.

Hidrocarburos aromáticos: familia de compuestos que tienen un núcleo común, el núcleo bencénico. Son derivados sustituidos del benceno o formados por la unión de varios núcleos bencénicos. Pueden ser monocíclicos o policíclicos.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (abreviado HAPs o PAHs por sus siglas en inglés): compuestos orgánicos que tienen dos o más anillos aromáticos fusionados.

Hidrocarburos totales de petróleo (abreviado HTP o TPH por sus siglas en inglés): término utilizado para referirse a una familia de compuestos químicos derivados del petróleo, extraídos de una matriz y cuantificados por un método particular. Debido a que son muchos los compuestos químicos presentes en el petróleo y sus derivados, resulta útil medir la cantidad total, aunque la misma puede variar en función del método empleado para la extracción de los hidrocarburos de la matriz.

Humedad gravimétrica: cantidad de agua que existe en un suelo, referida en porcentaje (% p/p).

Madurez: cualidad del producto estable y sin sustancias fitotóxicas que puedan afectar el crecimiento vegetal. Se alcanza con la finalización efectiva del proceso de compostaje.

Nitrógeno Total Kjeldahl: suma de nitrógeno orgánico en sus diversas formas, amoníaco (NH_3) y amonio (NH_4^+), determinados a partir del Método Kjeldahl.

Petróleo: mezcla compleja conformada por distintas fracciones de hidrocarburos, compuestos orgánicos con sulfuro, nitrógeno y oxígeno, y elementos metálicos en menor proporción.

Remediación: cualquier operación unitaria o conjunto de ellas, que altere la composición de un contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas, de manera que reduzcan su toxicidad, movilidad o volumen en la matriz o material contaminado.

Residuo: todo material que, por su cantidad, composición o particular naturaleza, sea de difícil integración a los ciclos, flujos y procesos ecológicos normales.

Residuo orgánico: cualquier residuo susceptible de sufrir transformación biológica, ya sea aeróbica o anaeróbicamente.

Resinas: fracción del crudo constituida por agregados de anillos aromáticos fusionados entre sí, la cual es insoluble en propano líquido, pero soluble en n-heptano.

Restauración: es el proceso de ayudar en la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido.

Sorción: los mecanismos de sorción incluyen la adsorción, que es la atracción de un compuesto hacia una superficie sólida o interfase, y la absorción, que es la penetración de un contaminante casi uniformemente en un sólido. La sorción es una expresión general para un proceso en el cual el componente se mueve desde una fase para acumularse en otra, principalmente en los casos en que la segunda fase es sólida.

Toxicidad: capacidad intrínseca de un agente para producir efectos adversos sobre un sistema biológico.

Tóxico: cualquier agente (físico o químico) que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, alterando sus equilibrios vitales. Se utiliza este término para referirse a los agentes cuyo origen deviene de la actividad antropogénica o subproductos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1.1 ¿Qué son los hidrocarburos?

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por cadenas de carbono e hidrógeno, originados en el subsuelo terrestre (Celis Hidalgo, 2009). Pueden encontrarse en estado gaseoso, líquido o sólido. El petróleo crudo es una combinación de diferentes hidrocarburos. Su composición es variable y depende de su origen, pero en promedio se considera que contiene un 80-87% de carbono y un 10-15% de hidrógeno (Botello, 2005; Celis Hidalgo, 2009). También se compone por azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y oxígeno (0-5%) (sea en su forma elemental o en grupos funcionales o constituyes heterocíclicos), y elementos metálicos en menor proporción, siendo hierro, aluminio, cobre, vanadio y níquel los más abundantes (Botello, 2005). A su vez, el petróleo puede ser sometido a un proceso de refinación y dar lugar a otros productos como gasolina, kerosén, asfalto o aceite combustible, entre otros productos petroquímicos, que son fracciones obtenidas por destilación del crudo a determinados rangos de temperatura, dependiendo del tipo de petróleo utilizado y del proceso de refinación aplicado (Wang et al., 2005).

Los hidrocarburos pueden ser alifáticos, aromáticos o polares (asfaltenos y resinas). Los hidrocarburos alifáticos pueden clasificarse según su estructura química; aquellos compuestos que contienen enlaces simples carbono-carbono (C-C) se denominan saturados a diferencia de los compuestos insaturados que contienen al menos un doble o triple enlace carbono-carbono (C=C, C≡C respectivamente), que se caracterizan por ser compuestos más reactivos e inestables que los saturados. Asimismo, los hidrocarburos alifáticos pueden ser de cadena lineal, ramificada o cíclicos (Olguín et al., 2007) (Figura 1.1 A). Un grupo importante dentro de los hidrocarburos alifáticos son los hidrocarburos isoprenoides, conformados por unidades de isopreno (C₅H₈) (Figura 1.1 A), siendo el Pristano (C₁₉) y el Fitano (C₂₀) los más abundantes en el petróleo, aunque se han reportado compuestos isoprenoides con hasta con 40 átomos de carbono (Botello, 2005). Cuantitativamente, los hidrocarburos saturados son los más abundantes, representando del 50 al 60% de la composición del petróleo (Ortuño Arzate, 2009).

Por su parte, los hidrocarburos aromáticos (Figura 1.1 B) contienen uno o más anillos bencénicos en su estructura molecular, en los cuales los hidrógenos (H) pueden estar sustituidos por grupos metilo (-CH₃).

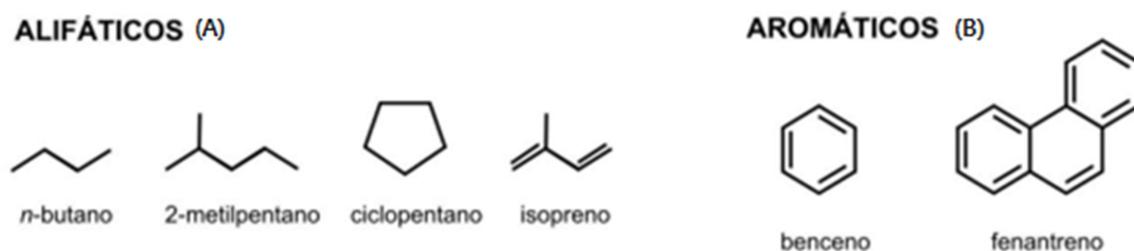


Figura 1.1. Estructura química de algunos hidrocarburos alifáticos (A) y aromáticos (B). Fuente: Guibert, 2014.

Los dos grupos principales de compuestos aromáticos que componen el petróleo y sus derivados son los denominados hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y los compuestos volátiles, tales como benceno, tolueno, etil benceno y xilenos (Figura 1.2), denominados conjuntamente como BTEX (Botello, 2005; Petro Cardona & Mercado Montero, 2014).

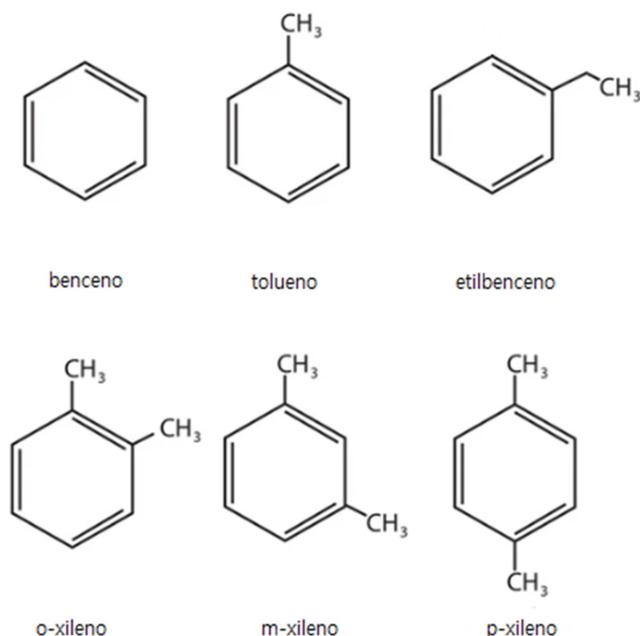


Figura 1.2 Estructura química de los BTEX

Los HAPs son un grupo de más de cien compuestos en cuya estructura molecular poseen de dos a siete anillos bencénicos condensados. Son volátiles en mayor o menor medida en función de su masa molecular (Madrid et al., 2021), y cuentan con

una gran capacidad de adsorción a partículas atmosféricas, lo cual favorece su transporte y su deposición a grandes distancias de la fuente emisora (Pérez-Morales López et al., 2016). Se consideran contaminantes persistentes de origen antrópico, con efectos biológicos a largo plazo y presentan una toxicidad variable en función de su estructura molecular (Prada-Ríos & Zambrano, 2006; Pérez-Morales López et al., 2016). Está comprobado que poseen un potencial carcinógeno, genotóxico y mutagénico, representando un grupo de contaminantes químicos con efectos adversos a largo plazo para la salud (Pérez-Morales López et al., 2016). La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) ha incluido a 16 de estos HAPs en su lista de contaminantes prioritarios (Figura 1.3).

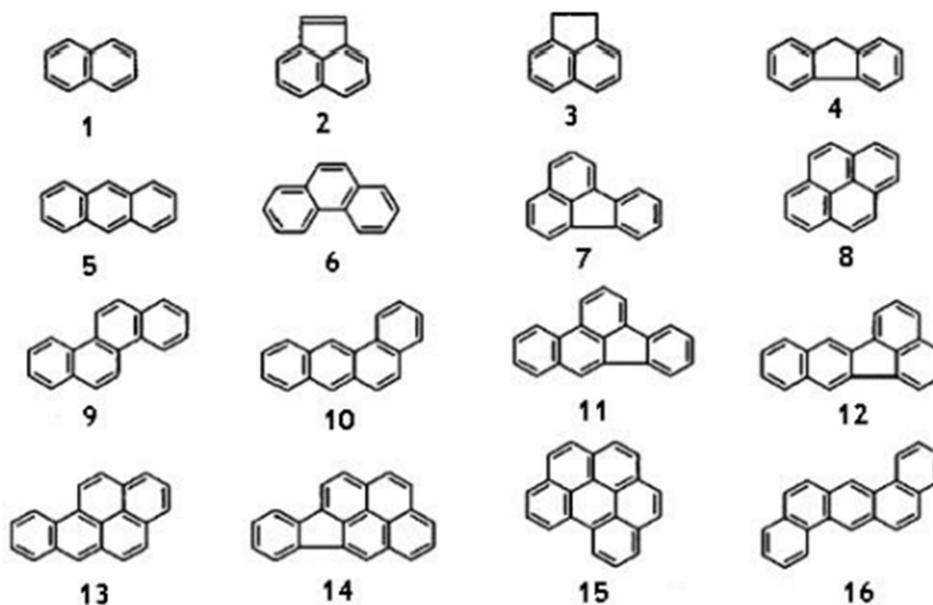


Figura 1.3. Estructura de los HAPs prioritarios. 1: naftaleno; 2: acenaftileno; 3: acenafteno; 4: floureno; 5: antraceno; 6: fenantreno; 7: fluoranteno; 8: pireno; 9: criseno; 10: venzo(a)antraceno; 11: venzo(b)fluoranteno; 12: venzo(k)fluoranteno; 13: venzo(a)pireno; 14: indeno(1,2,3-cd)pireno; 15: venzo(g,h,i)perileno; 16: dibenzo(a,h)antraceno. Fuente: Izquierdo Romero, 2013.

En cuanto a la toxicidad de los BTEX, se han descrito efectos en la salud asociados con la exposición humana, como disfunción del sistema nervioso central, y daños en riñones e hígado (Martínez-Toledo & Cuevas-Díaz, 2011). La inhalación de hidrocarburos volátiles, como el benceno, el tolueno y el xileno, puede tener efectos graves en la salud respiratoria provocando afecciones crónicas o incluso un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Flores et al., 2023). Puntualmente, el

benceno es una molécula leucemogénica y carcinogénica (Flores et al., 2023), categorizada como un agente carcinógeno del Grupo 1 según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), lo cual significa que existe suficiente evidencia científica para considerar una relación positiva entre la exposición crónica a este tóxico y el desarrollo de cáncer en el ser humano y algunos animales. La exposición humana al benceno puede causar intoxicación aguda o crónica, aún en bajas concentraciones (Silva Graciani & Vidrih Ferreira, 2014).

Respecto a las resinas y asfaltenos (Figura 1.4 A y B), se puede decir que son compuestos complejos, de alto peso molecular, con sustituyentes polares y ricos en elementos como nitrógeno, azufre y oxígeno, y, en ocasiones, níquel y vanadio. Estos compuestos constituyen la fracción de hidrocarburos más pesada del petróleo crudo (Ortuño Arzate, 2009).

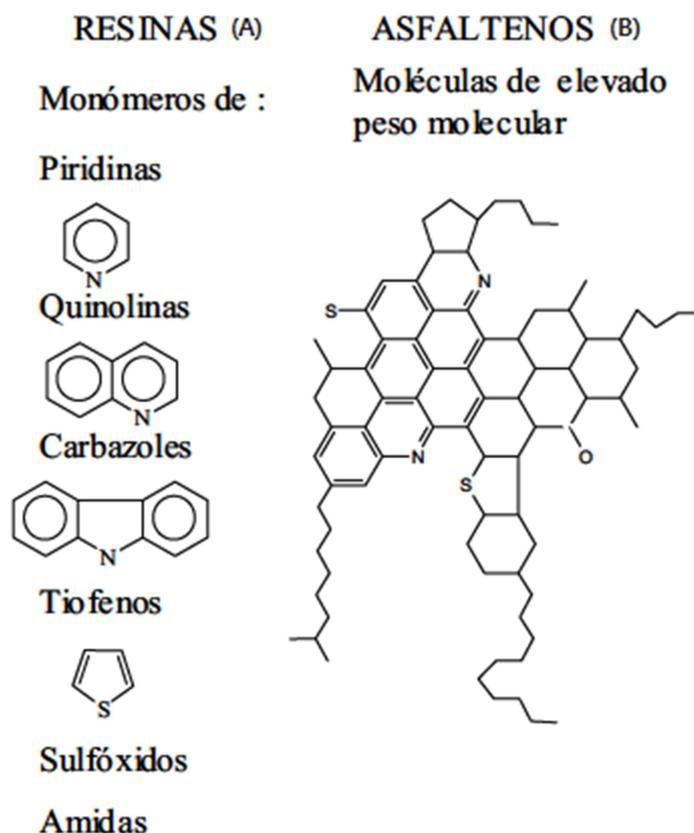


Figura 1.4 Ejemplos de estructura química de resinas (A) y asfaltenos (B). Fuente: Viñas Canals, 2005.

Las resinas son estructuralmente similares a los asfaltenos, pero de menores pesos moleculares. Consisten en núcleos poliaromáticos unidos por cadenas alquílicas largas y sustituidos por un número alto de cadenas laterales cortas. Se definen como la fracción soluble en alcanos como pentano y heptano, pero insolubles en propano líquido. Por su parte, los asfaltenos son definidos como la fracción del petróleo insoluble en n-alcanos, como n-pentano, n-hexano y n-heptano, y soluble en solventes aromáticos, como benceno o tolueno.

En términos ambientales, se ha demostrado que los hidrocarburos de petróleo son tóxicos para microorganismos, plantas y animales (Adams et al., 2008; Thapa et al., 2012). Su toxicidad es variable pero, en general, los hidrocarburos de menor peso molecular (fracción liviana C5-C10 y media C11-C28) son más tóxicos (Velázquez Arias, 2017), mientras que los más pesados (fracción media C11-C28 y fracción pesada C28+) son más recalcitrantes, es decir, son más difíciles de degradar y pueden permanecer en el ambiente por mucho más tiempo (Adams et al., 2008). La experiencia realizada por Hernández-Valencia y colaboradores (Hernández-Valencia et al., 2017), demostró que a medida que aumenta la gravedad API del crudo (es decir, a medida que disminuye su peso molecular) aumenta la toxicidad del mismo.

1.1.2 Problemática de la contaminación con hidrocarburos

En la Patagonia argentina, la explotación de yacimientos hidrocarburíferos representa uno de los principales componentes de la matriz productiva (Paladino, 2017). En las últimas décadas se ha incrementado la producción hidrocarburífera en la Cuenca Neuquina, convirtiéndose en uno de los pilares fundamentales de la economía regional, asociada principalmente al cobro de regalías, la generación de empleo y las actividades comerciales asociadas (Landriscini & Carignano, 2015). Sin embargo, el desarrollo de las actividades extractivas en la región ocasiona numerosos problemas ambientales (Pojmaevich et al., 2023). Los procesos de exploración, explotación y producción de pozos de gas y petróleo, como también la refinación del petróleo, el transporte y uso generalizado de petróleo crudo y sus derivados, pueden generar derrames, causados principalmente por prácticas inadecuadas o accidentes en las operaciones (Hernández-Valencia et al., 2017). Dichos eventos pueden causar la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos, y representan uno de los problemas ambientales más graves de la

actualidad (Suárez-Vera et al., 2020; Valenzuela et al., 2021; Alyana de la Cruz et al., 2023), además de generar impactos de tipo económicos, sociales y de salud pública (Pardo Castro et al., 2004; Thapa et al., 2012; Chan-Quijano et al., 2015).

Dentro de las principales consecuencias de la contaminación de ecosistemas terrestres con petróleo y sus derivados pueden mencionarse: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal en el lugar del derrame, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y de la biota microbiana, contaminación de cuerpos de agua subterráneos por infiltración, así como también la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales (Pardo Castro et al., 2004; Benavidez López de Mesa et al., 2006). Si bien la gravedad del impacto en el suelo varía según el tipo de hidrocarburo, en general, las propiedades fisicoquímicas del suelo tales como la estructura, la retención de agua, la compactación y la retención de nutrientes pueden verse afectadas notablemente por la contaminación con hidrocarburos y, en consecuencia, afectar la fertilidad del suelo (Pérez Vargas et al., 2002; Ortínez-Brito et al., 2003; Adams et al., 2008; Fortunato, 2018). Cuando los hidrocarburos cubren la superficie del suelo interrumpen la interacción electrostática que existe entre la superficie de las partículas del suelo con el agua y con los cationes, reduciendo la capacidad de retención hídrica y de nutrientes catiónicos (Adams et al., 2008). Además, la contaminación de suelos con hidrocarburos de petróleo disminuye el pH (debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos), modifica la conductividad eléctrica y la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Ortínez-Brito et al., 2003; Zamora et al., 2012). En este sentido, diferentes estudios han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos en la germinación y crecimiento vegetativo de diferentes especies sometidas a diferentes concentraciones de hidrocarburo, concluyendo que hay un marcado retraso en el crecimiento de todas las plantas evaluadas (Benavidez López de Mesa et al., 2006).

1.1.3 Tratamiento de suelos por biorremediación

Para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos existen diversas alternativas basadas en procesos fisicoquímicos como técnicas de extracción de vapores de suelo o estabilización; procesos químicos tales como la oxidación química, térmicos como desorción térmica; o procesos biológicos como la

biorremediación y fitorremediación. Cualquier tipo de tratamiento puede aplicarse en el lugar de la contaminación o utilizarse como tratamiento *ex situ*. En la actualidad, existe una necesidad creciente en el desarrollo e implementación de tecnologías de remediación ambientalmente sostenibles y de bajo costo, como es el caso de los tratamientos biológicos. Las técnicas fisicoquímicas y térmicas, incluso pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de estos contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo (Lladó Fernández, 2012). Como limitaciones de las técnicas biológicas, debemos considerar el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las exigencias requeridas (Pozzo Ardizzi, 2018).

La biorremediación utiliza el potencial metabólico de microorganismos heterótrofos, fundamentalmente bacterias, pero también hongos, algas y/o levaduras, para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples (Rodríguez Gallego & Sánchez Martín, 2003; Rodríguez González et al., 2022). Dentro de los métodos biológicos, la biorremediación, es el más utilizado por ser el más eficiente, destacándose como la mejor opción desde el punto de vista ambiental para el tratamiento de suelos contaminados (Tyagi et al., 2010; Thapa et al., 2012; García Delgado, 2015; Hidalgo-Lasso et al., 2023; Pojmaevich et al., 2023). Esta técnica es eficaz para degradar hidrocarburos, solventes orgánicos halogenados y pesticidas no clorados, entre otros compuestos (Park et al., 2011). Investigaciones recientes reportan resultados satisfactorios al aplicar tecnologías de biorremediación para la degradación de hidrocarburos de petróleo (Suarez-Vera et al., 2020; Cruz Torres et al., 2021; Díaz Rodríguez et al., 2023; Pojmaevich et al., 2023). Un proceso de biorremediación puede conducir a una transformación parcial de los contaminantes orgánicos, generando como producto intermediario o final un compuesto menos tóxico, o conducir a una transformación total, generando como producto final dióxido de carbono y agua o metano, según se lleve a cabo en condiciones aerobias o anaerobias respectivamente (Pozzo Ardizzi, 2018).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se produce una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena es iniciada por un sustrato orgánico (que pueden ser los hidrocarburos) que es exógeno

a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores de electrones comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio (Maroto Arroyo & Rogel Quesada, 2004), y se representan por la Ecuación 1:



Ecuación 1

Por otra parte, están los procesos anaeróbicos que son oxidaciones incompletas y se describen en la Ecuación 2:



Ecuación 2

La degradación aeróbica suele ser más rápida y se considera más eficaz que la degradación anaeróbica (Olajire & Essien, 2014; Arena Ortiz & Reyes Sosa, 2017).

Existe un gran número de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, los cuales poseen distintas rutas metabólicas de degradación que involucran diversas enzimas (Thapa et al., 2012; Izquierdo Romero, 2013), que pueden ser intra o extra celulares (Lladó Fernández, 2012). Este trabajo se centra en el proceso de biodegradación aeróbica de hidrocarburos por bacterias heterótrofas, el cual consta de las siguientes etapas (Izquierdo Romero, 2013; Arena Ortiz & Reyes Sosa, 2017) (Figura 1.5):

1. Procesos metabólicos o estrategias de las bacterias para optimizar el contacto con el contaminante, como la producción de compuestos biosurfactantes. Los hidrocarburos deben ser accesibles para las bacterias que van a realizar la biodegradación.
2. Ataque inicial del compuesto orgánico en el interior de la célula. Corresponde a un proceso oxidativo realizado por enzimas intracelulares como las oxigenasas (mono y dioxigenasas) y peroxidasas, que activan e incorporan oxígeno al contaminante.

3. Degradación de los hidrocarburos por rutas periféricas. Se produce la conversión de los contaminantes a compuestos intermedios (como acetil-coenzima A o piruvato), capaces de ingresar en el metabolismo central de las células, por ejemplo, al Ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarbóxicos).
4. Biosíntesis de la biomasa celular. Los metabolitos precursores, junto con los iones, participan en un conjunto de reacciones que conducen a la síntesis de las estructuras celulares.

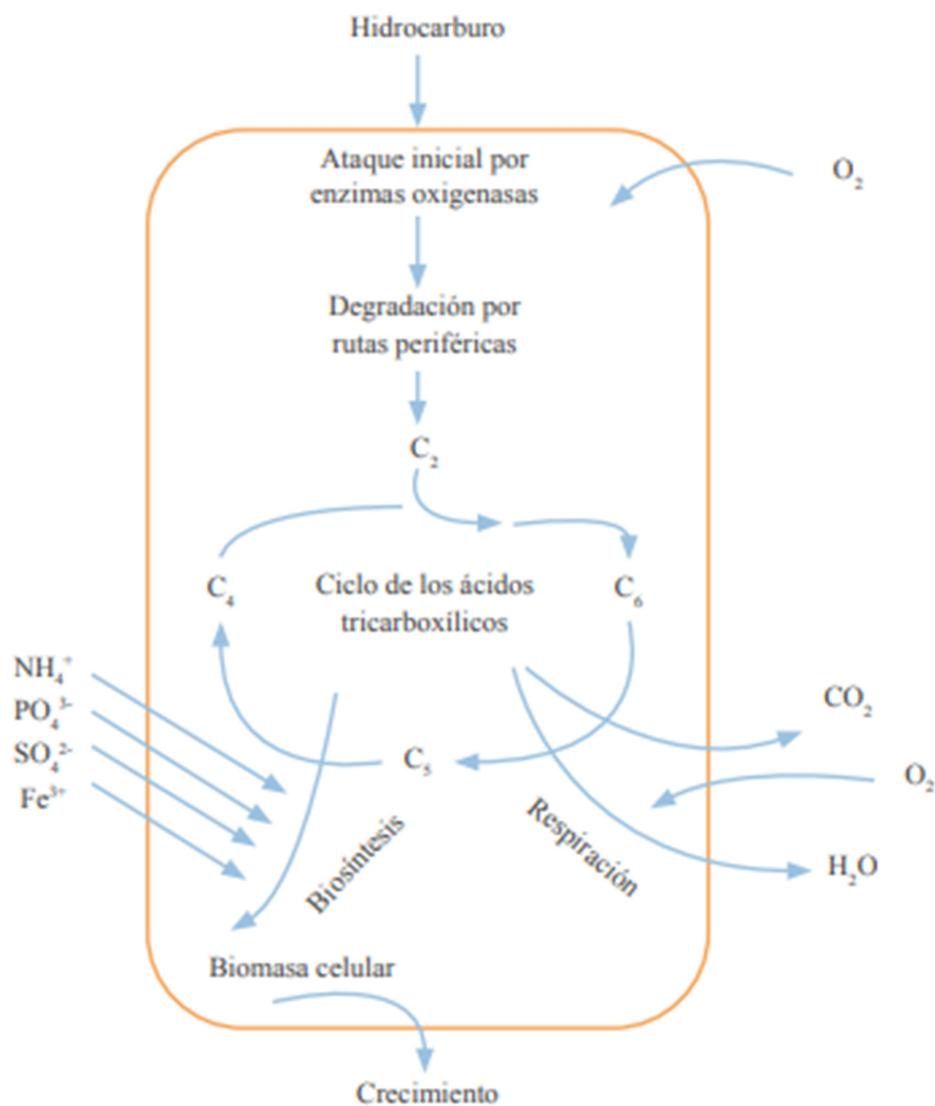


Figura 1.5 Degradación aerobia de hidrocarburos por bacterias heterótrofas. Fuente: Arena Ortiz & Reyes Sosa, 2017, basado en Fritsche & Hofrichter, 2000.

1.1.4 Eficacia de la biorremediación

Los procesos de biorremediación pueden verse limitados por diversos factores (Pozzo Ardizzi, 2018; Rodríguez-González et al., 2022; Hidalgo-Lasso et al., 2023), entre ellos:

- Estructura de los contaminantes orgánicos: los hidrocarburos presentes en el suelo son la fuente de carbono y energía que utilizan los microorganismos. Debido a la complejidad de la composición del petróleo, la biodegradación dependerá de las proporciones que tenga de cada una de sus fracciones (Acuña et al., 2010). En general se observa que la fracción de hidrocarburos alifáticos se degrada más fácilmente que las fracciones de hidrocarburos aromáticos y polares. Esto se debe a que la fracción alifática está compuesta principalmente por n-alcenos, hidrocarburos que son fácilmente metabolizados por los microorganismos. La utilización como fuente de carbono de compuestos orgánicos se dificulta a medida que ramificaciones y anillos aromáticos se incorporan en su estructura. Seguido a los n-alcenos, se hace más compleja la degradación de alcenos ramificados, compuestos aromáticos de bajo peso molecular, alcenos cíclicos y aromáticos. La fracción polar representa la fracción más recalcitrante a la biorremediación debido a la complejidad de sus moléculas (Acuña et al., 2010; Iturbe-Argüelles et al., 2002).
- Nutrientes: los nutrientes inorgánicos principales para la biodegradación son el nitrógeno y el fósforo. El primero es necesario para la síntesis de proteínas y la pared celular, mientras que el fósforo es necesario para formar los ácidos nucleicos (Iturbe-Argüelles et al., 2002). Existen relaciones de carbono, nitrógeno y fósforo óptimas para obtener un buen resultado en la biodegradación (Pucci et al., 2011).
- Oxígeno: la biorremediación depende principalmente de la actividad de los microorganismos aerobios, por lo que se requiere un suministro adecuado de oxígeno al suelo, de aproximadamente 2 a 3 kg de oxígeno por cada kilogramo de hidrocarburos para asegurar una buena degradación (Vila et al., 2014; Iturbe-Argüelles et al., 2002).
- Humedad: los microorganismos requieren humedad para transportar los nutrientes, llevar a cabo los procesos metabólicos y mantener la estructura

celular. Sin embargo, un exceso de humedad es indeseable debido a que las moléculas de agua ocuparían gran parte de los poros del suelo, limitando la permeabilidad del aire y provocando una menor difusión del oxígeno (Iturbe-Argüelles et al., 2002).

- pH: es un factor químico que puede afectar la actividad microbiana así como a la solubilización y disponibilidad de los contaminantes y de los iones (Gómez Romero et al., 2008; Rodríguez-González et al., 2022). Naturalmente, los suelos pueden tener un pH entre 3,5 y 10. En zonas áridas de suelos poco evolucionados o jóvenes, el pH suele encontrarse por encima de 7, mientras que en las zonas más húmedas en general se encuentran valores de pH menores a 7 (Cremona & Enríquez, 2020). Un pH adecuado para la biodegradación debe encontrarse en un rango entre 6 y 8 (Rodríguez-González et al., 2022).
- Temperatura: es un factor preponderante en la estimulación del metabolismo bacteriano responsable de llevar adelante el proceso. Las bajas temperaturas provocan una disminución en la tasa de metabolización de los microorganismos. El incremento de la temperatura, por lo general, se relaciona con el aumento de la biodegradación de los contaminantes, hasta llegar a temperaturas que no son compatibles con la vida de los microorganismos. Por otro lado, el petróleo a bajas temperaturas aumenta su viscosidad y disminuye su solubilidad, esto lo convierte en un sustrato poco biodisponible para que los microorganismos lo utilicen como fuente de carbono y energía (Pucci et al., 2011). Se ha encontrado que el proceso funciona de manera óptima con temperaturas de 25°C a 37°C, pudiéndose realizar una biodegradación eficiente a temperaturas menores (Acuña et al., 2012).

Si bien los procesos de biorremediación se dan de forma natural en la mayoría de los casos, muchas veces resulta necesario acelerar los mismos (Windevoxhel et al., 2011). Las dos principales estrategias que se utilizan para aumentar la eficacia de la técnica son la bioaumentación y la bioestimulación (Maldonado-Chávez et al., 2010). La bioaumentación consiste en la inoculación de cultivos microbianos concentrados (cepas individuales o consorcios) con capacidad comprobada para degradar los contaminantes presentes en el suelo, pudiendo llevarse a cabo con microorganismos

autóctonos o alóctonos (Tyagi et al., 2010; Windevoxhel et al., 2011). Por otro lado, la bioestimulación se basa en proporcionar a las comunidades presentes un entorno favorable en el que puedan degradar efectivamente los contaminantes (Kaplan & Kitts, 2004), mediante el ajuste de los factores limitantes (como nutrientes, humedad y aceptores de electrones) que estimulan el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

La decisión de implementar una o ambas estrategias depende de la capacidad degradante de las comunidades autóctonas, de su concentración y del grado de contaminación del suelo a tratar. Mientras que la técnica de bioaugmentación es adecuada para casos en los que los suelos no contienen suficientes microorganismos o la población nativa no posee las rutas metabólicas necesarias para degradar los compuestos contaminantes presentes (Tyagi et al., 2010), la bioestimulación es la estrategia más comúnmente utilizada (Margesin & Schinner, 2001; Alvaro et al., 2014; Cambarieri et al., 2021). Diversos estudios han demostrado que, en general, las comunidades bacterianas presentes en los suelos son capaces de degradar hidrocarburos de petróleo cuando las condiciones del sistema son controladas y optimizadas (Álvarez, 2015; Cárdenas Moscol et al., 2017, Cambarieri et al., 2021), encontrándose resultados favorables en procesos de bioestimulación en suelos contaminados con distintas familias de hidrocarburos (Arrieta Ramírez et al., 2012).

Se han encontrado resultados satisfactorios en la aplicación de metodologías de biorremediación mediante bioestimulación para suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la Patagonia (Acuña et al., 2012; Pojmaevich et al., 2023). Estos suelos se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno, lo que dificulta la biorremediación de los hidrocarburos si no se lleva a cabo una adecuada bioestimulación (Pucci et al., 2011). Además, un episodio de contaminación por hidrocarburos supone un gran aporte de carbono e hidrógeno que no va acompañado de un incremento de los otros elementos necesarios para la proliferación de las poblaciones microbianas presentes (Vila et al., 2014). La adición de hidrocarburos al suelo aumenta la cantidad de carbono disponible en el medio y, si esto ocurre en lugares donde la concentración de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo es baja, se producen relaciones C/N y C/P muy altas, lo cual es

desfavorable para el crecimiento microbiano (Pardo Castro et al., 2004). En la bibliografía se han considerado diferentes relaciones de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) de referencia para la adición de nutrientes en procesos de bioestimulación. Sin embargo, para obtener resultados óptimos, esta proporción debe ajustarse para cada suelo en particular (Acuña et al., 2007), ya que cada suelo tiene su propia biodiversidad microbiana, lo que le confiere necesidades biológicas particulares (Lawniczak et al., 2020). Experiencias realizadas en suelos de la Patagonia indican que utilizando una relación C:N:P de 100:2,5:0,25 se puede realizar un proceso de biorremediación eficiente (Cambarieri et al., 2021).

1.1.5 Aplicación de enmiendas orgánicas en procesos de biorremediación

Se denomina enmiendas orgánicas a las sustancias o mezclas de sustancias de carácter orgánico que se aplican a los suelos con el principal objetivo de mejorar sus propiedades físicas, químicas o biológicas (Cabrera Capitán, 2007). Existen diversos residuos orgánicos, generados a partir de actividades agrícolas o ganaderas, que pueden emplearse como enmiendas orgánicas (Vidal et al., 2018). Los residuos provenientes de las actividades pecuarias contienen compuestos orgánicos e inorgánicos que son fuente de nutrientes, como nitrógeno, fósforo y potasio (Delgado Arroyo et al., 2019).

El estiércol de cerdo está conformado por heces y orina mezclados con residuos y agua. La composición química depende de diversos factores, ya sea el alimenticio (cantidad suministrado, composición nutricional, calidad), animal (estado sanitario, edad, sexo, etapa fisiológica) y otros factores como la utilización o no de cama, su tipo, la mayor o menor incorporación de agua para limpieza, etc. Contiene nitrógeno (gran parte en forma orgánica), fósforo y potasio. Además de estos nutrientes contiene cantidades apreciables de elementos secundarios como calcio, magnesio, sodio, y oligoelementos como hierro, cobre y zinc (Moreno Ayala, 2019).

Por otra parte, el guano de gallina o gallinaza representa las heces producidas por las gallinas. De manera similar al estiércol, contiene fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro y zinc, entre otros elementos, y altas cantidades de nitrógeno (Restrepo Rivera, 2007).

Estiércoles y guanos pueden ser estabilizados mediante la técnica de compostaje (Campitelli, 2010), obteniéndose un compost biológicamente estable e inocuo, que puede aportar nutrientes, materia orgánica, humedad y microorganismos benéficos al ecosistema (Camacho Céspedes et al., 2018). El compostaje se trata de un proceso aeróbico controlado de transformación biológica que puede utilizar residuos orgánicos de distinta naturaleza (tanto de origen animal, vegetal o mineral) como material de partida y que requiere un grado de oxigenación y humedad adecuados (Brechelt, 2004; Delfrieri et al., 2005; Campitelli, 2010) (Figura 1.6). La presencia de oxígeno es imprescindible para que se desarrolle el proceso en condiciones aerobias, por lo que durante todo el proceso debe asegurarse la presencia del mismo.



Figura 1.6 Proceso de compostaje y factores intervinientes. Fuente: Barbaro, 2022.

La preparación de compost es una forma importante de reciclar elementos orgánicos residuales de la agricultura y la ganadería. Tiene como ventaja que el producto final es mucho más fácil de manejar que los estiércoles sin procesar (Figura 1.7).



Figura 1.7 Compost de estiércol de cerdo maduro. Fuente: Burba et al., 2020.

Además del compostaje, existe otra forma de procesar y transformar la materia orgánica, que se caracteriza por su corto período de elaboración. El producto de esta técnica se denomina Bocashi, y se caracteriza por ser un compost inmaduro, que posee materia orgánica y minerales sin transformar totalmente. El proceso de descomposición es más acelerado, consiguiéndose el producto final más rápido respecto del compost clásico (Brechelt, 2004; Mosquera et al., 2016). Este tipo de enmienda puede elaborarse con residuos vegetales y/o excretas animales. A diferencia del compost, puede realizarse en presencia y ausencia de oxígeno, involucrando en este último caso un proceso de fermentación láctica, dependiendo de los materiales y de las necesidades de cada situación en particular (Yugsi, 2011; Cárdenas et al., 2013). El Bocashi incorpora al suelo materia orgánica y nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre y boro; los cuales mejoran las condiciones físicas y químicas del suelo (Ramírez-Builes & Duque, 2010; Ramos Agüero & Terry Alfonso, 2014).

Se ha demostrado que las enmiendas orgánicas pueden emplearse para estimular la actividad microbiana en procesos de biorremediación de suelos (Pozzo Ardizzi, 2018), siendo una fuente económica de nutrientes (Agamuthu et al., 2013). La adición de enmiendas orgánicas a suelos contaminados produce un aumento del contenido de carbono y nutrientes, incrementa la retención de humedad, mejora el desarrollo microbiano y su actividad, y aumenta la sorción de los contaminantes orgánicos (Bastida et al., 2008; Li et al., 2009; Pozzo Ardizzi, 2018). Varios autores estudiaron los efectos de la aplicación de enmiendas orgánicas en procesos de biorremediación, obteniéndose resultados satisfactorios en numerosos casos. En diversas experiencias se encontró que el agregado de enmiendas orgánicas a suelos contaminados incrementa la degradación de hidrocarburos de petróleo (Gandolfi et al., 2010; Agamuthu et al., 2013; Cárdenas Moscol et al., 2017; Alanya de la Cruz et. Al, 2023). Asimismo, investigaciones realizadas por Ordaz y colaboradores (Ordaz et al., 2011) evidenciaron que la adición de una enmienda orgánica aumentó la oxigenación del suelo y estimuló a los microorganismos mediante el aporte de nutrientes, especialmente nitrógeno. En este sentido, Fernández y colaboradores (Fernández et al., 2009) aseguran que la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en suelos contaminados es más efectiva empleando estiércol como agente bioestimulante. La adición de enmiendas

orgánicas al suelo, optimiza la actividad microbiana, produciendo mayor degradación del petróleo respecto a los tratamientos convencionales de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Alvaro et al., 2014; Alvaro et al., 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General:

Estudiar la eficacia de la aplicación de enmiendas orgánicas (guano de gallina compostado, estiércol de cerdo compostado y bocashi) en el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos de la Patagonia Norte, a escala de laboratorio.

1.2.2 Específicos:

- Determinar las características fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas seleccionadas y del suelo contaminado con hidrocarburos empleado para la experiencia.
- Comparar el porcentaje de remoción de hidrocarburos totales de petróleo alcanzado a partir de la biorremediación de un suelo contaminado, con y sin agregado de las distintas enmiendas orgánicas seleccionadas.
- Aportar nuevos conocimientos que sirvan de base para el desarrollo de estrategias de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

1.3 HIPÓTESIS

En función de lo anteriormente expuesto, se plantea la hipótesis:

La utilización de enmiendas orgánicas, como guano de gallina compostado, estiércol de cerdo compostado y Bocashi, aumentarán la eficacia de las técnicas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la provincia de Neuquén, a escala de laboratorio, respecto del proceso de biorremediación sin agregado de enmiendas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SUELO

Las muestras de suelos contaminados empleadas para los ensayos de biorremediación fueron tomadas en dos yacimientos hidrocarburíferos diferentes denominados “A” y “B”, localizados en la Provincia del Neuquén. En los yacimientos, los suelos contaminados estaban dispuestos en forma de montículo sin cobertura vegetal. De cada montículo se colectaron porciones de diferentes puntos y profundidades seleccionadas aleatoriamente y se unificaron. Las mismas fueron tomadas con pala de mano y dispuestas en frascos de vidrio limpios de 360 cc con tapa axial metálica (Figura 2.1). Se mantuvieron refrigeradas en heladera en el laboratorio hasta el momento de su caracterización.

A los efectos de obtener una caracterización inicial de los suelos y poder seleccionar el más apropiado para la experiencia, se realizó la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) para ambas muestras, mediante cromatografía GC-FID en el Laboratorio de Cromatografía LIBIQUIMA-FaIn-UNCo. Se utilizó un cromatógrafo gaseoso marca Agilent modelo 6890A con detector FID. Para la extracción se empleó el método de referencia TNRCC 1005 modificado y para el análisis el método US EPA 8015D modificado.



Figura 2.1 Muestras de suelo de los yacimientos “A” y “B”.

En función de los resultados obtenidos, para para los ensayos de biorremediación, se seleccionó el suelo del yacimiento “B”. La decisión se basó en la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo del mismo (29.769 mg HTP/kg suelo) frente a la menor concentración encontrada para el suelo del yacimiento “A” (6.805 mg HTP/kg suelo), determinadas a partir de las muestras tomadas *in situ*.

El yacimiento “B” se encuentra ubicado en la Patagonia Norte, en la región este de la Provincia del Neuquén, involucrando parte de los ejidos urbanos de las ciudades de Plottier, Neuquén y Centenario (Figura 2.2).

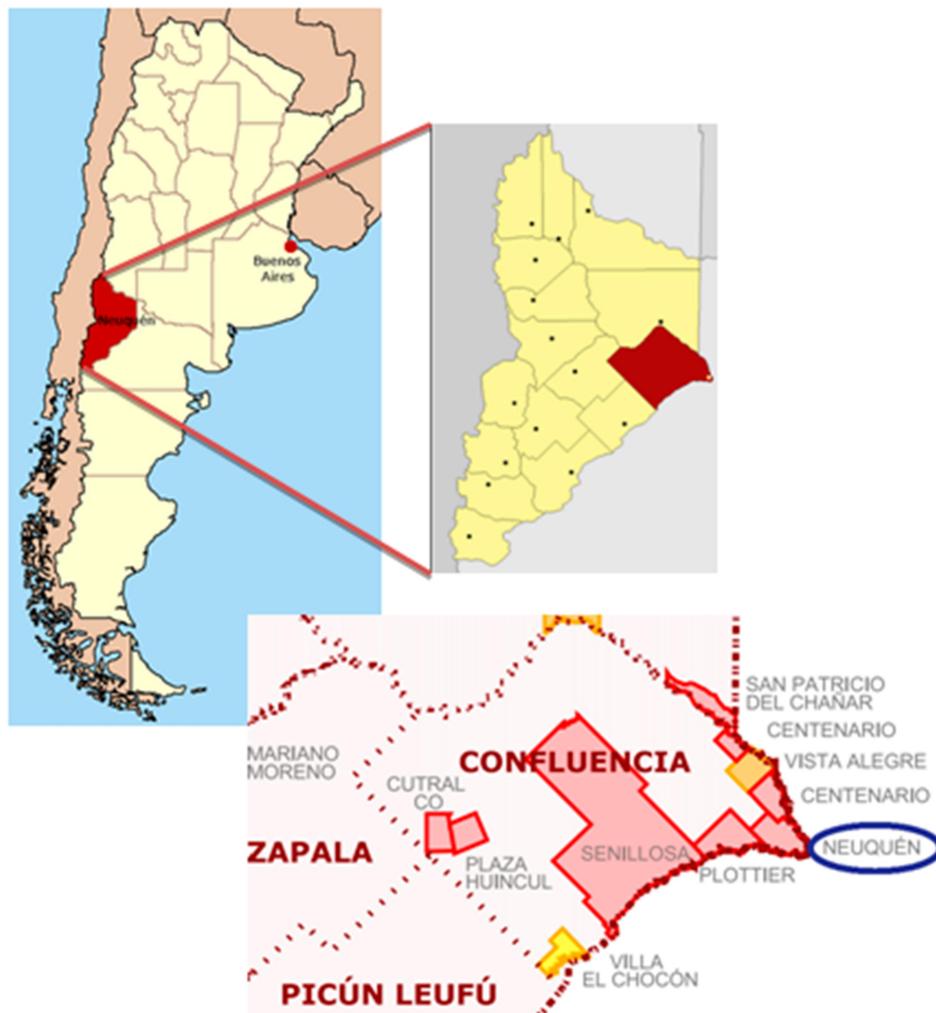


Figura 2.2 Mapa de ubicación de la región este de la provincia de Neuquén

Posterior a la selección del suelo, se procedió a recolectar el mismo del yacimiento de origen (Figuras 2.3 y 2.4), con fin de obtener una masa crítica (60 kg) para el ensayo de biorremediación en presencia y ausencia de enmiendas. Dado el volumen de suelo requerido, se recolectó la muestra con pala y se utilizaron bolsas de rafia para su traslado al laboratorio. Allí fue descargado en contenedor plástico de 100 L,

homogeneizado con pala y segregado manualmente, a los fines de retirar residuos dispersos (como nylon) y rocas de gran tamaño, pero manteniendo la estructura.



Figura 2.3 Sitio de extracción del suelo dentro del yacimiento “B”



Figura 2.4 Recolección del suelo en yacimiento “B”.

2.2 ENMIENDAS

Se trabajó con tres enmiendas orgánicas: guano de gallina compostado, composta de estiércol de cerdo y Bocashi, facilitadas por INTA IPAF Patagonia. El guano de gallina proviene del Establecimiento Avícola San Juan de la Ciudad de Plottier. La composta de estiércol fue elaborada por el Establecimiento de Producción Porcina de Claudio Fattorello, ubicado en Senillosa, a partir de material procedente de corrales, compuesto por rastrojo de maíz, pasto, orina y estiércol de cerdo. El Bocashi proviene de la Chacra de Ruth Rivera ubicada en el área rural de la Ciudad de Plottier (Figura 2.5), y se compone por residuo de una carbonería de Plottier, guano de gallina ponedora, semitín (subproducto de la molienda del grano de trigo), hojarasca de limpieza de canal de riego, residuo de hormiguero y bagazo deshidratado de cebada cervecera (proveniente de una cervecera local).



Figura 2.5 Elaboración de Bocashi en la chacra de Ruth Rivera

En la Figura 2.6 puede observarse la ubicación geográfica de los establecimientos donde fueron producidas las enmiendas seleccionadas.

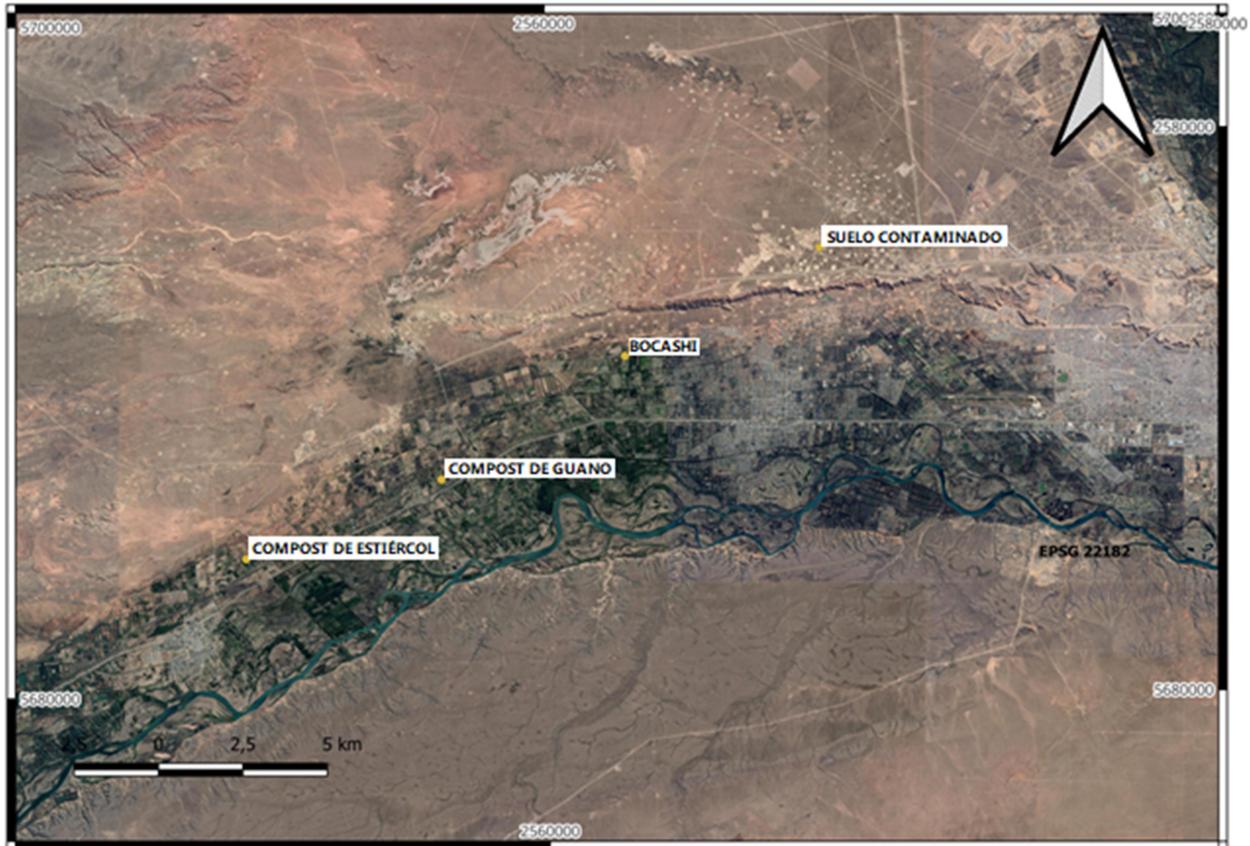


Figura 2.6 Zona de extracción del suelo y las enmiendas.

2.3 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y LAS ENMIENDAS

2.3.1 Análisis fisicoquímicos

Se realizó una caracterización fisicoquímica tanto el suelo como las enmiendas. La clase textural del suelo se determinó con el método del tacto, mediante la técnica propuesta por La Manna y colaboradores (La Manna et al., 2018, basada en Thien, 1979). Para ello, se tamizó una pequeña muestra de suelo (Figura 2.7), se tomó con las manos y se añadió agua destilada, intentando formar un cordón de aproximadamente 1 cm (Figura 2.8).



Figura 2.7 (izquierda): Tamización del suelo; Figura 2.8 (derecha): Determinación de la clase textural del suelo por método del tacto

Luego se llevó a cabo el procedimiento detallado en la Figura 2.9:

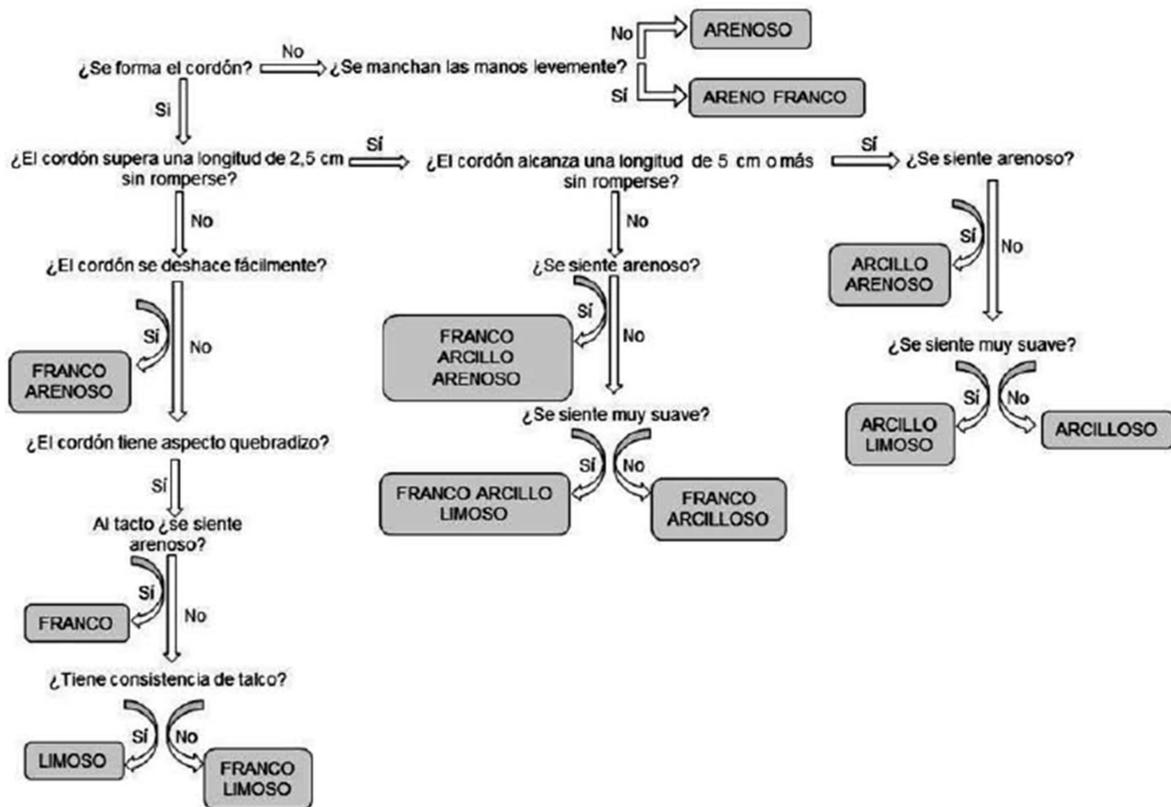


Figura 2.9 Diagrama para determinación de la clase textural del suelo, (La Manna et al., 2018, basado en Thien, 1979).

La medición de pH del suelo y las enmiendas fue realizada potenciométricamente en extracto 1:2,5 conforme lo propuesto por Paladino (Paladino, 2017) y por Acuña y colaboradores (Acuña et al., 2010). Para ello se realizó una suspensión de 10,0 g de material (suelo o enmienda tamizados) en 25,0 mL de agua destilada, se agitó en

agitador magnético por 10 minutos y se dejó decantar la solución por 10 minutos. Luego se realizó la medición con medidor de pH portátil con compensación automática de temperatura y electrodo de vidrio (Figura 2.10), previa calibración del mismo con soluciones de referencia de pH 4.00 y 7.00.

La capacidad de campo del suelo se determinó en laboratorio siguiendo la metodología indicada por Nápoles y colaboradores (Nápoles et al., 2015). Se dispuso una cantidad de suelo, previamente pesada y secada en estufa a 105°C hasta peso constante, sobre embudo con papel de filtro (previamente pesado), se saturó con agua destilada hasta aniego (Figura 2.11) y se pesó nuevamente al cesar el goteo.



Figura 2.10 (izquierda). Medición de pH sobre suspensión de suelo. Figura 2.11 (derecha). Ensayo para determinación de capacidad de campo.

Los análisis de metales pesados, conductividad, sales solubles, Potasio (K^+), Relación de Adsorción de Sodio (RAS), materia orgánica, nitrógeno total Kjeldahl (NTK), fósforo total y carbono orgánico total se realizaron en laboratorios contratados, siendo los mismos el Laboratorio de Servicios Agrarios y Forestales de Neuquén (LASAF), el Laboratorio IDAC de Análisis Industriales y el Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI). En la tabla 2.1 se detallan los métodos empleados por los laboratorios:

PARÁMETRO	MÉTODO EMPLEADO
NITRÓGENO TOTAL KJELDAHL (suma de nitrógeno orgánico, amoníaco (NH ₃) y amonio (NH ₄ ⁺))	IRAM-SAGyP 29572:2018. Determinación de nitrógeno en suelo por el método Kjeldahl modificado.
FÓSFORO EXTRACTABLE	Método Olsen, Análisis no reductivo, PROMAR-SAMLA
ZINC TOTAL	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), previa digestión por microondas. Basado en método EPA 3050 A; EPA 3050 B; EPA 3051 A.
BARIO TOTAL	
CADMIO TOTAL	
CROMO TOTAL	
ARSÉNICO TOTAL	
PLOMO TOTAL	
MERCURIO TOTAL	
NÍQUEL TOTAL	
SELENIO TOTAL	
VANADIO TOTAL	
PLATA TOTAL	
CONDUCTIVIDAD	
CARBONO ORGÁNICO	Norma IRAM SAGPyA 29571-1. Determinación de carbono orgánico. Método de Walkley y Black
POTASIO INTERCAMBIABLE (K ⁺)	Extracción por IRAM-SAGyP 29577-1 y lectura en método fotométrico de emisión de llama
SALES SOLUBLES	Métodos titulométricos, argentométricos y fotométricos de emisión de llama

Tabla 2.1 Parámetros analizados y métodos empleados por los laboratorios externos

2.3.2 Cuantificación de la población microbiana

Se llevó a cabo una determinación cuantitativa de las bacterias heterótrofas totales tanto para el suelo como para las enmiendas. Se realizó un recuento en placa, por la técnica de diseminación en superficie, a partir de una suspensión de 10,0 g de muestra en 90 mL de agua destilada estéril, agitada durante 30 minutos (Figura 2.12). Se utilizó como medio de cultivo R2A (extracto de levadura 0,5 g; peptona proteasa 0,5 g; casamino ácido 0,5 g; glucosa 0,5 g; almidón 0,5 g; piruvato de sodio 0,3 g; K₂HPO₄ 0,3 g; MgSO₄·7H₂O 0,05 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL). Se sembraron las placas por duplicado, con distintas diluciones seriadas 1:10 de las suspensiones y se incubaron en estufa durante 7 días a 28°C. Luego se seleccionaron las placas de las diluciones que contenían un número de colonias entre 30 a 300 y se realizó el recuento con lupa (Figura 2.13).



Figura 2.12 (izquierda). Preparación de suspensión de suelo. Figura 2.13 (derecha). Recuento en placa con lupa.

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó la experiencia de biorremediación del suelo contaminado a escala de laboratorio, a través de la estrategia de bioestimulación de los microorganismos autóctonos presentes, con el agregado de las tres enmiendas orgánicas descritas anteriormente. De esta forma se consideraron tres tratamientos más un control (suelo contaminado sin agregado de enmienda). Tanto para los tratamientos como para el control se realizaron tres réplicas, es decir, se trabajó con un diseño 4x3.

Las experiencias se llevaron a cabo en recipientes abiertos y calados, provistos de una malla plástica, para contener el material y a su vez permitir la circulación del aire (Figura 2.14). En cada recipiente se colocaron 5,0 kg del suelo contaminado.



Figura 2.14 Unidades experimentales del ensayo de biorremediación.

La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se realizó de forma completamente aleatoria, y cada recipiente fue debidamente identificado (Figura 2.15).



Figura 2.15 Esquema ilustrativo de la ubicación de las unidades experimentales. Ref: CTL: suelo, control sin enmienda; S+GG: suelo + guano de gallina compostado; S+EC: suelo + estiércol de cerdo compostado; S+BOC: suelo + bocashi.

La masa de cada una de las enmiendas incorporadas a los tratamientos (Tabla 2.I) se determinó en función de la concentración de carbono orgánico y nitrógeno total Kjeldahl del suelo contaminado y de cada una de las enmiendas (determinadas en laboratorio, sección 2.3.1), con el fin de obtener una relación de C:N:P de 100:2,5:0,5, recomendada para este tipo de suelos (Cambarieri et al., 2021).

Tratamiento	Suelo	Enmienda
CTL repeticiones 1-2-3	5.0 kg	sin enmienda
S+GG repeticiones 4-5-6	5.0 kg	113 g de guano de gallina compostado
S+EC repeticiones 7-8-9	5.0 kg	198 g de estiércol de cerdo compostado
S+BOC repeticiones 10-11-12	5.0 kg	157 g de Bocashi

Tabla 2.II Composición de los tratamientos

Para la obtención de muestras de cada unidad experimental se realizaron muestreos compuestos sistemáticos tipo estrella (Alvaro et al., 2014), que consistieron en tomar una submuestra de cada extremo y una del centro de cada recipiente con pala de mano, evitando la contaminación cruzada entre tratamientos. Estas submuestras se homogeneizaron y se conformaron muestras compuestas representativas de cada

tratamiento. Las mismas se almacenaron en recipientes de vidrio con tapa (Figura 2.16 A y B) y se resguardaron en condiciones óptimas hasta su análisis.



Figura 2.16 A y B Toma de muestras de los tratamientos.

2.5 ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN

2.5.1 Aireación y homogeneización

Con el uso de una pala y rastrillo de mano se realizó semanalmente el volteo y mezcla del material contenido en cada recipiente, a fin de asegurar la incorporación de oxígeno al proceso y una completa homogeneización. El tiempo de mezcla para cada recipiente se estandarizó a un minuto y medio, intentando mantener constante la velocidad de movimiento. Se evitó la contaminación cruzada entre las unidades experimentales durante el proceso, asegurando la correcta limpieza de los elementos utilizados al pasar de un tratamiento a otro.

2.5.2 Control de temperatura

Cada 20 días se midió la temperatura ambiente con termómetro de mercurio y la temperatura a cada tratamiento utilizando un termómetro digital de punción, realizando la limpieza del mismo entre cada medición.

2.5.3 Control de humedad

El control de humedad de cada unidad experimental se realizó cada 20 días, previo a la humectación de cada sistema y posterior a la etapa de homogeneización. Para ello, se tomó una muestra de cada unidad, se pesó una cantidad de material (entre

15 y 20 g) en un vaso de precipitados, y se llevó a estufa a 105 °C durante 24 horas (Figura 2.17). Luego de este período de tiempo se procedió a pesar nuevamente cada vaso una vez alcanzada la temperatura ambiente. Finalmente, por diferencia de masas se realizó el cálculo de la humedad gravimétrica y del volumen de agua necesario para alcanzar una humedad del 15% (p/p) en cada tratamiento, conforme el rango óptimo indicado para suelos contaminados con hidrocarburos (Cambarieri et al., 2021). Semanalmente se incorporó la cantidad de agua potable requerida a cada tratamiento.



Figura 2.17 Secado de suelo en estufa para determinación de humedad gravimétrica

2.5.4 Determinación del pH

La determinación del pH se realizó según el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1 para cada unidad experimental. Los registros se realizaron cada 20 días a partir de una muestra compuesta, conforme la metodología de muestreo expuesta en el apartado 2.4.

2.5.5 Cuantificación de Bacterias Heterótrofas Totales (BHT)

Se tomó una muestra compuesta de cada unidad experimental, conforme la metodología de muestreo expuesta en el apartado 2.4, cada 20 días. Luego se realizó la determinación de BHT de cada una, conforme la metodología descrita en el apartado 2.3.2.

2.5.6 Análisis de Hidrocarburos Totales del Petróleo

Para la experiencia de biorremediación, se utilizó el método US EPA 418.1 modificado, debido a que permite la determinación rápida y sencilla de hidrocarburos por espectroscopía infrarroja (IR), siendo uno de los métodos más utilizados para la determinación de HTP (Pons-Jiménez et al., 2011).

Para el análisis de HTP se realizó la extracción de los compuestos de interés (hidrocarburos) de la muestra y la posterior limpieza del extracto (clean-up) con sílica gel, para eliminar la posible presencia de grasas y aceites, previo a la lectura por espectroscopía infrarroja.

2.5.6.1 Método de extracción

En una primera etapa, se tomaron 10,0 g de muestra tamizada y se realizó una extracción de HTP con tetracloroetileno (C_2Cl_4) calidad espectroscópico. Se agitó en mezclador de vórtice durante 2 minutos y luego en agitador orbital durante 30 minutos más. Se dejó decantar durante una hora y se extrajo el sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio (Figura 2.18 A y B).



Figura 2.18 A y B Preparación de extractos para determinación de HTP

2.5.6.2 Optimización de etapa de clean-up

Se realizó una prueba para determinar la cantidad óptima de sílica gel a utilizarse en la etapa de clean-up, considerando el aporte de materia orgánica incorporada al suelo. En primer lugar, se realizó la extracción conforme el procedimiento descrito en la sección 3.5.6.1 para 0,226 g de guano de gallina, 0,314 g de estiércol de cerdo y 0,396 g de Bocashi, por sextuplicado, con un total de 18 soluciones. Estas masas son relativas al contenido de enmienda en 10,0 g de suelo para los distintos tratamientos. A cada uno de estos extractos se les realizó el clean-up variando la masa de adsorbente utilizado. Para ello se añadieron cantidades 0,30; 1,00 y 3,00 g de sílica gel (100-200 mesh, grado Davidson 923, secada en estufa previamente a 120 °C), se agitaron durante 5 minutos y se filtraron en embudo con lana de vidrio (Figura 2.19 A y B).



Figura 2.19 A y B. Realización de clean-up de los extractos

El detalle de las soluciones y su concentración se indica en la Figura 2.20:

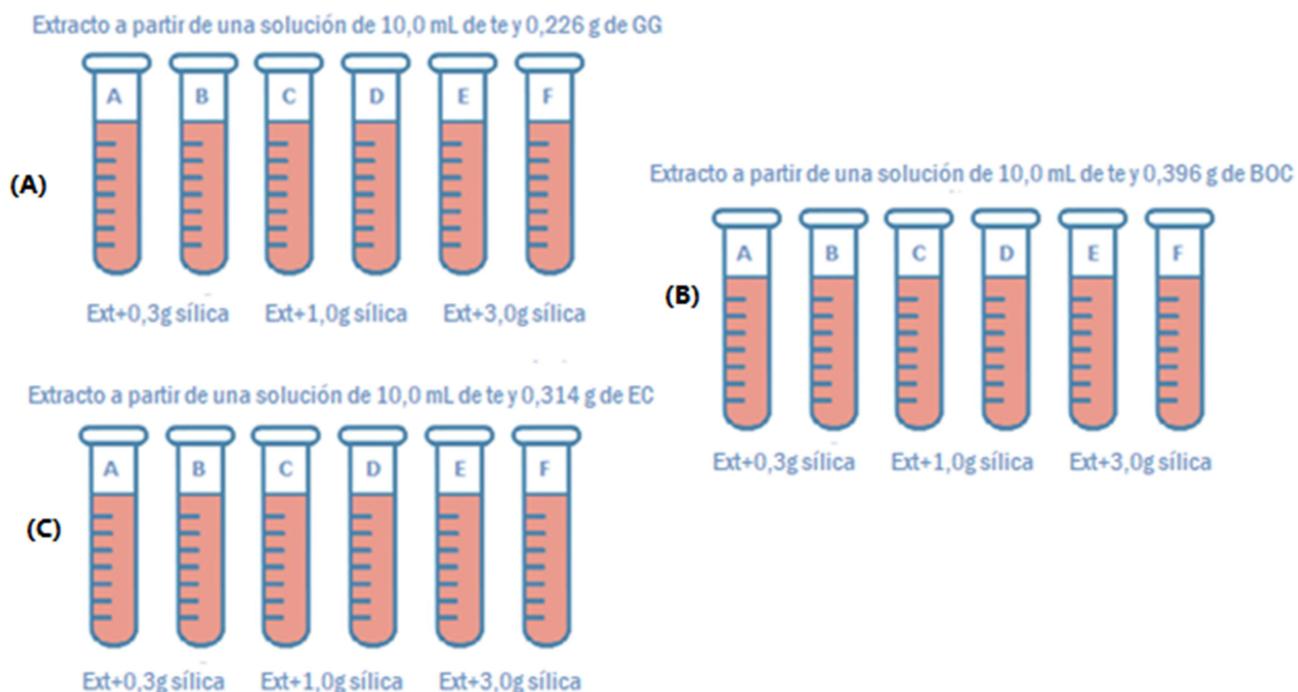


Figura 2.20 Extractos realizados para la prueba de aporte de enmiendas a partir de: A) guano de gallina compostado (GG); B) Bocashi (BOC) y c) estiércol de cerdo compostado (EC)

2.5.6.3 Cuantificación de HTP por espectroscopía infrarroja

La cuantificación de HTP se realizó mediante curvas de calibración realizadas con soluciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm de HTP y 300, 450, 600 y 750 ppm de HTP. Estas soluciones se prepararon a partir de una solución madre de referencia de hexadecano ($C_{16}H_{34}$), iso-octano (C_8H_{18}) y clorobenceno (C_6H_5Cl) de 4140,0 mg HTP/L.

Las lecturas de la curva de calibración como de las muestras y todas las pruebas subyacentes se realizaron con un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) marca Shimatsu modelo IRTracer-100, utilizando una celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico y el software LabSolutions (Figura 2.21), empleando una resolución de 4 cm^{-1} , un número de onda ($\tilde{\nu}$) en un rango de 2.700 a 3.200 cm^{-1} ($3,1$ - $3,7\text{ }\mu\text{m}$ de longitud de onda λ) y 45 escaneos. Las señales fueron tomadas a $\tilde{\nu} = 2930\text{ cm}^{-1}$ la cual es característica de la vibración de estiramiento C-H asimétrico de los grupos metileno (Comeseña García et al., 2020), y $\tilde{\nu} = 2960\text{ cm}^{-1}$, asociada al estiramiento C-H simétrico y asimétrico de los grupos metilo (Támara & Reyes, 2015).

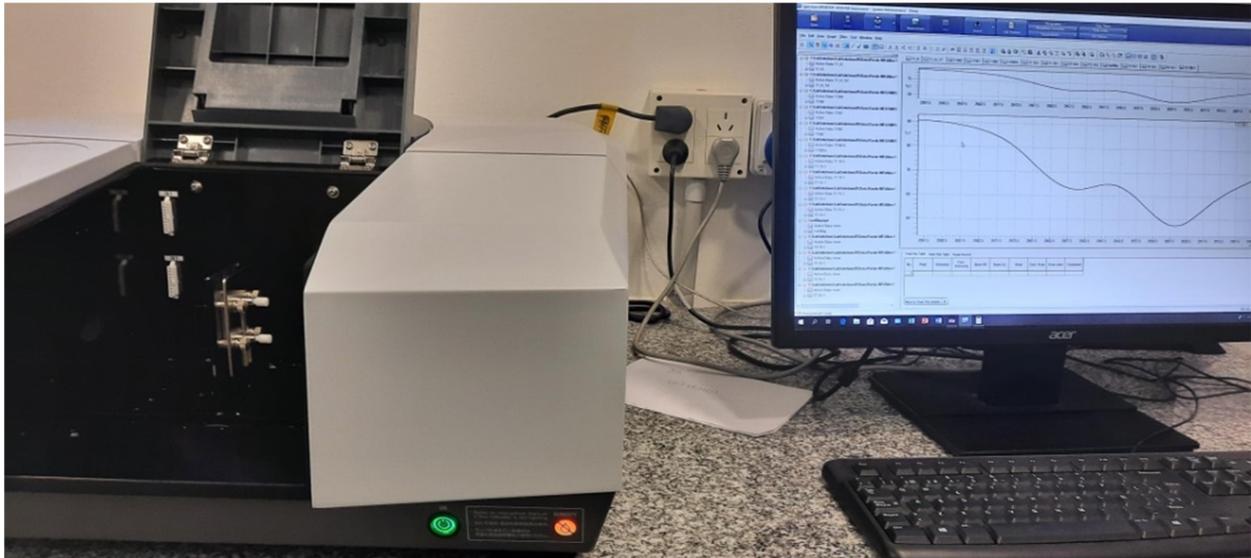


Figura 2.21 Espectrofotómetro FT-IR y software empleado.

Luego se realizó el clean-up de las diluciones a partir del agregado de sílica gel y posterior filtrado con lana de vidrio y se llevó a cabo nuevamente la lectura en el equipo infrarrojo. A partir de la regresión lineal de los datos se obtuvieron las curvas de calibración de 0 a 300 ppm y de 300 a 750 ppm de HTP, con y sin clean-up.

En cuanto a la experiencia de biorremediación, cada 20 días se tomó una muestra compuesta de cada unidad experimental, conforme la metodología de muestreo expuesta en el apartado 2.4. Para cada muestra se realizó la extracción de los HTP, y el clean-up de los extractos, conforme los procedimientos descritos precedentemente. Se realizaron las diluciones necesarias y se procedió a la lectura de la absorbancia de las muestras en FT-IR y cálculo de la concentración de HTP.

2.5.6.4 Cálculo del porcentaje de remoción de HTP

Para obtener datos más representativos de la eficacia del agregado de enmiendas, se calculó la remoción de hidrocarburos de la siguiente forma:

$$\% R_{HTP_{ik}} = \left(1 - \frac{C_{HTP(T_{ik})}}{C_{HTP(T_{i0})}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo $\%R_{HTP_{ik}}$ el porcentaje de remoción de hidrocarburos totales de petróleo para el tratamiento T_i en el tiempo t_k , $C_{HTP(T_{ik})}$ la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo del tratamiento T_i en el tiempo t_k , y $C_{HTP(T_{i0})}$ la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo del tratamiento T_i en el tiempo t_0 .

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de las variables pH, concentración de HTP, porcentaje de remoción de HTP y BHT se trabajaron como el promedio de las réplicas.

La representación gráfica de los datos se realizó mediante los programas OriginPro y R, y la regresión lineal de los datos de curvas de calibración con Microsoft Excel.

El análisis estadístico de los datos se efectuó empleando software R versión 4.2.2. La modelación se llevó a cabo por medio del uso de los Modelos Lineales Generales (ML) Mixtos y Modelos Lineales Generalizados (MLG) Mixtos. Los ML se basan en el análisis de relaciones lineales entre cierta variable de interés (la variable respuesta) y ciertas variables de control que contribuyen a explicar su comportamiento (variables explicativas). En cambio, los MLG permiten considerar distribuciones para la variable respuesta entre aquellas que pertenecen a la familia de distribuciones exponenciales de un parámetro (Dobson, 2002), por lo que brindan la posibilidad de analizar datos donde la variable respuesta tiene una distribución Poisson, Binomial, Bionomial Negativa o Gamma, entre otras. Estos permiten contemplar la falta de cumplimiento de los supuestos tradicionales y modelar, de manera flexible, complicadas estructuras de datos, así como luego poder realizar comparaciones entre distintos modelos. Por otra parte, el procedimiento de modelos mixtos amplía el modelo de manera que los datos puedan presentar variabilidad correlacionada y no constante. El modelo lineal mixto proporciona, por tanto, la flexibilidad necesaria para modelar no sólo las medias sino también las varianzas y covarianzas de los datos (Correa Morales & Salazar Uribe, 2016).

Para el caso del parámetro BHT y debido a que la naturaleza de la variable respuesta es un conteo (cantidad de UFC), se decidió trabajar en primer lugar un MLG Mixto con distribución Poisson (Agresti, 2007), en función de las variables explicativas: tipo de enmienda y tiempo de medición (como efecto aleatorio). En cuanto a la concentración de HTP y %R de hidrocarburos como variables respuesta y debido a su naturaleza, se eligieron modelos lineales generales mixtos en función del tipo de enmienda y el tiempo de medición (como efecto aleatorio). Para la selección de los modelos que mejor ajusten los datos se utilizaron los siguientes criterios (Barnett et al., 2009):

- El Criterio de Información de Akaike (AIC): es una medida de la bondad de ajuste de los modelos estadísticos. Proporciona un medio de comparación entre modelos de una misma distribución, para seleccionar el que mejor se ajuste a los datos, siendo éste aquel que tenga menor valor de AIC.
- La relación entre la devianza residual y los grados de libertad: la devianza es una medida de la bondad de ajuste de los modelos lineales generalizados. En una distribución Poisson, la media y la varianza son iguales. Pero cuando se trabaja con recuentos suele ocurrir que, por la heterogeneidad de las observaciones, la varianza es mayor que la media. Si el cociente entre la devianza residual y los grados de libertad es mayor a 1, es indicio de que hay sobredispersión, y que hay que utilizar otra distribución para ajustar los datos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y LAS ENMIENDAS

Como se mencionó en el apartado anterior, de manera previa al ensayo de biorremediación se determinaron las características fisicoquímicas del suelo y de las enmiendas orgánicas seleccionadas (Tabla 3.1). Del análisis fisicoquímico del suelo se observa que posee un bajo contenido de carbono orgánico (CO=31,2 g/kg) y nitrógeno total Kjeldahl (NTK=0,3 g/kg). En cuanto al pH, se obtuvo un valor de 8,21, asociado a un suelo alcalino. La conductividad eléctrica medida en el extracto de saturación indica suelo ligeramente salino. Para el caso de las enmiendas, se encontró que las mismas contienen mayores porcentajes de materia orgánica y nitrógeno que el suelo, así como mayores concentraciones de fósforo para el caso del guano de gallina y del estiércol de cerdo (Tabla 3.1).

	NTK (g/kg)	CO (g/kg)	Fósforo extractable (mg/kg)	pH	Conductividad (dS/m)
Suelo	0,3	31,2	4,41	8,21	6,46
Compost de Guano de Gallina (GG)	23,3	79,9	6,89	9,51	24,13
Compost de Estiércol de Cerdo (EC)	16,2	35,4	5,66	7,12	38,03
Bocashi (BOC)	19,9	311,0	0,90	8,59	3,60

Tabla 3.1 Caracterización inicial de suelo y enmiendas

En el Análisis de Componentes Principales (Figura 3.1) se observa un resumen de las medidas de la Tabla 3.1. El Bocashi muestra las mayores concentraciones de CO y menores de conductividad y pH, contrariamente a las enmiendas de estiércol de cerdo compostado y guano de gallina compostado que poseen mayor conductividad y pH, y menor concentración de CO en comparación con el Bocashi. Por otra parte, el suelo presenta valores medios de conductividad y pH, y las concentraciones más bajas de CO y NTK en comparación con las enmiendas testeadas.

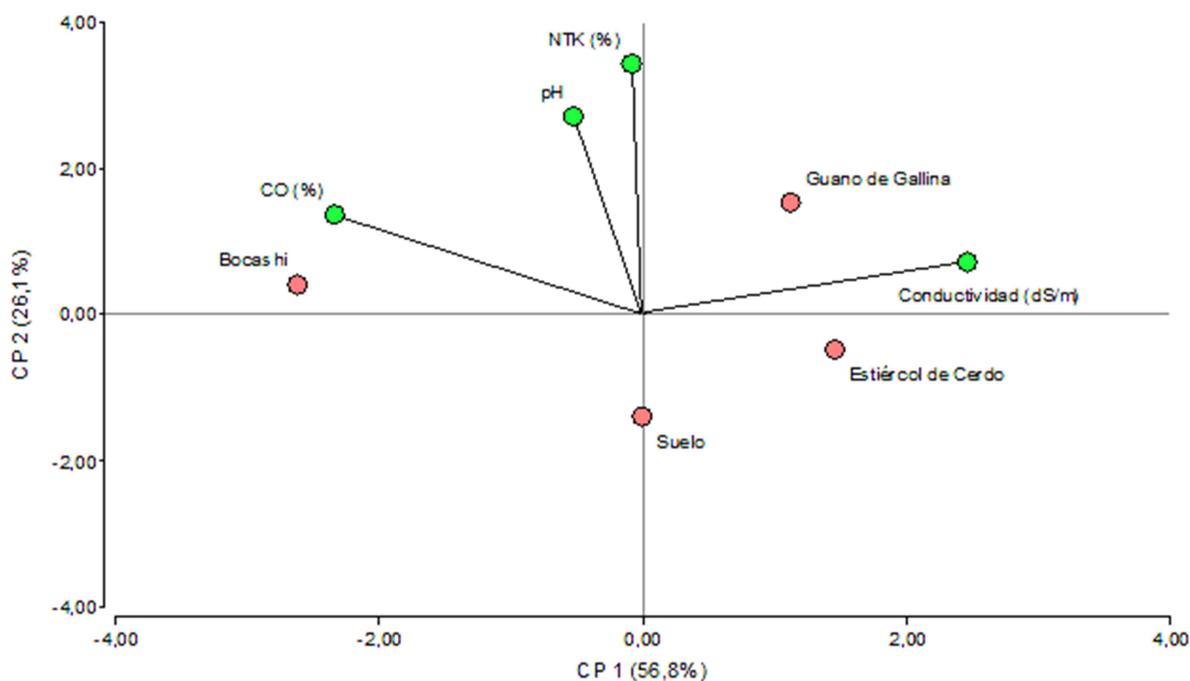


Figura 3.1 Análisis de componentes principales para la caracterización de suelo y enmiendas

El suelo fue clasificado texturalmente como franco-arcillo-arenoso. En la Tabla 3.II se presentan resultados adicionales a la caracterización inicial del suelo.

Parámetro	Valor	
Capacidad de campo (% p/p)	46,38	
RAS	6,92	
K ⁺ (mg/kg)	245,70	
	CO ₃ ²⁻	ND
	HCO ₃ ⁻	2,01
Sales solubles (meq/L)	Cl ⁻	54,01
	Na ⁺	30,59
	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	39,05

Tabla 3.II Caracterización inicial del suelo

En cuanto a los metales y metaloides, se detectaron concentraciones cuantificables de bario, cromo, plomo y vanadio en el suelo (Tabla 3.III), con valores por debajo de los límites establecidos en la legislación vigente (Ley Provincial N° 1875, Decreto 2263/15, Tabla 1- Niveles Guía de Calidad de Suelos) para suelos de uso agrícola, residencial e industrial.

Parámetro	Valor (mg/kg)
ZINC TOTAL	<LC=100
BARIO TOTAL	136
CADMIO TOTAL	ND
CROMO TOTAL	12
ARSÉNICO TOTAL	<LC=3
PLOMO TOTAL	9,1
MERCURIO TOTAL	ND
NÍQUEL TOTAL	ND
SELENIO TOTAL	<LC=1
VANADIO TOTAL	52
PLATA TOTAL	ND

Tabla 3.III Análisis de metales y metaloides en suelo

Los resultados del recuento inicial de bacterias heterótrofas obtenidos para el suelo y las enmiendas pueden observarse en la Tabla 3.IV.

	BHT (UFC/g)
Suelo	1,5E+07
Guano de gallina	6,9E+06
Estiércol de cerdo	8,0E+05
Bocashi	2,6E+07

Tabla 3.IV Recuento inicial de bacterias heterótrofas totales

Se advierte que el suelo contaba inicialmente con un número de microorganismos heterótrofos totales por encima del valor mínimo de referencia (10^5 a 10^6 UFC/g de suelo) para llevar a cabo el tratamiento de biorremediación (Pozzo Ardizzi, 2018).

3.2 ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN

La experiencia de biorremediación tuvo una duración total de 102 días partir del armado de los microcosmos para cada uno de los tratamientos: suelo con agregado de guano de gallina compostado (S+GG), suelo con agregado de estiércol de cerdo compostado (S+EC), suelo con agregado de Bocashi (S+BOC) y control sin enmienda (CTL). Durante la misma, se tomaron muestras de todas las unidades

experimentales al comenzar el ensayo (t_0) y a los 20, 42, 62, 82 y 102 días luego del comienzo (t_1 a t_5).

3.2.1 Control de temperatura

A lo largo del ensayo, la temperatura de cada una de las unidades experimentales evaluadas se mantuvo en $22 \pm 3^\circ\text{C}$, dentro del rango de temperatura de 15 a 45°C , adecuado para un proceso de biorremediación (Pozzo Ardizzi, 2018). Se encuentra que es posible realizar una biodegradación eficiente con temperaturas menores a 25°C (Acuña et al., 2012).

3.2.2 Determinación del pH

El pH se mantuvo dentro del rango de 7 a 9 en todos los tratamientos ($8,03 \pm 0,58$), encontrándose valores menores de pH en los tratamientos de suelo con agregado de enmiendas frente al control, como puede observarse en la Figura 3.2:

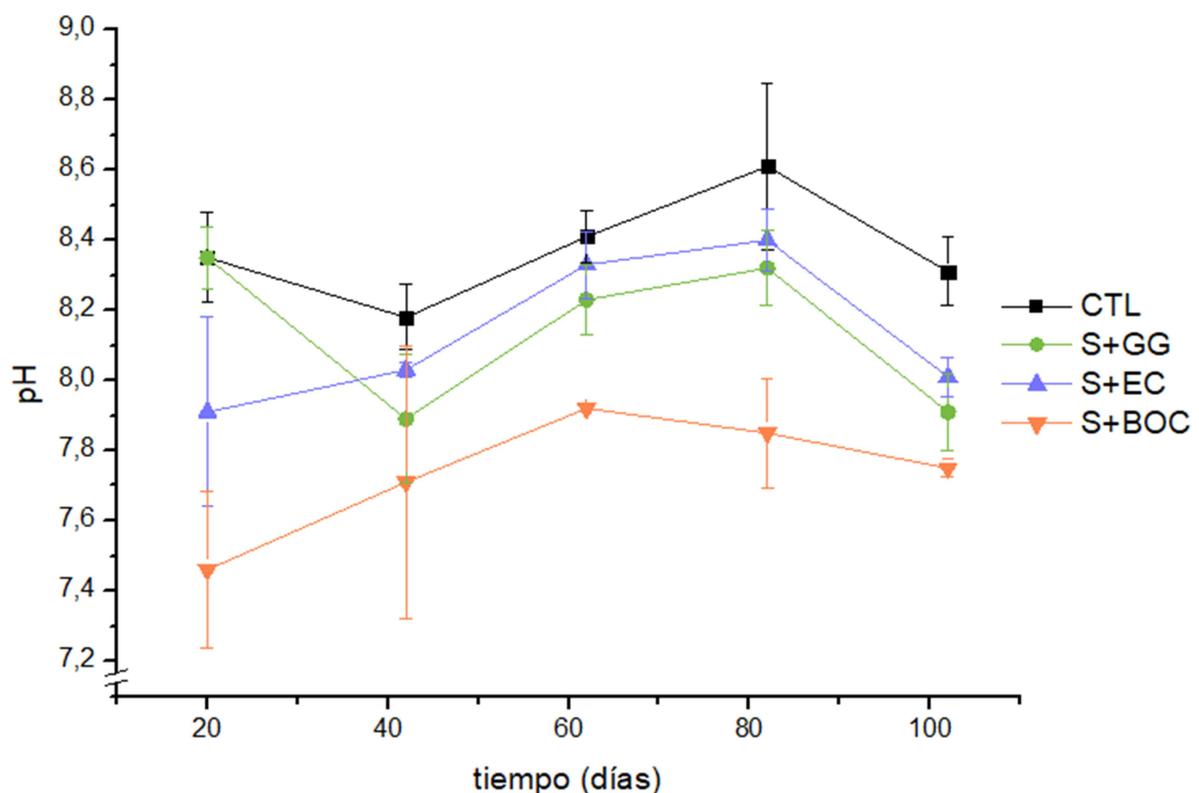


Figura 3.2 Evolución del pH de los tratamientos durante la biorremediación.

En términos generales, el pH óptimo para la biodegradación es neutro (6-8), coincidente con el rango óptimo para el crecimiento de las bacterias heterótrofas. Al haberse empleado para la experiencia un suelo ligeramente alcalino ($\text{pH}=8,21$) se

optó por no realizar una corrección del pH en los tratamientos, dado que los valores registrados fueron compatibles con la viabilidad de los microorganismos y se mantuvieron cercanos al pH inicial del suelo, al que se supone que los microorganismos ya se encontraban adaptados.

3.2.3 Cuantificación de bacterias heterótrofas totales (BHT)

Respecto de los recuentos de BHT realizados a las muestras tomadas a los 20, 42, 62, 82 y 102 días, se advierte que para todos los tratamientos evaluados el comportamiento fue similar (Figura 3.3), observándose un incremento de la población microbiana luego de los 60 días. Durante todo el ensayo la cantidad de BHT se mantuvo por encima del valor mínimo de referencia para llevar a cabo el tratamiento de biorremediación en todos los tratamientos. Al final de la experiencia se alcanzaron valores máximos y mínimos de BHT de $1,37 \times 10^{10}$ y $1,55 \times 10^9$ UFC/g respectivamente.

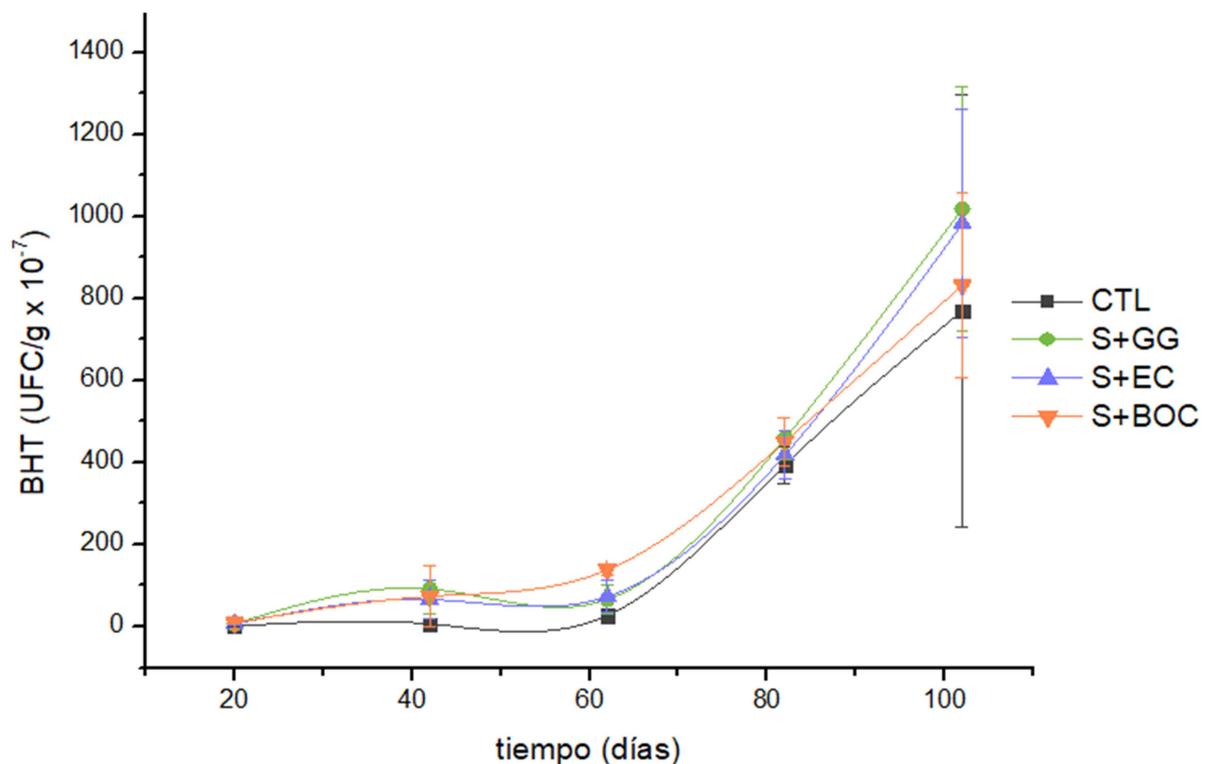


Figura 3.3 Recuento de bacterias heterótrofas totales durante la biorremediación

Se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando un MLG mixto, con el tiempo como factor aleatorio. En primer lugar se había seleccionado una distribución tipo Poisson pero se obtuvo un cociente entre la deviance residual y los grados de libertad de 1,3, por lo que se trabajó con una distribución binomial negativa

(AIC=664,280). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de bacterias heterótrofas totales de los tratamientos a lo largo de la experiencia (Figura 3.4).

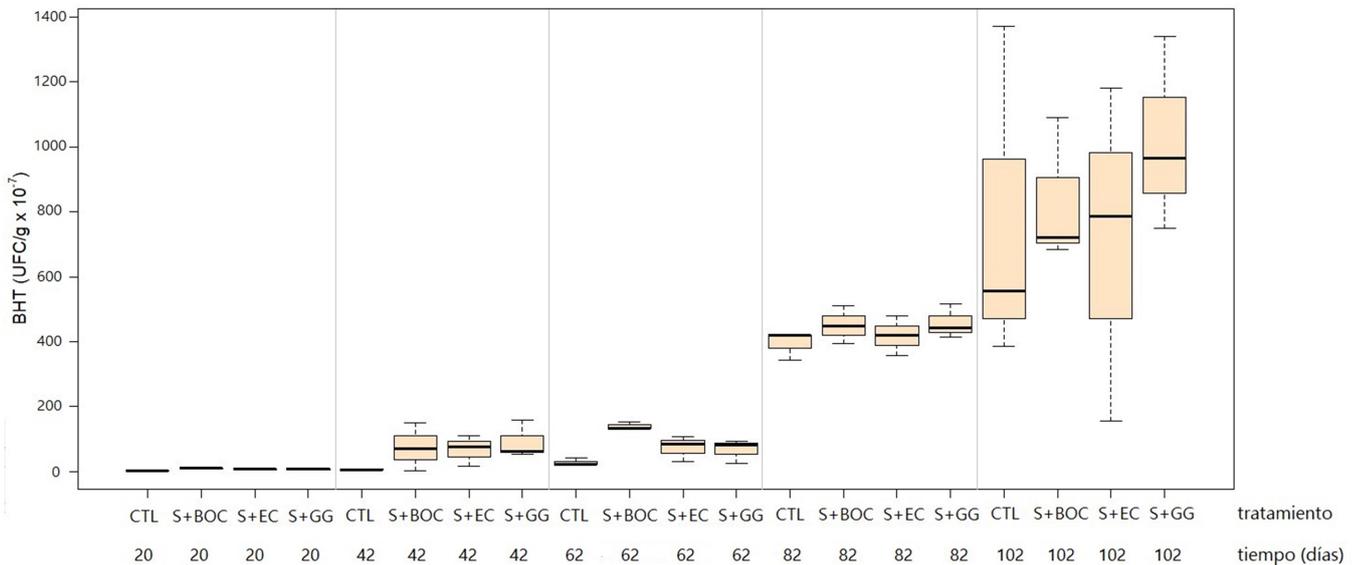


Figura 3.4 Comparación de la cantidad de BHT en los tratamientos durante la experiencia

3.2.4 Análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo

3.2.4.1 Optimización de etapa de clean-up

De la prueba inicial de enmiendas (sin adición de suelo) y sílica, se encontró que para agregados de sílica gel de 1,0 y 3,0 g en la etapa de clean-up se dificulta realizar la posterior extracción del sobrenadante. En las muestras con agregado de 3,0 g de sílica gel no se pudo realizar un clean-up eficiente. En las muestras con agregado de 1,0 g de sílica se pudo realizar el clean-up pero se redujo considerablemente el volumen del extracto. En las muestras en las que se realizó un agregado de 0,3 g de sílica gel pudo realizarse el clean-up de las muestras sin dificultades. Asimismo, se determinó el aporte de cada una de las soluciones de solvente y enmiendas a la señal del equipo FT-IR.

Se observó que para las soluciones de estiércol de cerdo, no hay diferencias entre las absorbancias medidas luego de realizar el clean-up con 0,3 g y 1,0 g de sílica gel (Figura 3.5).

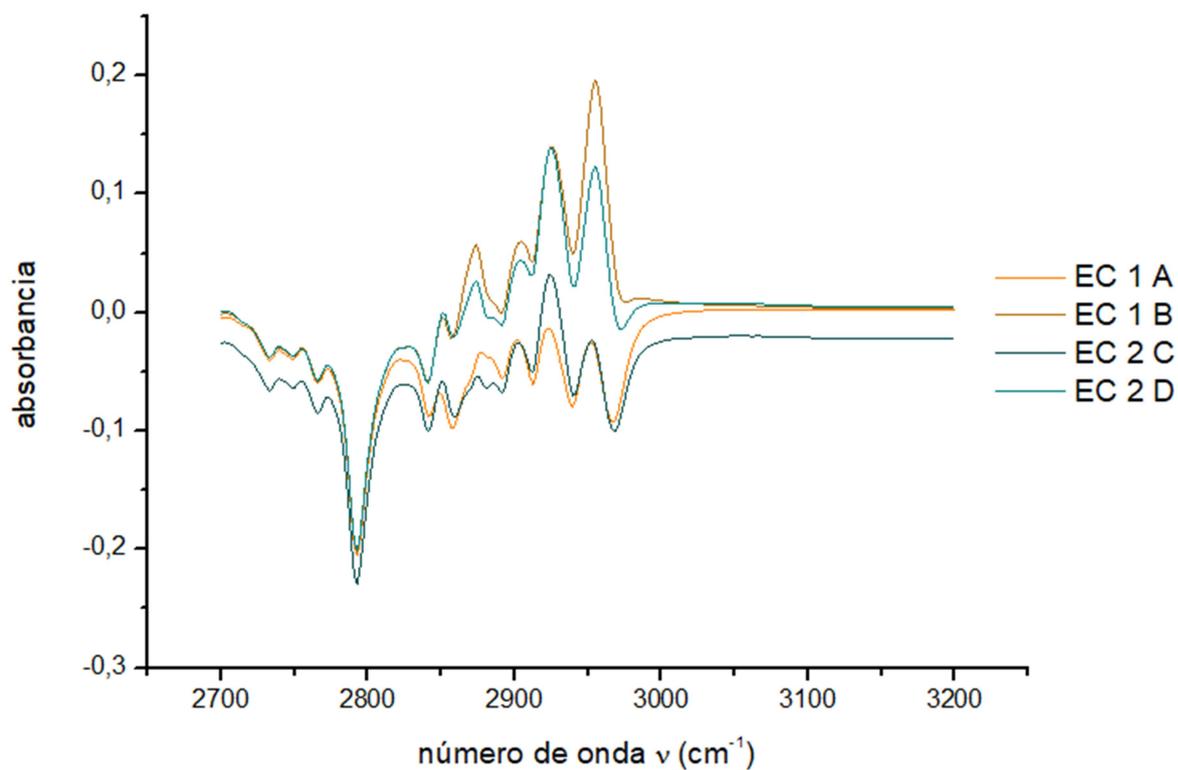


Figura 3.5 Espectros IR del ensayo de estiércol de cerdo compostado (EC) y sílica. EC 1 A y B: con agregado de 0,3 g de sílica gel; EC 2 C y D: con agregado de 1,0 g de sílica gel.

En cambio, para las soluciones de guano de gallina y Bocashi se advierte un aporte a la señal para las diluciones en las que se realizó el clean-up con 1,0 g de sílica gel, en comparación con las que se llevó a cabo con 0,3 g (Figuras 3.6 y 3.7). Los espectros IR de las pruebas con agregado de 0,3 g de sílica para todas las enmiendas se exhiben en la Figura 3.8.

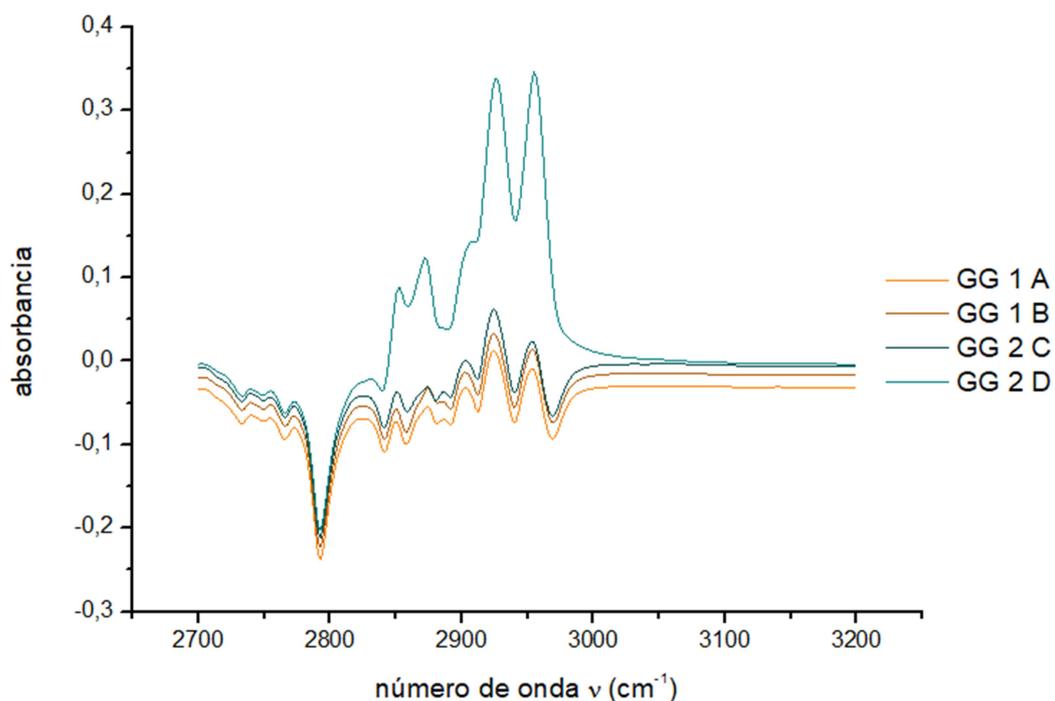


Figura 3.6 Espectros IR del ensayo de guano de gallina compostado (GG) y sílica. GG 1 A y B: con agregado de 0,3 g de sílica gel; GG 2 C y D: con agregado de 1,0 g de sílica gel.

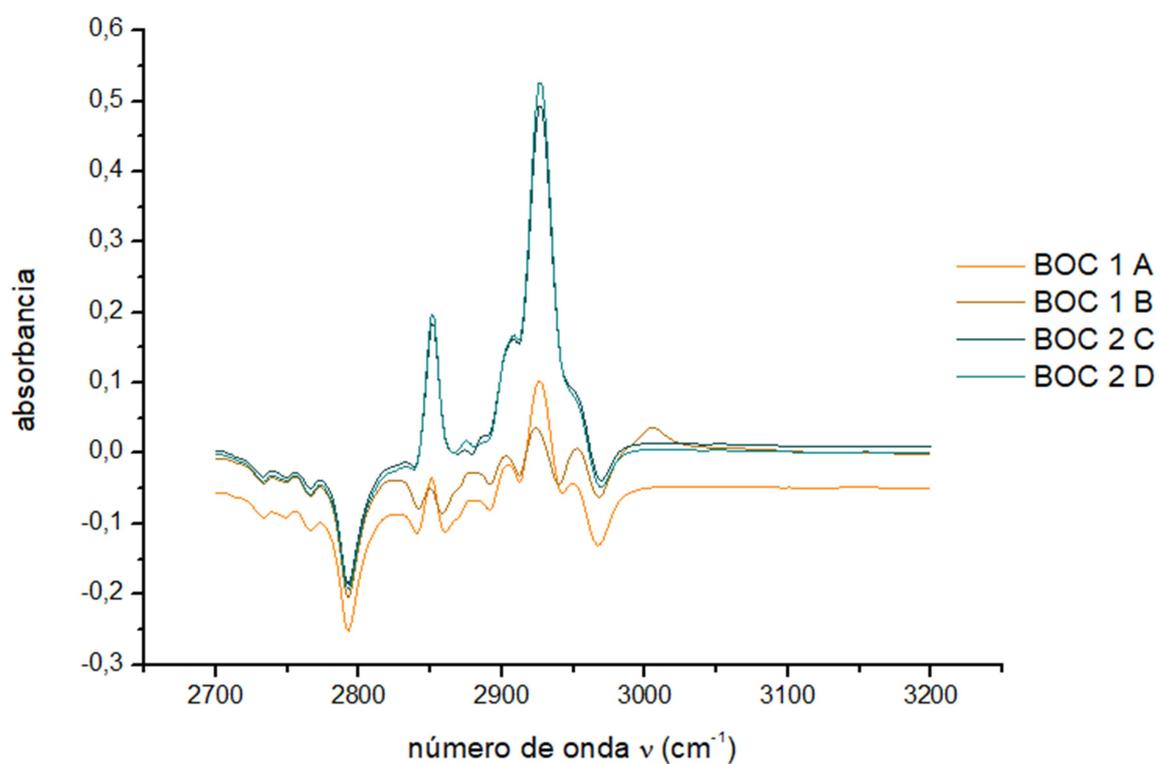


Figura 3.7 Espectros IR del ensayo de Bokashi (BOC) y sílica. BOC 1 A y B: con agregado de 0,3 g de sílica gel; BOC 2 C y D: con agregado de 1,0 g de sílica gel.

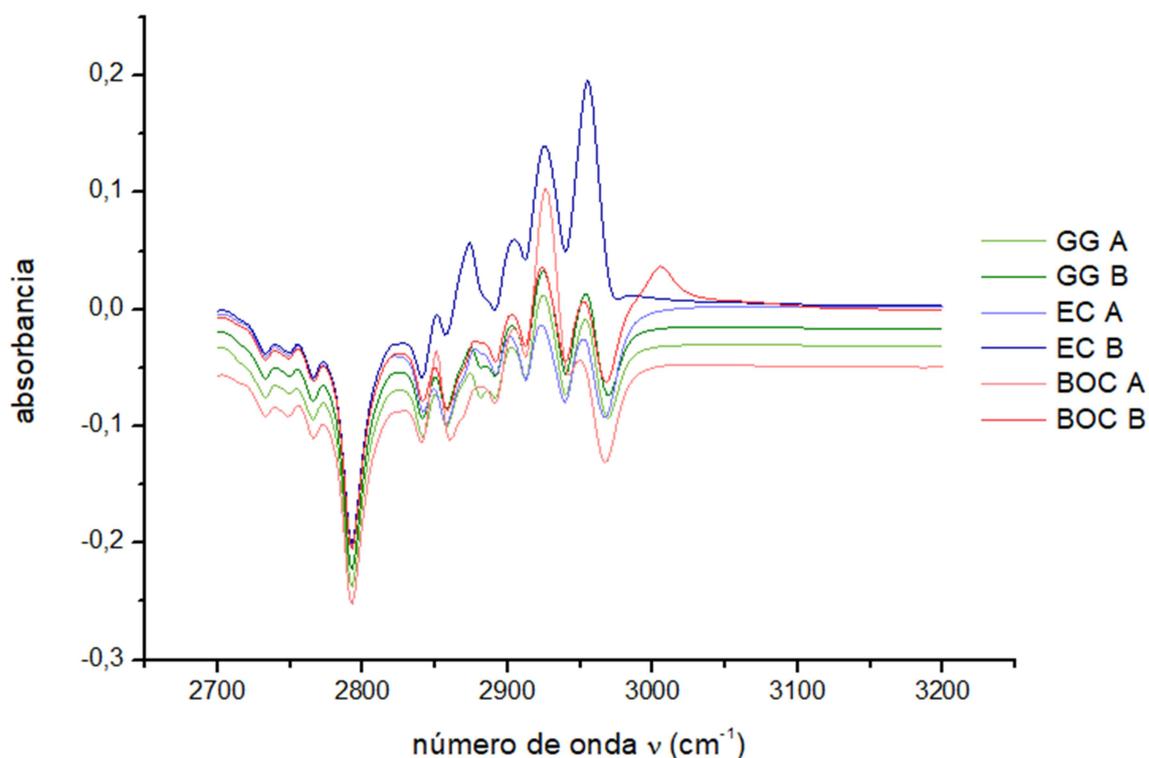


Figura 3.8 Espectros IR de las enmiendas con agregado de 0,3 g de sílica gel, para los extractos de guano de gallina compostado (GG), estiércol de cerdo compostado (EC) y Bocashi (BOC).

Las absorbancias promedio para cada enmienda, obtenidas para los números de onda 2930 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} y agregado de 0,3 g de sílica, se exhiben en la Tabla 3.V. Estos valores de aporte de las enmiendas pueden deberse a que las señales fueron tomadas para los números de onda característicos del estiramiento de los enlaces C-H, cuantificando hidrocarburos pero también pudiendo cuantificar algunos compuestos no derivados de los hidrocarburos, como los ácidos húmicos presentes en el compost (Cantero et al., 2005; Rodríguez Torres et al., 2010).

Enmienda	Absorbancia promedio	
	2930 cm^{-1}	2960 cm^{-1}
Compost de guano de gallina	0,080	0,076
Compost de estiércol de cerdo	0,076	0,112
Bocashi	0,114	0,048

Tabla 3.V Aporte de las enmiendas a la señal del equipo IR

3.2.4.2 Cuantificación de HTP por espectroscopía infrarroja

A partir de las diluciones de la solución patrón se obtuvieron las curvas de calibración a 2930 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} , para concentraciones de HTP de 100 a 300 ppm (Figura 3.9 A y B) y de 300 a 750 ppm (Figura 3.10 A y B), con y sin realización de clean-up.

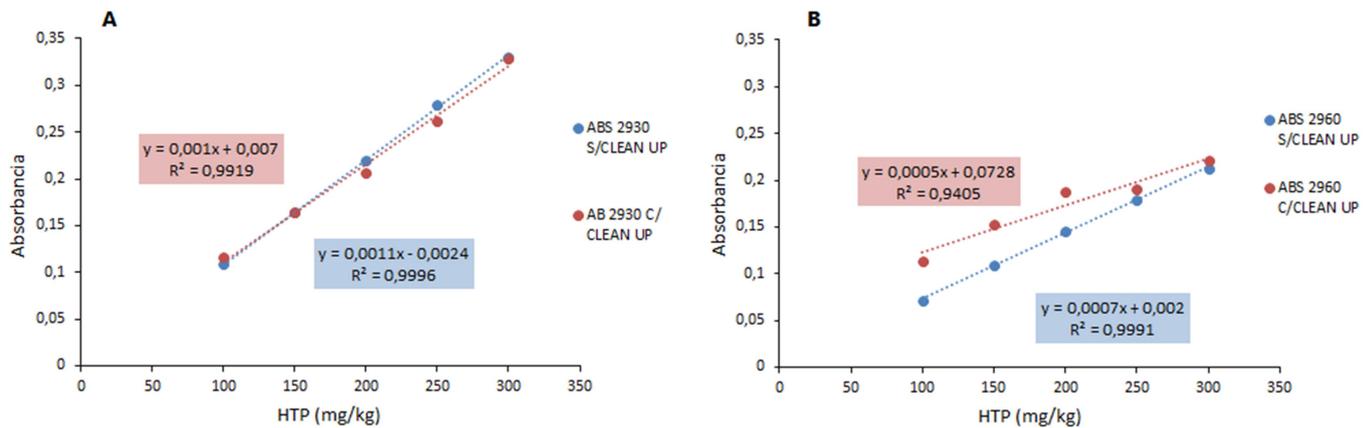


Figura 3.9 Curvas de calibración. A) a 2930 cm^{-1} de 100 a 300 mg/kg de HTP; B) a 2960 cm^{-1} de 100 a 300 mg/kg de HTP.

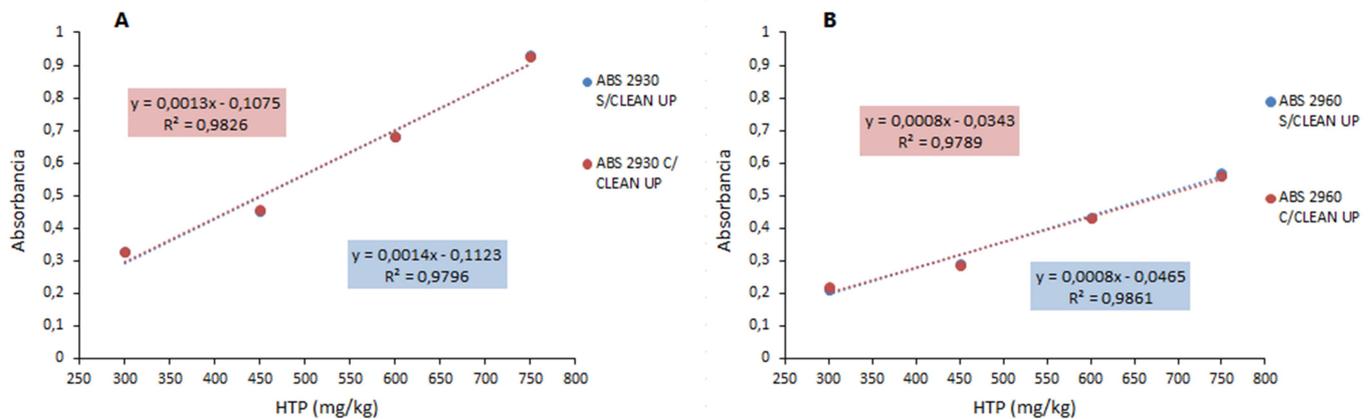


Figura 3.10 Curvas de calibración. A) a 2930 cm^{-1} de 300 a 750 mg/kg de HTP; B) a 2960 cm^{-1} de 300 a 750 mg/kg de HTP.

Se advierte que a bajas concentraciones de HTP (menores a 300 ppm) para la señal obtenida a 2960 cm^{-1} se encuentran diferencias en las curvas de calibración antes y después de realizar el clean-up de las diluciones de la solución patrón. Esto sugiere que podría haber un aporte a la señal por el agregado de la sílica. Para el resto de las curvas no se observa este comportamiento. Por este motivo, se decidió trabajar con las curvas y datos obtenidos para un número de onda de 2930 cm^{-1} ($\lambda = 3,4 \mu\text{m}$).

Con las curvas de calibración obtenidas y los valores de absorbancia medidos para las muestras de cada unidad experimental en los tiempos 0, 62, 82 y 102 días, se calculó la concentración de HTP. En la Figura 3.11 A-B-C-D se exhiben los espectros IR para el tiempo final (102 días) para cada unidad experimental (las tres réplicas de cada tratamiento y el control). Como puede verse en la Figura 3.12, en todos los tratamientos se produjo una disminución de la concentración de HTP luego de los 102 días de iniciado el proceso de biorremediación, siendo el tratamiento con agregado de Bocashi en el que se obtuvo la mayor reducción en el contenido de HTP respecto de todos los tratamientos evaluados.

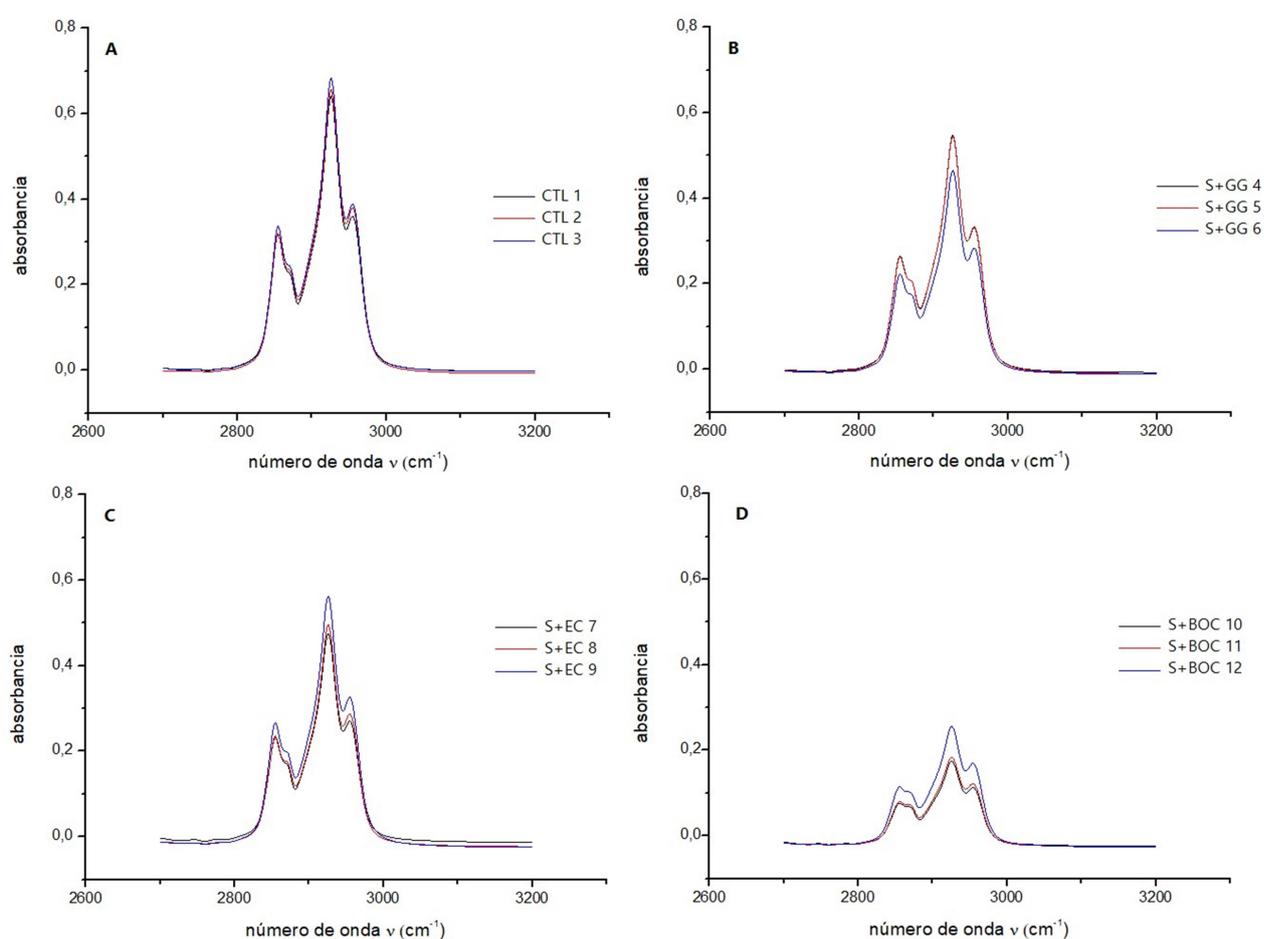


Figura 3.11 Espectros IR a los 102 días para las unidades experimentales A) CONTROL SIN ENMIENDA (CTL); B) SUELO CON AGREGADO DE GUANO DE GALLINA COMPOSTADO (S+GG); C) SUELO CON AGREGADO DE ESTIÉRCOL DE CERDO COMPOSTADO (S+EC); D) SUELO CON AGREGADO DE BOCASHI (S+BOC).

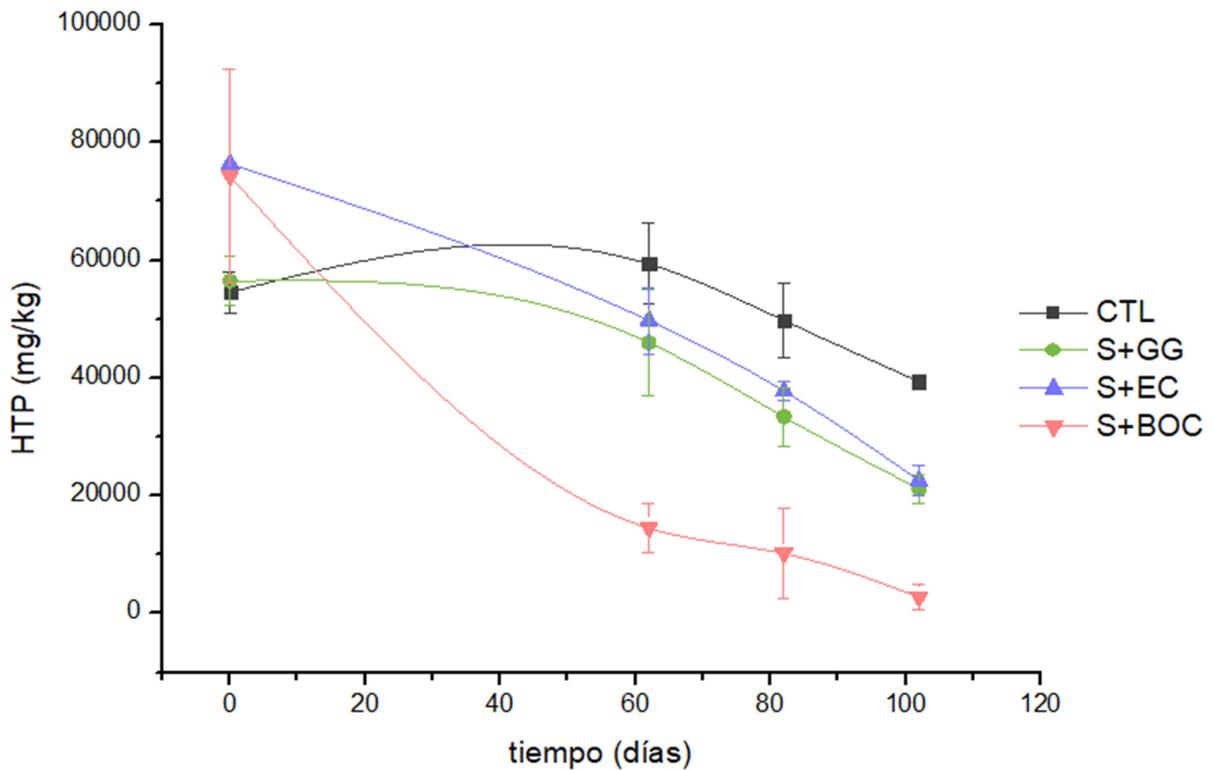


Figura 3.12 Evolución de la concentración de HTP durante la biorremediación

Con estos resultados se realizó un análisis estadístico utilizando, en este caso, un ML mixto (AIC=1013,023) utilizando el tiempo como variable aleatoria. El modelo hallado es el siguiente: $y = 47954,03 - 27013,75 \text{ bocashi} + 8934,63 \text{ estiércol} - 8508,78 \text{ guano}$.

Se encontraron diferencias significativas en la concentración media de HTP entre el tratamiento con Bocashi frente al resto de los tratamientos y al control (Figura 3.13).

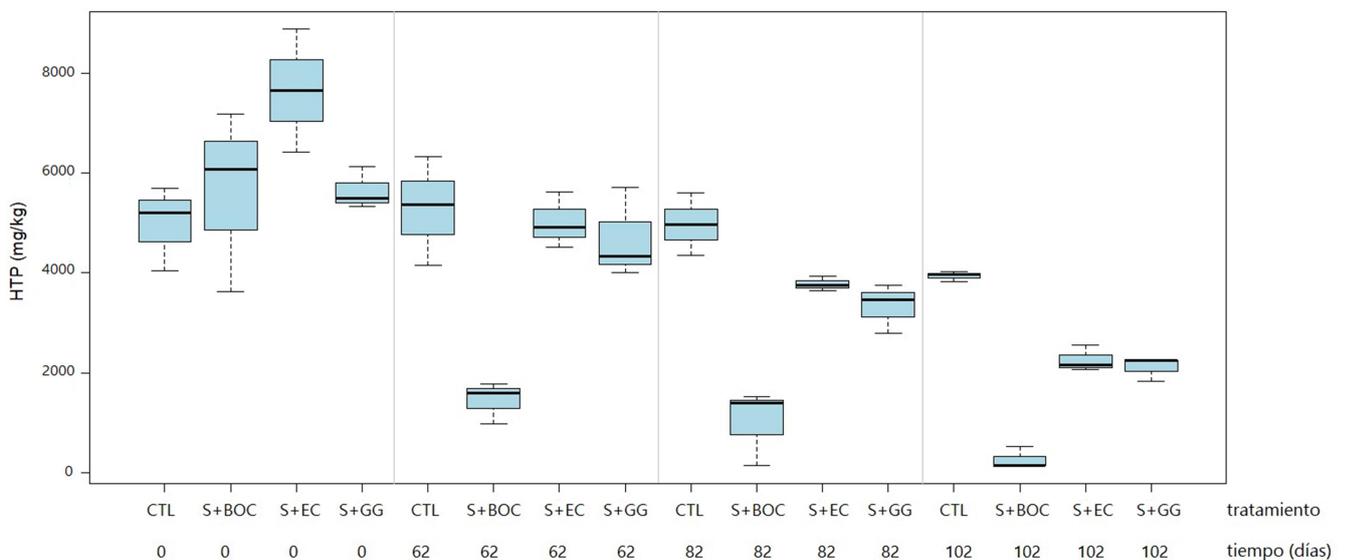


Figura 3.13 Comparación de la concentración de HTP de los distintos tratamientos

3.2.4.3 Cálculo del porcentaje de remoción de HTP

Como pudo observarse en la Figura 3.12 y de manera similar a lo sucedido en el trabajo realizado por García y colaboradores (García et al., 2011), los valores de HTP determinados en el tiempo de inicio de la biorremediación (t_0) presentaron una alta variabilidad, a pesar del esfuerzo empleado para la homogeneización del suelo y las unidades experimentales. Este comportamiento podría deberse a que los hidrocarburos se caracterizan por ser hidrófobos y formar agregados en el suelo, lo que genera una distribución heterogénea en el mismo (García et al., 2011). Por ello, para realizar una comparación más representativa entre los distintos tratamientos, se calcularon los porcentajes de remoción (%R) de hidrocarburos. Los valores obtenidos pueden observarse en la Tabla 3.VI:

Tratamiento	%R HTP a los 62 días	%R HTP a los 82 días	%R HTP a los 102 días
Control sin enmienda (CTL)	9,0%	9,8%	19,3%
Suelo con agregado de guano de gallina compostado (S+GG)	17,5%	40,7%	62,6%
Suelo con agregado de estiércol de cerdo compostado (S+EC)	54,0%	65,4%	79,6%
Suelo con agregado de Bocashi (S+BOC)	70,3%	89,1%	93,7%

Tabla 3.VI Porcentaje de remoción de HTP

Se realizó un análisis estadístico utilizando el %R de hidrocarburos como variable respuesta. Para ello se seleccionó un ML Mixto (AIC=299.448) con el tiempo como variable aleatoria. El modelo hallado es el siguiente: $y = 1,83 + 79,09 \text{ bocashi} + 64,49 \text{ estiércol} + 38,43 \text{ guano}$. El análisis evidenció diferencias significativas en el porcentaje medio de remoción de hidrocarburos (determinado entre los 62 y los 102 días) de los tratamientos con agregado de enmiendas orgánicas respecto del control sin enmienda (Figura 3.14).

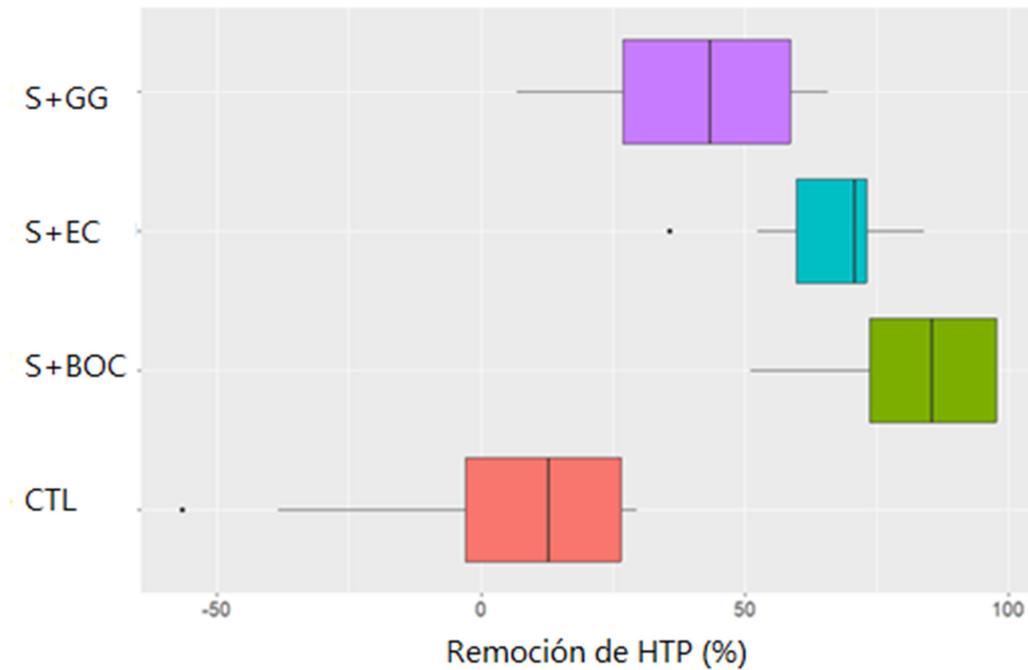


Figura 3.14 Comparación del porcentaje de remoción de HTP de los tratamientos

Mientras que el control sin enmienda obtuvo un porcentaje de remoción de hidrocarburos cercano al 20%, los tratamientos con agregado de enmiendas alcanzaron porcentajes de remoción considerablemente superiores (mayores al 60%). El porcentaje de remoción más alto se obtuvo en el tratamiento con agregado de Bocashi (93,7%).

3.2.4.4 Evaluación de la remoción de HTP en los tratamientos

En el trabajo realizado por Cárdenas Móscol y colaboradores (Cárdenas Moscol et al., 2017) se encontró que, en las unidades experimentales donde se realizó una bioestimulación mediante aplicación de enmiendas orgánicas, se obtuvo un mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos frente al control, aunque en dichos tratamientos no se observó un incremento de la comunidad microbiana respecto al control, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los autores sugieren que la aplicación de guano ejerce una acción selectiva de las especies microbianas, logrando que predominen sólo aquellas capaces de adaptarse y metabolizar los hidrocarburos.

Las enmiendas empleadas aportaron materia orgánica al suelo, que mejora la estructura y, por tanto, la difusión del agua y del oxígeno (Brechelt, 2004). Además, los residuos agroindustriales utilizados como enmiendas pueden incrementar la

porosidad de suelo, permitir un aumento en la difusión del oxígeno molecular en la matriz del suelo, y aportar nutrientes y microorganismos para la reactivación de flora nativa con capacidad metabólica de degradar tóxicos (Ordaz et al., 2011).

Asimismo, los resultados del apartado 3.2.4 pueden relacionarse con lo expuesto en el apartado 3.2.2, donde se advierte que en los tratamientos con agregado de enmiendas el pH fue menor que en el control. Particularmente para el tratamiento con agregado de Bocashi, que es el que obtuvo la mayor remoción de HTP, el pH se mantuvo en el rango óptimo entre 6 y 8 (Vallejo-Quintero et al., 2015) durante toda la experiencia. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Gómez Romero y colaboradores (Gómez Romero et al., 2008) donde señalan que la variación del pH, además de afectar la actividad microbiana, podría influir sobre la solubilización, adsorción y absorción de contaminantes e iones. En la Figura 3.15 se exhibe la comparación de los distintos tratamientos en cuanto a concentración de HTP y pH durante la experiencia.

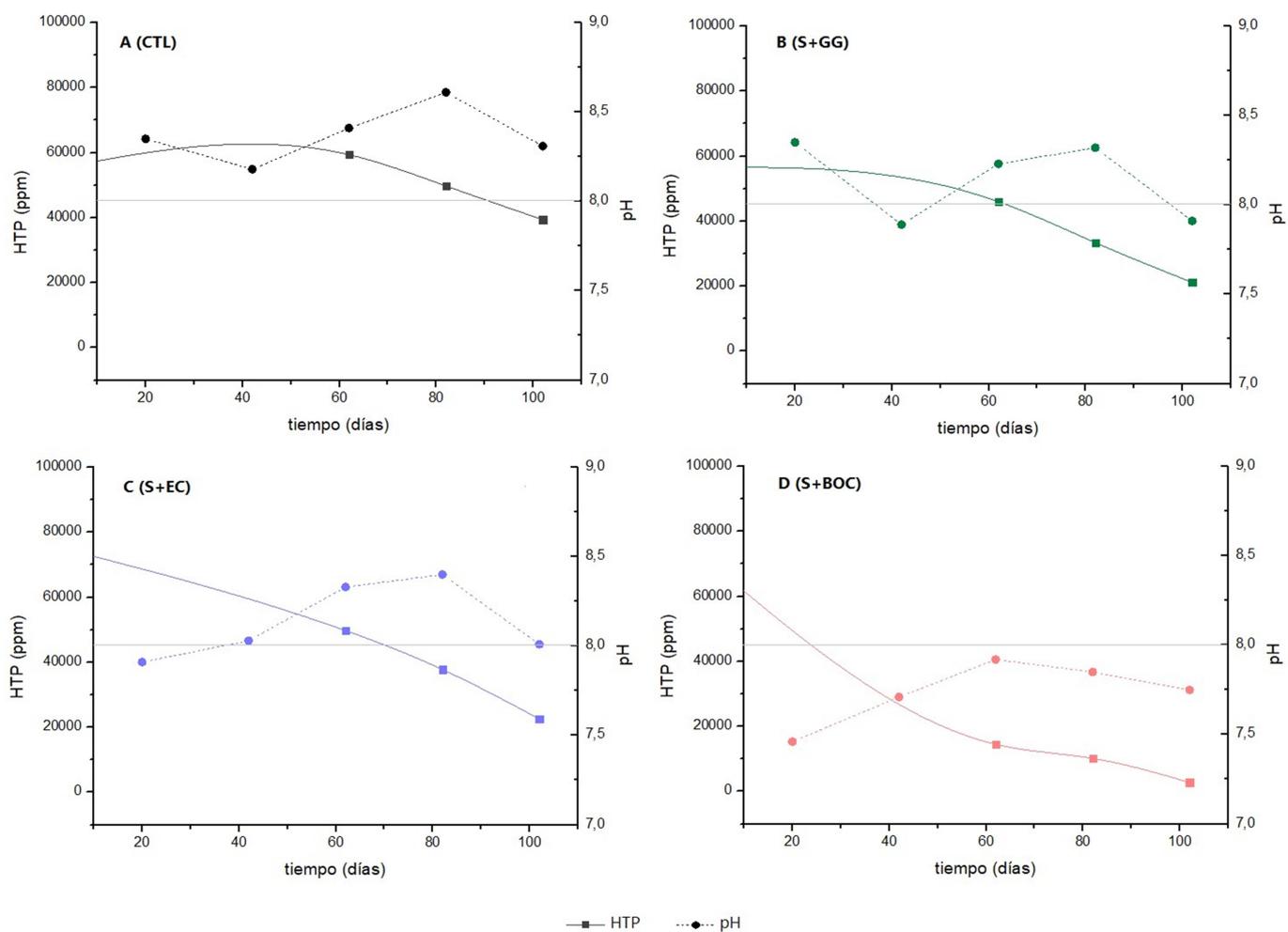


Figura 3.15 Comparación de la evolución de la concentración de HTP y pH en A) CONTROL SIN ENMIENDA; B) SUELO CON AGREGADO DE GUANO DE GALLINA COMPOSTADO; C) SUELO CON AGREGADO DE ESTIÉRCOL DE CERDO COMPOSTADO; D) SUELO CON AGREGADO DE BOCASHI.

4. CONCLUSIÓN

Los resultados evidencian que el agregado de las enmiendas orgánicas seleccionadas aumentó la eficacia del proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos proveniente de la Patagonia Norte y confirman la hipótesis propuesta.

El suelo estudiado presentó un número de bacterias heterótrofas totales superior al valor mínimo de referencia para procesos de biorremediación. Sin embargo, en todos los tratamientos con agregado de enmiendas se obtuvieron porcentajes de remoción de hidrocarburos significativamente mayores que en el suelo control sin adición de enmienda. Particularmente, el Bocashi fue la enmienda orgánica que obtuvo los mejores resultados, alcanzando un porcentaje de remoción del 93,7 % a los 102 días. El aporte de materia orgánica mediante la adición de enmiendas a un suelo franco-arcillo-arenoso, posiblemente, haya incrementado su porosidad, mejorando la difusión del agua y oxígeno requeridos para que se lleve a cabo el proceso de biorremediación.

Se puede concluir que la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es un proceso viable y de fácil aplicación para la remoción de los contaminantes. Se reafirma que con la implementación de una adecuada estrategia de bioestimulación de los microorganismos autóctonos es posible realizar la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados de la Patagonia Norte.

La aplicación de compost y Bocashi puede ser una alternativa sencilla y técnicamente viable para aumentar la eficacia de los métodos tradicionales de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, e incrementar la fertilidad de los suelos. Además, puede generar impactos de tipo económicos y ambientales positivos a escala regional, ya que implica transformar residuos orgánicos en un recurso de alto valor. Este trabajo de investigación proporciona una base y brinda un panorama alentador para la aplicación de esta tecnología a gran escala en la región, lo cual podría traer beneficios tanto ambientales como económicos.

La espectroscopía infrarroja resultó ser una técnica rápida, sencilla y económica, adecuada para la comparación y el seguimiento en el tiempo de la concentración de

HTP en suelo, para los diferentes tratamientos. Sin embargo es importante tener presente que los resultados deben corregirse por la matriz.

Se recomienda que en futuras investigaciones pueda analizarse la biorremediación de cada fracción del hidrocarburo y determinarse cualitativamente los microorganismos involucrados en la misma. Además se espera que la técnica pueda ser profundizada y estudiada a escala de campo.

Actualmente se proyecta continuar la investigación para evaluar el crecimiento de especies vegetales autóctonas en suelos tratados por biorremediación con y sin agregado de enmiendas orgánicas, a través de la realización de ensayos de germinación.

5. REFERENCIAS

- ACUÑA, A., PUCCI, G., MORALES, M. J. & PUCCI, O., 2010.- Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30 (1) : 29-36.
- ACUÑA, A. J., TONÍN, N. L., DÍAZ, V., PUCCI, G. N. & PUCCI, O. H., 2012.- Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 13 (1) : 105-112.
- ADAMS, R. H., ZAVALA-CRUZ, J. & MORALES GARCÍA, F. A., 2008.- Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*, 33 (7) : 483-489.
- AGAMUTHU, P., TAN, Y. S. & FAUZIAH, S. H., 2013.- Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environmental Sciences*, 18 : 694-702.
- AGRESTI, A., 2007.- *Categorical Data Analysis. Second Edition.* John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA. 710 pp.
- ÀLVAREZ, H. M., 2015.- Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Química Viva*, 14 (1) : 18-25.
- ALVARO, C. E. S., MARTINEZ, M. A. & AROCENA, L. A., 2014.- Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80 (4) : 251-261.
- ALVARO, C. E. S., AROCENA, L. A., MARTÍNEZ, M. Á. & NUDELMAN, N. E. S., 2017.- Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33 (2) : 247-257.
- ALANYA DE LA CRUZ, V., CLEMENTE HUAMAN, O., CASTAÑEDA CAMPOS, C., ANCCASI ESTEBAN, C. E., & RAMOS MENDOZA, V. R., 2023.- Uso de estiércol y aserrín en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7 (1) : 785-801.

- ARENA ORTIZ, M. C. & REYES SOSA, M., 2017.- Bacterias y hongos con potencial biodegradador de hidrocarburos en diversos ambientes. En: ARENA ORTIZ M. C. & CHIAPPA CARRARA X. (eds.), *Microbiología Ambiental en México: Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad*. Mérida, Yucatán, México, pp. 246-263.
- ARRIETA RAMÍREZ, O. M., RIVERA RIVERA, A. P., ARIAS MARIN, L., ROJANO, B. A., RUIZ, O. & CARDONA GALLO, S. A., 2012.- Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15 (1) : 27-39.
- BARBARO, L. A., 2022.- Compostaje de residuos orgánicos. INTA ediciones. En: <https://repositorio.inta.gob.ar/>.
- BARNETT, A. G., KOPER, N., DOBSON, A. J., SCHMIEGELOW, F. & MANSEAU, M., 2009.- Selecting the correct variance–covariance structure for longitudinal data in ecology : a comparison of the Akaike, quasiinformation and deviance information criteria. QUT Digital Repository. En: <http://eprints.qut.edu.au/>.
- BASTIDA, F., KANDELER, E., MORENO, J. L., ROS, M., GARCÍA, C. & HERNÁNDEZ, T., 2008.- Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40 (2) : 318-329.
- BENAVIDEZ LÓPEZ DE MESA, J. B., QUINTERO, G., GUEVARA VIZCAÍNO, A. L., JAIMES CÁCERES, D. C., GUTIÉRREZ RIAÑO, S. M. G. & GARCÍA, J. M., 2006.- Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4 (5) : 82-90.
- BOTELLO, A.V., 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, 2005.- En: BOTELLO, A.V., RENDÓN VON OSTEN, J., GOLD-BOUCHOT, G. & AGRAZ-HERNÁNDEZ, C. *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2da Edición. UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida, Campeche, México, pp. 261-268.
- BRECHELT, A., 2004.- Manejo ecológico del suelo. Red de acción de Plaguicidas y sus alternativas para América Latina, Santiago de Chile, Chile, 28 pp.

- BURBA, J. L., LIPINSKI V. M. & LÓPEZ A. M., 2020.- Manejo de estiércol y compostaje para el cultivo de ajo en Cuyo (Argentina). INTA ediciones. En: <https://repositorio.inta.gob.ar/>.
- CABRERA CAPITÁN, F., 2007.- Materia orgánica del suelo: papel de las enmiendas orgánicas. Memoria de la Real Academia Sevillana de Ciencias, 10 : 275-291.
- CAMACHO CÉSPEDES, F., URIBE LORÍO, L., NEWCOMER, Q., MASTERS, K. & KINYUA, M., 2018.- Bio-optimización del compost con cultivos de microorganismos de montaña (MM) y lodos digeridos de biodigestor (LDBIO). Cuadernos de Investigación UNED, 10 (2) : 330-341.
- CAMBARIERI, L., PUCCI, G. N. & ACUÑA, A. J., 2021.- Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. Ecosistemas, 30 (1) : 2084.
- CAMPITELLI, P. A., 2010.- Calidad de compost y vermicompuestos para su uso como enmiendas orgánicas en suelos agrícolas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- CANTERO, J., VIDELA, S. & GALVEZ, J., 2005.- Límites prácticos de biorremediación de suelos basados en fracciones de hidrocarburos totales del petróleo. Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, IAPG. En: <http://biblioteca.iapg.org.ar/ArchivosAdjuntos/JornadasPreservacionVI/019.pdf>
- CÁRDENAS, C. J., QUIPUZCO, U. L. & MEZA, C. V., 2013.- Calidad de biogás y biol obtenidos a partir residuos orgánicos domésticos pretratados con la técnica del bocashi. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, 16 (32) : 7-12.
- CÁRDENAS MOSCOL, P. G., CABELLO TORRES, R., VALDIVIESO GONZÁLES, L. & MUNIVE CERRÓN, R., 2017.- Bioestimulación de bacterias autóctonas con adición de enmiendas en la degradación de cadenas hidrocarbonadas de suelos contaminados en la Refinería de petróleo Conchan en Lima-Perú. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 15 (2) : 16-20.
- CELIS HIDALGO, J., 2009.- Efectos de los derrames de petróleo sobre los hábitats marinos. Ciencia Ahora, 24 (12) : 22-30.
- CHAN-QUIJANO, J. G., JARQUÍN-SÁNCHEZ, A., OCHOA-GAONA, S., MARTÍNEZ-ZURIMENDI, P., LÓPEZ-JIMÉNEZ, L. N. & LÁZARO-VÁZQUEZ,

- A., 2015.- Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, 17 : 123-144.
- COMESAÑA GARCÍA, Y., JIMÉNEZ K. A., NÚÑEZ CLEMENTE, A. C. & TORRES RÍOS B., 2020.- Determinación de hidrocarburos del petróleo en matrices acuosas mediante el empleo de la espectroscopía infrarroja. *Ciencia Química*, 51 (1) : 076-089.
 - CORREA MORALES, J. C. & SALAZAR URIBE, J. C., 2016.- Introducción a los modelos mixtos. Centro Editorial Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 257 pp.
 - CREMONA, M. V. & ENRIQUEZ, A. S., 2020.- Algunas propiedades del suelo que condicionan su comportamiento: el pH y la conductividad eléctrica. *Presencia*, 75, 5-8.
 - CRUZ TORRES, N., MELÉNDEZ ESTRADA, J. & LEAL CASTAÑEDA, E. J., 2021.- Biorremediación con vermicomposta en la contaminación del suelo producida por hidrocarburos. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 7 (7) : 193-197.
 - DEFRIERI, R. L., JIMENEZ, M. D. L. P., EFFRON, D. & PALMA, M., 2005.- Utilización de parámetros químicos y microbiológicos como criterios de madurez durante el proceso de compostaje. *Agriscientia*, 22(1) : 25-31.
 - DELGADO ARROYO, M. D. M., MENDOZA LÓPEZ, K. L., GONZÁLEZ, M. I., TADEO LLUCH, J. L. & MARTÍN SÁNCHEZ, J. V., 2019.- Evaluación del proceso de compostaje de residuos avícolas empleando diferentes mezclas de sustratos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35 (4) : 965-977.
 - DÍAZ RODRÍGUEZ, Y., ROMERO SILVA, R., HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, D., CHAO REYES, C., CAÑETE PÉREZ, C. & ACOSTA DÍAZ, S., 2023.- Aplicación en campo de la biorremediación mejorada a cortes de perforación contaminados con diésel. *Tecnociencia Chihuahua*, 17 (1).
 - DOBSON, A. J., 2022.- *An Introduction to Generalized Linear Models*. Second Edition. Ed. Chapman and Hall/CRC, Florida, USA. 221 pp.
 - FERNÁNDEZ, C., LABRADOR, H., LLOBREGAT, M., MÉNDEZ, L., BASTIDAS, H. & SIEN, B., 2009.- Efectos del estiércol equino y del humus líquido en el proceso de biodegradación de un suelo contaminado con petróleo. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 24 (1) : 47-58.

- FLORES, E. D., GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ, R., ALVARADO ALANÍS, J. L., RUÍZ DE CHÁVEZ RAMÍREZ, D. & LAZALDE RAMOS, B. P., 2023.- Efectos en la Salud ante Exposición a Hidrocarburos. Revista electrónica semestral en Ciencias de la Salud, 14 (2).
- FORTUNATO, R. H., 2018.- Propuesta de remediación con revegetación en área alterada por la actividad petrolera: Desfiladero Bayo, Rincón de los Sauces. En: BRUTTI, L., BELTRÁN, M. & GARCÍA DE SALAMONE, I. (eds.), Biorremediación de los Recursos Naturales, Ediciones INTA, Hurlingham, Buenos Aires, pp. 85-95.
- GANDOLFI, I., SICOLO, M., FRANZETTI, A., FONTANAROSA E., SANTAGOSTINO A. & BESTETTI G., 2010.- Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. Bioresource Technology, 101, 568–575.
- GARCÍA, E., ROLDÁN, F. & GARZÓN, L., 2011.- Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. Acta Biológica Colombiana, 16 (1) : 195 – 208.
- GARCÍA DELGADO, C., 2015.- Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante aplicación de sustrato post-cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- GÓMEZ ROMERO, S. E., GUTIÉRREZ BUSTOS, D. C., HERNÁNDEZ MARÍN, A. M., HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, C. Z., LOSADA CASALLAS, M. & MANTILLA VARGAS, P.C., 2008.- Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Nova, 6 (9) : 101-212.
- GUIBERT, L. M., 2014.- Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos en Sedimentos Marinos Subantárticos: Estudios Poblacionales y Metagenómicos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- HERNÁNDEZ-VALENCIA, I., LÁREZ, L. M. & GARCÍA, J. V., 2017.- Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. Bioagro, 29 (2) : 73-82.
- HIDALGO-LASSO, D., GARCÍA-VILLACÍS, K., LÓPEZ MONTALVO, J., YANEZ-TORRES, P., MARÍN TAPIA, D., URVINA ULLOA, J. & VARGAS-

- JENTZSCH, P., 2023.- Bioaccessibility as a tool for planning bioremediation of petroleum-polluted soil. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 15 (1).
- ITURBE-ARGUELLES, R., FLORES-TORRES, C., CHÁVEZ-LÓPEZ, C. & ROLDÁN-MARTÍN, A., 2002.- Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 3 (1) : 25-35.
 - IZQUIERDO ROMERO, A. R., 2013.- Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España.
 - KAPLAN, C. W. & KITTS, C. L., 2004.- Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3) : 1777-1786.
 - LA MANNA, L., TARABINI, M., GÓMEZ, F., NOLI, P. A., VOGEL, B. & BUDUBA, C. G., 2018.- Estimación de la capacidad de retención de agua de suelos volcánicos en función de variables de fácil determinación a campo. *Ciencia del Suelo*, 36 (1): 23-29.
 - LANDRISCINI, G. & CARIGNANO, A., 2015.- Hidrocarburos no convencionales en la Cuenca Neuquina en Argentina. Inversión, innovación y empleo. Una oportunidad para las PyMEs. *Revista Pymes, Innovación y Desarrollo*, 3 (1), pp. 54–78.
 - LAWNICZAK, L., WOZNIAK-KARCZEWSKA, M., LOIBNER, A. P, HEIPIEPER, H. J. & CHRZANOWSKI, L., 2020.- Microbial Degradation of Hydrocarbons - Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, 25 : 856. En: <https://doi:10.3390/molecules25040856>.
 - LI, R., WEN, B., ZHANG, S., PEI, Z. & SHAN, X., 2009.- Influence of organic amendments on the sorption of pentachlorophenol on soils. *Journal of Environmental Sciences* 21 : 474–480.
 - LLADÓ FERNÁNDEZ, S., 2012.- Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España.
 - MADRID, F., RUBIO-BELLIDO, M., VILLAVERDE, J. & MORILLO, E., 2021.- Biodegradación asistida de PAHs en suelos contaminados usando ciclodextrinas y ramnolípidos. *El suelo: clave para una gestión ambiental*

sostenible en un escenario de cambio global. IX Simposio sobre Control de la Degradación y Recuperación de Suelos CONDEGRES. 229-232.

- MALDONADO-CHÁVEZ, E., RIVERA-CRUZ, M. C., IZQUIERDO-REYES, F. & PALMA-LÓPEZ, D. J., 2010.- Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*, 26 (2) : 121-136.
- MARGESIN, R. & SCHINER, F., 2001.- Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7) : 3127–3133.
- MAROTO ARROYO, M. E. & ROGEL QUESADA, J. M., 2004.- Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. División de Protección Ambiental*, 4 (5) : 297-305.
- MARTÍNEZ-TOLEDO, A. & CUEVAS-DÍAZ, M. C., 2011.- Producción de BTX en México: usos, toxicología y análisis. *Tlatemoani Revista Académica de Investigación*, 5, 1-11.
- MORENO AYALA, L. A., 2019.- Calidad de abonos orgánicos a partir del estiércol porcino y su efecto en el rendimiento del Maíz Chala. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- MOSQUERA, A. T., MELO, M. M., QUIROGA, C. G., AVENDAÑO, D. M., BARAHONA, M., GALINDO, F. D., LANCHEROS, J. J., PRIETO, S. A., RODRÍGUEZ, A. & SOSA, D. N., 2016.- Evaluación de fertilización orgánica en cafeto (*Coffea arabica*) con pequeños productores de Santander, Colombia. *Temas Agrarios*, 21 (1) : 90-101.
- NÁPOLES, J., RODRÍGUEZ, S., LIUBER, S. & ÁBALOS, A., 2015.- Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Tecnología Química*, 35 (3) : 322-333.
- OLAJIRE, A. A. & ESSIEN, J. P., 2014.- Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5 (5). En: <https://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000195>.
- OLGUÍN, E. J., HERNÁNDEZ, M. E. & SÁNCHEZ-GALVÁN, G., 2007.- Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23 (3) : 139-154.

- ORDAZ, J. A., MARTÍNEZ TOLEDO, Á., RAMOS MORALES, F. R., SÁNCHEZ DÍAZ, L. F., MARTÍNEZ, A. J., TENORIO LÓPEZ, J. A. & CUEVAS-DÍAZ, M. C., 2011.- Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. *Multiciencias*, 11 (2) : 136-145.
- ORTUÑO ARZATE, S., 2009.- El mundo del petróleo. Origen, usos y escenarios. Ed. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México, México. 212 pp.
- ORTÍNEZ BRITO, O., IZE, I. & GAVILÁN, A., 2003.- La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 69 : 83-92.
- PALADINO, G. L., 2017.- Recortes de perforación de pozos de gas y petróleo, Alternativas de biotratamiento y reuso. Ed. Académica Española, Saarbrucken, Alemania, 189 pp.
- PARDO CASTRO, J. L., PERDOMO ROJAS, M. C. & BENVÍDEZ LÓPEZ DE MESA, J. L., 2004.- Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2 (2) : 40-49.
- PARK, J. H., LAMB, D., PANEERSELVAM, P., CHOPPALA, G., BOLAN, N. & CHUNG, J. W., 2011.- Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal (loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 185 (2-3) : 549-574.
- PÉREZ VARGAS, J., GARCÍA ESQUIVEL, G. & ESPARZA GARCÍA, F., 2002.- Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva*, 21 : 297-300.
- PÉREZ-MORALES LÒPEZ, G., MORALES GÒMEZ, P. & HAZA DUASO, A. I., 2016.- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (I): toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10 (1) : 1-15.
- PETRO CARDONA, P. H. & MERCADO MONTERO, G. D., 2014.- Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia. Universidad de San Buenaventura, Colombia. En <https://bibliotecadigital.usb.edu.co/entities/publication/a4906d3a-cd6e-4782-8fab-e53ae2af95b7>.

- PONS-JIMÉNEZ, M., GUERRERO-PEÑA, A., ZAVALA-CRUZ, J. & ALARCÓN, A., 2011.- Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *Universidad y Ciencia*, 27 (1) : 1-15.
- POJMAEVICH, A. B., CAMACHO, A., RUBERTO, L. A. M. & BUSTO, B. D., 2023.- Evaluación de estrategias de bioestimulación para la remoción de hidrocarburos del petróleo de un suelo árido de la Cuenca Neuquina (Arg). *Brazilian Journal of Development*, 9 (8) : 24757-24778.
- POZZO ARDIZZI, M. A., 2018.- La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. En: BRUTTI, L., BELTRÁN, M. & GARCÍA DE SALAMONE, I. (eds.), *Biorremediación de los Recursos Naturales*, Ediciones INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina, pp. 137-170.
- PRADA-RÍOS, J. & ZAMBRANO M., 2006.- Toxicidad aguda y bioacumulación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno) en *Anadara tuberculosa*. *Boletín Científico de Control de Contaminación del Pacífico*, (13) : 53-64.
- PUCCI, G. N., ACUÑA, A. J. & PUCCI, O. H., 2011.- Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 115 (3) : 36-41.
- RAMÍREZ-BUILES, V. H. & DUQUE, N. N., 2010.- Respuesta del lulo La Selva (*Solanum quitoense* x *Solanum hirtum*) a la aplicación de fermentados aeróbicos tipo bocashi y fertilizante químico. *Acta agronómica*, 59 (2) : 155-161.
- RAMOS AGÜERO, D. & TERRY ALFONSO, E., 2014.- Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos tropicales*, 35 (4) : 52-59.
- RESTREPO RIVERA, J., 2007.- Manual práctico el A, B, C de la agricultura orgánica y harina de rocas. SIMAS, Managua, Nicaragua. 262 pp.
- RODRÍGUEZ GALLEGO, J. L. & SÁNCHEZ MARTÍN, J., 2003.- Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y Minería*, 351 : 12-16.
- RODRÍGUEZ-GONZALES, A., ZÁRATE-VILLARROEL, S. G. & BASTIDA-CODINA, A., 2022.- Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales (Tropical Journal of Environmental Sciences)*, 56 (1) : 178-208.

- RODRÍGUEZ TORRES, M. D., VENEGAS GONZÁLEZ, J., ANGOA, M. V. & MONTAÑEZ SOTO, J. L., 2010.- Extracción secuencial y caracterización fisicoquímica de ácidos húmicos en diferentes compost y el efecto sobre trigo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1 (2) : 133-147.
- SILVA GRACIANI, F. & VIDRIH FERREIRA, L. B., 2014.- Salud laboral en Brasil y regulación y control de la toxicidad relacionada con el benceno. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40 : 406-411.
- SUAREZ-VERA, R. A., HERRERA-ESCOBAR, J. D. & FIGUEROA-MEDINA, W., 2020.- Evaluación de la actividad de biodegradación de microorganismos en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos”. *Respuestas Journal of Engineering Science*, 25 (2) : 79-83
- TÁMARA, A. M. & REYES, H., 2015.- Análisis y caracterización fisicoquímica de la especie *Hevea Brasiliensis*. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 9 (18) : 9-15.
- THAPA, B., KUMAR, A. K. C. & GHIMIRE, A. 2012.- A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8 (1) : 164-170.
- TYAGI, M., DA FONSECA, M. M. R. & DE CARVALHO, C. C., 2010.- Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22 (2) : 231-241.
- VALENZUELA, I. G., GALINDO, L, MANTILLA, D., MONCADA, D. S., ORJUELA, E., ROMANO, K. & RINCÓN, J., 2021.- Técnicas de Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos con fines de uso en el Municipio De Tibú, Norte De Santander. *Suelos Ecuatoriales*, 51 (1 y 2) : 107-118.
- VALLEJO-QUINTERO, V. E., SANDOVAL COBO, J. J., GARAGOA BARAHONA, S. C. & BASTOS ARENAS, J., 2015. Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha, Cundinamarca – Colombia. *Acta Agronómica*, 65 (4) : 354-361.
- VELÁSQUEZ ARIAS, J. A., 2017.- Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8 (1) : 151-167.

- VIDAL, C., MEIER, S., GARCÍA, S., MEDINA, J., CURAQUEO, G., GIL-CARDEZA, L., AGUILERA, P., BORIE, F. & CORNEJO, P., 2018.- Rol de la simbiosis micorrízica arbuscular y de las enmiendas orgánicas en la tolerancia a elementos tóxicos: su aporte en la remediación de suelos contaminados. En: BRUTTI, L., BELTRÁN, M. & GARCÍA DE SALAMONE, I. (eds.), Biorremediación de los Recursos Naturales, Ediciones INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina, pp. 406-427.
- VILA, J., URBIZU, A., GRIFOLL, M., BOSCH, M., NILSSON, J., LÓPEZ, S. & PIÑUELA, L. P., 2014.- Técnicas de biorremediación para el saneamiento del subsuelo. Medio Ambiente, 13 : 48-57.
- VIÑAS CANALS, M., 2015.- Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España.
- WANG, Z., FINGAS, M., YANG, C. & CHRISTENSEN, J. H., 2005.- Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. En: MORRISON R. D. & MURPHY B. L. (eds.), Environmental Forensics Contaminant Specific Guide. Elsevier Academic Press, EUA, pp. 339-407.
- WINDEVOXHEL, R., SÁNCHEZ, N. & BASTARDO, H., 2011.- Bioaugmentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Revista Ingeniería UC, 18 (1) : 23-27.
- YUGSI, L., 2011.- Elaboración y uso de abonos orgánicos. Módulos de capacitación para capacitadores. Módulo V. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito, Ecuador. 40 pp.
- ZAMORA, A., RAMOS, J. & ARIAS, M., 2012.- Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. Bioagro, 24 (1) : 5-12.