DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y COMBUSTIBLES
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MINAS

MODELIZACIÓN DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON GASOIL

TESIS DOCTORAL

MARCELO FABIÁN ORTEGA ROMERO
Ingeniero Industrial

DIRECTORES: JUAN FRANCISCO LLAMAS BORRAJO

Dr. Por la U.P.M.

MARÍA JESÚS GARCÍA MARTÍNEZ

Dra. Por la U.P.M.

2012

Índice

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VI
1 Estado del arte	1
1.1 Composición del crudo del petróleo	1
1.1.1 Hidrocarburos Alifáticos o Saturados	2
1.1.2 Hidrocarburos Aromáticos	3
1.1.3 Resinas	4
1.1.4 Asfaltenos	4
1.1.5 Productos derivados del petróleo	5
1.2 El suelo	6
1.2.1 Estructura y componentes del suelo	6
1.2.2 Reparto en fases de los contaminantes orgánicos en el suelo	9
1.2.3 Legislación ambiental de suelos contaminados	12
1.3 Biorremediación de Hidrocarburos en suelos	14
1.3.1 Cantidad y Estado del Hidrocarburo	16
1.3.2 Temperatura	18
1.3.3 Oxígeno	19
1.3.4 Humedad	20
1.3.5 Poblaciones Microbianas	20
1.3.6 Nutrientes	22
1.3.7 Utilización de surfactantes	22
1.3.8 Estructura y tipo de suelo	25
1.4 Modelos Estadísticos	26
1.4.1 Importancia de un modelo estadístico	27
1.4.2 Construcción de modelos estadísticos	27
1.4.3 Clasificación de los modelos estadísticos	28
1.4.4 Tipos de datos de los modelos estadísticos	29
1.4.5 Modelo Lineal	29
1.4.6 Contrastes de hipótesis	31
2 Materiales y Métodos	33
2.1 Tipos de suelos	33

2.2	Caracterización del Gasóleo	35
2.3	Caracterización de Nutrientes y Surfactantes.....	36
2.4	Diseño de experimentos	40
2.5	Diseño de muestreo	42
2.6	Preparación del experimento.....	49
2.6.1	Preparación del terreno	49
2.6.2	Dosificación de nutrientes y frecuencia de actividades	51
2.6.3	Balance de masa del Carbono y del Nitrógeno	53
2.7	Preparación de muestras	54
2.8	Extracción del Gasóleo del suelo.....	56
2.9	Análisis químico mediante GC-MS	58
2.9.1	Cuantificación de los Hidrocarburos Totales del petróleo (TPH)	58
2.9.2	Selección de indicadores de la biodegradación	58
2.10	Variables utilizadas en los modelos de predicción de TPH	58
2.11	Datos utilizados en los modelos.....	61
3	Análisis de Resultados.....	64
3.1	Modelo matemático del TPH en función del tiempo (forzado)	64
3.1.1	Variables utilizadas en el modelo.....	64
3.1.2	Expresión matemática y valores de los coeficientes.....	64
3.1.3	Observaciones	66
3.1.4	Conclusiones.....	70
3.2	Modelo matemático del TPH en función del tiempo (no forzado)	71
3.2.1	Variables utilizadas en el modelo.....	72
3.2.2	Expresión matemática y valores de los coeficientes.....	72
3.2.3	Observaciones	73
3.2.4	Conclusiones.....	79
3.3	Comparación entre los modelos en función del tiempo.....	80
3.4	Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo biológico (no forzado).....	81
3.4.1	Variables utilizadas en el modelo.....	81
3.4.2	Expresión matemática y valores de los coeficientes.....	81
3.4.3	Observaciones	82
3.4.4	Conclusiones.....	88
3.5	Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo biológico (forzado).....	88
3.5.1	Variables utilizadas en el modelo.....	89

3.5.2	Expresión matemática y valores de los coeficientes.....	89
3.5.3	Observaciones	89
3.6	Comparación entre los modelos en función del tiempo y las variables de tipo biológico	95
3.7	Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo químico (forzado).....	96
3.7.1	Variables utilizadas en el modelo.....	96
3.7.2	Expresión matemática y valores de los coeficientes.....	98
3.7.3	Observaciones	100
3.8	Efectos de los suelos y los nutrientes en la degradación de algunos compuestos...	103
3.8.1	Comparación de la degradación de compuestos en el suelo 1	106
3.8.2	Comparación de la degradación de compuestos en el suelo 2	109
3.8.3	Comparación de la degradación entre suelos	112
4	Conclusiones.....	115
5	Bibliografía	118

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el año 2005, se empezó a realizar ensayos para determinar los tipos de combustibles que se utilizarían en el proyecto de investigación “Estudio de la viabilidad de un proyecto de biorremediación” financiado por la empresa Repsol. El objetivo del proyecto de investigación es el estudio del proceso de biorremediación encaminado a la obtención de una Guía o Protocolo, que facilite la toma de decisiones en las operaciones de remediación de suelos de Repsol. El proyecto pretende generar una base de conocimientos que permita evaluar los factores físico-químicos, biológicos y periféricos, a través del desarrollo de un Protocolo o Guía de Aplicación, que permita decidir si dado un emplazamiento, dicha tecnología de biorremediación es adecuada, es decir, si el emplazamiento es susceptible de ser biorremediado en un plazo razonable hasta alcanzar los límites objetivo.

Para la consecución de estos objetivos se han llevado a cabo una serie de ensayos, a lo largo de un año de experiencia, en campo (en parcelas de tierra situadas en la refinería de Puertollano), al mismo tiempo que se replicaban dichos ensayos en laboratorio, a través de microcosmos. Previamente a estas fases de experimentación, en campo y laboratorio, se han llevado a cabo una caracterización físico-química de los suelos y productos contaminantes a utilizar en las parcelas, caracterización biológica de los suelos y una caracterización de los nutrientes y surfactantes que se van a utilizar en el proceso de biorremediación. Con este estudio se decide utilizar los siguientes factores a ser tomados en cuenta en el diseño de experimentos:

1. **Tipo de suelo:** suelo I y suelo II.
2. **Concentración de gasóleo:** 10.000 y 20.000 ppm.
3. **Fertilizante de liberación lenta:** Si y No
4. **Fertilizante oleofílico:** Si y No
5. **Surfactante:** Si y No

Con estos factores y manteniendo la humedad constante durante el proceso se realiza el diseño de experimentos equilibrado que consta en un total de 24 ensayos realizados por duplicado con lo que en total se montaron 48 parcelas de 4 m x 4 m en la refinería de Repsol en Puertollano y 24 microcosmos montados en los laboratorios de la Universidad de Granada.

Con los experimentos definidos se intenta ajustar un modelo matemático que prediga la evolución temporal de las concentraciones de hidrocarburo en función de los factores antes descritos con el principal objetivo de encontrar la mejor combinación de factores que hacen

que las tasas de biodegradación de hidrocarburos sea la más efectiva y llegar a resultados concluyentes de los efectos predominantes en un proceso de biorremediación.

RESUMEN

El objeto de esta tesis doctoral es encontrar, mediante herramientas estadísticas, un modelo matemático que prediga la evolución temporal de las concentraciones de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoleo. Obtenido el modelo matemático realizar las comparaciones pertinentes para determinar la eficiencia de distintos tratamientos, la influencia tanto del suelo como del nivel de concentración.

Para cumplir este objetivo se realizó un diseño de experimentos que tomaba en cuenta dos tipos de suelos, dos niveles de concentración de hidrocarburo y seis tratamientos. Se realizaron en total 1824 ensayos en laboratorio repartidos en 8 campañas de campo durante un año de experiencia tanto en parcelas de 4 x 4 m como en microcosmos.

Los resultados obtenidos muestran que el proceso de biorremediación se puede ajustar a un comportamiento exponencial, que es una ecuación de cinética de primer orden, y que las comparaciones realizadas han mostrado resultados satisfactorios de la eficiencia de algunos tratamientos.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is using statistical tools find a mathematical model to predict the time evolution of the total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations in the bioremediation process of diesel contaminated soil. Retrieved mathematical model make relevant comparisons to determine the efficiency of different treatments and the influence of both soil and concentration levels.

To achieve this goal a design of experiments was developed, it took into account two types of soil, two concentration levels of hydrocarbon and six treatments. There were a total of 1824 laboratory tests spread over 8 field campaigns during a year of experience in both plots of 4 x 4 m in microcosm.

The results obtained show that the bioremediation process can be adjusted to an exponential model, it is an equation of kinetic of first order and that the comparisons have shown satisfactory results of the efficiency of some treatments.

1 Estado del arte

1.1 Composición del crudo del petróleo

Generalmente, el crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja (Atlas, 1981), pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos los cuales son acumulados naturalmente bajo condiciones geológicas muy específicas (Fernández-Varela, et al., 2006; Nadim, et al., 2000). Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 50-98% de la composición) (Speight, 2001), constituyendo uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales. Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Viñas Canals, 2005; Atlas, 1981). La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 83-87% C, 10-14% H, de 0.05-6% S, de 0.05-1.5% O y de 0.1-2% N y metales como el níquel y el vanadio (Speight, 2001).

El petróleo contiene miles de compuestos individuales, los cuales son generalmente agrupados en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos; de acuerdo a su diferente solubilidad en disolventes orgánicos (Mana Capelli, et al., 2001; Leahy, et al., 1990; Pollard, et al., 1994) ordenados de menor a mayor polaridad. La composición del petróleo medio es del 57 % de hidrocarburos alifáticos o saturados, el 29 % de hidrocarburos aromáticos y el 14 % de resinas y asfaltenos; mientras que el azufre, presente en los compuestos tiofénicos, representa el 2 % en peso de la fracción de hidrocarburos aromáticos (García Martínez, 2005). La mayor parte del nitrógeno, del oxígeno y del azufre está asociado con las resinas y los asfaltenos, de ahí que a menudo se les denomine compuestos NSO polares. No obstante, puede haber una cantidad significativa de azufre en compuestos de peso molecular medio de las fracciones de hidrocarburos, normalmente en forma de compuestos aromáticos tiofénicos. Otros elementos presentes en los petróleos incluyen varios metales, especialmente el níquel y el vanadio, que suelen estar presentes en cantidades traza y asociados principalmente a los compuestos NSO polares. En la Figura 1.1 se puede observar los principales tipos de hidrocarburos presentes en un crudo de petróleo (García Martínez, 2005).

Figura 1.1. Principales hidrocarburos presentes en el petróleo

1.1.1 Hidrocarburos Alifáticos o Saturados

Los hidrocarburos saturados (también conocidos como alifáticos o parafínicos) se dividen en alcanos acíclicos (normales y ramificados) y cicloalcanos (o naftenos) (Atlas, 1981). Mayoritariamente, predominan los alcanos (cadenas lineales), extendiéndose de 1 hasta 40 o más átomos de carbono (Talat, et al., 1998), pero normalmente se alcanza un máximo que varía desde valores próximos a 25 hasta valores próximos a 15 a medida que crece la madurez del petróleo. Entre los alcanos ramificados se suele encontrar a los iso-alcanos (2-metilalcanos) y posiblemente cantidades menores de anteiso-alcanos (3-metilalcanos); ambos grupos exhiben un número de átomos de carbono similar a los de los n-alcanos. Los alcanos acíclicos isoprenoides pueden ser constituyentes importantes, en especial el pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) y el fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano) que provienen de la clorofila contenida en la materia orgánica inicial. El término iso-alcano se suele usar para describir todos los alcanos ramificados y no solamente los 2-metilalcanos. Los alcanos acíclicos de menos de cinco átomos de carbono son gases en condiciones ambientales, mientras que los que contienen de cinco hasta quince átomos de carbono son líquidos. Los n-alcanos con más de 15 átomos de carbono suelen ser desde líquidos viscosos hasta ceras sólidas. Es conveniente indicar que muchos de los compuestos más pesados de los crudos de petróleo se mantienen disueltos en los más ligeros (García Martínez, 2005). En la Figura 1.2 se puede observar la estructura atómica de los componentes alifáticos más comunes.

Figura 1.2. Componentes mayoritarios de un crudo de petróleo

1.1.2 Hidrocarburos Aromáticos

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

Hidrocarburos monoaromáticos:

Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.

Hidrocarburos poliaromáticos

Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (Figura 1.2). Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos (Figura 1.2). Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos) (Figura 1.2). También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

1.1.3 Resinas

Las resinas son compuestos con valores de polaridad y pesos moleculares más altos que los saturados y aromáticos. Están compuestos de grupos polares finales (con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre) y de grupos parafínicos no polares (Boukir, et al., 2001). Las moléculas de las resinas son estructuralmente similares a la de los asfaltenos pero tienen menor peso molecular, mayor ratio hidrógeno/carbón y menor contenido de heteroátomos (Gafonova, et al., 2001).

1.1.4 Asfaltenos

En términos generales, los asfaltenos son considerados compuestos orgánicos que pueden o no estar asociados con el petróleo. J. Boussingault, originalmente definió el término “asfaleno” en 1837, como el residuo de la destilación del crudo (Pineda-Flores, et al., 2001).

Los asfaltenos pueden ser descritos desde dos puntos de vista: operacional (basado en la solubilidad) y molecular (basado en su estructura química). En relación a la solubilidad los asfaltenos se definen como macromoléculas solubles en tolueno e insolubles en n-heptano (o n-pentano) (Silva, et al., 2008; Gafonova, et al., 2001). En relación a su estructura química todavía no hay una acertada conformación de los asfaltenos, sin embargo, muchos coinciden en representarlos como los hidrocarburos del petróleo con mayor peso molecular, con valores que oscilan desde 600 a 3×10^5 uma y desde 1000 a 2×10^6 uma (Pineda-Flores, et al., 2001; Pineda-Flores, et al., 2004). Actualmente, el peso molecular y el tamaño de las macromoléculas de los asfaltenos no está clara, pero en general, poseen: anillos aromáticos

cristalizados, pequeñas cadenas alifáticas laterales y grupos polares funcionales que contienen heteroátomos (ej.: ácido carboxílico, carbonilos, fenoles, pirroles y piridinas) (Silva, et al., 2008; Gafonova, et al., 2001).

1.1.5 Productos derivados del petróleo

El petróleo y sus productos refinados (gasolina, gasóleo, queroseno, aceites lubricantes, etc.) son el mayor recurso utilizado en el sector industrial y de transporte a nivel mundial (Sing, et al., 2006), siendo el suelo uno de los medios en donde accidentalmente se pueden verter grandes cantidades de estos productos (Chaîneau, et al., 2003).

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que potencialmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente, hay que entender el proceso de refinado del crudo utilizado para la obtención de estos productos petrolíferos. Se destila a temperaturas crecientes obteniendo 4 fracciones principales: gasolina, queroseno, destilados medios (querosenos, gasoil, aceites lubricantes) y un residuo. Este residuo se destila al vacío obteniéndose otros aceites lubricantes (más pesados), ceras y parafinas y betumes asfálticos (alquitranes) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Productos generalmente obtenidos del refinado

Fracción	Tª Ebullición (°C)	Composición aproximada	Usos
Gasolina ligera	20-100	C5H12-C7H16	Disolvente
Bencina	70-90	C6-C7	Limpieza en seco
Ligroína	80-120	C6-C8	Disolvente
Gasolina	20-180	C6-C11	Carburante de motores
Queroseno, Jet fuel	200-300	C12-C16	Alumbrado y carburante
Gasoleo - Diesel	200-350	C13-C18	Carburante de motores
Aceite lubricante	200-350	C16-C20	Lubricantes
Grasas, vaselinas	250-400	C18-C22	Farmacéutica
Cera de parafina	245-540	C20-C45	Velas
Betum asfáltico (35% peso)	> 540	C30-C45	Alquitrán asfáltico coque de petróleo

La composición química de la gasolina es diferente a la del gasoil debido a que se han obtenido como productos de destilación del petróleo a partir de diferentes intervalos de temperatura (Tabla 1.1). La obtención de gasolina es menos directa que la de los fueles y gasóleos, ya que

en una primera fase se obtiene por destilación del crudo entre 20-180°C. Esto implica una composición de *n*-alcanos más ligera (C₆-C₁₁) que los fueles y gasóleos (C₁₀-C₂₅).

De aquí en adelante nos centraremos en describir la composición del gasóleo, que es la fracción de destilación, que en este estudio nos interesa mayormente.

El gasóleo forma parte de la fracción intermedia de destilación en el proceso de refinado, lo que implica un rango de puntos de ebullición entre 185-345°C. La mayoría de los compuestos de hidrocarburos del gasóleo están en un rango C₁₀-C₁₈ (Kyung-Hee, et al., 2004), encontrando también compuestos de 10 a 25 átomos de carbono, siendo los más abundantes los C₁₅-C₁₇ (Viñas Canals, 2005). Su composición es una mezcla compleja de alcanos cíclicos, normales y ramificados y de compuestos aromáticos (Gallego, et al., 2001; Pinto Mariano, et al., 2007). Generalmente las proporciones predominantes son: un 30% en parafinas (*n*-alcanos e isoprenoides), 45% de cicloalcanos y un 25% de aromáticos. En concreto a nivel de compuestos aromáticos encontramos alquilbencenos, y más abundantemente, el naftaleno y sus alquilados. También se ha encontrado, en cantidades menores, el fenantreno y el fluoreno y sus productos metilados. No contienen pireno ni fluoranteno (compuestos de 4 anillos aromáticos), cuyos puntos de ebullición son más elevados que el intervalo utilizado en la destilación de fracciones intermedias.

Durante el proceso de refinado, se eliminan componentes de la fracción asfáltica (altamente recalcitrante a la biodegradación) lo que implica que los refinados intermedios (gasoil, fueles, querosenos y también las gasolinas) sean productos relativamente más biodegradables que los coques o alquitranes residuales, pero sobre este tema hablaremos más detalladamente en el apartado 1.3.

1.2 El suelo

1.2.1 Estructura y componentes del suelo

El suelo se define como una colección de cuerpos naturales sintetizados de una mezcla variable de minerales, erosionados y desechos, y de materia orgánica en descomposición que recubre la corteza terrestre (Chiou, 2002). Se trata de un sistema abierto, dinámico, constituido por tres fases. La fase sólida formado por los componentes inorgánicos y los orgánicos, que dejan unos huecos (poros, cámaras, galerías, grietas y otros) en cuyo interior se hayan las fases líquida y gaseosa. El volumen de huecos, está ocupado parcialmente por agua,

como componente principal de la fase líquida, que puede llevar iones y sustancias en solución o en suspensión; por aire, que constituye la fase gaseosa o atmósfera del suelo y por los organismos y raíces que viven en el suelo. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico Figura 1.3.

Figura 1.3. Esquema de los constituyentes del suelo

La estructura del suelo describe la forma en que se agregan las partículas individuales de suelo en unidades de mayor tamaño (agregados) y el volumen de huecos asociado a ellas. La estructura de cada horizonte se describe atendiendo al grado, forma y tamaño de los agregados. (Porta, et al., 2003; Bronick, et al., 2005).

suelos con mayor porcentaje de partículas finas son suelos que presentan menores tasas de biodegradación de hidrocarburos.

Tabla 1.2. Fracciones granulométricas

Denominación	Diámetros aparentes μm
Arena muy gruesa	$1000 < \phi < 2000$
Arena gruesa	$500 < \phi < 1000$
Arena media	$250 < \phi < 500$
Arena fina	$100 < \phi < 250$
Arena muy fina	$50 < \phi < 100$
Limo	$2 < \phi < 50$
Arcilla	$\phi < 2$

1.2.2 Reparto en fases de los contaminantes orgánicos en el suelo

La naturaleza heterogénea de las muestras de suelo de diferentes sitios geográficos complica en gran medida la generalización de los resultados de la sorción de los contaminantes orgánicos en el suelo. La gran variedad de datos de sorción, tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos en suelos, es un hecho que genera un gran desafío a la comunidad científica. En algunos estudios de interacción suelo-pesticida, generalmente, asumen al suelo como único adsorbente. En investigaciones más detalladas lo asumen como una mezcla de adsorbentes, análogos a otros adsorbentes convencionales bien definidos. Aunque este punto de vista reconcilia una gran cantidad de comportamientos de contaminantes orgánicos en minerales y suelos secos, implica serias dificultades técnicas para explicar los resultados de sorción en suelos saturados con agua. Las diferentes características de sorción, en suelos relativamente secos en comparación con suelos saturados con agua, son responsables directas de los cambios en la actividad química, biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes sorbidos en el suelo (Chiou, 2002).

Como resultado de actividades antrópicas cada año se liberan grandes cantidades de compuestos químicos, orgánicos e inorgánicos, en el medio ambiente. Estos compuestos están expuestos a varios procesos físicos, químicos y biológicos (Schwarzenbach, et al., 2003). Dichos procesos se interrelacionan en un sistema ambiental influyendo en el destino final del compuesto (por ejemplo en el suelo Figura 1.3). Los procesos pueden ser divididos en dos categorías principales: 1) Procesos que no permiten cambios en la estructura química del compuesto y 2) Procesos que transforman los compuestos en uno o varios productos de

diferente comportamiento y efecto(s) en el medio. La primera categoría incluye procesos de transporte y mezcla en un compartimento ambiental dado (ej. La materia orgánica del suelo) como también procesos de transferencia entre diferentes fases y/o medios (ej., intercambio agua-aire, intercambio sedimento-agua). La segunda categoría son procesos que provocan alteraciones en la estructura del compuesto. Esto incluye transformaciones químicas, fotoquímicas y/o biológicas. Es importante reconocer que en un sistema ambiental dado, todos estos procesos suelen ocurrir simultáneamente y por lo tanto procesos diferentes pueden tener fuerte influencia entre sí (Schwarzenbach, et al., 2003).

Figura 1.5. Coeficientes de reparto en el suelo

El reparto de un compuesto químico entre varias fases dentro de matrices medioambientales (como es el caso del suelo) se considera muy importante en cuanto al destino y la migración de dicho contaminante (Chin, et al., 1988). El coeficiente de reparto es una medida de la distribución de un compuesto entre dos fases y se expresa como un ratio de concentraciones (Schwarzenbach, et al., 2003).

A continuación se enumerará, las medidas más importantes de los fenómenos de reparto que pueden influir en un suelo cuando se vierte un contaminante orgánico. El esquema se puede observar en la Figura 1.5:

- ✓ **Coefficiente de reparto agua/aire (k_w)**. Es el cociente entre la concentración de un compuesto químico en el agua y su concentración en el aire, en equilibrio. Consiste en una expresión que es equivalente a la inversa de la constante de Henry (H) adimensional.
- ✓ **Coefficiente de reparto del carbono orgánico (k_{oc})**. Nos proporciona una medida del reparto de un constituyente químico entre el carbono orgánico del suelo o sedimento y el agua en el equilibrio. Es específico de un compuesto químico y bastante independiente de las propiedades del suelo (salvo de su contenido en carbono orgánico).
- ✓ **Coefficiente de reparto suelo-agua (k_d)**. La movilidad de los contaminantes en el suelo depende no sólo de las propiedades relacionadas con la estructura física del suelo, sino también con la capacidad del material del suelo para retener o adsorber los contaminantes. La capacidad de que un compuesto sea adsorbido depende de las propiedades físico-químicas del compuesto químico y del suelo. Este coeficiente se usa generalmente para cuantificar la sorción del suelo y es el cociente entre la concentración del contaminante adsorbido y la concentración disuelta en equilibrio.

La existencia de tres fases en el suelo (sólida con materia orgánica y mineral, líquida y gaseosa) (ver Figura 1.3), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierte en un compartimento ambiental muy complejo (Viñas Canals, 2005). La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por la coexistencia de las tres fases en el suelo, por lo que podríamos encontrar el contaminante adsorbido en la parte mineral o en la materia orgánica (mayoritariamente aquellos compuestos lipofílicos, con baja solubilidad en agua, apolares o de peso molecular alto, como algunos compuestos aromáticos, resinas, asfaltenos, etc.) (Chin, et al., 1988), en disolución, o en fase de vapor (Breus, et al., 2006; Mackay, et al., 1991). Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la parte mas superficial del suelo pueden sufrir evaporación o fotooxidación (García-Martínez, et al., 2006). De este modo en el conjunto del suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir biodegradación (Harms, et al., 1997; Margesin, et al., 2001). El proceso de transformación más importante, en el suelo, es la biodegradación. Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando microcolonias que se encuentran separadas unos 100 μm , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3 μm (Harms, et al., 1997).

1.2.3 Legislación ambiental de suelos contaminados

La legislación actual mas que regular los sistemas de tratamiento de suelos contaminados, regula los parámetros que debe cumplir un suelo para ser declarado como contaminado, la responsabilidad de la descontaminación de ese suelo y las actividades potencialmente contaminantes del mismo.

Debido a esta circunstancia, por el momento, la normativa por la que se debe regir la biorremediación a nivel estatal será por la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

La ley arriba indicada sigue las bases de la Ley 10/98 de Residuos y por el Real Decreto 9/2005 de 14 de enero para determinar cómo detectar que un suelo está contaminado y a quién corresponde su descontaminación pero en lo referente a cómo hacerlo, el artículo 34 de la ley 22 de residuos establece que corresponde a la comunidades autónomas la declaración de un suelo como contaminado, recogidos en el apartado 1 del anexo XI, la elaboración de criterios y estándares para esta declaración, la realización de un inventario de suelos contaminados, evaluando sus riesgos para la salud y el medio ambiente y establecer una lista de prioridades de actuación en función de los riesgos planteados por estos. Cabe entender por tanto que el planteamiento de tratamientos y su futura regulación podría ser competencia también de las comunidades autónomas.

El Real Decreto 9/2005 en su anexo I establece una lista de las actividades potencialmente contaminantes del suelo, entre las que se encuentran actividades relacionadas con los hidrocarburos, como la extracción de crudo de petróleo, actividades relacionadas con las explotaciones petrolíferas (excepto actividades de prospección) y el refino de petróleo. Todas ellas, según el artículo 3, están obligadas a remitir al órgano competente de la comunidad autónoma un informe preliminar, y posteriormente informes periódicos, de la situación del suelo en el que se desarrolle la actividad, en un plazo no superior a dos años (para el informe preliminar). El contenido mínimo del informe preliminar se presenta en el anexo II del Real Decreto.

El anexo III del Real Decreto establece los criterios para la consideración de un suelo como contaminado y expone textualmente:

“Un suelo será declarado como contaminado cuando se determinen riesgos inaceptables para la protección de la salud humana o, en su caso de los ecosistemas, debido a la presencia en este de alguna de las sustancias contaminantes recogidas en los anexos V y VI o de cualquier otro contaminante químico.

En aquellas circunstancias en que no se disponga de la correspondiente valoración de riesgos, los órganos competentes de las comunidades autónomas podrán asumir que el riesgo es inaceptable y, en consecuencia, declarar un suelo como contaminado cuando ocurra alguna de las siguientes circunstancias:

1. En aquellos casos en que se considere prioritaria la protección de la salud humana:
 - a. Que la concentración en el suelo de alguna de las sustancias recogidas en el anexo V excede 100 o más veces los niveles genéricos de referencia establecidos en él para la protección de la salud humana, de acuerdo con su uso.
 - b. Que la concentración en el suelo de cualquier contaminante químico no recogido en el anexo V para ese suelo excede 100 o más veces el nivel genérico de referencia calculado de acuerdo con los criterios establecidos en el anexo VII.
2. En aquellos casos en que se considere prioritaria la protección de los ecosistemas:
 - a. Que la concentración letal o efectiva media, CL(E)50, para organismos del suelo obtenida en los ensayos de toxicidad OCDE 208 (Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas terrestres, OCDE 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra), OCDE 216 (Ensayo de mineralización del nitrógeno en suelos), OCDE 217 (Ensayo de mineralización de carbono en suelo) o en aquellos otros que se consideren equivalentes para ese propósito por el Ministerio de Medio Ambiente, en inferior a 10 mg de suelo contaminado/g de suelo.
 - b. Que la concentración letal o efectiva media, CL(E)50, para organismos acuáticos obtenida en los ensayos de toxicidad OCDE 201 (Ensayo de inhibición del crecimiento en algas), OCDE 202 (Ensayo de inhibición de la movilidad en *Daphnia magna*), OCDE 203 (Ensayo de toxicidad aguda en peces) o en

aquellos otros que se consideren equivalentes para este propósito por el Ministerio de Medio Ambiente, efectuados con los lixiviados obtenidos por procedimiento normalizado DIN-38414, es inferior a 10 ml de lixiviado/l de agua.”

El Real Decreto 9/2005 también establece en su artículo 7 que las actuaciones de recuperación de un suelo contaminado deberán garantizar que la contaminación remanente, si la hubiera, se traduzca en niveles de riesgo aceptables de acuerdo con el uso del suelo. Además indica que esta recuperación deberá llevarse a cabo aplicando las mejores técnicas disponibles en función de las características de cada caso, priorizando las técnicas de tratamiento in situ.

1.3 Biorremediación de Hidrocarburos en suelos

La contaminación ambiental más extendida a nivel mundial se la puede atribuir a la contaminación por hidrocarburos del petróleo, causada principalmente por derrames en la explotación, accidentes de cargueros, rupturas de tanques de almacenamiento, fugas en tuberías y accidentes de transporte (Hui, et al., 2007; Borden, et al., 1995; Mana Capelli, et al., 2001). El crecimiento de la demanda energética a nivel mundial ha llevado, durante las tres últimas décadas, a un incremento del uso de los productos del petróleo lo que hace aumentar las probabilidades de derrames y accidentes relacionados con el petróleo (Vreysen, et al., 2005).

La biorremediación de suelos contaminados de hidrocarburos es un proceso natural que aprovecha la habilidad de los microorganismos para degradar y/o eliminar los contaminantes orgánicos con objeto de disminuir la concentración de una mezcla de compuestos orgánicos como el petróleo y sus derivados. El objetivo de la técnica de biorremediación es acelerar las tasas de biodegradación de los compuestos orgánicos (Margesin, et al., 2007).

Muchos microorganismos poseen la capacidad enzimática necesaria para degradar hidrocarburos del petróleo. Algunos microorganismos degradan alcanos (normales, ramificados y parafinas cíclicas), otros degradan aromáticos, y otros, tanto aromáticos como alcanos (Atlas, 1995). Hace algunos años fueron ordenados en función de su susceptibilidad decreciente a la biodegradación en el siguiente orden: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos con bajo peso molecular > alcanos cíclicos (Leahy, et al., 1990). A menudo los alcanos normales, en el rango C₁₀ a C₂₆, suelen ser los más susceptibles a ser degradados, así como también los compuestos aromáticos con bajo peso molecular (Amellal, et al., 2001), tales

como, el benceno, tolueno y xileno (estos compuestos tienen toxicidades muy elevadas). Estructuras más complejas (como los alcanos ramificados) suelen ser más resistentes a la biodegradación, significando que menos organismos pueden degradar estas estructura y las tasas de biodegradación son menores que las de las estructuras más simples (Atlas, 1995).

En otros estudios, bajo condiciones de laboratorio optimizadas, se observaron pérdidas considerables de resinas y asfaltenos (Atlas, 1981; Lacotte, et al., 1996). La degradación microbiana de estas fracciones, que previamente han sido consideradas relativamente recalcitrantes a la biodegradación, podrían ser atribuidas a co-oxidación (Lacotte, et al., 1996). La cooxidación es un proceso en el que los hidrocarburos, supuestamente, invariantes son oxidados cuando se presentan como co-sustrato en un medio en el que una diversidad de hidrocarburos se acondicionan (Perry, 1979).

La tasa de biodegradación de hidrocarburos en ambientes naturales como el suelo, generalmente, es más reducida comparada con la observada en un laboratorio experimental (Martienssen, et al., 2007) sugiriendo que la actividad microbiana se ve afectada por diferentes parámetros del suelo incluyendo la naturaleza y cantidad de nutrientes inorgánicos, que pueden ser insuficientes, para la óptima proliferación o actividad microbiana; la accesibilidad y biodisponibilidad de los contaminantes y características del suelo tales como la estructura y textura. Para asegurarnos de degradar parcial o totalmente los hidrocarburos presentes en el suelo es necesario un contacto eficiente entre los microorganismos activos y dichos contaminantes. No obstante, la mayoría de estos contaminantes orgánicos interactúan con los componentes del suelo, principalmente con la arcilla. Estas interacciones pueden aumentar o disminuir la tasa de biodegradación. Como, por ejemplo, los resultados del estudio realizado por Amellal (Amellal, et al., 2001) indicaron que bajo condiciones realistas del suelo con comunidades bacterianas intactas y autóctonas, la biodegradación de una mezcla de hidrocarburos aromáticos en el suelo está controlada por la naturaleza de los mismos así como por algunos parámetros del suelo tales como la naturaleza de la fracción de partículas y agregados en los cuales han sido asociados los hidrocarburos aromáticos.

Como se ha mencionado, la biodegradación de hidrocarburos en suelos depende de una infinidad de factores abióticos que afectan tanto los ratios de crecimiento microbiano como a la actividad enzimática lo que influye directamente en los ratios de biodegradación de hidrocarburos, entre los principales factores se puede mencionar: concentración, fracción y madurez de los hidrocarburos, de las poblaciones microbianas, propiedades del medio donde

se ha vertido, tales como: temperatura, oxígeno, humedad, disponibilidad de nutrientes, etc (Riffaldi, et al., 2005; Mohn, et al., 2000). A continuación detallaremos algunos de los factores más importantes que dominan la biodegradación de hidrocarburos.

1.3.1 Cantidad y Estado del Hidrocarburo

Al ser el petróleo una mezcla extremadamente compleja de hidrocarburos existe gran cantidad de estudios de biodegradación de las familias y compuestos que lo componen (Atlas, 1995; De Jonge, et al., 1997; Chaîneau, et al., 2003; Gafonova, et al., 2001; Martienssen, et al., 2007).

El estado físico en el que se encuentran los hidrocarburos del petróleo tiene un efecto marcado en su biodegradación. Concentraciones muy bajas de hidrocarburos son solubles en agua, pero la mayoría de derrames de hidrocarburos del petróleo se producen en concentraciones que sobrepasan en gran medida el límite de solubilidad (Atlas, 1981).

El derrame de hidrocarburos en suelos se caracteriza principalmente por el movimiento vertical a lo largo del terreno más que un esparcimiento horizontal (contrario a lo que sucedería en un derrame marino). La infiltración del hidrocarburo en el suelo disminuye las pérdidas por evaporación de los compuestos volátiles lo que puede hacer disminuir la actividad de los microorganismos. Por otro lado, las partículas presentes en el suelo, puede reducir, por absorción, la toxicidad efectiva de los componentes del petróleo, pero la absorción y adsorción de las sustancias húmicas del suelo probablemente contribuyan a la formación de residuos persistentes (Leahy, et al., 1990).

Según Atlas (Atlas, 1995), cuyo estudio está basado principalmente en derrames marinos, la tasa de biodegradación y la cantidad eliminada de hidrocarburo, depende más del tipo de hidrocarburo que de la cantidad de hidrocarburo presente en un emplazamiento contaminado, ya que, es más importante la limitación de nutrientes y oxígeno que en sí la cantidad. Aunque puede suceder que si la cantidad de hidrocarburo es excesiva se produzcan efectos tóxicos sobre las bacterias degradadoras, sobre este tema en la bibliografía, debido a la gran cantidad de factores influyentes en la biodegradación, no se dan concentraciones a partir de las cuales las bacterias queden totalmente inhibidas. En otros estudios (Rahman, et al., 2002; Del'Arco, et al., 2001; Hui, et al., 2007) en los que se han realizado ensayos, en laboratorio, a diferentes niveles de concentración de hidrocarburo se observa que la tasa de biodegradación es inversamente proporcional a la concentración. El estudio de Rahman (Rahman, et al., 2002) va un poco más allá y muestra que al hacer ensayos con el mismo crudo con diferentes niveles de

concentración son menores las tasas de biodegradación cuanto mayor es tanto el nivel de concentración como el peso molecular y más compleja la estructura molecular. Por ejemplo, no existe gran diferencia, en cuanto a las tasas de biodegradación, entre niveles de concentración en los hidrocarburos de cadena lineal corta pero si existe más diferencia cuando los hidrocarburos son ramificados o de cadena lineal más larga. Esto se puede deber a que los microorganismos lo primero que metabolizan son las cadenas lineales más cortas llegando un momento en el cual ya no tienen capacidad para seguir metabolizando ni compuestos de cadenas cortas ni ningún otro compuesto lo que produce un estancamiento de la biodegradación.

Con respecto al tipo de hidrocarburo, la heterogeneidad de la composición de los diferentes crudos del petróleo y sus productos refinados influyen en gran medida en los ratios de biodegradación tanto del crudo como de sus fracciones (Leahy, et al., 1990; Pollard, et al., 1994). En la bibliografía se puede encontrar algunos estudios como el de Zhendi Wang (Wang, et al., 1998) que realizó un estudio en laboratorio de ocho crudos diferentes, observando la evolución tanto de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) como de algunas de sus fracciones mostrando cada uno de ellos diferentes grados de biodegradación. Estos grados de biodegradación comprenden desde: 3 a 41 % en los TPH (en este caso suma de saturados + aromáticos), 0 a 47 % en saturados, 16 a >90% en n-alcanos, dentro de estos los más susceptibles a la biodegradación fueron los alcanos lineales de cadena corta. Por lo tanto, los ratios de biodegradación fueron más altos para los saturados, seguido de los aromáticos ligeros, aromáticos con alto peso molecular y finalmente los compuestos polares que presentan ratios muy bajos de biodegradación que concuerdan con estudios anteriores y posteriores (Leahy, et al., 1990; Song, et al., 1990; Seklemova, et al., 2001; Mana Capelli, et al., 2001). Por tanto, a igualdad de tiempos, la biodegradabilidad de los diferentes crudos es altamente dependiente de su composición. De principal importancia la cantidad relativa de altos y bajos pesos moleculares. Crudos pesados contienen gran porcentaje de componentes de alto peso molecular mientras que los crudos ligeros contienen gran porcentaje de componentes con bajos pesos moleculares. La degradación abiótica es mayor en los crudos ligeros debido, principalmente, a la volatilidad de sus componentes de bajo peso molecular. Los bajos datos de biodegradación en los estudios realizados, de crudos pesados, puede reflejar la resistencia a la degradación microbiana de los compuestos complejos de alto peso molecular.

Cuando el hidrocarburo ha estado durante un largo periodo de tiempo en el suelo presenta serias dificultades para realizarle un tratamiento biológico. Procesos ambientales tales como evaporación, pérdidas fotolíticas hidrólisis y biotransformación, reducen la concentración de los sustratos fácilmente degradables dejando en el suelo residuos mucho más resistentes al ataque biológico (Pollard, et al., 1994; Talat, et al., 1998).

Con respecto a los productos refinados, particularmente con el gasóleo, existen varios estudios de la biodegradación en suelos contaminados con este producto (Amellal, et al., 2001; Bento, et al., 2005; Bundy, et al., 2001; Margesin, et al., 2001; Margesin, et al., 2007; Riffaldi, et al., 2005; Song, et al., 1990) en los que certifican que es posible la biorremediación de parte de este producto, principalmente, las cadenas lineales más cortas, en periodos razonables de tiempo.

1.3.2 Temperatura

La temperatura tiene influencia en: la biodegradación del petróleo debido por un lado a su efecto en la naturaleza física y la composición química de los hidrocarburos y por otro lado a su efecto en los microorganismos y la composición de las comunidades microbianas (Atlas, 1981; Dibble, et al., 1979; Leahy, et al., 1990; Rahman, et al., 2002; Tremier, et al., 2005; Atlas, 1975; Pollard, et al., 1994).

Atlas (Atlas, 1975; Atlas, 1981) encontró que los efectos de la temperatura difieren, dependiendo de la composición de la mezcla de hidrocarburos. Bajas temperaturas, retardan los ratios de volatilización de los hidrocarburos de bajo peso molecular, algunos de los cuales son tóxicos para los microorganismos. La presencia de estos compuestos tóxicos ralentiza el comienzo de la biodegradación a bajas temperaturas.

En el estudio realizado por Dibble (Dibble, et al., 1979) muestra que la influencia de la temperatura en los procesos biológicos puede llegar a tener efectos significativos ya que, conforme aumenta la temperatura, las tasas de biodegradación también lo hacen, mostrando mejores resultados a 20°C que a 5°C, pero sin casi haber mejorías cuando la temperatura aumenta de 28 a 37 °C. Leahy (Leahy, et al., 1990) en su estudio también manifiesta que el aumento de la temperatura refleja un aumento de la eficiencia de biodegradación pero también sugiere la importancia de utilizar comunidades bacterianas adaptadas a los cambios de temperatura del medio donde se va a realizar un proceso de biorremediación, ya que,

existen estudios en los que se presentan resultados aceptables de biodegradación a bajas temperaturas.

Rahman (Rahman, et al., 2002) en sus resultados muestra diferentes porcentajes de biodegradación que dependen tanto de las bacterias utilizadas como del tipo de hidrocarburo, concluyendo que el uso de una mezcla de bacterias pueden degradar eficientemente los hidrocarburos del petróleo siendo alcanzada su máxima eficiencia a una temperatura de 30°C. Pero sugiere, finalmente, un uso optimizado tanto de bacterias como de nutrientes bajo ciertas condiciones ambientales para un eficaz funcionamiento de la biorremediación. Delille (Delille, et al., 2007) coincide manifestando que en su estudio ha tenido buenos resultados a temperaturas bajas pero que no se debe generalizar sino que para diseñar un buen sistema de biorremediación se requiere un minucioso estudio de las condiciones locales, consideraciones de las propiedades físicas, químicas y microbianas del suelo contaminado así como también de las condiciones ambientales.

1.3.3 Oxígeno

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados en mayor medida y con mayor rapidez de forma aeróbica (O_2 como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O_2 , y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Viñas Canals, 2005; Leahy, et al., 1990; Young-Gyun, et al., 2000)

El paso inicial para el catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, en condiciones aeróbicas, por bacterias y hongos envuelve la oxidación del sustrato, donde el O_2 sirve como aceptor terminal de electrones, por lo que las moléculas de oxígeno son necesarias (Pollard, et al., 1994). El ratio de disponibilidad del oxígeno en suelos depende: del consumo de oxígeno por parte de la microbiota, del tipo de suelo, de la saturación en agua del suelo y de la presencia de sustratos utilizables que pueden hacer decaer el oxígeno. La concentración de oxígeno ha sido identificada como la variable limitante para la biodegradación de crudos en suelos (Leahy, et al., 1990).

1.3.4 Humedad

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua (Young-Gyun, et al., 2000). No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y de si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica (Viñas Canals, 2005). Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Viñas Canals, 2005). Dibble (Dibble, et al., 1979), describió un rango de humedad óptimo del 30-90% de saturación en agua para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, ya que al hacer el estudio en este rango de humedades tuvieron buenos resultados de biodegradación sin encontrar diferencia significativas conforme aumentaban de 30 a 90%. En algunos suelos, con alto contenido de arcillas (partículas finas y por lo tanto menor porosidad), en el orden del 45% de contenido de arcilla, se han utilizado contenidos de humedad menores al 20% obteniendo mejores resultados que cuando se utilizó humedades mayores a 20% como es el caso del estudio realizado por Ayotamuno (Ayotamuno, et al., 2006).

1.3.5 Poblaciones Microbianas

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica, muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes (Sessitsch, et al., 2001). En términos generales se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables por gramo de suelo, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes de magnitud menos como unidades formadoras de colonias, pero representan una parte importante de la biomasa del suelo (Viñas Canals, 2005). La organización estructural de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable (Sessitsch, et al., 2001). Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo.

Los hidrocarburos son degradados fundamentalmente por bacterias y hongos y la adaptación por exposición anterior de las comunidades microbianas a los hidrocarburos aumenta las tasas de degradación de los mismos (Amellal, et al., 2001; Delille, et al., 2007; Riffaldi, et al., 2005). La adaptación se lleva a cabo mediante un enriquecimiento selectivo de los microorganismos que utilizan hidrocarburos y la amplificación del grupo de genes que catabolizan hidrocarburos (Riffaldi, et al., 2005). La biodegradación de los hidrocarburos normalmente requiere la cooperación de más de una única especie. Esto es particularmente cierto en las mezclas complejas de compuestos como es el caso del petróleo. Los microorganismos individuales pueden metabolizar solo un rango limitado de sustratos de hidrocarburos⁴. Se requiere un conjunto de poblaciones mezcladas con, sobre todo, extensas capacidades enzimáticas para aumentar la tasa y la extensión de la biodegradación del petróleo. Se ha detectado en suelos o aguas contaminadas con petróleo, la presencia de poblaciones microbianas pertenecientes a varios géneros (Riffaldi, et al., 2005).

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, con respecto a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación. Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Viñas Canals, 2005). Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, en ecosistemas complejos como es el suelo, los microorganismos autóctonos poseen una elevada biodiversidad influida, en gran medida, por la diversidad de las condiciones ambientales y varios factores físico-químicos y biológicos (Baek, et al., 2004; Volkering, et al., 1998; Hui, et al., 2007). Es decir, los organismos del propio ecosistema contaminado son los más eficientes para realizar la biodegradación. En consecuencia, es necesario abordar el análisis de la viabilidad de la microbiota del sistema a descontaminar y su capacidad para crecer en presencia de los hidrocarburos contaminantes. Cuando se intenta descontaminar un suelo, se ha demostrado, que la adición de bacterias degradadoras de hidrocarburos no es más efectiva (incluso puede llegar a ser menos efectiva) en comparación con la estimulación del crecimiento de la microbiota existente en el suelo. En consecuencia, el entendimiento de la ecología microbiana y las restricciones de la biodegradación de un suelo contaminado con petróleo es extremadamente importante (Bundy, et al., 2001). Por lo tanto, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes (Bento, et al., 2005). Lo

que se debe verificar es que la microbiota existente, que suele ser muy compleja, tenga las capacidades enzimáticas necesarias para degradar los hidrocarburos contaminantes.

1.3.6 Nutrientes

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y estos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes, normalmente requeridos, son el fósforo y el nitrógeno, por tanto, las concentraciones asimilables de dichos elementos presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca, Na, Fe y SO ya están presentes en cantidades suficientes (Menn et al., 2000).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Dott et al., 1995; Breedveld y Sparrevik, 2001; Chaîneau et al., 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas; el rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, de igual manera, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Zhou y Crawford, 1995; Margesin y Schinner, 1997; Genouw et al., 1994). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA@ 22) para la biorremediación de suelos contaminados (Lindstrom et al., 1991; Pritchard y Costa, 1991). Además es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amoníaco se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio) (Morgan y Watkinson, 1992).

1.3.7 Utilización de surfactantes

Los surfactantes son sustancias que presentan actividad en la superficie, reduciendo la tensión superficial del líquido en el que está disuelto o bien la tensión superficial de la interfase si hubiera otra fase presente (Vreysen, et al., 2005). Para que una sustancia sea tensioactiva o

surfactante se requiere que contenga dos grupos: uno polar o hidrófilo y otro no polar o hidrófobo, siendo esto lo que mas caracteriza a los surfactantes. A fin de disolver contaminantes hidrófobos (como los hidrocarburos), se utiliza un surfactante, que tiene una estructura anfifílica, una estructura anfifílica es aquella sustancia que tiene los dos grupos: el polar y el no polar que hacen que se disminuya la tensión superficial (Martienssen, et al., 2007).

Desde que, como resultado de su limitada biodisponibilidad bajo condiciones naturales, frecuentemente la degradación de hidrocarburos toma lugar más lentamente que lo que sería posible usando potenciales naturales de degradación, muchos intentos ya han sido realizados con vistas de mejorar la solubilidad en agua de los hidrocarburos y a su vez de sus métodos de biodisponibilidad físico-químicas. En este caso, parece obvio utilizar surfactantes como los utilizados en diferentes composiciones químicas en agentes de limpieza y lavado de ropa (Martienssen, et al., 2007).

La implementación de un tratamiento con surfactante para la remediación de suelos debería tomar en cuenta algunos factores, incluyendo una recuperación (degradación) eficiente del surfactante, reutilización, interacción entre la parte arcillosa y el surfactante, sorción del surfactante, biodegradación y efectos sobre la microbiota. Adicionalmente, las soluciones de surfactante residual no deben ser consideradas por sí solas una causa de mayor impacto ambiental. Por esta razón, algunos investigadores se han centrado en el uso de biosurfactantes, que por su biodegradabilidad, recientemente han sido preferidos para la remediación. Los biosurfactantes son comúnmente referidos como sustancias superficialmente activas, las cuales son sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos. Distintos surfactantes sintéticos, compuestos microbiológicamente producidos son biodegradables y particularmente muy apropiados para aplicaciones ambientales, tales como bioremediación y dispersión de derrames de petróleo. Comparados con compuestos sintéticos, los biosurfactantes presentan la ventaja de poco o nulo impacto ambiental y la posibilidad de su producción in situ, además, de alcanzar mayores eficiencias en la remoción de contaminantes orgánicos como el fenantreno y el diesel (Kyung_Hee et al 2004).

Un surfactante adecuado para mejorar la bioremediación de hidrocarburos debería tomar en cuenta la superficie de las bacterias degradadoras de hidrocarburos. Si los hidrocarburos son incorporados en micelas polares o igualmente cargadas, el contacto con superficies hidrofóbicas o campos hidrofóbicos de la superficie de la celda y por tanto la absorción de los

hidrocarburos en la celda puede llegar a ser inhibido o nulo. Además, las cargas en la superficie de las micelas de muchos surfactantes convencionales resultan en una repulsión de bacterias igualmente cargadas. Un problema, que también hay que tomar en cuenta, con muchos surfactantes convencionales es su alto potencial bacteriotóxico.

Los surfactantes se suelen utilizar para aumentar la biodisponibilidad y a su vez la eficiencia de la biodegradación, ya que, los microorganismos degradadores de hidrocarburos actúan principalmente en la interface hidrocarburo/agua (Atlas, 1981), lo que nos puede indicar que el uso de surfactantes siempre es beneficioso. Un gran problema del uso de muchos surfactantes industriales disponibles en la actualidad es su inadecuada biocompatibilidad, principalmente debido a su bacteriotoxicidad estos forman micelas electrostáticamente cargadas en agua o micelas que tienen una muy alta polaridad, esas micelas se enfrentan a las bacterias degradadoras de hidrocarburos las cuales son especialistas, primero, en permanecer en el agua sin mayor gasto de energía (siendo hidrófilas) y segundo, en establecer contacto con los sustratos hidrófobos. Para reunir esos requisitos, se han encontrado muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos que contienen una parte hidrófoba en una superficie previamente hidrófila para degradar los hidrocarburos. A su vez, la incorporación de sustratos hidrófobos en micelas altamente polares o igualmente cargadas pueden inhibir o incluso evitar el ataque a los hidrocarburos. El contacto entre micelas y bacterias es adicionalmente inhibido por repulsión electrostática entre micelas cargadas y bacterias cargadas. Las propiedades de la superficie de las bacterias capaces de degradar los mismos compuestos son comparables en la mayoría de los casos lo mismo ocurre con los hidrocarburos degradados en el estudio hecho por M. Martienssen and M. Schirmer (Martienssen, et al., 2007) . Parece ser posible optimizar las propiedades de los surfactantes en atenuación natural mejorada de sitios contaminados con petróleo. La estructura de un surfactante óptimo puede ser deducida de biosurfactantes producidos a partir de las bacterias degradadoras de hidrocarburos o de la estructura de la superficie de las respectivas bacterias. Ha sido encontrado que los surfactantes naturales son altamente efectivos en la movilización de los hidrocarburos por biorremediación y que son sumamente efectivos en remover los hidrocarburos por biorremediación. La eficiencia de los surfactantes relacionados con la naturaleza ha sido demostrada recientemente en otros estudios y con otros productos que contienen surfactantes.

La biocompatibilidad de los surfactantes es siempre cuestión de una adecuada estructura de los mismos y no una cuestión de su naturaleza ni de su origen sintético.

1.3.8 Estructura y tipo de suelo

La estructura del suelo puede influenciar en la biodegradación de hidrocarburos debido a que la actividad microbiana varía con el tamaño de los agregados que se forman en el suelo, dado que existe menor biomasa microbiana en microagregados (formados principalmente por arcillas) que en macroagregados (Bronick, et al., 2005). Lo que produciría que el movimiento de carbono orgánico del suelo está principalmente controlado por el volumen de agua que ocupa los poros del suelo. Siendo la estructura del suelo una propiedad que afecta indirectamente debido a su efecto en el contenido de agua del suelo, cuanto menores son los microporos, el agua no está disponible para ayudar a la actividad microbiana en la descomposición del carbono orgánico (Thomsen, et al., 1999; Dibble, et al., 1979). Por lo que en suelos en los que haya alto contenido de arcillas (que generen microagregados) queden secuestrados algunos hidrocarburos, asociados a esta estructura, que no pueden ser metabolizados por las bacterias como es el caso de algunos PAHs (Amellal, et al., 2001). En el caso en que la porosidad sea suficiente para que ingrese el agua, gran contenido de esta podría dificultar la presencia de oxígeno, lo que también produciría una disminución de la capacidad metabólica de las bacterias (Young-Gyun, et al., 2000). En los dos casos, en el que no haya disponible agua por la baja porosidad y en los que no haya disponible oxígeno por el alto contenido en agua, la utilización de nutrientes ya sean orgánicos o inorgánicos no aumenta la eficiencia de la biodegradación (WANG, et al., 2008) debido a la inaccesibilidad de estos para aumentar las poblaciones microbianas.

Con respecto a la influencia de la estructura del suelo, en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, existen varias publicaciones que han estudiado su influencia, principalmente basados en las diferentes tasas de biodegradación presentadas cuando varía el contenido de los tamaños de partículas que constituyen el suelo y de las agregaciones que están pueden producir (Young-Gyun, et al., 2000; Bronick, et al., 2005; Bento, et al., 2005; Baek, et al., 2004; Bundy, et al., 2001; Amellal, et al., 2001; Sessitsch, et al., 2001) coincidiendo que la textura juega un papel importante en la biodisponibilidad del hidrocarburo a ser metabolizado, disminuyen los porcentajes de biodegradación conforme aumenta la cantidad de partículas finas pero que existen otros factores que también influyen y que se los ha comentado a lo largo de este apartado.

1.4 Modelos Estadísticos

Como sabemos, un modelo matemático es una abstracción simplificada de una realidad más compleja y siempre existirá cierta discrepancia entre lo observado y lo previsto por el modelo. La estadística proporciona una metodología para evaluar y juzgar estas discrepancias entre la realidad y la teoría.

La importancia de la realización de los modelos matemáticos radica principalmente en que, gracias a estos, se puede predecir el comportamiento de una de las variables en función del resto. Además permiten comparar los distintos niveles asignados a las variables controladas (conocidas, preestablecidas e independientes) para poder determinar las principales causas de variación de la respuesta en función de estos valores asignados.

Debido a la importancia que conlleva la utilización de los modelos matemáticos y a la necesidad de simplificar la comprensión de la evolución de las concentraciones de TPHs, en un suelo contaminado con gasoil, se han realizado varios modelos matemáticos.

El principal objetivo de la construcción de los modelos matemáticos es encontrar cuales son las variables que más han influido en la disminución de las concentraciones de TPH a lo largo del tiempo y además las diferencias más significativas e influyentes entre las variables controladas cualitativas (suelos, concentraciones y tratamientos).

Los tres modelos matemáticos que se han construido en este trabajo son:

- Un modelo en el que el TPH es solamente función del tiempo, con este modelo nos daremos una idea general de la evolución de los TPHs.
- Un modelo en el que el TPH es función del tiempo y de las variables de tipo biológico (bacterias heterótrofas), en este modelo nos interesa conocer como han influido la cantidad de bacterias existentes en cada una de las parcelas en la disminución de los TPHs.
- Y un último modelo en función del tiempo y de las variables de tipo químico (estas variables son los índices de biodegradación como C18/fitano, C16/NorPristano, UCM), en este modelo nos interesa saber qué índice es el que mejor explica la disminución de los TPHs a lo largo del tiempo.

1.4.1 Importancia de un modelo estadístico

La estadística actúa como disciplina puente entre los modelos matemáticos y los fenómenos reales. Un modelo matemático es una abstracción simplificada de una realidad más compleja y siempre existirá cierta discrepancia entre lo observado y lo previsto por el modelo. La estadística proporciona una metodología para evaluar y juzgar estas discrepancias entre la realidad y la teoría. Un modelo es una representación formal de un sistema real, con el que se pretende aumentar su comprensión, hacer predicciones y ayudar a su control. Por tanto, su estudio es básico para todos aquellos que deseen trabajar en ciencia aplicada que requiera el análisis de datos y el diseño de experimentos.

La importancia de la realización de los modelos matemáticos radica principalmente en que, gracias a estos, se puede predecir el comportamiento de una de las variables en función del resto. Además permiten comparar los distintos niveles (valores) asignados a las variables controladas para poder determinar las principales causas de variación de la respuesta en función de estos valores asignados.

1.4.2 Construcción de modelos estadísticos

Para la construcción de un buen modelo es necesario contar con leyes (por ejemplo, físicas) que describan el comportamiento del sistema. También es importante la experiencia, la intuición, la imaginación, la simplicidad y la habilidad para seleccionar el subconjunto más pequeño de variables. El primer paso es establecer el problema en forma clara y lógica delimitando sus fronteras, definiendo los objetivos del estudio y relacionar este objetivo con los valores numéricos de variables observables. Luego viene la recogida y depuración de datos; el diseño del experimento; las pruebas de contrastes; la verificación del modelo y la validación de las hipótesis.

El tipo de modelo estadístico más frecuente consiste en una descomposición de los valores de la variable de interés en:

$$Y = \text{parte sistemática} + \text{parte aleatoria}$$

En donde la *parte sistemática* o previsible es la media de las observaciones de la variable que nos interesa, mientras la *parte aleatoria* es la diferencia entre la media y los valores observados, donde también se recoge el efecto de todas las variables no consideradas en el modelo. Por ejemplo, la nota media de un grupo de estudiantes (y), se relaciona con otra

variable (x , horas diarias que en promedio dedican al estudio durante la semana). La parte sistemática o previsible es una recta, que indica un crecimiento lineal de la nota media con el número de horas de estudio. La parte aleatoria es la diferencia entre los valores observados y la recta, recogiendo el efecto de todas las variables no consideradas en el modelo (inteligencia de los estudiante, preparación previa, etc).

1.4.3 Clasificación de los modelos estadísticos

A los modelos estadísticos los podemos clasificar, de acuerdo a sus características generales más frecuentes, como:

Modelos estáticos: Son aquellos que estudian la variabilidad en un momento temporal dado.

Modelos dinámicos: Son aquellos que se aplican a situaciones que cambian con el transcurso del tiempo, y donde, por tanto, el tiempo debe aparecer explícitamente como variable.

Conceptualmente, una variable cualquiera, será función de otro gran número de variables, algunas de las cuales pueden no ser observables y cuyo número exacto se desconoce. Un modelo estadístico es una aproximación operativa de esta realidad, que tiene en cuenta explícitamente las variables observables presumiblemente más importantes, y engloba en la parte aleatoria los efectos del resto.

Tanto los modelos estáticos como dinámicos pueden ser modelos extrapolativos y explicativos.

Los modelos extrapolativos son aquellos que explican la variabilidad de los datos tomando como información únicamente sus valores pasados, sin incluir ninguna otra variable. Estos modelos son los más simples, por tanto, la parte sistemática es una constante o una función de los valores pasados observados.

Los modelos explicativos son aquellos que tienen en cuenta el efecto de otras variables. La parte sistemática del modelo será la suma de la parte sistemática extrapolativa y del efecto de las variables explicativas. Estos modelos son los de mayor interés en Estadística.

En la Tabla 1.3 podemos ver un resumen de la clasificación de los modelos estadísticos más frecuentes.

Tabla 1.3. Clasificación de los modelos estadísticos mas frecuentes

	Estáticos	Dinámicos
Extrapolativos	$y = \mu + u$	$y_t = \mu + \phi y_{t-1} + u_t$
Explicativos	$y = \mu + \beta x + u$	$y_t = \mu + \beta x_t + \phi y_{t-1} + u_t$

Los valores de la Tabla 1.3, μ , β y ϕ de las partes sistemáticas, son constantes a determinar, u y u_t representan las partes aleatorias.

1.4.4 Tipos de datos de los modelos estadísticos

Dado el conjunto de datos de una variable, la estadística estudia procedimientos para sintetizar la información que contiene dicha variable.

Los tipos de variables que se consideran en la realización de un modelo estadístico son:

- **Variables cualitativas o atributos:** Son aquellas que no toman valores numéricos y describen cualidades. Por ejemplo, clasificar dos tipos de suelo: suelo 1 y suelo 2.
- **Variables cuantitativas discretas:** Son aquellas que toman únicamente valores enteros, corresponden en general a contar el número de veces que ocurre un suceso.
- **Variables cuantitativas continuas:** Son aquellas que toman valores en un intervalo, corresponden a medir magnitudes continuas (tiempo, concentración, etc)

1.4.5 Modelo Lineal

Antes de definir lo que es un modelo lineal me gustaría hacer una descripción de lo que es una función lineal. Se llama función lineal de una variable, a una función de la forma:

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 x$$

En donde:

α_0 : En una constante y es la ordenada en el origen (valor de Y cuando X=0)

α_1 : También es una constante y es la pendiente (cambio de Y al aumentar X en 1)

Por lo tanto el modelo lineal es un modelo de regresión lineal entre dos variables

$$\mu_{y/x} = \alpha_0 + \alpha_1 x$$

Que también es un modelo probabilístico que se puede escribir:

$$y_i = \alpha_0 + \alpha_1 x_i + \varepsilon \quad i=1, 2, 3, \dots, n$$

Donde el término y_i es el escalar que se corresponde a la observación i -ésima de la variable endógena del modelo, también denominada variable dependiente, o endógena. De esta forma, $y=[y_1 \ y_2 \ \dots \ y_n]$ es el vector columna de dimensión $(n \times 1)$ que recoge todas las observaciones de la variable endógena del modelo.

Por su parte, x_i es la observación i -ésima de la variable explicativa, por lo tanto, es la variable explicativa, variable exógena o variable independiente del modelo. Así, $x=[x_1 \ x_2 \ \dots \ x_n]$ es el vector columna de dimensión $(n \times 1)$ que recoge todas las observaciones de la variable exógena del modelo.

Los coeficientes α_0 y α_1 son desconocidos y deberán ser estimados. Por último, el término ε_i es una perturbación estocástica agregada al modelo para recoger todos los posibles errores de medida tanto en las variables x_i e y_i así como los errores en la especificación lineal del modelo, es decir recogerá todos aquellos factores que por error no se han incluido en el modelo y que pueden afectar a la variable dependiente del modelo. Nótese que, en definitiva, el término de perturbación ε indica en qué medida las variables x e y se apartan de la relación lineal.

De nuevo, $\varepsilon = [\varepsilon_1 \ \varepsilon_2 \ \dots \ \varepsilon_n]$ es el vector columna de dimensión $(n \times 1)$ que recoge todas las perturbaciones estocásticas del modelo.

A partir de una muestra aleatoria, la teoría estadística permite:

- i. Estimar los coeficientes α_i del modelo (hay dos procedimientos: mínimos cuadrados y máxima verosimilitud que dan el mismo resultado).
- ii. Estimar la varianza de las variables $Y|x_i$ llamada *cuadrados medios del error* y representada por s^2 o MSE. A su raíz cuadrada se le llama *error estándar de la estimación*.
- iii. Conocer la distribución muestral de los coeficientes estimados, tanto su forma (t) como su error estándar, que permite hacer estimación por intervalos como contrastes de hipótesis sobre ellos.

1.4.6 Contrastes de hipótesis

Una *hipótesis estadística* es una asunción relativa a una o varias poblaciones, que puede ser cierta o no. Las hipótesis estadísticas se pueden contrastar con la información extraída de las muestras y tanto si se aceptan como si se rechazan se puede cometer un error.

La hipótesis formulada con intención de rechazarla se llama *hipótesis nula* y se representa por H_0 . Rechazar H_0 implica aceptar una *hipótesis alternativa* (H_1).

En la Tabla 1.4 se muestra un esquema de las hipótesis y los tipos de errores existentes.

Tabla 1.4. Esquema de los tipos de hipótesis

	H_0 cierta	H_0 falsa H_1 cierta
H_0 rechazada	Error tipo I (α)	Decisión correcta (*)
H_0 no rechazada	Decisión correcta	Error tipo II (β)

(*) Decisión correcta que se busca

$\alpha = p(\text{rechazar } H_0 | H_0 \text{ cierta})$. Probabilidad de rechazar la hipótesis nula (H_0) siendo esta cierta.

$\beta = p(\text{aceptar } H_0 | H_0 \text{ falsa})$. Probabilidad de aceptar la hipótesis nula (H_0) siendo esta falsa.

Potencia $= 1 - \beta = p(\text{rechazar } H_0 | H_0 \text{ falsa})$. Probabilidad de rechazar la hipótesis nula (H_0) siendo esta falsa.

Los detalles que debemos tomar en cuenta en la formulación de las hipótesis y el análisis posterior son:

1. α y β están inversamente relacionadas.
2. Sólo pueden disminuirse los dos tipos de errores (α y β), aumentando n .

Los pasos necesarios para realizar un contraste relativo a un parámetro θ son:

1. Establecer la hipótesis nula en términos de igualdad

$$H_0: \theta = \theta_0$$

2. Establecer la hipótesis alternativa, que puede hacerse de tres maneras, dependiendo del interés del investigador, en el primer caso se habla de contraste *bilateral* o de *dos colas*, y en los otros dos de *lateral* (*derecho* en el 2º caso, o *izquierdo* en el 3º) o *una cola*.

$$H_1: \theta \neq \theta_0 \qquad \theta > \theta_0 \qquad \theta < \theta_0$$

3. Elegir un *nivel de significación*: nivel crítico para α
4. Elegir un *estadístico de contraste*: estadístico cuya distribución muestral se conozca en H_0 y que esté relacionado con θ y establecer, en base a dicha distribución, la *región crítica*: región en la que el estadístico tiene una probabilidad menor que α si H_0 fuera cierta y, en consecuencia, si el estadístico cayera en la misma, se rechazaría H_0 . Obsérvese que, de esta manera, se está más seguro cuando se rechaza una hipótesis que cuando no. Por eso se fija como H_0 lo que se quiere rechazar. Cuando no se rechaza, no se ha demostrado nada, simplemente no se ha podido rechazar. Por otro lado, la decisión se toma en base a la distribución muestral en H_0 , por eso es necesario que tenga la igualdad.
5. Calcular el estadístico para una muestra aleatoria y compararlo con la región crítica, o equivalentemente, calcular el "valor p" del estadístico (probabilidad de obtener ese valor, u otro más alejado de la H_0 , si H_0 fuera cierta) y compararlo con α .

2 Materiales y Métodos

2.1 Tipos de suelos

En este apartado detallaremos las caracterizaciones que se realizaron a los dos tipos de suelos seleccionados para el desarrollo del experimento de landfarming, denominados de aquí en adelante suelo I ("S1") y suelo II ("S2").

La caracterización microbiológica consistió fundamentalmente en la determinación del recuento total de bacterias heterótrofas, de la actividad biológica mediante medidas respirométricas y evaluación de la actividad deshidrogenasa y el estudio de la biodiversidad microbiana para cada uno de ellos (Seklemova, et al., 2001).

Como resumen de los resultados se puede detallar lo siguiente:

- ✓ Las dos muestras de suelo poseen un número elevado de microorganismos viables (superior a 10^6) (Viñas Canals, 2005) lo que garantizaría desde este punto de vista la viabilidad de un proceso de landfarming en los mismos.
- ✓ Los suelos I y II mostraron distinta actividad biológica. Siendo considerablemente mayor en el caso del suelo II. Ello determina la posibilidad de poder utilizar en futuros estudios dos suelos ciertamente diferenciados en cuanto a su actividad biológica intrínseca.

La caracterización química consistió en caracterizar los dos suelos a nivel granulométrico, mineralógico y químico, así como el estudio de la posible presencia de hidrocarburos procedentes de antiguos vertidos y que pudieran tener influencia posterior en los resultados del landfarming. Paralelamente se caracterizaron los suelos como si fueran a utilizarse para su cultivo, de modo que se obtuvieron parámetros importantes para la biorremediación como: proporción Carbono/Nitrógeno, contenido en materia orgánica, contenido de fósforo (Seklemova, et al., 2001).

Las determinaciones realizadas llevaron a las siguientes conclusiones:

- ✓ En cuanto a la fracción inorgánica de los análisis realizados no se encontraron niveles elevados de metales pesados. Tampoco se encontró ningún elemento químico que pueda suponer problemas de toxicidad para los microorganismos o dificultades de cualquier tipo en la realización de las experiencias.

- ✓ En cuanto a la fracción orgánica, el suelo I bastante más pobre que el suelo II en cuanto a materia orgánica, nitrógeno y fósforo (observar Tabla 2.1), supone, unido a su menor actividad biológica, que en principio la respuesta a los tratamientos de biorremediación no sea tan efectiva, como se manifestó en el apartado 1.3.6.
- ✓ En el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas efectuado por duplicado se han identificado hidrocarburos solamente en una muestra de suelo I. No obstante, en un análisis posterior del mismo suelo no se encontró restos de hidrocarburos. Esto nos lleva a la posible existencia de zonas donde ha habido un vertido anterior junto con zonas donde no ha llegado el vertido. En todo caso nada de esto supone que el suelo I haya estado afectado por un vertido importante que genere diferencias significativas en su comportamiento.
- ✓ La diferencia textural entre los suelos I y II se la puede observar en la Figura 2.1 donde se representa su posición en el diagrama textural. Los análisis texturales los realizó el laboratorio de Análisis Agrícola INEA, que cuenta con acreditación ENAC, mediante método de densidad de Bouyoucos y cuyo resumen se puede observar en la Tabla 2.1. Se observa que el suelo I (S1) es claramente “franco-arcillo-arenoso” mientras que el suelo (S2) está justo en el límite entre “arcillo-arenoso” y “franco-arcillo-arenoso”; Por lo tanto, se ha clasificado a **S1** como “**franco-arcillo-arenoso**” y a **S2** como “**arcillo-arenoso**”. el suelo II cuenta con mayor proporción de arcilla y de materia orgánica, con lo que es probable que muestre superior capacidad de adsorción de los hidrocarburos y por tanto mayores dificultades en su tratamiento (impermeabilidad, dificultad de circulación de nutrientes) (Amellal, et al., 2001).

Tabla 2.1. Resultados análisis del suelo

Granulometría	Suelo I	Suelo II
Limo	23	15
Arena	50	50
Arcilla	27	35
Materia Orgánica	0,26	1,28
Nitrógeno Total	0,03	0,08
Relación C/N	5,4	9,4
Fosforo	<2,6	4

Figura 2.1. Representación de suelos en diagrama textural

2.2 Caracterización del Gasóleo

Para la realización del experimento se ha seleccionado, como contaminante, gasóleo, ya que este producto tiene grandes probabilidades de derrames debido a su gran utilización en estaciones de servicio.

Se calibró el GC-MS para cuantificar TPHs (Total de Hidrocarburos del Petróleo). Para ello se siguieron las recomendaciones del método 8015 de la EPA. Dichas recomendaciones indican utilizar un producto lo más similar posible al original. Por lo tanto, se procedió a realizar la calibración correspondiente con el mismo producto que se vertió en las parcelas.

En la Figura 2.2 se presenta un cromatograma del gasóleo en cuestión, en el que se observan la fracción C_{10} a la C_{30} , en la que destaca la abundancia de alcanos lineales ligeros. Si extraemos

de este cromatograma el ion 57 (ver Figura 2.3), característico de los alcanos lineales, se puede observar su gran abundancia y que la relación de áreas octadecano/fitano es de 1.32.

Figura 2.2. Cromatograma total del gasóleo empleado en el landfarming

Figura 2.3. Ion 57 del gasóleo empleado en el landfarming

2.3 Caracterización de Nutrientes y Surfactantes

Fertilizante Oleofílico

El fertilizante oleofílico (S200) es un producto de aceleración de la biorremediación usado para la remediación de vertidos de hidrocarburos. No es intrusivo con el medio ambiente

donde se aplica y tiene una relación coste-efectividad de la limpieza de los hidrocarburos bastante buena. Este producto es usado para limpiar en, entre otros, los hidrocarburos y sus derivados como: diesel, fuel para aviones, keroseno, aceites lubricantes, aceites crudos.

Se trata de un producto bioestimulante que utiliza bacterias autóctonas, es decir no aplica ningún microorganismo exógeno. Es un fertilizante que favorece el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos. El aspecto del S200 es el de un líquido claro de color ámbar tal que puede ser rociado o pulverizado mediante el tradicional equipo pulverizador de líquidos. El ratio de aplicación recomendado es aproximadamente del 10 % en peso de S200 en comparación con el hidrocarburo que quiere ser eliminado mediante este sistema. En otras palabras, utilizamos 1 gramo de S200 por cada 10 gramos de hidrocarburo que pretendemos eliminar o biodegradar.

Los fertilizantes oleofílicos, en general, tienen la propiedad de mostrar gran afinidad por los hidrocarburos (se quedan adheridos), puesto que sus componentes, principalmente los ácidos grasos tales como el ácido oleico, los dotan de esta propiedad. El producto permanece adherido al fuel (a las rocas o al suelo) pese a las lluvias y las mareas (según sea el caso).

El funcionamiento del S200 consiste en adherirse al fuel y los ácidos grasos servirán como aperitivo de las bacterias degradadoras de hidrocarburos de modo que se produce una proliferación de las mismas. Una vez que se ha degradado la capa externa, existe una gran cantidad de nutrientes mezclados con el fuel y (en teoría) de muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos. Luego, debido a que en su composición también tiene sustancias utilizadas como surfactantes (principalmente éteres glicol) aumentaría la superficie de contacto entre las bacterias y el hidrocarburo en presencia de agua. En definitiva, cuando el producto es pulverizado sobre la zona contaminada, éste se adhiere al fuel, crea una microemulsión y estimula el crecimiento de las bacterias.

Para caracterizar completamente al fertilizante oleofílico S200 se procedió a analizarlo mediante cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), tomándose 0.5 ml de S200 disueltos en 5 ml de diclorometano. Se agitó y se inyectaron 0.2 µl en el GC-MS.

En resumen se puede decir que el fertilizante oleofílico S200 está compuesto en su gran mayoría por ácidos grasos y éteres glycol (sustancias utilizadas como surfactantes) que le dan las propiedades antes mencionadas. Como se puede ver en la Figura 2.4 los picos del

cromatograma marcados con el número 1 son los éteres glicoles (sustancias surfactantes) y los marcados con el número 2 son ácidos grasos, que le dan el carácter olefílico al fertilizante.

Figura 2.4. Cromatograma del S200

Fertilizante de liberación lenta

El fertilizante de liberación lenta que se utilizó en los experimentos fue el Sierrablen 31-5-7 que está formado por gránulos de una doble capa de úrea-fertilizante con una lámina de sulfuro y otra de polímero, mezclado con fósforo y potasio. Los aspectos que más destacan de este producto son:

- ✓ Se extiende con facilidad
- ✓ Completamente libre de polvo
- ✓ Tamaño de grano constante, no se forman pegotes.
- ✓ Nutriente constante que se libera en un largo periodo de tiempo que puede fluctuar de entre 2 y 3 meses (60 y 90 días)

Cuando el producto se extiende, necesita agua para que esta penetre a través de la capa hacia el centro de los nutrientes, los disuelve y la capa libera el contenido en un ratio determinado dependiendo de la temperatura. Una vez que los gránulos estén vacíos la capa de material está totalmente degradada.

La composición del fertilizante de liberación lenta es:

- ✓ 31% de Nitrógeno total a su vez formado por:

- 1.7% de nitrato de amonio
- 29.3% de nitrato de carbamida, del cual el 63% está en capa.
- ✓ 5% de Iones Fosfato (P_2O_5) formado por citrato de amonio neutro y soluble en agua. El 4.5% soluble en agua.
- ✓ 7% de Oxido de Potasio (K_2O), soluble en agua.
- ✓ 7% de Trióxido de Azufre (SO_3), soluble en agua.

Esta es la composición que normalmente se suele conocer mediante una simplificación (31:5:7, N:P:K).

Este producto se eligió debido a que existen otros productos de características similares en el mercado tales como las sales de laboratorio y fertilizantes líquidos pero cuyo coste es muy superior al del fertilizante de liberación lenta en gránulo. Además, este fertilizante nos proporciona la relación adecuada de nutrientes para un tratamiento de bioestimulación.

Surfactante

El surfactante utilizado en el experimento es Bioversal un producto totalmente biológico para la eliminación de los hidrocarburos. La empresa distribuidora lo describe como un producto eliminador de aceites concentrados, líquido, que puede ser mezclado sin límite con agua, pH neutro, protege el medio ambiente, dermatológicamente inofensivo, la descomposición biológica es muy sencilla y sus principales aplicaciones son las de eliminación de residuos de aceites e hidrocarburos.

Para aplicar el producto es necesario diluirlo en agua. El fabricante da una serie de ratios de dilución del producto con agua:

- ✓ Normal: ratios de 1:25 a 1:50
- ✓ Técnicas con alta presión: ratios de 1:100 a 1:200
- ✓ Aceites en el agua: ratios de 1:100 a 1:200

Para saber su composición se tomó medio mililitro de Bioversal y se disolvió en 5 ml de diclorometano (no muy soluble). Se agitó y se analizaron 0,2 microlitros mediante GC-MS.

Siguiendo el mismo procedimiento, realizado con el fertilizante oleofílico, algunos de los se muestra el cromatograma obtenido en la Figura I.9.

Figura 2.5. Cromatograma del surfactante

Todos los compuestos identificados, al hacer el análisis por GC/MS, son compuestos que se comercializan en el mercado como surfactantes y que ninguno de ellos tiene propiedades que afecten al medio ambiente.

2.4 Diseño de experimentos

Una vez descritos las características de los elementos que vamos a utilizar (tipos de suelos apartado 2.1, gasóleo como contaminante apartado 2.2 y los nutrientes y surfactante apartado 2.3) se realizó el diseño de experimentos equilibrado considerando cinco factores con dos niveles cada uno. Los factores que se han tomado en cuenta para el análisis son los siguientes:

6. **Tipo de suelo:** suelo I y suelo II.
7. **Concentración de gasóleo:** 10.000 y 20.000 ppm.
8. **Fertilizante de liberación lenta:** Si y No (abreviado, de aquí en adelante, "FL").
9. **Fertilizante oleofílico:** Si y No (abreviado, de aquí en adelante, "FF")
10. **Surfactante:** Si y No (abreviado, de aquí en adelante, "S")

El resultado sería de $2^5 = 32$ experimentos que quedan reducidos a 24 al no realizarse los ensayos correspondientes a la adición conjunta de los dos tipos de fertilizante por considerarse un absurdo desde el punto de vista operacional. Se excluyeron por lo tanto los ensayos (FL+FF) y (FL+FF+S) para los dos suelos y para las dos concentraciones de

contaminante; en total $2^3 = 8$ ensayos que se descuentan de los 32. A pesar de no incluir estos 8 ensayos, el experimento se puede considerar como equilibrado.

El diseño final ha sido de 48 experimentos (parcelas de 4 m x 4 m de superficie y 30 cm de profundidad), y que todas las experiencias se realicen por duplicado, esto queda resumido en la Tabla 2.2 que se muestra a continuación, donde además se puede observar el número de parcela que le hemos asignado a cada una de ellas.

Tabla 2.2. Esquema del diseño de experimentos

Suelo I								Suelo II								Trat.
10000 ppm				20000 ppm				10000 ppm				20000 ppm				
FL	FF	S	NP	FL	FF	S	NP	FL	FF	S	NP	FL	FF	S	NP	
			1				3				5				7	C
			2				4				6				8	
SI			9	SI			11	SI			13	SI			15	FL
			10				12				14				16	
SI		SI	17	SI		SI	19	SI		SI	21	SI		SI	23	FL+S
			18				20				22				24	
		SI	25			SI	27			SI	29			SI	31	S
			26				28				30				32	
	SI	SI	33		SI	SI	35		SI	SI	37		SI	SI	39	FF+S
			34				36				38				40	
	SI		41		SI		43		SI		45		SI		47	FF
			42				44				46				48	

Los parámetros que mostramos a continuación son los que hemos controlado a lo largo del experimento. Dentro de ellos los parámetros biológicos y químicos son los que se han tomado en cuenta para realizar el diseño de muestreo que se detalla más adelante (apartado 2.5).

Parámetros Biológicos:

- Conteo de bacterias heterótrofas (**BH**)
- Conteo de bacterias degradadoras de hidrocarburos (**BD**)
- Actividad de la deshidrogenasa (**AD**)
- Producción de CO_2 (**CO2**)

Parámetros químicos:

- Contenido total en hidrocarburos de petróleo (**TPH**)

- Relación C18/Fitano (**C18/F**)
- Relación C16/norPristano (**C16/Npr**)
- Mezcla compleja sin resolver (**UCM**) (La proporción del área de los cromatogramas sin resolver en picos)

Parámetros de operación:

- Humedad del suelo (**HUM**)
- Tiempo
 - Tiempo desde el inicio del experimento
 - Tiempo transcurrido desde la última adición de productos
 - Tiempo transcurrido desde la última aireación
- Temperatura
 - Temperatura media
 - Temperatura mínima
 - Temperatura mínima en el suelo a 5 cm de profundidad

2.5 Diseño de muestreo

Es necesario diseñar una metodología de muestreo que nos permita conocer y controlar la representatividad de los resultados analíticos que se obtengan. Esta representatividad será función, no sólo de los protocolos de preparación y de análisis de las muestras, sino, fundamentalmente, del diseño del muestreo (Wilson, 1964; Visman, 1969; Gy, 1974; Gy, 1979; Stanley, 2003). A fin de asegurar el conocimiento de la precisión de los resultados y de poder modificarla, la campaña de muestreo se debe planificar en dos etapas:

1. Una etapa piloto, en un número limitado de unidades de control. En nuestro caso, la unidad de control que a su vez es el soporte de la muestra es la parcela (con una superficie de 4 m x 4 m y una profundidad de 30 cm). De esta etapa se obtendrá la determinación de la masa de cada incremento muestral y el número de incrementos muestrales que se deben recoger en cada parcela.
2. La campaña de detalle, diseñada para una varianza y precisión aceptadas para cada uno de los parámetros.

En la estimación, del valor medio de cada una de las variables de interés en la zona de trabajo, se parte del hecho de que cometeremos errores en el muestreo, debido a que sólo se incluyan

en cada muestra una porción del total de unidades muestrales que constituyen la población de estudio (representatividad de la muestra), así como, de otro tipo de errores provenientes de las operaciones necesarias para averiguar el valor de magnitud que se investiga en la muestra recogida (tratamiento) (Visman, 1969; Gy, 1979; Stanley, 2003). De este modo, son inevitables los errores atribuibles al procedimiento de la toma de muestras en campo, al modo de almacenamiento de las muestras, al tipo de preparación física y química de la misma en el laboratorio, y al método y equipo de análisis o medida empleado (método de muestreo en el campo, manipulación en el laboratorio y técnica analítica utilizada).

Por otro lado, se entiende que las diferentes parcelas, al estar homogeneizadas van a presentar una baja heterogeneidad, en cuanto a la variabilidad de las concentraciones elementales dentro de ellas. Por ello, se considera suficiente la realización del muestreo piloto en una única parcela.

La metodología de Visman (Visman, 1969), desarrollada para el muestreo de graneles en actividades mineras y mineralúrgicas, incorpora en su formulación el problema de la indefinición del soporte para la unidad muestral y el efecto que el tamaño de la misma tiene sobre la precisión de las estimaciones que se realicen, sobre todo en investigaciones de materiales granulados (suelos, partículas en suspensión, etc.), por lo que resulta de especial utilidad en estudios de suelos. Esta metodología de muestreo se desarrolla a partir de la propiedad de aditividad de las varianzas. Considera que la varianza total del estimador, de la media de la concentración química elemental, en una unidad de superficie o de volumen, puede descomponerse en la suma de cuatro términos: Varianza de composición, Varianza de distribución, Varianza de preparación y Varianza de análisis.

La metodología de Visman (1969) se formula de la siguiente manera:

Ecuación 2.1

$$Var_{TOTAL}(\bar{X}) = \frac{Var_{COMP}}{m \times n} + \frac{Var_{DIST}}{N} + Var_{PREP} + Var_A$$

Dónde:

$Var_{TOTAL}(X)$:	Varianza total del estimador de la concentración
Var_{COMP} :	Estimación de la varianza de composición de la unidad de masa
Var_{DIST} :	Estimación de la varianza de distribución
Var_{PREP} :	Varianza de preparación.
Var_A :	Varianza de análisis

m : Masa del incremento muestral
 n : Numero de incrementos

El parámetro varianza de composición (Var_{COMP}), mide la heterogeneidad o variabilidad de los resultados, que se produce como consecuencia de diferencias de composición entre partículas. Se refiere a micropropiedades o propiedades de las distintas partículas consideradas individualmente.

La varianza de distribución (Var_{DIST}) mide la contribución a la varianza total, asignable al hecho de que los incrementos muestrales, están tomados en distintos puntos de un terreno, en el que existe segregación espacial de las concentraciones de los elementos y compuestos de interés.

De acuerdo a la formulación de Visman (Visman, 1969), los términos de var_{COMP} y var_{DIST} , pueden ser estimados a partir de los resultados obtenidos de un estudio piloto, realizado en una o en varias de las unidades de cartografía (en nuestro caso parcelas) en que previamente se ha dividido la zona sometida a investigación. Dentro de esta cuadrícula se lleva a cabo una toma de muestras en un número limitado de puntos. En cada una de estos puntos, se recogen dos incrementos muestrales, uno (grande denominado m_G) de peso considerablemente superior al otro (pequeño denominado m_p), procurando que el incremento pequeño sea de un tamaño suficiente como para que en él estén representados todos los tipos diferentes de partículas. A partir de estas dos series de incrementos muestrales grandes y pequeños, se pueden estimar las varianzas de composición y distribución mediante las expresiones:

Ecuación 2.2

$$Var_{COMP} = \frac{m_p \times m_G \times (Var_p - Var_G)}{m_G - m_p}$$

Ecuación 2.3

$$Var_{DIST} = Var_G - \frac{m_p \times (Var_p - Var_G)}{m_G - m_p}$$

Dónde:

Var_{COMP} : Estimación de la varianza de composición de la unidad de masa
 Var_{DIST} : Estimación de la varianza de distribución
 Var_p : Estimación de la varianza de la serie de incrementos muestrales pequeños

Var_G :	Estimación de la varianza de la serie de incrementos muestrales grandes.
m_p :	Peso medio de la serie de incrementos muestrales pequeños.
m_G :	Peso medio de la serie de incrementos muestrales grandes.

Las varianzas de preparación y análisis son las generadas en el laboratorio. La varianza de preparación cuantifica la contribución a la varianza total, del error que se comete en todos aquellos factores que intervienen en el proceso de transformar la muestra que llega al laboratorio, en una muestra de análisis. La varianza de análisis cuantifica la contribución que supone a la varianza total, la aportada por el método de análisis utilizado, y se estima a partir de la repetición, independiente, de la medida analítica de una misma muestra. Esta estimación es proporcionada, generalmente, por el propio equipo de análisis.

Si se esperase una gran heterogeneidad, se plantearía el problema de decidir qué estudio piloto se ha de realizar, y cuyas conclusiones sirvan para diseñar el muestreo definitivo. Una primera opción, consistiría en dividir la zona de estudio en los distintos sectores (estratos) homogéneos presentes, realizar un estudio piloto en cada uno de ellos y aplicar los resultados obtenidos a las cuadrículas identificadas que componen el estrato correspondiente. Pero, como ya ha quedado dicho, en nuestro caso al tratarse de parcelas preparadas de forma similar, se espera que la heterogeneidad sea baja y por lo tanto no se plantea este problema. No obstante, a lo largo del experimento, en algunas parcelas especialmente aquellas a las que se haya adicionado surfactantes, cabe esperar que se produzca algún tipo de segregación en vertical. En ese caso, si se observasen indicios de ese comportamiento, se procedería a definir dos estratos (los 15 cm superiores y los 15 cm inferiores) en los que se muestrearía independientemente aplicando la misma metodología general que se implemente como consecuencia el muestreo piloto.

En la cuadrícula piloto, única en nuestro caso, determinaremos las varianzas de Composición, de Distribución y de Preparación y Análisis para cada elemento analizado. Viendo cómo evoluciona la varianza total para el estimador medio en función del número de incrementos muestrales (n) y de la masa (m) de cada incremento muestral que se tome en cada cuadrícula. A partir de estos resultados y de la precisión que se desee para los diferentes parámetros de control, se diseñará la metodología definitiva de muestreo.

Para diseñar la “campaña de detalle”, y conocer a priori la bonanza de los resultados que esperamos obtener, estimaremos la varianza y la precisión que obtendríamos para el estimador de la media de cada parámetro analizado (descritos en el apartado anterior), en

función del número de incrementos muestrales tomados en la cuadrícula y la masa de los mismos. Para el diseño se trata de llegar a un compromiso priorizando aquellos parámetros de mayor interés en el estudio.

Una vez preparada la parcela piloto, se realiza la campaña de recogida de muestras con el siguiente criterio: cada cuadrícula, con una superficie de 16 m², se subdivide en 9 subcuadrículas cuadradas de 1.33 m de lado, numeradas a su vez del 1 al 9 de forma correlativa (ver Figura 2.6), empezando por el vértice superior izquierdo. En cada subcuadrícula se toma una muestra, con el objetivo de cubrir toda la superficie de la parcela. La posición de la muestra, dentro de cada subcuadrícula, se determina aleatoriamente; para ello se generan 2 números aleatorios, uno para las coordenadas en X y otro para las coordenadas en Y (comprendidos entre 0 y 1.33), que indican las coordenadas del punto de muestreo. En la Tabla 2.3 se dan los resultados (tomando como el punto de origen la esquina inferior izquierda), si bien, en el momento del muestro se repite la generación de números aleatorios, para que no fuesen conocidos “a priori”, se presenta una hoja de Excel muy simple que permite realizar el proceso automáticamente para cada parcela.

Figura 2.6. Subcuadrículas de la parcela

Diseñada la retícula de muestreo para la parcela piloto, contaminada con una concentración de 20000 ppm y bien homogenizada, se plantea la recogida de muestras según la metodología de Visman (Visman, 1969) de la siguiente forma: En cada punto se toman dos muestras, una pequeña de unos 500-600 gramos de masa (la que se obtenga al muestrear 1 vez con el tomamuestras los 30 cm de profundidad del suelo) y otra grande de unos 1000-1200 gramos de masa (la que se obtenga al muestrear 2 veces con el tomamuestras los 30 cm de profundidad del suelo).

La recogida de las muestras se realiza con un tomamuestras de tornillo “Auger” de cuchillas enfrentadas.

Tabla 2.3. Coordenadas de muestreo piloto

Subcuadrícula	X punto muestreo	Y punto muestreo
1	0.38	3.87
2	2.11	2.90
3	3.57	3.66
4	0.99	1.95
5	1.59	2.41
6	3.86	2.37
7	1.16	1.26
8	2.47	0.01
9	3.45	0.18

Vale recalcar que la homogenización de la parcela piloto era exageradamente buena, lo que podría conducirnos a resultados de estimaciones de las varianzas subdimensionadas. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar una fotografía de la arcela piloto con los puntos aleatorios donde se tomaron las muestras y el instrumento utilizado para realizar la toma de muestras.

Figura 2.7. Parcela Piloto

Las muestras una vez en el laboratorio se las somete a una preparación física (descrita en el apartado 2.6 Preparación de Muestras) y química (descritas en los apartados 2.8 Extracción del

gasóleo y 2.9 Análisis químico mediante GC-MS) para adecuarlas a cada una de las técnicas de análisis.

Con las fórmulas de Visman, que se pueden ver en las ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3, se calcula la estimación de las varianzas de composición y distribución, y con estas dos varianzas calculamos la varianza total del estimador de la media de la concentración, finalmente con este valor se realiza el gráfico de la varianza total del estimador de la media de las concentraciones de TPH frente al número de **incrementos** (número de puntos de donde se tomarán las muestras) para diferentes **tamaños de muestra** (peso en gramos de la muestra). Los resultados predominantes de los parámetros de estudio, en este muestreo piloto, han sido los presentados en el procedimiento de obtención de la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo por esta razón vamos a presentar, en la Figura 2.8 y en la Tabla 2.4, los resultados obtenidos de la estimación de la varianza total de la media de la concentración de hidrocarburos. El estudio ha sido hecho para 10 incrementos y para 4 tamaños de muestra diferentes 225, 450, 900 y 1350 g.

Figura 2.8. Estimación de la varianza total con diferentes tamaños de muestra

Observando la Figura 2.8 y la Tabla 2.4, buscando la mayor optimización de tiempo y recursos y que estamos dispuestos a cometer unos errores con una desviación 1000 a 1500 ppm, se ha comparado las estimaciones de las desviaciones de la concentración entre las masas de 900g y

1350g. Como se puede notar, no existe una diferencia significativa en tomar 3 incrementos, de masa 1350 g, y 4 incrementos, de masa 900 g (las dos celdas sombreadas con color naranja en la Tabla 2.4). Debido al peso de cualquiera de las dos opciones se toma la decisión de hacer la primera división de la muestra en el campo y además la de muestrear tres puntos de la parcela con masa 1350 g en cada uno de ellos ya que a priori esta decisión haría que tardemos menos tiempo en muestrear las 48 parcelas que constituyen el experimento.

Tabla 2.4. Estimación de varianza y desviación total

		Estimación de Varianza Total				Estimación de la Desviación total			
		Tamaño de Muestra (g)				Tamaño de Muestra (g)			
		225	450	900	1350	225	450	900	1350
Incrementos	1	15804066	8629867	5042767	3847068	3975	2938	2246	1961
	2	7902033	4314933	2521384	1923534	2811	2077	1588	1387
	3	5268022	2876622	1680922	1282356	2295	1696	1297	1132
	4	3951016	2157467	1260692	961767	1988	1469	1123	981
	5	3160813	1725973	1008553	769414	1778	1314	1004	877
	6	2634011	1438311	840461	641178	1623	1199	917	801
	7	2257724	1232838	720395	549581	1503	1110	849	741
	8	1975508	1078733	630346	480883	1406	1039	794	693
	9	1756007	958874	560307	427452	1325	979	749	654
	10	1580407	862987	504277	384707	1257	929	710	620

2.6 Preparación del experimento

2.6.1 Preparación del terreno

En marzo del año 2006 se pusieron en marcha un total de 48 parcelas y 24 microcosmos destinados a realizar las experiencias con los parámetros mencionados en los apartados anteriores de este capítulo.

Las parcelas tienen 4 x 4 metros con una profundidad aproximada de 30 cm de suelo constituyendo un volumen aproximado de 4,8 m³ de tierra y un peso aproximado¹ de 7 t.

Una vez dispuestas las parcelas, como se puede observar en la Figura 2.9, con la numeración correspondiente y el tratamiento realizado y en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, fotografías de los trabajos de mezclado y vertido del gasoil y los nutrientes, el día 13 de Marzo se efectuó la aplicación y el subsiguiente mezclado del gasoil con las tierras de ambos suelos, se utilizaron 200 l de gasoil en las parcelas de 20.000 ppm y 100 l en las de 10.000 ppm. Inicialmente se sobrevaloró la densidad de los suelos fijándose en unas 10 t el

peso total. Esta cuestión, así como diferencias de granulometría entre la parcela piloto que se empleó para diseñar el muestreo y las reales, hacen que en realidad los contenidos iniciales de TPH sean casi el doble de los previstos, aunque no obstante seguiremos manejando la denominación de 10.000 y 20.000 ppm durante toda la redacción.

C	FL	FL/S	S	FF/S	FF		
1	9	17	25	33	41	10000 PPM	SUELO I
2	10	18	26	34	42		
3	11	19	27	35	43	20000 PPM	
4	12	20	28	36	44		
5	13	21	29	37	45	10000 PPM	SUELO II
6	14	22	30	38	46		
7	15	23	31	39	47	20000 PPM	
8	16	24	32	40	48		

Figura 2.9. Esquema configuración parcelas

Por tanto, y en síntesis, para los dos tipos de suelo y cada nivel contaminante (10.000 y 20.000 ppm de gasoil) se prepararon 2 parcelas y 1 microcosmos según la siguiente distribución:

- Control (C)
- Fertilizante de liberación lenta Sierrablen (FL)
- Fertilizante oleofílico S200 (FF)
- Surfactante Bioversal (S)
- Fertilizante de Liberación Lenta más surfactante (FF+S)
- Fertilizante oleofílico + Surfactante (FF/S)

Figura 2.10. Adición de gasóleo y nutrientes

2.6.2 Dosificación de nutrientes y frecuencia de actividades

Las dosificaciones de nutrientes y surfactante se han realizado en fechas 15 de Marzo, 11 de Mayo y 5 de Julio con las cantidades mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 2.5. Cantidad y fechas de dosificaciones de nutrientes

Nutrientes	Dos. 1: 15/03/2006		Dos. 2: 11/05/2006		Dos. 3: 05/07/2006		TOTAL	
	10000	20000	10000	20000	10000	20000	10000	20000
FL	6 kg	12 kg	-	-	6 kg	12 kg	12 kg	24 kg
S	0,25 L	0,5 L	0,15 L	0,3 L	0,15 L	0,3 L	0,55 L	1,1 L
FF	1 L	2 L	0,5 L	1 L	0,5 L	1 L	2 L	4 L

Se debe mencionar que en las parcelas en donde se utilizaron los fertilizantes con los surfactantes, como es caso de las parcelas con FL+S y FF+S, las dosis fueron aditivas, es decir,

por ejemplo en la primera dosificación en las parcelas de 10000 ppm se añadió 6 kg de FL + 0,25 L de S.

Toma de muestras

La fechas en las cuales se realizaron los muestreos, en las diferentes parcelas, son las siguientes:

- 17 de Marzo: 10.000 y 20.000 ppm.
- 18 de Abril: 10.000 y 20.000 ppm.
- 16 de Mayo: 10.000 ppm.
- 20 de Junio: 10.000 y 20.000 ppm.
- 25 de Julio: 20.000 ppm.
- 19 de Septiembre: 10.000 y 20.000 ppm.
- 23 de Noviembre: 10.000 y 20.000 ppm.
- 6 de Febrero: 10.000 y 20.000 ppm

Aireación de parcelas

La aireación de las parcelas que consiste en remover manualmente, con el objetivo principal de aumentar el intercambio de oxígeno y de homogenizar el suelo fueron realizadas en las fechas señaladas a continuación:

- Marzo: días 15-16-17 y 18
- Abril: días 3 y 20
- Mayo: días 5 y 20
- Junio: días 6 y 23
- Julio: días 7 y 24
- Agosto: días 7 y 22
- Septiembre: días 4 y 25
- Octubre: no se aireó (lluvias)
- Noviembre: día 15

Riegos

Debido a la importancia de mantener la humedad del suelo con el objetivo de que los índices de biodegradación estén en unos niveles aceptables se procedió a realizar riegos periódicos como se muestra a continuación:

- Primer riego el 16 de marzo; desde entonces y hasta el 1 de julio un riego semanal excepto en semanas de lluvia.
- 1 – 10 de julio dos riegos semanales
- 10 de julio- 30 agosto cinco riegos semanales (salvo tormentas)
- Desde el 30 de agosto hasta Octubre 3 riegos semanales: lunes, miércoles y viernes (salvo lluvias, aireación o muestreo)

Desde Octubre hasta el momento del último muestreo no se regó (debido principalmente a las precipitaciones en las que se produjo una saturación por lluvias)

2.6.3 Balance de masa del Carbono y del Nitrógeno

Según las dosificaciones, mostradas en Tabla 2.5, los datos disponibles del análisis agronómico inicial (apartado 2.1), y la cantidad de gasóleo añadido, se puede establecer el siguiente balance:

Carbono

- Suelo I:
 - 11,2 kg de C. orgánico inicialmente por parcela.
 - 85,0 kg de C. orgánico añadidos (gasoil) en parcelas de 10.000 ppm
 - 170,0 kg de C. orgánico añadidos en parcelas de 20.000 ppm
 - 0,8 kg de C. org. añadido con el fertilizante oleofíclio S200 en parcelas de 10.000 ppm
 - 1,6 kg de C. org. añadido con el fertilizante oleofíclio S200 en parcelas de 20.000 ppm

Suponiendo que el 40% del S-200 fuera C. org. y que en los demás productos es despreciable la cantidad de C orgánico.

- Suelo II:
 - 52,5 kg de C. orgánico inicialmente por parcela.
 - 85,0 kg de C. orgánico añadidos en parcelas de 10.000 ppm

- 170,0 kg de C. orgánico añadidos en parcelas de 20.000 ppm
- 0,8 kg de C. orgánico añadido con el fertilizante oleofílico S200 en parcelas de 10.000 ppm
- 1,6 kg de C. orgánico añadido con el fertilizante oleofílico S200 en parcelas de 20.000 ppm

Suponiendo que el 40% del fertilizante oleofílico S200 fuera C. org. y que en los demás productos es despreciable la cantidad de C orgánico.

Nitrógeno

- Suelo I:
 - 0,21 kg de N inicialmente por parcela.
 - 3,72 kg de N añadido en el FL en parcelas de 10.000 ppm
 - 7,44 kg de N añadido con el FL en parcelas de 20.000 ppm
 - 0,3 kg de N añadido con el S200 en parcelas de 10.000 ppm
 - 0,6 kg de N añadido con el S200 en parcelas de 20.000 ppm
 - Suponiendo que el 15% del S200 fuera nitrógeno y que en el surfactante es despreciable la cantidad de nitrógeno.
- Suelo II:
 - 0,56 kg de N inicialmente por parcela.
 - 3,72 kg de N añadido con el FL en parcelas de 10.000 ppm
 - 7,44 kg de N añadido con el FL en parcelas de 20.000 ppm
 - 0,3 kg de N añadido con el S200 en parcelas de 10.000 ppm
 - 0,6 kg de N añadido con el S200 en parcelas de 20.000 ppm
 - Suponiendo que el 15% del S200 fuera nitrógeno y que en el surfactante es despreciable la cantidad de nitrógeno.

2.7 Preparación de muestras

El procedimiento que se ha seguido una vez llegada la muestra al laboratorio es:

- En el caso que el contenido de humedad sea excesivo (mayor a 30%), se deja secando al aire un par de días con el objetivo de tener una extracción más eficiente, debido a la inmiscibilidad del diclorometano (disolvente utilizado para la extracción) con el agua.

- La muestra que se obtiene en campo, que luego es enviada al laboratorio, es demasiado grande (del orden de 1 a 1.5 kg) para la cantidad necesaria para la extracción. Por lo que lo primero que se realiza es una reducción del tamaño de la muestra. Para ello, se procede de la siguiente manera:
 - Se machaca la muestra (se machaca tanto para que entre por las rejillas del instrumento que se emplea para cuartear como para que sea más fácil su manipulación en el momento de la extracción).
 - Se cuartea la muestra, para lo cual se utiliza un instrumento con rejillas que divide la muestra en dos partes iguales (teóricamente), que se la puede observar en ver , colocándola en dos compartimentos diferentes. Este cuarteo se lo realiza hasta obtener una muestra de entre 100 a 150 gramos.

Figura 2.11. Cuarteador de las muestras de suelo

- Se tritura, nuevamente, la muestra, hasta alcanzar que todos los pegotes que no se han podido quitar del triturado anterior se deshagan, con el objetivo de obtener una mayor superficie de contacto entre la muestra y los disolventes que van a extraer los compuestos.
- Se pesa 10 g de la muestra triturada, que es la cantidad de muestra para la que está fabricado el cartucho donde se coloca el suelo para su respectiva extracción.

- Con la misma cantidad de muestra (10 g de suelo) aproximadamente, se calcula su peso en seco, metiéndola en la estufa durante 12 horas a 110°C y pesándolo antes y después de ser introducido a la estufa. Hay que tener en cuenta que esta muestra no se va a extraer dado que junto con el agua también se han perdido aquellos compuestos cuya temperatura de vaporización sea inferior a 110°C.

2.8 Extracción del Gasóleo del suelo

El montaje del sistema para la realización de la extracción consta de los siguientes elementos:

1. Agitador magnético
2. Manta calefactora con regulador de potencia (mantiene la temperatura constante).
3. Matraz de vidrio (50 ml)
4. Soxhlet (50 ml)
5. Refrigerante de columna

Una vez cuarteada y triturada la muestra se realizan los siguientes pasos, basados en el método 3540C de la EPA, propuesto para extracción de compuestos no volátiles y semivolátiles en suelos (EPA, 1996):

- Se introduce 10 g de la muestra de suelo en el cartucho de extracción que, a su vez, se introduce en un soxhlet.
- Se colocan los matraces en las mantas calefactoras con el disolvente, que en nuestro caso es diclorometano (con el que se van a extraer los compuestos orgánicos de la muestra), en una cantidad tal que rellenen algo más de un volumen y medio de los soxhlet. Dentro de cada matraz se introduce un imán para que agite la disolución por medio del agitador magnético, uniendo los matraces a los Soxhlet. Debajo del matraz se coloca una manta calefactora que va a hacer que el disolvente se evapore. La temperatura de las mantas se regula a 60-70 °C con potenciómetros. El montaje así dispuesto se conecta a la red eléctrica y de agua dejándolo operar durante 24 horas. Todo el sistema se lo puede observar en la Figura 2.12
- Durante este tiempo, los vapores de disolvente irán subiendo hasta la zona de refrigeración, donde condensarán y caerán en el interior de los cartuchos, donde se encuentra la muestra, arrastrando los compuestos que nos interesan al matraz. Esta operación se repite una y otra vez, quedando la disolución del matraz más y más cargada con los compuestos de nuestra muestra.

- Transcurridas las 24 horas se corta la corriente de las mantas y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Figura 2.12. Extracción por soxhlet

- Una vez fríos los matraces se desmonta el sistema dejando los cartuchos en vasos de precipitados para su secado en vitrina y eliminación del diclorometano.
- El extracto así obtenido en los matraces, se concentra hasta un volumen final de 1 mL usando un rotavapor. En el rotavapor, el matraz con el disolvente, que está girando a velocidad constante, se coloca en un baño de agua caliente (regulado a 50 °C que es la temperatura de evaporación del diclorometano). Al mismo tiempo se aplica un ligero vacío a la muestra. Tanto el vacío como el calor van a hacer que el disolvente se vaya evaporando. A medida que se evapora llega a una zona donde hay un refrigerante que hace que el disolvente condense y caiga en otro matraz. De tal manera, que en este otro matraz se va acumulando el disolvente supuestamente limpio y en el matraz original se va reduciendo el volumen del extracto hasta llegar a un volumen final de 1 mL.
- Del mililitro de disolución se sacan 500 microlitros y se guarda el resto de la muestra. Esos 500 microlitros se disuelven en 5 mL de diclorometano y de ahí se encapsula la

muestra (unos 200 microlitros) y se lleva al cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS).

- Finalmente se analizan 2 μL de muestra.

2.9 Análisis químico mediante GC-MS

2.9.1 Cuantificación de los Hidrocarburos Totales del petróleo (TPH)

Se calibró el GC-MS para cuantificar TPHs (Total de Hidrocarburos del Petróleo). Para ello se siguieron las recomendaciones del método 8015 de la EPA. Dichas recomendaciones indican utilizar un producto lo más similar posible al original. Por lo tanto, se procedió a realizar la calibración correspondiente con el mismo producto que se vertió en las parcelas.

El rango de calibración que se seleccionó fue de 500 a 20.000 ppm (seis patrones: 500, 1.000, 5.000, 10.000, 15.000 y 20.000 ppm). Se prepararon los viales con 1mL de disolución con cada una de estos patrones (concentraciones) realizándose, a partir de aquí, el mismo procedimiento que con el extracto de 1mL de disolución del suelo contaminado. Por lo tanto nuevamente se introdujo al GC-MS 2 μL de muestra.

Los 2 μL de las soluciones fueron inyectados en modo “splitless” a 275°C y en el puerto de inyección de un GC-MS Hewlett-Packard 6890-MSD 5973 usando un inyector automático. El sistema de GC-MS fue equipado con una columna capilar de 5% difenilpolidimetilsiloexano AT-5 de Altech (25m x 0.25mm x 0.20 μm). Se utilizó como gas transportador Helio en una columna de 4.0psi de presión. Los gradientes utilizados fueron los siguientes: 60°C (1min), calentamiento a 6.0°C/min hasta 300°C, 10min a 300°C y 15min una vez terminado.

2.9.2 Selección de indicadores de la biodegradación

2.10 Variables utilizadas en los modelos de predicción de TPH

Antes de comenzar a describir los modelos conviene definir los dos tipos de variables que se tendrán en cuenta en dichos modelos:

- **Variable controlada** – Variable cuyos valores han sido asignados previamente durante el diseño de los experimentos.

- **Variable cualitativa** – Es la variable controlada que puede tomar un número discreto de valores. A cada uno de estos valores se les denomina **niveles**. Por ejemplo, la variable tipo de suelo tiene dos niveles: suelo1 y suelo 2.
- **Variable continua** – Es la variable controlada que puede tomar cualquier valor dentro de un intervalo. Por ejemplo, el tiempo, que puede tomar cualquier valor en el caso que nos ocupa entre 0 y 389 días.
- **Variable no controlada** – Variable cuyos valores se van conociendo a medida que se realiza el experimento. Por ejemplo, el TPH o el número de bacterias heterótrofas o degradadoras.

Por ejemplo, comparar para un mismo suelo y una misma concentración las diferencias entre los distintos tratamientos (6 niveles o valores: C, FF, FL, FF+S, FL+S y S).

En concreto, se realizarán tres modelos para tratar de predecir el TPH:

- Un modelo que tendrá en cuenta todas las variables controladas (sin tener en cuenta ninguna de las variables no controladas a excepción del TPH). Con este modelo lo que pretendemos es observar cómo el TPH evoluciona en función del tiempo y ver cómo influyen las variables controladas en dicha evolución. Dentro de este modelo se realizará dos tipos de modelos uno **forzado** en el que todas las concentraciones iniciales, es decir a tiempo igual a cero para todos las parcelas y microcosmos, sean iguales, con esto lo que estamos buscando es ver el tratamiento que mejor ha funcionado a lo largo de toda la experiencia. El otro tipo de modelo es el **no forzado** en el que se intentará observar que tratamiento ha funcionado más eficazmente en las primeras campañas, es decir, el tratamiento que más ha hecho disminuir las concentraciones durante un corto periodo de tiempo a partir del comienzo de la experiencia. Además, se comparará el comportamiento de las concentraciones de los TPHs, para todos los casos de estudio, entre estos dos modelos.
- Un modelo que tendrá en cuenta todas las variables controladas y las variables no controladas de tipo químico más significativas (algunas de dichas variables no controladas no serán consideradas por el modelo por no ser significativas o porque la información que proporcionan está incluida en otra variable que, a su vez, explica mejor lo que está ocurriendo). Este modelo permitirá seleccionar las variables químicas (índices) que mejor explican la variación de los TPH en función del tiempo; es

decir cuáles son los índices que mejor permiten hacer un seguimiento de la biodegradación y predecir la evolución de los TPH en función del tiempo. Al igual que en el modelo anterior se realizarán los dos tipos de modelos **forzado** y **no forzado**, con el mismo objetivo buscado, para observar cuales son los tratamientos que mejor han funcionado tanto a largo como a corto plazo respectivamente.

- Un modelo que tendrá en cuenta todas las variables controladas y las variables no controladas de tipo biológico más significativas (al igual que pasaba con las no controladas de tipo químico, algunas de dichas variables no controladas no serán consideradas por el modelo por no ser significativas o porque la información que proporcionan está incluida en otra variable que, a su vez, explica mejor lo que está ocurriendo). Este modelo permitirá seleccionar las variables biológicas que mejor explican la variación de los TPH en función del tiempo; es decir cuáles son las variables que mejor permiten hacer un seguimiento de la biodegradación y predecir la evolución de los TPH en función del tiempo. Al igual que en los casos anteriores se realizarán los dos tipos de modelos **forzado** y **no forzado**, para ver la evolución a largo y corto plazo respectivamente y también una comparativa entre estos dos tipos de modelos.

A continuación se detallarán las **variables no controladas** que se han utilizado para realizar el estudio y la construcción de los modelos matemáticos. Como se indicó anteriormente, dependiendo del modelo se utilizarán unas u otras variables para tratar de predecir el valor de TPH en función de las mismas.

- Variables no controladas de tipo biológico:
 - **BH:** Bacterias Heterótrofas
 - **BD:** Bacterias Degradadoras
 - **CO₂:** Dióxido de carbono
 - **AD:** Actividad deshidrogenasa
- Variables no controladas de tipo químico:
 - **C18.F:** Relación entre el C18 y el Fitano
 - **C16.N:** Relación entre el C16 y el NorPristano
 - **P.A:** Relación entre el área de los picos y el área total, en el cromatograma resultante del análisis del extracto de los hidrocarburos contenidos en la muestra.

- **TPH:** Concentración de hidrocarburos en el suelo.

Las **variables controladas** que se han tomado en cuenta en todos los modelos son:

- **Tex:** En el caso de las muestras recogidas en las parcelas, es el tiempo que ha transcurrido desde que se aplicó el producto (diesel) hasta el momento de la extracción de los hidrocarburos de la muestra en laboratorio. En caso de los microcosmos es el tiempo de recogida de la muestra, dado que hay que tener en cuenta que estas muestras sí que se mantenían refrigeradas hasta el momento de la extracción debido a que su volumen era mucho menor. Esta variable toma valores dentro de un rango que va de 0 a 389 días.
- **ts:** Tipo de suelo con dos niveles (1 y 2) correspondientes respectivamente a los dos tipos de suelos utilizados en el estudio.
- **con:** Concentraciones teóricas iniciales, con dos niveles (10000 y 20000 ppm).
- **trat:** Tratamientos con los que se ha experimentado, con 6 niveles: “C” (de control), “FF” (S200), “FF/S” (S200 más surfactante), “FL” (fertilizante de liberación lenta), “FL/S” (fertilizante de liberación lenta más surfactante), “S”(surfactante).
- **np:** Esta variable fue introducida para diferenciar el comportamiento entre parcelas y microcosmos con dos niveles, asignándole el valor de 1 para parcelas y 2 para microcosmos.

Las variables controladas son importantes porque van a permitir:

- Compararlas entre sí; por ejemplo, ver las diferencias de comportamiento de los TPHs para el suelo I a 10.000 ppm y el suelo II a 10.000 ppm.
- Comparar los distintos niveles de una misma variable; por ejemplo, para el suelo I a 10.000 ppm ver cómo varían los TPHs en función de los distintos tratamientos.

Ver qué variables controladas influyen más en el comportamiento de los TPHs predicho por el modelo.

2.11 Datos utilizados en los modelos

Los datos que se han utilizado para la generación de los modelos se pueden observar en el anexo 1, que es una tabla que contiene un total de 13 columnas, en la que cada una de ellas

pertenece a las variables antes descritas, y 546 filas, correspondiente al total de muestras tomadas y analizadas en los laboratorios. En estas 546 filas no están incluidas 6 muestras que fueron eliminadas por ser consideradas como datos anómalos, estas muestras corresponden a la tercera campaña y microcosmos y ya que en esta campaña solamente se muestreó las parcelas y microcosmos con concentración teórica inicial de 10000ppm la muestras correspondientes son: del suelo 1 los tratamientos de control ("C"), surfactante("S"), fertilizante oleofílico ("FF"), fertilizante de liberación lenta ("FL") y fertilizante de liberación lenta con surfactante ("FL/S"), en el suelo 2 solamente se eliminó la de fertilizante oleofílico con surfactante ("FF/S"). Estos datos anómalos se produjeron debido a que se realizó la extracción de las muestras demasiado húmedas (humedad > 25%), por lo tanto, el porcentaje de masa de suelo era menor y como la extracción es realizada con diclorometano, siendo esta sustancia inmiscible con el agua, no fue efectiva, dando mucho menos concentración de TPH de la que en realidad corresponde. También hay que mencionar que en la última campaña, es decir, en la campaña 8, no se realizaron los análisis en los microcosmos.

Los valores de las concentraciones iniciales, es decir a tiempo cero, con los que se han realizado todos los modelos son de **18800 ppm** para todas las parcelas y microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de **10000 ppm** y de **37600 ppm** para las parcelas y microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de **20000 ppm**. Estos valores son los valores calculados teniendo en cuenta la cantidad de producto que se añadió a las parcelas y microcosmos y la densidad aparente del suelo calculada en el laboratorio. De todas formas, y como se observará más adelante, cuando se realiza la modelización y para que haya un mejor ajuste, los modelos modifican los valores de concentraciones de TPH a tiempo cero, tanto en parcelas como en microcosmos.

Los valores iniciales (a $t=0$) de las bacterias heterótrofas, degradadoras, actividad de deshidrogenasa y CO_2 no se introdujeron en el modelo porque no se consideró como representativo de la realidad poner los mismos datos que se obtuvieron en el suelo original. Para el resto de las campañas los tiempos a los que se introducían estas variables biológicas se supusieron igual a los Tex (tiempos de extracción). Esto no es cierto, dado que puede haber un decalaje, normalmente entre 15 días y un mes, pero no hay otra forma de que el modelo pueda predecir los TPH excepto si tiene datos para todas las variables continuas en un mismo valor de tiempo.

Los valores de TPH, que constan en la tabla, para la primera campaña, con su respectivo tiempo de extracción, son el promedio entre el valor dado para cada una de las parcelas y su respectivo duplicado. Para los microcosmos, debido a que no existen duplicados, los valores son los mismos que se obtuvieron en el laboratorio. Este cálculo se lo realizó debido a la gran diferencia existente, en algunos tratamientos, entre los resultados de la parcela y su respectivo duplicado, intentándose disminuir la dispersión de los datos por lo menos en cada uno de los tratamientos y que se parezcan lo más posible a lo que en realidad está ocurriendo.

En el anexo 2, se muestra como se realizó la corrección de los resultados obtenidos en el laboratorio para las concentraciones de TPH, para las campañas 6 y 7. Esta corrección tuvo que realizarse debido a que, como se explica en el anexo 2, hubo cambios de algunas piezas del equipo que alteraron los resultados, haciendo que los mismos fueran mayores.

3 Análisis de Resultados

3.1 Modelo matemático del TPH en función del tiempo (forzado)

3.1.1 Variables utilizadas en el modelo

Las variables utilizadas para la realización de este modelo son todas las variables controladas (que van a ser las variables independientes), a excepción de la variable no controlada TPH (que va a ser la variable dependiente). Como se indicó anteriormente, con este modelo lo que pretendemos es observar cómo el TPH evoluciona en función del tiempo y ver cómo influyen las variables controladas en dicha evolución. Inicialmente, también se introdujeron como variables tanto la temperatura ambiental como la humedad del proceso, ninguna de estas dos variables presentaron una respuesta significativa frente a la concentración de TPH con lo que por esta razón se decidió no tomarlas en cuenta en el modelo de evolución temporal.

A continuación se muestra la expresión matemática que gobierna el comportamiento del TPH a lo largo del tiempo. La explicación detallada, de la obtención de los coeficientes de dicha ecuación, se la puede observar en el anexo 3 del documento, donde se muestra claramente y paso a paso el procedimiento seguido para obtener los coeficientes para cada uno de los casos que hemos estudiado.

3.1.2 Expresión matemática y valores de los coeficientes

La ecuación que mejor predice el comportamiento de los TPHs a lo largo del tiempo para cada uno de los casos que hemos estudiado, luego de haber hecho el estudio entre diferentes funciones, tiene una dependencia exponencial del TPH con el tiempo y responde a la siguiente expresión:

Ecuación 3.1

$$TPH = k_1 e^{k_1 + k_2 \times t}$$

La ecuación 3.1 es una ecuación de cinética de primer orden donde los valores k_1 y k_2 son, respectivamente, la concentración a tiempo cero y el tiempo que tardaría en llegar, el TPH, a la mitad de la concentración inicial que como estamos hablando de un proceso de biodegradación lo denominaremos tiempo de semibiodegradación. A la ecuación 3.1 se la puede expresar en función del tiempo de la siguiente forma:

Ecuación 3.2

$$TPH[t] = TPH_0 \times e^{-\left(\frac{\ln(2)}{t_1} \times t\right)}$$

Los valores de k_1 (concentración en ppm a tiempo igual a cero TPH_0) y k_2 (tiempo de semibiodegradación $-\frac{\ln(2)}{t_1}$) de la ecuación varían dependiendo de los niveles de cada una de

las variables, esto se lo puede verificar en la explicación detallada del anexo 3.

En la Tabla 3.1 se puede observar un resumen de los coeficientes para cada uno de los casos que se han incluido durante toda la experiencia.

Tabla 3.1. Coeficientes de ecuaciones para parcelas y microcosmos

PARCELAS					
SUELO 1					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	14869	323,90	25949	302,68
	FF		202,08		266,60
	FF/S		224,32		253,90
	FL		174,60		183,86
	FL/S		165,82		139,75
	S		256,72		309,44

SUELO 2					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	14869	229,52	25949	218,66
	FF		239,84		334,85
	FF/S		285,25		334,85
	FL		143,81		150,03
	FL/S		161,57		136,45
	S		252,97		304,01

MICROCOSMOS					
SUELO 1					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	14869	153,35	25949	148,43
	FF		131,03		155,07
	FF/S		116,69		124,22
	FL		139,47		145,31
	FL/S		136,72		118,49
	S		137,80		151,34

SUELO 2					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	14869	128,12	25949	124,89
	FF		145,62		175,93
	FF/S		131,28		140,88
	FL		119,10		123,34
	FL/S		133,81		116,11
	S		136,72		150,03

3.1.3 Observaciones

Analizando la Tabla 3.1 se pueden realizar las siguientes observaciones:

- El valor del coeficiente k_1 se ve influenciado solamente por el valor de la concentración teórica inicial. En cambio k_2 se ve influenciado por todos los valores de las celdas que están interactuando con el tiempo (el resto de las variables), la misma variable puede estar sola y/o interactuando con el tiempo lo que hace que pueda llegar a influir en los dos coeficientes. Como podemos observar el valor de k_1 no cambia cuando variamos el tratamiento debido a que hemos forzado para que todos salgan del mismo punto.
- Si nos fijamos en el coeficiente k_2 (variables que interactúan con el tiempo) podemos ver que varía en todos los casos que hemos estudiado (ver Tabla 3.1), siendo lo más notorio que:
 - De forma general, es decir, teniendo en cuenta ambos suelos y parcelas y microcosmos, el TPH disminuye con mucha mayor intensidad en los tratamientos FL y FL/S y con menor intensidad en FF y aún con menos intensidad con FF/S. Es decir, los tratamientos que harían disminuir los TPH de mayor a menor velocidad serían: FL/S > FL > FF > FF/S > S > C aunque el modelo no encuentra una diferencia significativa en la forma en que disminuyen los TPH con los tratamientos de control (C) y surfactante (S). En el siguiente punto haremos una comparación de los tratamientos en los suelos y en microcosmos y parcelas por separado. El TPH disminuye con mayor intensidad en el suelo 2 comparado con el suelo 1; esto se muestra al observar (en la Tabla 3.1) que las celdas correspondiente a las parcelas y microcosmos del suelo 2 tienen valores más negativos (en la mayoría de los casos aunque más adelante se realiza un estudio detallado por tratamiento) que las del suelo 1, aunque esto es menos notorio en los microcosmos.

- El TPH también disminuye con mayor intensidad en los microcosmos en comparación con las parcelas, nuevamente los valores del coeficiente k_2 en los microcosmos son más negativos que los de las parcelas (en todos los casos). Esto es razonable ya que como dicen algunos autores (Martienssen, et al., 2007; Riffaldi, et al., 2005) las velocidades en laboratorio son mucho mayores que las presentadas en campo.
- Otra de las observaciones que se puede realizar observando la Tabla 3.1 es una comparación de cómo influye el tipo de suelo o el que sean parcelas o microcosmos en la evolución del TPH en el tiempo para los distintos tratamientos:
- Los tratamientos FF y FF/S tienen una menor eficacia en el suelo 2, con respecto al control (de este suelo) [los valores de k_2 en las celdas correspondientes a estos tratamientos son menos negativos], es decir, en estos tratamientos para este tipo de suelo, tanto en parcelas como microcosmos, los TPHs disminuyen con menor intensidad (comparados los mismos tratamientos con respecto al de control en el suelo 1).
- Los tratamientos FL y FL/S tienen una menor eficacia en microcosmos que en las parcelas, [la diferencia entre los valores de k_2 correspondientes a estos dos tratamientos y el de control (para los dos suelos) es menor en el caso de microcosmos que en el de parcelas].
- A continuación realizaremos un estudio detallado de cada uno de los casos que consta la experiencia, de tal forma que se pueda observar cuáles han sido los mejores y peores tratamientos en función del tipo de suelo y de si es parcela o microcosmos.
 - Parcelas
 - Suelo 1. El orden sería:
 - (Para 10000 ppm) $C < S < FF/S < FF < FL < FL/S$
 - (Para 20000 ppm) $S \approx C < FF < FF/S < FL < FL/S$
 - Suelo 2. El orden sería:
 - (Para 10000 ppm) $FF/S < S < FF < C < FL/S < FL$

- (Para 20000 ppm) $FF/S = FF < S < C < FL < FL/S$
- Microcosmos
 - Suelo 1. El orden sería:
 - (Para 10000 ppm) $C < FL \approx S \approx FL/S < FF < FF/S$
 - (Para 20000 ppm) $FF < S \approx C < FL < FF/S < FL/S$
 - Suelo 2. El orden sería:
 - (Para 10000 ppm) $FF < S < FL/S < FF/S < C < FL$
 - (Para 20000 ppm) $FF < S < FF/S < C \approx FL < FL/S$
 - Por otro lado, si sólo estudiamos las parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm es menos eficaz el tratamiento “FF” y más eficaz el “FL/S”, [si nos fijamos en las comparaciones que hicimos anteriormente siempre el tratamiento “FL/S” es el que presenta el valor más negativo comparado con el resto de tratamientos, mientras que sucede lo contrario con el tratamiento “FF” donde este tiene el valor menos negativo].

En las figuras 4.1 y 4.2 podemos observar los resultados obtenidos de la modelización para parcelas y microcosmos respectivamente donde podemos ver claramente que los tratamientos que mejor funcionan son el FL y FL/S y corroborar lo dicho en los párrafos anteriores.

Figura 3.1. Parcelas TPH vs Tiempo (modelo forzado tiempo)

Figura 3.2. Microcosmos TPH vs Tiempo (modelo forzado tiempo)

3.1.4 Conclusiones

Las conclusiones que podemos obtener de esta modelización viendo las tablas 3.1 y 3.2 son las siguientes:

- Los TPH con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm son mayores que los de 10000 ppm, decir esto puede parecer superfluo, pero lo que en realidad interesa es saber si los niveles del resto de factores son diferentes, entre sí, cuando se compara estos dos niveles, es decir, si hay una diferencia en la intensidad con la que disminuyen las concentraciones de hidrocarburos conforme transcurre el proceso.
- En general, los tratamientos FL y FL/S hacen que los TPHs disminuyan mucho más rápido comparados con el resto de tratamientos. Esto puede deberse a que, el

contenido de limos y arcillas (partículas mas finas) de los suelos lo podemos considerar alto del 50%, en los dos suelos (Amellal, et al., 2001; Bundy, et al., 2001) para realizar un proceso de biorremediación y a que las propiedades del fertilizante de liberación lenta (ver apartado 2.3) que libera los nutrientes, nitrógeno y fósforo, poco a poco hace que haya una buena disponibilidad de los mismos, así como también permite que haya la suficiente agua y oxígeno necesarios para que las bacterias metabolicen el hiddrocarburo.

- En las parcelas y microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm, el tratamiento “FF” hace disminuir los TPHs con menor intensidad que el resto de tratamientos, esto puede deberse a las propiedades del fertilizante oleofílico, que, como se vio en el apartado 2.3, se queda adherido al hidrocarburo sumado a que el porcentaje de partículas finas existentes (por lo tanto baja porosidad en los dos suelos) no haya suficiente disponibilidad de agua y oxígeno para que sean metabolizados los hidrocarburos con estos nutrientes.
- Los tratamientos FF y FF/S hacen que las concentraciones de TPH en el suelo 2 disminuyan con menor intensidad que en el suelo 1 y que en el resto de tratamientos en el mismo suelo. Esto puede deberse a lo mismo que se ha mencionado antes, sólo que, debido al mayor porcentaje de arcillas en el suelo II (35%) que en el suelo I (28%) haya aumentado el efecto mencionado.
- Las concentraciones de TPH disminuyen con mayor intensidad en los microcosmos comparados con las parcelas, esto es debido a que en laboratorio las tasas de biodegradación normalmente son mayores que en campo (Martienssen, et al., 2007; Riffaldi, et al., 2005). Si bien cuando se compara exclusivamente por tratamientos podemos observar que el efecto de los tratamientos “FL” y “FL/S” en el valor de TPH es menor en los microcosmos. No obstante, se vuelve a insistir, una vez más, en la conveniencia de haber tomado las muestras iniciales más juntas en el tiempo para poder diferenciar dos modelos entre dos etapas (una inicial más rápida y otra posterior más lenta), esto es mucho más acusado en el caso de los microcosmos.

3.2 Modelo matemático del TPH en función del tiempo (no forzado)

Aunque ya se ha comentado el interés de que todos los tratamientos, suelos y microcosmos y parcelas salgan de un mismo valor inicial de TPH para que sea más aproximado a lo que ocurrió en la realidad, también es cierto que se debería, al menos, tener una idea de ver qué es lo que

predice el modelo si no se le fuerza a que esto ocurra. El interés radica en que si se fuerza al modelo a que todo salga de un mismo valor inicial, el ajuste que hará el modelo va a ser peor que el que hace si se le deja libre. No obstante hay que tener siempre en cuenta que las diferencias que prediga ahora el modelo respecto a los valores iniciales de TPH se deben únicamente a que, con los datos que se suministran al modelo, él es incapaz de detectar que todos los tratamientos parten de un mismo valor inicial y lo que hace es ajustarlos en función de la tendencia que siguen a lo largo del tiempo (dado que tiene muchos más valores de TPH que están más o menos estabilizados en el tiempo, no es capaz de caracterizar adecuadamente el brusco descenso de TPH en la etapa inicial debido a que hay pocos datos en esta etapa). De esta manera, lo que hará será bajar los valores iniciales de TPH de aquellos tratamientos que van más rápido al inicio en la degradación (FL y FL/S y de microcosmos respecto a parcelas). Para obtener un modelo que predijera mejor esta primera etapa hubiera sido necesario hacer más muestreos en esta etapa de descenso brusco de TPHs.

3.2.1 Variables utilizadas en el modelo

Si se ajusta un modelo en el que se permite que el coeficiente que no acompaña al tiempo (k_1) tome cualquier valor en función de las variables controladas, no solo de la concentración (como antes se lo había hecho), sino también del tipo de suelo, tratamiento, y la variable que indica si estamos en parcelas o microcosmos, se puede observar claramente como varían todos los valores de este coeficiente (que en este caso es lo mismo decir los valores iniciales, a tiempo=0, de TPH), para todos los casos en la Tabla 3.2.

Al igual que en el modelo anterior, apartado 3.1, también se introdujeron como variables tanto la temperatura ambiental como la humedad del proceso, ninguna de estas dos variables presentaron una respuesta significativa frente a la concentración de TPH con lo que por esta razón se decidió no tomarlas en cuenta en el modelo de evolución temporal.

3.2.2 Expresión matemática y valores de los coeficientes

La mejor expresión matemática que gobierna el comportamiento del TPH en el tiempo es la misma que se obtuvo en el apartado anterior, pero la principal diferencia es que tanto k_1 como k_2 pueden variar con cada una de las variables controladas del experimento (antes sólo variaba k_2). La expresión es:

Ecuación 3.3

$$TPH = k_1 e^{-\frac{t}{k_2}}$$

Que al igual que en el apartado anterior es la ecuación de cinética de primer orden que se puede expresar como:

Ecuación 3.4

$$TPH[t] = TPH_0 \times e^{-\left(\frac{\ln(2)}{t_{1/2}}\right) \times t}$$

El resultado resumido de los coeficientes k_1 y k_2 para todos los casos estudiados, cuya obtención se detalla en el anexo 3 (correspondiente para este modelo), mientras que los valores de TPH_0 y $t_{1/2}$ se los puede observar en la Tabla 3.2

3.2.3 Observaciones

Analizando la Tabla 3.2 podemos observar lo siguiente:

- Comparación de valores iniciales (tener en cuenta que la escala es lognormal):
 - A continuación se muestra el orden de los valores iniciales de TPH en función del tratamiento, del suelo y de los microcosmos y parcelas:

- Suelo 1, 10.000 ppm, parcelas:	FL/S < FF ≈ FL ≈ S ≈ FF/S < C
- Suelo 1, 20.000 ppm, parcelas:	FL < FL/S < FF ≈ C ≈ S ≈ FF/S
- Suelo 2, 10.000 ppm, parcelas:	FL/S ≈ FL < C < S ≈ FF ≈ FF/S
- Suelo 2, 20.000 ppm, parcelas:	FL ≈ FL/S < C ≈ S ≈ FF ≈ FF/S
- Suelo 1, 10.000 ppm, microcosmos:	FF ≈ FF/S ≈ S ≈ FL/S < FL ≈ C
- Suelo 1, 20.000 ppm, microcosmos:	FL ≈ FF ≈ FF/S ≈ S ≈ FL/S ≈ C
- Suelo 2, 10.000 ppm, microcosmos:	C ≈ FL/S ≈ S ≈ FL ≈ FF/S ≈ FF
- Suelo 2, 20.000 ppm, microcosmos:	S ≈ C ≈ FL ≈ FF ≈ FF/S ≈ FL/S

Si comparamos los microcosmos observamos que todos los tratamientos arrancan de un valor muy similar de TPH. En el caso de las parcelas sí que se observan más diferencias en este valor inicial de TPH según el tratamiento, pareciendo que los que mejor van son los FL y FL/S (valores más bajos de TPH inicial; o lo que es lo mismo, que al comienzo del experimento descendieron, se degradaron, más rápidamente) frente a los C, FF, FF/S y S que tienen valores mayores de TPH inicial. Una posible explicación del porqué se observa esta diferencia en las parcelas y no en los microcosmos es debido al tiempo de extracción de la primera campaña. A los modelos se les da un valor inicial de TPH para $t=0$ que es igual para todos los tratamientos y suelos y parcelas o microcosmos (sólo varía con la concentración); el modelo calcula el nuevo valor inicial de TPH para los distintos tratamientos que mejor se ajuste. Si tenemos en cuenta de que le hemos dicho que teóricamente se parte de un mismo valor y, dado que el tiempo de extracción de los microcosmos es el día 2, el modelo no puede marcar muchas diferencias entre los distintos tratamientos con sólo dos días de degradación de los TPHs (*El hecho de que el tiempo de extracción de los microcosmos sea tan próximo al de recogida de las muestras se debe a que dichas muestras se mantuvieron refrigeradas desde su recogida hasta su extracción y análisis, no así en el caso de las parcelas debido al gran volumen de las mismas, lo que hacía inviable el guardarlas refrigeradas*). En el caso de las parcelas, como el tiempo de extracción varía de 20 a 30 días el modelo puede observar más diferencias e interpolar valores más diferentes para tiempo cero (hay que tener en cuenta que las muestras de las parcelas han sufrido biodegradación durante mayor tiempo que las de los microcosmos).

Tabla 3.2. Coeficientes de ecuaciones de modelo modificado

PARCELAS					
SUELO 1					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	17747,50	261,56	25951,90	263,55
	FF	14200,04	224,32	25514,44	301,37
	FF/S	16026,52	216,61	28709,98	238,19
	FL	14750,02	184,35	19594,42	218,66
	FL/S	12004,06	229,52	22270,09	159,71
	S	15260,15	252,97	27805,80	288,81

SUELO 2					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	14530,42	206,91	28424,31	208,78
	FF	18287,99	183,37	31225,80	231,82
	FF/S	19811,15	178,19	35739,08	192,54
	FL	13160,83	155,76	24514,01	179,57
	FL/S	12682,77	186,83	26160,35	137,80
	S	17222,98	201,50	30853,33	224,32

MICROCOSMOS

SUELO 1					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	20211,36	134,85	29554,76	135,65
	FF	15138,55	124,44	27173,57	145,01
	FF/S	15275,42	122,03	27391,83	128,60
	FL	19870,67	111,08	26396,85	122,68
	FL/S	15756,37	126,03	29231,44	101,63
	S	15709,17	132,53	28623,98	142,04

SUELO 2					
	CONCENTRACIÓN	10000 ppm (teóricos)		20000 ppm (teóricos)	
	COEFICIENTES	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]	TPH ₀ [ppm]	t _{1/2} [días]
TRATAMIENTO	C	16547,66	118,89	26476,16	174,16
	FF	19496,69	110,55	27227,97	189,90
	FF/S	18901,56	108,64	27889,35	162,71
	FL	17729,76	100,02	27038,04	153,69
	FL/S	16647,24	111,98	28113,35	122,03
	S	17712,04	117,09	25977,86	185,33

- Comparando el “Control” de ambos suelos se observa que:
 - Parcelas, 10.000 ppm, Control – El suelo 2 tiene un menor valor inicial de TPH que el suelo 1 (es como si al inicio hubiera ido más rápida la degradación, tal vez relacionada con la mayor abundancia de bacterias inicialmente en el suelo 2 que en el suelo 1 apartado 2.1).
 - Parcelas, 20.000 ppm, Control – El suelo 2 tiene un mayor valor inicial de TPH que en el suelo 1 (quizá, a pesar de tener más bacterias, la concentración es demasiado alta para dichas bacterias por lo que necesiten un mayor período de adaptación, lo que ralentiza la degradación).
 - Microcosmos, 10.000 ppm, Control – El suelo 2 tiene un menor valor inicial de TPH que el suelo 1 (coincide con lo dicho para las parcelas).

- Microcosmos, 20.000 ppm, Control - El suelo 2 tiene un menor valor inicial de TPH que el suelo 1. En este caso se contradice con lo indicado para las parcelas; quizá al tener el microcosmos una mejor oxigenación, estar más homogenizado o ser un ambiente más controlado, con mayor humedad, el impacto inicial de las altas concentraciones no ha sido tan perjudicial como en el caso del suelo 1.

En principio parece que el suelo 2 tiene una mayor actividad degradadora de TPHs inicialmente que el suelo 1.

- A continuación se va a observar cómo los distintos tratamientos hacen variar el TPH en función del tiempo:

- El orden de degradación (de menor a mayor degradación) de los TPH en función del tratamiento, del suelo y de los microcosmos y parcelas:

- Suelo 1, 10.000 ppm, parcelas: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 1, 20.000 ppm, parcelas: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 2, 10.000 ppm, parcelas: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 2, 20.000 ppm, parcelas: $FF \approx S < C < FF/S < FL < FL/S$

- Suelo 1, 10.000 ppm, microcosmos: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 1, 20.000 ppm, microcosmos: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 2, 10.000 ppm, microcosmos: $C \approx S < FL/S \approx FF \approx FF/S < FL$

- Suelo 2, 20.000 ppm, microcosmos: $FF \approx S < C < FF/S < FL < FL/S$

Se observa que el orden es el mismo para todos los casos excepto el del suelo 2 a 20.000 ppm tanto para las parcelas como para los microcosmos. En principio, la tendencia general (excepto en este caso) es que el tratamiento que mejor funciona con diferencia es el FL, no necesitando, en principio ningún surfactante que mejore la biodisponibilidad de los hidrocarburos. El resto de los tratamientos daría resultados similares, a excepción del surfactante que daría resultados muy similares a los de control y, por lo tanto, por sí solo no

mejoraría en nada la biodegradación de los hidrocarburos. Sin embargo, en el caso del suelo 2 parece que sí necesite la ayuda del surfactante a concentraciones altas. Esto puede deberse a que este suelo tenga un mayor contenido arcilloso o de materia orgánica que haga que el hidrocarburo se quede más adherido a los sólidos y menos biodisponible; de ahí que al añadir el surfactante mejore la biodisponibilidad del hidrocarburo en el suelo. Quizá a bajas concentraciones, la población bacteriana degradadora accede adecuadamente al hidrocarburo pero, a altas concentraciones, la población bacteriana necesita que el hidrocarburo se encuentre más biodisponible. Esto también concordaría con el hecho de que en este caso, el FF es el tratamiento que peor funciona, esto podría deberse a que al ser un fertilizante oleofílico, que tiende a quedarse adherido al producto, su efecto es que todavía lo hace menos biodisponible para las bacterias.

- En general, se observa que en el suelo 2 se degradan más rápidamente los hidrocarburos que en el suelo 1. La única excepción son los microcosmos de 20.000 ppm, en los cuales va mejor el suelo 1, a excepción del tratamiento FL/S que sigue yendo mejor en el microcosmos del suelo 2.

Figura 3.3. Parcelas TPH vs Tiempo (modelo sin forzar tiempo)

En la Figura 3.3 y en la Figura 3.4 se pueden observar los resultados obtenidos de la modelización para parcelas y microcosmos donde se puede ver claramente que, en general, los tratamientos que mejor funcionan son el FL y el FL/S y corroborar lo dicho en los apartados anteriores. Se observa cómo, al no forzar el modelo, los valores iniciales varían en función del tratamiento. Se repite una vez más que el modelo es incapaz de predecir el brusco descenso inicial y lo que hace es indicar que el valor inicial de TPH es diferente para cada tratamiento (siendo inferior para los tratamientos que hacen disminuir más rápidamente el TPH al inicio). En realidad este resultado es tan solo un artificio que debe interpretarse como si entre ese punto inicial y el origen existiese una línea de evolución (no dibujada) que indicaría que todos los tratamientos parten de un mismo punto inicial (igual valor de TPHs inicial) y el descenso inicial para los distintos tratamientos es más rápido para unos (FL y FL/S) que para otros (C).

Figura 3.4. . Microcosmos TPH vs Tiempo (modelo sin forzar tiempo)

3.2.4 Conclusiones

- Con respecto a los valores iniciales, podemos decir que en microcosmos, en todos los tratamientos, los valores son similares, en cambio, en las parcelas se nota una mayor diferencia entre los tratamientos.
- En las parcelas, los tratamientos que tienen los valores iniciales más bajos son FL y FL/S, o lo que es lo mismo, que con estos tratamientos, al comienzo del experimento descendieron, se degradaron, más rápidamente frente al resto de tratamientos.
- Debido a los bajos valores iniciales que, en general, se presentan en el suelo 2, parece que este suelo tiene una mayor actividad degradadora de TPHs inicialmente.

- El tratamiento que más rápido hace disminuir los TPHs es el tratamiento FL, en todos los casos, a excepción de las parcelas y microcosmos del suelo 2 de 20000 ppm donde el mejor tratamiento es el FL/S. Esto se puede deber a que en el suelo 2 haya un mayor contenido arcilloso o de materia orgánica que haga que el hidrocarburo se quede más adherido a los sólidos y menos biodisponible; con lo que el surfactante ayudaría a aumentar la biodisponibilidad.

3.3 Comparación entre los modelos en función del tiempo

- En los dos suelos, a concentraciones iniciales de TPH menores (10.000 ppm), el tratamiento que mejor funciona a largo plazo es el FL.
- En el caso de concentraciones iniciales de TPH mayores (20.000 ppm), el tratamiento que mejor funciona a largo plazo es FL/S en ambos suelos (probablemente es necesaria la ayuda del surfactante para hacer más biodisponibles los hidrocarburos a altas concentraciones durante más tiempo).
- En el caso del suelo 2, tanto en parcelas como en microcosmos, los tratamientos que mejor funcionan para concentraciones iniciales de TPHs menores es el FL y para concentraciones iniciales mayores es el FL/S (independientemente del tiempo).
- En el caso del suelo 1, a corto plazo, parece que el tratamiento que mejor funciona en las parcelas es el FL/S (independientemente de la concentración inicial) y, en los microcosmos el FF/S y el FF para 10.000 ppm y el FL/S y FF/S para 20.000 ppm. Parece que en este suelo llegan a ser más eficientes en un primer momento los fertilizantes oleofílicos, aunque para 20.000 ppm se prefieren los nutrientes que lleven surfactantes. La razón de esta diferencia en el caso de este suelo con las parcelas puede deberse a que la adición del fertilizante oleofílico se hizo de forma mejor y más controlada en los microcosmos que en las parcelas.
- En general, en el caso del suelo 1 se observa una mayor eficacia de los fertilizantes oleofílicos que en el caso del suelo 2, siendo más notable en los microcosmos y no llegando a superar nunca al fertilizante de liberación lenta a largo plazo.
- Tanto el modelo forzado como el no forzado indican que, en general, la biodegradación es más rápida en el suelo 2 que en el suelo 1. El modelo forzado indica que esto es así excepto para los tratamientos FF y FF/S que funcionan mejor en el suelo 1 que en el 2. En el modelo no forzado no se observa esa diferencia, lo que indica

que esos tratamientos van mejor en un primer momento en el suelo 1 para, luego, ir perdiendo eficiencia. Por otro lado, el modelo no forzado indica que en el caso de microcosmos de 20000, en el suelo 2 la biodegradación fue más lenta que en el suelo 1. Parece que, aunque en microcosmos de 20.000 el suelo 2 arranca más rápido que el 1, luego parece que la degradación va siendo más lenta en el tiempo (diferencia que no se observa para las concentraciones de 10.000, ni en las parcelas de 20.000, en las que el suelo 2 siempre es más rápido que el 1).

3.4 Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo biológico (no forzado)

3.4.1 Variables utilizadas en el modelo

Las variables utilizadas para la realización de este modelo son todas las variables controladas y las variables no controladas de tipo biológico (que van a ser las variables independientes), es decir, las bacterias heterótrofas (BH), las bacterias degradadoras (BD), la actividad deshidrogenasa (AD), el dióxido de carbono (CO_2), y nuevamente la variable no controlada TPH (que va a ser la variable dependiente). Con este modelo lo que pretendemos es observar cómo el TPH evoluciona en función del tiempo, cómo influyen las variables controladas en dicha evolución y determinar que variable(s) biológica(s) es mas indicativa de la disminución (por biodegradación) del TPH.

3.4.2 Expresión matemática y valores de los coeficientes

Una vez introducidas todas las variables antes descritas (con todas las interacciones posibles) se realiza la evaluación de la función matemática que mejor se ajusta, el resultado de esta evaluación, nuevamente, es una función logarítmica. Lo que debemos recalcar es que las bacterias heterótrofas y las bacterias degradadoras están fuertemente correlacionadas y es prácticamente indiferente, en cuanto a la bondad del ajuste, el que se incluya una u otra en la elaboración del modelo.

La explicación detallada de la obtención de los coeficientes de la ecuación que predice el comportamiento de los TPHs en función del tiempo y de las bacterias degradadoras (única variable significativa), al igual que en los modelos anteriores, se encuentra en el anexo 3.

La ecuación está regida por la siguiente expresión:

Ecuación 3.5

$$TPH = e^{k_1 + k_2 \times t + k_3 \times BD + k_4 \times t \times BD}$$

En la Tabla 1.1 Tabla 3.3 se puede observar los coeficientes correspondientes para cada uno de los casos estudiados y que más adelante se realizarán las respectivas observaciones.

3.4.3 Observaciones

Analizando la Tabla 3.3 se pueden realizar las siguientes observaciones:

- El valor del coeficiente k_1 se ve influenciado por las variables concentración “con”, tipo de suelo “ts” y parcelas o microcosmos “np”. Lo que también nos podemos dar cuenta es que el valor de k_1 no se ve modificado cuando cambiamos de tratamiento en cada uno de los niveles de estas variables. (Se recalca una vez más que este modelo se ha dejado libre para k_1 por lo que podría variar este valor para los distintos tratamientos, pero es el mismo modelo el que indica que este k_1 es independiente del tratamiento, tal vez porque el efecto de los tratamientos es sobre las bacterias y, por lo mismo, su efecto aparece en el modelo en k_3). Por ejemplo, el valor de k_1 para parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm en el suelo 1 es de 10 para todos los tratamientos. Si analizamos cada uno de los casos se puede ver que:

Tabla 3.3. Coeficientes ecuaciones modelo variables biológicas (no forzado)

PARCELAS									
SUELO 1									
	CONC.	10000 ppm				20000 ppm			
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
TRATAMIENTO	C	10	-4.97E-03	-4.23E-02	3.27E-04	10.3911	-4.79E-03	-4.23E-02	3.27E-04
	FF		-5.04E-03	-7.62E-02			-3.84E-03	-7.62E-02	
	FF/S		-5.56E-03	-4.84E-02			-4.31E-03	-4.84E-02	
	FL		-4.87E-03	-9.51E-02			-4.44E-03	-9.51E-02	
	FL/S		-4.87E-03	-1.01E-01			-5.40E-03	-1.01E-01	
	S		-4.63E-03	-6.56E-02			-4.14E-03	-6.56E-02	
SUELO 2									
	CONC.	10000 ppm				20000 ppm			
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
TRATAMIENTO	C	10.338	-5.10E-03	-1.15E-01	3.27E-04	10.8686	-4.92E-03	-1.15E-01	3.27E-04
	FF		-5.84E-03	-8.80E-02			-4.65E-03	-8.80E-02	
	FF/S		-5.77E-03	-7.51E-02			-5.05E-03	-7.51E-02	
	FL		-6.89E-03	-1.18E-01			-6.31E-03	-1.18E-01	
	FL/S		-5.69E-03	-1.38E-01			-6.07E-03	-1.38E-01	

S		-5.64E-03	-9.21E-02			-4.76E-03	-9.21E-02	
---	--	-----------	-----------	--	--	-----------	-----------	--

MICROCOSMOS

SUELO 1									
	CONC.	10000 ppm				20000 ppm			
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
TRATAMIENTO	C	10.114	-7.34E-03	-4.23E-02	3.27E-04	10.5048	-7.16E-03	-4.23E-02	3.27E-04
	FF		-6.97E-03	-7.62E-02			-5.83E-03	-7.62E-02	
	FF/S		-8.57E-03	-4.84E-02			-7.90E-03	-4.84E-02	
	FL		-6.37E-03	-9.51E-02			-5.83E-03	-9.51E-02	
	FL/S		-6.00E-03	-1.01E-01			-6.44E-03	-1.01E-01	
	S		-7.21E-03	-6.56E-02			-6.38E-03	-6.56E-02	

SUELO 2									
	CONC.	10000 ppm				20000 ppm			
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
TRATAMIENTO	C	10.140	-7.47E-03	-1.15E-01	3.27E-04	10.6704	-5.25E-03	-1.15E-01	3.27E-04
	FF		-7.79E-03	-8.80E-02			-4.85E-03	-8.80E-02	
	FF/S		-9.58E-03	-7.51E-02			-6.41E-03	-7.51E-02	
	FL		-6.19E-03	-1.18E-01			-4.58E-03	-1.18E-01	
	FL/S		-4.87E-03	-1.38E-01			-4.51E-03	-1.38E-01	
	S		-6.54E-03	-9.21E-02			-5.18E-03	-9.21E-02	

- De forma general, los valores de k_1 (valor de TPH para Tiempo = 0 y $bd = 0$) para las parcelas y microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm son mayores comparados con las concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm, como era lógico de esperar. Nuevamente recalamos que el objetivo de poner las concentraciones de 20000 ppm en el modelo es para observar si hay diferencias significativas en la velocidad de disminución de la concentraci
- De forma general, los valores de k_1 para las parcelas y microcosmos del suelo 2 son mayores comparados con las parcelas y microcosmos del suelo 1. Al decir esto podríamos contradecirnos con las conclusiones del capítulo anterior, pero eso debe entenderse como que a tiempo=0 no hay bacterias en el sistema y que en cuanto entran las bacterias, el efecto es mucho mayor, haciendo descender, en ese momento, más rápidamente el TPH en el suelo 2; por lo tanto en este modelo el efecto de las bacterias queda más evidente. Vale recalcar que esta diferencia (entre los suelos) es menor cuando estamos en microcosmos.

- Si nos fijamos en el coeficiente k_2 (coeficiente que acompaña al tiempo) podemos ver que varía en todos los casos que hemos estudiado (ver Tabla 3.3) siendo lo más notorio que:
 - De forma general, es decir, para todos los casos estudiados este coeficiente es negativo (lo que es lógico de suponer). Por lo tanto, mientras aumenta el tiempo el valor de las concentraciones de TPH disminuyen.
 - Si nos fijamos solamente en las parcelas, en el suelo 2 los TPHs disminuyen con mayor intensidad que en el suelo 1 tanto para concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm como de 20000 ppm. Siendo con diferencia el tratamiento FL, en el suelo 2, el que más hace disminuir los TPHs.
 - Si nos fijamos solamente en las parcelas, disminuye con mayor intensidad la respuesta en las parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm comparadas con las de 20000 ppm, a excepción del tratamiento FL/S, que va mucho mejor en las parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm. Además, el tratamiento FF, con concentración teórica inicial de 20000 ppm, es el que menos hace disminuir la respuesta.
 - Si nos fijamos solamente en los microcosmos, en general, la respuesta disminuye con mayor intensidad con el tratamiento “FF/S”. Aunque esta observación puede resultar chocante en relación a lo que predice el modelo anterior, hay que tener en cuenta que solamente es válida para el coeficiente que acompaña al tiempo y, que para ver el verdadero efecto sobre cada uno de los casos estudiados hay que realizar una evaluación final de la influencia de la suma de todos los coeficientes para cada uno de los casos. Este estudio se realiza al final de este apartado y se ha hecho para distintos tiempos.
 - Si nos fijamos solamente en los microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm, los tratamientos “C”, “FF” y “FF/S”, hacen que la respuesta disminuya con mayor intensidad en el suelo 2 comparado con el suelo 1.
 - Si nos fijamos solamente en los microcosmos con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm, en general, la respuesta disminuye con mayor intensidad en el suelo 1 comparado con el suelo 2.

- Si nos fijamos en el coeficiente k_3 (coeficiente que acompaña a las bacterias degradadoras “BD”) podemos ver que varía con los tratamientos y con el tipo de suelo, lo más notorio de estas variaciones e interacciones, las podemos ver en la Tabla 3.3 y son las siguientes:
 - En general mientras aumentan las bacterias degradadoras existe una disminución de TPHs, (todos los signos de k_3 son negativos en la Tabla 3.3).
 - En el suelo 1, existe una mayor disminución de los TPHs en los tratamientos “FL/S”, “FL”, y “FF” (ordenados de mayor a menor disminución), comparados con el de control en el mismo suelo.
 - De forma general, a igual número de bacterias, las bacterias del suelo 2 hacen que haya una mayor disminución del TPH que las del suelo 1 (valores más negativos en este tipo de suelo comparado con el suelo 1). Además, si sólo nos fijamos en el suelo 2, podemos ver que los tratamientos que mejor van son el “FL/S”, “FL” y “C” (ordenados de mayor a menor disminución; ver Tabla 3.3).
 - También se observa diferencias de comportamiento en cuanto a cómo favorece la adición de nutrientes a las bacterias degradadoras en ambos suelos. Lo que se observa es que, en general, los tratamientos que se aplican al suelo 1 hacen disminuir más rápidamente el TPH con respecto al control del suelo 1. En cambio, en el suelo 2, aunque la eficiencia es mejor con respecto al 1, el comportamiento de los distintos tratamientos y del de control a la hora de reducir el contenido en TPH es más parecida entre sí que en el suelo 1. Es decir, que el suelo 1, quizá al estar más empobrecido en bacterias, al añadir los nutrientes se observa una mejora en cuanto al aumento de las bacterias y por lo tanto una mayor disminución del TPH en comparación con el control (donde no se han añadido nutrientes). Sin embargo, en el suelo 2, quizá debido a que ya tiene una mayor población bacteriana inicial, al añadir los nutrientes, se mejora algo el aumento de la población bacteriana y, por lo tanto, la disminución de los TPHs, pero sin haber tanta diferencia con el de control. Sin embargo, al tener desde el inicio ya más bacterias el suelo 2 su eficiencia es mejor, en términos generales, que la del suelo 1.
- Si nos fijamos en el coeficiente k_4 nos podemos dar cuenta que es constante para todos los casos estudiados (no hubo mas interacciones significativas con las variables

controladas). Debido a su valor positivo, y el valor negativo de los coeficientes k_2 y k_3 mientras aumenta el tiempo un gran aumento de estas bacterias no se traduciría en una disminución de los TPH, o lo que es lo mismo conforme aumenta el tiempo el efecto de la cantidad de bacterias degradadoras se hace menos importante.

- Se puede intentar establecer un orden de qué tratamientos conducen a una mayor y más rápida degradación para cada uno de los casos estudiados. Para ello habría que estudiar la interacción entre los coeficientes k_2 y k_3 , dado que k_1 y k_4 son iguales para todos los casos estudiados (por ejemplo, para todas las parcelas del suelo 1 a 10.000 ppm). Para hacer esta comparación hay que tener en cuenta que k_2 (del orden de 10^{-3}) es el coeficiente que acompaña al tiempo (el tiempo oscila entre 0 y 389 días) y k_3 (del orden de 10^{-2} a 10^{-1}) es el coeficiente que acompaña al número de bacterias degradadoras (dicho número oscila entre 5,38 y 10,1). Esto indica que la influencia de las bacterias degradadoras en la degradación del TPH va a ser mayor a tiempos bajos, para ir perdiendo influencia a medida que aumenta el tiempo. Teniendo en cuenta el orden de magnitud de los coeficientes k_2 y k_3 y los valores entre los que oscilan Tex y BD, se pueden establecer los tratamientos que van más rápido para distintos intervalos de tiempo:
 - **Para $t < 10$ días**, la influencia de $k_3 \cdot BD$ es un orden de magnitud mayor que la de $k_2 \cdot Tex$ por lo que se van a ordenar los tratamientos en función de k_3 . Al observar la Tabla 3.3 se puede ver que el orden de menor a mayor degradación de TPH en función de este coeficiente se mantiene para todos los casos, siendo:

$$FF/S < FF < S < C \approx FL < FL/S$$
 - También se observa que en el suelo 2 el descenso es más rápido que en el suelo 1 (a igual número de bacterias degradadoras).
 - **Para $t > 100$ días**, la influencia de $k_3 \cdot BD$ es un orden de magnitud inferior que la de $k_2 \cdot Tex$, por lo que se van a ordenar los tratamientos en función de k_2 . A continuación se va a observar el orden de degradación (de menor a mayor degradación) de los TPH en función del tratamiento, del suelo y de los microcosmos y parcelas (teniendo en cuenta k_2):

- Suelo 1, 10.000 ppm, parcelas: $S < FL = FL/S < C \approx FF < FF/S$

- Suelo 1, 20.000 ppm, parcelas: $FF < S < FF/S < FL < C < FL/S$
- Suelo 2, 10.000 ppm, parcelas: $C < S \approx FL/S \approx FF/S \approx FF < FL$
- Suelo 2, 20.000 ppm, parcelas: $FF < S < C < FF/S < FL/S < FL$
- Suelo 1, 10.000 ppm, microcosmos: $FL/S < FL < FF < S < C < FF/S$
- Suelo 1, 20.000 ppm, microcosmos: $FL = FF < S \approx FL/S < C < FF/S$
- Suelo 2, 10.000 ppm, microcosmos: $FL/S < FL < S < C < FF < FF/S$
- Suelo 2, 20.000 ppm, microcosmos: $FL/S \approx FL < FF < S \approx C < FF/S$

En las figuras 4.5 y 4.6 podemos observar los resultados obtenidos de la modelización para parcelas y microcosmos respectivamente donde podemos ver claramente que los tratamientos que mejor funcionan son el FL y FL/S y corroborar lo dicho en los párrafos anteriores.

Figura 3.5. Parcelas TPH y BD vs Tiempo (modelo sin forzar)

Figura 3.6. Microcosmos TPH y BD vs Tiempo (modelo sin forzar)

3.4.4 Conclusiones

- A corto plazo, es decir a tiempo menor a 10 días, el tratamiento que mejor ha funcionado en la experiencia es el “FL/S”.
- A largo plazo, es decir a tiempo mayor a 100 días, en microcosmos, con concentraciones teóricas iniciales de 10000 y 20000 ppm, y en suelo 1, con concentraciones teóricas iniciales de 10000 ppm, el tratamiento que mejor ha funcionado es el “FF/S”. En cambio en el suelo 1 con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm el tratamiento que mejor ha funcionado es el FL/S, mientras que en el suelo 2, tanto para concentraciones de 10000ppm como para 20000ppm el tratamiento que mejor ha funcionado es el FL.

3.5 Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo biológico (forzado)

Ya se comentó el interés de que todos los tratamientos, suelos y microcosmos y parcelas salgan de un mismo valor inicial de TPH para que sea, intuitivamente, más aproximado a lo que

ocurrió en la realidad. Para obtener un modelo que predijera mejor esta primera etapa sería necesario hacer más muestreos en esta etapa de descenso brusco de TPHs.

3.5.1 Variables utilizadas en el modelo

Las variables utilizadas para la realización de este modelo son todas las variables controladas y la variables no controlada de tipo biológico (BD, bacterias degradadoras como variable independiente) y nuevamente la variable no controlada TPH (que va a ser la variable dependiente). Con este modelo lo que pretendemos es observar cómo el TPH evoluciona en función del tiempo, cómo influyen las variables controladas en dicha evolución, forzando para que todos los tratamientos salgan desde un mismo punto.

El modelo y los coeficientes de la ecuación que se va a describir ahora sólo considera independiente del tiempo (k_1) la variable concentración “con” (antes se permitía variar el valor inicial de TPH en función de la concentración teórica inicial, de las bacterias degradadoras y del resto de las variables controladas: tipo de suelo “ts”, tratamientos “trat” y diferencia entre parcelas y microcosmos “np”), de todas formas estas variables son incluidas para encontrar los coeficientes de la ecuación que predice el comportamiento de los TPHs.

3.5.2 Expresión matemática y valores de los coeficientes

La ecuación obtenida, cuya explicación detallada se encuentra en el anexo 3, que predice el comportamiento de los TPHs a lo largo del tiempo y de la variación de las bacterias degradadoras para cada uno de los casos que hemos estudiado, la ecuación está regida por la siguiente expresión:

Ecuación 3.6

$$TPH = e^{k_1 + k_2 \times t + k_3 \times t \times BD}$$

El valor de los coeficientes, para todos los casos estudiados, se resume en la , que se muestra a continuación

3.5.3 Observaciones

- Lo primero que se observa en la tabla es que el coeficiente k_1 es igual para parcelas y microcosmos de 10.000 ppm y también es igual para parcelas y microcosmos de

20.000 ppm. Lo cual es lógico dado que hemos forzado al modelo a que cumpla este requisito.

- A la hora de interpretar k_2 y k_3 ya existen más dificultades. En principio k_2 nos indicaría cómo disminuyen los TPHs en función del tiempo y k_3 nos indicaría cómo influye el número de bacterias en esta disminución de los TPHs a lo largo del tiempo.
 - Lo primero que llama la atención en k_2 es que justo para los tratamientos FF y FF/S y en el caso de parcelas, el coeficiente es positivo; es decir, que hace aumentar el valor del TPH. Esto se pone aquí a modo de curiosidad dado que en algún momento parecía que aumentaban los TPHs justo con estos tratamientos y se pensó (aunque luego se descartó) si podía ser debido a que llevaran algún hidrocarburo fácilmente biodisponible para estimular a las bacterias. Esto no ocurre en el caso de los microcosmos, quizá porque la adición del FF se hizo mejor que en las parcelas y funcionó mejor que en las mismas.
 - Otra observación que se puede hacer es ver la influencia del número de bacterias en los distintos tratamientos en función del tiempo. Como el logaritmo del recuento de bacterias degradadoras oscila entre 5 y 10, se puede observar cómo influye el número de bacterias en la degradación final en cada uno de los tratamientos. Dado que la fórmula es:

Tabla 3.4. Coeficientes ecuaciones modelo variables biológicas (forzado)

PARCELAS							
SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.55	-5.12E-03	3.73E-04	10.0162	-5.05E-03	3.73E-04
	FF		2.18E-03	-6.70E-04		3.47E-03	-6.70E-04
	FF/S		1.45E-03	-5.52E-04		2.40E-03	-5.52E-04
	FL		-3.71E-03	1.10E-06		-3.26E-03	1.10E-06
	FL/S		-3.03E-03	-1.25E-04		-3.59E-03	-1.25E-04
	S		-1.14E-03	-1.70E-04		-3.07E-04	-1.70E-04

SUELO 2							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.55	-5.95E-03	3.73E-04	10.0162	-5.89E-03	3.73E-04
	FF		2.82E-03	-6.70E-04		4.11E-03	-6.70E-04
	FF/S		2.14E-03	-5.52E-04		3.09E-03	-5.52E-04
	FL		-4.56E-03	1.10E-06		-4.11E-03	1.10E-06
	FL/S		-3.05E-03	-1.25E-04		-3.62E-03	-1.25E-04
	S		-1.14E-03	-1.70E-04		-3.07E-04	-1.70E-04

	S		-1.10E-03	-1.70E-04		-2.64E-04	-1.70E-04
--	---	--	-----------	-----------	--	-----------	-----------

MICROCOSMOS

SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.55	-2.08E-03	-2.10E-04	10.0162	-2.01E-03	-2.10E-04
	FF		-5.87E-03	1.21E-03		-4.58E-03	1.21E-03
	FF/S		-5.55E-03	9.67E-04		-4.60E-03	9.67E-04
	FL		-5.40E-03	5.33E-04		-4.96E-03	5.33E-04
	FL/S		-6.42E-03	7.81E-04		-6.99E-03	7.81E-04
	S		-4.79E-03	6.16E-04		-3.96E-03	6.16E-04

SUELO 2							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.55	-2.91E-03	-2.10E-04	10.0162	-2.85E-03	-2.10E-04
	FF		-5.23E-03	1.21E-03		-3.94E-03	1.21E-03
	FF/S		-4.86E-03	9.67E-04		-3.91E-03	9.67E-04
	FL		-6.26E-03	5.33E-04		-5.81E-03	5.33E-04
	FL/S		-6.45E-03	7.81E-04		-7.01E-03	7.81E-04
	S		-4.74E-03	6.16E-04		-3.91E-03	6.16E-04

Ecuación 3.7

$$\log(TPH) = k_1 + k_2 \times t + k_3 \times BD \times t = k_1 + (k_2 + k_3 \times BD) \times t$$

Se puede calcular el valor de $(k_2 + k_3 \times BD)$ y ver cómo varía entre los distintos tratamientos para ver cuáles de ellos hacen disminuir más rápidamente el TPH (ver). En la tabla se ha calculado este valor para un valor de logaritmo de bacterias de degradadoras de 5 (que se ha supuesto mínimo) y de 10 (que se ha supuesto máximo). Al mismo tiempo se ha restado el término calculado con menor número de bacterias $(k_2 + 5k_3)$ al de mayor número $(k_2 + 10k_3)$ resultando la columna $5k_3$ de la tabla 3.9 $((k_2 + 10k_3) - (k_2 + 5k_3) = 5k_3)$ para ver si la variación de bacterias influía mucho en la disminución de TPH a lo largo del tiempo para cada uno de los tratamientos (Sería una forma de hacer un análisis de sensibilidad del modelo frente a BD). Lo que se observa es que en todas las parcelas tanto del suelo 1 como del 2, tanto de 10.000 como de 20.000 ppm, el término $5k_3$ es independiente del tipo de suelo y de la concentración inicial; sólo varía con el tratamiento y con si es parcela o microcosmos. Lo mismo ocurre para el caso de microcosmos de suelo 1 y 2, de 10.000 y de 20.000 ppm. A continuación se

ordenarán los tratamientos en los cuales el número de bacterias influye más sobre la variación de TPH a lo largo del tiempo (de menor a mayor influencia):

Parcelas: $FL < S \approx FL/S < C \approx FF/S \approx FF$

Microcosmos: $C \approx FL \approx S \approx FL/S \approx FF/S \approx FF$

- Lo que llama la atención es que esta influencia está en términos absolutos; es decir, que un aumento de bacterias lo que lleva asociado en algunos casos es un aumento de TPHs. Esto, así dicho, no tiene mucho sentido; la única explicación que se nos puede ocurrir es que, al principio, la cantidad de bacterias degradadoras es menor y, el descenso de TPHs es más brusco, mientras que, al final, la cantidad de bacterias degradadoras es mayor (en general la tendencia es más o menos creciente a lo largo de toda la experiencia) y, sin embargo, los TPHs disminuyen más lentamente. Según la Otra observación que se puede hacer es ver la influencia del número de bacterias en los distintos tratamientos en función del tiempo. Como el logaritmo del recuento de bacterias degradadoras oscila entre 5 y 10, se puede observar cómo influye el número de bacterias en la degradación final en cada uno de los tratamientos. Dado que la fórmula es:

Tabla 3.4 vamos a ver a continuación los tratamientos que al aumentar el número de bacterias harían aumentar los TPHs a medida que pasa el tiempo. En el caso de las parcelas, esto ocurriría para los tratamientos C y, en menor medida FL. En el caso de los microcosmos, esto ocurriría para los tratamientos $FL < S \approx FL/S < FF/S < FF$.

Tabla 3.5. Comparación de la suma de los coeficientes ($K_2 + BD * K_3$) en función del número de bacterias degradadoras (BD=5 y BD=10)

PARCELAS							
SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$
TRATAMIENTO	C	-3.25E-03	-1.39E-03	1.87E-03	-3.19E-03	-1.32E-03	1.87E-03
	FF	-1.17E-03	-4.52E-03	-3.35E-03	1.21E-04	-3.23E-03	-3.35E-03
	FF/S	-1.31E-03	-4.07E-03	-2.76E-03	-3.57E-04	-3.12E-03	-2.76E-03
	FL	-3.70E-03	-3.69E-03	5.50E-06	-3.26E-03	-3.25E-03	5.50E-06
	FL/S	-3.65E-03	-4.28E-03	-6.26E-04	-4.22E-03	-4.84E-03	-6.27E-04
	S	-1.99E-03	-2.84E-03	-8.52E-04	-1.16E-03	-2.01E-03	-8.52E-04
SUELO 2							

	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$
TRATAMIENTO	C	-4.09E-03	-2.22E-03	1.87E-03	-4.02E-03	-2.16E-03	1.87E-03
	FF	-5.29E-04	-3.88E-03	-3.35E-03	7.60E-04	-2.59E-03	-3.35E-03
	FF/S	-6.19E-04	-3.38E-03	-2.76E-03	3.33E-04	-2.43E-03	-2.76E-03
	FL	-4.55E-03	-4.55E-03	5.50E-06	-4.11E-03	-4.10E-03	5.50E-06
	FL/S	-3.68E-03	-4.31E-03	-6.26E-04	-4.25E-03	-4.87E-03	-6.27E-04
	S	-1.95E-03	-2.80E-03	-8.52E-04	-1.12E-03	-1.97E-03	-8.52E-04

MICROCOSMOS

SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$
TRATAMIENTO	C	-3.13E-03	-4.18E-03	-1.05E-03	-3.06E-03	-4.11E-03	-1.05E-03
	FF	1.65E-04	6.20E-03	6.03E-03	1.45E-03	7.49E-03	6.03E-03
	FF/S	-7.14E-04	4.12E-03	4.84E-03	2.38E-04	5.07E-03	4.84E-03
	FL	-2.74E-03	-6.90E-05	2.67E-03	-2.29E-03	3.74E-04	2.67E-03
	FL/S	-2.52E-03	1.39E-03	3.90E-03	-3.08E-03	8.22E-04	3.90E-03
	S	-1.71E-03	1.37E-03	3.08E-03	-8.77E-04	2.20E-03	3.08E-03

SUELO 2							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$	K_2+5k_3	K_2+10k_3	$5k_3$
TRATAMIENTO	C	-3.96E-03	-5.01E-03	-1.05E-03	-3.90E-03	-4.95E-03	-1.05E-03
	FF	8.03E-04	6.84E-03	6.03E-03	2.09E-03	8.12E-03	6.03E-03
	FF/S	-2.34E-05	4.81E-03	4.84E-03	9.29E-04	5.76E-03	4.84E-03
	FL	-3.59E-03	-9.22E-04	2.67E-03	-3.15E-03	-4.78E-04	2.67E-03
	FL/S	-2.55E-03	1.36E-03	3.90E-03	-3.11E-03	7.93E-04	3.90E-03
	S	-1.67E-03	1.41E-03	3.08E-03	-8.34E-04	2.24E-03	3.08E-03

En el caso de las parcelas: Los TPHs varían más justo al principio del tratamiento (entre la campaña 1 y 2) que es cuando más rápido aumentan las bacterias degradadoras. Los tratamientos FL y FL/S son los que mejor van en este período (alcanzan antes el máximo número de bacterias degradadoras para luego disminuir ligeramente y estabilizarse, de ahí que la diferencia del número de bacterias degradadoras en cuanto a la degradación de los TPHs en el tiempo sea mínima; porque se estabilizan enseguida ambos parámetros). A lo largo de la evolución de los tratamientos en el tiempo cobran más importancia los FF y FF/S dado que $5k_3$ es mayor (hay mayor disminución de TPHs a medida que aumenta el número de bacterias degradadoras – ambos parámetros tardan más en estabilizarse y, se ve mejor su influencia relativa. Al tardar más tiempo en alcanzarse el máximo de bacterias degradadoras en el caso de los tratamientos FF y FF/S llegará un momento que empiezan a degradar más rápidamente los TPHs que en el caso de los tratamientos FL y FL/S.

Figura 3.7. Parcelas TPH y BD vs Tiempo (modelo forzado)

La conclusión de todo lo anterior es que justo en aquellos casos en los que el tratamiento ha ido mejor y más rápido al inicio del experimento, cuando se fuerza a que todos partan de un mismo punto, se llega a conclusiones erróneas en la parte del experimento que va más lento (casi constante). Por lo tanto, en este caso el modelo a utilizar es claramente el anterior, en el que se deja libre el TPH inicial.

En las figuras 3.7 y 3.8 podemos observar los resultados obtenidos de la modelización para parcelas y microcosmos respectivamente donde podemos ver claramente que los tratamientos que mejor funcionan son el FL y FL/S y corroborar lo dicho en los párrafos anteriores.

Figura 3.8. Parcelas TPH y BD vs Tiempo (modelo forzado)

3.6 Comparación entre los modelos en función del tiempo y las variables de tipo biológico

- En este caso se ha considerado interesante hacer las comparaciones de los resultados que se obtuvieron sin tener en consideración las bacterias en el modelo y los que se tienen ahora en estos nuevos modelos que incluyen las bacterias. De esta forma podemos ver las diferencias debidas a la influencia de las bacterias únicamente.
- En los dos suelos, a concentraciones iniciales de TPH menores (10.000 ppm), el tratamiento que mejor favorece la biodegradación a lo largo del tiempo es el FF/S, quedando más patente en el suelo 1 que en el 2 (aunque en el microcosmos del suelo 1 la eficiencia se puede asimilar al de control).
- En los dos suelos, a concentraciones iniciales de TPH menores (10.000 ppm), el tratamiento que mejor parece favorecer la degradación abiótica a lo largo del tiempo es el FL (aunque en el microcosmos del suelo 1 la eficiencia se puede asimilar al de control).

- En el caso de concentraciones iniciales de TPH mayores (20.000 ppm), el tratamiento que mejor favorece la biodegradación a lo largo del tiempo es, en general, también el FF/S (aunque se observa mejor a concentraciones iniciales de 10.000 ppm). Aunque en el caso de parcelas del suelo 2 se asemeja al FL y en el caso de microcosmos del suelo 1 se asemeja al C.
- En el caso de concentraciones iniciales de TPH mayores (20.000 ppm), el tratamiento que mejor favorece los procesos abióticos a lo largo del tiempo es, en general, el FL/S. Aunque en el caso de parcelas del suelo 2 también parece observarse que el FF/S favorece los procesos abióticos.
- En el caso tanto del suelo 1 como del 2, tanto en parcelas como en microcosmos, los tratamientos que mejor favorecen la biodegradación inicial para concentraciones iniciales de TPHs de 10.000 ppm son el FL y el FL/S.
- En general, los fertilizantes oleofílicos han favorecido la biodegradación a lo largo del tiempo, mientras que los fertilizantes de liberación lenta han favorecido la biodegradación inicial. Sin embargo, los FL favorecen hasta tal punto la biodegradación inicial, que en muchos casos, su eficiencia global aún no ha sido superada por los FF. Es de destacar, cómo en los microcosmos sí que el FF/S ha llegado a alcanzar al FL y al FL/S en la mayoría de los casos mientras que en las parcelas todavía queda bastante para que el FF/S alcance los resultados obtenidos con el FL y FL/S.

3.7 Modelo matemático del TPH en función del tiempo y las variables de tipo químico (forzado)

3.7.1 Variables utilizadas en el modelo

Las variables utilizadas para la realización de este modelo son todas las variables controladas y las variables no controladas de tipo químico (que van a ser las variables independientes), es decir, el índice octadecano/fitano (C18.F), el índice hexadecano/nor-pristano (C16.NP), la relación picos/áreas (P.A), y nuevamente la variable no controlada TPH (que va a ser la variable dependiente). Con este modelo lo que pretendemos es observar cómo el TPH evoluciona en función del tiempo, cómo influyen las variables controladas en dicha evolución y determinar qué variable(s) química(s) es más indicativa de la disminución (por biodegradación) del TPH. Para los índices químicos, el valor inicial (a $t=0$) que se ha tomado es el valor máximo de dicho índice en la primera campaña. No se ha escogido el del producto inicial porque puede variar

ligeramente en función de la concentración a la que se pinchan las muestras y, para ello se ha considerado mejor no introducir dicha perturbación en el modelo.

A la hora de ver la dependencia del TPH con los índices, se observó que el índice que mejor se ajusta a los TPHs es el de picos/áreas, dado que es el que mayores variaciones ha tenido a lo largo de toda la experiencia. Sin embargo, no se puede olvidar que este índice está influenciado tanto por procesos biológicos como abióticos. El grado de ajuste de los modelos cuando se elige un índice u otro para explicar la evolución del TPH en el tiempo es muy similar; por lo tanto se podría escoger cualquiera de ellos para estudiar cómo varían cada uno de los índices a medida que se va degradando el TPH.

El índice que se ha escogido para hacer un estudio detallado es el del octadecano/fitano (C18.F) dado que es el índice más utilizado en este tipo de estudios y, a la hora de hacer el modelo, permite un mejor ajuste que el hexadecano/nor-pristano (el índice P/A es mucho menos utilizado y ya ha quedado dicho que el modelo es prácticamente similar al C18/F).

Como se ha visto a lo largo de la experiencia este índice ha variado poco por lo que el modelo va a encontrar pocas diferencias significativas; no obstante, dada la amplia utilización de este índice a la hora de hacer el seguimiento de biodegradación en la bibliografía, se considera interesante extraer el máximo de información posible basándonos en él.

Antes de comenzar, conviene aclarar que el modelo solamente será válido mientras que el índice C18.F no llegue a cero, además y lógicamente, sabemos que para valores de dicho índice igual a cero puede seguir habiendo disminución de TPHs pero, el modelo es incapaz de saberlo.

Al realizar el modelo no forzado, se puede observar (ver tabla 3.10 en anexo 3) que este modelo utiliza casi todas las interacciones entre las distintas variables para poder explicar la evolución del TPH y, dado que pocas de estas interacciones tienen una diferencia significativa; no es un modelo que explique de forma adecuada lo que está ocurriendo realmente. Además, se puede observar que los términos que no dependen del tiempo no presentan ninguna diferencia significativa para ninguno de los casos ni tratamientos de los que consta la experiencia, parece ser que lo que nos está indicando el modelo es que todos los valores iniciales de TPH no van a ser significativamente diferentes a tiempo cero. Igual, al tener en cuenta tantas variables que influyen un poco, al final no hay ninguna variable que influya de forma significativa para el modelo; aunque la lógica nos dice que esto no es así porque, al menos, debería haber una diferencia significativa entre las de 10.000 y 20.000 ppm (que

tampoco la encuentra). Por lo tanto, se ha considerado que este modelo no explica satisfactoriamente la evolución de los TPH teniendo en cuenta el tiempo y el índice C18.F; además, el propio modelo nos está llevando hacia la realización de un modelo forzado, en el que sería conveniente fijar los valores iniciales de TPH. Además, conviene destacar que en el modelo forzado (en el cual se han fijado los valores iniciales de TPH) se observa que hay más factores significativos, que en el no forzado, que interactúan con el tiempo; es decir que el modelo observa más diferencias significativas en la evolución de los TPHs entre los distintos tratamientos para cada uno de los casos estudiados.

La expresión resultante y los coeficientes de la misma se pueden observar en el siguiente apartado.

3.7.2 Expresión matemática y valores de los coeficientes

Este modelo también dio como resultado una función logarítmica, es decir, el ajuste del logaritmo de TPH es función del tiempo de extracción (T_{ex}), del índice octadecano/fitano (C18.F), de la concentración (con), del tipo de suelo (ts), del tratamiento (trat), de la variable que indica parcelas o microcosmos (np) y de la interacción de cada una de las variables discretas con el tiempo de extracción y el índice octadecano/fitano.(variables continuas).

Una explicación detallada de cómo se han obtenido los coeficientes de la expresión, que se muestra a continuación se la puede ver en el anexo 3. Con esta ecuación se podría predecir el comportamiento de los TPHs a lo largo del tiempo y de la variación del índice c18.f para cada uno de los casos que hemos estudiado. La ecuación está regida por la siguiente expresión:

$$TPH = e^{k_1 + k_2 \times t + k_3 \times t \times c18f}$$

Los valores de los coeficientes para cada uno de los casos estudiados se puede observar en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Coeficientes ecuaciones parcelas y microcosmos

PARCELAS							
SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.6492605	-1.23E-03	-4.21E-04	10.287572	5.54E-03	-5.73E-03
	FF		-4.17E-03	4.09E-04		2.29E-03	-4.90E-03
	FF/S		-7.18E-03	3.09E-03		-8.50E-04	-2.21E-03
	FL		1.05E-03	-5.00E-03		1.29E-03	-1.03E-02
	FL/S		-9.58E-04	-3.26E-03		7.72E-05	-8.57E-03
	S		-6.51E-03	2.39E-03		1.97E-03	-2.92E-03
SUELO 2							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.6492605	-3.34E-03	-4.21E-04	10.287572	3.43E-03	-5.73E-03
	FF		-3.29E-03	4.09E-04		-2.51E-04	-4.90E-03
	FF/S		-4.98E-03	3.09E-03		-1.14E-03	-2.21E-03
	FL		-1.70E-03	-5.00E-03		5.70E-04	-1.03E-02
	FL/S		-2.25E-03	-3.26E-03		-7.98E-04	-8.57E-03
	S		-4.57E-03	2.39E-03		-9.58E-04	-2.92E-03
MICROCOSMOS							
SUELO 1							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.6492605	-3.86E-03	-4.21E-04	10.287572	1.84E-03	-5.73E-03
	FF		-5.58E-03	4.09E-04		5.55E-04	-4.90E-03
	FF/S		-9.04E-03	3.09E-03		-3.37E-03	-2.21E-03
	FL		3.94E-04	-5.00E-03		5.89E-03	-1.03E-02
	FL/S		-2.09E-03	-3.26E-03		2.63E-03	-8.57E-03
	S		-7.92E-03	2.39E-03		-2.97E-04	-2.92E-03
SUELO 2							
	CONC.	10000 ppm			20000 ppm		
	COEF.	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
TRATAMIENTO	C	9.6492605	-3.91E-03	-4.21E-04	10.287572	9.46E-04	-5.73E-03
	FF		-4.96E-03	4.09E-04		1.61E-03	-4.90E-03
	FF/S		-8.13E-03	3.09E-03		-2.45E-03	-2.21E-03
	FL		1.31E-03	-5.00E-03		6.51E-03	-1.03E-02
	FL/S		-1.20E-03	-3.26E-03		1.24E-03	-8.57E-03
	S		-7.57E-03	2.39E-03		-7.48E-04	-2.92E-03

3.7.3 Observaciones

- Lo primero que se observa en la tabla es que el coeficiente k_1 es igual para parcelas y microcosmos de 10.000 ppm y también es igual para parcelas y microcosmos de 20.000 ppm. Lo cual es lógico dado que hemos forzado al modelo a que cumpla este requisito.
- A la hora de interpretar k_2 y k_3 ya existen más dificultades. En principio k_2 nos indicaría cómo disminuyen los TPHs en función del tiempo y k_3 nos indicaría cómo influye el índice C18/fitano en esta disminución de los TPHs a lo largo del tiempo. En este modelo nos vamos a centrar únicamente en el k_3 , que es el coeficiente que nos va a indicar la relación entre el tiempo, el índice C₁₈/fitano y los TPHs.
 - Lo primero que llama la atención es que k_3 sólo varía con los tratamientos y con la concentración inicial; por ejemplo, el valor de k_3 es igual para el control del suelo 1 y 2 de parcelas y microcosmos con concentración inicial de 10.000 ppm. Esto indica que el comportamiento del índice C18/fitano a lo largo del tiempo es independiente del tipo de suelo y de si es parcela o microcosmos; solamente le influye el tipo de nutrientes y la concentración teórica inicial.
 - En el caso de suelo 1 y suelo 2, microcosmos y parcelas con concentración teórica inicial de 10.000 ppm, el tratamiento para el cual el índice disminuye más para un mismo intervalo de tiempo y, por lo tanto, hace disminuir más el TPH sería el FL (hay que tener en cuenta que al ser modelo forzado la variación inicial va a tener mucho peso a la hora de ver cómo varía el índice con el tiempo).
 - Si ordenamos todos los tratamientos de menor a mayor disminución del índice para un mismo intervalo de tiempo serían:

$$FF < FF/S < S < C < FL/S < FL$$

- Conviene prestar atención al signo de este coeficiente. Los tratamientos FL, FL/S y C muestran que en un mismo intervalo de tiempo, una disminución del índice ha hecho disminuir aún más rápido el TPH (signo negativo). Sin embargo, en el caso de los tratamientos FF, FF/S y S no ha habido una disminución clara del índice C18/fitano como para relacionarla con una disminución más rápida del TPH. Esto podría indicarnos que la degradación en estos tratamientos no es tanto del tipo biológico como en los otros indicados anteriormente.

- En el caso de suelo 1 y suelo 2, microcosmos y parcelas con concentración teórica inicial de 20.000 ppm, el tratamiento para el cual el índice disminuye más para un mismo intervalo de tiempo y, por lo tanto, hace disminuir más el TPH sería el FL (hay que tener en cuenta que al ser modelo forzado la variación inicial va a tener mucho peso a la hora de ver cómo varía el índice con el tiempo).
 - Si ordenamos todos los tratamientos de menor a mayor disminución del índice para un mismo intervalo de tiempo serían:

$$FF/S \approx S < FF < C < FL/S < FL$$

- En este caso todos los tratamientos tienen un signo negativo; es decir, todos los tratamientos muestran que en un mismo intervalo de tiempo, una disminución del índice ha hecho disminuir aún más rápido el TPH (signo negativo). Esto podría explicarse como que para una misma disminución del índice, en los casos de concentración teórica inicial de 20.000, el TPH disminuye más rápidamente que en el caso de concentración teórica de 10.000 ppm.

Hay que tener en cuenta a la hora de observar estas conclusiones que estamos trabajando con el modelo forzado, por lo tanto lo que más influye en las mismas es el comportamiento que tuvo el sistema al principio de la experiencia.

En las figuras 3.9 y 3.10 podemos observar los resultados obtenidos de la modelización para parcelas y microcosmos respectivamente donde podemos ver claramente que los tratamientos que mejor funcionan son el FL y FL/S y corroborar lo dicho en los párrafos anteriores.

Figura 3.9. TPH con C₁₈/fitano vs TIEMPO PARCELAS Figura 3.10. TPH con C₁₈/fitano vs TIEMPO MICROCOSMOS

3.8 Efectos de los suelos y los nutrientes en la degradación de algunos compuestos

Debido al interés de observar el comportamiento de las diferentes familias y compuestos del diesel al final del proceso de biorremediación, se ha realizado un estudio detallado por GC-MS de los cromatogramas correspondientes a la primera y última campaña de muestreo para parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 20000 ppm, y para cada tratamiento, calculándose porcentajes residuales de las familias de los alcanos, aromáticos, isoprenoides y cicloalcanos, tomando en cuenta además el resto de compuestos que se los ha denominado “otros” presentes en las diferentes parcelas donde se han utilizado los diferentes tratamientos, por lo que se ha procedido:

- Para los alcanos, a extraer el ión 57, determinando su área total,
- Para los cicloalcanos, a extraer el ion 83, determinando su área total,
- Para los isoprenoides, a extraer el ion 183, determinando su área total, y
- Para los aromáticos, a la extracción de los iones característicos de algunos compuestos (que forman parte de la familia de los aromáticos), determinando el área del pico del compuesto.

Un resumen de los iones que se han extraído se puede ver en la Tabla 3.7.

Una vez determinadas las áreas totales de los iones 57 (alcanos), 183 (isoprenoides), 83 (cicloalcanos) y las áreas de los picos de los diferentes compuestos (aromáticos), para parcelas con concentraciones teóricas iniciales de 20000ppm (en las que se observó mayor disminución de los TPHs), entre la primera y última campaña, para los dos tipos de suelos y para cada tratamiento que se ha estudiado a lo largo de la experiencia, dividimos cada una de estas áreas por el área total del cromatograma (TPH) en cada una de estas parcelas, para luego, multiplicarla por respectiva concentración de TPHs, de esta forma, se tiene una idea de la cantidad de cada uno de los compuestos tanto al inicio como al final del experimento. Un resumen del porcentaje residual relativo a la primera campaña, se puede observar en la **figura 1**, donde se muestra tanto el gráfico de barras como los valores correspondientes a cada uno de los compuestos de la Tabla 3.7. Además, se puede observar los resultados para los dos tipos de suelos, donde para dos barras consecutivas, la primera corresponde al suelo 1 y la segunda al suelo 2, siendo, por lo tanto, para cada compuesto o familia 12 barras (6

tratamientos x 2 suelos), por ejemplo la primera y la segunda barra corresponden al tratamiento de control “C” para el suelo 1 y 2 respectivamente.

Tabla 3.7. Iones de los compuestos estudiados

Familia	Compuestos	ION
Alcanos		57
Aromáticos		
	Naftaleno	128
	C1-naftalenos	142
	C2-naftalenos	156
	C3-naftalenos	170
	C4-naftalenos	184
	antraceno/fenantreno	178
	C1-antraceno/fenantreno	192
	C2-antraceno/fenantreno	206
	C3-antraceno/fenantreno	220
	Fluoreno	166
	C1-fluorenos	180
	C2-fluorenos	194
	C3-fluorenos	208
	Aromáticos con azufre	
	C1-dibenzotiofenos	198
	C2-dibenzotiofenos	212
Cicloalcanos		83
Isoprenoides		183

Como observaciones generales, con relación a la Figura 3.11, tenemos que:

- No se encontraron, ni en la primera ni en la última campaña, en ninguno de los tratamientos, naftalenos ni trimetilfluorenos.
- Se han degradado totalmente, en todos los casos, los metilnaftalenos, antracenos/fenantrenos, que son compuestos aromáticos ligeros.
- Se puede decir que los compuestos que menor porcentaje residual presentan, en general, son los compuestos más ligeros y los menos metilados.

Figura 3.11. Porcentaje residual de todos los tratamientos y compuestos

Para poder encontrar, con mayor facilidad, las diferencias en el comportamiento de los tratamientos en los dos suelos se ha realizado un estudio detallado de la evolución de los compuestos según los tratamientos y los dos tipos de suelos utilizados, se ha dividido la figura anterior en dos figuras, una para cada suelo. En la Figura 3.12 podemos observar el gráfico perteneciente al suelo 1 y en la Figura 3.13 el perteneciente al suelo 2.

3.8.1 Comparación de la degradación de compuestos en el suelo 1

Figura 3.12. Porcentajes residuales en el suelo 1

De la Figura 3.12 se pueden realizar las siguientes observaciones con respecto al comportamiento de cada uno de los tratamientos en el suelo 1:

- El comportamiento de los tratamientos en los compuestos denominados “otros”, (que es el porcentaje residual de los compuestos que no han sido tomados en cuenta en este análisis) es muy similar con excepción del tratamiento “S” que presenta, con diferencia, el porcentaje residual más alto.
- Control “C”:
 - En el caso de los alcanos su porcentaje residual es el mayor de todos los tratamientos, por lo tanto el que peor ha funcionado con esta familia.

- En el caso de los compuestos aromáticos, podemos decir que tiene un comportamiento parecido a los tratamientos “FF/S”, “FL” y “FL/S” mientras que el tratamiento “S”, claramente, es el que peor ha funcionado a lo largo de la experiencia en este suelo, además podemos ver que en todos los casos el porcentaje residual de este tratamiento es mayor al del fertilizante oleofílico “FF”.
- Fertilizante Oleofílico “FF”:
 - En el caso de los alcanos su porcentaje residual es bajo siendo solamente superado por el tratamiento “FF/S”.
 - En el caso de los compuestos aromáticos, en todos, es menor que el de control y al resto de tratamientos, incluso algunos compuestos han desaparecido como es el caso de los fluorenos, metilfluorenos y de los metildibenzotiofenos.
 - En el caso de isoprenoides y cicloalcanos, es el que presenta menor porcentaje residual, por lo tanto es el tratamiento que mas ha favorecido la degradación en estos compuestos.
 - Por lo tanto, el comportamiento de este tratamiento mejora, considerablemente, la degradación en este tipo de suelo.
- Fertilizante Oleofílico mas surfactante “FF/S”:
 - En el caso de los alcanos, es el tratamiento que mejor ha funcionado, ya que presenta el menor porcentaje residual.
 - En el caso de los compuestos aromáticos, el comportamiento es muy parecido al de control y al resto de tratamientos, incluso algunos compuestos han desaparecido como es el caso de los fluorenos, metilfluorenos y de los metildibenzotiofenos.
 - En el caso de isoprenoides y cicloalcanos, presenta un porcentaje residual alto, pero inferior al del surfactante “S” (que es el que peor ha funcionado).
 - En el caso de “otros” (compuestos no tomados en cuenta en este análisis), es el tratamiento que menor porcentaje residual presenta.
 - Por lo tanto, el comportamiento de este tratamiento mejora, considerablemente la degradación, en este tipo de suelo, en los alcanos y “otros” compuestos, mientras que para los aromáticos su comportamiento es similar al de control

- Fertilizante de liberación lenta “FL”:
 - En el caso de los alcanos, tiene un porcentaje residual alto, siendo menor, con poca diferencia, con los tratamientos de control y “S”.
 - En el caso de los aromáticos, con este tratamiento existe un porcentaje residual en todos los compuestos, en la mayoría muy parecidos al de control. Donde sí es considerablemente menor el porcentaje residual, con respecto al de control, es en los dimetilnaftalenos.
 - En el caso de isoprenoides, cicloalcanos y “otros” compuestos, se puede decir que el comportamiento es muy similar al de control
 - Por lo tanto, podríamos decir que el comportamiento de este tratamiento ha sido parecido al de control.
- Fertilizante de liberación lenta más surfactante “FL/S”:
 - En el caso de los alcanos, se han degradado mucho mas con respecto al de control, siendo el porcentaje muy parecido al del “FF” pero superior al del “FF/S” (que es el que menor porcentaje residual presenta para esta familia).
 - En el caso de los aromáticos, tiene un comportamiento muy parecido al de control, habiendo casos, como en los dimetilnafatalenos en donde el porcentaje residual es mucho menor con el “FL/S” y el caso de los fluorenos, donde todavía existe un porcentaje residual con este tratamiento y no en el de control.
 - En el caso de isoprenoides, cicloalcanos y “otros”, con este tratamiento se tiene un porcentaje residual similar al que presenta el control.
 - Por lo tanto, podemos decir que con este tratamiento se mejora la degradación de alcanos con respecto al de control y que el comportamiento en los aromáticos, isoprenoides, cicloalacanos y “otros” compuestos es muy similar.
- Surfactante “S”:
 - En el caso de los alcanos, el porcentaje residual es ligeramente inferior al de control. Siendo estos dos tratamientos los que peor han favorecido la degradación de esta familia.

- En el caso de los aromáticos, isoprenoides, cicloalcanos y “otros” compuestos, es con el tratamiento donde mayor porcentaje residual se observa, es decir que es el tratamiento que menos ha favorecido la degradación de todos estos compuestos, en este tipo de suelo.
- Por lo tanto, este tratamiento, es el que peor ha favorecido la degradación en este tipo de suelo.

3.8.2 Comparación de la degradación de compuestos en el suelo 2

Figura 3.13. Porcentajes residuales en el suelo 2

De la Figura 3.13 se pueden realizar las siguientes observaciones con respecto al desempeño de cada uno de los tratamientos en el suelo 2:

- En general, en este tipo de suelo, han desaparecido completamente los dimetilnaftalenos y trimetilnaftalenos.
- Control “C” :
 - En el caso de los alcanos su porcentaje residual es uno de los menores, siendo solamente mayor al del tratamiento “FL/S” (tratamiento que más ha favorecido la degradación en este tipo de suelo).
 - En el caso de los compuestos aromáticos, han desaparecido completamente los tetrametilnaftalenos, los metilantracenos y metildibenzotiofenos. En el

resto de compuestos, el porcentaje residual es uno de los más altos, siendo, en casi la mayoría de compuestos, el comportamiento similar al “FF” .

- En el caso de isoprenoides y cicloalcanos, es el tratamiento conjuntamente con el fertilizante oleofílico “FF” los que menos han favorecido la degradación de estos compuestos.
 - En el caso de “otros” compuestos también es uno de los que menos ha favorecido la degradación de estos compuestos, al igual que el “FF/S” y “FF”.
- Fertilizante Oleofílico “FF”:
 - En el caso de los alcanos su porcentaje residual es mayor que el de control y prácticamente igual al del “FF/S” pero muy inferior al del “FL” (tratamiento que peor ha funcionado en esta familia y este tipo de suelo), además, mayor al del “FL/S” (tratamiento que más ha favorecido la degradación en este tipo de suelo).
 - En el caso de los compuestos aromáticos, isoprenoides, cicloalcanos y “otros”, su comportamiento es muy parecido al de control “C”, con la diferencia de que en los compuestos metilfluorenos y dimetilfluorenos han desaparecido mientras que todavía existe un porcentaje residual con el de control.
 - Por lo tanto, el comportamiento de este tratamiento es muy similar al de control en este tipo de suelo.
 - Fertilizante Oleofílico mas surfactante “FF/S”:
 - En el caso de los alcanos, prácticamente tiene el mismo porcentaje residual que el tratamiento “FF”.
 - En el caso de los aromáticos, han desaparecido completamente la mayoría de compuestos, solamente quedando un porcentaje residual, y además el menor en los fluorenos.
 - En el caso de isoprenoides y cicloalcanos, el porcentaje residual es muy parecido al del “FL/S” y “S”, siendo estos tres tratamientos los que mas han favorecido la degradación en este tipo de compuestos.
 - En el caso de “otros” (compuestos que no se han tomado en cuenta en este análisis), se puede observar que este tratamiento presenta el mayor porcentaje residual, pero similar al de control y al de “FF”.

- Por lo tanto, podemos considerar que mejora considerablemente la degradación en comparación con el de control y al tratamiento “FF” en este tipo de suelo.
- Fertilizante de liberación lenta “FL”:
 - En el caso de los alcanos, es el que presenta el mayor porcentaje residual y con gran diferencia.
 - En el caso de los aromáticos, con este tratamiento se observa un porcentaje residual menor que el de control en todos los compuestos a excepción de los metildibenzotiofenos.
 - En el caso de isoprenoides, cicloalcanos y “otros” el porcentaje residual es menor que el de control y ligeramente superior a los porcentajes residuales del “FL/S” y “S” (que son los tratamientos que mejor han funcionado en estos compuestos y este suelo).
 - Por lo tanto, podríamos decir que el comportamiento de este tratamiento no ha favorecido la degradación de los alcanos, pero si ha mejorado la degradación de los aromáticos, isoprenoides, cicloalcanos y “otros”, con respecto al de control.
- Fertilizante de liberación lenta más surfactante “FL/S”:
 - En el caso de los alcanos, es el tratamiento que más ha favorecido la degradación de esta familia.
 - En el caso de los aromáticos, es uno de los tratamientos, al igual que el “S”, que menor porcentaje residual presentan. También tenemos que tomar en cuenta que este tratamiento presenta, conjuntamente con el “S”, el menor porcentaje residual en los isoprenoides, cicloalcanos y “otros”.
 - Por lo tanto, podemos decir que este tratamiento es el que mejor ha favorecido la degradación de todos los compuestos en este tipo de suelo.
- Surfactante “S”:
 - En el caso de los alcanos, el porcentaje residual es alto, estando solamente por debajo del “FL” (tratamiento que peor ha funcionado con esta familia).

- En el caso de los aromáticos, isoprenoides, cicloalcanos y “otros”, su comportamiento es muy similar al del “FL/S”. Siendo estos dos tratamientos los que más han favorecido la degradación de estos compuestos.
- Por lo tanto podemos decir que este tratamiento no ha hecho disminuir demasiado los alcanos, pero que ha favorecido en gran medida la degradación de aromáticos, isoprenoides, cicloalcanos y “otros” compuestos.

3.8.3 Comparación de la degradación entre suelos

En la Figura 3.14 tenemos un gráfico donde se compara el comportamiento de los tratamientos entre los dos suelos. Cada barra representa la diferencia entre el porcentaje residual de cada tratamiento en el suelo 2 menos el porcentaje residual del mismo tratamiento en el suelo 1, por tanto, un valor positivo significa que dicho tratamiento ha favorecido mucho más la degradación en el suelo 2 que en el suelo 1.

Figura 3.14. Comparación entre suelos por tratamiento

De Figura 3.14 se puede observar lo siguiente:

- En el caso de los alcanos:
 - Los tratamientos que mejor han funcionado en el suelo 2 son el de control y el fertilizante de liberación lenta mas surfactante “FL/S”.

- El resto de tratamientos han funcionado mejor en el suelo 1, siendo el tratamiento “FL” el que mayor diferencia presenta.
- En el caso de los aromáticos:
 - El tratamiento de control, ha funcionado mejor en el suelo 2 en los dimetilnaftalenos, trimetilnaftalenos, metilantracenos, dimetilantracenos, metilfluorenos y metildibenzotiofenos, mientras que en el resto de compuestos ha funcionado mejor en el suelo 1.
 - El tratamiento “FF” ha funcionado mucho mejor en el suelo 1 en los trimetilantracenos y también tiene una mejoría en este suelo con los fluorenos y dimetilantracenos.
 - El tratamientos “FF/S” ha funcionado mucho mejor en el suelo 2, aunque, solamente, en los fluorenos existe una pequeña diferencia.
 - El tratamiento “FL” también ha funcionado mejor en el suelo 2, con la misma excepción que en el caso anterior.
 - El tratamiento “FL/S” ha funcionado, en todos los compuestos, mejor en el suelo 2.
 - El tratamiento “S” ha funcionado, con gran diferencia, mucho mejor en el suelo 2.
- En el caso de isoprenoides:
 - Los tratamientos de control y “FF” han funcionado mucho mejor en el suelo 1, siendo el fertilizante oleofílico “FF” el que mayor diferencia presenta.
 - El tratamiento “FF/S” ha funcionado mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.
 - Los tratamientos “FL” y “FL/S” han funcionado ligeramente mejor en el suelo 2 que en el 1.
 - El tratamiento “S” ha funcionado, con gran diferencia, mucho mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.
- En el caso de cicloalcanos:
 - Los tratamientos de control y “FF” han funcionado mucho mejor en el suelo 1, siendo el fertilizante oleofílico “FF” el que mayor diferencia presenta.
 - El tratamiento “FF/S” ha funcionado mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.
 - El tratamineto “FL” ha funcionado ligeramente mejor en el suelo 1 que en el suelo 2.
 - El tratamiento “FL/S” ha funcionado ligeramente mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.

- El tratamiento “S” ha funcionado, con gran diferencia, mucho mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.
- En el caso de “otros” compuestos:
 - Los tratamientos de control, “FF” y “FF/S” han funcionado mucho mejor en el suelo 1, siendo el fertilizante oleofílico mas surfactante “FF/S” el que mayor diferencia presenta.
 - El tratamineto “FL” ha funcionado ligeramente mejor en el suelo 1 que en el suelo 2.
 - El tratamiento “FL/S” ha funcionado ligeramente mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.
 - El tratamiento “S” ha funcionado, con gran diferencia, mucho mejor en el suelo 2 que en el suelo 1.

Todas estas observaciones quedan resumidas en la tabla 2, donde se ha coloreado cada una de las celdas, tomando en cuenta el valor del porcentaje residual de cada tratamiento y en cada suelo (para las familias de compuestos incluídas en este estudio), con una escala de colores que va desde el verde, para los tratamientos en donde existe el menor porcentaje residual de las diferentes familias, hasta el rojo para los tratamientos con el mayor porcentaje residual.

Tabla 3.8. Resultados resumidos y coloreados

TRATAMIENTO	C	FF	FF/S	FL	FL/S	S	COMPUESTOS
SUELO 1	0.41	0.23	0.15	0.34	0.26	0.38	alcanos
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.19	PAH
	1.05	0.37	0.79	1.04	0.91	2.37	Cn-PAH
	0.14	0.04	0.06	0.21	0.16	0.36	Cn-DBTF
	0.23	0.05	0.31	0.23	0.24	0.61	iso-alcanos
	0.31	0.10	0.40	0.29	0.33	0.76	ciclo-alcanos
	0.27	0.22	0.19	0.28	0.27	0.70	“otros”
SUELO 2	0.27	0.34	0.34	0.70	0.22	0.46	alcanos
	0.08	0.10	0.03	0.06	0.00	0.00	PAH
	0.67	0.40	0.00	0.30	0.18	0.12	Cn-PAH
	0.13	0.04	0.00	0.11	0.03	0.02	Cn-DBTF
	0.38	0.39	0.16	0.22	0.19	0.17	iso-alcanos
	0.50	0.52	0.28	0.34	0.27	0.25	ciclo-alcanos
	0.48	0.41	0.52	0.31	0.25	0.23	“otros”

4 Conclusiones

- I. Los niveles de degradación alcanzados tras un año de seguimiento son muy apreciables, y destacables, más de un 80%, especialmente en el caso de las parcelas con fertilizante de liberación lenta (con o sin surfactante). Las mejoras obtenidas respecto al control (que no era tal puesto que se regaba y aireaba) oscilan al final entre 10 y 20 puntos porcentuales respecto a las concentraciones de partida, habiendo sido mayores transcurridos entre tres y seis meses del inicio de los trabajos.
- II. Como consecuencia de lo anterior, y genéricamente, el proceso se ha dividido en dos fases; una primera en la que la bioestimulación en todas las parcelas ha permitido un crecimiento exponencial de los microorganismos y que se ha plasmado en reducciones de TPH y de los índices de biodegradación. En esta primera fase por tanto, la degradación de los hidrocarburos ha sido mayoritariamente biológica con lo que las diferencias de cinética entre los tratamientos y entre suelos (algo a favor del suelo II) se han percibido claramente. En una segunda fase la disminución de TPH ha sido mucho más suave y parece que se ha equilibrado la degradación biológica con la abiótica. Como nota para el futuro hay que remarcar que el muestreo debería haber sido más frecuente en la primera fase, y menos en la segunda.
- III. Con los dos tipos de suelo en los tratamientos de FL y FL/S ha sido posible llegar a niveles que rondan o bajan de las 5.000 ppm, incluso en los casos de las parcelas de 20.000 ppm teóricas (más de 35.000 reales). De modo que si se hubiera tratado de un trabajo “real” con una sola parcela, un tratamiento muy económico hubiera permitido reducir más del 80% de la contaminación inicial en menos de un año; de modo que el landfarming se demuestra un procedimiento excelente para tratar suelos afectados por un vertido reciente de gasoil siempre que se verifiquen previamente algunos parámetros (actividad biológica, etc.)
- IV. El tratamiento con FL es el más barato y mejor, aunque la entrada de S puede ser útil en función del tipo de suelo. Posiblemente relacionado con la población microbiana autóctona del suelo, ya que el surfactante en su composición carece de nutrientes.
- V. Según los análisis de nutrientes y los balances de materia efectuados, las dosis de FF y, en menor medida, las de S fueron insuficientes. Pudiera ocurrir que su resultado mejorara mucho con dosis y aplicaciones más adecuadas (algo que convendría ensayar) pero en ese caso las hipotéticas dosis superiores son antieconómicas, a los

precios actuales. Los resultados (mejores en general, sobretodo para FF/S) obtenidos en microcosmos con estos productos indican que parte del problema al margen de dosis bajas se tuvo que deber a defectos en la aplicación en las parcelas. Aunue tampoco se está seguro que la utilización de fertilizante oleofílico sea el mas adecuado cuando se está utilizando un suelo con porcentaje alto de partículas finas (arcillas), ya que podría generar, a concentraciones altas, un retardo o poca eficacia de la biodegradación.

- VI. En cuanto a índices de biodegradación el C18/fitano ha mostrado aceptablemente su utilidad indicando por ejemplo como en el suelo II la biodegradación ha tenido más peso sobre la bajada de TPH que en el suelo I. No obstante el índice está lastrado por los siguientes aspectos:
- a. La rapidísima degradación inicial de parte de los alcanos lineales que falsea el resultado siempre que el muestreo y el análisis no sean muy próximos en el tiempo. Este problema no se daría con un producto menos “fresco” que el utilizado en este caso.
 - b. Las dificultades de cálculo (poca resolución del GC-MS, dependencia del operador que hace los cálculos de áreas, etc.).
 - c. El fitano indudablemente se degrada también, aunque más lentamente por lo que el índice siempre minora la amplitud de la biodegradación. Como alternativa se puede utilizar el C16/nor-pristano que mejora las posibilidades de cálculo (picos más separados) aunque usa un hidrocarburo más biodegradable que el fitano como referencia. El índice denominado “picos-áreas” correlaciona mejor que cualquiera de los anteriores con el TPH aunque se trata de un índice que valora degradación en general (envejecimiento o “weathering”) y no puramente biodegradación.
- VII. Los microcosmos permiten realizar “ensayos de biotratabilidad” que tienen sentido en períodos breves; ya que básicamente no hay diferencias grandes entre tratamientos una vez pasados los primeros meses; es decir que lo observado en los microcosmos en un lapso breve anticipa a grosso modo lo que ocurre a escala real. Se podría aventurar de forma aproximada una equivalencia mes/año entre experimentos en microcosmo y experimentos en parcelas.
- VIII. En cuanto a las medidas microbiológicas, parece claro que el mejor parámetro de los “sencillos” es el recuento de degradadores y como alternativa el de heterótrofos totales. Del resto de parámetros parece que la evolución de un dato de actividad

biológica es imprescindible para saber “cómo de vivo está el suelo”, sugiriéndose que este parámetro sea la actividad deshidrogenasa, que pese a ciertas fluctuaciones, muestra correlación con los momentos de mayor actividad degradadora.

- IX. Los análisis de nutrientes deberían utilizarse con más frecuencia de la que se ha empleado, ya que aportan buena información sobre la utilización de los productos y la evolución del proceso.
- X. Los análisis microbiológicos iniciales (actividad biológica general), los de tipo textural y los de nutrientes son importantes para predecir el comportamiento posterior del landfarming, aunque no ha sido posible determinar la importancia relativa de los mismos.
- XI. Salvo que se utilicen extractos orgánicos (no es lo indicado en la normativa), las características del diesel utilizado en estos suelo implican que incluso en concentraciones elevadas no haya ecotoxicidad. Cuando los niveles de TPH bajan por debajo de una 5.000 ppm incluso los extractos orgánicos pueden dejar de ser tóxicos aunque esto depende ya más del tipo de hidrocarburos o subproductos que resten en el suelo

5 Bibliografía

Amellal N., Portal J.M. and Berthelin J. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil [Journal] // Applied Geochemistry. - 2001. - Vol. 16. - pp. 1611 - 1619.

Atlas R. M. Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation [Journal] // Applied Microbiology. - 1975. - 3 : Vol. 30. - pp. 396-403.

Atlas R. M. Microbial Degradation Of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective [Journal] // Microbiological Reviews. - 1981. - 1 : Vol. 45. - pp. 180-209.

Atlas R. M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation [Journal] // Marine Pollution Bulletin. - 1995. - 4-12 : Vol. 31. - pp. 178-182.

Ayotamuno Josiah M., Kogbara Reginald B. and Taleat Muiden O. Biorremediation of a petroleum-hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt, Nigeria [Journal] // Journal of Food, Agriculture & Environment. - 2006. - Vol. 4. - pp. 214-217.

Baek [et al.] "Effects of Soil types on the Biodegradation of Crude Oil by Nocardia sp. H17-1 [Journal] // Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2004. - 5 : Vol. 14. - pp. 901-905.

Bento Fatima M. [et al.] Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation [Journal] // Bioresource Technology. - 2005. - 96. - pp. 1049-105.

Borden Robert C., Gomez Carlos A. and Becker Mark T. Geochemical Indicator of Intrinsic Biorremediation [Journal] // Ground Water. - 1995. - 2 : Vol. 33. - pp. 180-189.

Boukir A. [et al.] Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins [Journal] // Chemosphere. - [s.l.] : Elsevier, 2001. - 3 : Vol. 43. - pp. 279-286.

Breus I. P. and Mishchenko A. A. Sorption of Volatile Organic Contaminants by Soils (A Review) [Journal] // Eurasian Soil Science. - 2006. - 12 : Vol. 39. - pp. 1271-1283.

Bronick C.J. and Lal R. Soil Structure and mangment: a review [Journal] // Geoderma. - 2005. - Vol. 124. - pp. 3-22.

Bundy J.G., Paton G.I. and Campbell C.D. Microbial communities en different soil tupes do not converge after diesel contamination [Journal] // Journal of Applied Microbiology. - 2001. - Vol. 92. - pp. 276-288.

Chaîneau C. H. [et al.] Bioremediation Of A Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching And Toxicity Assessments [Journal] // Water, Air, And Soil Pollution. - 2003. - Vol. 144. - pp. 419-440.

Chin Yu-Ping [et al.] Estimating soil/sediment partition coefficients for organic compounds by high performance reverse phase liquid chromatography [Journal] // Water Research. - 1988. - 7 : Vol. 22. - pp. 873-881.

Chiou Cary T. Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environemntal Systems [Libro]. - New Jersey : John Wiley & Sons, 2002.

De Jonge H. [et al.] Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils [Journal]. - 1997. - 3 : Vol. 31. - pp. 771-775.

Del'Arco J.P. and de França F.P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment [Journal] // Environmental pollution. - 2001. - Vol. 110. - pp. 515-519.

Delille Daniel, Pelletier Emilien and Coulon Frederic The influence of temperature on bacterial assemblages durin biorremediation of a diesel fuel contaminated subAntartic soil [Journal] // Cold Regions Science and Technology. - 2007. - 2 : Vol. 48. - pp. 74-83.

Dibble J. T. and Bartha R. Effect of Environmental Parameter on the Bidoegradation of Oil Sludges [Journal] // Applied and Environmental Microbiology. - 1979. - 4 : Vol. 37. - pp. 729-739.

EPA 3540C Method Shoxlet Extraction SW-846 Test Methods [En línea] // www.epa.gov. - Diciembre de 1996. - 3. - Enero de 2006. - <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>.

Fernández-Varela R. [et al.] Monitoring photooxidation of the Prestige's oil spill by attenuated total reflectance infrared spectroscopy [Journal] // Talanta. - [s.l.] : Elsevier, 2006. - Vol. 69. - pp. 409-417.

Gafonova Olga V. and Yarranton Harvey W. The stabilization of water-in-hydrocarbon emulsions by asphaltenes and resins [Journal] // Journal of Colloid and Interface Science. - 2001. - 2 : Vol. 241. - pp. 469-478.

Gallego José L.R. [et al.] Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation [Journal] // Biodegradation. - 2001. - Vol. 12. - pp. 325-335.

García Martínez María Jesús "Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Asociados a Combustibles Fósiles. Caracterización, Análisis Y Remediación" / ed. Canoira Laureano y Llamas Juan Francisco. - [s.l.] : Universidad Politécnica de Madrid, 2005. - Departamento de Ingeniería Química y Combustibles.

García-Martínez Maria J. [et al.] Photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in fossil fuels catalysed by supported TiO₂ [Journal] // Applied Catalysis B: Environmental. - 2006. - Vol. 67. - pp. 279-289.

Gy P. M. The sampling of broken ores: A review of principle and practice, Geological Mining and Metallurgical Sampling, Transactions, Section [Journal] // Apply Earth Sciences, Institution of Mining and Metallurgy. - 1974. - pp. 194-205.

Gy P. M. The sampling of particulate materials, Theory and Practice [Publicación periódica] // Developments in Geomathematics. - 1979. - Vol. 4. - pág. 43.

Harms H. and Bosma T. M. P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant [Journal] // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. - 1997. - pp. 97-105.

Hui Li [et al.] Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment [Journal] // Journal of Environmental Sciences. - 2007. - Vol. 19. - pp. 1003-1013.

Kyung-Hee Shin and Kyoung-Woong Kim A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand [Journal] // Environmental Geochemistry and Health. - 2004. - Vol. 26. - pp. 5-11.

Lacotte D.J. [et al.] Arabian Light 150 Asphaltene Biotransformation with N-alkanes as Co-substrate [Journal] // Chemosphere. - 1996. - 9 : Vol. 32. - pp. 1755-1761.

Leahy Joseph G. and Colwell Rita R. Microbial Degradation of Hydrocarbons In The Environment [Journal] // Microbiological Reviews. - [s.l.] : American Society For Microbiology, 1990. - 3 : Vol. 54. - pp. 305-315.

Mackay N. and Betts W.B. The fate of chemicals in soil [Book Section] // Biodegradation: natural and synthetic materials / book auth. Betts W.B.. - London : Springer Verlag, 1991.

Mana Capelli S., Busalmen J.P. and de Sanchez S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria [Journal] // International Biodeterioration & Biodegradation. - [s.l.] : Elsevier, 2001. - Vol. 47. - pp. 233-238.

Margesin R. and Schinner F. Biorremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area [Journal] // Applied Environmental Microbiology. - 2001. - Vol. 67. - pp. 3127 - 3133.

Margesin Rosa, Hammerle Marion and Tscherko Dagmar Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time [Journal] // Microbial Ecology. - 2007. - Vol. 53. - pp. 259-269.

Martienssen M. and Schirmer M. Use of surfactants to improve the biological degradation of petroleum hydrocarbons in a field site study [Journal] // Environmental Technology. - 2007. - Vol. 28. - pp. 573 - 582.

Martienssen M. and Schirmer M. Use of surfactants to improve the biological degradation of petroleum hydrocarbons in a field site study [Journal] // Environmental Technology. - 2007. - Vol. 28. - pp. 573 - 582.

Mohn William W. and R. Stewart Gordon Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils [Journal] // Soil Biology & Biochemistry. - 2000. - Vol. 32. - pp. 1161-1172.

Nadim Farhad [et al.] Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview [Journal] // Journal of Petroleum Science and Engineering. - [s.l.] : Elsevier, 2000. - Vol. 26. - pp. 169–178.

Perry Jerome J. Microbial Cooxidation Involving Hydrocarboons [Publicación periódica] // Microbiological Reviews. - 1979. - págs. 59-72.

Pineda-Flores Gabriel [et al.] A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source [Journal] // Biodegradation. - 2004. - Vol. 15. - pp. 145-151.

Pineda-Flores Gabriel and Mesta-Howard Ana María Petroleum Asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanism [Journal] // Revista Latinoamerica de Microbiología. - 2001. - 3 : Vol. 43. - pp. 143-150.

Pinto Mariano Adriano [et al.] Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a Petrol Station [Journal] // Brazilian Journal of Microbiology. - 2007. - Vol. 38. - pp. 346-353.

Pollard Simon J.T., Hrudehy Steve E. and Fedorack Philip M. Biorremediation of Petroleum and Creosote-Contaminated soils: A review of Constraints [Journal] // Waste Management and Research. - 1994. - Vol. 12. - pp. 173-194.

Porta J., López-Acebedo N. and Roquero C. Edafología para la agricultura y el medio ambiente [Book]. - Madrid : Mundi-Prensa Libros S.A., 2003.

Rahman K.S.M. [et al.] Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium [Journal] // Bioresource Technology. - 2002. - Vol. 85. - pp. 257-261.

Riffaldi R. [et al.] Soil Biological Activities In Monitoring The Bioremediation Of Diesel Oil-Contaminated Soil [Journal] // Water, air and soil pollution. - 2005. - Vol. 170. - pp. 3-15.

Schwarzenbach Rene P., Gschwend Philip M. and Imboden Dieter M. Environmental Organic Chemistry [Book]. - New Jersey : John Wiley & Sons, 2003.

Seklemova E., Pavlova A. and Kovacheva K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration [Journal] // Biodegradation. - 2001. - Vol. 12. - pp. 311–316.

Sessitsch Angela [et al.] Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment [Journal] // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. - 2001. - 9 : Vol. 67. - pp. 4215–4224.

Silva Taís F. [et al.] Effect of biodegradation on biomarkers released from asphaltenes [Journal] // Organic Geochemistry. - 2008. - 8 : Vol. 39. - pp. 1249-1257.

Sing S.K., Srivastava R.K. and John S. Assessment and Remediation of Soils Contaminated with Gasoline [Journal] // Environmental Geotechnics. - 2006. - pp. 294-301.

Song Hong-Gyu, Wang Xiaoping and Bartha Richard Biorremediation Potencial of Terrestrial Spills [Journal]. - 1990. - 3 : Vol. 56. - pp. 652-656.

Speight James G. Handbook of Petroleum Analysis [Libro]. - Danvers : John Wiley & sons, 2001.

Stanley Clifford R. Estimating sampling errors for major and trace elements in geological materials using a propagation of variance approach [Journal] // Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis. - 2003. - 2 : Vol. 3. - pp. 169-178.

Talat Saeed, Huda Al-Hashash and Khalid Al-Matrouk ASSESSMENT OF THE CHANGES IN THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE CRUDE OIL SPILLED IN THE KUWAIT DESERT AFTER WEATHERING FOR FIVE YEARS [Journal] // Environment International. - 1998. - 1/2 : Vol. 24. - pp. 141-152.

Thomsen Ingrid K. [et al.] Turnover of organic matter in differently textured soils II. Microbial activity as influenced by soil water regimes [Journal] // Geoderma. - 1999. - Vol. 89. - pp. 199-218.

Tremier A. [et al.] A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted [Journal] // Bioresource Technology. - 2005. - Vol. 96. - pp. 169-180.

Viñas Canals Marc "Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica" / ed. Solanas Cánovas Anna María. - [s.l.] : Universitat de Barcelona, 2005. - Departament de Microbiologia.

Visman J. A general sampling theory [Journal] // Materials Research and Standards. - 1969. - Vol. 9. - pp. 8-13.

Volkering F., Breure A.M. and Rulkens W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation [Journal] // Biodegradation. - 1998. - Vol. 8. - pp. 401-417.

Vreysen Steven and Maes André Remediation of a Diesel Contaminated, Sandy-Loam Soil Using Low Concentrated Surfactant Solutions [Journal] // Journal of Soils and Sediments. - 2005. - 4 : Vol. 5. - pp. 240-244.

WANG [et al.] Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta [Journal] // Pedosphere. - 2008. - 6 : Vol. 18. - pp. 707-716.

Wang ZHendi [et al.] Comparision of oil composition changes due to biodegradation physical weatherin in differrent oils [Journal] // Journal of Chromatography A. - 1998. - Vol. 809. - pp. 89-107.

Wilson A.D The sampling of silicate rock powders for chemical analysis [Journal]. - 1964. - Vol. 89. - pp. 18-30.

Young-Gyun Cho, Sung-Keun Rhee and Sung-Taik Lee Effect of soil moisture on biorremediation of cholopheno-contaminated soil [Journal] // Biotechnology Letters. - 2000. - Vol. 22. - pp. 915-919.