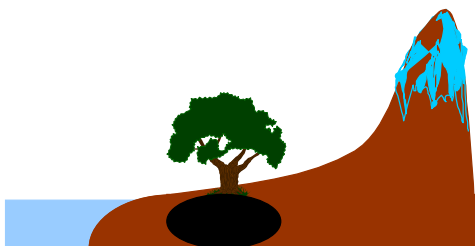


Tesis de Maestría en Manejo Ambiental *



DESEMPEÑO DE CUATRO ESPECIES VEGETALES PARA FITORREMEDIA SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN PATAGONIA

Por Ing. Agr. Jorge Luis Luque ¹.

Director: Dr. Gustavo A. Zuleta ^{3,4}
Codirector: Lic. Julio Fuchs ^{3,5}

- 1- Estación Experimental Chubut del Instituto Nac. de Tecnología Agropecuaria (INTA), Trelew, Chubut.
- 2- Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew.
- 3- Dpto. Ecología y Ciencias Ambientales, CEBBAD, Universidad Maimonides, Buenos Aires.
- 4- Cátedra de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Lomas de Zamora.
- 5- CONICET – Toxicología y Qca. Legal, Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires.

(*) acreditada por CONEAU

Univ. Maimónides: Hidalgo 775. (1405). Buenos Aires, Argentina
TE: +(011) 4905-1185 / 1180 Fax: +(011) 4905-1115
www.maimonides.edu / postgrado.ambiental@maimonides.edu

Lista de acrónimo y abreviaturas

Abreviatura	Significado
HC	Hidrocarburos
HTP	Hidrocarburos totales por ciento sobre suelo seco
FR	Fitorremediación
B de O	Botón de Oro (<i>Grindelia chilensis</i>)
Agr	Agropiro alargado (<i>Thynopiron ponticum</i>)
Ely	<i>Elymus</i> (<i>Leymus racemosus</i> subespecie <i>sabulosus</i>)
Cha	Charcao (<i>Senecio filaginoides</i>)
Te	Te
F	Fertilizado
NF	Sin fertilización
Pr/nC ₁₇	Pristano/normal Carbono 17
Fi/nC ₁₈	Fitano/ normal Carbono 18
Pr	Pristano
Fi	Fitano
C ₁₇	Carbono 17
C ₁₈	Carbono 18
MCNR	Mezcla compleja No Resuelta
PAH´s	Hidrocarburos Poliaromáticos
ds	Diferencias significativas
sss	sobre suelo seco
sps	Especies

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	9
2. Introducción	12
2.1. Marco teórico	12
2.2. Química de hidrocarburos con relación a la degradación	16
2.3. Objetivos e Hipótesis	18
La hipótesis que sostenemos para realizar esta investigación es que mediante la FR con especies nativas como exóticas adaptadas a las condiciones de suelo y clima de la Patagonia complementado con la adición de nutrientes es factible la remediación de los suelos contaminados con petróleo, en una forma económica, rápida y eficiente.....	18
3. Materiales y Métodos	19
3.1. Área de estudio	19
3.2. Diseño experimental y materiales.....	19
3.3. Análisis químicos.....	27
3.4. Análisis estadístico.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Degradación de los HC totales de petróleo	31
4.2. Degradación de fracciones hidrocarburíferas obtenidas a partir de método SARA	35
4.3. Degradación de aromáticos	39
4.4. Indicadores de degradación.....	40
4.5. Degradación de los HC normales (n-alcanos)	48
4.6. Producción de biomasa.....	55
4.7. Consumo de nutrientes minerales.....	59
5. DISCUSIÓN.....	62
6. CONCLUSIONES.....	69
7. BIBLIOGRAFÍA.....	71
8. Anexo.....	79
8.1. Fotografías relativas al diseño y marcha del ensayo.....	79
8.2. Glosario	83
8.3. Estructura química básica de los Hidrocarburos	86
8.4. Antecedentes en el uso de plantas para restaurar ambientes contaminados por actividad petrolera.....	89
8.5. Datos meteorológicos de Trelew.....	95
8.6. Análisis de HTP por el método del Soxhlet.....	96
8.7. Procedimiento de inyección directa CG-FID para análisis cromatográfico de HC en suelo ...	97

ÍNDICE DETALLADO

1. Resumen	9
2. Introducción	12
2.1. Marco teórico	12
2.2. Química de hidrocarburos con relación a la degradación	16
2.3. Objetivos e Hipótesis	18
2.3.1. Objetivo general	18
2.3.2. Objetivos específicos	18
3. Materiales y Métodos	19
3.1. Área de estudio	19
3.2. Diseño experimental y materiales	19
3.2.1. Suelo	19
3.2.2. Hidrocarburos	20
3.2.3. Preparación del sustrato	21
3.2.4. Especies vegetales	22
3.2.5. Fertilización	23
3.2.6. Riego	24
3.2.7. Factores evaluados	25
3.2.8. Plantación en macetas	25
3.2.9. Muestreo del sustrato	26
3.2.10. Muestreo de biomasa aérea y radicular	26
3.3. Análisis químicos	27
3.4. Análisis estadístico	30
4. Resultados	31
4.1. Degradación de los HC totales de petróleo	31
4.1.1. HC según el método gravimétrico	31
4.1.2. Hidrocarburos livianos según el método de inyección directa CG-FID	33
4.2. Degradación de fracciones hidrocarburíferas obtenidas a partir de método SARA	35
4.2.1. Saturados	35
4.2.2. Aromáticos	36
4.2.3. Resinoides	37
4.2.4. Asfaltenos	37
4.3. Degradación de aromáticos	39
4.3.1. Volátiles bencénicos (BTEX)	39
4.3.2. HC Poliaromáticos (PAH´s)	39
4.4. Indicadores de degradación	40
4.4.1. Pristano/nCarbono 17 (Pr/nC17) sobre la fracción saturada	40
4.4.2. Fitano/nC18 (Fi/nC18) sobre la fracción saturada	41
4.4.3. n- e iso-alcanos sobre la fracción saturada	43
4.4.3.1. Pristano y Fitano	43
4.4.3.2. nCarbono 17 y nCarbono 18	45
4.5. Degradación de los HC normales (n-alcanos)	48
4.6. Producción de biomasa	55
4.6.1. Radicular	55
4.6.2. Aérea	57

4.7. Consumo de nutrientes minerales.....	59
4.7.1. Nitrógeno.....	59
4.7.2. Fósforo	60
5. DISCUSIÓN.....	62
6. CONCLUSIONES.....	69
7. BIBLIOGRAFÍA.....	71
8. Anexo.....	79
8.1. Fotografías relativas al diseño y marcha del ensayo.	79
8.2. Glosario	83
8.3. Estructura química básica de los Hidrocarburos	86
8.4. Antecedentes en el uso de plantas para restaurar ambientes contaminados por actividad petrolera.....	89
8.5. Datos meteorológicos de Trelew.....	95
8.6. Análisis de HTP por el método del Soxhlet.....	96
8.7. Procedimiento de inyección directa CG-FID para análisis cromatográfico de HC en suelo ...	97

LISTA DE ILUSTRACIONES

Tablas

Tabla 1. HC normales de cadena lineal – Alcanos.....	17
Tabla 2. HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX).....	17
Tabla 3. HC Poliaromáticos (PAH´s) seleccionados por la EPA (*).....	18
Tabla 4. Atributos del suelo utilizado para la preparación del sustrato.....	20
Tabla 5. Fracciones hidrocarburíferas del petróleo utilizado en el ensayo.....	21
Tabla 6. HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX) en el petróleo utilizado para el ensayo.....	21
Tabla 7. HC poliaromáticos (PAH´S´s) en el petróleo utilizado para el ensayo.....	21
Tabla 8. Determinaciones analíticas realizadas sobre las muestras provenientes del ensayo.....	29
Tabla 9. Momentos de muestreo en relación a cada uno de los parámetros medidos.....	30
Tabla 10. Contenido promedio de HC (% sss) en cada tratamiento a los 180 y 350 días.....	33
Tabla 11. HC totales por el método de inyección directa CG-FID (mg/kg) a 180 y 350 días.....	34
Tabla 12. Fracción Saturados (mg/kg) a la finalización del ensayo.....	36
Tabla 13. Fracción Aromáticos (mgs/kg) a la finalización del ensayo.....	36
Tabla 14. Fracción Resinoides (mgs/kg) a la finalización del ensayo.....	37
Tabla 15. Fracción Asfaltenos (mg/kg) a la finalización del ensayo, a los 350 días.....	38
Tabla 16. Aromáticos volátiles bencénicos presentes en el sustrato al inicio del ensayo.....	39
Tabla 17. Hidrocarburos Poliaromáticos (PAH´s) (mgs/kg) a la finalización del ensayo.....	40
Tabla 18. Coeficiente Pr/nC17 a los 180 y a los 350 días.....	41
Tabla 19. Coeficiente Fitano/nCarbono 18 a los 180 y a los 350 días de muestreo.....	42
Tabla 20. Isoalcanos sobre la fracción saturada (mg/kg) a los 180 y 350 días de muestreo.....	44
Tabla 21. n-alcanos sobre la fracción saturada.....	45
Tabla 22. Alcanos (nC6 a nC40) a los 180 y 350 días de muestreo.....	49
Tabla 23. Biomasa radicular (grs/maceta) en dos fechas en los tratamientos fertilizados y sin fertilizar.	56
Tabla 25. MS aérea (grs/maceta) a los 350 días de muestreo.....	58
Tabla 26. Nitrógeno en el sustrato en las tres fechas de muestreo (mgs/kg sustrato).....	60
Tabla 26. Fósforo disponible en las tres fechas de muestreo (mgs/kg sustrato).....	61
Tabla 27. Cuadro comparativo de los métodos de remediación más utilizados.....	88
Tabla 28. Plantas que han demostrado potencial para fitorremediar HC del petróleo.....	91
Tabla 29. Datos climáticos de Trelew (Pcia. del Chubut). Período 1971- 2007.....	95

Figuras

Figura 1. Modelo conceptual de posibles transportes del contaminante (círculo rojo) en la dinámica planta-suelo (adaptado de Pilon & Smits 2005).....	14
Figura 2. HC normales resueltos en el suelo utilizado.....	20
Figura 3. Distribución relativa de la cadena carbonada del petróleo utilizado en el ensayo.	21
Figura 4. Picos resueltos (n-alcano) y fase Mezcla Compuesta No Resuelta (MCNR) en una corrida cromatográfica.....	28
Figura 5. Porcentaje de HC Totales de Petróleo (HC) al inicio del ensayo, a los 180 y a los 350 días.	33
Figura 6. HC totales por el método de inyección directa CG-FID (mg/kg) a los 180 y 350 días.....	35
Figura 7. Fitano/nCarbono 18 sobre fracción saturada en las tres fechas de muestreo.....	43
Figura 8. Grindelia Chilensis fertilizado	48
Figura 9. Grindelia Chilensis no Fertilizado.....	48
Figura 10. Testigo Fertilizado.....	48
Figura 11. Testigo no Fertilizado	48
Figura 12. Corrida cromatográfica de la muestra inicial, en el día 1 de ensayo.....	52
Figura 13. Cromatograma del tratamiento de Agropiro (Thynopiron ponticum) fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.	52
Figura 14. Cromatograma del tratamiento Agropiro (Thynopiron ponticum) no fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.	52
Figura 15. Cromatograma del tratamiento Testigo fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo. ...	53
Figura 16. Cromatograma del tratamiento Testigo no fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.	53
Figura 17. Distribución relativa de n-alcanos en el sustrato con HC al inicio del ensayo (día 1).....	53
Figura 18. Distribución relativa de n-alcanos en Agropiro (Thynopiron ponticum) , a los 180 días..	54
Figura 19. Distribución relativa de n-alcanos en Agropiro (Thynopiron ponticum) sin fertilizar, a los 180 días.	54
Figura 20. Distribución relativa de n-alcanos en Agropiro fertilizado, a los 350 días.....	54
Figura 21. Distribución relativa de n-alcanos en Agropiro sin fertilizar, a los 350 días.....	54
Figura 22. Distribución relativa de n-alcanos en Testigo fertilizado, a los 180 días.....	54
Figura 23. Distribución relativa de n-alcanos en Testigo sin fertilizar, a los 180 días.....	54
Figura 24. Distribución relativa de n-alcanos en Testigo fertilizado, a los 350 días.....	55
Figura 25. Distribución relativa de n-alcanos en Testigo sin fertilizar, a los 350 días.....	55
Figura 26. MS en raíces (gr/maceta) en sustrato con y sin petróleo, sin fertilizar, a los 350 días.....	56
Figura 27. MS en raíces (gr/maceta) en sustrato con y sin petróleo, fertilizados, a los 350 días	57
Figura 28. MS aérea (gr/maceta) en suelos con y sin petróleo, sin fertilizar, a los 350 días.....	58
Figura 29. MS aérea (grs/maceta) en suelos con y sin petróleo, fertilizados, a los 350 días.....	59
Figura 30. Preparación de las macetas y acondicionamiento del sustrato.....	79
Figura 31. Ensayo instalado en el vivero.....	80
Figura 32. Ensayo a los 90 días de su inicio (Enero del 2007)	81
Figura 30. Fracciones más importantes en que se dividen químicamente los HC.	86

Agradecimientos

Todo mi agradecimiento:

- ÿ A mi Director de Tesis, Dr. Gustavo Zuleta y a mi Co-director el Lic Julio Fuchs por todo lo que aprendí con ellos, su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza y afecto, fundamentales para la concreción de este trabajo.
- ÿ Al personal jerárquico de la Regional Patagonia Sur y de la Estación Experimental INTA EEA Chubut por darme el apoyo institucional y posibilitarme la realización de este postgrado.
- ÿ Al Ing. Gustavo Buono y a la Lic. Virginia Massara por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo
- ÿ A los auxiliares de la Unidad de la Unidad de Viverización de Especies Nativas de la EEA INTA por colaborar en las tareas rutinarias realizadas durante el ensayo.
- ÿ A los técnicos del laboratorio de Análisis Agronómicos de la EEA Chubut del INTA por su predisposición y colaboración en realizar los análisis de sustrato.
- ÿ A mi esposa y mis hijos por su cariño, su gran comprensión y constante estímulo, durante los años que dediqué a este trabajo.
- ÿ A mi padre por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.
- ÿ Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación

1. RESUMEN

La contaminación de los suelos por HC tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades de los suelos, con procesos de salinización, de toxicidad sobre los microorganismos y mortandad de la vegetación por efectos fitotóxicos. Esto se ve agravado en la Patagonia extra-andina porque es un ecosistema sumamente frágil ya que tiene condiciones que limitan naturalmente el crecimiento de las plantas.

En los últimos años ha cobrado una gran importancia la utilización de métodos biológicos para la limpieza de sitios contaminados, dentro de ellos incluimos la fitorremediación. Es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, secuestrar, detoxificar, degradar, contener o tornar inocuos a los contaminantes en suelos o aguas subterráneas, por alteración de las condiciones químicas y físicas del suelo.

Las tecnologías que utilizan los principios de la fitorremediación, y que son útiles para tratar gran variedad de contaminantes, sólo han sido evaluadas en nuestro país a escala de laboratorio para el tratamiento de suelos contaminados con HC de petróleo.

Los objetivos del ensayo han sido estudiar el posible efecto fitorremediador de cuatro especies en suelos recientemente contaminados con HC e incorporar una línea temática que demuestre ser factible de utilizarse en la restauración y/o recuperación de áreas degradadas por actividad petrolera.

El ensayo se realizó en el vivero de especies nativas de la E.E.A. INTA Chubut, en la ciudad de Trelew, entre Octubre del 2006 y Octubre del 2007,.

El suelo utilizado, de textura gruesa, sin limitaciones fisicoquímicas y con pobre fertilidad, fue extraído de los cañadones costeros de Comodoro Rivadavia. El HC utilizado en el ensayo, denominado "petróleo Cañadón" era un petróleo denominado mixto, con una densidad de 0.83 g/ml, o sea de características intermedias entre un petróleo asfáltico y parafínico. En la preparación del sustrato, se mezcló hasta la homogeneidad el suelo con aproximadamente 5 a 7 % en peso de HC fresco. El contenido inicial de HC en el sustrato era del 4.1% ($\pm 0,12$) sobre suelo seco.

Las especies ensayadas eran de ciclo de vida perenne: Dos especies que componen la flora nativa patagónica (Botón de Oro (*Grindelia chilensis*)), Charcao (*Senecio filaginoides*) y dos especies gramíneas exóticas perennes (*Agropiro alargado* (*Thynopiron ponticum*) y *Elymus* (*Leymus racemosus subsp sabulosus*)).

Con el objetivo de analizar como se modifican las condiciones del suelo entre y alrededor de la masa de raíces, en condiciones controladas, el sustrato se colocó en macetas. El repique de las plantas (de dos meses y medio) a las macetas se realizó a fines de octubre del 2006. Se regaron periódicamente a fin de mantener una humedad constante eliminando el factor sequía.

Se fertilizó la mitad de las macetas aplicando una dosis de 60 unidades de Nitrógeno y 60 de Fósforo, en dos aplicaciones, al inicio del ensayo (Octubre 2006) y en Enero 2007. Estadísticamente se diseñó un experimento con dos fuentes de variación: especies vegetales y fertilización, en un diseño factorial 5 tratamientos de plantación x 2 tratamientos de fertilización x 3 réplicas. Se evaluaron tres repeticiones por tratamiento en cada momento de muestreo (los dos momentos de muestreo finales). Adicionalmente se comparó la producción de biomasa aérea y de raíces de las diferentes especies sobre suelos con o sin presencia de HC.

Se evaluó la evolución del contenido total de HC y otros componentes en el tiempo, mediante tres momentos de muestreo: Al inicio del ensayo en Octubre del 2006, a los 180 días de iniciado el ensayo y a su finalización, a los 350 días.

Se realizaron determinaciones analíticas de: Cuantificación de los HC por el método gravimétrico y por el método de inyección directa CG-FID (inyección directa de extracto crudo de diclorometano); cuantificación de las fracciones hidrocarbúricas mediante el método SARA (cuantificación de los Hidrocarburos como fracciones discriminadas); identificación y cuantificación de los HC Saturados normales, evaluación de la Mezcla Compleja No Resuelta (MCNR); Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX); 16 compuestos PAH's que contempla la legislación, y de los alcanos isoprenoides Pristano y Fitano.

Para el análisis estadístico se realizó ANOVA, utilizando como variables de clasificación las especies vegetales y la fertilización y sus interacciones en los diferentes momentos de muestreo, según correspondiera ($p \leq 0.05$); se utilizó el test de Tukey para comparar las medias.

La concentración inicial de HC (40.100 mg/kg) disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) en todos los tratamientos al cabo de 350 días de ensayo, produciéndose una degradación sostenida. Las diferencias fueron mayores en los primeros 180 días de ensayo, luego el ritmo de degradación disminuyó. Las gramíneas fueron más eficientes que las especies autóctonas para disminuir el contenido de HC en el suelo ya que Elymus y Agropiro fertilizados, disminuyeron entre 36 y 43 % a los 180 días y entre 45 y 49 % al final del ensayo.

En el análisis de la degradación de las fracciones livianas (C_6 a C_{16}) estas disminuyeron entre 75 y 80 % a los 180 días, y un 80 % a su finalización. A los 180 días los tratamientos vegetados degradaron los HC más eficientemente respecto a los Testigos y que los tratamientos vegetados no fertilizados, mientras que seis meses después el Testigo fertilizado no tuvo diferencias significativas con los tratamientos vegetados. Por lo tanto en los HC livianos hay uso de los nutrientes aportados por el fertilizante por parte de los microorganismos pero no hay fitorremediación ya que no se observó un comportamiento diferencial entre tratamientos vegetados y no vegetados.

Mientras que en los HC más pesados, determinados por el método gravimétrico, hay una degradación más selectiva ya que dentro de cada tratamiento de fertilización en las gramíneas se ha hallado la degradación más eficiente y los tratamientos vegetados lo hacen significativamente más que el Testigo (Fitorremediación + Bioestimulación).

En nuestras condiciones de ensayo actuó fundamentalmente la rizorremediación involucrando la destrucción de los contaminantes en el suelo como resultado de actividad microbiana en la presencia de la rizosfera.

En el inicio del ensayo la mayor proporción de las fracciones la constituían los Saturados, 53.7 %, le seguían los Aromáticos con 32.1 % y los Resinoides con 14 %. Mientras que los Asfaltenos se hallaban en muy baja proporción, solo el 0.3 %. En la degradación no hubo diferencias significativas entre tratamientos. La fracción Saturados es la que más disminuyó, por degradación, entre 58 y 65 %. Mientras que la fracción Aromáticos disminuyó muy poco, entre 15 y 33 % del total.

Los isoalcanos Pristano y Fitano no fueron adecuados indicadores de actividad de degradación en las condiciones de nuestro ensayo, por lo tanto se propone reemplazarlos por el concepto "Tasa de Degradación", a partir del contenido de HC por el método gravimétrico

Los PAH´s disminuyeron significativamente en los tratamientos vegetados entre 64 y 75 %, respecto al Testigo, que alcanzó una disminución del 34 %.

No se halló correlación entre contenido de HC y el de los nutrientes a lo largo del tiempo como tampoco se halló correlación entre la disminución de HC en los diferentes tratamientos y la producción de biomasa de raíces y aérea.

En los tratamientos con sustrato sin HC la mayor producción de materia seca, al igual que en el sustrato empetrolado, la obtuvieron Agropiro y Botón de Oro fertilizados. Podemos inferir que una misma especie puede tolerar diferentes niveles de HC según tenga o no una adecuada disponibilidad de nutrientes, comparando la producción de materia seca aérea de las especies utilizadas en el ensayo, en el sustrato con petróleo respecto a sin HC.

En las condiciones de nuestro ensayo la implementación de la FR es una tecnología eficiente ya que permite el crecimiento de plantas sobre los suelos contaminados y permite la producción de una biomasa suficiente para la fitodegradación y la degradación microbiana. Particularmente las especies de un gran volumen de raíces tales como las gramíneas exóticas adaptadas a las condiciones de Patagonia son las de mayor eficiencia por sobre las especies nativas.

Palabras claves: fitorremediación, bioestimulación, hidrocarburos, fertilización, degradación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Problemática ambiental petrolera

El aumento de la población humana y el desarrollo industrial sin precedentes alcanzados durante el siglo XX, incrementaron las concentraciones de contaminantes sólidos y líquidos a niveles críticos. El manejo inadecuado de los materiales y residuos trajo como consecuencia la aparición de problemas de contaminación, para los cuales ni el ambiente estaba adaptado ni la sociedad preparada. Entre ellos se destacan los que se producen a causa de la extracción y el manejo del petróleo.

Los problemas ambientales de la explotación petrolera en yacimientos terrestres se producen principalmente en la etapa de transporte, ya que a través de su conducción por oleoductos se mantiene el riesgo de contaminación de suelos y de aguas superficiales y subterráneas, en el caso de eventuales eventos de derrames. Debido a los sistemas de control de la red de oleoductos, y a los planes de contingencia diseñados por las empresas, en la actualidad se ha disminuido la cantidad de derrames por roturas de oleoductos, y también su magnitud. A pesar de estas medidas adoptadas, los eventos por derrames siguen siendo una fuente de contaminación a la cual se le debe prestar atención.

La contaminación de los suelos por HC, generalmente por pérdidas o roturas de cañerías de conducción, tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades de los suelos, con procesos de salinización, de toxicidad sobre los microorganismos y mortandad de la vegetación por efectos fitotóxicos (Molina et al. 1995). Esto se ve agravado en la Patagonia extra-andina, dado que es un ecosistema sumamente frágil ya que tiene condiciones que limitan naturalmente el crecimiento de las plantas: muy baja disponibilidad de agua y nutrientes, clima árido frío, elevadas amplitudes térmicas, fuertes vientos.

Los componentes del petróleo son biodegradables gracias a la acción de los microorganismos aunque su degradación espontánea es relativamente lenta (fenómeno usualmente conocido como atenuación natural: sin intervención humana). Los HC de petróleo son fuente de carbono para los microorganismos y proveen electrones que los organismos usan para obtener energía. Otro rol que ejercen los microorganismos se basa en su habilidad para reducir la fitotoxicidad de los contaminantes.

La rehabilitación de suelos contaminados con HC y el tratamiento de los diversos residuos que produce la actividad petrolera, aplicando tecnologías inspiradas en procesos naturales, son métodos ecológicamente sustentables que minimizan el compromiso ambiental que pueden originar otros métodos de restauración y/o tratamiento, resultando ser métodos más económicos y factibles. En consecuencia, en los últimos años, a cobrado una gran importancia la utilización de métodos biológicos para la limpieza de sitios contaminados, todos ellos agrupados en procesos de biodegradación.

2.2. Biorremediación: marco teórico-conceptual

Los procesos de biodegradación constan de un conjunto de técnicas ó prácticas cuyo fin es estimular la degradación de contaminantes contribuyendo a la restauración del ecosistema mediante procesos biológicos.

Biorremediación es el uso de microorganismos para descomponer o degradar sustancias peligrosas en otras de carácter menos tóxicas o bien inocuas para el ambiente y la salud humana. La degradación de los contaminantes es un proceso que se puede dar de forma natural por los microorganismos autóctonos de la zona contaminada. La restauración del sitio puede durar un largo período (años). Es un método de tratamiento in situ, no invasivo.

En nuestro estudio hay un conjunto de prácticas que utilizan los conceptos de los procesos naturales de biodegradación de contaminantes, y buscan acelerar y/o potenciar dichos procesos. A estas las denominamos Biorremediación asistida. Dentro de ella incluimos la Bioestimulación (adición de nutrientes) y la Fitorremediación (FR) (utilización de plantas).

El contaminante, en nuestro caso los HC de petróleo son fuente de carbono para los microorganismos y proveen electrones que los organismos usan para obtener energía. Otro rol que ejercen los microorganismos se basa en su habilidad para reducir la fitotoxicidad de los contaminantes.

La FR es una alternativa de remediación ambientalmente amigable, visualmente atractiva, y que no modifica sustancialmente la estructura del suelo (Kuiper et al 2004).

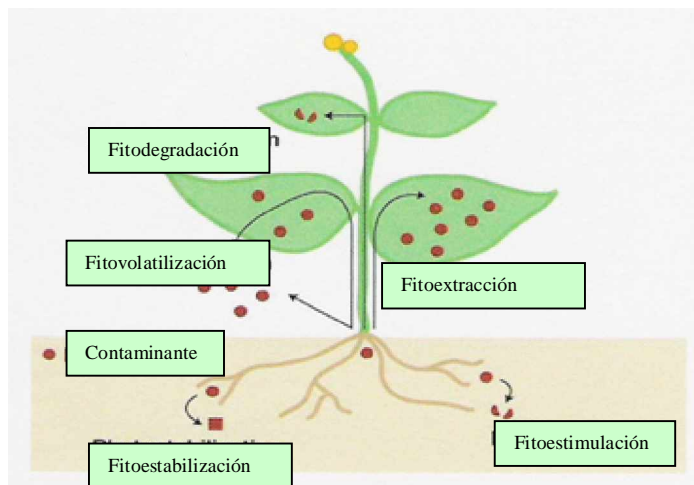
En términos de definición, la FR es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, secuestrar, detoxificar, degradar, contener o tornar inocuos a los contaminantes en suelos o aguas. Las plantas y sus raíces influyen en la degradación por alteración de las condiciones químicas y físicas del mismo. La exploración del suelo por parte de las raíces pone en contacto a plantas, microorganismos y nutrientes, con los contaminantes. Una característica muy positiva adicional de la implementación de la FR es que una rápida recomposición de la cobertura vegetal permite la estabilización y protección de los suelos, disminuyendo el riesgo de ocurrencia de los procesos de erosión hídrica y eólica, característicos de la Patagonia extrandina, y de todas las zonas áridas y semiáridas del mundo.

La FR agrupa a una serie de procesos naturales que realizan las plantas para "limpiar" los sitios contaminados, que se basan principalmente en tres procesos: remover, inmovilizar o degradar al contaminante presente en el suelo. La combinación de ella junto a otros métodos biológicos podría solucionar algunos de los problemas encontrados durante la aplicación de las técnicas por separado (Kuiper et al 2004). Las plantas y sus microorganismos asociados en el suelo pueden ser usados para la FR a través de diferentes mecanismos:

- § **Fitoestabilización:** involucra el uso de plantas para contener o inmovilizar contaminantes en el suelo (absorción y acumulación por parte de las raíces, la adsorción hacia las superficies de la raíz, o precipitación dentro de la zona de la raíz).
- § **Fitodegradación (fitotransformación o degradación directa):** involucra el rompimiento de la estructura de los contaminantes ya sea internamente, a través de los procesos metabólicos, o externamente, a través de la liberación de enzimas producidas por la planta en el suelo.
- § **Fitovolatilización:** captación y transpiración de un contaminante por parte de la planta con posterior liberación a la atmósfera.
- § **Fitoacumulación o fitoextracción** es el uso de plantas para limpiar contaminantes a través de su acumulación en tejidos cosechables.
- § **Rizorremediación (rizodegradación, biodegradación de la rizósfera, y biodegradación asistida de la planta):** destrucción de los contaminantes en el suelo como resultado de actividad microbiana que se refuerza en la presencia de la rizósfera.

Una vez dispuesto en el ambiente terrestre, el contaminante puede ser estabilizado o degradado en la rizósfera, secuestrado o degradado dentro del tejido vegetal, o volatilizado (Figura 1).

Figura 1. Modelo conceptual de posibles transportes del contaminante (círculo rojo) en la dinámica planta-suelo (adaptado de Pilon & Smits 2005).



Con la finalidad de poder interpretar claramente los términos utilizados en esta investigación, y debido a que aún algunos de estos términos se utilizan con diferentes interpretaciones según cada autor, indicamos en la sección anexo su significado en un glosario.

Las plantas y los microorganismos están involucrados directamente e indirectamente en la degradación o transformación de los contaminantes en productos que generalmente son menos tóxicos y con menor persistencia en el ambiente que el original. Las plantas y sus raíces influyen en la degradación por alteración de las condiciones químicas y físicas del suelo. La exploración del suelo por parte de las raíces pone en contacto a plantas, microorganismos y nutrientes, con los contaminantes.

Pero por otro lado la FR tiene limitaciones en el marco de las condiciones de ambientes áridos y semiáridos en las que se encuentran las cuencas hidrocarburíferas de la Patagonia, que son de importancia cuando se plantea la posibilidad de su uso. Kuiper et al (2004), y National Risk Management Research and Development (2000) sostienen que la técnica de la FR presenta algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de su implementación a una escala comercial. Estas son:

- § tiempo necesario para efectos aceptables: es más lenta que los métodos ex situ, ya que requiere un tiempo prolongado para limpiar el sitio (tiempos relativamente largos de tratamiento) especialmente con los contaminantes hidrofóbicos. Por ello no es una solución apropiada donde hay riesgos inmediatos para la salud humana.
- § limitada profundidad del sistema radicular: la descontaminación ocurre a poca profundidad, coincidente con la de las raíces.

- § lento crecimiento de las plantas
- § la sensibilidad a algunos contaminantes
- § el problema de formar parte de una cadena trófica: aunque los HC no pueden acumularse en gran cantidad en el tejido vegetal, puede haber potencialmente biomagnificación en la cadena trófica a través del consumo de plantas por parte de los animales.
- § la dependencia sobre los cambios en el clima y la dormancia invernal.

La limitada profundidad del sistema radicular es una característica de ambientes más húmedos, y/o de algunas especies vegetales de ambientes áridos y semiáridos de ciclo de vida anual, que crecen y se desarrollan durante el período en que el agua se encuentra disponible para su sistema radicular más superficial. La mayoría de los pastos perennes concentran la mayor proporción de su sistema radicular a una profundidad promedio de 30-50 cm, y los arbustos, el otro grupo de especies vegetales característico de estos ambientes, lo hacen a una profundidad mayor. Además, por lo observado en los trabajos que hemos realizado en la cuenca del Golfo San Jorge, los derrames de petróleo, en general, tienen una profundidad media de 20 a 30 cm (Luque et al. 1998 y 2000).

La característica de lento crecimiento de las plantas de estos ambientes, garantizan su supervivencia. Debido a la escasez de agua, las plantas no podrían sostener una tasa de crecimiento elevada. A su vez, esta característica va unida a la baja concentración de nutrientes en el suelo, principalmente nitrógeno, necesario para la formación de tejido vegetal. Por lo tanto, esta adaptación de las especies vegetales en zonas áridas debe tenerse en cuenta a la hora de planificar trabajos de fitorremediación.

Si el mecanismo por el cual una planta es fitorremediadora es la fitoacumulación o la fitodegradación, es decir, que el contaminante ingresa a la planta en su forma original o en un compuesto más simple, se corre el riesgo de incorporar al contaminante a la cadena trófica, y de esta manera, afectar a distintos organismos consumidores. Una alternativa para que ello no ocurra es la utilización de especies que no sean consumidas por la fauna menor o el ganado. Algunas de las plantas en estos ambientes presentan compuestos químicos que inhiben su consumo. Estos compuestos son generalmente metabolitos secundarios, derivados de los metabolitos primarios aunque más limitados en su distribución. Ejemplos de ellas son la presencia de ceras y resinas epicuticulares en plantas de crecimiento lento de zonas áridas.

Respecto a la dependencia sobre los cambios en el clima y la dormancia invernal de las especies vegetales, las especies de ambientes áridos y semiáridos perennes, que son las utilizadas principalmente en tareas de revegetación en la cuenca del Golfo San Jorge, son del tipo siempreverdes, es decir, que permanecen todo el año con follaje debido a distintos mecanismos de tolerancia a las bajas temperaturas y la escasa disponibilidad de agua. Ejemplo de ello son *Atriplex lampa*, *A. sagittifolia*, *Lycium chilensis*, *Grindelia chiloensis*, *Colliguaya integerrima* y *Senecio filaginoides*, estas tres últimas no consumidas por el ganado (Nakamatsu 2001).

Las tecnologías que utilizan los principios de la FR, y que son útiles para tratar una gran variedad de contaminantes, han sido evaluadas en nuestro país casi exclusivamente a escala de laboratorio para el tratamiento de suelos contaminados con HC de petróleo. La comprensión científica de estos fenómenos complejos y del papel que los microorganismos y los distintos sistemas biológicos desempeñan en ellos es esencial para revertir los daños que pueden ocasionar los distintos tipos de contaminación.

Desde inicios de la década de los 90, la EEA Chubut del INTA incorpora dentro de sus líneas de trabajo la rehabilitación de sitios disturbados por la actividad petrolera. Mientras la producción ovina (principal actividad agropecuaria en Patagonia) utiliza los pastizales naturales como fuente de alimento, la actividad petrolera interactúa con ellos en las etapas de exploración, extracción y transporte.

Mediante prácticas de biolabranza y bioestimulación in situ a nivel extensivo (Luque et al. 1996; Ciano et al. 2000, 2001; Nakamatsu et al. 2001) fue posible disminuir el contenido de HC de petróleo en suelo, y facilitar la posterior revegetación con especies autóctonas, con lo que se inició el proceso de recomposición de la estructura y funcionalidad del ecosistema a escala de paisaje, enfoque y técnicas muy poco utilizadas en Argentina (Zuleta et al. 2003; Li Puma et al. 2004; Fuchs et al. 2005.b).

Las diferentes empresas petroleras que operan en el Golfo San Jorge (tanto en Chubut como Santa Cruz) fueron incorporando estas prácticas. Estos resultados alentadores nos permitieron vislumbrar como paso siguiente el abordaje a la temática de la fitorremediación, para comprender a nivel de sistema qué sucede con los contaminantes que quedan en el suelo, y si la presencia de vegetación ayuda a degradarlos.

2.3. Química de hidrocarburos con relación a la degradación

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de HC, es decir, de compuestos ricos en Carbono e Hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como Azufre, Oxígeno y Nitrógeno, así como trazas de metales. Se la denomina compleja, porque dada la capacidad del átomo de Carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas o ciclos. Las cadenas se conocen como compuestos Alifáticos, y consisten en sucesiones de átomos de Carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) formando cadenas abiertas.

Los Alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como Parafinas (

Tabla 1). Son compuestos saturados de cadena abierta cuya fórmula molecular es C_nH_{2n+2} . El HC más simple es el metano CH_4 ($n = 1$). Los HC de cadena lineal se denominan HC normales. Los primeros cuatro miembros del grupo son gases a presión y temperatura ambiente; los miembros intermedios son líquidos, y los miembros más pesados son semisólidos o sólidos, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 Carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos.

Los Alcanos y los Aromáticos son las fracciones predominantes en los compuestos del petróleo. Con respecto a su biodegradabilidad en líneas generales los n-alcanos, n-alcaliaromáticos y los Aromáticos de C_{10} a C_{22} son los más fácilmente biodegradables. En cambio los n-alcanos, n-alcaliaromáticos y los Aromáticos de más de C_{22} tienen muy baja solubilidad en agua, y debido a que se presentan en estado sólido a temperaturas fisiológicas, son de muy lenta transformación por los microorganismos (Calabrese & Kosteci 1993).

Tabla 1. HC normales de cadena lineal - Alcanos.

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
Metano	$C_1 H_4$	Octano	$C_8 H_{18}$
Etano	$C_2 H_6$	Nonano	$C_9 H_{20}$
Propano	$C_3 H_8$	Decano	$C_{10} H_{22}$
Butano	$C_4 H_{10}$	Undecano	$C_{11} H_{24}$
Pentano	$C_5 H_{12}$	Dodecano	$C_{12} H_{26}$
Hexano	$C_6 H_{14}$	Elcosano	$C_{20} H_{42}$
Heptano	$C_7 H_{16}$	Tricontano	$C_{30} H_{62}$

Los HC cíclicos pueden ser Saturados, donde varios carbonos se unen entre sí por medio de enlaces sencillos, o pueden ser aromáticos, donde algunos Carbonos del ciclo están unidos por enlaces dobles. Los ciclos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o Naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo.

Los compuestos aromáticos pueden ser de dos tipos: los aromáticos volátiles bencénicos y los poliaromáticos (PAH's). Los aromáticos volátiles bencénicos son derivados del benceno, el cual es un anillo de seis átomos de carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces dobles alternados (anillo aromático). Los aromáticos bencénicos pueden presentar uno o varios anillos fusionados. El benceno, tolueno, etilbenceno y los xilenos (BTEX) son los aromáticos volátiles de un anillo bencénico más analizados debido a su movilidad y toxicidad ambiental (Tabla 2.HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX)).

Tabla 2.HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX).

Nombre	Fórmula Molecular
Benceno	$C_6 H_6$
Tolueno (metilbenceno)	$C_7 H_8 (C_6 H_5 CH_3)$
Etilbenceno	$C_8 H_{10} (C_6 H_5 CH_2 CH_3)$
Xilenos (m,p,o dimetilbencenos)	$C_8 H_{10} (CH_3 C_6 H_4 CH_3)$

Los HC Policíclicos Aromáticos (PAH's) comprenden del 10 al 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas. La familia de los HC aromáticos policíclicos (PAH's) es un grupo de HC que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados. La mayoría de los PAH's contienen habitualmente anillos de benceno fusionados aunque hay que tener en cuenta la existencia de PAH's basados en estas estructuras que contienen grupos alquilo. Existen más de 100 grupos de PAH's diferentes. Los PAH's se consideran compuestos orgánicos persistentes, por lo que pueden permanecer en el medioambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas. Las propiedades semivolátiles de los PAH's les otorgan gran movilidad en el medioambiente. Los principales impactos de los PAH's en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir, causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los más potentes carcinógenos son el benzo(a) antraceno, benzo(a) pireno y el dibenzo (ah) antraceno.

La EPA seleccionó 16 PAH´s como agentes contaminadores prioritarios (Tabla 3). Estos están constituidos por 2 ó más anillos bencénicos de forma simple o múltiple formando cadenas o racimos. Cuanto más anillos tenga el compuesto, mayor será la resistencia a la actividad degradatoria o enzimática. En general, los PAH´s de 4 y 5 anillos son más difícilmente removidos mientras que los de menor peso molecular son más biodegradables, más solubles en agua y más volátiles que de los de mayor peso molecular.

Tabla 3. HC Poliaromáticos (PAH´s) seleccionados por la EPA

Nombre	Fórmula	Nº anillos	Nombre	Fórmula	Nº anillos
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	2	Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂	4
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	3	Criseno	C ₁₈ H ₁₂	4
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	3	Benzo(b)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	3	Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	3	Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	5
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	3	Dibenzo(a,h)antraceno	C ₂₂ H ₁₄	5
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	4	Benzo(ghi)perileno	C ₂₂ H ₁₂	5
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	4	Indeno(1,2,3-cd)pireno	C ₂₂ H ₁₂	6

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

- § Cuantificar la efectividad de cuatro especies vegetales como herramienta para rehabilitar suelos contaminados con HC de petróleo en condiciones ambientales patagónicas.

2.4.2. Objetivos específicos

- § Determinar la tolerancia de las especies ensayadas a los sustratos contaminados con HC.
- § Evaluar el efecto combinado de la bioestimulación (adición de nutrientes) con la FR.
- § Comparar el desempeño de la atenuación natural con la efectividad de las técnicas de rehabilitación ambiental.
- § Establecer indicadores químicos y biológicos de degradación de HC.
- § Formular recomendaciones para el manejo ambiental en yacimientos de petróleo, con énfasis en ecosistemas áridos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Esta investigación se realizó, entre Octubre 2006 y Octubre 2007, en las instalaciones de la Unidad de Viverización de Especies Nativas de la EEA INTA, ubicada en la ciudad de Trelew (Provincia de Chubut), Latitud: 43° 15' Sur y Longitud: 65° 18' Oeste.

La región posee un clima árido desértico según la Clasificación de Thorthwaite. Las precipitaciones son escasas, con un promedio anual de 182 mm (1971-2007), dándose los máximos entre marzo a mayo y los mínimos en agosto y septiembre. La amplitud térmica tanto diaria como anual es notoria. Los vientos predominantes son del sector oeste, con mayor intensidad, velocidad y frecuencia desde comienzos de la primavera hasta fines del verano. La evaporación es alta. Presenta picos en los meses estivales favorecidos por los vientos y las altas temperaturas. La humedad relativa ambiente es baja, con un porcentaje de humedad medio anual de 59%, bajando en el verano hasta un 30% y aumentando en el invierno hasta un 70%. El clima zonal reconoce un desequilibrio entre el agua que accede por lluvias y la que pierde por evaporación. Para 182,4 mm/año que llueven se contraponen una evaporación de 1240,4 mm/año. El balance hídrico resulta negativo durante todo el año, excepto durante el invierno en que al disminuir la evaporación comienza la reposición de humedad en el suelo, pero no alcanzando a evidenciarse un excedente de agua. En la sección anexo se presenta una sinopsis (Tabla 28) de las características climáticas destacadas de la región en donde se realizó el experimento.

El ambiente del suelo en la Patagonia central en general posee bajo contenido de materia orgánica, déficit de nutrientes especialmente Nitrógeno y Fósforo, bajo contenido de humedad y bajas temperaturas en ciertas épocas del año. Estas condiciones determinan la presencia de comunidades bacterianas muy específicas en los suelos de la región.

3.2. Diseño experimental y materiales

3.2.1. Suelo

El suelo utilizado fue extraído de la zona petrolera, específicamente de los cañadones costeros de Comodoro Rivadavia. Se tamizó con una malla de 3 mm x 19 mm de tamaño de poro, que permitió eliminar las gravillas y la gran mayoría los restos de material vegetal (partículas leñosas, raicillas y hojas). Se homogeneizó todo el material, y se extrajeron cinco submuestras para caracterizarlo.

Es un suelo de textura arenoso franco, con predominio de la fracción Arena, de pH débilmente alcalino, sin limitaciones por salinidad ni por sodicidad, y de infiltración rápida (Tabla 4 A), con una pobre fertilidad en general, solo se halla bien provisto en Potasio (Tabla 4 B). Los suelos de la Patagonia central se caracterizan por su bajo contenido de nutrientes.

Su contenido natural de HC fue del 0,02 %, lo que representa un "blanco" prácticamente libre del citado componente. De hecho el método que se utilizó para determinar HC, gravimétrico, también evalúa sin hacer separación del material orgánico de origen vegetal, que puede ser el origen de este contenido encontrado en el "blanco". En la corrida cromatográfica (Figura 2) se encontraron tres HC normales resueltos: nC₂₉, nC₃₃, nC₃₄ y nC₃₅ cuya sumatoria es de 13,9 mg/kg.

No contiene HC Poli aromáticos, denominados PAH's. De Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX) solo se encontraron trazas de tolueno, m-p-xileno y o-xileno (Tabla 4 C)

Tabla 4. Atributos del suelo utilizado para la preparación del sustrato.

A- Propiedades fisico-químicas

pH (1:2,5)	Salinidad (mmhos/cm)	P.S.I.	Textura	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Permeabilidad
7.2	0.44	1.21	Arenoso	82	6	12	Extremadamente rápida

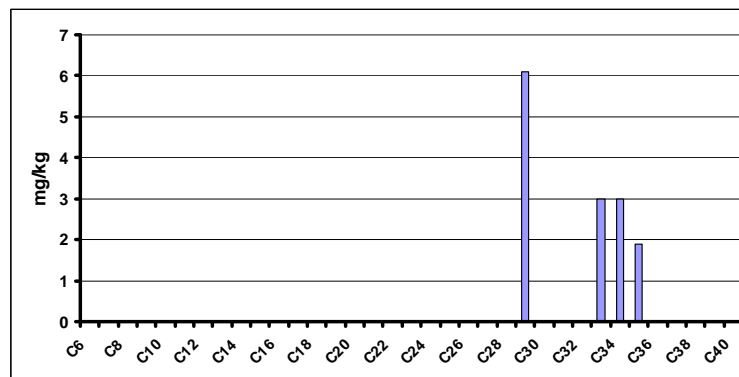
B- Características de fertilidad.

Materia Orgánica (%)	Nitrógeno Total (%)	Fósforo Disponible (ppm)	Potasio Intercambiable (meq/100 gr)
1.43	0.102	10,31	1.84

C- Concentración (mg/kg) de HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX).

Benceno	Tolueno	Etilbenceno	m,p-xilenos	o-xileno
<0,05	0,07	<0,05	0,15	0,09

Figura 2. HC normales resueltos en el suelo utilizado.



3.2.2. Hidrocarburos

El HC utilizado en el experimento, denominado "petróleo Cañadón" que es el típico de la cuenca del Golfo San Jorge, incluía un contenido de agua promedio del 10,6%. Estaba conformado por un neto predominio de la fracción Saturados (Fracción I), más del 50%, seguido de la fracción Aromáticos (Fracción II) y en menor proporción los Recalcitrantes (Fracción III) (Tabla 5). En el punto 3.6 se dan detalles del concepto fracciones hidrocarburíferas.

La corrida cromatográfica muestra que predominan las fracciones mas livianas, desde C₆ hasta C₁₈, aunque contiene también fracciones de cadena larga hasta C₄₀ (Figura 3). Se trata de un petróleo

denominado mixto, con una densidad de 0.83 g/ml, o sea de características intermedias entre un petróleo asfáltico (negros, viscosos y de elevada densidad (0,95 g/ml en la destilación primaria y producen poca nafta con abundante fuel oil, quedando asfalto como residuo) y parafínico (de color claro, fluidos y de baja densidad, 0,75 a 0,85 g/ml, cuyo rinde en nafta es mayor que los asfálticos).

En los Aromáticos volátiles bencénicos simples (BTEX) predomina el Tolueno, conformando el 54 % del total (Tabla 6). Fenantreno, Benzo(a) Antraceno, Criseno y Naftaleno conforman el 61,5 % del total de los 16 HC Poliaromáticos (PAH´s) medidos en este petróleo (Tabla 7).

Tabla 5. Fracciones hidrocarburíferas del petróleo utilizado en el experimento.

Fracción I	Fracción II	Fracción III		SUMATORIA
Saturados	Aromáticos	Asfaltenos	Resinoides	
mg/kg				
441106	266019	1664	129619	838.408
441106	266019	131283		838.408
En porcentaje (%)				
52,6	31,7	15,6		100

Tabla 6. HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX) en el petróleo utilizado para el experimento.

BTEX (mg/kg)				
Benceno	Tolueno	Etilbenceno	M,p-xilenos	o-xileno
230	1152	209	369	174

Tabla 7. HC poliaromáticos (PAH´s) en el petróleo utilizado para el experimento.

PAH´s (mg/kg)							
Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno
24,3	0,1	3,1	17,7	59	17,7	10,3	17,7
Benzo(a) antraceno	Criseno	Benzo(b) fluoranteno	Benzo (k)fluoranteno	Benzo(a) Pireno	Dibenzo (a,h) antraceno	Benzo (g,h,i) perileno	Indeno (1,2,3-cd) Pireno
36,4	27,2	3,7	3,3	15,4	2,9	0,1	0,1

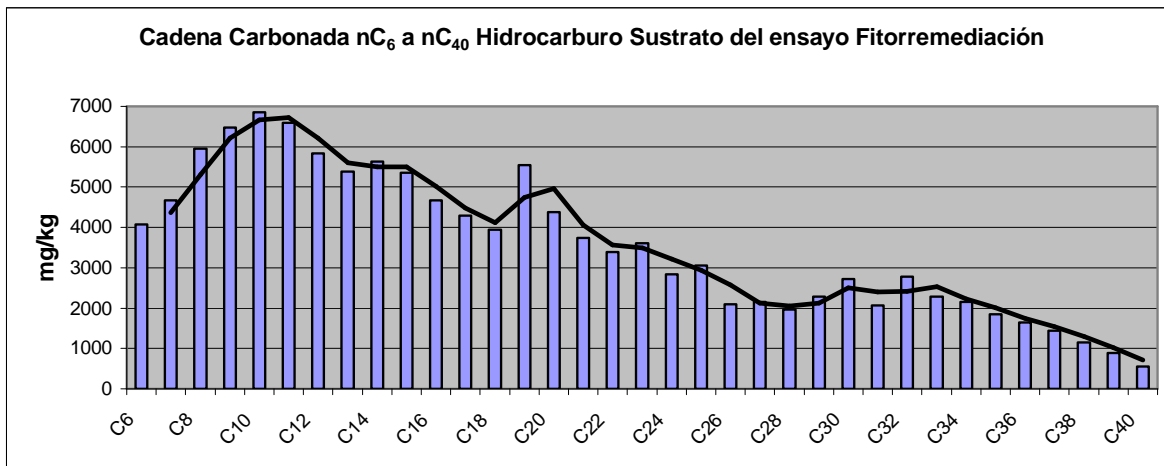
3.2.3. Preparación del sustrato

Se mezcló hasta la homogeneidad el suelo con aproximadamente 5 a 7 % en peso de HC fresco con un rango de cadenas carbonadas desde C5 a C40, manualmente hasta obtener un sustrato homogéneo.

El contenido inicial de HC en el sustrato era del 4.1% (+ 0,12) sobre suelo seco (41.000 mgs/kg de HC sobre suelo seco). Este contenido representaría el nivel adecuado para iniciar un tratamiento

de FR luego de haber llegado a ese nivel mediante la técnica de degradación por laboreo y agregado de nutrientes.

Figura 3. Distribución relativa de la cadena carbonada del petróleo utilizado en el experimento.



3.2.4. Especies vegetales

Se utilizaron cuatro especies de ciclo de vida perenne: dos nativas y dos exóticas.

§ Especies que componen la flora nativa patagónica, utilizadas en plantaciones de suelos empetroados, con buenos establecimientos a campo:

- Botón de Oro (*Grindelia chiloensis*)
- Charcao (*Senecio filaginoides*)

Grindelia chiloensis es una planta psamófila, de la familia Compuesta, nativa de las zonas de estepa patagónica de Chile y de Argentina (desde la provincia de San Juan hasta Santa Cruz). Su distribución geográfica abarca toda la franja árida y semiárida denominada como Monte, estando presente en los ambientes en que se encuentran las cuencas hidrocarburíferas de las provincias de Santa Cruz, Chubut, Neuquén y Mendoza. Es buena colonizadora y abunda en áreas disturbadas, como ser al costado de los caminos y superficies con suelo superficial decapitado. Es una perenne siempreverde, arbusto sufrútice (planta ramificada desde la base, leñosa abajo y herbácea en la superior), con tallo erecto ramificado, redondo y esponjoso, que alcanza 30 a 100 cm de altura, muy resinoso, con ramas ascendentes que terminan en una inflorescencia. Las hojas son de color verde claro lanceoladas, alternas y finamente dentadas. Los capítulos florales son amarillos, grandes y terminales. El fruto es un aquenio, y las semillas las lleva el viento (Vilela, 2007). Produce resinas diterpénicas que se producen en glándulas epicuticulares (Ravetta y McLaughlin, 1997; Ravetta y Soriano, 1999), insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos, que la hace no apetecible ó palatable para los animales con lo que resulta adecuada para evitar el pastoreo en las tareas de revegetación.

El charcao o mata mora (*Senecio filaginoides*) es una especie botánica de la familia de las Asteraceae. Se trata de una especie perenne y conserva todo el año sus hojas. El período de mayor crecimiento es Octubre-Noviembre. Es un arbusto que raramente sobrepasa los 50 a 60 cm de altura. Posee numerosas ramas. Todas ellas, al igual que las hojas, tienen una gran densidad de pelos ramificados o simples, lanosos. La raíz principal es vertical, no profunda, con corteza de color castaño rosado, fácilmente descascarable. Las flores de color amarillo, se encuentran agrupadas formando cabezuelas o capítulos; florece con gran intensidad en Enero y fructifica en Febrero. Esta especie es típica del Distrito Occidental patagónico. Su valor forrajero es prácticamente nulo. Desde este punto de vista se la considera una especie indeseable (es raro observar matas de *Senecio* comidas y, en tal caso, lo más probable es que sea comida por algunos caballos o guanacos). Se propaga agresivamente como toda especie colonizadora en suelos deteriorados por sobrepastoreo o procesos erosivos. Se la puede utilizar como indicadora de lugares degradados cuando hay gran cantidad de matas (Arce y González, 2000; Ramírez y Beloso, 2002).

- § Especies gramíneas exóticas perennes muy utilizadas en Patagonia en la restauración de suelos degradados (Ciano et al. 1998; 2000 y 2001).
- **Agropiro alargado (*Thynopiron ponticum*)**
 - **Elymus (*Leymus racemosus* subespecie *sabulosus*).**

Thynopiron ponticum es una gramínea perenne, de buen desarrollo, rústica, resistente a la sequía y a la salinidad. Muy utilizada en Patagonia como pastura en suelos de mala calidad, y en la recuperación de mallines degradados. Resiste las bajas temperaturas por lo que, entre el otoño y principios del verano, obtiene su mejor producción. Es ideal para suelos anegadizos y bajos. Tiene un hábito de crecimiento cespitoso, muy macollador, forma matas densas. Llega a medir 70 a 180 cm de altura cuando florecidas. Su sistema radicular es profundizante. Su follaje es de hojas largas, rígidas, color verde o glauco, menores de 10 mm de ancho con nervaduras muy marcadas, especialmente la central. Fue sembrada en mallines que presentaban contaminación con petróleo, presentando buenos establecimientos (Ciano et al, 1998; 2000; 2001).

El *Elymus* (*Leymus racemosus* subespecie *sabulosus*) es una gramínea perenne, rizomatosa, ampliamente utilizada en Patagonia para siembra de médanos, pavimentos de erosión, picadas de la actividad petrolera, etc., e introducida por INTA en la década del '70. Hay numerosos trabajos relativos a la adaptación excelente de esta especie para controlar la desertificación en Patagonia (Castro, Salomone y Reichart, 1983; Becker, Bustos y Marcolín, 2001; Guitart y Botaro, 2001, Utrilla y Alvarez, 2004). En las Provincias de Chubut y Santa Cruz se han sembrado más de 5.000 hectáreas de esta forrajera convirtiéndose en la especie más sembrada en condiciones de secano en la patagonia austral. Produce buena cantidad de semilla fértil y se establece en lugares con precipitaciones desde 180 mm/año.

3.2.5. Fertilización

Los suelos de la cuenca del Golfo San Jorge, y de las otras cuencas hidrocarburíferas que se encuentran en zonas áridas y semiáridas, son pobres en su fertilidad por lo que la provisión mediante una fuente externa o sea la adición de nutrientes, por las deficiencias acentuadas

particularmente de Nitrógeno y Fósforo (Luque et al 1994; Pucci et al 2000) es de gran importancia.

Se fertilizó la mitad de las macetas a fin de lograr el desarrollo de la vegetación y aumentar la degradación. Se aplicó una dosis de 60 unidades de Nitrógeno y 60 de Fósforo, dividido en dos aplicaciones, al inicio del experimento (Octubre 2006) y en Enero 2007. Esta misma cantidad se aplicó con excelentes resultados en ensayos y trabajos de biodegradación en la cuenca hidrocarburífera del Golfo San Jorge (Luque et al 1996; Luque et al 1998; Ciano et al 2000; Luque et al 2000_a; Luque et al 2000_b; Nakamatsu et al 2001; Ciano et al 2002). Pucci et al (1995b) encontraron en suelos de la cuenca petrolera del Golfo San Jorge que la cantidad de nutrientes bacterianos presentes varía con márgenes muy amplios y en general deben de agregarse manteniendo un balance tal que no excedan los límites a partir de los cuales comienzan a ser tóxicos sobre los microorganismos. Ubochi et al (2006) también obtuvieron adecuada degradación de HC con la misma dosis de fertilizantes agrícolas. Los fertilizantes utilizados fueron Urea (46 % de Nitrógeno) y Superfosfato triple de Calcio (0:46:0 con 46 % de Fósforo). Ambos fertilizantes son fertilizantes comunes en uso agrícola, son totalmente utilizables por los microorganismos y muy económicos

3.2.6. Riego

Manteniendo una humedad constante eliminamos el factor sequía o variabilidad en las precipitaciones como "ruido", y aceleramos los procesos metabólicos en el suelo y en la planta.

El transporte y biodegradación de los HC es afectado por el agua contenida en el suelo: la transpiración de las plantas y el movimiento asociado del agua favorecerán la biodegradación, y movilizarán y acumulará los contaminantes cerca de la superficie. Además se busca el efecto máximo potencial que puede realizar la planta sin la limitante del agua. Karthikeyan et al (2003) y Lewis et al (2001) demostraron que el transporte y la biodegradación de HC es afectado positivamente por el agua en el suelo y sugieren que la transpiración de las plantas y el movimiento del agua asociada favorecen la degradación al concentrar el contaminante cerca de la superficie del suelo. Mientras que Dible and Bartha (1979) y Alexander (1994) sostienen que la disminución en el contenido de humedad en el suelo produce la disminución de la tasa de degradación como resultado de un inadecuado suplementación de agua para sostener la proliferación, ó el metabolismo de las colonias microbianas degradadoras, o ambos.

En función de su textura y capacidad de retención de agua teórica, se estimó un contenido de agua para alcanzar una capacidad de campo del 20 %. Estas determinaciones se realizaron por pesajes periódicos de 15 macetas. Por lo tanto, se agregó a cada maceta 1.250 cm³ de agua, que aseguró la homogenización de la humedad en todo el perfil del sustrato contenido en la maceta. Además, se utilizó como criterio la observación del vigor de las plantas al mediodía, momento en que la evaporación es máxima. En el caso que las plantas presentasen pérdida de vigor (evidenciado por decaimiento) se realiza un riego tipo lluvia para compensar el desbalance temporario.

Inmediatamente después de regar un suelo, éste se satura, es decir, todos los poros se llenan completamente de agua. Sin embargo, al cabo de 2-3 días, si el suelo tiene buen drenaje, aproximadamente la mitad de esta agua se escurre por gravedad. En este momento, las partículas de tierra mantienen agua adherida en toda su superficie, pero también queda bastante aire entre ellas. Se dice entonces que el suelo está en su "capacidad de campo", es decir, con el máxima de

agua que puede retener después de eliminarse el agua de drenaje. Esta agua es la que utilizan las plantas.

3.2.7. Factores evaluados

Para evaluar la capacidad fitorremediadora de las especies seleccionadas se diseñó un experimento factorial siendo los factores de interés: especies vegetales (cinco condiciones: cuatro especies y testigo) y fertilización (con o sin). Se utilizaron tres réplicas por condición, dando un total de 30 (5 x 2 x 3) unidades experimentales.

La fertilización presenta dos niveles:

- § Fertilizado (60 unidades de Nitrógeno y 60 de Fósforo) (F)
- § Testigo (Sin fertilización) (NF)

En todos los casos la unidad experimental fue cada maceta. Se evaluaron tres repeticiones por tratamiento en cada momento de muestreo (dos momentos de muestreo finales), totalizando 60 macetas o unidades experimentales.

Adicionalmente, para evaluar el efecto limitante del HC en el suelo, se comparó la producción de biomasa aérea de las diferentes especies sobre suelos con o sin presencia de HC. Para ellos se llenaron 24 macetas con el suelo utilizado en el experimento, pero sin agregado de HC, se fertilizaron la mitad de las macetas y no se fertilizaron las restantes, allí se plantaron las mismas especies del ensayo, habiendo tres repeticiones por cada una (4 especies x 2 tratamientos de fertilización x 3 repeticiones).

3.2.8. Plantación en macetas

Mediante el uso de macetas se podía analizar como se modifican las condiciones del suelo entre y alrededor de la masa de raíces, en condiciones controladas.

Las macetas, de cinco litros de capacidad, se ubicaron en el exterior del vivero, protegiendo las mismas con media sombra en caso de lluvia y en las horas del mediodía en los días de calor intenso. Se llenaron con el sustrato previamente preparado, a las que se les colocó una bolsa de polietileno, a fin de evitar la producción de lixiviado, controlar el crecimiento de las raíces y facilitar la extracción del sustrato de las macetas al momento de los muestreos. Las macetas no presentan orificios de drenaje a fin de asegurarnos que los cambios en la composición del suelo no son debidos al lavado y lixiviación de los compuestos presentes inicialmente. En cada maceta se agregó 5 kg de suelo (densidad final de 1 a 1,2 g/cm³).

En cada maceta se colocaron cuatro plantas de cada especie, con la finalidad de asegurar una exploración radicular del sustrato homogénea y abundante. El repique de las plantas (de dos meses y medio) a las macetas se realizó a fines de octubre del 2006. Las semillas de las especies utilizadas se habían puesto a germinar en bandejas de tubetes (speelding), con celdas individuales pequeñas (10 a 20 cc) rellenas con arena dentro del invernáculo, para posteriormente las plantas ser repicadas a las macetas con suelo empetroado. Todas las especies germinaron a los 5 a 10 días de sembradas.

3.2.9. Muestreo del sustrato

Se evaluó la evolución del contenido total de HC y otros componentes en el tiempo, mediante tres momentos de muestreo:

T1. Octubre 2006. Al inicio del experimento sobre el sustrato homogeneizado antes de llenar las macetas.

T2. Abril 2007. A los 180 días de iniciado el experimento.

T3. Octubre 2007. A la finalización del experimento, o sea a los 350 días de iniciado.

En el primer momento de muestreo (T1), una vez preparado el sustrato y antes de colocarlo en las macetas, se extrajeron 5 muestras compuestas de aproximadamente 2 kg. de sustrato cada una. La muestra compuesta se extrajo con un barreno tipo sacabocado que fue muestreando el montículo de sustrato.

En los siguientes momentos de muestreo (T2 y T3) se extrajo una muestra individual por maceta. El procedimiento metodológico en cada momento de muestreo fue el siguiente:

- a Al azar, por sorteo, se eligieron tres de las seis repeticiones (macetas).
- b Se retiró el pan de tierra de la maceta y se volcó el contenido en una bandeja y se deshicieron los terrones.
- c Se separaron manualmente la mayor cantidad posible de raíces y raicillas, con la menor cantidad de sustrato adherido posible, y se colocó en bolsas de polietileno identificadas.
- d Se separó la tierra proveniente de las bandejas de germinación (speelding) contenidas en la maceta para no contaminar el sustrato con petróleo durante el muestreo.
- e El sustrato, con un bajo contenido de humedad, se tamizó por malla de 5 mm, separando las raíces y gravillas que quedaban retenidas. Luego se envasó en frascos de 350 cm³ llenándolo hasta el borde y ejerciendo una suave presión compactando, y se agregó algodón de tal modo que no quedase cámara de aire entre la muestra y la parte inferior de la tapa. Inmediatamente después se guardó en freezer a 3-4 °C. Las raíces se adjuntaron a las que se habían recolectado durante el desterronado del sustrato.
- f Los frascos con las muestras de sustrato se remitieron al laboratorio, colocados en heladera de tergopol con abundante gel refrigerante para no cortar la cadena de frío, en donde se realizaron las determinaciones correspondientes.

3.2.10. Muestreo de biomasa aérea y radicular

La elección de las tres repeticiones a muestrear en cada fecha (T2 o T3), de las seis disponibles en el experimento, se realizó mediante sorteo, al azar.

De cada maceta se cortó la totalidad de la biomasa aérea y se colocó en bolsas de polietileno identificadas, que se almacenaron en freezer, a una temperatura de 3 a 4 °C, hasta el momento de su procesamiento. Lo mismo se realizó con la biomasa de raíces, una vez que se limpiaron del sustrato. Para la determinación de la materia seca (MS), se colocó el material vegetal en estufa a 60° C hasta obtener un peso constante, que se alcanzó aproximadamente a las 72 horas y se pesó en balanza de precisión.

3.3. Análisis químicos

Se realizaron determinaciones analíticas de: Cuantificación de los HC por el método gravimétrico y por el método de inyección directa CG-FID; cuantificación de las fracciones hidrocarburíferas mediante el método SARA; identificación y cuantificación de los HC Saturados normales, evaluación de MCNR; Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX); 16 PAH´s que contempla la legislación, y de los alcanos isoprenoides Pristano y Fitano.

§ **Cuantificación de los HC Totales de Petróleo (HC) por el método gravimétrico (Método EPA SW-846 3540, USEPA, 1992).** La extracción por Soxhlet es muy antigua pero muy eficiente y esta ampliamente difundida: el solvente, cloroformo, es calentado y recirculado continuamente a través de una muestra de suelo por 16 a 24 horas. A continuación se reduce el solvente hasta sequedad para luego pesar el material extraído. En este método se extraen preferentemente las fracciones pesadas ya que en la metodología se pierden los volátiles. El dato brindado por el laboratorio es materia extraíble por Soxhlet, que incluye otros constituyentes del petróleo, como así también materia orgánica del sustrato.

§ **Método de inyección directa CG-FID para determinar HC.** Es un método cromatográfico, el cual consiste básicamente en inyectar toda la muestra cruda a partir de la extracción con diclorometano (más detalles del método en anexo) extrayendo preferentemente las fracciones livianas dado que el otro método pierde gran parte de las mismas. Mediante este método de inyección directa CG-FID se reconocen las mismas fracciones pero en forma conjunta sin necesidad de realizar técnicas de tratamiento y separación previas.

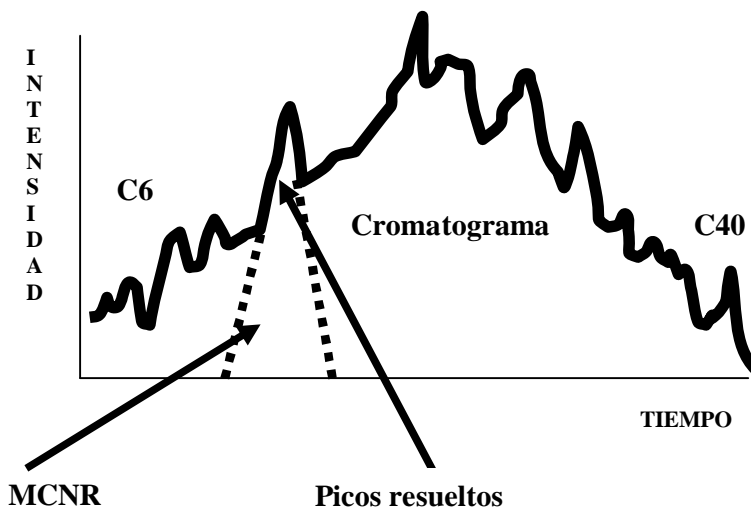
§ **Cuantificación de las Fracciones hidrocarburíferas, a través del método SARA (Saturados, Aromáticos, Resinoides, Asfaltenos).** Este es un método analítico que cuantifica HC como fracciones discriminadas separando los constituyentes hidrocarbonados en cuatro fracciones. La técnica separa inicialmente los Asfaltenos por precipitación con n-pentano o n-heptano, y luego el resto de los componentes por cromatografía de columna abierta, donde cada una de las fracciones se cuantifican gravimétricamente una vez evaporado el solvente de elusión. Las fracciones obtenidas por este método son útiles en la caracterización de compuestos y en las variaciones de su composición. Este tipo de fraccionamiento permite poder determinar las diferentes velocidades de degradación de cada uno de estos grupos utilizando los componentes reales de un petróleo y no HC aislados que si bien presentan una buena aproximación, no revelan la situación real de un residuo frente a una comunidad bacteriana.

§ **Identificación y cuantificación de los HC Saturados Normales.** A partir de la inyección directa se obtiene la serie homóloga n-C₆ a n-C₄₀ por Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama GC-FID. Estos compuestos son los más simples estructuralmente y más fácilmente degradables. A su vez, dentro de los Saturados, los n-alcanos o normales son los más simples y fáciles de degradar. Esta determinación nos permite identificar y cuantificar los n-alcanos más relevantes dentro de lo que es la degradación de los componentes hidrocarburíferas, por lo cual permite evaluar la eficacia de un tratamiento biológico al comparar la evolución cromatográfica de los HC en el tiempo.

§ **Cuantificación de Mezcla Compleja No Resuelta (MCNR)** Se obtiene los datos a partir del método de inyección directa, por Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC- FID). Los Hidrocarburos Saturados son una mezcla de compuestos orgánicos que involucra compuestos aromáticos y alifáticos, y dentro de estos últimos por ejemplo cicloalcanos, alcanos ramificados y otros compuestos que no pueden ser resueltos por la

columna capilar y que aparece como una "loma" en el cromatograma (Figura 4), por debajo de los compuestos resueltos. El índice de MCNR se calcula a partir del área en el cromatograma que se ubica por debajo de los picos resueltos.

Figura 4. Picos resueltos y fase Mezcla Compuesta No Resuelta (MCNR) en una corrida cromatográfica



§ **Identificación y cuantificación de BTEX.** Se analizaron los componentes aromáticos (BTEX) a partir de los cromatogramas obtenidos por el método de inyección directa.

§ **Identificación y cuantificación de los 16 HC Aromáticos Policíclicos (PAH's, sigla utilizada de su traducción al inglés)** considerados prioritarios por la EPA y otros organismos de salud internacionales. La determinación se realizó por cromatografía líquida (HPLC) – EPA 8310.

§ **Identificación y cuantificación de los alcanos isoprenoides Pristano y Fitano** como biomarcadores. Una forma de complementar los resultados analíticos de HC totales es realizar un seguimiento de la eficiencia de biorremediación por medio del análisis de biomarcadores o trazadores ampliamente utilizados.

Índices de degradación

1.- Los parámetros Pristano/Hidrocarburo normal de 17 átomos de carbono (Pr/nC_{17}) y Fitano/Hidrocarburo normal de 18 átomos de carbono (Fi/nC_{18}). Estos índices dan idea del avance de la biodegradación. Los compuestos Pr y Fi son isoprenoides, HC saturados ramificados, llamados biomarcadores resistentes a los procesos de degradación. Los hidrocarburos normales de 17 y 18 átomos de Carbono son HC saturados lineales. Los procesos biológicos degradan

primero a los HC normales, luego con menor eficiencia a los aromáticos y finalmente a los ramificados isoprenoides, ó sea a los considerados biomarcadores. A medida que aumenta los índices Pr/nC₁₇ y Fi/nC₁₈ hay una tendencia creciente de la actividad de degradación. La bibliografía sobre este tema cita que se consideran valores umbrales de biodegradación relaciones de 0,5 y 0,3 respectivamente (Lee et al 1993; Luque et al 2000; Wang et al 1998, 1999; Ortiz et al 2003).

La base del uso de estos coeficientes se basa en que por un lado la mayor parte de los procesos (meteorización física, lixiviación) no producen pérdidas acusadas de HC ramificados y alifáticos, y por otro, los alcanos ramificados se biodegradan a distinta velocidad que los alcanos lineales, que en general es más rápida en los primeros (Prinik et al 1977; Mueller et al 1992).

2.- "Tasa de Degradación", a partir del contenido de HC por el método gravimétrico. Se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Tasa (\%)} = \frac{\text{CI HC} - \text{CFHC}}{\text{CI HC}} * 100$$

Siendo:

Tasa (%) = tasa de degradación de HC (%)

CIHC = Concentración inicial de HC (% ss)

CFHC = Concentración final de HC (%ss)

Luego de obtenida la tasa de degradación ha de compararse con los coeficientes Pr/nC₁₇ y Fi/nC₁₈ como indicadores de velocidad de degradación en función del tiempo.

En la Tabla 8 se presenta un esquema que resume las determinaciones realizadas, en función de los distintos componentes del HC presente en el sustrato, y en la Tabla 9 las determinaciones analíticas en relación a los momentos de muestreo en que se realizaron.

Tabla 8. Determinaciones analíticas realizadas sobre las muestras provenientes del ensayo.

Parámetro	Método
HC totales	Soxhlet. EPA 3540.
Fraciones hidrocarburíferas.	S.A.R.A. (*)
HC, desde nC ₆ a nC ₄₀	GC-FID. Serie de métodos 3600. (**)
Coefficientes de biodegradación Pr/nC ₁₇ y Fi/nC ₁₈	GC-FID (**)
HC Aromáticos Policíclicos (PAH's)	EPA 8310 (***)
HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX)	EPA 8015 D
HC (C ₆ -C ₄₉)	Met. de inyección directa CG-FID
n-alcanos e isoprenoides nC ₆ -nC ₄₀	Met. de inyección directa CG-FID
MCNR	Met. de inyección directa CG-FID
Nitrógeno Total	Microkjeldhal
Fósforo disponible	Olsen

(*) = Saturados-Aromáticos-Resinoides-Asfaltenos.

(**) = Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (FID)

(***) Por cromatografía líquida (HPLC)

Tabla 9. Momentos de muestreo en relación a cada uno de los parámetros medidos.

Parámetro	Día 1	Día 180	Día 350
HC totales	X	X	X
Fraciones (SARA)	X	---	X
Alcanos e isoprenoides	X	X	X
MCNR	X	---	X
HC Aromáticos volátiles bencénicos (BTEX)	X	---	X
HC Poliaromáticos (PAH´s)	X	---	X
Biomasa aérea	---	---	X
Biomasa radicular	---	X	X

3.4. Análisis estadístico

Para el estudio de los resultados analíticos se realizaron análisis de la varianza (Anova) y correlaciones entre tratamientos.

§ **Análisis de la Varianza (ANOVA)**, utilizando como variables de clasificación las especies vegetales, la fertilización y sus interacciones en los diferentes momentos de muestreo, según correspondiera. En caso de obtener diferencias significativas ($p \leq 0.05$), se utilizó el test de Tukey para comparar las medias. De igual forma, se comparó la producción de biomasa aérea y radicular de las distintas especies utilizando como variables de clasificación la presencia de HC y la fertilización. Para todos estos análisis, se utilizó el software estadístico InfoStat versión 2006 p.2

Cuando hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre Especies, tratamiento de Fertilización y en la interacción Especies x Fertilización (o sea que no todos los tratamientos respondieron de igual manera a la fertilización, ya que es diferente su efecto a los 180 días respecto a los 350 días) el análisis de los datos se hizo separando tratamientos fertilizados de los no fertilizados, con un $n = 3$ por especie, por fecha de muestreo y por tratamiento de fertilización. Cuando no hubo interacción entre fertilización y especies se calculó el promedio de los resultados por especie sin separar tratamientos fertilizados de los no fertilizados ($n = 6$ por especie). También en ambos casos (haya interacción o no) se calculó el promedio de todos los tratamientos fertilizados y de los sin fertilizar en forma separada, sin separar por fecha de muestreo ($n = 15$ por tratamiento de fertilización).

En el caso particular del contenido de Nitrógeno y Fósforo en el sustrato el análisis se realizó separando los tratamiento fertilizados de los no fertilizados ya que no son comparables simultáneamente ya que se manejan variables edáficas diferentes.

Análisis de correlación entre tratamientos, fechas de muestreo, nutrientes (Nitrógeno y Fósforo), HC, Materia seca aérea y radicular. La medida de la fuerza de la asociación está dada por el coeficiente de correlación. El rango del coeficiente va de -1 a +1. El valor absoluto representa la intensidad de la asociación, mientras que el signo representa el sentido. Un coeficiente igual a cero indica la falta de asociación. El coeficiente a obtener fue el de Pearson. Este coeficiente mide la asociación entre variables continuas. La correlación fue considerada significativa cuando P era menor o igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Degradación de los HC totales de petróleo

4.1.1. HC según el método gravimétrico

La concentración inicial de HC (40.100 mg/kg) disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) en todos los tratamientos al cabo de 350 días de experimento, produciéndose una degradación sostenida durante el tiempo que duró el ensayo (Figura 5).

Hay diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre Especies, tratamiento de Fertilización y en la interacción Especies x Fertilización (no todos los tratamientos responden de igual manera a la fertilización, ya que es diferente su efecto a los 180 días respecto a los 350 días).

Aunque en todos los tratamientos hay diferencias significativas entre días de muestreo, las diferencias son mayores en los primeros 180 días de experimento, luego el ritmo de degradación disminuye (Figura 5). Respecto al día 1 de inicio del ensayo, a los 180 días hay diferencias significativas en todos los tratamientos, o sea que en todos los casos hubo degradación (Tabla 3 A).

Las gramíneas fueron más eficientes que las especies autóctonas para disminuir el contenido de HC en el suelo. A los 180 días Elymus fertilizado es quien degradó más, un 36 % respecto al contenido inicial, y Botón de Oro sin fertilizar es el que menos degradó, solo un 23 %. A la finalización del experimento, Elymus y Agropiro fertilizados fueron los más eficientes para degradar, 49 y 45 % respectivamente, en 350 días. Los demás tratamientos no difieren significativamente entre sí.

El HC degradado en los Testigos tanto fertilizado como sin fertilizar no difiere significativamente de los tratamientos vegetados. A los seis meses de iniciado el ensayo, el Testigo fertilizado (Bioestimulación) es uno de los tratamientos que más degradó (el contenido inicial de HC disminuyó 30 %), tiene una eficiencia de degradación similar a Elymus y Charcao fertilizados y a Agropiro no fertilizado. El Testigo no fertilizado (atenuación natural) degrada tanto como los tratamientos vegetados sin fertilizar, 20 % del contenido inicial.

A la finalización del experimento, a los 350 días, tanto Elymus como Agropiro fertilizados tuvieron la mayor degradación, 49 y 45 % respectivamente y difieren significativamente de los demás tratamientos (no hay diferencias significativas marcadas entre especies y tratamientos de fertilización). El Testigo y Botón de Oro no fertilizados son los que degradaron menos, 24 y 22 % del contenido inicial (Tabla 3 A). El Testigo fertilizado (bioestimulación) fue eficiente al degradar, 34 % del contenido inicial de HC en 1 año, tanto como Elymus sin fertilización, Charcao tanto fertilizado como no fertilizado y Botón de Oro fertilizado. El Testigo sin fertilizar (atenuación natural) ha sido de los tratamientos con menor eficiencia de degradación, 24 % del contenido inicial de HC en 350 días, que es similar a todos los tratamientos vegetados sin fertilización y a Botón de Oro no fertilizado (Tabla 3 A).

Donde más aparecieron diferencias no significativas es en la comparación entre 180 y 350 días de muestreo, ello estaría indicando que en algunos tratamientos (Agropiro y Testigo, tanto fertilizados como sin fertilizar, y Charcao fertilizado) la disminución fue rápida inicialmente hasta los 180 días, y luego el ritmo disminuyó hasta la finalización del experimento (Tabla 3 A), o sea que en los últimos 150 días entró en una meseta el ritmo de degradación. No hubo degradación en los últimos 170 días en:

- § -Agropiro y Testigo fertilizados y sin fertilizar.
- § -Charcao fertilizado
- § -Botón de Oro no fertilizado

Existen diferencias significativas entre tratamientos fertilizados y no fertilizados, ya que el primero es más eficiente en la degradación. Pero no incrementa de la misma forma la degradación el fertilizar en todos lo tratamientos y en todas las fechas de muestreo, ya que en Agropiro, Testigo y Charcao fertilizados y en Agropiro, Testigo y Botón de Oro no fertilizados, no hay degradación de los HC en los últimos 170 días del experimento (Tabla 3 A). En términos generales a la finalización del ensayo los tratamientos con fertilización disminuyeron en un 37 % el contenido de HC mientras que los no fertilizados lo hicieron un 26 % (Tabla 3 B).

Figura 5. Porcentaje de HC totales de petróleo al inicio del experimento, a 180 y a 350 días.
Método gravimétrico.

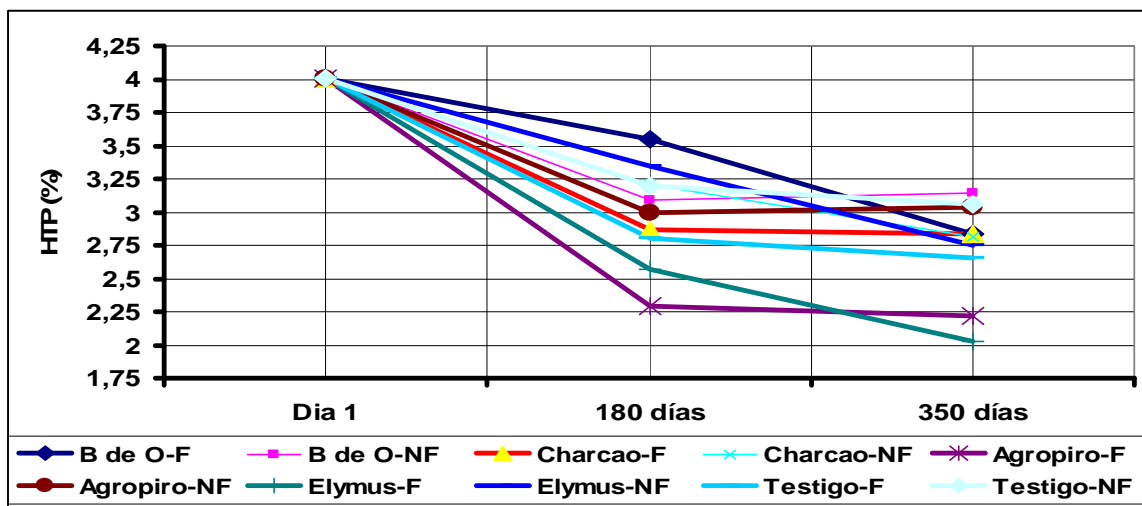


Tabla 2. Contenido promedio de HC (% sss) en cada tratamiento a los 180 y 350 días. Método gravimétrico.

A- En todos los tratamientos con y sin fertilización.

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Disminución respecto al contenido inicial (%)	
				180 días	350 días
Elymus – F		2,57 ± 0,05 b B	2,03± 0,06 a C	35,9	49,4
Agropiro – F		2,29 ± 0,08 a B	2,22± 0,14 a B	42,9	44,6
Testigo – F		2,80 ± 0,17 bc B	2,65± 0,08 b B	30,2	33,9
Elymus - NF		3,35 ± 0,06 fg B	2,75± 0,05 bc C	16,4	31,4
Charcao – NF	4,01% ± 0,12 mg/kg A	3,21 ± 0,06 ef B	2,81± 0,11 bcd C	19,9	29,9
Charcao – F		2,87 ± 0,03cd B	2,84± 0,08 bcd B	28,4	29,2
Botón de oro - F		3,55 ± 0,05 g B	2,84± 0,11 bcd C	11,5	29,2
Agropiro – NF		2,99 ± 0,08cde B	3,04± 0,13 cde B	25,4	24,2
Testigo – NF		3,20 ± 0,08 ef B	3,06± 0,11 de B	20,2	23,7
Botón de oro - NF		3,09 ± 0,10 de B	3,14± 0,11 e B	22,9	21,7

Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

F = Tratamientos fertilizados NF = Tratamientos sin fertilización.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización. Método gravimétrico.

Tratamiento	Contenido medio de HC (% ss)		Disminución respecto al contenido inicial (%)	
	180 días	350 días	180 días	350 días
Fertilizado	2,82 ± 0,64 a	2,52 ± 0,37a	29,7	37,1
Sin fertilización	3,17 ± 0,44 b	2,96± 0,35 b	20,9	26,2

Al inicio del experimento 4,01% ± 0,12 ss

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

4.1.2. Evaluación de los HC mediante el método de inyección directa CG-FID

Las concentraciones de HC, estimados mediante el método de inyección directa CG-FID, bajaron significativamente a los 350 días para todos los tratamientos respecto al contenido inicial (Figura 6). Se presentaron diferencias entre tratamientos de fertilización ($p < 0,001$), entre especies ($p \leq 0,01$), y en la interacción fertilización x especies ($p = 0,04$ y $0,001$ para 180 y 350 días, respectivamente). En síntesis, se detectaron efectos entre cuatro factores: fertilización (causa primaria), tiempo de degradación, interacción fertilización-especies, y, en menor medida, especie vegetal.

A los 180 días, los cuatro tratamientos de FR con fertilización generaron una alta degradación: entre 69 y 80 % del valor inicial (Tabla 4). El proceso disminuyó sensiblemente en la segunda mitad del experimento (350 días) degradándose los HC totales en suelo hasta el 78-80%, sin diferencias entre especies vegetales. Estos tratamientos fueron significativamente más efectivos que

los FR sin fertilización que degradaron apenas entre 11 y 28% a los 180 días, y entre 36 y 53 % al final del experimento (la mitad que el tratamiento FR con fertilizantes).

Los tratamientos Testigo y Charcao sin fertilizar no degradaron significativamente los HC totales a los 180 días (15 y 11 % respectivamente;). El Testigo fertilizado (bioestimulación) degrada con la misma eficiencia que la mayoría de los tratamientos vegetados sin fertilizar: Agropiro, Elymus y Botón de Oro. El Testigo sin fertilizar (atenuación natural) no tiene diferencias significativas con ningún tratamiento vegetado sin fertilizar.

La fertilización no incrementa por igual la degradación de los HC livianos en todos los tratamientos: no tiene un efecto marcado sobre la degradación en los últimos 150 días en relación al contenido de HC en los primeros 180 días, en todos los tratamientos vegetados fertilizados como tampoco en Agropiro y Elymus, ambos sin fertilizar.

A la finalización del experimento todos los tratamientos fertilizados, incluido el Testigo, no tuvieron diferencias significativas entre sí en la acción bioestimuladora de los nutrientes aportados pero si las hubo respecto a los tratamientos sin fertilización. De hecho, el Testigo fertilizado (bioestimulación) degrada lo mismo que todos los tratamientos vegetados fertilizados, y el Testigo sin fertilizar (atenuación natural) junto con los tratamientos vegetados sin fertilizar son los que menos degradaron y sin diferencias significativas entre ellos.

La degradación aumenta significativamente ($P \leq 0.0001$) al fertilizar. En la interacción días de muestreo x fertilización hay diferencias significativas en ambas fechas lo que implica que cambia el efecto de la fertilización a través del tiempo. Esto se da mayormente los primeros 180 días, ya que en el promedio de todos los tratamientos degrada un 68 %, pero solo lo hace un 9 % más los últimos 150 días. Todos los tratamientos vegetados y fertilizados, a los 180 días, se ubican en un rango entre 2.000 y 4.000 mg/kg pero a los 350 días se degradan tan poco que se ubican entre 2.000 y 3.000 mgs/kg (Figura 6). Cuando no se fertiliza, el contenido de HC disminuye un 23 % en los primeros 180 días y luego un 25 % más a la finalización del experimento (Tabla 4).

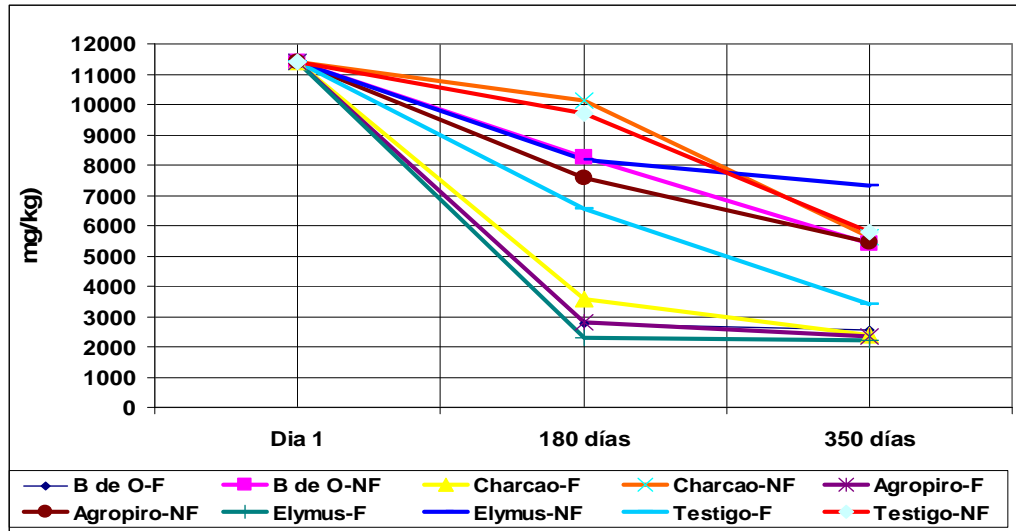
Tabla 3. HC totales por el método de inyección directa CG-FID (mg/kg) a 180 y 350 días.

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Disminución respecto al contenido inicial (%)	
				180 días	350 días
Elymus – F		2288,0 ± 483,2 a B	2227,7 ± 555,6 a B	80,0	80,5
Agropiro – F		2816,0 ± 217,7 a B	2332,0 ± 319,6 a B	75,3	79,6
Charcao – F		3583,0 ± 364,7 a B	2373,7 ± 501,4 a B	68,6	79,2
Botón de Oro-F		2756,0 ± 292,3 a B	2546,0 ± 287,1a B	75,9	77,7
Testigo-F	11420 mg/kg ± 1168,1 A	6567,0 ± 617,7 b B	3390,3 ± 430,6 a C	42,5	70,3
Botón de Oro-NF		8238,0 ± 427,8 bc B	5403,0 ± 592,3 b C	27,9	52,7
Agropiro-NF		7580,0 ± 1275,2 bc B	5452,3 ± 678,0 b B	33,6	52,2
Charcao-NF		10143,0 ± 1487,9 c A	5637,7 ± 570,6 b B	11,2	50,6
Testigo-NF		9688,0 ± 993,9 c A	5791,1 ± 355,7 b B	15,2	49,3
Elymus-NF		8152,0 ± 1518,8 bc B	7311,0 ± 416,7 b B	28,6	36,0

Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra mayúscula en la fila.

F = Tratamientos fertilizados NF = Tratamientos sin fertilización

Figura 6. HC totales por el método de inyección directa CG-FID (mg/kg)



4.2. Degradación de HC según el método SARA.

El SARA es una metodología de análisis de utilidad para ver la variación relativa de las fracciones que son indicativas de la evolución de la biodegradación, la que como por ejemplo se corresponde con un aumento relativo de la fracción correspondiente a los compuestos recalcitrantes (Asfaltenos y Resinoides) como indicador de la degradación de las otras fracciones.

4.2.1. Saturados

La fracción Saturados y en particular los alcanos lineales son los HC más simples del petróleo y de las cuatro fracciones es la más susceptible de ser degradada.

En todos los tratamientos hubo degradación. A la finalización del experimento hay diferencias entre tratamientos de fertilización ($p < 0,00001$) y entre especies ($p = 0,02$) pero no hay interacción entre fertilización y especies ($p = 0,17$). La fracción Saturados disminuyó en todos los tratamientos con respecto al valor inicial en forma significativa, incluido el Testigo, entre 54 %, en Botón de Oro, y 65%, para Agropiro pero sin diferencias entre tratamientos (Tabla 4 A). Entre tratamientos de fertilización es significativa la diferencia ($p < 0,001$), siendo mayor la disminución de Saturados en el fertilizado, un 36 % más, que en los tratamientos sin fertilización (Tabla 4 B). Al ser la interacción no significativa (Tabla 4 A) explica el hecho de que el efecto de la fertilización es el mismo tanto a los 180 como a los 350 días, en ambos casos y para todos los tratamientos produce degradación de los Saturados.

Tabla 4 Fracción Saturados (mg/kg) a la finalización del experimento. Método SARA

A- En todos los tratamientos con y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido inicial	350 días	Disminución respecto al contenido inicial (%)
Testigo		7503,0 ± 216,5 a B	64,3
Agropiro		7.245,7 ± 816,4 a B	65,5
Botón de Oro	21.028,0 ± 117,5 A	9.752,0 ± 1823,1 a B	53,6
Charcao		9.081,5 ± 725,3 a B	56,8
Elymus		8.804,0 ± 776,3 a B	58,1

Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido medio	Disminución respecto al contenido inicial (%)
Fertilizado	6.614,3 ± 1092,8 a	69,2
Sin fertilización	10.340,2 ± 650,2 b	49,0

Al inicio del ensayo 21.028,0 ± 117,5 mg/kg

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

4.2.2. Aromáticos

En todos los tratamientos hubo disminución de la fracción Aromáticos. No hubo diferencias entre tratamientos de fertilización ($p=0.61$), en ambos casos la disminución fue muy similar a la finalización del ensayo, solo del 2,7 % entre fertilizados y no fertilizados, disminuyendo el contenido de Aromáticos entre 20 y 22% respecto al contenido inicial (Tabla 13 B). Tampoco entre tratamientos vegetados, disminuyendo entre 33 % para el Testigo, y 15 % para Elymus ($p=0.10$; Tabla 13 A), ni en la interacción ($P=0.65$) ya que en todos los tratamientos el fertilizar incrementó la degradación.

Tabla 13. Fracción Aromáticos (mgs/kg) a la finalización del ensayo.

A- En todos los tratamientos con y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido inicial.	350 días	Disminución respecto al contenido inicial (%)
Testigo		8.451,8 ± 1.519,7 a B	32,7
Agropiro		9.617,3 ± 7.71,0 a B	23,4
Botón de Oro	12.560,7 ± 934 A	10.329,7 ± 957,9 a B	17,8
Charcao		10.451,3 ± 1.340,4 a B	16,8
Elymus		10.664,2 ± .1612,9 a B	15,1

Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido medio	Disminución respecto al contenido inicial (%)
Fertilizado	9764,6 ± 1.249,7 a	22,3
Sin fertilización	10.041,1 ± 2.908,7 a	20,1

Al inicio del ensayo 12.560,7 + 934 mg/kg

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05)

4.2.3. Resinoides

La concentración de Resinoides al finalizar el ensayo fue mayor a la inicial en todos los tratamientos. Las diferentes especies aumentaron la concentración a la finalización del ensayo entre 36%, en Charcao, y 74%, en el Testigo, pero sin diferenciarse estadísticamente entre sí (p=0,09, Tabla 5 A). El tratamiento con fertilización registró diferencias significativas (p=0,01) con un incremento 28% superior al tratamiento no fertilizado (Tabla 5 B). No se registró interacción fertilización X especies (p=0,11).

Tabla 5. Fracción Resinoides (mgs/kg) a la finalización del experimento.

A- En todos los tratamientos con y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido inicial.	350 días	Aumento respecto al contenido inicial (%)
Testigo		7467,5 ± 2.480,0 a B	35,9
Agropiro		7493,2 ± 4.538,5 a B	36,4
Botón de Oro	5.493 ± 809,2 A	8712,3 ± 4.113,8 a B	58,6
Charcao		9339,2 ± 1.207,5 a B	70,0
Elymus		9576,3 ± 1.522,1 a B	74,3

Diferencias entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila (p<0,05)

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido medio	Aumento respecto al contenido inicial (%)
Fertilizado	9293,5 ± 3.376,2 b	69,2
Sin fertilización	7741,9 ± 2.182,6 a	40,9

Al inicio del ensayo 5.493 ± 809,2 mg/kg

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05)

4.2.4. Asfaltenos

El HC utilizado en el ensayo, por ser un HC fresco, presentó una muy baja proporción de la fracción Asfaltenos, 0.3%, por lo tanto las variaciones registradas tienen valor estadístico pero escaso valor biológico.

Se registraron diferencias en el tratamiento Especies ($p < 0.001$, Tabla 7 A), pero no en el de Fertilización ($p = 0,96$), solo un 0,36 % al fertilizar, y una interacción significativa entre ambos ($p < 0,01$) ya que la fertilización incrementa la degradación en algunos tratamientos pero en otros no (Tabla 7 B). Charcao fertilizado y Botón de Oro no fertilizado disminuyeron el contenido de Asfaltenos, mientras que el Testigo (fertilizado o no) y Agropiro sin fertilizar incrementaron el nivel inicial. En los demás tratamientos no hay diferencias significativas con el nivel inicial, no aumentaron ni disminuyeron su contenido en 350 días (Tablas 7 A y B).

Tabla 6. Fracción Asfaltenos (mg/kg) a la finalización del ensayo, a los 350 días.

A- En todos los tratamientos.

Tratamiento	Valor inicial	350 días	Disminución ó aumento respecto al inicio del ensayo (%)
Charcao - F		26,4 _± 22,5 a B	- 73,4
Botón de Oro - NF		42,6 _± 15 ab B	- 57,1
Elymus - NF		84,3 _± 40,3 abc A	- 15,2
Charcao - NF		89,2 _± 19,6 abc A	- 10,3
Elymus - F	99,4 _± 3,6 A	99,7 _± 9,2 bcd A	+ 0,30
Botón de Oro - F		106,5 _± 17,0 cd A	+ 7,1
Agropiro - NF		132,3 _± 12,0 cd B	+ 33,1
Agropiro - F		136,7 _± 23,2 cd A	+ 37,5
Testigo - F		137,3 _± 23,2 cd B	+ 38,1
Testigo - NF		156,3 _± 20,5 d B	+ 57,2

Diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización.

Tratamiento	Contenido medio	Respecto al contenido inicial (%)
Fertilizado	101,33 _± 45,1 a	+ 1,9
Sin fertilización	100,96 _± 45,7 a	+ 1,6

Al inicio del ensayo 99,4_± 3,6 mg/kg.

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

4.3. Degradación de aromáticos

4.3.1. Volátiles bencénicos (BTEX)

Estos compuestos solamente fueron detectados en el primer muestreo (Tabla 7). No fueron detectados en el segundo ni en el tercer muestreo, por lo que se supone que fueron rápidamente perdidos durante el proceso de mezclado con el suelo o en la metodología de análisis utilizada. Cuando hay ausencia de Carbonos menores a C₉ es el indicador de que no hay compuestos volátiles (BTEX). La ausencia de BTEX muestra la ausencia de compuestos de toxicidad conocida y regulada por la legislación argentina.

Tabla 7. Aromáticos volátiles bencénicos presentes en el sustrato al inicio del ensayo.

BTEX (mg/kg)					
Benceno	Tolueno	Etilbenceno	m,p-xilenos	o-xileno	Sumatoria
0,06	0,29	0,07	0,61	0,21	1,24

4.3.2. HC Poliaromáticos (PAH´s)

Analizando el contenido de los PAH´s a los 350 días hay diferencias significativas entre tratamientos de especies ($p < 0,0001$), entre tratamientos de fertilización ($p < 0,0001$), pero no en la interacción ($p = 0,28$) (el efecto de la fertilización cambia con el tiempo ya que es diferente su efecto a los 180 días respecto a los 350 días).

La concentración inicial de los PAH´s, $29,5 \pm 1,74$ mg/kg disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en todos los tratamientos vegetados, entre un 77 y un 64 % respecto al contenido inicial, sin que haya diferencias significativas entre ellos, no así en el Testigo que disminuyó 34 %, al cabo de 350 días de ensayo (Tabla 8 A). Fue evidente la acción fitorremediadora de los tratamientos vegetados respecto al Testigo en la degradación de los PAH´s (Tabla 8 A), que junto a los BTEX son los únicos componentes hidrocarbúricos contemplados a través de niveles guía de calidad de suelos en la legislación nacional ambiental, Ley n° 24.051 de Residuos Peligrosos, como incidentes en la salud, posiblemente cancerígenos. Numerosos trabajos demuestran la acción de FR de diversas especies sobre los PAH´s, de géneros botánicos similares a las ensayadas (Aprill & Sims 1990; Reilley et al 1996; Rogers et al 1996; Quiu et al 1997; Liste & Alexander 1999; Bengtsson & Zerhouni, 2003) sobre estos componentes.

Existen diferencias significativas entre tratamientos F y NF ya que el primero es más eficiente en la degradación. Fertilizando hubo una degradación del 73 % del contenido inicial mientras que al no fertilizar se degradó 55 % (Tabla 9 B).

Tabla 8. Hidrocarburos Poliaromáticos (PAH´s) (mgs/kg) a la finalización del ensayo.

A- En todos los tratamientos con y sin fertilización.

Tratamiento	Valor inicial	350 días	Disminución respecto al inicio del ensayo (%)
Charcao		6,88 ± 1,20 a B	76,7
Botón de Oro		8,65 ± 2,98 a B	70,7
Elymus	29,5 ± 1,74 A	10,27 ± 1,46 a B	65,2
Agropiro		10,50 ± 2,90 a B	64,4
Testigo		19,38 ± 1,7 b B	34,3
Fertilizado		7,84 ± 0,84 a	73,4
Sin fertilización		13,40 ± 2,39 b	54,6

Diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilización

Tratamiento	Contenido medio de PAH´s (contenido inicial 29,5 ± 1,74 mg/kg).	Disminución respecto al inicio del ensayo (%)
Fertilizado	7,84 ± 0,84 a	73,4
Sin fertilización	13,40 ± 2,39 b	54,6

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

4.4. Indicadores de degradación

La bibliografía especializado sobre los rangos de los índices de Pr/nC_{17} y Fi/nC_{18} cita que se consideran valores umbrales de biodegradación relaciones de 0,5 y 0,3 respectivamente (Lee et al 1993; Luque et al 2000; Wang et al 1998, 1999; Ortiz et al 2003).

4.4.1. Pristano/nCarbono 17 (Pr/nC_{17})

En el muestreo inicial el promedio del coeficiente de degradación ha sido de 0.45, no evidenciando signos de degradación bacteriana al momento de muestreo.

A los 180 días hay diferencias significativas entre especies ($p = 0,01$) y entre tratamientos de fertilización ($p = 0,01$) pero no en la interacción ($p = 0,19$). Todos los tratamientos aumentaron su actividad degradatoria a los 180 días respecto al inicio del tratamiento, quien más lo hizo fue Elymus, 200 %, mientras que el Testigo mostró la menor actividad degradatoria, incremento del 49 %, habiendo diferencias significativas entre ellos mientras que los demás tratamientos (Charcao, Botón de Oro y Agropiro) no tienen diferencias entre sí (los incrementos de actividad son similares, entre 135 y 185 %) (Tabla 9 A).

A los 350 días hay diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento de fertilización ($p = 0,04$) pero no entre especies ($p = 0,32$) ni en la interacción ($p = 0,20$). Algunos tratamientos incrementaron su actividad degradatoria levemente, respecto a los 180 días, tales como Charcao,

10 %, y Testigo, 67 %, pero los demás permanecieron estables o disminuyeron el coeficiente en los últimos 150 días de ensayo, pero no hubo diferencias entre los tratamientos (Tabla 9 A).

Durante todo el ensayo la actividad fue mayor en los tratamientos fertilizados que en los sin fertilización, un 39 % mayor a los 180 días y 36 % a los 350 días (Tabla 10 B).

Podemos concluir que en los primeros 180 días los tratamientos vegetados tienen un comportamiento generalizado en el que aumenta los coeficientes respecto al inicio y luego disminuyen o bien, la mayoría de los tratamientos, se mantienen hasta el final del ensayo, mientras que el Testigo incrementa los coeficientes constantemente hasta su finalización.

Tabla 9. Coeficiente Pr/nC17 a los 180 y a los 350 días.

A- En todos los tratamientos

Tratamiento	Coeficiente Inicial	180 días	350 días	Aumento ó disminución respecto al contenido inicial (%)	
Charcao		1,17 \pm 0,24 ab B	1,29 \pm 0,55 a C	+ 160,0	+ 186,7
Botón de Oro		1,06 \pm 0,21 ab B	0,86 \pm 0,07 a C	+ 135,5	+ 91,1
Agropiro	0,45 \pm 0,02 A	1,28 \pm 0,28 ab B	1,23 \pm 0,43 a C	+ 184,4	+ 173,3
Elymus		1,45 \pm 0,49 b B	1,04 \pm 0,08 a C	+ 222,2	+ 131,1
Testigo		0,67 \pm 0,20 a A	1,12 \pm 0,50 a C	+ 48,9	+ 148,9
Fertilizado		1,34 \pm 0,50 a	1,21 \pm 0,32a	+ 197,8	+ 168,9
Sin fertilización		0,78 \pm 0,19 b	0,95 \pm 0,26 b	+ 73,3	+ 111,1

Diferencias entre tratamientos (P<0,05) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilizar

Tratamiento	180 días	350 días	Aumento ó disminución respecto al contenido inicial (%)	
Fertilizado	1,34 \pm 0,50 a	1,21 \pm 0,32a	+ 197,8	+ 168,9
Sin fertilización	0,78 \pm 0,19 b	0,95 \pm 0,26 b	+ 73,3	+ 111,1

Coeficiente inicial en el día 1 de ensayo 0,45 \pm 0,02

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

4.4.2. Fitano/nC18 (Fi/nC18)

En el sustrato al inicio del ensayo el promedio ha sido de 0.34, no evidenciando signos de degradación bacteriana.

Al igual que en el coeficiente Pr/nC17, a los 180 días hay diferencias entre especies (p= 0,0006) y entre tratamientos de fertilización (p<0,0001) pero no en la interacción (p= 0,11). Mientras que a la finalización del ensayo se hallaron diferencias significativas en la especie (p= 0,0002), en los tratamientos de fertilización (p= 0,0001) y en la interacción (p = 0,004).

Casi todos los tratamientos tienen un comportamiento generalizado en el que aumentan la degradación a los 180 días respecto al inicio. El Testigo tiene un coeficiente de 0.58 que es

indicativo de inactividad y difiere significativamente de Agropiro, Charcao y Elymus que tuvieron los más altos coeficientes y sin diferencias entre ellos. Botón de Oro tuvo un comportamiento intermedio (Tabla 10 A).

Entre los 180 y 350 días, Botón de Oro tanto F como NF, Charcao, Agropiro y Elymus todos NF se estabilizan en el coeficiente de degradación, no aumenta hasta la finalización del ensayo mientras que todos los demás tratamientos minimizan la actividad en los últimos 150 días (Tabla 10 C).

Si a la finalización del ensayo se compara cada tratamiento por separado y en c/u de ellos se separa tratamientos fertilizados de los que no se fertilizó, y dentro de cada comparación comparando fechas (Tabla 10 C) podemos expresar que:

Hay tres tipos de patrón de comportamiento en el coeficiente de degradación Fi/C18 (Figura 7):

§ En B de O F, Agr F y NF y Ely F y NF tanto al inicio (día 1) como al final del ensayo (día 365) no habría actividad degradatoria mientras que esta se concentra o es máxima a los 180 días en relación a los momentos de muestreo.

§ En BO y en Ch NF al inicio del ensayo no habría actividad degradatoria pero luego se mantiene en el tiempo hasta la finalización del ensayo.

§ En Cha F y en ambos Testigos, la actividad degradatoria aumenta paulatinamente a través del tiempo, haciéndose máxima a la finalización del ensayo.

En ambas fechas de muestreo al fertilizar, la actividad es mayor que cuando no se fertiliza, considerando el promedio de todos los tratamientos, a los 180 días la actividad es un 49 mayor, cuando se fertiliza y a la finalización del ensayo un 68 % más (Tabla 10 B).

Tabla 10. Coeficiente Fitano/nCarbono 18 a los 180 y a los 350 días de muestreo.

A- En todos los tratamientos

Tratamiento	Coefficiente Inicial	180 días	350 días	% de aumento respecto al inicio del ensayo	
Agropiro		1,06± 0,06 b B	0,81± 0,41 ab C	+ 211,8	+ 131,4
Botón de Oro		0,77± 0,27 ab B	0,59± 0,12 a C	+ 126,5	+ 68,6
Charcao	0,34 ± 0,02 A	1,06± 0,21b B	1,14± 0,26 bc B	+ 211,8	+ 225,7
Elymus		0,96 ± 0,14 b B	0,66 ± 0,15 a C	+ 182,3	+ 88,6
Testigo		0,58± 0,07 a A	1,36± 0,35 c C	+ 65,7	+ 288,6
Fertilizado		1,06 ± 0,20 a	1,14 ± 0,32 a	+ 202,8	+ 225,7
Sin fertilización		0,71 ± 0,11 b	0,68 ± 0,13 b	+ 120,8	+ 94,3

Diferencias entre tratamientos (P<0,05) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

B- En el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilizar.

Tratamiento	180 días	350 días	Aumento respecto al contenido inicial (%)	
Fertilizado	1,06 ± 0,20 a	1,14 ± 0,32 a	+ 202,8	+ 225,7
Sin fertilización	0,71 ± 0,11 b	0,68 ± 0,13 b	+ 120,8	+ 94,3

Coefficiente inicial en el día 1 de ensayo 0,34 ± 0,02.

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

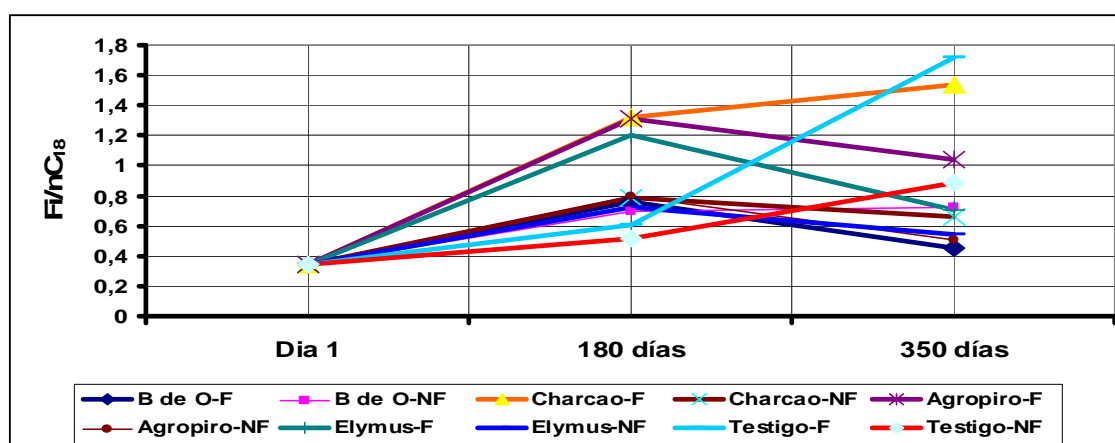
C- En la interacción Tratamientos x Fertilización

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Aumento respecto al contenido inicial (%)	
Botón de oro – F		0,76±0,40 abc B	0,45±0,19 a A	123,5	32,3
Botón de oro – NF		0,70±0,15 ab B	0,72±0,05 a B	105,9	111,8
Charcao – F		1,32±0,24 c B	1,54±0,36 bc C	288,2	352,9
Charcao – NF		0,79±0,17 abc B	0,66±0,16 a B	94,1	94,1
Agoproiro – F	0,34 ± 0,02 A	1,31±0,42 c B	1,04±0,34 abc C	285,3	205,9
Agoproiro – NF		0,80±0,05 abc B	0,51±0,20 a A	135,3	50,0
Elymus – F		1,20±0,79 bc B	0,71±0,29 a C	252,9	108,8
Elymus – NF		0,72±0,13 ab B	0,54±0,01 a C	52,5	58,8
Testigo - F		0,61±0,11 a B	1,72±0,45 c C	79,4	405,9
Testigo – NF		0,52±0,03 a B	0,89±0,26 ab C	52,9	161,8

Diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

Figura 7. Fitano/nCarbono 18 sobre fracción saturada en las tres fechas de muestreo



4.4.3. n- e iso-alcanos.

4.4.3.1. Pristano y Fitano

Hay diferencias significativas ($P < 0,0001$) en Tratamientos, Fertilización y en la interacción, en todas las fechas de muestreo. Además ambos alcanos tienen un patrón de comportamiento muy similar durante todo el ensayo: tanto el Pristano como Fitano, son degradado en todos los tratamientos.

Entre el inicio del ensayo y los 180 días todos los tratamientos vegetados y fertilizados se hallan casi totalmente degradados a pesar de ser recalcitrantes, alcanzan un contenido menor a 6 mg/kg o sea que tienen una alta degradación inicial (Tabla 11 A y B); en cambio todos los tratamientos sin fertilizar y también en ambos Testigos, tanto F como NF, disminuyen su contenido pero gradualmente y en mucha menor proporción que en los tratamientos vegetados fertilizados, alcanzando niveles entre 25 y 33 mgs/kg el Pristano, y entre 17 y 29 mgs/Kg el Fitano, en ese mismo período.

Luego entre los 180 días y 350 días o sea en los últimos 170 días, a la finalización del ensayo, el contenido de Pristano y de Fitano en los tratamientos vegetados fertilizados se mantiene constantes sin variaciones significativas o sea que prácticamente no hay degradación en los tratamientos vegetados y fertilizados, casi toda la degradación se produce en los primeros 180 días.

En aquellos que no se fertilizó y en ambos Testigo la degradación continúa en forma sostenida hasta la finalización del ensayo; inclusive a excepción de Charcao NF, todos los demás llegan a un contenido mínimo de isoalcanos, similares a los alcanzaron los tratamientos fertilizados a los 180 días (Tabla 11 A y B).

Tabla 11. Isoalcanos sobre la fracción saturada (mg/kg) a los 180 y 350 días de muestreo

A- Pristano (mg/kg).

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Disminución respecto al inicio (%)	
Botón de oro – F		2,37± 0,40 a C	1,83±0,38 a C	98,2	98,6
Botón de oro – NF		35,87± 1,79 d B	6,33±2,71 a C	72,3	95,1
Charcao – F		37,83± 6,05 a B	2,61±1,06a C	70,8	97,9
Charcao – NF		37,83±6,05 d B	25,12±2,64 b B	70,8	80,6
Agropiro – F		2,13±1,01 a C	2,40±4,42 a C	98,3	98,1
Agropiro – NF	129,67 ± 14,64 A	34,90±4,42 cd B	5,60±0,66 a C	73,1	95,7
Elymus – F		4,97±1,10 a C	1,87±0,33 a C	96,2	98,5
Elymus – NF		21,00±3,50 b B	6,32±1,21 a C	83,8	98,2
Testigo – F		25,57±4,67 bc B	2,28±4,47 a C	80,3	98,3
Te NF		32,83±8,99 cd B	4,27±2,11 a C	74,7	96,7

Diferencias entre tratamientos (P<0,05) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

B-Fitano (mg/kg)

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Disminución a 180 y 350 días respecto al contenido inicial (%)	
Botón de oro – F		3,73± 1,91 a C	2,00±0,89 a C	95,9	97,8
Botón de oro – NF		24,50± 2,66 d B	6,53±0,32 bc C	73,0	92,8
Charcao – F		5,70± 1,67 ab C	2,61±0,72 a C	93,7	97,1
Charcao – NF		26,87±5,00 e B	18,57±0,78 d B	70,4	79,6
Agropiro – F	90,93 ± 6,74 A	2,07±0,59 a C	1,72±0,13 a C	97,7	98,1
Agropiro – NF		23,23±2,72 de B	6,73±2,52 a C	74,4	92,6
Elymus – F		3,73±0,95 a C	1,75±0,24 a C	95,9	98,1
Elymus – NF		13,50±2,16 bc B	6,90±0,40 c C	85,1	92,4
Testigo – F		16,73±2,64 cd B	3,49±0,27 ab C	81,6	81,6
Testigo – NF		28,80±5,41 e B	6,00±2,23 bc C	68,3	93,4

Diferencias entre tratamientos (P<0,05) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila.

F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

4.4.3.2. nCarbono 17 y nCarbono 18

La tendencia de degradación a medida que transcurren los días de ensayo es similar a los iso-alcanos recalcitrantes, ya que se repite el patrón de degradación en los n-alcanos: los tratamientos que tuvieron fertilización se degradaron casi totalmente en los primeros 180 días (Tablas 12 B y E), y luego tuvieron degradación mínima o nula los últimos 150 días de ensayo. Mientras que los tratamientos sin fertilizar y ambos Te, con y sin fertilización se degradaron en forma constante y sostenida a lo largo de todo el ensayo hasta llegar a niveles similares a los tratamientos fertilizados a la finalización del ensayo (Tablas 12 B y E).

Tanto en C₁₇ como en C₁₈ a los 180 días hay diferencias significativas en fertilización, en especies pero no en la interacción fertilización x especie, y a los 350 días hay diferencias significativas en fertilización, especies y en la interacción fertilización x especie. Todos los tratamientos vegetados degradan por igual, sin diferencias significativas entre ellas, llegando a un nivel de 11 a 20 mg/kg mientras que el Testigo alcanzó a 45.8 mg/kg de C₁₇ y 41 mg/Kg en C₁₈ (Tablas 12 A y D). Pero al finalizar el ensayo, Charcao es quien degradó menos, 15 mg/Kgr, mientras los demás incluido el Te no tienen diferencias significativas entre ellos.

Tanto C₁₇ como C₁₈ se degradan más cuando se fertiliza, un 70-80 % más que cuando no se lo hace (Tablas 12 B y E).

A la finalización del ensayo (Tabla 12 C), al haber interacción entre tratamientos y fertilización, para C₁₇, Agropiro, Elymus y Botón de Oro todos fertilizados degradaron significativamente respecto a los demás tratamientos y Charcao sin fertilizar es quien degradó menos; en C₁₈ (Tabla 12 F) todos los tratamientos fertilizados incluido el Testigo degradaron en forma significativa respecto a los no fertilizados.

Tabla 12. n-alcanos sobre la fracción saturada

A- Carbono 17 en el promedio de los tratamientos (mg/kg) en dos fechas de muestreo

Tratamiento	Contenido inicial	180 días	350 días	Disminución respecto al inicio (%)	
Agropiro		16,17± 16,18 a B	3,69± 2,84 a C	94,3	98,7
Botón de Oro		19,55± 18,64 a B	4,39± 2,66 a C	93,2	98,5
Charcao	286mg/kg ± 33,87 A	19,52± 16,85 a B	15,01± 14,93 b C	93,2	94,7
Elymus		11,62 ± 9,92 a B	4,31 ± 3,12 a C	95,9	98,5
Testigo		45,82± 6,32 b B	3,04± 1,43 a C	84,4	98,9
Fertilizado		8,64 ± 12,43 a	1,84 ± 0,54 a	97,0	99,3
Sin fertilización		36,43 ± 6,84 b	10,34 ± 9,66 b	87,3	96,4

Diferencias entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

B- Carbono 17 en el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilizar (mg/kg) en dos fechas de muestreo

Tratamiento	180 días	350 días	% de disminución a los 180 y 350 días respecto al inicio del ensayo	
Fertilizado	8,64 ± 12,43 a	1,84 ± 0,54 a	97,0	99,3
Sin fertilización	36,43 ± 6,84 b	10,34 ± 9,66 b	87,3	96,4

Nivel inicial en el día 1 de ensayo 286 ± 33,87

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

C- Carbono 17 a los 350 días en todos los tratamientos (mg/kg)

Tratamiento	Valor inicial	350 días	% de disminución respecto al inicio
Botón de oro-F		2,61±0,31 ab C	99,1
Botón de oro-NF		6,17±2,84 ab C	97,8
Charcao-F		1,54±0,37 a C	99,5
Charcao-NF		28,47±3,69 c B	90,0
Agropiro-F		1,61±0,41 a C	99,4
Agropiro-NF	286,00 ± 14,64 A	5,77±2,67 ab C	98,0
Elymus-F		1,55±0,39 a C	99,4
Elymus-NF		7,07±1,20 b C	97,5
Testigo-F		0,53±1,87 a C	99,8
Testigo-NF		4,21±0,88 ab C	98,5

Diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

D- Carbono 18 en el promedio de los tratamientos (mg/kg) en dos fechas de muestreo

Tratamiento	Valor inicial	180 días	350 días	Disminución respecto al inicio (%)	
Agropiro		15,25± 15,02 a	7,43± 6,57 a	94,3	97,2
Botón de Oro		20,03± 16,94 a	6,73± 2,53 a	92,6	97,5
Charcao	270,33 ± 30,73.	19,07± 16,27 a	14,85± 15,21 b	92,9	94,5
Elymus		11,00 ± 8,58 a	7,60 ± 5,66 a	95,9	97,2
Testigo		41,15± 18,23 b	4,38± 3,04 a	84,8	98,4
Fertilizado		8,23 ± 10,45 a	2,46 ± 1,17 a	96,9	99,1
Sin fertilización		34,37 ± 13,43 b	13,94 ± 8,34 b	87,3	94,8

Diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

E- Carbono 18 en el promedio de los tratamientos fertilizados y sin fertilizar (mg/kg)

Tratamiento	180 días	350 días	Disminución respecto al inicio (%)	
Fertilizado	8,23 ± 10,45 a	2,46 ± 1,17 a	96,9	99,1
Sin fertilización	34,37 ± 13,43 b	13,94 ± 8,34 b	87,3	94,8

Nivel inicial en el día 1 de ensayo 270,33 ± 30,73.

Diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$) se indican con cambios en letra minúscula. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

F- Carbono 18 a los 350 días en todos los tratamientos (mg/kg)

Tratamiento	Valor inicial	350 días	Disminución respecto al contenido inicial (%)
Botón de oro - F		4,43± 1,78 a B	98,4
Botón de oro - NF		9,03±5,23 ab B	96,6
Charcao - F		1,69±0,69 a B	99,4
Charcao - NF		28,00±2,65 c B	89,6
Agropiro - F	270,33 ± 30,73 A	1,65±0,53 a B	99,4
Agropiro - NF		13,20±2,17 b B	95,1
Elymus - F		2,47±1,18 a B	99,1
Elymus - NF		12,73±0,46 b B	95,3
Testigo - F		2,03±8,81 a B	99,2
Testigo - NF		6,73±2,46 ab B	97,5

Diferencias entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

Comparando en nuestros resultados dos tratamientos contrastantes, por ejemplo Botón de Oro, con el Testigo se puede inferir que:

- entre el inicio del ensayo y los 6 meses, tanto en los n-alcanos como en los iso-alcanos aunque todos los tratamientos se degradan sustancialmente, a los 180 días quedan con un contenido menor al 96 % respecto al inicio del ensayo. Botón de Oro fertilizado (Figura 8) degrada mucho más que sin fertilizar (Figura 9) y que los Testigos tanto fertilizado (Figura 10) como sin fertilizar (Figura 11).
- Entre los 180 y la finalización del ensayo, los cuatro tratamientos degradan muy poco los cuatro alcanos, y con similar intensidad, menos del 0,4 % (Figura 8, 9, 10 y 11).
- Los tratamientos sin fertilizar (Figura 9 y 11) parten a los 180 días de un contenido mayor que los fertilizados (Figura 8 y 10).
- En Botón de oro con fertilización C17 no se degrada los últimos 170 días (Figura 8) mientras que sí lo hace en los otros tres tratamientos, Botón de Oro sin fertilizar y ambos Testigos (Figura 9, 10 y 11). De cualquier modo en el primer caso la degradación en los primeros 180 días es mayor que en los otros casos.
- En Botón de Oro sin fertilizar (Figura 9) y en ambos Testigos (Figuras 10 y 11) los n-alcanos (C17 y C18) y los iso-alcanos (Pristano y Fitano) la velocidad de degradación desde los 180 días de muestreo es similar (pendiente de la recta).

Figura 8. Grindelia Chilensis Fertilizado

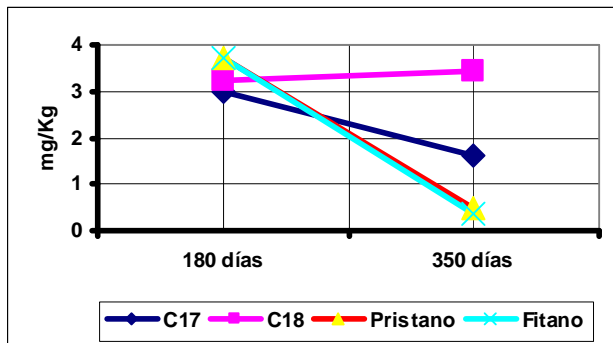


Figura 9. Grindelia Chilensis no Fertilizado

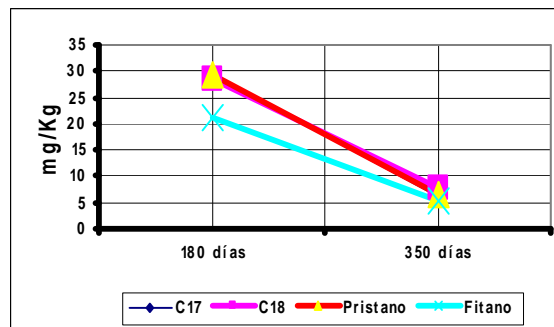


Figura 10. Testigo Fertilizado

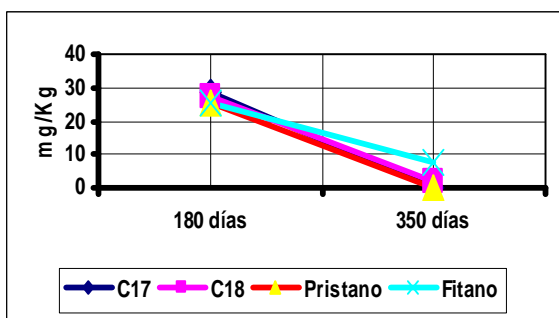
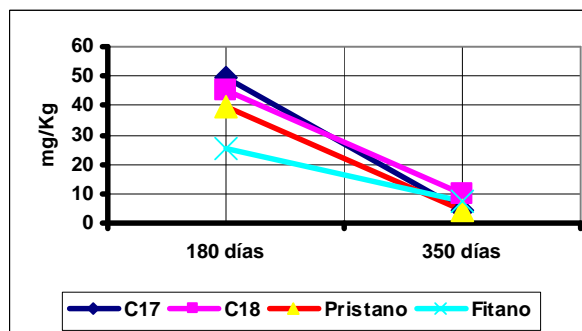


Figura 11. Testigo no Fertilizado



4.5. Degradación de los HC normales (n-alcános)

Los alcanos, HC saturados de estructura más sencilla, son los que se degradan más rápida y fácilmente. A los 180 días de ensayo existen diferencias significativas en tratamientos ($p=0,006$), en fertilización ($p<0,0001$) pero no hay diferencias en la interacción tratamientos x fertilización. Todos los tratamientos vegetados, de 6.200 mgr/kg de alcanos al inicio del ensayo, se degradan hasta 230-300 gr/kg, o sea un 4-5 % aproximadamente del contenido inicial, sin diferencias entre estos pero sí respecto al Testigo que degrada algo menos, ya que a los 180 días contiene un 10 % del contenido inicial de alcanos (Tabla 13 A). La fertilización incrementa en forma significativa la eficiencia de degradación, ya que a los 180 días degrada 3.5 veces más que cuando no se fertiliza y 4 veces más a la finalización del ensayo (Tabla 13 B).

Así como los primeros 180 días la degradación fue de magnitud, los últimos 150 días de ensayo la degradación es mínima entre tratamientos vegetados y algo menos en el Testigo sin observar diferencias entre tratamientos (Tabla 13 A).

Tabla 13. Alcanos (nC6 a nC40) a los 180 y 350 días de muestreo.

A- En los cinco tratamientos.

Tratamiento	Valor inicial	Valor absoluto de degradación (mgr/kg)		Disminución respecto al contenido inicial (%)	
		180 días	350 días	180 días	350 días
Agropiro		229,2 _± 223,2 a	132,3 _± 117,1 a	96,3	97,9
Botón de Oro		252,6 _± 251,4 a	125,9 _± 76,2 a	95,9	98,0
Charcao	6.222,3 mg/kg _± 808,6	236,2 _± 158,8 a	250,4 _± 249,9 a	96,2	96,0
Elymus		295,3 _± 342,0 a	171,0 _± 121,3 a	95,2	97,2
Testigo		640,6 _± 270,6 b	210,3 _± 185,1 a	89,7	96,6
Fertilizado		144,0 _± 80,0 a	68,6 _± 30,5a	97,7	98,9
Sin fertilización		517,5 _± 50,4 b	287,3 _± 158,1b	91,7	95,4

Diferencias entre tratamientos se indican con cambios en letra minúscula en la columna; diferencias entre fechas con respecto al valor inicial se indican con cambios en letra MAYÚSCULA en la fila. F = Tratamientos con fertilización. NF = Tratamientos sin fertilización.

B- En los tratamientos fertilizados y sin fertilizar

Tratamiento	Valor inicial	Valor absoluto de degradación (mgr/kg)		Disminución respecto al contenido inicial (%)	
		180 días	350 días	180 días	350 días
Fertilizado	6.222,3 mg/kg _± 808,6	144,0 _± 80,0 a	68,6 _± 30,5a	97,7	98,9
Sin fertilización		517,5 _± 50,4 b	287,3 _± 158,1b	91,7	95,4

Contenido inicial 6.220,3 mg/kg _± 808,6 Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Evolución cromatográfica de los n-alcanos en el tiempo.

A fin de establecer las diferentes composiciones del sustrato a medida que se produce su degradación, se analizaron las corridas cromatográficas en el muestreo inicial (día 1), en el muestreo intermedio (a los 180 días) y final (a los 350 días). El análisis de los cromatogramas permite evaluar la eficacia de un tratamiento biológico, a través de la transformación de los HC acontecida durante el proceso, la que puede ser verificada al comparar la evolución cromatográfica de los HC en el tiempo.

Tomamos como ejemplo el análisis de la muestra de los tratamientos Agropiro y Testigo, sea fertilizado como sin fertilizar. El perfil cromatográfico de los compuestos hidrocarbonados va sufriendo variaciones a medida que avanza la biorremediación. En ellas es observable procesos de cambio de los componentes del petróleo cuando toman contacto con el medio natural. Para ello, la intensidad de los picos la cual es proporcional a la concentración del componente hidrocarbúrico en el sustrato, es graficada respecto al tiempo de retención en la columna cromatográfica.

Día 1 (inicio del ensayo)

En la muestra inicial el sustrato muestra incipiente meteorización (

Figura 12). Ausencia de livianos o sea menores a C8-10, perdidos por evaporación (Figura 17). Los n-alcanos están presentes en mayor proporción que los iso-alcanos (recalcitrantes). Por debajo de la línea de base (fase MCNR) se hallan cicloalcanos, alcanos ramificados y otros isoprenoides no resueltos en la columna ya que no es posible separarlos y se resuelven en la zona ubicada por debajo de los picos (

Figura 12). Los n-alcanos son los alifáticos lineales que forman la serie homóloga que sale en el cromatograma. Mientras que los iso-alcanos son los isoprenoides, los compuestos ramificados, tales como Pristano y Fitano, de mayor resistencia a la degradación que los n-alcanos, de allí que se los denomina recalcitrantes.

Tiene baja proporción de Carbonos mayores a 32 átomos, que corresponde con los HC polares, con una concentración máxima de 150 mg/Kg, en relación a los saturados y aromáticos, ya que se observa un buen porcentaje de HC desde C10 a C22 que son los más solubles y más fácilmente degradables, correspondiendo a los alcanos, alquilaromáticos y aromáticos, con una concentración máxima de 300 a 400 mg/kg (Figura 17).

Día 180 (muestreo intermedio)

En ningún tratamiento sea vegetado (Figura 18, 19, 20 y 21) o el Testigo (Figura 22, 23, 24 y 25) se detectaron componentes livianos o volátiles menores a C10.

La concentración de Carbonos en el tratamiento no fertilizado del Testigo (Figura 23) duplica la del tratamiento fertilizado (Figura 22), 60 mgs/Kg, con un pico máximo de 95 mg/kg, y 30 mgs/Kg respectivamente, lo que es indicativo de la mayor degradación en ese período cuando se fertiliza.

En el tratamiento vegetado, Agropiro, y fertilizado, prácticamente casi todos los HC cromatografiados se hallan degradados ya que no superan los 5 mg/kg los picos (Figura 18) mientras que en el tratamiento no fertilizado (Figura 19) entre C10 y C36 aún se detecta su presencia en el cromatograma, y el pico más alto llega a 40 mg/kg.

A los 350 días (finalización del ensayo)

En ambos tratamientos tanto Agropiro como el Testigo, sean fertilizados o no, a medida que transcurre el tiempo disminuye el contenido de HC, y los picos y el área de cada pico de los cromatogramas disminuye con el tiempo; existe también un corrimiento con el tiempo de los picos iniciales del cromatograma hacia la derecha, que indica la desaparición de los HC más livianos (Figura 13, 14, 15 y 16).

En el tratamiento Agropiro fertilizado, a la finalización del ensayo (Figura 13), el sustrato ya ha sido expuesto a 350 días de meteorización: se observan aún pocos iso-alcanos; la mayoría del material no está totalmente resuelto y se puede observar una escasa proporción de n e iso-alcanos remanentes, que no se resuelven cromatográficamente debido a la complejidad de su estructura química.

La máxima concentración de HC cromatografiados corresponde en los tratamientos fertilizados, tanto Testigo (Figura 15) como Agropiro (Figura 13), a HC del rango C28 a C34, que se corresponde con los HC polares, asfaltenos y resinas, de composición compleja y difícilmente mineralizados por los microorganismos, y en los no fertilizados (Figura 14 y 16) al rango C20 a C32.

Todos los Carbono no polares se hallan prácticamente degradados casi en su totalidad, y ello es más evidente en Agropiro (Figura 20) en el que hay picos entre C28 y C34 que en el Testigo (Figura 24) donde los picos se corresponden con el rango C16 a C36, aunque es baja la concentración, menos de 15 mg/kg. O sea que en el tratamiento vegetado (Figura 20) se degradó casi completamente la cadena carbonada desde C10 a C22, o sea la más fácilmente biodegradable. En cambio en el no fertilizado (Figura 21) la degradación fue completa hasta el C16.

Cuando finaliza el ensayo en función de la representación cromatográfica, estamos frente a un HC de baja movilidad y de lenta degradación porque la mayoría de las fracciones no superan los 5 mg/kg y los que se encuentran en mayor concentración son los inmóviles, C28 a C33. Ello se hace más evidente en el tratamiento vegetado, Agropiro (Figura 20 y 21), que en el tratamiento sin vegetación, Testigo (Figura 22 y 23).

En todos los tratamientos, a excepción de Agropiro fertilizado, en el que ya han sido totalmente degradados, aún hay trazas de HC mayores a C32, pero no son móviles en el ambiente ni presentan características toxicológicas importantes que puedan tener incidencia en una evaluación de riesgos a la salud

En todas las corridas de los tratamientos a los 350 días (Figuras 13 a 16) se observa:

a) mayor cantidad de material no resuelto (MCNR), el que se ubica entre la línea de base y la base de los picos, que en el del día 1 (

Figura 12). Ello indica que la degradación transforma los compuestos hidrocarbonados originales (la fase resuelta) en otros de menor movilidad (la MCNR) que sus predecesores. Además el tamaño de área es menor y la altura de los picos de las fracciones resueltas en los tratamientos fertilizados (Figura 13 y 15) que en los sin fertilizar (Figuras 49 y 51), lo que indica una menor degradación de los HC en el último caso. Lo mismo sucede observando las corridas cromatográficas de Agropiro (Figura 13 y 14) respecto al Testigo (Figura 15 y 16), independientemente si se fertilizó o no ya que hay mayor cantidad de picos y más altos en el Testigo que en la gramínea, lo que muestra menor degradación en las macetas sin vegetar.

b) El suelo remediado en todos los casos no presenta HC superiores a C35, los cuales no son móviles en el ambiente ni presentan características toxicológicas importantes que puedan tener incidencia en una evaluación de riesgos a la salud.

c) En la muestra inicial (

Figura 12) se observa en los perfiles cromatográfico que se resuelven e identifican numerosos constituyentes, desde C8 a C41. En los perfiles de los tratamientos fertilizados predomina una mezcla compuesta sin resolver y se resuelven muy pocos picos ya que la mayoría de los faltantes corresponde a fracciones ya degradadas.

Figura 12. Corrida cromatográfica de la muestra inicial, en el día 1 de ensayo.

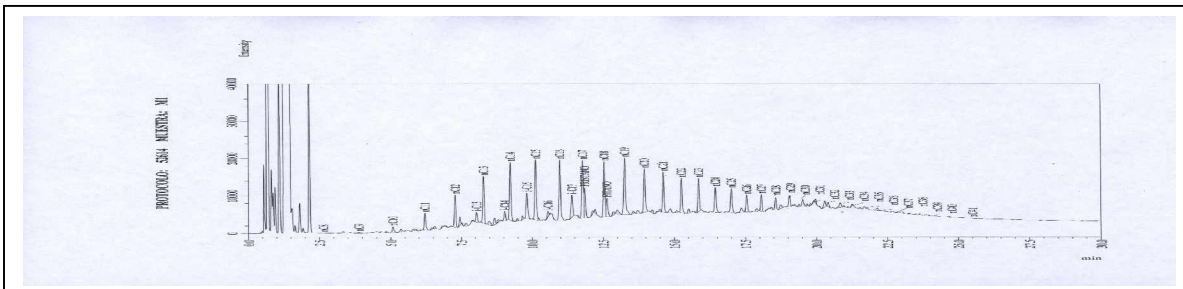


Figura 13. Cromatograma del tratamiento de Agropiro (*Thynopiron ponticum*) fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.

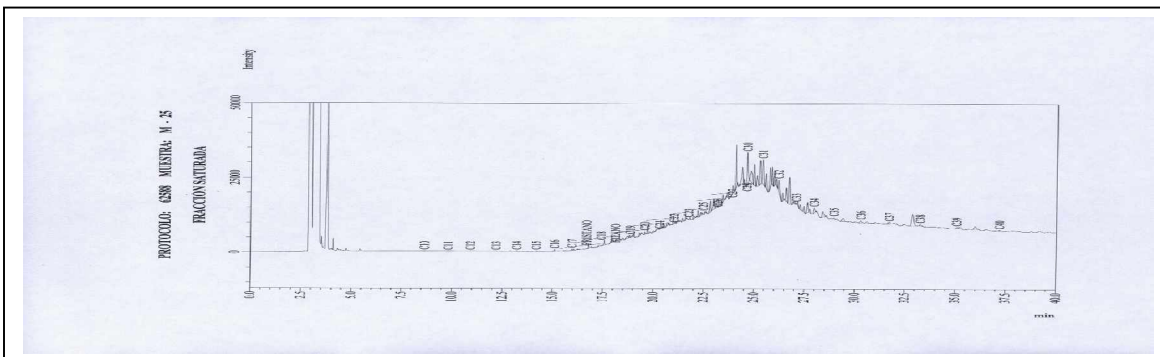


Figura 14. Cromatograma del tratamiento Agropiro (*Thynopiron ponticum*) no fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.

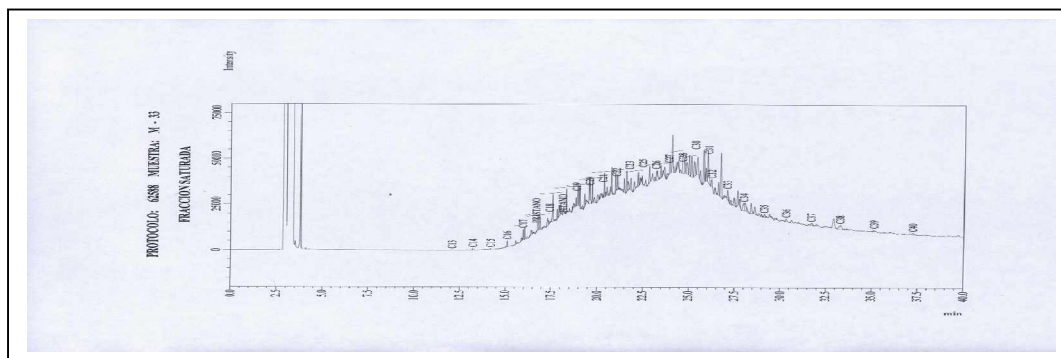


Figura 15. Cromatograma del tratamiento Testigo fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.

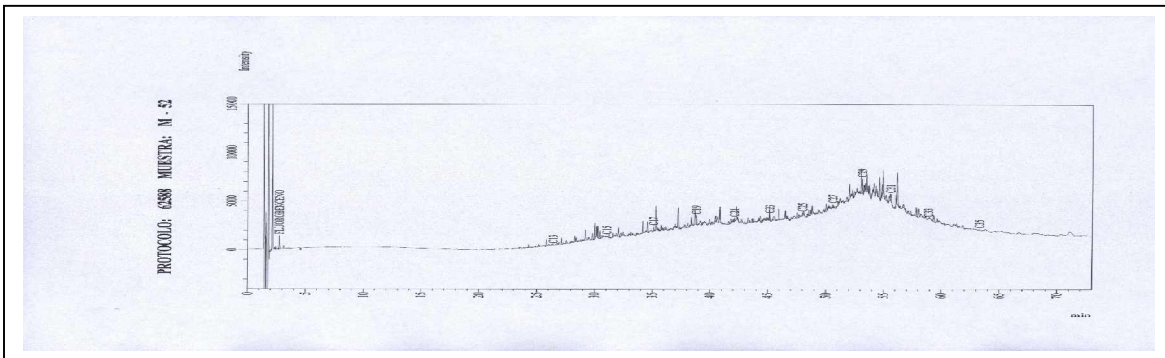


Figura 16. Cromatograma del tratamiento Testigo no fertilizado a los 350 días de iniciado el ensayo.

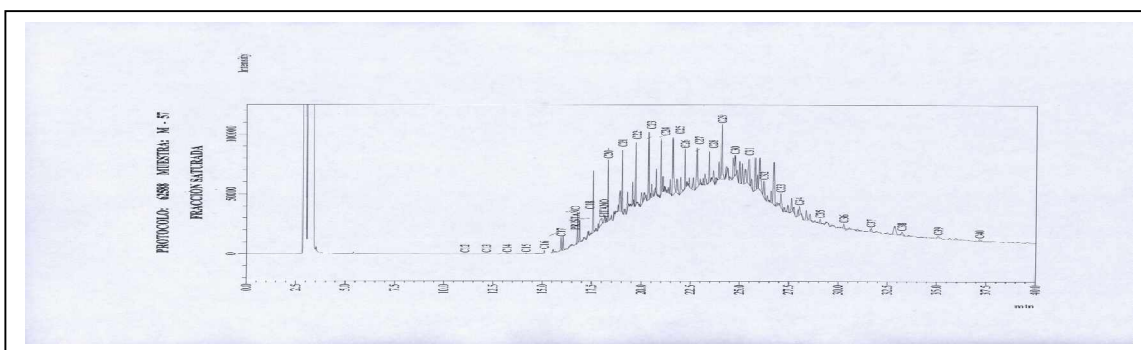


Figura 17. Distribución relativa de n-alcenos en el sustrato con HC al inicio del ensayo (día 1).

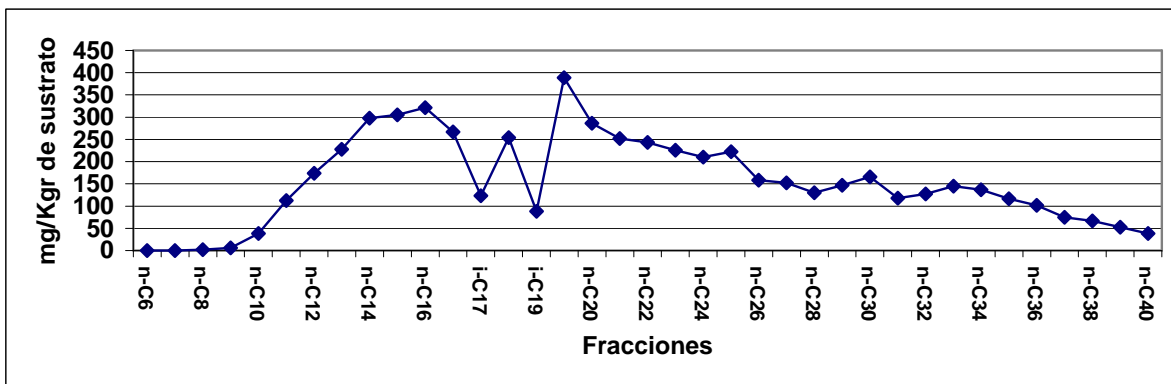


Figura 18. Distribución relativa de n-alcenos en Agropiro fertilizado (Thynopiron ponticum) , a los 180 días

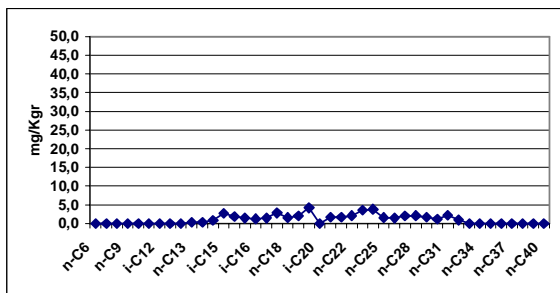


Figura 19. Distribución relativa de n-alcenos en Agropiro (Thynopiron ponticum) sin fertilizar , a los 180 días.

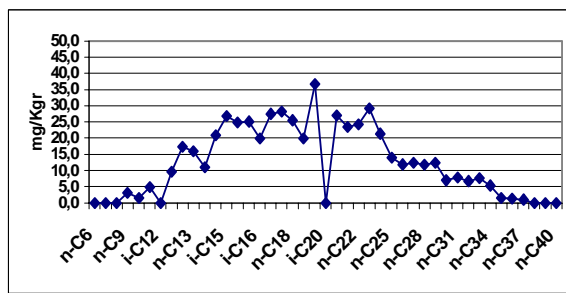


Figura 20. Distribución relativa de n-alcenos en Agropiro fertilizado, a los 350 días.

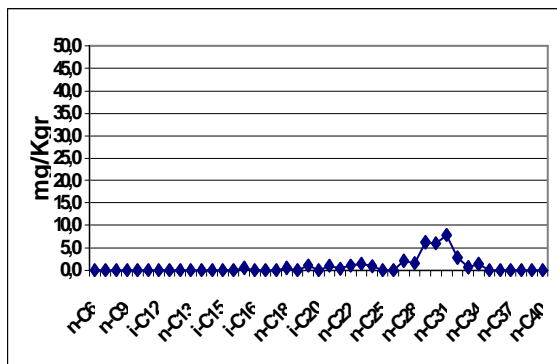


Figura 21. Distribución relativa de n-alcenos en Agropiro sin fertilizar, a los 350 días.

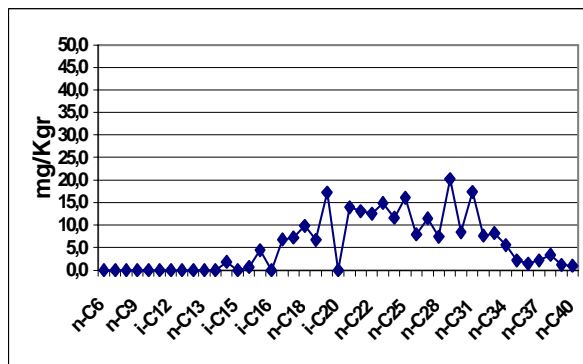


Figura 22. Distribución relativa de n-alcenos en Testigo fertilizado, a los 180 días.

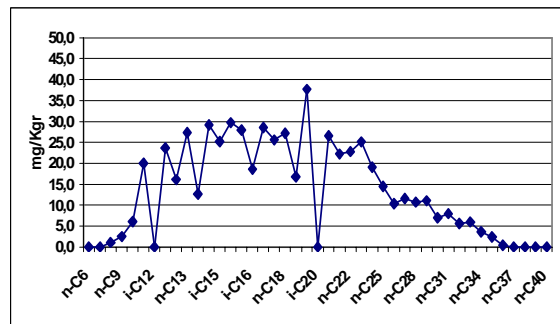


Figura 23. Distribución relativa de n-alcenos en Testigo sin fertilizar, a los 180 días.

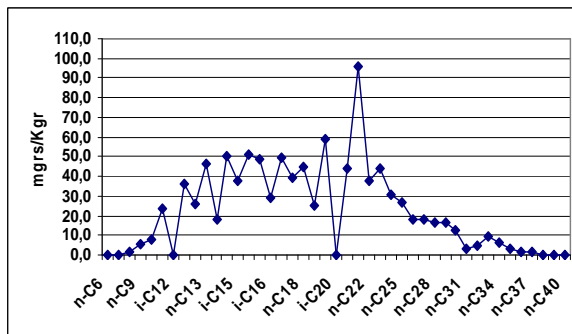


Figura 24. Distribución relativa de n-alcenos en Testigo fertilizado, a los 350 días.

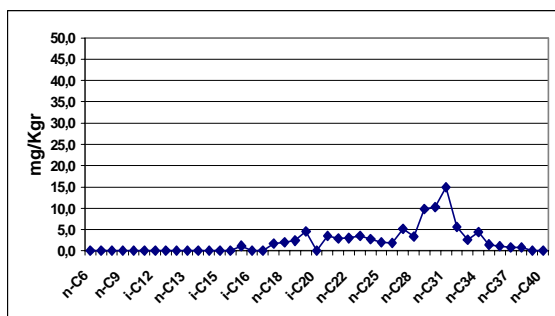
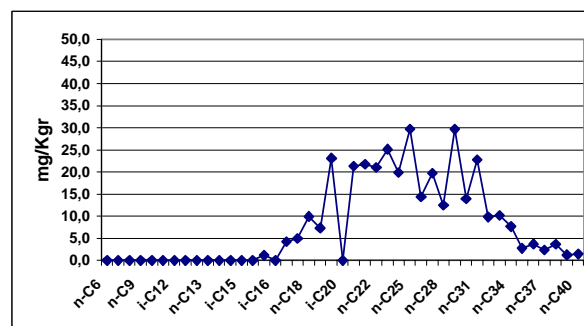


Figura 25. Distribución relativa de n-alcenos en Testigo sin fertilizar, a los 350 días.



4.6. Producción de biomasa

4.6.1. Radicular

Durante todo el ensayo se registraron diferencias en la biomasa de raíces cuando se compararon todos los tratamientos, especies ($P < 0,0001$) y fertilización ($p = 0,004$ a los 180 días y $< 0,0001$ a los 350 días) y una interacción significativa ($p = 0,003$ y $0,004$).

A los 180 días Agropiro y Elymus fertilizado, y Botón de Oro fertilizado y no fertilizado tienen la mayor producción de biomasa de raíces, y sin diferencias entre sí. Los tratamientos sin fertilización y Charcao fertilizado, los de menor producción, no difieren entre sí. En el mismo período la fertilización duplicó la producción respecto al tratamiento sin fertilizar (Tabla 14).

A los 350 días Botón de Oro tanto fertilizado como sin fertilizar tiene la mayor producción, aunque al fertilizar se incrementa 77 %. Ambos difieren significativamente de Charcao no fertilizado que tuvo la menor producción, 10 veces menos de materia seca; los demás no difieren entre sí (Tabla 14).

O sea que fertilizar produce un mayor volumen de raíces en ambas fechas de muestreo, especialmente en los primeros 180 días.

Al comparar tratamientos de sustrato empetrolado y suelo sin petróleo, ambos sin fertilizar, no hubo diferencias en la masa radicular en casi todos los tratamientos ya que únicamente se encontraron diferencias significativas en Agropiro, 15.1 y 55.1 gr/maceta de raíces, respectivamente, o sea 2,6 veces más en el suelo sin contaminar (Figura 26). Comparando tratamientos fertilizados, Charcao, Agropiro y Elymus tiene mucha mayor producción en el suelo sin petróleo, 1.7, 5.2 y 2.2 veces más en el suelo no contaminado lo a causa de un efecto inhibitorio fitotóxico del petróleo presente en el sustrato (Figura 27).

La comparación de la producción de materia seca sea biomasa aérea o de raíces en sustratos con y sin petróleo es un parámetro del comportamiento de las especies en presencia de HC en el suelo: cuanto menor es la diferencia entre ambos sería mayor la tolerancia. Botón de Oro tanto fertilizado como sin fertilizar tiene las menores diferencias en producción de materia seca de raíces

(Tabla 14). Es coincidente con varios trabajos que han demostrado la muy buena aptitud del Botón de Oro para restaurar suelos contaminados con petróleo (Ciano et al 2000 y 2002; Molina et al 1995, Nakamatsu et al 1998 y 2001).

Tabla 14. Biomasa radicular (grs/maceta) en dos fechas en los tratamientos fertilizados y sin fertilizar.

Tratamiento	180 días	350 días		MS en sustrato SP respecto a CP (%)
		CP	SP	
Botón de oro - F	15,63 ± 3,619 b	27,15 ± 7,568 bc	39,26 ± 2,349 cd	+ 44,6
Botón de oro - NF	13,68 ± 4,256 b	21,91 ± 11,351 abc	27,91 ± 8,6693 bc	+ 27,4
Charcao - F	3,71 ± 0,720 a	10,62 ± 1,736 ab	54,08 ± 1,598 d	+ 409,2
Charcao - NF	2,43 ± 0,205 a	4,17 ± 2,334 a	8,79 ± 4,406 ab	+ 110,8
Agropiro - F	16,27 ± 3,959 b	17,93 ± 3,745 abc	112,17 ± 3,812 e	+ 520,0
Agropiro - NF	3,63 ± 0,197 a	15,09 ± 2,291 ab	55,09 ± 0,376 d	+ 265,1
Elymus - F	12,53 ± 4,272 b	11,88 ± 2,919 ab	38,35 ± 1,208 cd	+ 222,8
Elymus - NF	1,36 ± 0,458 a	11,05 ± 5,536 ab	9,30 ± 0,994 ab	-15,8

CP = macetas con sustrato empetrolado SP = macetas con sustrato sin petróleo

F = Tratamientos fertilizados NF = Tratamientos sin fertilización

Figura 26. MS en raíces (gr/maceta) en sustrato con y sin petróleo, sin fertilizar, a los 350 días.

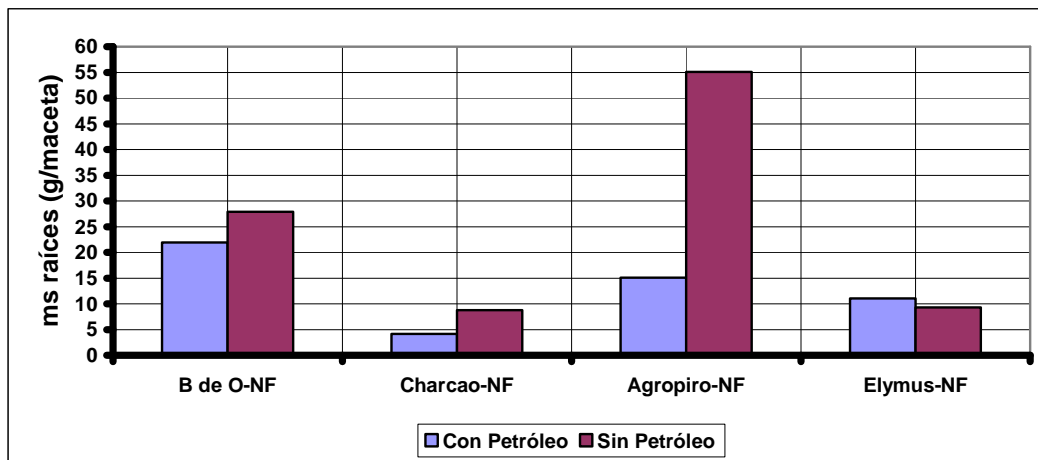
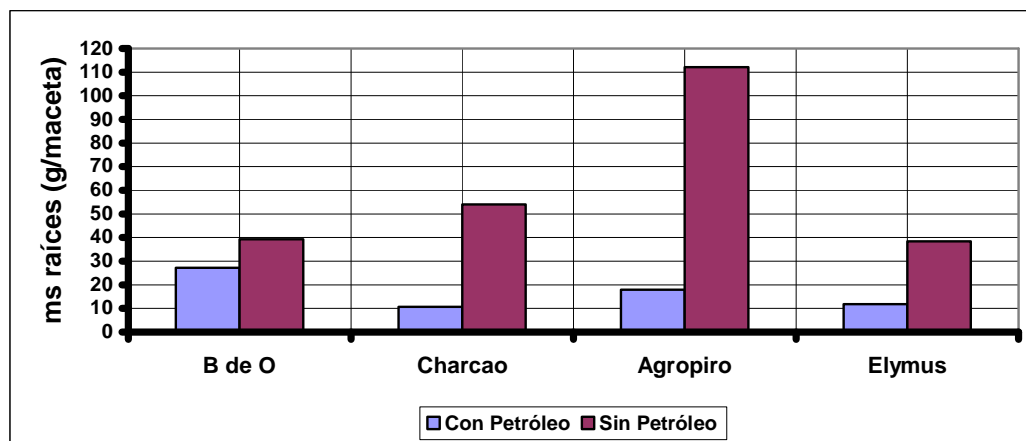


Figura 27. MS en raíces (gr/maceta) en sustrato con y sin petróleo, fertilizados, a los 350 días



4.6.2. Aérea

Se registraron diferencias en la biomasa aérea acumulada cuando se compararon todos los tratamientos, especies ($P < 0,0001$) y fertilización ($p = 0,004$ a los 180 días y $< 0,0001$ a los 350 días) y una interacción significativa ($p = 0,004$) ya que la fertilización no modificó la producción de Charcao, Agropiro y Elymus, mientras que sí lo hizo con Botón de Oro ($p < 0,01$, Tabla 15 A).

Botón de Oro y Agropiro fertilizados tiene la mayor producción de biomasa aérea (Figura 28). Charcao y Elymus sea fertilizados o no, los de menor producción, y no difieren entre sí. En el mismo período la fertilización casi duplicó la producción promedio (Tabla 15 B).

Al comparar tratamientos de sustrato empetrolado y suelo sin petróleo, ambos sin fertilizar (Figura 28), no hubo diferencias en la masa aérea en casi todos los tratamientos ya que únicamente se encontraron diferencias significativas en Botón de Oro, 15.7 y 4.0 gr/maceta respectivamente (Figura 28). Comparando tratamientos fertilizados, Charcao, Agropiro y Elymus tienen una producción entre 91 % y 167 % mayor en el suelo sin petróleo respecto al sustrato empetrolado (Figura 29 y Tabla 15 A).

La comparación de la producción de materia seca de biomasa aérea al igual que la de raíces en sustratos con y sin petróleo es un parámetro de la tolerancia de las especies al HC en el suelo: cuanto menor es la diferencia entre ambos sería mayor la tolerancia. Botón de Oro fertilizado tuvo las menores diferencias en producción de materia seca de raíces (Tabla 14).

Tabla 15. MS aérea (grs/maceta) a los 350 días de muestreo

A- En todos los tratamientos

Tratamiento	350 días		MS en sustrato SP respecto a CP (%)
	CP	SP	
Botón de oro-F	17,34 ± 3,28 ef	18,83 ± 1,226 ef	+ 8,6
Botón de oro-NF	4,00 ± 0,791 abc	15,71 ± 2,365 de	+ 292,7
Charcao-F	4,13 ± 1,835 abc	11,04 ± 0,986 bcde	+ 167,3
Charcao-NF	2,44 ± 0,797 ab	2,93 ± 0,556 ab	+ 20,1
Agropiro-F	13,49 ± 4,326 cde	25,84 ± 3,265 f	+ 91,5
Agropiro-NF	6,95 ± 1,237 abcd	10,20 ± 1,998 abcd	+ 46,8
Elymus-F	4,23 ± 1,962 abc	9,86 ± 3,409 abcde	+ 133,1
Elymus-NF	1,12 ± 0,635 a	5,20 ± 2,098 abc	+ 364,3

Letras distintas indican diferencias significativas(p< 0,05)

F = fertilizado NF = sin fertilización SP = Suelo sin petróleo.

B- En los tratamientos fertilizados y sin fertilizar.

Tratamiento	Biomasa aérea (grs./maceta)	HC (%) a la finalización del ensayo, por met. gravimétrico.
Fertilizado	9,80 ± 6,57 a	2,55 ± 0,37 a
Sin fertilización	3,63 ± 2,39 b	2,96 ± 0,35 b

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Figura 28. MS aérea (gr/maceta) en suelos con y sin petróleo, sin fertilizar, a los 350 días

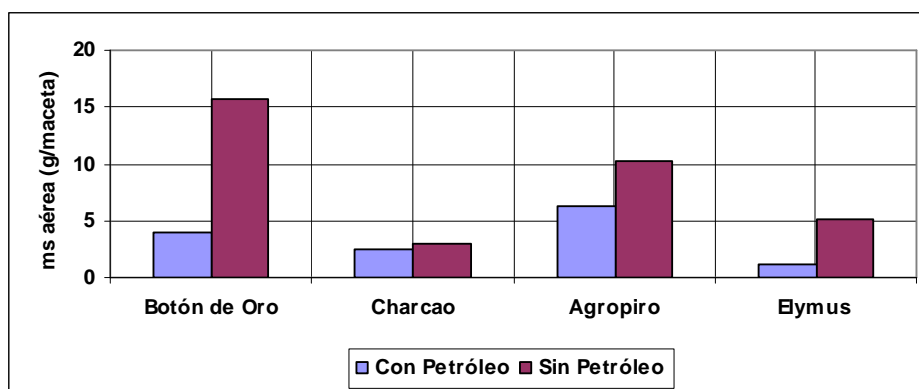
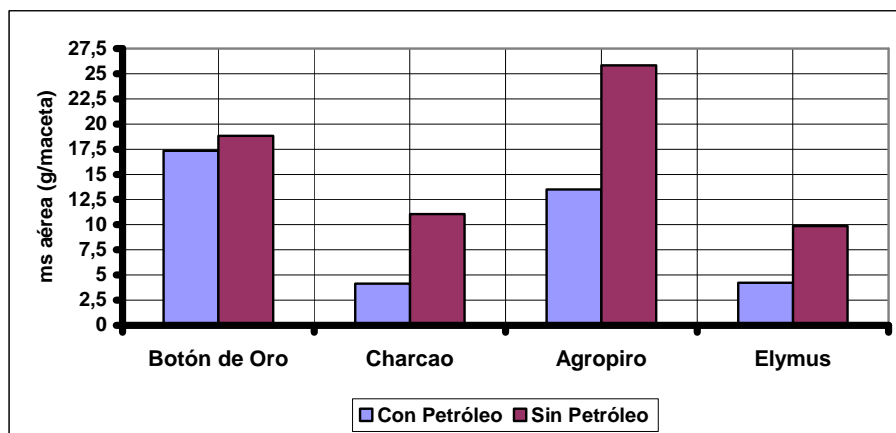


Figura 29. MS aérea (grs/maceta) en suelos con y sin petróleo, fertilizados, a los 350 días.



4.7. Consumo de nutrientes minerales

4.7.1. Nitrógeno

El contenido de Nitrógeno en el sustrato disminuyó con el tiempo independientemente del agregado de fertilizantes o de las especies presentes.

A los 180 días, al fertilizar hay diferencias significativas entre especies ($P < 0,0001$): Botón de Oro, el de mayor consumo, difiere de Elymus, Charcao y el Te, que consumieron 18 %, 26 % y 53 % menos. El consumo de Botón de Oro no difiere del de Agropiro, que consumió 11 % menos; ello es coincidente en el comportamiento de los tratamientos vegetados, con la producción relativa de biomasa aérea y radicular (Tabla 16).

A los 350 días, Agropiro, Botón de Oro y Charcao no difieren entre sí, y son los de mayor consumo, entre 1.085 y 1.362 mg/kg al finalizar el ensayo, lo que representa un consumo del 65 a 72 % del Nitrógeno disponible en el sustrato. Botón de Oro y Charcao no difieren de Elymus, que tuvo un comportamiento intermedio, consumió el 43 % del Nitrógeno del sustrato. El Testigo realizó el menor consumo de todos los tratamientos, solo consumió el 35 % (Tabla 16): al no ser un tratamiento vegetado, todo el consumo lo realizaron los microorganismos en su actividad degradatoria.

En los tratamientos fertilizados y vegetados el mayor consumo se registra en los primeros 180 días de ensayo. Mientras que en el Testigo la tasa de consumo en ese período es sensiblemente menor y luego en los últimos 150 días el ritmo de consumo es similar a los tratamientos con vegetación, pero partiendo de un nivel mayor.

En los tratamientos sin fertilizar, a los 180 días, Botón de Oro y Agropiro son quienes realizan el mayor consumo, 34 y 38 % del inicial, y el Testigo quien menos consumió, solo un 10 %, lo que es coincidente con lo sucedido en los tratamientos fertilizados, aunque a menor escala ya que partimos de un nivel inicial 58 % menor ya que cuando no se fertilizó el contenido de Nitrógeno presente en el suelo es sensiblemente menor. A los 350 días en los tratamientos sin fertilizar, Agropiro es quien consume más, disminuye un 70 % el nivel de Nitrógeno a la finalización del ensayo (Tabla 16). Charcao tiene un comportamiento intermedio, disminuye 51 % el contenido

inicial de Nitrógeno. El consumo es constante y regular durante todo el ensayo en los tratamientos vegetados, la excepción es el Testigo en donde el consumo es mayor en los últimos 150 días de ensayo (Tabla 16). El Testigo solo consume el 10 % del contenido inicial, como ya expresamos, es lo que utilizan los microorganismos.

De lo expresado en los anteriores párrafos, comparativamente ambos tratamientos Testigos, tanto fertilizado como sin fertilizar tienen similar velocidad de consumo durante todo el ensayo, entre el 100 y el 111 % en los primeros 180 días y entre 26 y 27 % los últimos 170 días, aunque partiendo de un contenido nitrogenado 2,4 veces mayor en el sustrato cuando se fertilizó (Tabla 16).

Tabla 16. Nitrógeno en el sustrato en las tres fechas de muestreo (mgs/kg sustrato).

Tratamiento	Día 1	180 días	350 días
Tratamientos fertilizados			
Agropiro		1.848 ± 77,5 ab EF	1.085 ± 43,6 a J
Botón de oro		1.640 ± 17,3 a FG	1183 ± 28,4 ab IJ
Elymus	3.901 ± 15,3 A	2.000 ± 67,6 b ED	1447,88 ± 5,8 b GH
Charcao		2.232 ± 17,6 c D	1.362 ± 95,7 ab HI
Testigo		3.458 ± 155,1 d B	2.527 ± 205,0 c C
Tratamientos sin fertilizar			
Agropiro		1.095 ± 19,5 a C	496 ± 33,6 a E
Botón de oro		1.016 ± 12,6 a C	657 ± 32,8 b ED
Elymus	1.650 ± 62,4 A	1.287 ± 62,6 b B	727 ± 12,0 bc D
Charcao		1.187 ± 26,0 ab BC	811 ± 72,8 c D
Testigo		1.481 ± 133,2 c A	1.093 ± 30,6 d C

4.7.2. Fósforo

Al igual que con Nitrógeno el contenido de Fósforo en el sustrato disminuyó con el tiempo independientemente del agregado de fertilizantes o de las especies presentes.

A los 180 días, al fertilizar hay diferencias significativas entre especies ($P < 0,0001$), ya que se da una relación muy similar a la del Nitrógeno: Botón de Oro, el de mayor consumo, 59 % del contenido inicial, difiere de Elymus y Charcao, que consumieron 53 y 49 %. El consumo de Botón de Oro no difiere de Agropiro, ya que este último solo consumió 3 % menos. El Testigo difiere de todos los demás tratamientos, los microorganismos en el proceso de degradación consumieron el 19 % del contenido inicial de Fósforo (Tabla 17).

A los 350 días, Agropiro y Botón de Oro no difieren entre sí, y son los de mayor consumo, entre 52 y 64 mg/kg al finalizar el ensayo, lo que representa un consumo del 78 y 73 % del Fósforo disponible en el sustrato. Botón de Oro y Charcao no difieren, este último consumió el 65 %. Charcao y Elymus no difieren ya que este último tuvo un comportamiento intermedio, consumió el 63 % del Nitrógeno. El Testigo realizó el menor consumo y difiere de todos los tratamientos, solo consumió el 17 % (Tabla 17). En este caso también al no ser un tratamiento vegetado, todo el consumo lo realizaron los microorganismos en su actividad degradatoria.

En los tratamientos fertilizados y vegetados el mayor consumo se registra en los primeros 180 días de ensayo. Mientras que en el Testigo la tasa de consumo en ese período es sensiblemente menor y luego en los últimos 150 días es similar a los tratamientos con vegetación.

En los tratamientos sin fertilizar, a los 180 días, Agropiro y Elymus son quienes realizan el mayor consumo, 38 y 35 % del contenido inicial. Botón de Oro y Charcao y el Testigo no difieren entre sí ya que los vegetados consumieron muy poco respecto a Agropiro y Elymus: 13, 3.7 y el Testigo no realizó ningún consumo ya que permaneció estable. A los 350 días Elymus y Agropiro son quienes consumen más, el 49 % ambos, a la finalización del ensayo (Tabla 17). Charcao, Botón de Oro y el Testigo no difieren entre sí, consumiendo entre el 34 y el 20 % del contenido inicial de Fósforo a los 350 días. El consumo es constante y regular durante todo el ensayo en los tratamientos vegetados, la excepción es el Testigo el cual todo el consumo se realiza en los últimos 150 días de ensayo.

Comparando ambos Testigo, cuando se fertilizó el consumo es constante durante todo el ensayo mientras que no se lo hizo, todo el consumo se realiza en los últimos 150 días (Tabla 17).

Tabla 17. Fósforo disponible en las tres fechas de muestreo (mgs/kg sustrato).

Tratamiento	Día 1	180 días	350 días
Tratamientos fertilizados			
Agropiro		105,2 ± 3,71 ab DE	52,0 ± 4,54 a H
Botón de oro		96,8 ± 1,80 a DEF	64,4 ± 3,75 ab GH
Elymus	237,4 ± 0,35 A	112,4 ± 2,50 b D	88,2 ± 1,46 c EF
Charcao		118,7 ± 2,75 b D	82,8 ± 2,91 bc FG
Testigo		191,8 ± 11,63 c B	158,6 ± 17,24 d C
Tratamientos sin fertilizar			
Agropiro		13,87 ± 1,16 a DE	8,13 ± 0,49 a EF
Botón de oro		12,73 ± 0,06 b AB	9,57 ± 0,49 b CD
Elymus	17,65 ± 0,35 A	15,53 ± 0,06 a D	11,53 ± 0,21 a F
Charcao		15,93 ± 0,35 b A	10,90 ± 0,10 b CD
Testigo		18,30 ± 1,71 b A	12,07 ± 0,29 b BC

5. DISCUSIÓN

En la Patagonia semiárida para sitios donde el deterioro de la vegetación y el suelo son intensos y las tasas de autogeneración son muy bajas se realizan planes de revegetación a partir de la reproducción y reimplantación de especies nativas o bien exóticas adaptadas a las condiciones ambientales extremas de la región.

Esta tesis trata de un estudio de cuatro especies en suelos de la Patagonia contaminados con HC para evaluar el comportamiento de las mismas.

Se puede inferir de los resultados obtenidos que:

1.- Comparando los métodos de determinación de HC:

En el Método primario de extracción gravimétrico (Soxhlet) los HC más livianos en su mayoría son perdidos por evaporación debido al método y se detectan los HC más pesados, los correspondientes a los de mayor cantidad de Carbonos en su estructura y dejando fuera del espectro los livianos especialmente de C₆ y C₁₆.

En el Método de inyección directa CG-FID, específicamente se detecta los HC más livianos, o sea los más fácilmente degradables, particularmente C₆-C₁₆.

a) En el análisis de la degradación de las fracciones más livianas en conjunto, por el método de inyección directa CG FID, se puede inferir que estas disminuyen entre 75 y 80 % a los 180 días, y un 80 % a su finalización.

b) Mientras que la degradación de los HC al cabo de 350 días es más marcada en todos los tratamientos respecto al método de análisis gravimétrico, debido a que el Método de inyección directa testea los HC más livianos. Por el método gravimétrico los tratamientos con mejor comportamiento en la eficiencia de degradación, Elymus y Agropiro fertilizados, disminuyen entre 36 y 43 % a los 180 días y entre 45 y 49 % al final del ensayo.

c) Los tratamientos fertilizados disminuyen un 30 % y los sin fertilizar un 21 % a los 180 días, y 37 % y 26 %, respectivamente, a la finalización del ensayo, por el método gravimétrico. Mientras que por el método de inyección directa a los 180 días los fertilizados disminuyen 68 % y los sin fertilizar un 24 %, y a los 350 días un 77 % y 48 % respectivamente. De modo tal que se observó un efecto estadísticamente significativo de la fertilización sobre la eficiencia de degradación en ambos métodos de determinación química.

d) A los 180 días los tratamientos vegetados degradaron los HC más eficientemente respecto a ambos Testigos y que los tratamientos no fertilizados, por lo cual quedó demostrado que hubo FR. En cambio seis meses después el Testigo fertilizado no tuvo diferencias significativas con los tratamientos vegetados, o sea que hubo una acción más lenta de degradación pero al finalizar el ensayo degradó tanto como los vegetados. Desde el punto de vista práctico, al utilizar plantas en la acción remediadora, la recuperación ocurre en menos tiempo que si solo se fertilizase el sustrato contaminado.

e) A los 350 días, no hay diferencias significativas entre el Testigo y los tratamientos vegetados en la degradación de los livianos, ya sea con o sin fertilización, pero sí hay diferencias significativas entre tratamientos fertilizados y sin fertilizar. Por lo tanto hay uso de los nutrientes aportados por el fertilizante por parte de los microorganismos (Bioestimulación) pero no hay FR ya que no se observó un comportamiento diferencial entre tratamientos vegetados y no vegetados. Mientras que en los HC más pesados, determinados por el método gravimétrico, hay una degradación más selectiva ya que dentro de cada tratamiento de fertilización en las gramíneas se ha hallado la degradación más eficiente y los tratamientos vegetados lo hacen significativamente más que el Testigo (FR + Bioestimulación).

2.- Los mallines son ecosistemas particularmente afectados en forma intensa por la actividad petrolera, por razones topográficas, su riqueza florística y de fauna, y ser un humedal por presencia de capas freáticas y/o cursos de agua superficiales contrastando con el medio árido que lo rodea. En este estudio los tratamientos con Agropiro y Elymus fertilizados, lograron una disminución estadísticamente significativa en los HC por método gravimétrico, del 45 y 49 % respecto al contenido inicial, 1 año después de iniciado el ensayo, comparados con el resto de los tratamientos vegetados, o sea las especies nativas, y el Testigo, sin vegetar. Ello implica que la acción fitorremediadora sería de particular importancia en la restauración de mallines degradados por derrames de petróleo ya que las gramíneas son las especies utilizadas en la resiembra de estos ambientes cuando se realizan acciones para recuperarlos (Ciano et al, 1998; Ciano et al, 2000 (a); Ciano et al 2001).

3.- Una rápida recomposición de la cobertura vegetal permite la estabilización y protección de los suelos, disminuyendo el riesgo de ocurrencia de los procesos de erosión hídrica y eólica, característicos de la Patagonia extrandina. Botón de Oro y Elymus son actualmente dos especies muy utilizadas para la recomposición de estos ambientes, siendo la primera una nativa y la segunda una exótica, actualmente muy utilizadas con estos fines. En nuestro estudio los tratamientos Botón de Oro Fertilizado y Elymus, tanto fertilizado como sin fertilización, hubieran seguido degradando HC más allá de los 350 días. Los tres tratamientos tienen una degradación constante hasta su finalización, dado que las plantas juveniles de estas especies necesitan un tiempo prolongado para desarrollar un sistema denso de raíces (Ciano 2004), requisito fundamental para la fitorremediación de los suelos contaminados. Consecuentemente esto se halla bien documentado (Frick et al 1999, Schnoor et al 1995) como uno de los aspectos negativos de la FR son sus tiempos relativamente largos de tratamiento para limpiar el sitio de contaminantes.

4.- En una FR se hallan involucrados diferentes mecanismos (Kuiper et al, 2004; Pilon and Smits 2004). El incremento de la degradación biológica en la zona de la rizósfera del suelo, en nuestro caso por la adición de nutrientes, parecería ser el principal mecanismo de disipación. Tampoco hubo lixiviado que sería otro proceso de disipación de los HC presentes en un suelo contaminado. En nuestras condiciones de ensayo actuó fundamentalmente la rizorremediación denominada también rizodegradación, la cual incluye la biodegradación de la rizósfera y biodegradación asistida de la planta involucrando la destrucción de los contaminantes en el suelo como resultado de actividad microbiana en la presencia de la rizosfera, actuando fundamentalmente sobre los HC mas pesados.

5.- El 2 % de HTP es el límite para ser considerado "residuo" de petróleo por el decreto reglamentario n° 712/02 de la ley 2567, anexo 10 (Identificación de materiales afectados con hidrocarburos), de la Provincia de Santa Cruz, la cual legisló sobre los límites de Hidrocarburos totales, la que establece que "será residuo petrolero todo material o suelo afectado por hidrocarburo como resultado de tareas de exploración, perforación, producción, mantenimiento y limpieza y/o derrames de hidrocarburos en suelo y/o agua con un contenido de hidrocarburos totales de petróleo mayor a 2,00 % p/p sobre masa seca o su equivalente 20.000 mg/Kg resultante de procesos, operaciones o actividades desarrolladas dentro de las tareas de exploración, explotación, transporte y almacenaje de hidrocarburos efectuadas dentro del yacimiento, generado en forma habitual o eventual, no programado o accidental que carece de utilidad o valor para su dueño y cuyo destino natural debería ser su eliminación".

En 350 días de degradación se llegó aproximadamente al 2 % de HTP en todos nuestros tratamientos, medido por el método gravimétrico. Ello es concordante con otro ensayo de FR realizado durante 250 días en el que el sustrato contenía HC ya degradados en campo previamente mediante biodegradación (Luque et al, 2007) (ver Tabla 6). Banks et al (2003) expresan que 2 % en el contenido total de HC es la demarcación entre suelo tóxico y no tóxico: la absorción y el metabolismo de los componentes orgánicos cesa cuando la concentración del contaminante alcanza un cierto nivel en el que los microorganismos no son capaces fisiológicamente de reducir aún más la concentración de los contaminantes, principalmente cuando aumenta la proporción de los más recalcitrantes. Pero en nuestro ensayo se requeriría un período mayor al de la duración del ensayo para reducir la concentración del contaminante a menos del 2 %, específicamente disminuir aún más la proporción de Saturados y Aromáticos.

6.- Haciendo una evaluación conjunta de todas las fracciones, evaluadas por el método SARA, podemos inferir lo siguiente:

- § En el inicio del ensayo la mayor proporción de las fracciones la constituyen los Saturados, 53.7 %, le siguen los Aromáticos con 32.1 % y los Resinoides con 14 %. Mientras que los Asfaltenos se hallan en muy baja proporción, solo el 0.3 %.
- § En la degradación no hubo diferencias significativas entre tratamientos. La secuencia de degradación encontrada es Alifáticos, Aromáticos y Asfaltenos, ello es coincidente con Pucci et al, 1995 (b), y Pucci y Pucci, 2000).
- § La fracción Saturados es la que mas disminuyó, por degradación, entre 58 y 65 %. Mientras que la fracción Aromáticos disminuyó muy poco, entre 15 y 33 % del total. A medida que disminuyeron los Saturados los Aromáticos lo hicieron con menos eficiencia Ello fue coincidente con los resultados obtenidos por Ercoli et al (1995).
- § Cantidades relativas y absolutas de Resinoides y Asfaltenos se incrementaron durante la biodegradación del HC. Diversos autores lo atribuyen a su resistencia a la degradación por su insolubilidad y la presencia de grupos funcionales que los protegen de la degradación

microbiana por las extensivas estructuras de anillos aromáticos (Atlas, 1991) y por las reacciones de condensación (Eweis et al, 2000; Leahy y Colwell, 1990). Los Resinoides aumentaron en todos los tratamientos respecto al nivel inicial, entre 36 y 74 %. Los Asfaltenos variaron muy poco, sea aumentando hasta el 0,6 % o disminuyendo hasta 0,1 %. Diversos autores encontraron un incremento en la fracción recalcitrantes dando una explicación de los factores químicos que producen este efecto. Peressutti et al (2003) detectaron una disminución en Saturados y Aromáticos pero un incremento en los componentes resistentes al ataque bacteriano como los Resinoides y Asfaltenos debido a una transformación biológica de los componentes de los HC en otros componentes de alta complejidad por oxidación produciendo procesos de polimerización en la rizósfera. Otros autores (Bossert y Bartha, 1984), reportaron la transformación de diferentes fracciones hidrocarburíferas en compuestos recalcitrantes por reacciones de condensación; el incremento de bacterias degradadoras de este tipo de fracciones sugeriría una oxidación biológica de componentes conteniendo estas fracciones.

§ También en nuestros resultados se observó que coincidentemente la remoción de material recalcitrante fue mayor bajo las condiciones en que los HC Saturados fueron menos degradados, que en nuestro caso son los tratamientos no fertilizados, un 30 % menos en promedio respecto a los tratamientos con fertilización. Varios autores sostienen que es posible que la rápida utilización de los Saturados a una baja tasa de degradación resulte en una acumulación de metabolitos que contribuye al incremento del material recalcitrante (Dibble y Bartha, 1979). Inclusive Pucci et al (1995b) en ensayos de biodegradación asistida en suelos contaminados de la misma cuenca petrolífera de la que provenían el suelo y el petróleo de nuestro ensayo obtuvieron un leve incremento en la fracción de los recalcitrantes y explican que podría deberse a la asociación o unión de Alifáticos de alto peso molecular con HC asphalténicos modificados biológicamente, que enmascararían la disminución de estos últimos por formación de sustancias tipo húmicas.

7.- Como puede observarse en las condiciones de nuestro ensayo, los isoalcanos Pristano y Fitano a pesar de ser conocidos recalcitrantes resistentes a la degradación biológica, igualmente al cabo de 180 días fueron degradados y prácticamente al mismo ritmo que los n-alcanos C₁₇ y C₁₈, lo que implica para nuestro estudio que no fueron adecuados indicadores de actividad de degradación. Ello es coincidente con los resultados obtenidos por Bragg et al (1994), ya que observó una degradación similar de Fitano y C₁₈. Alvarez et al (2000) hallaron que poblaciones bacterianas autóctonas y habituales en suelos de la Patagonia central, de los géneros Nocardia, Rhodococcus, Gordona y Dietzia tienen capacidad de degradar HC recalcitrantes y transformarlos en lípidos celulares. Gunter et al (1996) encontraron, usando ryegrass perenne, pérdida de HC mixtos incluyendo n-alcanos (C₁₀ a C₂₄) pero también algunos recalcitrantes como el Pristano, después de 22 meses. Observando los resultados obtenidos mediante el método de inyección directa podemos inferir que posiblemente la utilización de los coeficientes Pr/nC17 y Fi/nC18 hubiese sido válida al comienzo del tratamiento, en los primeros estadios del proceso de degradación. En la primera medición, realizada a los 180 días posteriores al inicio, el proceso ha avanzado mucho, dado que los microorganismos también consumen los recalcitrantes lo que conduce a una subestimación del proceso de biodegradación.

A partir de nuestros resultados se propuso reemplazar como índice de actividad degradatoria, los coeficientes Pr/nC17 y Fi/nC18 por el concepto "Tasa de Degradación diaria", a partir del contenido de HC por el método gravimétrico. Este concepto reflejó adecuadamente la mayor velocidad de degradación en los primeros 180 días de ensayo. Algunos autores recomiendan una tasa de degradación superior al 25 % para considerar el tratamiento efectivo, pero no mencionan en cuanto tiempo ó período concreto de degradación es esa tasa mínima aplicable (Alvarez et al, 2001; Belloso, 1998).

8.- En nuestro estudio las diferencias significativas en la degradación de los PAH´s en los tratamientos vegetados con una disminución entre 64 y 75 %, respecto al Testigo, que alcanzó una disminución del 34 %, sugieren un efecto fitorremediador de las especies ensayadas sobre estos componentes Aromáticos. Estos concuerda con diversos autores en los degradaron los PAH´s mediante la implementación de la FR: Olson et al (2008) expresaron que tanto las especies de las plantas como las prácticas agronómicas afectan la eficiencia de la FR de los PAH´s; cuando sembraron ryegrass perenne y fertilizaron lograron una disminución del 80 % en los niveles iniciales de los Poliaromáticos. Denis et al (2006) alcanzaron una disminución del 74 % de la concentración inicial de PAH´s especialmente aquellos con una estructura de tres anillos, siendo las gramíneas las más eficientes para degradar. Diab (2008) pudo degradar entre 64 y 75 % los PAH´s mediante la FR con tres especies y un 54 % en suelo desnudo, fertilizando con Nitrógeno y Fósforo en todos los casos.

9.- En el Cuadro nº 10 se puede observar que los Saturados fue la fracción que más fácilmente se degradó y en menor tiempo Dentro de esta fracción los n-alcenos son los que más rápidamente se degradan (Fuchs et al, 2005). Los resultados obtenidos en nuestro ensayo demostraron que los n-alcenos se degradan en un muy alto porcentaje del contenido inicial, más del 90 %, y ocurre en forma muy rápida ya que en los primeros 180 días la degradación fue de magnitud mientras que en los últimos 150 días de ensayo la degradación es mínima entre tratamientos.

10.- Al estudiar las correlaciones entre la masa radicular y la capacidad de las plantas para estimular la degradación de los HC en nuestro caso tuvimos una mayor cantidad de altas correlaciones (r) en la producción de biomasa radicular que en biomasa aérea. Esto es acorde con diversos autores (Reddy and Sethunathan, 1983; Wiltse et al, 1998; Liste and Alexander, 1999). Las más altas correlaciones (r), de tipo inverso halladas en nuestro estudio, fueron entre contenidos de Nitrógeno y Fósforo, y fechas de muestreo, con $r > -0,80$. También se halló buena correlación inversa, entre la producción de masa radicular y nutrientes ya que a mayor producción de biomasa, el agotamiento del nutriente aumenta, resultando $r > -0,55$. Las relaciones encontradas en los tratamientos fertilizados son similares a aquellos sin fertilización, una correlación algo menor se halló entre biomasa área y nutrientes, un $r = -0,75$ y $-0,80$ respectivamente. Por lo tanto ello implica que independientemente del diferente nivel nutricional del sustrato por aporte o no de nutrientes, hay agotamiento de estos a medida que aumenta la cosecha aunque las proporciones de agotamiento y producción de material vegetal sean muy diferentes. No se halló correlación entre contenido de HC medidos por el método gravimétrico y el de los nutrientes a lo largo del tiempo como tampoco se halló correlación entre la disminución de HC en los diferentes tratamientos y la producción de biomasa de raíces y aérea. Por lo tanto podemos expresar que la relación entre agotamiento de nutrientes y degradación de HC es de tipo

“indirecto” ya que estos disminuyen porque son consumidos por los microorganismos que a su vez consumen el petróleo.

11.- Al evaluar producción de materia seca aérea se debe diferenciar entre tolerancia de las especies a la contaminación de suelo con HC, y el posible efecto fitorremediador de las especies. Por lo cual, en el sustrato contaminado, a la finalización de nuestro ensayo, Agropiro y Elymus fueron las especies más eficientes para degradar HC con un alto efecto fitorremediador mientras que Botón de Oro y Agropiro resultaron ser las especies de mayor crecimiento o producción de materia seca, resultando ser las especies de mejor tolerancia a los HC (Figuras 13 y 14) y mayor producción de materia seca en el suelo sin petróleo, al igual que en el sustrato empetroado. Pero la presencia de petróleo en el sustrato disminuyó la producción de biomasa aérea respecto al suelo sin petróleo demostrando una leve fitotoxicidad a las concentraciones de HC evaluadas.

La incorporación de nutrientes disminuyó el efecto depresor del HC sobre el crecimiento de las plantas y por lo tanto aumentó significativamente la producción de biomasa aérea respecto a los tratamientos sin fertilización. Por lo que podemos inferir que una misma especie puede tolerar diferentes niveles de HC según tenga o no una adecuada disponibilidad de nutrientes, comparando la producción de materia seca aérea de las especies, en el sustrato con petróleo respecto a sin HC, cuando se fertilizó Botón de Oro obtuvo la menor diferencia, 8.6 %, a favor del suelo descontaminado. Contrariamente, cuando no se fertilizó la diferencia entre ambos tratamientos fue amplia, se triplicó el rendimiento en suelo sin HC (Tabla 36), mientras que en Elymus sin fertilización es donde hubo la menor tolerancia al HC ya que disminuyó 3.5 veces la producción de biomasa aérea en sustrato con petróleo respecto a suelo descontaminado.

12.- Los HC en el suelo pueden reducir significativamente el aprovechamiento de los nutrientes debido a que tienen un alto contenido de Carbono y además provee pobremente de Nitrógeno y Fósforo. También crea deficiencias nutricionales en el suelo el uso de Nitrógeno y Fósforo por parte de los microorganismos que degradan los HC. Se produce una reducción en el nivel de Nitrógeno por su inmovilización debido al rápido crecimiento de la población microbiana de las bacterias degradadoras y la supresión de la fijación bacteriana de Nitrógeno. Los HC también pueden limitar el acceso a los nutrientes. Estas limitaciones son solucionadas mediante la aplicación de fertilizantes en el suelo ya que el daño en las plantas de un suelo contaminado puede ser minimizado por fertilización con altas dosis y de este modo movilizar los nutrientes necesarios dentro de la planta a pesar de la reducción de la capacidad de las raíces para absorber nutrientes a través de un suelo contaminado.

Por otro lado en términos generales fertilizar el sustrato contaminado con HC hace más eficiente la degradación y en forma significativa: Los nutrientes aprovechables son un factor fundamental que gobierna el éxito de la remediación. En nuestro ensayo el efecto del aumento de la eficiencia de la fertilización se hizo evidente en todos los tratamientos.

Ya otros trabajos mostraron que en suelos de la Patagonia semiárida la incorporación, al sitio a biorremediar, de nutrientes nitrogenados y fosforados incrementa la velocidad de eliminación de compuestos hidrocarbonados presentes en el suelo cuando se fertilizó (Mendoza et al, 1996(a); Luque et al, 1996 y 1998; Pucci et al, 2000; Pucci y Pucci, 2003; Acuña y Pucci, 2008). Específicamente Mendoza et al (2000) observó una interacción positiva entre petróleo y fertilización especialmente en el nivel del 4 % de HC presente en el suelo (que es similar contenido que tenía el sustrato al inicio de nuestro ensayo).

El aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos por parte de los microorganismos fue declinando con el tiempo, particularmente después de los primeros 180 días. Por ello hay tratamientos que después de los 180 días (Tablas 38 y 39) entraron en un período estacionario o de meseta en el ritmo de degradación, donde la disminución de la concentración es casi inapreciable, este fenómeno se lo puede denominar "período de saturación" en la capacidad de degradación. Ello ocurrió en Agropiro, tanto fertilizado como no fertilizado, y en el Testigo, Charcao y Botón de Oro, estos últimos sin fertilización. Podríamos inferir que en el caso del Agropiro fertilizado la degradación fue eficiente y máxima los primeros seis meses (180 días). En los demás tratamientos al no haber fertilizado, la cantidad de nutrientes en el suelo era muy poca, en relación a los tratamientos fertilizados, y por lo tanto los microorganismos y las plantas utilizaron rápidamente, antes de los 180 días, lo poco disponible. Pucci et al (1996b) en un ensayo que duró 294 días, en la cuenca del Golfo San Jorge encontraron que la mayor disminución se produjo en los primeros 170 días; el aumento en los recuentos de bacterias degradadoras de HC acompaña la disminución de los HC en los primeros 100 días para luego estabilizarse e inclusive disminuir. También hallaron que los valores en la etapa de incremento de bacterias son coincidentes con una rápida disminución del petróleo y esta es una fase de transformación del petróleo en biomasa que también incluye mineralización. Mendoza et al (2000) fertilizaron en un derrame en la misma región y encontraron que la disminución en el contenido de HC fue rápida inicialmente y luego disminuyó.

Algunos investigadores no observaron después de fertilizar, un incremento en la tasa de degradación o bien un aumento en la tasa de degradación después de varios meses de hecha la aplicación (Olivieri et al, 1976; Raimond et al, 1976). Este punto de vista contradictorio aparentemente es atribuido por Bossert y Bartha (1984) a la composición compleja y variable de los suelos y otros factores tales como disponibilidad de reservas de Nitrógeno y la presencia de bacterias fijadoras de Nitrógeno. En nuestro caso el comportamiento fue inverso: la respuesta a través de la degradación fue rápida e intensa durante los primeros seis meses de ensayo, para luego declinar.

13.- Hay consumo mayor de Nitrógeno en los tratamientos fertilizados que los sin fertilizar, ya que en el primer caso en promedio se consumieron 2.379 mg/kg mientras que en el segundo, 893 mg/kg. Pero ello sería más atribuible a la producción de material vegetal que a lo consumido por los microorganismos en la degradación ya que no se halló correlación entre el nivel de Nitrógeno y el de la degradación de HC en cada fecha de muestreo. En el caso de Fósforo también, al igual que en el caso del Nitrógeno, existe una relación entre el agotamiento de los nutrientes durante el tiempo de duración del ensayo y la producción de materia seca aérea y radicular, encontrándose correlación entre nivel de Fósforo a través del tiempo y producción de materia seca aérea tanto en los tratamientos fertilizados ($r = -0.61$) como en los no fertilizados ($r = -0.90$).

Pero por otro lado quedó demostrado que parte del Nitrógeno y del Fósforo, presentes en el suelo al inicio del proceso de degradación es utilizado por los microorganismos como compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo del proceso degradativo, en el hecho de que en el Testigo (tratamiento sin vegetar) también hay disminución de los mencionados nutrientes.

6. CONCLUSIONES

Sobre un sustrato contaminado con HC se ensayó la capacidad fitorremediadora de 4 especies vegetales presentes en la Patagonia semiárida, dos exóticas y otras 2 autóctonas, bajo dos medidas diferentes de manejo, con y sin fertilización. Simultáneamente se realizaron varios tipos diferentes de análisis químicos a fin de determinar cuales parámetros reflejan más adecuadamente el proceso de degradación a través del tiempo.

La determinación de HTP por el análisis gravimétrico reflejó adecuadamente la degradación de los HC en el sustrato y en el desempeño de la FR. Adicionalmente es aconsejable realizar otras determinaciones que reflejan el comportamiento de los componentes hidrocarbúricos durante el proceso degradativo, por ejemplo, Hidrocarburos livianos (C_6 a C_{40}) determinados por inyección directa CG-FID, fracciones determinadas por el método SARA, PAH's y la evolución cromatográfica de los n-alcenos a través del tiempo.

Al estudiar los Hc livianos mediante el método de inyección directa CG-FID se concluye que se pierden con facilidad ya que con solo fertilizar logramos la biodegradación aunque con menos eficiencia que cuando revegetamos, mientras que considerando el método gravimétrico con los tratamientos vegetados sí hubo un efecto e FR, y las más eficientes fueron las gramíneas exóticas ya que durante todo el ensayo degradaron el petróleo en forma significativa respecto a las especies autóctonas y al Testigo sin vegetación. Esta acción se incrementó sustancialmente mediante fertilizaciones.

El comportamiento diferencial en los tratamientos fertilizados respecto a los no fertilizados incluido una mayor biodegradación de los HC justificaría la necesidad de aportar nutrientes al medio durante el proceso de FR luego de una contaminación del suelo con petróleo.

No se encontraron correlaciones entre producción de biomasa de raíces y eficiencia en la FR.

La rizorremediación fue el proceso fundamental que actuó en nuestro ensayo, fundamentalmente sobre los HC más pesados.

El tratamiento realizado resultó un enfoque adecuado para la descontaminación de los suelos con HC, para el 2 % de HTP fijado por la regulación de Santa Cruz, pero se requeriría un período mayor a 1 año para reducir la concentración de los HC a menos del valor fijado, específicamente disminuir aún más las fracciones de los Saturados y de los Aromáticos.

Fue evidente la acción fitorremediadora en la degradación de los PAH's, que junto a los BTEX son los únicos componentes hidrocarbúricos contemplados a través de niveles guía de calidad de suelos en la legislación nacional ambiental, Ley nº 24.051 de Residuos Peligrosos.

Los coeficientes Pri/nC_{17} y Fi/nC_{18} en este estudio no resultaron ser buenos indicadores de la actividad de degradación cuando esta se halla en proceso avanzado. Por lo tanto se propone reemplazarlos en los ensayos y trabajos de campo de restauración de suelos empetrolados, por el concepto "Tasa de Degradación", a partir del contenido de HC por el Método gravimétrico.

En las condiciones de nuestro ensayo la implementación de la FR es una tecnología eficiente ya que permite el crecimiento de plantas sobre los suelos contaminados y permite la producción de una biomasa suficiente para la fitodegradación y la degradación microbiana. Particularmente las especies

de un gran volumen de raíces tales como las gramíneas exóticas adaptadas a las condiciones de Patagonia son las de mayor eficiencia por sobre las especies nativas.

Aplicación futura de los resultados del estudio.

La utilización generalizada de Agropiro en la resiembra de mallines degradados, cobra mayor importancia a partir de nuestros resultados del poder fitorremedidor del mismo sobre los HC. Adicionalmente, el uso de estas especies en la restauración de estos ambientes tendría una acción fitorremediadora significativa en la restauración de mallines.

Agropiro era una especie ya conocida por su tolerancia a los suelos contaminados con HC en humedales de la Patagonia árida pero la respuesta del *Elymus* la muestra como otra especie a ser tomada en cuenta para restaurar ambientes contaminados con petróleo por lo que se abre la posibilidad de realizar ensayos de campo en lo que hace a la tecnología de implantación que permita la mayor emergencia y posterior supervivencia de esta especie en esas condiciones.

En sitios biestimulados, y bajo regímenes hídricos naturales, el proceso de Fitorremediación se daría a un nivel diferente al observado en este experimento y es por ello que proponemos: a) evaluar áreas con varios años de sucedido un derrame y posterior laboreo, muestreando cerca de la vegetación desarrollada y establecida y en parches sin vegetación, considerando como control áreas aledañas donde no hubo efecto del derrame; b) en un derrame con 6 meses a 1 año de sucedida la contingencia realizar un ensayo y a gran escala la implantación del sitio con arbustivas de reconocida tolerancia al petróleo realizando durante por lo menos tres años el seguimiento de su posible acción fitorremediadora analizando los mismos parámetros químicos que reflejan adecuadamente la evolución y eficiencia de la degradación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A., O. Pucci y G. Pucci. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Revista Ecosistemas* 17: 85-93. Asociación Española de Ecología Terrestre.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego Academy Press. New York. 284 pp.
- Alvarez, H y O. Pucci. 2000. Biodegradación de HC por bacterias Actinomycetes aisladas en la Patagonia central. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Alvarez, H; M. Souto; A. Viale y O. Pucci. 2000. Degradación de un alcano ramificado (Pristano) por una cepa bacteriana autóctona de Patagonia. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Alvarez, J.; E. Ramos; B. Fernandez y A. Nuñez. 2001. Impacto ambiental ocasionado por la actividad petrolífera en Cuba y sus soluciones tecnológicas. CUPET. La Habana.
- Aprill, W. & Sims, R. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulation polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
- Arce, M. y S. González. 2000. *Patagonia, un jardín natural*. Editores Arce-González. 137 pgs. Comodoro Rivadavia, Pcia del Chubut.
- Atlas, R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microb. Rev.* 45:180-209.
- Atlas, R.M., 1995. *Bioremediation*. In: C & EN Special Report. ACS Products services, American Chemical Society, Washington, DC.
- Banks, M.; Schwab, P.; Liu, B.; Kulakow,, P; Smith, J. and Kim, R.. 2003. The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 78:75-96.
- Belloso, C. 1998. Biodegradación de suelos contenidos en terrarios. 26º Congreso Interamericano de Ingeniería y Ambiental. La Habana.
- Bengtsson, G. and P. Zerhouni. 2003. Effects of carbon substrate enrichment and doc concentration on biodegradation of PAH´s in soil. *J. Appl. Microbiol.* 94, 608-17.
- Becker, G.F, Bustos, C. y Marcolín, A. 2001. Ensayos de revegetación de veranadas degradadas por sobrepastoreo de Lonco Huan (Provincia del Neuquén). INTA EEA Bariloche. Seminario taller internacional Argentino Chileno. Resúmenes del taller de actualización sobre métodos de evaluación, monitoreo y recuperación de pastizales naturales patagónicos. INTA-FAO-INIA. p 57.
- Bossert, I. and Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems, p. 434-476. In R. Atlas (ed), *Petroleum microbiology*. Mac Millan Publishing Co. New York.
- Biederbeck, V; St. Jaghes, E; Curtin, R; Geissler, H; Selles, F and Waddington, J. 1993. Use of heavy oil waste sludge for protection and improvement of sandy soil. Agriculture and Agri-Food Canada, SK, and Environment Canada.
- Bragg, J.; R. Prince; E. Harner y R. Atlas. 1994. Effectiveness of bioremediation from the Exxon

- Valdez oil spill. *Nature* 368: 413-418.
- Brown, J; Lockheed M. & Edison, N. 2000. Soil qualitativas a prerequisite for conventional or plant-mediated bioremediation of petroleum contaminated soil. University of Massachusetts. The Annual International Conference on Soils, Sediments and Water.
- Calabrese E. and P. Kostecki. 1993. Principles and practices for petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. 658 pp.
- Cantero, J.; Videla, S.; Gálvez, J.; Vardaro, S.; Tettamanti, G.; López, A. y Ercoli, E. 2005. Límites prácticos de biorremediación de suelos afede inyección directa CG-FIDdos por petróleo. 6tas Jornadas de preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. 31 de Octubre y 1-2 de Noviembre 2005. Organizadas por el Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG). Neuquen, Argentina.
- Castro, J. M; J. M. Salomone y R. N. Reichart. 1983. Un nuevo método para la fijación de médanos en la Región Patagónica. IDIA, Suplemento nro. 36. Séptima Reunión Nacional para el estudio de las regiones Aridas y Semiáridas.p. 254-255.
- Catallo, W.J., Portier, R.J., 1992. Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. *Water Science Technology* 25, 229–237.
- Chiaranini, F. Y D. Campolongo. 1995. Inoculación de bacterias *Pseudomonas putida*. 2º Simposio HC y Medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Ciano, N., Nakamatsu, V. y Luque, J. 1998. Evaluación de sistemas de siembra de Agropiro Alargado en mallines salino-sódicos de la Patagonia. *Rev. Arg. De Prod. Animal*. Vol. 18 – Sup 1. Pág. 109
- Ciano, N.; Luque, J.; Amari, M. y Buono, G. 2000 (a). Establecimiento de Agropiro alargado bajo 3 sistemas de siembra en mallines salino sódicos de la Patagonia. Ade inyección directa CG-FIDs del XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Pcia. de Buenos Aires).
- Ciano, N.; Nakamatsu, V.; Luque, J.; Amari, M.E.; Owen, M. y Lisoni, C. 2000 (b). Revegetación de áreas disturbadas por la actividad petrolera en la Patagonia extra andina. Ade inyección directa CG-FIDs de la 11º Conferencia de la Organización Internacional de la Conservación del Suelo. Buenos Aires. 22 al 27 de Octubre del 2.000. pag 257.
- Ciano, N; V. Nakamatsu; J. Luque; M. Amari y C. Lisoni. 2000 (c). Reconstrucción de la cobertura vegetal en un área disturbada por la realización de una locación en Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut. Cuartas Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. Salta, Argentina.
- Ciano, N.; J. Luque; M. Amari y G. Buono. 2001. Producción de Agropiro alargado en 3 sistemas de siembra en mallines salino sódicos de la Patagonia. Taller de actualización sobre métodos de evaluación, monitoreo y recuperación de pastizales naturales patagónicos. IV Reunión del grupo regional patagónico de ecosistemas de pastoreo, auspiciado por la FAO. 26 y 27 de Junio 2001. P. 72.
- Ciano, N.; Salomone, J.; Nakamatsu, V.; Luque, J. 2001. Nuevos escenarios para la remediación de áreas degradadas en la Patagonia. IV Reunión del Grupo Regional Patagónico de Ecosistemas de Pastoreo (FAO – INTA – INIA). Taller de actualización sobre métodos de evaluación, monitoreo y recuperación de pastizales naturales patagónicos. 26 y 27 de julio.

- Chubut, Argentina.
- Ciano, N. 2002. Captación de agua en plantaciones de arbustos de áreas degradadas en la Patagonia extrandina. XVIII Congreso Argentino de las Ciencias del Suelo. 16 al 19 de abril. Chubut, Argentina.
- Ciano, N.; J. Salomone; V. Nakamatsu y J. Luque. 2002. Remediación de áreas degradadas en la Patagonia extrandina: viejos problemas, nuevos desafíos. XVIII Congreso Argentino de las Ciencias del Suelo. 16 al 19 de abril. Chubut, Argentina.
- Ciano, N. 2004. Producción de plantines de arbustos nativos para la recuperación de áreas degradadas de la Patagonia extrandina. Revista Patagonia Forestal. Año X n° 2. Junio 2004. Pags 3-5.
- Ciano, N. 2004. Producción de plantines de arbustos nativos para recuperación de áreas degradadas de la Patagonia Extrandina. Revista Patagonia forestal. v. 10, no. 2 (jul. 2004).
- Cruz, M.; Plaza, G. y Chihan, S. 2005. Ensayo de germinación y crecimiento de gramíneas en suelos biorremediados. 6tas Jornadas de preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. Organizadas por el Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG). 31 de Octubre y 1-2 de Noviembre 2005. Neuquén, Argentina.
- Denis, S.; C. Rollin; F. Guillot and H. Baroudi. 2006. In situ phytoremediation of PAH´s contaminated soils following a bioremediation treatment. Water, air and soil pollution Vol 6 n° 3-4 pp 299-315 (17).
- Diab, E. 2008. Phytoremediation of PAH´s in a polluted desert soil with special reference to the biodegradation of the carcinogenic PAH´s. Australian Journal of basic and applied sciences, 2 (3): 757-762.
- Dibble, J. and R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. Appl. Environm. Microbiol. 37:729-39.
- Epuri, V. and D.L. Sorensen. 1997. Benzo(a)pyrene and hexachlorobiphenyl contaminated soil: phytoremediation potential. Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. E.L. Kruger, T.A. Anderson and J.R. Coats (eds.). American Chemical Society, Washington, DC. ACS Symposium Series 664. Pp. 200-222.
- Ercoli, E.; B. Fuentes; M. Gilobert y M. Arreghini. 1995. Tratamiento biológico de lodos de refinería. 2º Simposio HC y Medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Ercoli, E.; M. Gilobert y M. Arreghini. 1995. Tratamiento biológico de lodos de refinería. 1995. 2º Simposio de HC y Medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Eweis J., S. Ergas, D. Chag, E. Schoroeder. 1999 Principios de Biorrecuperación. 1ª ed. McGraw-Hill. Madrid, España. 327 pp.
- Frick, R.; E. Farrell & J. Germida. 1999. Assessment of Phytoremediation as an in situ technique for cleaning oil-contaminated sites. University of Saskatchewan. Canada.
- Fuchs J.; M del R Rosso y F. Portela. 2005. Evaluación del proceso de biodegradación de compuestos hidrocarbonados. 6tas Jornadas de preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. 31 de Octubre y 1-2 de Noviembre 2005. Organizadas por el

- Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG). Neuquén, Argentina.
- Günther, T., U. Dornberger and W. Fritsche. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*. Volume 33, Issue 2, July 1996, Pages 203-215
- Guitar, E y Bottaro, H. 2001. Evaluación económica de un caso de recuperación ambiental: Fijación de un médano en Cushamen (Chubut). Técnicas empleadas y evaluación económica. Carpeta Técnica INTA Esquel. Agosto 2001.
- Interstate Technology and Regulatory Cooperation (ITRC). 1999. Phytoremediation Decision Tree. Work Group Phytoremediation Work Team.
- Karthikeyan, R. and P. Kulakow. 2003. Soil Plant Microbe Interactions in Phytoremediation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Volume 78. Pag 52-74.
- Kirk, J.L., J.N. Klironomos, H. Lee, J.T. Trevors. 2002. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremediation Journal* 6(1): 57-63
- Kuiper I., E. Lagendijk, G. Bloemberg and B. Lugtenberg. 2004. Rhizoremediation: a Beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 17: 6 – 15.
- Leahy, J., and R Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1990 September; 54(3): 305-315
- Lewis Hutchinson, S; Schwab, A and Banks, M. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of irrigation techniques and scheduling. *Journal environmental quality*, vol 30, september-october 2001. p 1516-1522.
- Liste, H. and M. Alexander. 1999. Rapid screening of plant promoting phenanthrene degradation. *J. Environ. Qual.* 28, 1376-77.
- Luque, J.; D. Molina Sánchez, M. Amari. 1994. Características edáficas de suelos afede inyección directa CG-FIDdos por derrames de petróleo. II° Simposium de Ciencia y Tecnología en la Patagonia Austral Argentina-Chile.
- Luque, J.; M. E. Amari; V. Nakamatsu y N. Ciano. 1996. Utilización de nutrientes en la biodegradación de suelos contaminados con HC. II^{as} Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. Organizado por el IAPG. San Martín de los Andes (Neuquén).
- Luque, J.; M. Amari; V. Nakamatsu; N. Ciano y O. Mackeprang. 1998. Saneamiento de un área de derrames de HC mediante la biodegradación. Ade inyección directa CG-FIDs del XVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Carlos Paz. 4 al 7 de mayo de 1998. Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo. p. 325.
- Luque J, V Nakamatsu, N Ciano, M Amari, y C Lisoni. 2000. Monitoreo de la evolución de la biodegradación del petróleo en un derrame próximo a la ciudad de Caleta Olivia, pcia. de Santa Cruz .Cuartas Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. 3 al 6 de Octubre. Salta, Argentina.
- Luque, J.; Ciano, N.; Nakamatsu, V.; Amari, M.E. y Lisoni, C. 2000. Saneamiento de derrames de HC por la técnica de biodegradación "in situ" en Patagonia, Argentina. Ade inyección directa CG-FIDs de la 11° Conferencia de la Organización Internacional de la Conservación del Suelo. Buenos Aires. 22 al 27 de Octubre del 2.000. Pág 188.
- Luque, J., N. Ciano y V. Massara. 2004. Evaluación de la fitorremediación de suelos afectados por hidrocarburos. Convenio INTA-Repsol YPF S.A. Acuerdo EEA Chubut del INTA-CTA de

- YPF S.A. Informe Técnico. Octubre 2007.
- Mackey, C.V. and E.J. Deput. 1985. Natural revegetation of surface-deposited spent oil shale in Colorado. *Reclamation and Revegetation Research* 4: 1-16
- Méndez-Natera J, C Roque, K. Zapata y V. Otahola-Gómez. 2004. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 66 – 71.
- Mendoza, R.; Rodríguez, D y Portal R.(a) 1996. Empleo de residuos orgánicos de petróleo en suelos agrícolas: Efecto en la lixiviación de HC, actividad microbiana y producción de forraje. 2as Jornadas de preservación de agua, aire y suelo en la industria petrolera. IAPG. San Martín de los Andes, Argentina.
- Mendoza, R.; Rodríguez, D y Portal R.(b) 1996. Empleo de residuos orgánicos de petróleo como enmienda en suelos agrícolas: Efecto sobre la conservación de la humedad del suelo y la producción de tubérculos en papa. 2as Jornadas de preservación de agua, aire y suelo en la industria petrolera. IAPG. San Martín de los Andes, Argentina.
- Mendoza, R.; W. Mack Cormack; E. Pagani; L. Marban y L. Ríos Merino. 1998. Efectos del derrame de petróleo en suelo sobre microflora degradadora de HC, la vegetación y algunas propiedades químicas del suelo. 3ras Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. Chubut, Argentina.
- Mendoza, R; W. Mack Cormack; E. Pagani; L. Marban; L. Ríos Merino y R. Portal. 2000. Contaminación con crudo, efecto sobre propiedades del suelo, la vegetación y microflora degradadora de HC. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Molina Sánchez D, J Luque, M Amari, R Mac Karthy, C Lisoni, J Quinteros y O Mackeprang. 1995. Recuperación edáfica y revegetación de áreas afectadas por derrames de petróleo en la región árida fría de Patagonia. Segundo Simposio de Producción de HC. 12 al 16 de junio. IAP. Mendoza, Argentina.
- Mueller, J.G., C. Cerniglia, and P. Pritchard. 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. p. 125–194. In R.L. Crawford and D.L. Crawford (ed.) *Bioremediation: Principles and applications*. Cambridge Univ. Press, New York.
- Nakamatsu V, J Luque, N Ciano, M Amari, V Utrilla y C Lisoni. 1998. Recuperación de un cañadón con derrame de petróleo en Pico Truncado (pcia. De Santa Cruz). Terceras Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. 14 al 17 de septiembre. Chubut, Argentina.
- Nakamatsu V, N Ciano, J Luque, C Lisoni, J Quinteros y O Mackeprang. 1996. Adaptación de especies vegetales nativas a suelos contaminados con HC. Segundas Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. 5 al 10 de Mayo. San Martín de los Andes, Argentina.
- Nakamatsu, V., N. Ciano y J. Luque. 1998. Adaptación de especies vegetales nativas plantadas en suelos contaminados con HC en Patagonia. 51 Annual Meeting, Society for Range Management. Guadalajara, México.
- Nakamatsu, V.; J. Luque; N. Ciano; M. Amari y C. Lisoni. 2001. Revegetación natural en un suelo empetroado biodegradado in situ. Caleta Olivia, Santa Cruz. IV Reunión del Grupo Regional

- Patagónico de Ecosistemas de Pastoreo (FAO – INTA – INIA) Taller de actualización sobre métodos de evaluación, monitoreo y recuperación de pastizales naturales patagónicos. 26 y 27 de julio. Chubut, Argentina.
- National Risk Management Research and Development. 2000. Introduction to phytoremediation. U.S. Environmental Protection Agency. EAP/600/R-99/107. 72 p.
- Newman L and C Reynolds. 2004. Phytodegradation of organic compounds. Current Opinion in Biotechnology 15: 225 – 230.
- Oliva, G.; Luque, J.; César, D.; Ferrante, J.; Kofalt, J.; Castro Dassen, H.; Rivera, E.; Humano, G y D´Elía, E. 2005. Rehabilitación con bioestimulación y gramíneas nativas de un derrame en la trampo scraper Las Horquetas, Santa Cruz. 6tas Jornadas de preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. 31 de Octubre y 1-2 de Noviembre 2005. Organizadas por el Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG). Neuquen, Argentina.
- Olivieri, R.; P. Bacchin; A. Robertiello; N. Oddo; L. Degen and A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow release fertilizer. Appl. Environ. Microbiol. 31:629-634.
- Olson, P.; A. Castro; M. Joern; N. Du Teau; E. Pilon Smith and K. Reardon. 2008. Effects of agronomic practices on phytoremediation of an aged PAH's contaminated soils. Journal Environ Qual 37:1439-1446.
- Ortiz, J. y M. García. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. Documento técnico del Consejo Superior de Colegios de Ingenieros en Minas de España. En <http://ingenierosdeminas.org>. Revisado el 25 de Noviembre 2008.
- Parrish Z, M. Banks and A. Schwab. 2004. Effectiveness of Phytoremediation as a Secondary Treatment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH´s) in Composted Soil. International Journal of Phytoremediation 6 (2): 119 – 137.
- Peressutti, S.; Alvarez, H y Pucci, O. 2003. Dinamic of Hydrocarbon-Degrading Bacteriocenosis of an Experimental Oil Pollution in Patagonian Soil. International Biodeterioration and Biodegradation 52: 21-30.
- Pilon & Smits, E. 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 56: 15 – 39.
- Pozzo Ardizzi, M. L. Fidel y A. Caligari. 2000. Diseño y construcción de plantas de biotratamiento para remediación de suelos contaminados en recintos de acopio transitorio de suelos empetrolados. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Pozzo Ardizzi, M.; A. Manacorda; G. Altamirano y L. Barbieri. 1995. Biodegradación de residuos de petróleo por bioaumentación con bacterias nativas de suelos regionales. 2º Simposio HC y medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Pozzo Ardizzi, M.; A. Manacorda; G. Altamirano y L. Barbieri. 1998. Rehabilitación por biorremediación de áreas destinadas a la disposición de aguas de producción provenientes de la actividad petrolera. 3ras Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. Chubut, Argentina.
- Pozzo Ardizzi, M; G. Altamirano; L. Barbieri; A. Sánchez; G. Díaz; C. Eusebi; A. Sosa y A.

- Caligari. 2000. Rehabilitación por remediación asistida en un predio de vertido de aguas de producción. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Pozzo Ardizzi, G y J. Fuchs. 2004. Técnicas de tratamiento in situ: biorremediación, fitorremediación, atenuación natural controlada. Seminario de Sistemas de Remediación para sitios contaminados con HC. Asociación Argentina de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (AIDIS). Buenos Aires.
- Pradham, S.; Conrad, J.; Paterek, J. & Srivastava, V. 1998. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *Journal of soil contamination* 7(4):467-480.
- Prinik, M.P.; Atlas, R.M. and Bartha, R. 1977. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology* 119: 868-878
- Pucci, O.;M. Back, M. y S. Perezutti (a). 1995. Biodegradación del petróleo en suelos de la Patagonia Central. 2º Simposio HC y medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Pucci, O.;M. Back, M. y S. Perezutti (b). 1995. Biodegradación asistida aplicada a derrames de petróleo. 2º Simposio HC y medio Ambiente. Mendoza, Argentina.
- Pucci, G y O. Pucci. 2000. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de HC. 4tas Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria del petróleo y del gas. IAPG. Salta, Argentina.
- Pucci, O.; S. Velazquez; H. Alvarez; S. Perezutti y M. Bak. 2000. Biodegradación de HC: influencia de la fertilización en el proceso de biorremediación. Congreso de Producción, IAPG. Puerto Iguazú (Misiones).
- Pucci, G. y O. Pucci. 2003. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de HC previamente sometidos a landfarming. *Revista Argentina de Microbiología*. Buenos aires: , v.35, p.62 - 68, 2003
- Qiu, X.; Leland, T.; Shah, S.; Sorensen, D. & Kendall, E. 1997. Chapter 14 field study: grass remediation for clay soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Phytoremediation of soil and water contaminants*. American Chemical Society, Washington DC. Symposium Series 664. 189-199.
- Radwan, S.; Aal Awadhi, H.; Sorkhoh, N. & El Nemr. 1998. Rhizospheric hydrocarbon utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwaiti desert. *Microbiological Research*. 153(3):247-251.
- Ramírez, C. y C. Beloso. Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica extraandina. 2002. Jardín Botánico de la Patagonia Extraandina. Cenpat-Conicet. 51 pgs. Puerto Madryn, Pcia del Chubut.
- Ravetta, D.; S. McLaughlin; J. O'Leary. 1997. Evaluation of salt tolerance and resin production in coastal and central valley accessions of *grindelia* species (asteraceae). *Madroño*. , v.44, p.74 - 88, 1997.
- Ravetta, D.; A. Soriano. 1999. Alternatives for the development of new industrial crops for Patagonia. *Ecología Austral*. Buenos Aires: , v.8, n.2, p.297 – 307.
- Raymond, R.; J. Hudson and V. Jamison. 1976. Oil degradation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*

31:522-535.

- Reddy, B. and Sethunathan, N. 1983. Mineralization of parathion in the rhizosphere of rice and pearl millet. *Agric. Food Chem.* 31, 1379-81.
- Reilley, K.; Banks, M. & Schwab, A. 1996. Organic chemicals in the environment: Dissipation of PAH's in the rhizosphere. *Journal of environmental quality.* 25:212-219.
- Robinson B, J. Fernández, P. Madejón, T. Marañón, J. Murillo, S. Green and B. Clothier. 2003. Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant and Soil* 249: 117 – 125.
- Rogers, H.B., C.A. Beyrouthy, T.D. Nichols, D.C. Wolf, and C.M. Reynolds. 1996. Selection of cold-tolerant plants for growth in soils contaminated with organics. *Journal of Soil Contamination* 5(2): 171-186.
- Schwab, A.; Banks, M. & Arunachalam, M. 1995. Biodegradation of PAHs in rhizosphere soil. *Bioremediation of recalcitrant organics.* Columbus. 23-29.
- Schnoor J, Licht L, Mc Cutcheon S, Wolfe N and Carriera L. 1995. Phytoremediation: an emerging technology for contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 29: 318 – 323.
- Shimp J, Tracy J, Davis L, Lee E and Huang W. 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Crit. Rev. in Envi. Sci. and Tech.* 23: 41 – 47.
- Schwendinger, R. 1968. Reclamation of soil contaminated with oil. *Journal of the Institute of Petroleum.* 54:182-197.
- Ubochi, K.; V. Ibekwe and E. Ezeji. 2006. *African Journal of Biotechnology.* Vol 5 (17). pp 1584-7.
- Vilela, A; M. Bolkovic; P. Carmanchahi, M. Cony, D. de Lamo and D. Wassner. 2007. Past, present and potential uses of native flora and wildlife of the Monte Desert. *Journal of Arid Environments* Vol 73 Pgs 238-43.
- Wang, Z. and M. Fingas. 1997. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* Volume 774, Issues 1-2, 11 July 1997, Pages 51-78
- Wang, Z. M. Fingas and D. Page. 1999. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A* Volume 843, Issues 1-2, 28 May 1999, Pages 369-411
- Zhendi Wang, M. Fingas, S. Blenkinsopp, G. Sergy, M. Landriault, L. Sigouin, J. Foght, K. Semple and D. Westlake. 1998. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A* Volume 809, Issues 1-2, 5 June 1998, Pages 89-107
- Wiltse, C.; Rooney, W.; Chen, Z.; Schwab, A and Banks, M. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *Journal of environmental quality.* 27:169-173.
- Zhu X., A. Venosa and M. Suidan. 2004. Literature review on the use of comercial bioremediation agents for cleanup of oil contaminated estuarine environments. EPA Contract No. 68-C-00-159. Task Oder Nro. 19.

8. ANEXO

8.1. Fotografías relativas al diseño y marcha del ensayo.

Figura 30. Preparación de las macetas y acondicionamiento del sustrato

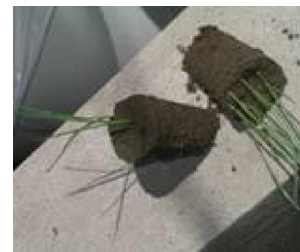
A. Maceta (unidad de muestreo)



B. Llenado de las macetas



C. Plantines extraídos del spilding



D. Plantación



Figura 31. Ensayo instalado en el vivero



Figura 32. Ensayo a los 90 días de su inicio (Enero del 2007)



A. Agropiro fertilizado



B. Agropiro sin fertilización



C. Charcao fertilizado



D. Charcao sin fertilización



E. Botón de Oro fertilizado



F. Botón de Oro sin fertilización



G. Elymus fertilizado



H. Elymus sin fertilización



I. Agropiro sobre sustrato sin petróleo fertilizado.



J. Botón de Oro sobre sustrato sin petróleo no fertilizado.



K. Charcao sobre sustrato sin petróleo no fertilizado



L. Elymus sin petróleo no fertilizado

8.2. Glosario

Glosario de términos utilizados en el tratamiento de los suelos contaminados con petróleo.

Distintas tecnologías se han implementado para el tratamiento de los contaminantes ambientales. Las técnicas de remediación pueden dividirse en dos grupos: técnicas de ingeniería, y las técnicas de biorremediación.

Tecnologías In situ. Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.

Tecnologías ex situ. La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (on site) o fuera de él (off site).

Técnicas de Ingeniería: involucran procesos físicos, químicos y mecánicos, a través de tratamientos ex situ (excavación, transporte e incineración) e in situ tales como el bombeo y tratamiento, extracción con vapor y lavado químico.

Técnicas de biorremediación: Son aquellas que se basan en procesos naturales y utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos.

Tecnologías de biorremediación

Atenuación natural. Es una de las técnicas de biorremediación. La atenuación natural es la reducción de las concentraciones del contaminante en el ambiente con los procesos biológicos, los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio iónico, complejización, transformación abiótica) embargo, pueden sufrir procesos tales como volatilización, fotooxidación, oxidación química, bioacumulación y adsorción en la matriz del suelo. Esta técnica es aplicada principalmente en sitios con bajo valor público o ambiental, cuando el tiempo no es un factor limitante, debido a que la restauración del sitio puede durar un largo período (décadas), o donde no son aplicables otras técnicas de restauración (Kuiper et al. 2004); también cuando los niveles de contaminación son relativamente bajos (Pilon-Smits 2004). Es un método de tratamiento in situ, no invasivo. Es un proceso que se puede dar de forma natural por los microorganismos autóctonos de la zona contaminada siempre que los mismos posean las vías metabólicas apropiadas.

Bioaumentación: Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora.

Biodegradación: consiste en un conjunto de técnicas cuyo fin es estimular la degradación de contaminantes. Agrupa a una serie de prácticas que utilizan procesos naturales de biodegradación de contaminantes, y buscan acelerar y/o potenciar dichos procesos. A este conjunto de prácticas las denominamos biorremediación asistida. Dentro de ella incluimos:

Biodegradación in situ: Consiste en degradar el HC en el mismo lugar mediante microorganismos autóctonos donde se produjo el derrame, mediante remoción del suelo para favorecer los procesos aeróbicos y adición de nutrientes, generalmente mediante fertilizantes, para enriquecer el sustrato (Pozzo Ardizzi y Fuchs, 2005). Dado que los microorganismos requieren Nitrógeno y Fósforo para aumentar la biomasa microbiana, el aprovechamiento de estos nutrientes en un suelo contaminado es un factor crítico para su posible degradación (Atlas and Bartha, 1972; Bartha, 1986; Leahy and Colwell, 1990; Chen et al, 2003; Chaîneau et al, 2005). Es posible la aceleración de este proceso por adición de urea, fosfatos y fertilizantes del tipo NPK. De esta forma, se aumenta la masa microbiana encargada de descomponer al HC en compuestos más simples tales como dióxido de carbono y agua.

Bioestimulación: utiliza la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ.

Biolabranza: mediante este proceso la superficie del suelo contaminado es tratado en el mismo sitio por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, aireación) se controlan para optimizar la velocidad de degradación y generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviados

Biorreactores: pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, ya que es posible combinar controlada y eficientemente, procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Reiser-Roberts, 1998). Es la tecnología más adecuada cuando existen peligros potenciales de descargas y emisiones. Uno de los reactores más utilizados para biorremediar suelos es el biorreactor de lodos, en el cual el suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida.

Biorremediación: Es el proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de HC por la acción de microorganismos, por adición de fertilizantes para provisión de Nitrógeno y Fósforo (Ercoli, y Gálvez, 2001). El proceso de degradación requiere control de variables operacionales tales como nutrientes, humedad y oxígeno.

Biorremediación asistida: conjunto de prácticas que utilizan los conceptos generales de los procesos naturales de biodegradación de contaminantes, y buscan acelerar y/o potenciar dichos procesos. Dentro de ella incluimos la bioaugmentación (adición de microorganismos específicos capaces de degradar), la bioestimulación (adición de nutrientes) y la fitorremediación (utilización de plantas

Bioventeo: es una tecnología relativamente nueva, cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores (Van Deuren y col., 1997).

Composteo: es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), que son sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor

durante el proceso. La diferencia entre la biolabranza y el composteo, es que en la biolabranza, se mezcla el suelo contaminado con suelo limpio, mientras que el composteo generalmente se realiza sobre el suelo

Fitorremediación: es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto in situ como ex situ. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la rizodegradación, la fito-extracción, la fitodegradación y la fitoestabilización.

Inoculación: Práctica de agregado de cultivos microbianos activos.

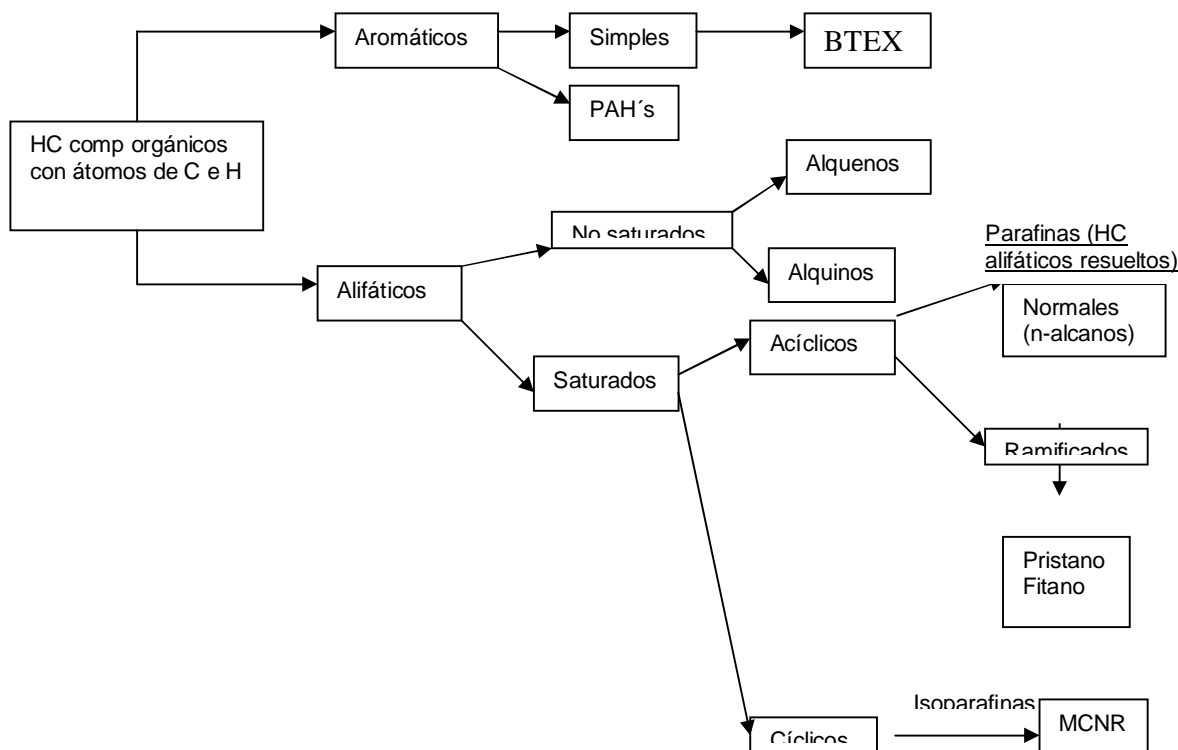
Land Farming: técnica de tratamiento ex-situ que consiste en extender el contaminante en una superficie debidamente acondicionada y en la cual se suministran nutrientes y se dan condiciones de aireación y humedad apropiadas.

Recalcitrantes: Compuestos químicos difíciles de degradar

Tasa de degradación: cantidad de material contaminante degradado por unidad de superficie y de tiempo.

8.3. Estructura química básica de los Hidrocarburos

Figura 33. Fracciones más importantes en que se dividen químicamente los HC.



Las tres principales fracciones por cromatografía en columna del petróleo (HC alifáticos, aromáticos y polares –asfaltenos y resinas-) tienen diferentes capacidades de producción de biomasa y de velocidad de mineralización. Los procesos de degradación comienzan por afectar aquellos compuestos que son más fáciles de reducir, es decir los HC Alifáticos de cadena normal. Como los microorganismos degradan preferencialmente los HC Alifáticos resultando en un aumento relativo de las fracciones Aromáticas y Asfálticas. Un petróleo es una mezcla compleja de compuestos de Carbono, a los fines de su estudio podemos expresar que existen tres grandes grupos, la fracción I (F1), correspondiente a los HC Saturados o Alifáticos (compuestos por n-alcános, alcános de cadena ramificada e isoprenoides y cicloparafinas o cicloalcános), la fracción II (FII) que corresponde a los HC Aromáticos (HC monoaromáticos, diaromáticos y aromáticos policíclicos) y la fracción III (FIII) que corresponde a los Asfaltenos (estructuras alifáticas y aromáticas de 100 a 300 átomos de carbono con sustituyentes alquílicos, sulfuros, Nitrógeno y Oxígeno unidos conformando grandes estructuras heterocíclicas) más las Resinas (agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfoxidos y amidas). Estos dos constituyentes de la fracción III son recalcitrantes o bien se metabolizan muy lentamente por largos períodos. La diferencia entre las Resinas y los Asfaltenos radica en mayores peso molecular, aromaticidad y contenido de Nitrógeno, Azufre y Oxígeno por parte de los Asfaltenos.

Estas tres fracciones pueden ser obtenidas en laboratorio en columnas de separación cromatográfica rellenas convenientemente y eluida en forma sucesiva con solventes de diferente polaridad, la FI se eluye con Cilcohexano, la FII se eluye con Diclorometano y la FIII se eluye con Cloroformo-Metanol. De esta manera tendríamos por ejemplo:

Muestra inicial (antes de la remediación): 100.000 mg/Kg seco de HC fraccionado en:

-50 % de FI (50.000 mg/Kg)

-20 % de FII (20.000 mg/Kg)

-30 % de FIII (30.000 mg/Kg)

Muestra degradada después de una remediación. 53.000 mg/Kg seco de HC fraccionado en:

-9,4 % DE FI (5.000 mg/Kg)

-34 % de FII (18.000 mg/Kg)

-56,6 % de FIII (30.000 mg/Kg)

De mayor a menor capacidad de degradación el orden es el siguiente:

Fracción I > Fracción II > Fracción III.

Tabla 18. Cuadro comparativo de los métodos de remediación más utilizados.

Sitio	Método de remediación				
	Fitorremediación	Atenuación Natural	Ingeniería	Bioestimulación	Bioaumentación
	In situ	In situ	Ex situ o In situ	Ex situ o In situ	Ex situ o In situ
Intervención Humana	De tipo agronómica (laboreo, fertilización y plantación)	No	Extensiva	Extensiva	Extensiva
Beneficios directos	Sustentable en grandes superficies; percepción pública favorable; microorganismos degradan una variedad amplia de contaminantes; plantas transfieren O ₂ a la rizósfera y retienen el contaminante.	No hay disturbio	Confiable; permite limpiar el sitio en su totalidad; más rápida que otros métodos; probadamente efectivo.	Disturbio limitado cuando es in situ, probadamente efectiva.	Se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora.
Beneficios indirectos	Mejora calidad del suelo; previene la erosión; ayuda a eliminar residuos secundarios.; las plantas más efectivas pueden beneficiar a las menos efectivas.	Idem a FR	-----	-----	-----
Limitaciones	La contaminación debe ser poco profunda, y con bajos tenores; los contaminantes pueden no ser bioaprovechables; necesita condiciones ambientales adecuadas; problemas iniciales de lavado o volatilización.	Es más lenta que otros métodos, lo que presenta mayores riesgos. Posible ausencia de plantas, microorganismos beneficiosos en el sitio.	Altamente disruptivo; problemas de disposición final de residuos; algunos tratamientos directos son lentos (bombeo).	Alta disrupción en excavaciones ex situ; en in situ requiere un sistema de recolección; duración intermedia del tratamiento; no trabaja con contaminantes tóxicos para microorganismos. requiere intenso monitoreo.	Antes de llevarse a cabo en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa
Costos (*)	u\$s 17-100/m ³ ; u\$s 3/m ³ *año	No tiene costos operacionales pero sí asociados al monitoreo	u\$s 10 a 1.000/m ³ ; u\$s 10-100 para contaminación in situ volátiles o solubles en agua; u\$s 260-1100/m ³ en incineración. In situ menor costo que ex situ.	u\$s 50-130/m ³ in situ. u\$s 13-400/m ³ ex situ.	u\$s 100-200/m ³ in situ. u\$s 300-500/m ³ ex situ.

Fuente: Assessment of phytoremediation as an in situ technique for cleaning oil contaminated sites. (Frick, Farrel and Germida, 1999).

(*) A valores internacionales y mencionados por la bibliografía

8.4. Antecedentes en el uso de plantas para restaurar ambientes contaminados por actividad petrolera

1.- Bibliografía internacional.

Aunque el conocimiento de la degradación de los HC del petróleo por el sistema metabólico de la planta es limitado, en relación al que existe sobre la actividad de microorganismos, varios trabajos confirman la importancia de la fitorremediación como una alternativa emergente. Varias plantas han sido identificadas por su potencial para facilitar la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo. La bibliografía cita una importante cantidad de trabajos relacionados a la actividad de las plantas en la fitorremediación. A continuación se citan los ejemplos que consideramos más trascendentes para este trabajo:

Varias especies de plantas con sus microorganismos asociados han incrementado la remoción de HC en suelos contaminados (Aprill & Sim, 1990; Qiu et al, 1997; Gunter et al, 1996; Reilley et al, 1996; Reynolds & Wolf, 1999; Schab et al, 1995; Pradhan et al, 1998). La contención del contaminante en la FR involucra el uso de plantas para reducir o eliminar la disponibilidad de contaminantes en otra biota: no solo habrá degradación sino que también habrá mecanismos de contención y/o acumulación en las plantas y la adsorción de los contaminantes en la superficie de las raíces.

Las plantas inducen al incremento de la población microbiana y ello es el resultado del incremento de la degradación de los contaminantes orgánicos en la rizosfera. Este proceso se da típicamente en la FR de los HC. Gunter et al, 1996 y Epuri and Sorensen (1997) mencionan una alta mineralización del Benzo(a) pireno, mientras que Jordahl et al (1997), y Nichols et al (1997), realizaron ensayos de degradación de Aromáticos volátiles bencénicos (Benceno, Tolueno y Xileno) mediante álamos.

Está documentada la acumulación de HC en plantas y la adsorción sobre la superficie de las raíces. El contenido de lípidos (grasas no solubles en agua pero sí en solventes no polares) de la planta puede influir en el grado de acumulación de HC, particularmente los PAH´s. Por ejemplo la alfalfa contiene 10 gr/kg de raíz seca, de lípidos, y la festuca 4,5 grs/kg: por lo cual es mayor el grado de absorción de HC en la alfalfa (Bell, 1992).

Las plantas absorben HC a través de las raíces y acumulan en pequeño grado en raíces y parte aérea especialmente brotes, ya que otras partes de la planta tales como hojas y tallos son mucho menos eficientes. Particularmente los BTEX ingresan a la planta con el agua de riego y se incorporan al proceso metabólico de la planta. Lo mismo sucede con los PAH´s y sus metabolitos (Gunter et al, 1996).

Las plantas también transpiran considerables cantidades de agua y por lo tanto pueden revertir la migración hacia abajo de químicos solubles en agua, incluidos los PAH´s (Banks et al, 2003). En estudios realizados al respecto se encontró que el volumen acumulado de lixiviado (es el agua moviéndose hacia abajo a través del suelo conteniendo sustancias en solución o en suspensión) fue significativamente mayor en áreas sin vegetación que en sitios vegetados donde se han establecido suficiente masa de raíces y brotes (Lewis Hutchinson, Schwab and Banks, 2001). La planta actúa como una bomba orgánica previniendo tanto la pérdida de compuestos originales como de productos intermedios disueltos en agua por lixiviación o lavado más allá de la zona de raíces. Esta acción de bombeo es un mecanismo preponderante en regiones áridas y semiáridas donde la

evapotranspiración excede la precipitación, por ejemplo en la Patagonia donde el déficit hídrico supera los 900 mm.

Ciertas pasturas aceleran la pérdida de PAH´s de bajo peso molecular. Aprill & Sims (1990) implantaron una mezcla de 7 pastos en suelos limo arenosos para determinar si degradan cuatro PAH´s (Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Dibenzo(a,h)antraceno y Criseno). El grado de descomposición de los PAH era mayor en los sitios con estas plantas que en aquellos sin cobertura vegetal, ello estaría indicando que la FR incrementó la eliminación de estos compuestos del suelo contaminado. Aparentemente la degradación fue mayor en el Benzo(a)antraceno seguido del Criseno y del Benzo(a)pireno y finalmente del Dibenzo(a,h)antraceno. Esto se halla relacionado con la solubilización en agua de los componentes PAH ya que es mayor la solubilización en agua que la degradación en el suelo. Por ejemplo cuanto más soluble es en agua el PAH´s (Antraceno es más soluble que el Benzo(a)antraceno), más eficiente es el proceso.

Gunter et al (1996) encontraron, usando una gramínea (*Lolium perenne*), pérdida de HC mixtos incluyendo n-alcanos (C10, C14 a C18, C22 y C24) como así también Pristano, Hexodecano, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno y Pireno. Después de 22 semanas (5 ½ meses) la concentración de HC extrade inyección directa CG-FIDbles, inicialmente 4.330 mg/kg de suelo (0,43%) disminuyó a 120 mg/kg (0,012%), o sea un 97 % de reducción mientras que en el suelo sin plantas disminuyó a 790 mg/kg (0,08%). La diferencia estuvo dada por la estimulación de la actividad microbiana por parte de las raíces, o sea el aumento en la degradación biológica en la rizosfera del suelo sería el mecanismo primario de disipación, mientras que el lixiviado, el consumo de la planta, la degradación abiótica, la mineralización y la absorción irreversible son mecanismos menos significativos.

Las concentraciones muy altas de HC causan efectos tóxicos y pueden provocar la muerte de plantas y microorganismos, limitando así el efecto de la FR. A su vez, una baja concentración de contaminantes puede limitar la extensión a la cual la FR puede reducir adicionalmente los niveles de contaminación. Esto ocurre porque la absorción y el metabolismo de los componentes orgánicos cesa cuando la concentración del contaminante alcanza un cierto nivel en el que los microorganismos no son capaces fisiológicamente de reducir más aún la concentración de los contaminantes, principalmente cuando aumenta la proporción de los más recalcitrantes.

Diferentes plantas pueden tolerar diferentes niveles de HC en suelos. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada los autores trabajaron con contenidos entre 0,2 % y 10 % de HC en suelos. Pocos son los casos referidos a plantas nativas ya que en general utilizaron alfalfa, maíz, cereales, pasturas, etc. Por ello una de las excepciones son los trabajos de revegetación en suelo empetroado realizados por la EEA Chubut de INTA en la Cuenca del Golfo San Jorge. En líneas generales, para las especies más estudiadas, el límite superior de tolerancia es de 4 % de HC.

La mayoría de los estudios (Radwan et al, 1998; Rogers et al, 1996, Aprill and Sims, 1990; Mackey and Deput, 1985; Kirk et al, 2002) muestran que el grupo de las gramíneas y las leguminosas son las que mejor comportamiento presentan como fitorremediadoras. Las gramíneas basan su ventaja en las características de su sistema radicular en cabellera densa, que le permite explorar un importante volumen de suelo. En cambio las leguminosas, en su habilidad por fijar Nitrógeno, con lo cual no tienen que competir con los microorganismos del suelo que son biodegradadores, y necesitan a este nutriente para su actividad metabólica.

En el siguiente listado, sólo presentamos aquellas especies introducidas de las cuales se cuenta con disponibilidad comercial en el país, y que su cultivo es ampliamente difundido y/o sin limitaciones agronómicas (Tabla 5).

Tabla 19. Plantas que han demostrado potencial para fitorremediar HC del petróleo.

Nombre científico	Nombre vulgar	Forma de vida	Ciclo de vida	Uso
<i>Chloris gayana</i>	Grama Rhodes	Gramínea	Perenne	Pastura
<i>Festuca arundinacea</i>	Festuca alta	Gramínea	Perenne	Pastura
<i>Glycine max</i>	Soja	Leguminosa	Anual	Cultivo oleaginoso
<i>Lolium multiflorum</i>	Rye grass anual	Gramínea	Perenne	Pastura
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Leguminosa	Perenne	Pastura
<i>Sorghum vulgare</i>	Sorgo	Gramínea	Anual	Cereal forrajero
<i>Cynodon dactylon</i>	Gramillón	Gramínea	Perenne	Pastura
<i>Lolium perenne</i>	Rye grass perenne	Gramínea	Perenne	Pastura
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poroto	Leguminosa	Anual	Legumbre
<i>Secale cereale</i>	Centeno	Gramínea	Anual	Cereal - Forraje

Fuente: C.M. Frick, R.E. Farrell and J.J. Germida. 1999. Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC). 82 pp.

Las especies citadas en la tabla, deben ser cultivadas con buena disponibilidad de agua, ya que son utilizadas comercialmente para producir alimento (humano o para el ganado) presentando altas producciones, lo que se alcanza en áreas con precipitaciones mayores a 800 mm, o con riego suplementario. Esta característica limitaría su uso en zonas áridas y semiáridas de nuestro país, que es donde se encuentran las principales cuencas hidrocarburíferas. El listado sería mayor si incorporásemos las especies que toleran, entendiendo a esta característica como la habilidad para crecer en suelos contaminados con petróleo, aunque esto no necesariamente exprese que crezcan en condiciones óptimas de salud. Con respecto a la tolerancia, las distintas especies pueden tolerar distintos niveles de HC en suelos.

Otro aspecto por el cual podría desalentarse o restringir el uso de estas especies como fitorremediasoras, es que de acuerdo a su uso habitual (consumo humano o animal), pueden tener algunos riesgos por el destino de las producciones: es decir, estas especies que actúan como fitoextractoras o fitoacumuladoras, pueden incorporarse a la cadena trófica, con efectos no deseables. Sólo podrían ser utilizadas en sitios de tratamiento de suelos contaminados, donde se extraiga (coseche) la vegetación una vez cumplido su ciclo, y el material se incinere, reduciendo el volumen de biomasa, y llevando las cenizas a un sitio de disposición final.

2.-Antecedentes regionales en el uso de especies nativas.

Se realizó en las parcelas experimentales de biodegradación en un derrame nuevo, la plantación de dos arbustos de la flora nativa, *Atriplex lampa* y *Grindelia chilensis*, para evaluar si los contenidos de HC totales entre 7-10 % permitían el establecimiento de la vegetación. El % de establecimiento de *Grindelia* fue del 76.35 %, mientras que el de *Atriplex* fue del 56,9 %. Si bien los % de establecimiento no presentaron diferencias entre los distintos tratamientos de biodegradación aplicados, en las dos especies el mayor establecimiento se presentó en las plantas

que se encontraban en las parcelas tratadas con 60 unidades de Nitrógeno y Fósforo, que fue el que presentó mayor tasa de degradación de HC (Luque et al 1996).

Debido al tipo de sistema radicular de las especies mencionadas, las plantas toleran bien durante la etapa de establecimiento el suelo empetrolado, y luego, si logran sobrevivir, comienzan a explorar a mayor profundidad, "evitando" el área contaminada. Si la profundidad del suelo empetrolado es mayor, la técnica de biodegradación in situ deja de ser efectiva, ya que la remoción que realizan los implementos utilizados alcanzan hasta los 40 cm. Esto fue testeado en una experiencia donde se realizó una plantación sobre unos montículos de suelo empetrolado de aproximadamente 2.500 m², y una altura de 1,5 m, que había sido extraído del lugar donde se produjo el derrame. Su % de HC fue de 7 % en los primeros cm, que es la zona donde alcanzó el efecto de los tratamientos de biodegradación. Luego de dos años de realizada la plantación, los porcentajes de establecimiento fueron bajos *Atriplex lampa* (23%), *Colliguaya integerrima* (40 %) y *Atriplex sagittifolia* (15 %). Sin embargo *Grindelia chilensis* (79 %), *Tamarix gallica* (63 %), *Atriplex semibaccata* (72 %) presentaron valores altos, lo cual supondrían mecanismos de tolerancia a estas condiciones (Ciano et al, 1998).

Una de las experiencias realizadas en las que se intervino inmediatamente a la contingencia del derrame, permite ilustra claramente las etapas de la Intervención (Nakamatsu et al, 1998). En el año 1995 se realizó el saneamiento de un cañadón de 2.5 ha que sufrió un derrame de petróleo. En este sitio no hubo previa remoción de suelo por topadoras. Este presentaba una cobertura herbácea (principalmente gramíneas del género *Stipa* y *Festuca*), lo cual facilitó la tarea de limpieza del petróleo sobrenadante (mediante la realización de pozos de captura y posterior extracción con camiones tipo "chupa") y el movimiento de la maquinaria utilizada para la aplicación de la técnica de biodegradación in situ. Debido a la textura arenosa que presentaban los suelos, y a los bajos naturales, en algunos sitios la penetración del petróleo fue cercana a los 40 cm. El contenido inicial de HC fue del 12 %, descendiendo al 6 % promedio al finalizar el tratamiento, que se implementó durante 2 temporadas. En ese mismo período la tasa de biodegradación de los componentes más perjudiciales fue alta, ya que los indicadores Pr/nC17 y Fi/nC18 pasaron de 0.56 y 0.35, a 4.73 y 2.86, respectivamente. Posteriormente se sembró una pastura, compuesta de dos gramíneas, *Agropyron elongatum* (introducido naturalizado de amplia utilización en valles irrigados de la Patagonia en suelos de calidad inferior, y en mallines salinizados) y el híbrido New Hi (*Elytrigia repens* x *Pseudoregneria spicata*, introducido, con importante potencial en la zona). La siembra prosperó satisfactoriamente en un 70 % del área, manteniéndose en esas condiciones en la actualidad. La superficie con escasa o nula densidad de plantas se distribuyó en pequeños parches que siguen microrrelieves donde se concentró mayor HC. Se encontró que tanto el aumento de la cantidad de plantas logradas como la mayor altura se correspondieron a menores contenidos de HC. La técnica de biodegradación in situ aplicada, junto con la posterior revegetación con gramíneas, es una alternativa válida en estos ambientes de cañadones con suelos arenosos, donde la protección contra el viento y la mayor disponibilidad para las plantas del agua de lluvia debido a la textura, favorecen el crecimiento de la vegetación.

3.- Estado del conocimiento relativo a la biodegradación de los HC en relación a la rehabilitación de sitios empetrolados en la Cuenca del Golfo San Jorge:

Las bacterias autóctonas halladas tienen mucha mayor capacidad de degradación que las foráneas, y algunas de ellas sobresalen por su buena velocidad de degradación, inclusive a bajas temperaturas (4°C) (Pucci, Back y Prezzuti, 1995a; Ercoli, Fuentes, Gilobert y Arreghini, 1995; Mendoza et al, 1998; Pozzo Ardizzi et al, 1995; Pozzo Ardizzi, 1998), lo que resulta de interés

dado las condiciones climáticas de la Patagonia; la secuencia de degradación encontrada es alifáticos, aromáticos y asfaltenos (Pucci, Back y Perezutti, 1995b; Pucci y Pucci, 2000). Las bacterias de los géneros Nocardia, Rhodococcus, Gordona y Dietzia (Alvarez et al, 2000), y flora fúngica degradadora del grupo Actinomycetes (Alvarez y Pucci, 2000) convierten los HC en lípidos celulares no tóxicos bajo las condiciones de la región (Alvarez y Pucci, 1995; Alvarez, Soto, Viale y Pucci, 1995; Mendoza et al, 1998).

La aplicación de nutrientes nitrogenados y fosforados permitió un rápido crecimiento de las bacterias autóctonas (Chiaranini y Campolongo, 1995; Mendoza et al, 1998, Mendoza et al, 2000; Pucci et al, 1995(a) (b)).

La biodegradación fue eficiente en derrames de hasta 3 años de antigüedad (Pucci, Back y Prezutti, 1995b). La eficiencia de la degradación in situ baja sensiblemente ya que en general a la finalización del tratamiento (2 a 3 años) y con condiciones del medio adecuadas (temperatura, humedad natural y nutrientes) se alcanza un 4-5 % en promedio de HC en suelo.

Mediante riego, laboreo y siembra de población microbiana previamente incrementada en un biorreactor se obtuvo la máxima eficiencia degradatoria (Pozzo Ardizzi et al, 2000; Pozzo Ardizzi, Fidel y Caligari, 2000), llegando el nivel final de HC en el suelo contaminado a menos del 2 % al cabo de 18 a 24 meses (Pozzo Ardizzi et al, 2000).

La bioestimulación es la adición de nutrientes inorgánicos al suelo contaminado para proveer una fuente nitrogenada y fosforada que estimula la biodegradación del contaminante a través de un aumento de los microorganismos nativos degradadores de HC (Atlas, 1981, 1995; Catallo and Portier, 1992; Calabrese y Kostecky, 1993; Peressutti, Alvarez y Pucci, 2003). Sobre este principio se basó el desarrollo de la técnica bioestimulación in situ (conocida como biodegradación in situ). Consiste en degradar el HC en el mismo lugar mediante microorganismos autóctonos donde se produjo el derrame, mediante remoción del suelo para favorecer los procesos aeróbicos y adición de nutrientes, generalmente mediante fertilizantes tipo NPK, para enriquecer el sustrato (Atlas and Bartha, 1972; Bartha, 1986; Leahy and Colwell, 1990; Chen et al, 2003; Pozzo Ardizzi y Fuchs, 2004; Chaîneau et al, 2005). De esta forma, se aumenta la masa microbiana encargada de descomponer al HC en compuestos más simples tales como dióxido de carbono, agua y amoníaco. El proceso de biodegradación in situ se ve favorecido en condiciones de alta temperatura y adecuada disponibilidad de agua en el suelo.

4.-Estado del conocimiento en relación a la rehabilitación de sitios empetroados en la Cuenca del Golfo San Jorge:

Las bacterias autóctonas halladas tienen mucha mayor capacidad de degradación que las foráneas, y algunas de ellas sobresalen por su buena velocidad de degradación, inclusive a bajas temperaturas (4°C) (Pucci, Back y Prezutti, 1995a; Ercoli, Fuentes, Gilobert y Arreghini, 1995; Mendoza et al, 1998; Pozzo Ardizzi et al, 1995; Pozzo Ardizzi, 1998), lo que resulta de interés dado las condiciones climáticas de la Patagonia; la secuencia de degradación encontrada es alifáticos, aromáticos y asfaltenos (Pucci, Back y Perezutti, 1995b; Pucci y Pucci, 2000). Las bacterias de los géneros Nocardia, Rhodococcus, Gordona y Dietzia (Alvarez et al, 2000), y flora fúngica degradadora del grupo Actinomycetes (Alvarez y Pucci, 2000) convierten los HC en lípidos celulares no tóxicos bajo las condiciones de la región (Alvarez y Pucci, 1995; Alvarez, Soto, Viale y Pucci, 1995; Mendoza et al, 1998).

En todos los casos se aplicaron nutrientes nitrogenados y fosforados lo que permitió un rápido crecimiento de las bacterias autóctonas (Chiaranini y Campolongo, 1995; Mendoza et al, 1998, Mendoza et al, 2000).

La biodegradación fue eficiente en derrames de hasta 3 años de antigüedad (Pucci, Back y Prezutti, 1995b). La eficiencia de la degradación in situ baja sensiblemente ya que en general a la finalización del tratamiento (2 a 3 años) y con condiciones del medio adecuadas (temperatura, humedad natural y nutrientes) se alcanza un 4-5 % en promedio de HC en suelo.

Mediante riego, laboreo y siembra de población microbiana previamente incrementada en un biorreactor se obtuvo la máxima eficiencia degradatoria (Pozzo Ardizzi et al, 2000; Pozzo Ardizzi, Fidel y Caligari, 2000), llegando el nivel final de HC en el suelo contaminado a menos del 2 % al cabo de 18 a 24 meses (Pozzo Ardizzi et al, 2000)

8.5. Datos meteorológicos de Trelew

Tabla 20. Datos climáticos de Trelew (Pcia. del Chubut). Período 1971- 2007

Meses	Temperatura media mensual (°C)	Humedad relativa (%)	Velocidad del viento a 2 mts de altura (km)	Precipitación (mm)	Evaporación Tanque A (mm)
Enero	20,5	48	9,2	13,2	194,0
Febrero	19,6	54	8,5	17,2	147,4
Marzo	17,0	58	7,7	19,1	117,2
Abril	13,3	62	7,5	19,1	75,0
Mayo	9,1	70	7,1	20,5	45,7
Junio	6,0	74	7,0	15,5	28,9
Julio	6,0	71	7,2	15,3	38,5
Agosto	7,7	63	8,4	14,0	51,1
Septiembre	10,4	56	9,3	12,4	79,2
Octubre	13,7	54	9,5	17,0	120,6
Noviembre	16,8	49	10,1	14,9	160,5
Diciembre	19,0	49	9,6	14,4	182,3
Anual	13,2	59	8,7	182,4	1240,4

Fuente: Programa Agrometeorología E.E.A. INTA Chubut.

8.6. Análisis de HTP por el método del Soxhlet.

1. La muestra de suelo con petróleo pasarlas por un tamiz de 2 mm hasta obtener un material bien homogeneizado.
2. Cortar papel de filtro de 12cm ancho por 12cm de largo y hacer cilindros.
3. Poner en el fondo del cilindro algodón.
4. Pesar 10 gms de suelo con petróleo anotar el peso exacto, se realizan tres repeticiones.
5. Pesar 10 gms de sulfato de sodio anhídrido.
6. Mezclar bien ambas sustancias y ponerlos dentro del cilindro tapándolo con un algodón.
7. Pesar los balones y anotar su peso.
8. Pone el cilindro de papel de filtro en el cilindro de vidrio.
9. Añadirle cloroformo, por encima del cilindro de papel y dejar que haga sifón y volverlo a llenar.
10. Prender los calentadores y abrir la canilla con la manguera de agua fría.
11. Dejarlos que hagan sifón cuantas veces sea necesarias hasta que el cloroformo con el papel de filtro salga totalmente transparente.
12. Recuperar el cloroformo hasta que en el balón no quede nada.
13. Poner los balones en la estufa.
14. A las 24hs hacer la primer pesada, repetirlo dos veces mas.

Fórmulas de cálculo

$$\text{Porcentaje HC (sss)} = \frac{(\text{peso balón + petróleo} - \text{peso balón}) * 100}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\text{Promedio} = \frac{(\text{La suma de los tres resultados de \%})}{3}$$

8.7. Procedimiento de inyección directa CG-FID para análisis cromatográfico de HC en suelo

La presente no tiene rigor de procedimiento analítico, solo se trata de una enumeración de criterios analíticos particulares, los cuales requieren de su integración con los procedimientos habituales del laboratorio y del rigor analítico en cada paso enunciado, el cual no ha sido especificado aquí y queda a criterio del laboratorio su implementación.

Disponer de un vial con septum, tararlo con tapa.

1. Colocar una masa de suelo en cantidad suficiente según el grado de contaminación con HC (por diferencia de pesada) agregarle sulfato de sodio anhidro, mezclar suavemente.
2. Cerrar el septum
3. Con jeringa de vidrio agregar un volumen conocido de diclorometano y suficiente para cubrir el suelo y dejar un par de mm por encima de la masa de suelo. Esto se puede hacer por pesada, pesando antes y después del agregado de Diclorometano.
4. Agregar el Bromuro de etilo como estándar interno, en una cantidad no mayor al 0.1% de la masa de suelo.

Sonicar 15 minutos

1. Factor de recuperación
 - a. Preparar de idéntica manera un vial al que se le agrega arena de construcción de malla 150, en un peso similar al de suelo usado.
 - b. Luego se agrega un peso conocido de un petróleo.
 - c. Se agrega el Diclorometano como se indico.
 - d. Se toma una alícuota y se la analiza, se calcula el peso de HC y se lo compara con el peso de petróleo.
 - e. Se calcula el factor de recuperación,
2. Preparar solución de normal hexadecano e inyectar tres volúmenes diferentes (o como lo hacen habitualmente)
3. En las mismas condiciones cromatográficas correr la muestra.
4. Las condiciones cromatográficas generales podrían ser:
 - a. Temperatura inicial 35 °C
 - b. Tiempo inicial 10 minutos
 - c. Rampa de calentamiento de 6 °C /minutos
 - d. Temperatura final 295 °C
 - e. Tiempo final 10 minutos o el que sea necesario para que salga nC40.
 - f. La corrida alcanzará los 65 minutos
5. Verificar la rampa en función de la separación y resolución de los picos de nC17 y pristano, nC18 y fitano.

6. Verificar la identificación del BTEX en los primeros minutos de la corrida.
7. Se conviene que la corrida será válida de nC6 a nC40
8. Identificar HC del BTEX, informar concentración en peso seco
9. Identificar normal alcanos, integrar VV y HH
10. Identificar isoprenoides de 20, 19, 18, 16, 15, 14, 13 y 12, integrar VV y HH.
11. Informar los puntos 12 y 13 en concentración en peso seco
12. Integrar suma de área entre tiempo de retención del nC6 y el tiempo de retención del nC40, informar en concentración en peso seco