



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

Evaluación de alternativas de biotratamiento y reuso de  
recortes de perforación de pozos de gas y petróleo,  
mediante la aplicación de residuos y enmiendas orgánicas

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Lic. Gabriela Lucía Paladino

Director: Dra. Patricia Silvia Satti

Codirector: Dra. Irma Susana Morelli

2017

---

Lic. Gabriela Lucía Paladino

Autor

---

Dra. Patricia Silvia Satti

Director

---

Dra. Irma Susana Morelli

Co-Director

*A Juan Pablo,  
A mi familia,  
por ser y por estar.*

## *Agradecimientos*

*A mis directoras, las Dras. Patricia Satti e Irma Morelli, por su guía y apoyo a lo largo de este camino.*

*A la Dra. Francisca Laos, por brindarme y hacer posible esta oportunidad única e invaluable.*

*A la Universidad Nacional de Río Negro, por el espacio y el apoyo para la realización de este trabajo, y a aquellas personas que forman y formaron parte de ella que, de una u otra manera, estuvieron presentes y me brindaron su colaboración y compañía durante estos años de ardua labor.*

*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, y al CONICET, por el financiamiento para esta etapa de mi formación.*

*Al Grupo de Suelos del CRUB-U. N. Comahue, y en especial a Paula Crego y Elisa Castán, por su generosa ayuda en el trabajo en el laboratorio.*

*Al grupo de docentes y estudiantes de la Tecnicatura en Viveros de la UNRN-Sede Andina, por compartir el espacio en su invernáculo para el desarrollo de parte del trabajo experimental, y por su candidez y grata compañía en la docencia.*

*A Compañía TSB S.A y, en especial, a Rodrigo Contreras, por su apoyo y colaboración, que fue crucial para la realización de este trabajo.*

*A las integrantes del Laboratorio de Degradación Microbiana de Hidrocarburos del CINDEFI (CONICET-UNLP), por su cordialidad y ayuda durante mi estancia en su lugar de trabajo.*

*A Silvia Dutrús, Sergio Suárez y Bernarda Quiroga del Centro Atómico Bariloche (CNEA), por su colaboración desinteresada y tanta amabilidad.*

*A mi familia toda, de mi sangre y adoptada, y a mis amigos, a todos y a cada uno, por el apoyo y el aliento constantes, por la palabra justa en el momento adecuado y, sobre todo, por saber comprender tantas ausencias, aún en los momentos más difíciles.*

*A Juan Pablo, siempre, en cada momento, como estuviste vos. Nada sería posible de otra manera. Siempre estas y estuviste ahí, luchando a mi lado. Siempre juntos...y a la par.*

*A mi país, por mi educación y formación, por brindarme esta y tantas oportunidades, y a todos aquellos argentinos que aún hoy, por todo y a pesar de todo, sueñan con una nación justa, digna, valiente y soberana. Gracias por soñar conmigo.*

# Resumen

---

En la Patagonia argentina, la explotación de yacimientos hidrocarburíferos representa uno de los principales componentes de la matriz productiva regional. Entre las principales corrientes de desecho de esta actividad se encuentran los “recortes de perforación” o “*drilling cuttings*”, originados en las operaciones de perforación de pozos de gas y petróleo. Los recortes de perforación están compuestos por restos de fluidos utilizados en la operación, y los fragmentos de roca provenientes de las formaciones geológicas atravesadas durante la perforación. La gestión de este material residual complejo, que es generado en forma continua y en grandes cantidades, supone una problemática ambiental actual, tanto para las compañías operadoras de las áreas de explotación de gas y petróleo, como para las autoridades de aplicación ambiental.

Los fluidos de perforación están compuestos por arcillas y una fase líquida (base), que puede ser acuosa u oleosa, a la cual se le agregan diferentes aditivos químicos según los requerimientos específicos del pozo a perforar. La formulación del fluido que se utilice en la perforación, en conjunto con el tipo de minerales e hidrocarburos presentes en la formación atravesada, determinarán el tipo (recortes base agua o base oleosa) y la toxicidad ambiental de los recortes de perforación resultantes.

De manera genérica, se identifican cuatro características principales que representan la peligrosidad y/o toxicidad ambiental de este residuo: (i) elevado contenido de sales inorgánicas; (ii) alta concentración de hidrocarburos del petróleo en recortes base oleosa; (iii) contenido variable de metales pesados; y (iv) toxicidad potencial (poco explorada o desconocida) de otros aditivos utilizados en los fluidos de perforación (biocidas, dispersantes, desincrustantes, etc.).

La principal diferencia entre los recortes de perforación de base acuosa y base oleosa, está dada por el elevado contenido de hidrocarburos de los segundos. Por consiguiente, esta característica requiere de distintos abordajes en las estrategias para su tratamiento y disposición final. De esta manera, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de diferentes estrategias de tratamiento y reutilización de recortes de perforación de pozos de gas y petróleo, mediante la aplicación de residuos y enmiendas orgánicas generados en los yacimientos hidrocarburíferos y zonas aledañas.

Por un lado, se estudió el efecto de la aplicación de dos tipos de enmiendas orgánicas, disponibles en la región patagónica argentina (compost de residuos orgánicos urbanos (CROU) y compost de biosólidos (CB)), en las propiedades como sustrato de crecimiento vegetal de los recortes de perforación base agua, para su uso potencial como material de relleno para la revegetación y/o restauración de áreas degradadas. Por el otro, se evaluó la tratabilidad de los recortes de perforación base oleosa mediante la estrategia de biorremediación por compostaje, utilizando residuos orgánicos de cocina y jardín, generados en los yacimientos hidrocarburíferos.

Considerando que los recortes de perforación base agua pueden asemejarse a un suelo salino-sódico de condiciones extremas, se realizó un ensayo de invernáculo para evaluar el crecimiento de una especie vegetal halotolerante (agropiro alargado o

*Thynopirum ponticum*), en sustratos formulados con el recorte de perforación base agua y compost. El recorte de perforación fue sometido previamente a un pretratamiento de lavado para la reducción de sales, se formularon 6 tipos de sustratos utilizando dos proporciones en volumen (1:1 y 1:1,5 enmienda:recorte) de perlita, CB y CROU.

La aplicación de ambos tipos de enmiendas orgánicas mejoró significativamente la fertilidad del recorte de perforación base agua. No obstante, el efecto diferencial en la aptitud como sustrato de crecimiento vegetal, entre los tratamientos con CB respecto de tratamientos con CROU, estuvo principalmente asociado a la mejora en las propiedades físicas del recorte de perforación. En el tratamiento con CB aplicado en mayor proporción se favoreció el lavado de sales, y en particular del catión sodio, probablemente debido a una mejora significativa en la estructura del recorte de perforación. Este efecto en las propiedades físicas del sustrato parece haber sido relevante, ya que rendimiento vegetal fue significativamente mayor en este tratamiento, respecto de los tratamientos con CROU y perlita.

Para evaluar la viabilidad de la alternativa de biorremediación por compostaje de recortes de perforación base oleosa, se realizó un ensayo en reactores de 60 L aislados térmicamente donde se compostaron, durante 151 días, recortes base oleosa (RBO) y residuos orgánicos de cocina y jardín triturados (RO), utilizando chips de madera como agente estructurante en un 50 % en volumen. Se ejecutaron los siguientes tratamientos: solo recortes de perforación base oleosa (0 % RO), dos mezclas con dos proporciones de RBO y RO en volumen (33 y 75 % RO), y únicamente residuos orgánicos (100 % RO), como referencia del proceso de compostaje de los residuos utilizados. Durante el ensayo, se monitoreó la degradación de distintos tipos de hidrocarburos (totales, alcanos y poliaromáticos), además de variables del proceso, como temperatura, pH, conductividad eléctrica, y contenido de agua y nutrientes.

La aplicación de residuos orgánicos en una proporción de 1:0,4 recorte:residuo (tratamiento 75 % RO) en peso seco, proveyó proporciones adecuadas de carbono y nitrógeno disponibles, microorganismos en cantidad y variedad, redujo la toxicidad inicial del residuo, y mejoró la disponibilidad de agua y oxígeno (dada la naturaleza arcillosa del recorte de perforación) resultando altamente eficaz en la remoción de todos los tipos de hidrocarburos, incluyendo poliaromáticos de elevado peso molecular, usualmente muy recalcitrantes. Por otro lado, la aplicación de una proporción de 1:0,1 (tratamiento 33 % RO) no fue más efectiva que no aplicar residuos orgánicos (tratamiento 0 % RO) en la biodegradación de hidrocarburos.

Los resultados obtenidos alientan a considerar la viabilidad de estrategias que involucren la aplicación de estos residuos orgánicos, o de enmiendas producidas a partir de los mismos, como alternativa para el tratamiento, reuso o disposición de recortes de perforación base acuosa y base oleosa. Además, estas estrategias pueden contribuir en el reciclado y valorización de residuos orgánicos, y posibilitan el tratamiento simultáneo de más de una corriente de los desechos generados en los yacimientos o en localidades cercanas.

# Summary

---

In Argentinean Patagonia, oil and gas production represents one of the main components of the regional productive matrix. One of the main waste streams from this activity are "drilling cuttings", generated by oil and gas wells drilling operations. Drilling cuttings are composed of remnants of fluids used in the operation, and rock fragments from geological formations cut across during drilling. The management of this complex waste material, which is generated continuously and in large quantities, is a current environmental concern for environmental authorities and for the companies operating oil and gas areas.

Drilling fluids are generally composed of clay and a liquid phase (base), which may be aqueous or oily, to which are added various chemical additives according to the specific requirements of the well to be drilled. The formulation of the drilling fluid being used, together with the type of minerals and hydrocarbons present in the geological formation, determine the type (water-based or oil-based) and environmental toxicity of drilling cuttings.

Broadly, the four main characteristics that represent hazardous and environmental toxicity of this waste are: (i) high content of inorganic salts; (ii) high concentration of petroleum hydrocarbons in oil-based cuttings; (iii) variable content of heavy metals; and (iv) potential toxicity (unexplored or unknown) of other additives used in drilling fluids (biocides, dispersants, etc.).

The main difference between water-based drilling and oil-based cuttings is given by the high petroleum hydrocarbons content of the latter. Therefore, this feature requires different approaches for their treatment and disposal. The overall objective of this study was to evaluate the feasibility of different drilling cuttings treatment and reuse strategies, by applying organic wastes and amendments generated in the oilfields and surrounding areas or cities.

On the one hand, it was studied the effect of the application of two types of organic amendments, available in Argentinean Patagonia region (municipal organic waste compost (MOWC) and biosolids compost (BC), in the properties of water-based drilling cuttings (WBC) as a substrate for plant growth, for its potential use as a soil substitute in degraded lands revegetation or restoration. On the other hand, it was evaluated the bioremediation of oil-based drilling cuttings (OBC) by composting with kitchen and garden organic wastes (OW).

WBC could be assimilated to a saline-sodic soil, thus a greenhouse test was conducted to evaluate the growth of a halotolerant plant species (tall wheatgrass or *Thynopirum ponticum*) in substrates formulated with water-based cuttings and composts (MWOC and BC) or perlite. WBC was previously subjected to a water wash pretreatment for reducing salts. Then, six types of substrates were formulated, using two volume ratios (1: 1 and 1: 1.5) of amendment (perlite, MOWC or BC) to WBC.

The application of both types of organic amendments significantly improved water-based cuttings fertility. However, there was a differential effect between MWOC

and BC treatments on their aptness as a plant growth substrate. This difference was mainly associated with improvement in WBC physical properties. In 1:1 CB:WBC treatment the washing out of salts was highly favored, especially sodium salts, probably due to a significant improvement in the structure of the WBC. This effect on the physical properties of the substrate appears to be important, since plant growth performance was significantly higher in this treatment than in perlite and MOWC substrates.

To assess the feasibility of OBC bioremediation by composting, a test was performed in thermally insulated 60 L reactors, where OBC and OW were composted for 151 days, using 50 % by volume of wood chips as bulking agent. The following treatments were carried out: only OBC (0 % OW), two mixtures with two ratios of OBC to OW in volume (33 and 75 % OW), and only organic wastes (100 % OW), as a composting reference. During the test, the degradation of various hydrocarbons types (total, alkanes and polyaromatics) were monitored, as well as other process variables such as: temperature, pH, electrical conductivity, and water and nutrients contents.

The application of organic wastes in a ratio of 1:0.4 OBC to OW dry weight (75 % OW treatment) provided available carbon and nitrogen, microorganisms variety, reduced initial toxicity and improved water and oxygen availability. This resulted in a highly effective removal of all types of hydrocarbons, including recalcitrant high molecular weight polyaromatics. By the other hand, the application of 1:0.1 OBC to OW dry weight (33 % OW treatment) was as effective as not applying organic wastes, in the biodegradation of OBC hydrocarbons.

Obtained results encourage the evaluation of strategies involving the application of organic amendments and wastes as an alternative for the treatment, reuse or disposal of water and oil-based drilling cuttings. In addition, these strategies can contribute with organic wastes recycling and reuse, and enables simultaneous treatment of more than one waste streams generated in the oilfields, or in nearby areas or cities.

# Contenidos

---

1	CAPITULO 1.....	11
1.1	Problemática de los recortes de perforación de pozos de gas y petróleo ....	12
1.2	Origen y características de los recortes de perforación.....	13
1.3	Toxicidad e impacto ambiental de los recortes de perforación.....	17
1.4	Alternativas de gestión de recortes de perforación.....	18
1.5	Aplicación de enmiendas orgánicas a recortes de perforación base agua, para su uso como material de relleno en la revegetación y restauración de áreas degradadas.....	24
1.6	El compostaje como estrategia para el biotratamiento de recortes de perforación base oleosa.....	25
1.7	Estado de situación, demanda e impacto regional y nacional.....	31
1.8	Objetivos de este trabajo de tesis.....	34
2	CAPITULO 2.....	35
2.1	Introducción.....	36
2.1.1	Efectos de la aplicación de enmiendas orgánicas en un suelo o sustrato	36
2.1.2	Uso de compost en la restauración de suelos o sustratos salino-sódicos	39
2.2	Hipótesis y Objetivos.....	42
2.3	Materiales y Métodos.....	43
2.3.1	Recolección y acondicionamiento de recortes de perforación base agua	43
2.3.2	Pretratamiento de recortes de perforación base agua por lavado.....	45
2.3.3	Origen y características de las enmiendas orgánicas.....	45
2.3.4	Diseño experimental.....	47
2.3.5	Ensayo de germinación.....	51

2.3.6	Análisis químicos y físicos de recortes de perforación, enmiendas y sustratos	52
2.3.7	Actividad biológica en sustratos	55
2.3.8	Análisis estadísticos de los resultados	56
2.4	Resultados y discusión	58
2.4.1	Caracterización del recorte de perforación base agua y efecto del pretratamiento de lavado	58
2.4.2	Germinación y rendimiento vegetal de agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> ) en los sustratos formulados	65
2.4.3	Análisis exploratorio de factores y procesos que influyeron en el rendimiento vegetal de agropiro alargado	69
2.4.4	Contenido de nutrientes de los sustratos formulados	73
2.4.5	Características físicas de los sustratos: Densidad aparente	77
2.4.6	Actividad biológica	78
2.4.7	Evolución del pH y del contenido de sales solubles durante el ensayo de invernáculo	80
2.4.8	Cationes Intercambiables y Solubles	84
2.5	Conclusiones	87
3	CAPITULO 3	88
3.1	Introducción	89
3.1.1	Factores ambientales que regulan el proceso de biorremediación por compostaje	89
3.1.2	Dinámica de la comunidad microbiana	92
3.1.3	Biodegradabilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos	95
3.2	Hipótesis y Objetivos	98
3.3	Materiales y Métodos	99
3.3.1	Recolección de recortes de perforación y residuos orgánicos	99
3.3.2	Diseño experimental y monitoreo	101
3.3.3	Muestreo	104
3.3.4	Análisis químicos	104
3.3.5	Identificación y cuantificación de hidrocarburos	106
3.3.6	Recuento de microorganismos heterótrofos e hidrocarburolíticos cultivables	108
3.3.7	Actividad de la enzima deshidrogenasa	110
3.3.8	Análisis estadístico de los resultados	111
3.4	Resultados y Discusión	113

3.4.1	Caracterización química de los materiales originales y de las mezclas a compostar.....	113
3.4.2	Densidad de las mezclas a compostar .....	117
3.4.3	Contenido inicial de hidrocarburos según tipo y tamaño molecular..	117
3.4.4	Evolución de la temperatura y el contenido de humedad durante el proceso de compostaje .....	126
3.4.5	pH y conductividad eléctrica.....	130
3.4.6	Disponibilidad de nutrientes .....	133
3.4.7	Biodegradación de hidrocarburos .....	136
3.4.8	Recuento y actividad microbiana .....	149
3.4.9	Análisis integral de los resultados.....	158
3.5	Conclusiones.....	160
4	CAPITULO 4.....	161
4.1	Factibilidad de reuso de recortes de perforación base agua como material de relleno en la restauración de áreas degradadas .....	162
4.1.1	Trabajo futuro.....	164
4.2	Biorremediación de recortes de perforación base oleosa por compostaje.	165
4.2.1	Consideraciones para el escalado y aplicación a campo.....	165
4.2.2	Trabajo futuro.....	168
5	Referencias bibliográficas.....	170
6	Trabajo de respaldo.....	190

## Tabla de Abreviaturas

---

AE: Agente estructurante

BTEXs: Benceno, Tolueno, Etil-benceno y Xilenos

CB: Compost de biosólidos

CE: Conductividad eléctrica

COT: Carbono orgánico total

CROU: Compost de residuos orgánicos urbanos (de origen domiciliario o doméstico)

CRR: Crecimiento relativo de raíces

CSA: Carbono soluble en agua

CT: Carbono total

DR: Decreto reglamentario

DRO: Orgánicos en el rango diésel (*Diesel Range Organics*)

EPTs: Elementos potencialmente peligrosos

GRO: Orgánicos en el rango gasolina (*Gasoline Range Organics*)

GRS: Germinación relativa de semillas

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HT: Hidrocarburos totales

IG: Índice de germinación

NKj: Nitrógeno Kjeldahl (N-orgánico + N-NH<sub>4</sub>)

NMP: Número más probable

NT: Nitrógeno total

RBA: Recorte de perforación base acuosa

RBO: Recorte de perforación base oleosa

RO: Residuos orgánicos

UFC: Unidades formadoras de colonias

## Tablas

---

<b>Tabla 1.1.</b> Componentes comunes de los distintos tipos de fluidos utilizados en la perforación de pozos de gas y petróleo .....	14
<b>Tabla 1.2.</b> Alternativas de gestión de recortes de perforación base oleosa y base acuosa.....	20
<b>Tabla 2.1.</b> Caracterización de las enmiendas orgánicas utilizadas.....	47
<b>Tabla 2.2.</b> Densidad aparente de los materiales utilizados en la formulación de los sustratos.....	48
<b>Tabla 2.3.</b> Descripción y composición en volumen y peso seco de los sustratos formulados.....	48
<b>Tabla 2.4.</b> Características del recorte de perforación base agua (RBA), antes y después del pretratamiento por lavado. ....	59
<b>Tabla 2.5.</b> Índice de Germinación de ryegrass ( <i>Lolium perenne</i> ) y agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> ) en el recorte base agua, antes y después del lavado.....	60
<b>Tabla 2.6.</b> Contenido de hidrocarburos y EPTs en el recorte de perforación base agua sin lavar y lavado. ....	64
<b>Tabla 2.7.</b> Caracterización inicial de los sustratos formulados.....	75
<b>Tabla 2.8.</b> Correlación de Pearson entre la variable biomasa aérea acumulada de agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> ) y el contenido de nutrientes en los sustratos formulados.....	76
<b>Tabla 3.1.</b> Composición en volumen y peso de los tratamientos formulados.....	103
<b>Tabla 3.2.</b> Hidrocarburos alcanos y aromáticos policíclicos identificados y cuantificados .....	108
<b>Tabla 3.3.</b> Composición de medio de cultivo R2A agar para recuento de bacterias aerobias heterótrofas .....	110
<b>Tabla 3.4.</b> Composición medio mineral para recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	110
<b>Tabla 3.5.</b> Caracterización química de los materiales originales utilizados en la experiencia .....	113
<b>Tabla 3.6.</b> Caracterización química de las mezclas a compostar .....	114

<b>Tabla 3.7.</b> Concentración inicial de hidrocarburos en los tratamientos con recortes de perforación y en los componentes originales de las mezclas a compostar .....	121
<b>Tabla 3.8.</b> Concentración inicial y final de hidrocarburos en los tratamientos con recortes de perforación (0, 33 y 75 % RO) .....	139
<b>Tabla 3.8.</b> Parámetros de ajuste del modelo de biodegradación de hidrocarburos totales, alcanos y HAPs para cada tratamiento .....	142
<b>Tabla 3.9.</b> Correlación de la actividad de la enzima deshidrogenasa con otras variables de interés .....	157

## Figuras

---

<b>Figura 1.1.</b> Esquema equipo de perforación y detalle de equipamiento de control de sólido .....	16
<b>Figura 1.2.</b> Recortes de perforación en repositorio en campo y vista cercana de muestras.....	17
<b>Figura 2.1.</b> Recolección y envasado de recortes de perforación base agua en locación. ....	44
<b>Figura 2.2.</b> Aspecto recorte de perforación base agua fresco, secado en bandejas, y aspecto luego del secado .....	44
<b>Figura 2.3.</b> Formulación de sustratos y armado de macetas. Ensayo instalado en invernáculo en la primera etapa de crecimiento vegetal .....	50
<b>Figura 2.4.</b> Germinación de agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> ) en suspensiones en agua (1:10) de los sustratos formulados .....	66
<b>Figura 2.5.</b> (a) Vista de tratamientos PER 1 y 2, CB 1 y 2 y CROU 1 y 2; (c) vista general del ensayo a los 291 días, antes del último corte de biomasa aérea; (b) Evolución de la biomasa aérea seca de agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> ) en tres cortes, a los 73, 177 y 291 días desde la siembra.....	68
<b>Figura 2.6.</b> Representación gráfica (“biplot”) del ACP realizado sobre las variables analizadas en los sustratos: (a) antes y (b) después del ensayo de crecimiento vegetal en invernáculo. ....	72
<b>Figura 2.7.</b> Actividad respiratoria (evolución de CO <sub>2</sub> ) en los sustratos incubados a 25 °C.....	79
<b>Figura 2.8.</b> (a) pH (1:2,5) y (b) conductividad eléctrica (1:5) en los sustratos antes y después del ensayo de crecimiento vegetal.....	83
<b>Figura 2.9.</b> Cationes intercambiables en los sustratos antes y después del ensayo de crecimiento vegetal: (a) calcio; (b) sodio; (c) potasio; (d). ....	86
<b>Figura 3.1.</b> Recolección de recortes de perforación base oleosa en locación: lengüetas de salida de separador a contenedores, colección desde contenedores y pesaje, y termosellado de bolsas .....	100
<b>Figura 3.2.</b> Triturado y homogeneización de residuos orgánicos, recortes de césped y agente estructurante (chips de madera) .....	100

<b>Figura 3.3.</b> Reactores utilizados en la experiencia, falso fondo de malla metálica y sistema de desagote para la separación y colección de lixiviados .....	101
<b>Figura 3.4.</b> Sitio de instalación del ensayo; reactores con lanzas de sensor de temperatura y PLC; mezcla y reactor con monitoreo automático de temperatura y ensayo instalado .....	102
<b>Figura 3.5. a y b.</b> Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras de residuos orgánicos <b>(a)</b> y del agente estructurante <b>(b)</b> .....	122
<b>Figura 3.5. c y d.</b> Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras del recorte de perforación base oleosa (extracto diluido al 50 %) <b>(c)</b> y mezcla inicial (“tiempo cero”) del tratamiento 0 % RO <b>(d)</b> . .....	123
<b>Figura 3.5. e y f.</b> Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras de las mezclas iniciales (“tiempo cero”) del tratamiento 33 % RO <b>(e)</b> y del tratamiento 75 % RO <b>(f)</b> .....	124
<b>Figura 3.6.</b> Perfil de temperatura por tratamiento. ....	128
<b>Figura 3.7.</b> Evolución de la humedad gravimétrica durante el proceso de compostaje en todos los tratamientos. ....	130
<b>Figura 3.8.</b> Evolución del <b>(a)</b> pH y <b>(b)</b> conductividad eléctrica (CE) en relación 1:10, en todos los tratamientos. ....	133
<b>Figura 3.9.</b> Evolución de: <b>(a)</b> carbono orgánico total (COT), <b>(b)</b> carbono soluble en agua (CSA), <b>(c)</b> relación C/N (COT/NKj) y <b>(d)</b> relación CSA/N, en todos los tratamientos durante el ensayo. ....	136
<b>Figura 3.10.</b> Porcentaje de remoción de hidrocarburos por tratamiento: <b>(a)</b> hidrocarburos totales (HT), alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) totales; <b>(b)</b> alcanos y HAPs agrupados por tamaño molecular, según número de carbonos o de anillos, respectivamente. ....	138
<b>Figura 3.11.</b> Concentración y tasa de remoción de hidrocarburos en función del tiempo por tipo de hidrocarburos: <b>(a, d)</b> alcanos totales, <b>(b,e)</b> HAPs totales, e <b>(c,f)</b> hidrocarburos totales (HT). ....	145
<b>Figura 3.12.</b> Recuento de poblaciones bacterianas aerobias heterótrofas cultivables durante el ensayo. ....	151
<b>Figura 3.13.</b> Recuento de poblaciones bacterianas cultivables en función del tiempo por tratamiento: <b>(a)</b> degradadoras de HT, <b>(c)</b> degradadoras de alcanos, y <b>(e)</b>	

degradadoras de HAPs, en comparación con las curvas de degradación de hidrocarburos (derecha): <b>(b)</b> HT, <b>(d)</b> alcanos totales, <b>(f)</b> HAPs totales.....	152
<b>Figura 3.14.</b> Actividad de la enzima deshidrogenasa.....	155
<b>Figura 3.15.</b> Biplot donde son representados los dos primeros componentes principales (CP 1 y CP 2), las variables analizadas y los tratamientos con RBO (0, 33 y 75 % RO).....	158



# CAPITULO 1

---

## Introducción

## 1.1 Problemática de los recortes de perforación de pozos de gas y petróleo

La generación de residuos con características peligrosas se encuentra entre los aspectos ambientales más significativos de las actividades de exploración y producción (E&P) de gas y petróleo, dado su potencial impacto negativo en el entorno ambiental. Una de las principales corrientes de desecho de esta actividad, originada específicamente en las operaciones de perforación de pozos para la extracción de gas y petróleo, son los denominados “recortes de perforación” o “*drilling cuttings*”, o sólo “*cuttings*”, como se los denomina usualmente en el ámbito de la industria petrolera (Reis, 1996; USEPA, 2000 a; Onwukwe y Nwakaudu, 2012). Los recortes de perforación constituyen un material residual complejo, compuesto por restos de fluidos, que son utilizados en la perforación, y los fragmentos de roca provenientes de las formaciones geológicas atravesadas durante la operación.

Los fluidos de perforación son lodos cuya utilización es crítica a fin de asegurar una operación segura y productiva, y cumplen diversas funciones. No obstante, el objetivo principal de estos fluidos es suministrar la fase de transporte de los restos de roca pulverizada por el trépano, o broca de perforación, hacia la superficie, con el fin de evitar que el pozo colapse. Una vez en la superficie, el fluido es separado de la fase sólida y reinyectado para su reutilización. Debido a que esta separación no es completamente efectiva, los restos de roca pulverizada (la fracción sólida), quedan impregnados con restos del fluido de perforación; esta fracción constituye el recorte de perforación (IPIECA-OGP, 2009; Ball et al., 2012).

En la Patagonia argentina, la explotación de yacimientos hidrocarburíferos representa uno de los principales componentes de la matriz productiva regional, y las antiguas prácticas asociadas a su desarrollo y expansión, han originado impactos de importancia en un entorno ambiental que presenta un reducido poder de resiliencia. Particularmente, el manejo y disposición inadecuados de los residuos y efluentes generados por la actividad, han producido pasivos ambientales que aún hoy persisten. En la actualidad, la perspectiva ha cambiado como consecuencia de un enfoque

“ambientalmente amigable” o sustentable de las actividades productivas, sumado a la expansión de la legislación y regulación ambiental en el país y en las provincias de la región.

Por su cantidad y complejidad, los recortes de perforación se encuentran entre los residuos de mayor importancia generados en los yacimientos hidrocarburíferos de nuestro país. Actualmente, estos son acopiados en repositorios destinados a tal fin en las áreas de explotación petrolera, y aún no han sido desarrolladas, o aplicadas en forma sistemática, estrategias sustentables para su tratamiento y/o disposición final segura, posiblemente debido a las dificultades técnicas y logísticas asociadas a su generación rutinaria y en grandes volúmenes, y a su composición variable y compleja. Estos aspectos plantean un importante desafío en la búsqueda de alternativas o soluciones tecnológicas apropiadas para su tratamiento y disposición final.

La gestión de los recortes de perforación supone una problemática ambiental actual para las compañías operadoras de las áreas de explotación de gas y petróleo, tanto en el ámbito nacional como internacional (Ball et al., 2012; Onwukwe y Nwakaudu, 2012). El cumplimiento de la normativa legal vigente y de los estándares ambientales propios, conducen a las organizaciones del rubro a la búsqueda de alternativas tecnológicas que permitan minimizar los impactos de la actividad en el entorno a costos accesibles. Es por ello que la investigación para el desarrollo y la optimización de alternativas y métodos de tratamiento y/o disposición final de recortes de perforación, de manera sustentable y viable, puede resultar un aporte de relevancia a nivel nacional e internacional.

## **1.2 Origen y características de los recortes de perforación**

Durante la operación, el fluido de perforación es inyectado de forma continua al pozo y, además de circular transportando los restos de roca pulverizada hacia la superficie, cumple otras funciones críticas como: la lubricación y enfriamiento de la columna de perforación; la impermeabilización de las paredes de la excavación, a fin de minimizar la probabilidad de ingreso de fluidos (agua, gas o petróleo); y el control de las presiones de la formación y estabilidad del pozo (OGP, 2003). De esta manera,

la composición del fluido es variable según las necesidades operacionales del pozo a perforar. La formulación del fluido, en conjunto con el tipo de minerales e hidrocarburos presentes en la formación perforada, determinarán el tipo y la toxicidad y consecuente impacto ambiental de los recortes de perforación resultantes (Getliff et al., 2002; Onwukwe y Nwakaudu, 2012).

Los lodos o fluidos de perforación están generalmente compuestos por arcillas y una fase líquida (base), a la cual se le agregan diferentes aditivos químicos según los requerimientos específicos del pozo a perforar. De acuerdo al tipo de base utilizada se clasifican tradicionalmente en: fluidos de base acuosa y fluidos de base oleosa o sintética, también llamados de emulsión inversa. Los fluidos base agua consisten en una fase acuosa salina, con pequeñas cantidades de lubricantes derivados del petróleo, y arcilla como agente de control de viscosidad. Los fluidos de base oleosa o sintética están compuestos por arcillas y una fase acuosa salina emulsionada en una base hidrocarbonada (Sadiq et al., 2003). En la Tabla 1.1, son detallados los constituyentes y aditivos más comúnmente utilizados en los distintos tipos de fluidos.

**Tabla 1.1.** Componentes comunes de los distintos tipos de fluidos utilizados en la perforación de pozos de gas y petróleo  
Adaptado de: Reis (1996); USEPA (2000 a); OGP (2003); Ball et al. (2012).

Tipo de fluido	Base	Aditivos (comunes a todos los tipos de base)					
		Control de Viscosidad	Control de Densidad	Sales	Dispersantes	Biocidas	Otros
<b>Base Acuosa</b>	Agua dulce o salina	Arcillas (bentonita, caolinita, arcillas organofílicas); polímeros orgánicos (celulosa, almidón, lignita, entre otros)	Barita (más usado), calcita, carbonatos	Cloruros de potasio, sodio, magnesio y calcio	Fosfatos, lignosulfonatos, taninos	Carbamatos, sulfuros, aldehídos, fenoles clorados	Inhibidores de corrosión y desincrustantes
<b>Base Oleosa</b>	Aceite mineral, gas oil, petróleo crudo, parafinas						
<b>Base Sintética</b>	Esteres vegetales, oleofinas						

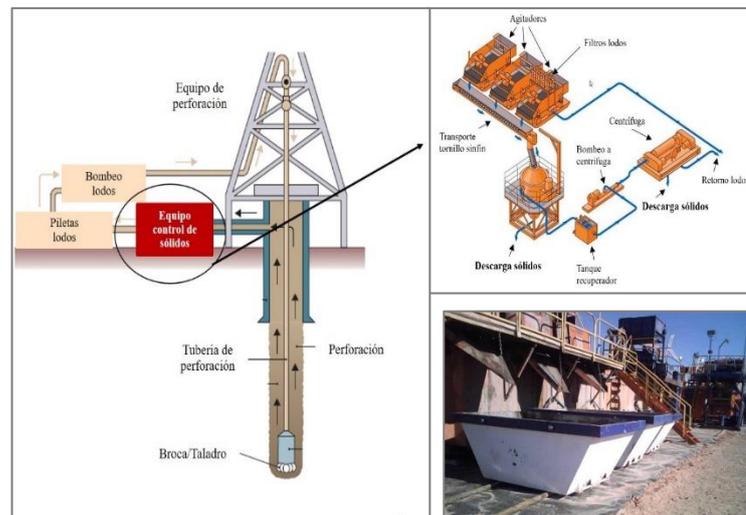
El tipo de base y los aditivos utilizados en el fluido de perforación varían en función de las necesidades operacionales, factores logísticos y tecnológicos, costos y aspectos ambientales (Veil et al., 1995; IPIECA-OGP, 2009). Los fluidos base agua son menos peligrosos para el ambiente y tienen un menor costo de producción, por lo cual son mayormente utilizados, excepto en perforaciones cuyas características requieren necesariamente del uso de fluidos oleosos. No obstante, los fluidos base oleosa suelen ser más eficientes en la perforación y generan menor volumen de recortes por pozo perforado, por lo cual suelen ser utilizados a pesar de las restricciones ambientales (Ball et al., 2012). Los fluidos de perforación de base sintética han sido desarrollados con el objetivo de reducir la toxicidad de los fluidos de base oleosa, mediante el reemplazo de derivados del petróleo por compuestos de menor toxicidad ambiental; no obstante, su uso no se ha generalizado aún en el país. De esta manera, los recortes de perforación son primariamente clasificados como: **recortes base agua y recortes base oleosa.**

En las operaciones en plataforma marina (“*off-shore*”), las alternativas de gestión de los recortes de perforación son escasas y la situación es de mayor complejidad que en las perforaciones en tierra (“*on-shore*”), más comunes en la Argentina. Las opciones posibles para la gestión de los recortes de perforación generados *off-shore* son la reinyección a pozo, el traslado para su tratamiento y disposición final en tierra, o la descarga en el fondo marino, lo cual está siendo cada vez más restringido debido a los impactos ambientales que esta práctica implica (Ball et al., 2012). En las operaciones *on-shore*, históricamente los recortes de perforación fueron dispuestos en piletas a cielo abierto, ubicadas en la misma locación de perforación (“*on-site*”) o en las cercanías de la misma (“*off-site*”), en las cuales también se almacenan otros desechos de la perforación, como el agua de formación.

Usualmente, el sobrenadante de la mezcla de desechos dispuestos en las piletas a cielo abierto se deja evaporar, se succiona mediante bombeo y se reinyecta en el pozo, o se esparce en el terreno circundante. Al finalizar las operaciones de perforación y terminación del pozo, estas piletas se cubren con tierra y, en algunos casos, se realiza algún escarificado o práctica de aireación para favorecer la atenuación natural de los contaminantes allí depositados. Sin embargo, frecuentemente se crean condiciones anaeróbicas que dificultan el proceso natural de degradación de los hidrocarburos

presentes, el cual suele ser lento aún en condiciones favorables. Además, el riesgo de lixiviación de metales y sales a cuerpos de aguas superficiales o subterráneas es muy alto. De esta manera, estas piletas resultan en pasivos ambientales complejos por su cantidad y potencial peligrosidad (Haut et al., 2007; Wojtanowicz, 2008).

En la actualidad, a nivel nacional e internacional, y debido al desarrollo de la legislación ambiental y la exigencia de las autoridades de aplicación, este sistema está siendo reemplazado gradualmente por el sistema de “locación seca”. El sistema de locación seca consiste en la disposición de los recortes de perforación en contenedores estancos y su traslado a sitios de almacenamiento transitorio o repositorios para su tratamiento y/o disposición final, una vez que el fluido ha sido separado del recorte de perforación en el equipo de control de sólidos, compuesto por un conjunto de centrífugas, hidrociclones, decantadores y zarandas (Figura 1.1). No obstante, el sistema de piletas *on-site/off-site* sigue utilizándose en aquellos casos en que los contenidos de compuestos o elementos peligrosos de los residuos allí depositados, no superen los valores límite establecidos por la normativa ambiental pertinente (IAPG, 2009; Ball et al. 2012).



**Figura 1.1.** Esquema equipo de perforación (izquierda) y detalle de equipamiento de control de sólidos (derecha arriba). Las flechas claras indican el sentido de circulación de los lodos y las flechas oscuras de los recortes de perforación. En la foto (derecha abajo), se observan las lengüetas de descarga de sólidos y los contenedores dispuestos para su recepción. Adaptado de OGP (2003) e IPIECA-OGP (2009).

### 1.3 Toxicidad e impacto ambiental de los recortes de perforación

Los recortes de perforación consisten en un material de aspecto lodoso y débil estructuración, compuesto principalmente por partículas correspondientes a la fracción limo, con contenidos variables de arcillas y sales, y biológicamente empobrecido. En la Figura 1.2, puede observarse el aspecto de ambos tipos de recortes de perforación y su disposición en los repositorios de almacenamiento transitorio.



**Figura 1.2.** Recortes de perforación en repositorio en campo y vista cercana de muestras: recorte base agua (arriba) y recorte base oleosa (abajo).

Como se indicó anteriormente, la toxicidad de los recortes está asociada a los fluidos utilizados en la perforación y a la formación geológica de origen, por lo cual el tipo y contenido de elementos y compuestos peligrosos en este residuo será variable. No obstante, diversos estudios sobre el impacto ambiental de esta corriente de

desechos en el medio terrestre y marino, identifican cuatro características principales, que representan la peligrosidad y/o toxicidad de este residuo:

- (i) Elevado contenido de sales inorgánicas, principalmente cloruros (Leuterman et al., 1999; Bauder et al., 2005; Willis et al., 2005; Onwukwe y Nwakaudu, 2012);
- (ii) Alta concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) en recortes base oleosa (hasta un 10-20 % en peso), con una proporción significativa de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (USEPA, 2000 a; Grant y Briggs, 2002; McCosh y Getliff, 2003; OGP, 2003; Arce-Ortega et al., 2004; Vardaro et al., 2005; Ayotamuno et al., 2009; Kisic et al., 2009; Ball et al., 2012);
- (iii) Contenido variable de elementos potencialmente peligrosos (EPTs), comúnmente llamados “metales pesados” (Ba, Cr, Cd, Hg, Pb, As, Co, Ni, Zn, Mo, V), los cuales pueden ser originarios del fluido de perforación o provenir de los minerales presentes en la formación. Estos constituyentes suelen encontrarse en concentraciones bajas o en formas no biodisponibles, pero deben ser considerados dada su toxicidad (Reis, 1996; Terzaghi et al., 1998; USEPA, 2000 b; Breuer et al., 2008; Neff, 2008; Joel y Amajuoyi, 2009);
- (iv) Potencial toxicidad de otros aditivos utilizados en los fluidos de perforación (biocidas, dispersantes, desincrustantes, etc.) (Holdway, 2002).

#### **1.4 Alternativas de gestión de recortes de perforación**

De manera general, las alternativas de gestión propuestas para los recortes de perforación de pozos de gas y petróleo contemplan: prácticas que reduzcan el volumen o toxicidad del residuo, estrategias de reuso o reciclado, métodos fisicoquímicos o biológicos de tratamiento y prácticas de disposición final. En la literatura científica, los antecedentes de experiencias a escala de laboratorio, piloto o campo, de tratamiento o disposición final de recortes de perforación son escasos, o al menos no se encuentran disponibles en las bases de datos de común acceso para la comunidad científica. Ello

puede deberse a que las empresas u organizaciones privadas del rubro suelen evaluar e implementar sus propias técnicas, las cuales no siempre son de dominio público debido a razones de propiedad intelectual.

En la Tabla 1.2 se exponen sintéticamente los antecedentes hallados sobre alternativas propuestas, evaluadas o aplicadas para la gestión de este residuo, tanto por las organizaciones privadas y empresas del rubro en esfuerzos de I+D, como por la comunidad científica o autoridades de aplicación y regulación ambiental, en el ámbito nacional e internacional. Asimismo, se indican los requerimientos generales para la implementación de la estrategia, y sus ventajas y desventajas

**Tabla 1.2.** Alternativas de gestión de recortes de perforación base oleosa y base acuosa. Elaborado en base a: Ball et al. (2012); Onwukwe y Nwakaudu (2012); U.S. DOE's Drilling Waste Management Information System (2016).

Estrategias		Requerimientos	Ventajas y Desventajas	Referencias
<b>Reducción de volumen o toxicidad</b>	Perforación direccional; perforación en diámetros menores.	Mayor desarrollo tecnológico.	Simplificación tratamiento y disposición final; aumento de costos de perforación.	Veil et al., 1995; Norman et al., 2002; Paiuk, 2005; Candler y Friedheim, 2006.
	Uso de fluidos de bases sintéticas y/o aditivos de menor toxicidad ambiental.			
	Perforación con aire.			
<b>Reuso o reciclado</b>	Relleno de caminos, canteras o locaciones.	Tratamiento previo para la reducción de contaminantes a límites legales; permisos especiales de las autoridades de aplicación ambiental y de superficiarios.	Bajo costo; reutilización del residuo; monitoreo a largo plazo.	Choi et al., 2005; Choi y Chang, 2009; Chiappori et al., 2013.  Kelley y Mendelsohn, 1995; Hester et al., 2002; Willis et al., 2005.
	Restauración de humedales.			
	Incorporación en cemento o ladrillos para la construcción.	Tratamiento y/o reducción a niveles guía de compuestos peligrosos; adaptación tecnológica para la incorporación del residuo.	Reutilización del residuo como insumo; costos relacionados a la adaptación tecnológica para la utilización del residuo; posibles emisiones de compuestos peligrosos; monitoreo a largo plazo; restricciones normativas.	Filippov et al., 2009
	Combustible			

**Tabla 1.2. (Continuación).** Alternativas de gestión de recortes de perforación base oleosa y base acuosa. Elaborado en base a: Ball et al. (2012); Onwukwe y Nwakaudu (2012); U.S. DOE's Drilling Waste Management Information System (2016).

		Estrategias	Requerimientos	Ventajas y Desventajas	Referencias
Tratamiento y Disposición Final	Métodos fisicoquímicos	Estabilización/solidificación	Espacio pequeño impermeabilizado; agentes químicos; equipamiento para el tratamiento.	Tratamiento rápido y bajo requerimiento de espacio; alto costo; riesgos ambientales a largo plazo; necesidad de monitoreo; restricciones normativas frecuentes; menor cumplimiento de estándares ambientales.	Al-Ansary y Al-Tabba, 2007; Fantín et al., 2005.
		Desorción térmica de contaminantes Incineración	Equipos de incineración o desorción portátiles; combustible.	Remoción rápida y completa de contaminantes; reducción del volumen de residuo; alto costo; potenciales emisiones de contaminantes a la atmósfera; necesidad de disposición de producto inerte resultante.	
	Métodos biológicos	Aplicación en suelo ( <i>Landfarming/landspreading</i> )	Espacio muy amplio con suelo fértil y biológicamente activo; fertilización; agua; equipamiento de laboreo.	Bajo costo; tratamiento de grandes volúmenes de residuo en simultáneo; remoción lenta de contaminantes (puede aumentar el costo); emisión de compuestos orgánicos volátiles, necesidad de monitoreo periódico.	Chaineau et al., 1995; Pozzo Ardizzi, 2000; Steliga et al., 2009, 2010 y 2012.
		Biorreactores/Bioaugmentación	Mayor desarrollo tecnológico; infraestructura y personal calificado; fertilización; agua.	Remoción completa y rápida de contaminantes; tratamiento de pequeños volúmenes; control de emisiones y lixiviados; alto costo.	Okparanma et al., 2009.

**Tabla 1.2. (Continuación).** Alternativas de gestión de recortes de perforación base oleosa y base acuosa. Elaborado en base a: Ball et al. (2012); Onwukwe y Nwakaudu (2012); U.S. DOE's Drilling Waste Management Information System (2016).

		Estrategias	Requerimientos	Ventajas y Desventajas	Referencias
Tratamiento y Disposición Final	Métodos biológicos	Biopilas/Compostado	Espacio impermeabilizado y/o infraestructura de contención; fertilizantes inorgánicos/enmiendas orgánicas en volumen considerable; agua; equipamiento de aireación o volteo.	Bajo costo; tratamiento de grandes volúmenes de residuo en simultáneo; remoción completa y relativamente rápida (respecto de otros métodos biológicos) de contaminantes; generación de un subproducto reutilizable; tratamiento de más de una corriente de desechos; emisión de lixiviados y de compuestos orgánicos volátiles, riesgo de incendio, necesidad de monitoreo periódico.	Scheibli, 2002; Chaillan et al., 2006; Rojas-Avelizapa et al., 2005, 2006 y 2007; Ayotamuno et al., 2009.
		Vermicompostado	Área para camas de lombrices; fertilización; agua.	Remoción completa y relativamente rápida (respecto de otros métodos biológicos) de contaminantes; producción de un subproducto reutilizable; costo medio; tratamiento de volúmenes medios de residuos en simultáneo; sólo apto en un rango limitado de concentración del contaminante; alta demanda en cuidado de lombrices y monitoreo; potencial bioacumulación de metales.	Getliff et al., 2002; McCosh y Getliff, 2003.
	Otros	Entierro en rellenos sanitarios	Grandes espacios en rellenos impermeabilizados; transporte desde la locación de perforación al relleno.	Disposición final rápida; costo medio, riesgos durante el transporte o descarga; monitoreo a largo plazo (emisiones, lixiviados); restricciones normativas frecuentes; menor cumplimiento de estándares ambientales.	
		Reinyección a formación			
		Descarga en fondo marino			
					Geehan et al., 2007.
				OGP, 2003	

Aun cuando se realicen importantes esfuerzos tecnológicos u operativos para la reducción del volumen y/o toxicidad de los recortes de perforación, esta corriente de desecho es generada en forma rutinaria, como resultado de las operaciones normales de perforación de pozos de gas y petróleo, a diferencia de un suelo o sedimento contaminado por hidrocarburos, que es usualmente generado por situaciones de contingencia, como derrames durante el transporte de petróleo o la rotura de ductos. Por lo tanto, es deseable que las alternativas tecnológicas para su tratamiento y/o disposición final puedan ser desarrolladas y aplicadas con costos accesibles, dado los grandes volúmenes que son generados en forma periódica.

En las áreas de explotación hidrocarburífera, los residuos orgánicos originados por las actividades domésticas e industriales (residuos de cocina de los comedores de personal, lodos de las plantas modulares de tratamiento de efluentes cloacales de los campamentos, restos de poda de jardines de oficinas, madera de pallets y cajones, etc.) pueden alcanzar hasta un 55 a 70 % en peso del total de residuos sólidos generados anualmente en un yacimiento (Elshorbagy y Alkamali, 2005). Incluso, en algunos yacimientos patagónicos, se han desarrollado experiencias de compostaje de estos residuos, en cumplimiento de los estándares de gestión ambiental propios de las empresas operadoras, obteniendo enmiendas orgánicas estables (compost) de buena calidad (Universo YPF, 2010). Además este tipo de residuos orgánicos son generados en localidades o municipios cercanos a los yacimientos petroleros, y en varios casos compostados, como parte de los programas de gestión de residuos sólidos urbanos de estos municipios (Mazzarino y Satti, 2012).

Entre las alternativas descritas para el tratamiento o disposición de recortes de perforación base acuosa y base oleosa, la utilización de aquellas estrategias que involucren la aplicación de estos residuos orgánicos, o de enmiendas producidas a partir de los mismos, permitiría su reciclado o reutilización y valorización, posibilitando el tratamiento simultáneo de más de una corriente de los desechos generados en los yacimientos o en localidades cercanas. Además, esta estrategia puede colaborar significativamente con los programas de gestión de residuos desarrollados por las empresas operadoras de áreas hidrocarburíferas, en cumplimiento de la normativa legal vigente y de los estándares de gestión ambiental propios.

## **1.5 Aplicación de enmiendas orgánicas a recortes de perforación base agua, para su uso como material de relleno en la revegetación y restauración de áreas degradadas**

Los recortes de perforación base acuosa contienen algunos componentes, como el exceso de calcio y las arcillas, que son intrínsecamente beneficiosos para muchos suelos (Méndez-Natera et al., 2007). Además, se han evaluado los efectos de la disposición de recortes base acuosa en las propiedades de un suelo agrícola y en el desarrollo de cultivos vegetales (germinación de semillas, caracteres vegetativos y nodulación de plántulas), sin observarse cambios o efectos negativos por la aplicación del residuo (Bauder et al., 2005; Kisic et al., 2009). Por otro lado, los recortes base acuosa han demostrado ser aptos como soporte para el crecimiento de la vegetación en áreas inundables (humedales y marismas), resultando en materiales/sustratos apropiados para el relleno y/o la rehabilitación de este tipo de ecosistemas (Kelley y Mendelssohn, 1995; Hester et al., 2002; Willis et al., 2005).

Preliminarmente, estos antecedentes permitirían considerar, como una opción de gestión sustentable y de bajo costo, el uso de recortes de perforación base agua, semejantes en apariencia y composición a un suelo arcilloso y salino, como material de relleno para la revegetación de áreas degradadas (canteras, caminos, locaciones), muy comunes en los yacimientos hidrocarbúricos. Sin embargo, luego de descartar la presencia de compuestos en concentraciones tales que puedan resultar tóxicas o peligrosas para el ambiente, uno de los principales limitantes del uso de estos materiales como sustrato o “sustituto de suelo”, puede ser su elevado contenido de sales, y en particular de sales de sodio.

La aplicación de enmiendas orgánicas estables (compost) en suelos salino-sódicos ha demostrado incrementar el contenido de carbono orgánico del suelo a mediano y largo plazo (Lakhdar et al., 2009). El aumento del contenido de materia orgánica facilita la formación de agregados en el suelo, lo cual mejora la estructura y porosidad, favoreciendo el lavado del exceso de sales solubles mediante el riego o las precipitaciones (Khaleel et al., 1981; Laos et al., 2002; Zeytin y Baran, 2003). Asimismo, está bien documentado que los residuos orgánicos compostados presentan

una lenta liberación de nutrientes (principalmente de nitrógeno y fósforo), debido a la elevada estabilización de la materia orgánica que contienen, permitiendo el mantenimiento de condiciones de fertilidad a largo plazo. Estas condiciones no sólo incentivan la actividad microbiana y enzimática del suelo, si no que pueden favorecer el desarrollo y crecimiento vegetal (Laos et al., 2000; Tejada y González, 2003; Tejada et al., 2008, Walker y Bernal, 2008; Mazzarino y Satti, 2012).

De esta manera, la aplicación de residuos orgánicos compostados a los recortes de perforación base agua, podría mejorar significativamente sus propiedades como sustituto de suelo o sustrato de crecimiento vegetal, posibilitando la reutilización de este material para el relleno y revegetación de áreas degradadas. No obstante, las referencias halladas en la bibliografía científica sobre la aplicación de compost, como estrategia para la mejora de las condiciones como soporte de crecimiento vegetal de recortes de perforación base agua, son escasas.

Un antecedente de experiencias similares es la de Kelley y Mendelsohn (1995), quienes evaluaron el uso de recortes base agua enmendados con “compost verde” (producido sólo con residuos vegetales como materia prima), y distintas dosis de fertilizantes inorgánicos, como sustrato de crecimiento de dos especies vegetales típicas de áreas inundables costeras (marismas), con el objetivo de uso potencial de estos sustratos como sedimentos en la restauración de estos ambientes. Estos autores observaron que el principal efecto de la adición de compost estuvo asociado a la regulación del pH (fuertemente alcalino) de los recortes de perforación.

## **1.6 El compostaje como estrategia para el biotratamiento de recortes de perforación base oleosa**

La principal diferencia entre los recortes de perforación base acuosa y base oleosa está dada por el contenido de hidrocarburos. Por consiguiente, esta característica diferencial requiere de distintos abordajes en la evaluación de las estrategias para su tratamiento y disposición final. Entre las tecnologías propuestas para el tratamiento de recortes de perforación, listadas en la Tabla 1.2, aquellas basadas en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de organismos vivos (plantas,

hongos, bacterias), para la degradación y/o transformación de compuestos contaminantes a productos inocuos o de menor toxicidad, se conocen como técnicas de *biorremediación* o *biotratamiento* (Eweis et al., 1999).

Para el tratamiento de recortes base oleosa, estas estrategias reúnen una serie de ventajas, frente a otras técnicas de tratamiento físico-químico, como: un menor costo, la transformación o eliminación del compuesto contaminante de manera permanente, menor generación de emisiones o efluentes secundarios y gran aceptación pública, entre otras. No obstante, el grado de éxito en la degradación de los contaminantes de interés es dependiente de muchos factores, entre ellos: la naturaleza y concentración del contaminante, la dinámica de la población o comunidad microbiana degradadora, y las condiciones ambientales. Es por ello que, particularmente, la duración prolongada de estos tratamientos y el uso de maquinaria pesada para la homogeneización y el volteo del material, que resultan en un aumento de costos y complicaciones logísticas, han llevado a cierta pérdida de reputación de estas tecnologías (Ward, 2004; Juwarkar et al., 2010). De esta manera, el tratamiento biológico de materiales contaminados por hidrocarburos constituye un sistema complejo, que debe ser comprendido en sus partes y optimizado para alcanzar el grado de eficiencia requerido.

Durante las últimas décadas, las autoridades de aplicación ambiental de las provincias patagónicas argentinas, se han inclinado por recomendar o exigir el uso de técnicas biológicas para el tratamiento de suelos y materiales contaminados por hidrocarburos, dadas sus ventajas frente a otros métodos de tratamiento fisicoquímico. Es por ello que las organizaciones privadas del rubro (empresas operadoras de yacimientos hidrocarburíferos y contratistas) han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo y la aplicación de estrategias de biorremediación de suelos o materiales contaminados por hidrocarburos mediante las técnicas más tradicionales, tales como la aplicación en suelo ("*landfarming*") o el tratamiento en biopilas, utilizando fertilización inorgánica, aireación por volteo y riego, como prácticas para la bioestimulación de la flora microbiana degradadora. No obstante, debido a un conjunto de factores, estas técnicas han tenido un variable grado de éxito en su aplicación.

Entre los factores que pueden limitar la efectividad de estas técnicas podrían contemplarse: el clima de la región patagónica, con períodos muy secos y muchos

meses de temperaturas muy bajas; la baja disponibilidad de agua dulce en los yacimientos para un riego adecuado; el costo asociado a la utilización de maquinaria pesada para las operaciones de mezcla y volteo del material bajo tratamiento; y, en muchos casos, un elevado contenido inicial de hidrocarburos en el material a biotratarse que puede resultar tóxico para la comunidad microbiana degradadora. Esta serie de limitaciones influyen, principalmente, en el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar los valores guía o límite en la concentración de hidrocarburos, incrementando los costos económicos y logísticos asociados. De esta manera, se hace ineludible la búsqueda de alternativas de tratamiento que puedan superar estas limitaciones para el tratamiento de los recortes de perforación base oleosa.

El compostaje de materiales contaminados con residuos orgánicos, utilizado como técnica de biorremediación, ha demostrado alta eficacia frente a otras técnicas más tradicionales de tratamiento biológico, y variada aplicabilidad en la degradación de hidrocarburos del petróleo y otros contaminantes en diversas matrices. Esta diferencia se atribuye principalmente a la mayor disponibilidad de oxígeno, agua y nutrientes, y a la gran actividad biológica, propia del proceso de compostaje, que puede resultar en una alta velocidad y eficacia en la degradación de los compuestos contaminantes (Semple et al., 2001; Vallini et al., 2002; Van Gestel et al., 2003; Antizar-Ladislao et al., 2004; Sarkar et al., 2005; Lee et al., 2008; Megharaj et al., 2011; Sayara et al., 2011; Zhang et al., 2011; Chen et al., 2015).

En su definición más general, el compostaje es un proceso en fase sólida de transformación biológica de la materia orgánica, en forma aeróbica y controlada (Zuconi y De Bertoldi, 1987; Rynk et al., 1992). Este proceso, como tecnología de tratamiento de residuos sólidos, puede ser entendido de acuerdo a dos perspectivas. Por un lado, una perspectiva “orientada al producto”, donde los residuos sólidos orgánicos (domésticos o urbanos, agro-industriales, de poda, lodos de plantas depuradoras de efluentes (biosólidos), etc.), son reciclados con la producción de una enmienda orgánica de alto valor agrícola denominada “compost”. Por otro lado, una perspectiva “orientada al proceso”, cuando el compostaje es utilizado como estrategia para la estimulación de la biodegradación o transformación de contaminantes orgánicos en matrices sólidas, como suelos o sedimentos contaminados (Vallini et al., 2002; Mazzarino y Satti, 2012).

La biorremediación por compostaje consiste en la mezcla de la materia prima del compostaje, es decir residuos orgánicos, con el material contaminado, de forma que durante el proceso de compostado el o los contaminantes son degradados o transformados a productos más inocuos por la flora microbiana activa, característica de un proceso de compostaje (Ziegenfuss y Williams, 1991; Semple et al., 2001; Antizar-Ladislao et al., 2004).

El proceso de compostaje puede llevarse a cabo bajo dos sistemas: abiertos o cerrados (en reactores), y con diferentes métodos o formas de suministro de oxígeno, lo cual es crucial, independientemente del sistema utilizado. En general, la aireación de la masa en compostaje puede realizarse de manera pasiva o por el movimiento forzado de aire. La aireación pasiva o natural, tiene lugar por difusión molecular y el movimiento del aire causado por el viento y la convección térmica. No obstante, la disponibilidad adecuada de oxígeno para el proceso con este tipo de aireación es dependiente en buen grado de la porosidad del material. Además, la mayoría de los sistemas de compostaje con aireación pasiva implican normalmente un volteo y homogeneización periódica del material (Chica Pérez y García Morales, 2008).

En la aireación forzada, el aire se suministra mecánicamente utilizando sopladores (presión positiva) o aspiración (presión negativa) existiendo variadas estrategias posibles de control y configuraciones del equipamiento necesario (conductos, compresores, etc.). El flujo de aire en estos sistemas puede ser continuo, o bien intermitente según la necesidad. La aireación forzada suele ser controlada en base a la temperatura de los materiales en compostaje, o por intervalos regulares, en forma manual o automática. Otra modalidad utilizada, particularmente en sistemas cerrados, es la recirculación de parte del aire para retener la temperatura y humedad en el proceso (Rynk et al., 1992)

Los sistemas abiertos de compostaje suelen ser de bajo costo y tecnológicamente sencillos, requiriendo de disponibilidad de terreno y condiciones climáticas favorables para su aplicación. No obstante, con algunas precauciones pueden realizarse bajo condiciones ambientales más adversas. El material a compostar suele disponerse en forma de hileras, pilas o trincheras. El método de aireación más común es pasivo con volteo (sistemas dinámicos), siendo menos frecuente los sistemas estáticos con aireación forzada. En los sistemas cerrados, el material se encuentra

totalmente aislado, confinado en dispositivos estancos de variable tamaño, tales como túneles, contenedores o tambores. El tipo de aireación es forzada, el control de las variables del proceso puede ser mucho más efectivo y el mismo podría ser optimizado. Sin embargo, la complejidad tecnológica aumenta, además de los costos y requerimientos energéticos asociados (Chica Pérez y García Morales, 2008).

Particularmente, para el compostaje de residuos orgánicos urbanos, se ha desarrollado y evaluado un importante abanico de opciones y combinaciones posibles de los distintos sistemas. No obstante, la selección y aplicación del tipo de sistema de tratamiento dependerá de los factores económicos, técnicos y ambientales de cada situación (Lavado, 2012).

La disponibilidad de oxígeno y agua, proporciones de macronutrientes adecuadas (principalmente carbono, nitrógeno y fósforo) y condiciones de pH favorables, son factores determinantes para el desarrollo exitoso del proceso de compostaje en general, y de la biodegradación de los contaminantes de interés en particular (Semple et al., 2001; Van Gestel et al., 2003; Zhang et al., 2011). La aplicación de residuos orgánicos a materiales muy contaminados con hidrocarburos y muy pobres en nutrientes (como los recortes de perforación base oleosa), aporta microorganismos en variedad y cantidad, nutrientes fácilmente disponibles, incluyendo carbono orgánico altamente degradable (lo que implica mayor disponibilidad de energía). Además, puede mejorar la retención de agua y la estructura del material a biotratarse, incrementando la capacidad de oxigenación (Vallini et al., 2002. Savage y Díaz, 2007).

De esta manera, la aplicación de proporciones adecuadas de residuos orgánicos y/o de agentes estructurantes a materiales contaminados, permitirían una reducción en la demanda de operaciones de oxigenación del material en tratamiento, como el volteo o la inyección de aire, así como del riego, considerando que en muchas áreas de explotación hidrocarburífera la reserva de agua dulce es restringida. Además, al proveer condiciones ambientales muy favorables para el desarrollo de la microflora degradadora, el tiempo necesario para alcanzar los objetivos de remediación planteados podrá minimizarse, con las consiguientes ventajas en los costos operativos y logísticos asociados. Estos aspectos fundamentan la posibilidad de obtener mejores

resultados en la biorremediación de materiales contaminados mediante el compostaje, respecto de otras técnicas de tratamiento biológico.

Como se indicó previamente, la biorremediación por compostaje de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, ha sido ampliamente estudiada y reportada en la literatura científica. No obstante, los recortes de perforación base oleosa son materiales complejos, muy diferentes de un suelo contaminado, dado sus características físicas y la potencial toxicidad debida a los aditivos provenientes de los fluidos de perforación de origen. En la medida de nuestro conocimiento, el compostaje de recortes de perforación base oleosa como alternativa para su tratamiento, ha sido evaluado en esfuerzos de I+D realizado por empresas que prestan servicios relacionados a las operaciones de perforación (Parenteau y Lyon, 2001; McMillen et al., 2002; Saretsky et al., 2002; Scheibli, 2002), principalmente, y en menor grado en el ámbito científico internacional.

Entre los escasos antecedentes de investigación hallados sobre experiencias de investigación en el compostaje de recortes de perforación de base oleosa a nivel internacional, se ha reportado el uso de estiércol de aves de corral en combinación con suelo fértil o residuos de poda, alcanzando una reducción del 99 % de los hidrocarburos totales del petróleo, en seis semanas de tratamiento (Imarhiagbe et al., 2013). Por otro lado, el Instituto Mexicano del Petróleo ha realizado también esfuerzos en evaluar esta tecnología para la biorremediación de suelos contaminados con recortes de perforación base oleosa. En estos estudios, se utilizaron residuos de frutas o chips de madera, como agente estructurante, con el agregado de fertilización inorgánica para alcanzar relaciones C/N/P adecuadas. Los resultados obtenidos indicaron un efecto positivo del agregado de enmiendas orgánicas en la biodegradación de los hidrocarburos presentes en los suelos contaminados por recortes de perforación, respecto de tratamientos sin aplicación de enmiendas (Rojas-Avelizapa et al., 2006 y 2007).

Finalmente, el estudio y desarrollo de estrategias de biotratamiento de suelos y otros materiales contaminados mediante compostaje, se encuentra en expansión a nivel internacional, pero ha tenido limitado desarrollo en el ámbito nacional (Vecchioli et al., 2003; Medaura et al., 2005; Laos et al., 2012). Específicamente, en el tratamiento de recortes de perforación base oleosa, se ha encontrado una única referencia a nivel

nacional de una experiencia de tratamiento biológico de recortes de perforación mediante la técnica de aplicación en suelo (“*landfarming*”) en el norte del país (Pozzo Ardizzi, 2000). Por lo tanto, avanzar en una mayor comprensión de las condiciones y limitaciones del proceso de compostaje de este residuo, en particular utilizando residuos orgánicos disponibles en las áreas de explotación petrolera y considerando las condiciones ambientales locales, puede constituir un punto de partida en la evaluación de alternativas viables y sustentables para la gestión de esta corriente de desecho de la industria petrolera nacional.

### **1.7 Estado de situación, demanda e impacto regional y nacional**

Las regulaciones ambientales y los costos asociados al uso de fluidos de perforación de base oleosa, han marcado una tendencia hacia el uso de fluidos de base acuosa en las áreas de explotación petrolera de la Patagonia argentina, reduciendo de esta manera los costos de producción y la generación de recortes contaminados por hidrocarburos. Sin embargo, en muchas situaciones, como perforaciones profundas o de largo alcance, se requiere necesariamente del uso de fluidos de base oleosa a fin de satisfacer la eficiencia de la operación (Veil et al., 1995; Vardaro et al., 2005). Por lo tanto, las proporciones de recortes de base oleosa y base acuosa acopiados actualmente en los repositorios de los yacimientos de la región son muy variables, debido a que la frecuencia y volumen de generación de uno u otro tipo dependen de las características y demandas operacionales del pozo a perforar.

En la región, la práctica más común de disposición de recortes base agua consiste en su vuelco en bajos naturales, canteras agotadas, antiguas piletas saneadas o repositorios (áreas impermeabilizadas y cercadas). Esta metodología dificulta el secado de los recortes (que pueden contener agua en exceso, debido a una ineficiente separación del fluido de perforación) y, aun cuando se realicen procedimientos de monitoreo y control de estos sitios, pueden ocasionarse efectos no deseados en el entorno ambiental, debido a que estos sitios o áreas pueden no resultar aptos para el almacenamiento o disposición final de este material residual (Chiappori et al., 2013).

Por otro lado, el perfil químico cuali-cuantitativo de los recortes de perforación base oleosa clasificaría este material como un “residuo peligroso”, en los términos de la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24051 (Decreto Reglamentario 831/93), por lo cual deben ser necesariamente almacenados, transportados y tratados de acuerdo a lo estipulado en esta norma. Esta clasificación se encuentra principalmente asociada al contenido de hidrocarburos y, potencialmente, de EPTs (elementos potencialmente peligrosos, comúnmente denominados “metales pesados”) en los recortes de perforación. En este punto cabe aclarar que la Ley Nacional N° 24051 se encontraría formalmente derogada por la Ley N° 25612 (de residuos industriales y de actividades de servicio). Sin embargo, el veto de esa parte del articulado de la segunda norma, así como la ausencia de otras regulaciones específicas, implicó que ambas normas coexistan, generando una importante confusión legal y la continuidad de la aplicación de la Ley N° 24051 (y su decreto reglamentario), en la regulación de la gestión de residuos peligrosos y/o de origen industrial.

De manera general, la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24051 (Decreto Reglamentario 831/93), insta clara pautas de manejo de residuos peligrosos, la responsabilidad penal del generador del residuo “desde la cuna a la tumba”, y la recomposición de los daños ambientales originados por una disposición inadecuada de los mismos en todo el territorio nacional. Esta condición demanda a las empresas operadoras su almacenamiento transitorio en lugares aptos, usualmente repositorios acondicionados, y la búsqueda de alternativas para su tratamiento y disposición final avaladas por las autoridades de aplicación ambiental nacional y provincial.

Además, en las provincias patagónicas se ha desarrollado, junto al avance de las explotaciones petroleras en sus territorios, un importante andamiaje legal de regulación ambiental de esta actividad, en particular luego de la reforma de la Constitución Nacional del año 1994, que delega en las provincias la protección de sus recursos naturales. Por ejemplo, la Provincia del Neuquén, una de las provincias productoras de hidrocarburos más relevante, presenta importantes avances en la regulación ambiental de la actividad petrolera, con dos normas reglamentadas y aplicadas: la Ley Provincial N° 1875, modificada por Ley N° 2267 (texto ordenado) (Decreto Reglamentario 2656/99), y la Ley Provincial N° 2666 (promulgada en el año 2009). La Ley N° 2666 establece específicamente la aplicación del sistema de locación

seca, control de sólidos y el tratamiento de lodos y “*cuttings*” en plantas adecuadas para ello, por las empresas que realicen, en áreas de su propiedad o consignadas, perforaciones vinculadas con la actividad hidrocarburífera o minera.

Asimismo, las provincias patagónicas de Chubut y Santa Cruz cuentan con normativa ambiental específica (Ley XI N° 35-DR N° 1456/11 y Ley 2567-DR N° 712/02, respectivamente) que establecen pautas de manejo de los residuos potencialmente peligrosos generados por la actividad hidrocarburífera, en concordancia con lo estipulado por las Leyes N° 24051 y N° 25612 del nivel nacional.

Finalmente, la gestión de los residuos orgánicos urbanos (domésticos o domiciliarios, biosólidos, de poda y espacios verdes, etc.), constituye una problemática ambiental actual en nuestro país. En la región patagónica argentina, se ha desarrollado una vasta experiencia en el compostaje de estos residuos, con el doble objetivo de gestionar adecuadamente estas corrientes de desechos y de generar una enmienda orgánica de alto valor agrícola (Mazzarino y Satti, 2012). Evaluar nuevas formas de uso posibles, tanto para los residuos como para las enmiendas orgánicas obtenidas mediante compostaje, puede colaborar ampliamente en la valorización de los residuos sólidos urbanos y en la promoción y desarrollo de estrategias sustentables para su gestión.

## 1.8 Objetivos de este trabajo de tesis

### Objetivo general:

Evaluar la viabilidad de estrategias de tratamiento y reutilización de recortes de perforación de pozos de gas y petróleo, mediante la aplicación de residuos y enmiendas orgánicas generados en los yacimientos hidrocarburíferos, como alternativa tecnológica ambiental y económicamente sustentable.

### Objetivos particulares:

- I. Caracterizar los recortes de perforación de base acuosa y de base oleosa, a fin de identificar y analizar aquellas características físicas o químicas que puedan posibilitar o limitar las estrategias de tratamiento y/o de reuso propuestas (Capítulos 2 y 3).
- II. Evaluar el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas disponibles en la región patagónica argentina, en las propiedades como sustrato de crecimiento vegetal de los recortes de perforación base agua, para su uso potencial como material de relleno para la revegetación y/o restauración de áreas degradadas (Capítulo 2).
- III. Evaluar la biorremediación por compostaje con residuos orgánicos de cocina y jardín, usualmente disponibles en los yacimientos hidrocarburíferos, como estrategia de tratamiento de recortes de perforación base oleosa (Capítulo 3).

## CAPITULO 2

---

Aplicación de enmiendas orgánicas en recortes de perforación base agua, para su uso como sustrato de crecimiento vegetal en la restauración de áreas degradadas.

## **2.1 Introducción**

### **2.1.1 Efectos de la aplicación de enmiendas orgánicas en un suelo o sustrato**

La valorización de las enmiendas producidas a partir de residuos orgánicos ha crecido en base a su utilización en la agricultura, como insumo en viverismo, y en la recuperación de suelos degradados y contaminados. Estas estrategias son doblemente ventajosas para una producción sustentable de plantas y alimentos, y para el cuidado del ambiente. Como se expuso en el Capítulo 1, la utilización de enmiendas provenientes de residuos orgánicos implica el aprovechamiento de la materia orgánica de los residuos, rica en macro y micronutrientes. Asimismo, esta estrategia puede proveer una alternativa de reutilización de las grandes cantidades de residuos orgánicos provenientes de actividades agroindustriales y de las áreas urbanas (Stoffella y Kahn, 2005; Mazzarino y Satti, 2012).

Los distintos usos de estas enmiendas orgánicas se fundamentan en que la aplicación de materia orgánica estable, puede mejorar sustantivamente la fertilidad física, química y biológica de los suelos y sustratos (Tittarelli et al. 2007). El efecto positivo de la materia orgánica en la estructura, constituye el principal aspecto positivo de la aplicación de enmiendas orgánicas en las propiedades físicas de un suelo o sustrato. La materia orgánica colabora de manera directa (actuando como cementante) e indirecta (mediante el favorecimiento de la actividad microbológica), en la agregación de las partículas minerales, incrementando la macroporosidad de la matriz y favoreciendo sus propiedades hidráulicas. En particular, este efecto es maximizado en materiales o suelos de textura arcillosa, en los cuales la incorporación de enmiendas produce un aumento del tamaño de los poros, mejorando el equilibrio necesario entre micro y macro porosidad (García Izquierdo y Lobo Bedmar, 2008).

De esta manera, la aplicación de enmiendas orgánicas a un suelo o sustrato permite: disminuir el grado de compactación (facilitando la exploración por las raíces de las plantas); mejorar la estabilidad de los agregados (a fin de conservar la distribución de los poros a más largo plazo); y, aumentar la capacidad de

almacenamiento o retención de agua útil para las plantas, mejorando al mismo tiempo la infiltración y disminuyendo el riesgo de anegamiento. No obstante, el alcance de estos efectos es dependiente no sólo de la dosis, sino también del tipo de materia orgánica incorporada con la enmienda. En particular, del grado de humificación de la materia orgánica y de la calidad del carbono disponible para la comunidad microbiana, responsable, principalmente, de la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Khaleel et al., 1981; Tejada y González, 2003; Zeytin y Baran, 2003).

En el aspecto químico, el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas en un suelo o sustrato puede observarse principalmente sobre tres parámetros: (i) el aumento de la capacidad de intercambio catiónico, (ii) el aporte y la disponibilidad de macro y micronutrientes, y (iii) la regulación del pH. El complejo de intercambio de iones del suelo está compuesto por la interacción humus-arcilla, por lo cual los compuestos húmicos provenientes de las enmiendas orgánicas tendrán un rol fundamental en la formación del complejo de intercambio y, por lo tanto, en la regulación del pH y en la adsorción o desorción de los nutrientes (Sánchez y Rubio Delgado, 2008). Por otro lado, los nutrientes aportados por las enmiendas orgánicas son liberados lentamente, lo cual asegura la fertilización a largo plazo y reduce el riesgo de una pérdida rápida de los nutrientes por lixiviación o volatilización, y los problemas de contaminación de cuerpos de agua subterránea o superficial asociados (Laos et al., 2000).

El nitrógeno y el fósforo constituyen los nutrientes de mayor relevancia aportados por las enmiendas orgánicas. El nitrógeno en el compost puede encontrarse en forma orgánica e inorgánica. En un compost, un 10 % a 15 % del N total es inorgánico, por lo tanto se encuentra en forma soluble y disponible para las plantas, y entre el 85 % y el 90 % del contenido de N total es orgánico. La potencial disponibilidad para las plantas de la fracción de nitrógeno orgánico depende de muchos factores; entre ellos, los más relevantes son la calidad o tipo de carbono mayoritario y la actividad biológica del medio (en particular, de los géneros microbianos asociados al ciclo del N), debido a que estos factores determinarán el grado y velocidad de mineralización de la materia orgánica y, por lo tanto, la liberación de formas de N disponible para las plantas: amonios y nitratos (Tittarelli et al. 2007).

El fósforo es un nutriente esencial para las plantas y su baja concentración y solubilidad en los suelos suelen convertirlo en un nutriente crítico. Se estima que del

20 % al 40 % del P total de un compost se encuentra disponible, mientras que el resto se encuentra formando parte de biomoléculas o compuestos inorgánicos de solubilidad variable. En las transformaciones de P interviene una complicada red de factores fisicoquímicos y biológicos. No obstante, se ha demostrado que la liberación del fósforo orgánico es relativamente rápida, aunque si el pH del medio es alcalino o hay abundancia de calcio, el fósforo una vez liberado, puede insolubilizarse al formar fosfato monocálcico. Por otra parte, la aplicación de enmiendas orgánicas no sólo puede incrementar los niveles de P de manera directa, sino que también puede mejorar la capacidad de absorción y disponibilidad de fósforo presente en el suelo o sustrato (Sánchez y Rubio Delgado, 2008).

Sobre el final de la etapa de maduración del proceso de compostaje, el compost tiende a estabilizarse en valores de pH neutros o ligeramente alcalinos (6 a 8), dependiendo de la materia prima y del proceso. Por ejemplo, los compost de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos pueden presentar valores de pH más elevados, mientras que enmiendas orgánicas provenientes de otras materias primas pueden tener un pH más ácido. Por otro lado, el pH de un suelo o sustrato es elevado o alcalino cuando el complejo de intercambio se encuentra saturado de bases, y es bajo o ácido cuando en el complejo abundan los iones  $H^+$  en las posiciones de intercambio (González et al., 2011). De esta manera, el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas en la regulación del pH de un suelo o sustrato, y en consecuencia en las condiciones ambientales microbiológicas y en la disponibilidad de nutrientes, dependerá del tipo y dosis de enmienda que se utilice y de las características de los materiales a los que se aplique (Mazzarino et al., 2012 a).

La microbiología del proceso de compostaje es extremadamente compleja y se caracteriza por la sucesión de comunidades microbianas, que son seleccionadas por cambios lo suficientemente bruscos en las condiciones ambientales. No obstante, en términos del efecto de la incorporación de la enmienda en la fertilidad de un suelo o sustrato, lo importante es que en las comunidades microbianas de un compost maduro, existen en abundancia microorganismos celulíticos, pectinolíticos, proteolíticos, nitrificantes, etc., que contribuirán ampliamente en el ciclado de los nutrientes del suelo (Tittarelli et al. 2007).

Asimismo, la incorporación de materia orgánica frecuentemente origina un

rápido incremento en la biomasa microbiana y en la actividad respiratoria y enzimática del suelo (Marschener et al., 2003; Tejada et al., 2008). Por otra parte, la mejora en las propiedades físicas del sustrato, que incrementan la disponibilidad de agua y oxígeno, favorecen el desarrollo de la actividad biológica y, por lo tanto, la excreción de compuestos producto del metabolismo microbiano, como exopolisacáridos, que actúan como cementantes y dan estabilidad a los agregados de las partículas del suelo, generándose un círculo virtuoso para la fertilidad del suelo y el desarrollo vegetal.

### **2.1.2 Uso de compost en la restauración de suelos o sustratos salino-sódicos**

Las características de los recortes de perforación base agua, tales como su composición textural predominantemente arcillosa, el elevado contenido de sales (particularmente de sodio), y la deficiencia en los macronutrientes de mayor importancia para el crecimiento vegetal, como el nitrógeno y fósforo, asimilan a este material a un suelo salino-sódico de condiciones extremas, como se indicó en el capítulo introductorio de este trabajo. En suelos o materiales con alto contenido de sales de sodio, el exceso de este elemento promueve la dispersión de las partículas, aumentando la inestabilidad en los agregados y reduciendo el tamaño de los poros. Ello provoca un deterioro de la estructura del suelo, con un impacto directo en la adecuada circulación de oxígeno y agua. Además, estos suelos presentan un elevado riesgo de compactación, que dificulta la penetración de las raíces de las plantas afectando su anclaje y origina una mayor probabilidad de anegamiento (Richards, 1954; Lakhdar et al., 2009; Seenivasan et al., 2015).

Las condiciones físicas y químicas de los suelos salinos proveen un entorno ambiental desfavorable para el desarrollo de la comunidad microbiana responsable del ciclado y liberación de los nutrientes necesarios para el crecimiento y establecimiento vegetal. Esto ha sido verificado mediante la observación de una importante inhibición de la actividad biológica y enzimática en este tipo de suelos (Tejada et al., 2006; Ouni et al., 2013; Chaganti et al., 2015).

Por otro lado, la presión osmótica, causada por el exceso de sales en la rizosfera, limita la capacidad de las plantas de tomar agua y nutrientes; en este medio

hipertónico, el agua tiende a migrar desde las raíces hacia afuera hasta alcanzar el equilibrio osmótico con el medio circundante, lo cual demanda mayor energía de las plantas para contrarrestar este efecto. Además, las sales interfieren con los mecanismos de absorción de iones activos (macro y micronutrientes) en la interfaz de la raíz, y los iones sodio y cloruro resultan tóxicos de manera directa para muchas especies vegetales. Estos factores, además de conducir al estrés vegetal, con efectos adversos en los procesos de intercambio gaseoso, de fotosíntesis y de síntesis de proteínas, pueden promover la desecación de la raíz de la planta (Barrett-Lennard, 2002; USEPA, 2007; Mahdy, 2011).

La aplicación de enmiendas orgánicas a suelos salino-sódicos ha demostrado ser muy efectiva en la restauración de este tipo de ambientes (Lakhdar et al., 2009). De acuerdo a lo señalado anteriormente, la materia orgánica tiene un rol muy importante en la formación y estabilidad de los agregados del suelo. Por consiguiente, la aplicación de enmiendas orgánicas estables contribuye a mejorar la estructura del suelo y la circulación de agua y oxígeno, facilitando el lavado de las sales solubles si las precipitaciones o el riego son suficientes (Khaleel et al., 1981; Tejada et al., 2006; Sastre-Conde et al., 2015).

El efecto de las enmiendas orgánicas en las condiciones físicas, junto al aporte de nutrientes y de diversas y variadas especies microbianas, favorecerían los procesos de ciclado y liberación de los nutrientes necesarios para el desarrollo vegetal, cuya disponibilidad suele ser limitada en los suelos con restricciones por salinidad o sodicidad. Además el aporte de cationes divalentes por las enmiendas, como el calcio, favorece el reemplazo del sodio en el complejo de intercambio, colaborando también en la floculación de las partículas sueltas (Walker y Bernal, 2008; Chaganti y Crohn, 2015).

No obstante, el desarrollo y rendimiento vegetal en estos suelos también está relacionado a la tolerancia a la salinidad de la especie de que se trate, el cuál es un parámetro muy variable. Por lo general, cuando el estrés por salinidad es más grave que la deficiencia de nutrientes, aumentar el suministro de nutrientes puede no necesariamente mejorar el crecimiento de una planta, sobre todo en la primera fase de su desarrollo (Mahdy, 2011).

Maas y Hoffman (1977), propusieron que la respuesta a la salinidad del

crecimiento vegetal responde a un modelo de “curva en bastón”. En este modelo, existe un límite inferior de salinidad a partir del cual el rendimiento vegetal decrece por cada unidad que crece la concentración de sales. De acuerdo a este patrón de crecimiento, estos autores realizan una clasificación de las especies en: “sensible”, “moderadamente sensible”, “moderadamente tolerante” y “tolerante” a la salinidad. De esta manera, la adecuada selección de la o las especies vegetales a utilizar en las estrategias y programas de revegetación y restauración de suelos o áreas degradadas por salinidad, es también de crucial importancia.

## 2.2 Hipótesis y Objetivos

De acuerdo a las siguientes **hipótesis**:

La aplicación de enmiendas orgánicas modifica la estructura y porosidad de los recortes de perforación base agua, favoreciendo la circulación de oxígeno y el lavado de las sales solubles mediante el riego.

La aplicación de enmiendas orgánicas mejora la fertilidad de los recortes de perforación base agua y su aptitud como sustrato de crecimiento vegetal, debido al aporte de macro y micronutrientes y de una comunidad microbiana diversa.

Se plantea el siguiente **objetivo general** para este Capítulo:

Evaluar el efecto de la aplicación de dos tipos de enmiendas orgánicas estables, disponibles en la región patagónica argentina, en las propiedades como sustrato de crecimiento vegetal de los recortes de perforación base agua, para su uso potencial como material de relleno para la revegetación y/o restauración de áreas degradadas.

Como **objetivos específicos** se establecen los siguientes:

- (i) Analizar el contenido de aquellos compuestos relevantes (principalmente hidrocarburos y EPTs) del recorte de perforación base agua, que puedan resultar peligrosos para su reuso como material de relleno, contemplando las regulaciones ambientales nacionales vigentes y pertinentes.
- (ii) Evaluar el rendimiento vegetal en sustratos formulados con recortes de perforación base agua y compost de biosólidos y de residuos orgánicos urbanos en distintas proporciones, utilizando agropiro alargado como especie vegetal de prueba.
- (iii) Estudiar los efectos del tipo y proporción de las enmiendas orgánicas utilizadas en aquellos factores que pueden afectar el rendimiento vegetal en los sustratos formulados con recortes de perforación base agua, a fin de evaluar las posibilidades y limitaciones de esta estrategia de gestión.

## **2.3 Materiales y Métodos**

### **2.3.1 Recolección y acondicionamiento de recortes de perforación base agua**

Los recortes de perforación base agua (RBA) fueron colectados en un yacimiento hidrocarburífero localizado en el norte de la región patagónica argentina (Cuenca neuquina; Provincia del Neuquén). La recolección del material (Figura 2.1) se realizó desde los contenedores que reciben la fracción sólida de los recortes en la locación de perforación, en forma previa a la disposición del residuo en los repositorios destinados a tal fin. De esta forma, se evitó su mezclado con suelos contaminados dispuestos en los repositorios, lo cual constituye una práctica común en las áreas de explotación petrolera. En bolsas plásticas de alto micronaje, se colectaron aproximadamente 193 kg de material. Las bolsas fueron termoselladas y trasladadas a la ciudad de Bariloche (Provincia de Río Negro, Argentina), dónde se realizó el ensayo de crecimiento vegetal.

Los recortes de perforación recolectados presentaban un importante contenido de agua libre, debido a que no siempre es totalmente efectiva la separación de las fases líquida y sólida durante la operación. A fin de eliminar este sobrenadante, el residuo fue esparcido en bateas para su homogeneización y secado a temperatura ambiente (20-25 °C) por 7 días (Figura 2.2). Una vez seco, el material se homogenizó y se tomaron muestras compuestas por triplicado para su caracterización física (textura y densidad aparente) y química (contenido de hidrocarburos totales: fracciones liviana y pesada, hidrocarburos poliaromáticos, EPTs, pH, conductividad eléctrica, contenido de nutrientes y cationes intercambiables) (Sección 2.3.6).



**Figura 2.1.** Recolección y envasado de recortes de perforación base agua en locación.



**Figura 2.2.** Aspecto recorte de perforación base agua fresco (izquierda arriba); secado en bandejas y aspecto luego del secado (derecha abajo). Nótese la textura predominantemente arcillosa y los cristales de sales en el recorte base agua.

### 2.3.2 Pretratamiento de recortes de perforación base agua por lavado

La caracterización posterior al secado de los recortes de perforación base agua arrojó un valor promedio de conductividad eléctrica (CE) de  $137 \pm 2 \text{ dS m}^{-1}$  (en suspensión en agua 1:5). Por lo tanto, para la reducción del elevado contenido de sales solubles observado, se consideró necesario un pretratamiento de lavado del material, en forma previa a la aplicación de las enmiendas orgánicas.

El lavado se realizó con agua corriente (CE: 0,15 a 0,17  $\text{dS m}^{-1}$ ) en recipientes plásticos de 10 L, en una relación 1:2 p/v de recorte de perforación:agua, con 12 horas de contacto y agitación manual cada 30 minutos. Posteriormente, se dejó en reposo durante 12 horas más para la decantación de la fracción sólida, y el sobrenadante se retiró mediante un sistema de sifón. Este pretratamiento de lavado se realizó 5 veces sucesivas en cada lote de material, lo que permitió llevar la CE de los recortes de perforación a un valor promedio de  $10 \text{ dS m}^{-1}$ .

En el agua de lavado (sobrenadante), se observó material particulado formado principalmente por arcillas y una fracción menor de hidrocarburos, por lo cual el agua fue colectada en recipientes apropiados y destinada a su tratamiento en conjunto con los residuos peligrosos generados en el laboratorio de trabajo.

La fracción sólida, recuperada por decantación del procedimiento de lavado (“RBA Lavado”), fue secada a temperatura ambiente por 24 horas, y se tomaron muestras representativas por triplicado para su caracterización física y química (Sección 2.3.6).

### 2.3.3 Origen y características de las enmiendas orgánicas

Las enmiendas orgánicas utilizadas en el ensayo fueron compost de biosólidos (CB) y compost de residuos orgánicos urbanos (CROU) maduros. El compost de biosólidos es producido en la planta de compostaje de lodos cloacales de la Cooperativa de Electricidad de Bariloche (CEB) (Bariloche, Río Negro, Argentina). Los biosólidos, provenientes de la planta de tratamiento de efluentes cloacales local, son compostados por un período de 8 a 12 meses en sistemas de hileras con volteo.

Como agentes estructurantes se utiliza viruta de madera de pino y chips de poda, en una proporción que varía de 1:1 a 1:2 (biosólidos:estructurante), según la época del año.

El compost de biosólidos es producido según las regulaciones establecidas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por su sigla en inglés) como un compost “Clase A”, de acuerdo a los requisitos de control de patógenos ( $T^{\circ} > 55^{\circ}\text{C}$  por 15 días con al menos 5 volteos, o por dos períodos consecutivos de 3 días con un volteo, y coliformes fecales  $< 1000$  NMP/g seco) (Mazzarino et al., 2012 b). En forma previa a su utilización en el ensayo, el compost de biosólidos fue tamizado por malla de 1 cm.

El CROU es producido en la planta de tratamiento de residuos urbanos de la ciudad de Villa La Angostura (Provincia de Neuquén, Argentina), utilizando la fracción orgánica (segregada en planta) de los residuos sólidos urbanos generados en esa ciudad. Los residuos son compostados sin triturar y sin la utilización de agentes estructurantes, mediante el sistema de pilas estáticas. Una vez maduro, el compost es tamizado por malla de 0,5 cm. Las concentraciones de elementos potencialmente peligrosos en este compost también se encuentran dentro de los valores guía estipulados en las normativas internacionales de referencia (Satti et al., 2012).

Considerando la homogeneidad del material una vez tamizado, por cuarteo se tomaron muestras representativas de ambas enmiendas orgánicas para su caracterización física y química, según se detalla en la sección 2.3.6. Los resultados de esta caracterización y otros valores de referencia para cada tipo de enmienda son presentados en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Caracterización de las enmiendas orgánicas utilizadas

	Compost de Biosólidos (CB)	Compost de Residuos Orgánicos Urbanos (CROU)
Densidad aparente (g cm <sup>-3</sup> )	0,3 (<0,1)	0,8 (<0,1)
pH (H <sub>2</sub> O) 1:10	5,3 (0,2)	7,9 (0,1)
CE 1:10 (dS m <sup>-1</sup> )	1,1 (0,1)	0,1 (<0,1)
CT (g kg <sup>-1</sup> )	185 (31)	136 (23)
N Kj (g kg <sup>-1</sup> )	12,3 (1,3)	7,5 (1,9)
N Total (g kg <sup>-1</sup> )	17,3 (2)	10,6 (2)
C/N	11	13
P extractable (g kg <sup>-1</sup> )	1,3 - 1,8 <sup>(a)</sup>	0,2 - 0,3 <sup>(b)</sup>
P Total (g kg <sup>-1</sup> )	1,3 - 1,4 <sup>(a)</sup>	3 - 5 <sup>(b)</sup>
K <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	3 - 10 <sup>(a)</sup>	1 - 3 <sup>(b)</sup>
Na <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	1 <sup>(a)</sup>	1 - 3 <sup>(b)</sup>
Ca <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	14 - 17 <sup>(a)</sup>	40 - 50 <sup>(b)</sup>
Mg <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	6 - 8 <sup>(a)</sup>	5 - 6 <sup>(b)</sup>

Todos los valores son expresados en base seca, como el promedio de tres repeticiones. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

CE: Conductividad eléctrica; CT: Carbono total; NKj: Nitrógeno Kjeldahl (Norgánico + N-NH<sub>4</sub>); NT: Nitrógeno total; C/N: CT/NT; los cationes corresponden a valores totales.

<sup>(a)</sup> Tomado de Mazzarino et al., 2012 b.

<sup>(b)</sup> Tomado de Satti et al., 2012.

### 2.3.4 Diseño experimental

#### 2.3.4.1 Formulación de sustratos

Se prepararon seis tipos de sustrato aplicando CB, CROU y perlita <sup>1</sup> (Lombriquen®) al recorte base agua lavado, en dos proporciones en volumen: 1:1 y 1,5:1 (recorte:enmienda), estableciendo 6 tratamientos para el ensayo de crecimiento vegetal. Los sustratos con perlita fueron utilizados como “tratamientos testigo”, puesto

<sup>1</sup> Perlita: mineral no metálico, principalmente silíceo, muy poroso y estable, que es utilizado como agente estructurante en la formulación de sustratos en viverismo. Tiene pH neutro y nulo contenido de sales o capacidad de liberación de nutrientes.

que la perlita fue utilizada en reemplazo de los compost (y en iguales proporciones), sólo como mejorador de las propiedades físicas del recorte de perforación.

Mediante el método propuesto por el TMECC (2001), se determinó la densidad aparente en base seca de los cuatro tipos de materiales utilizados en la formulación de los sustratos (Tabla 2.2), lo cual permitió el cálculo de las proporciones en peso seco de los componentes en cada sustrato formulado. En la Tabla 2.3, se presentan las proporciones en volumen y en peso seco de los sustratos formulados. De cada sustrato se tomaron muestras compuestas por triplicado para su caracterización inicial (Secciones 2.3.5, 2.3.6 y 2.3.7).

**Tabla 2.2.** Densidad aparente (en base seca) de los materiales utilizados en la formulación de los sustratos

Componente	Densidad aparente (g cm <sup>-3</sup> )
RBA Lavado	1,20
Compost de Biosólidos (CB)	0,32
Compost de Residuos Orgánicos Urbanos (CROU)	0,80
Perlita	0,21

**Tabla 2.3.** Descripción y composición en volumen y peso seco de los sustratos (tratamientos) formulados

Identificación Tratamiento	Descripción	Proporción en volumen (RBA:enmienda)	Dosis en peso seco (g enmienda/kg RBA)
Per 1	RBA Lavado + Perlita	1:1	175
Per 2	RBA Lavado + Perlita	1,5:1	117
CB 1	RBA Lavado + CB	1:1	250
CB 2	RBA Lavado + CB	1,5:1	167
CROU 1	RBA Lavado + CROU	1:1	667
CROU 2	RBA Lavado + CROU	1,5:1	444

### 2.3.4.2 Ensayo de crecimiento vegetal en invernáculo

La especie seleccionada para los ensayos de crecimiento vegetal en los sustratos formulados, es una gramínea conocida vulgarmente como “agropiro alargado” (*Thynopirum ponticum*, (Podp.) Barkworth et Dewey). El agropiro alargado es una gramínea perenne y tolerante a la salinidad y alcalinidad (Bazzigalupi et al., 2008; Jenkins et al., 2010). Por su rusticidad, resistencia a sequías y adaptación a suelos hidromórficos y salinos, se ha difundido y es ampliamente utilizada en la Norpatagonia argentina para la rehabilitación edáfica de suelos degradados por salinidad; además, es una especie de valor forrajero aprovechada en áreas de productividad marginal (Ochoa, 1994; Agnusdei et al., 2011; Miñón et al., 2015).

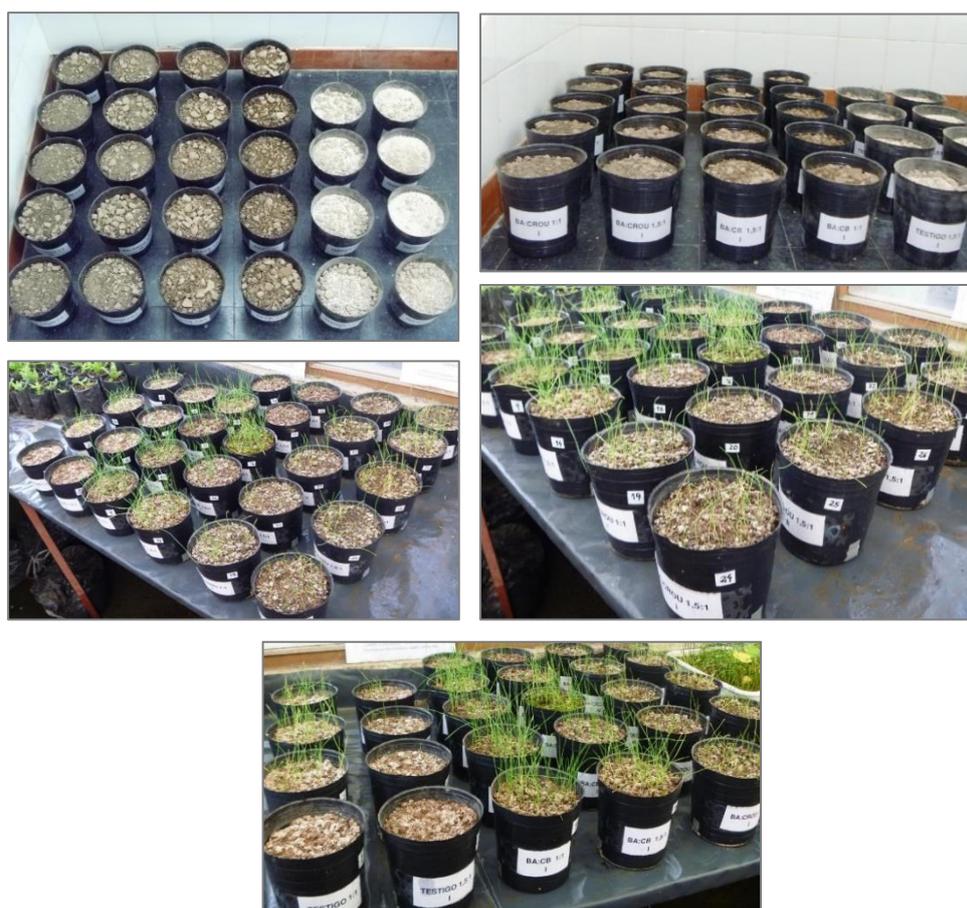
Los sustratos formulados se dispusieron en macetas plásticas perforadas de 1,5 litros de capacidad, con 5 repeticiones (macetas) por tratamiento o sustrato, a excepción de los tratamientos con perlita (testigos), que se desarrollaron con 4 repeticiones cada uno (Figura 2.3). La realización de 4 repeticiones en los tratamientos testigos respondió exclusivamente a la disponibilidad de espacio en el invernáculo donde se realizó el ensayo. Se consideró que este número de repeticiones es estadísticamente representativo y útil a los objetivos planteados para el experimento.

Para humectar los sustratos, las macetas fueron saturadas con agua y se las dejó drenar durante una noche. Cabe mencionar que, al día siguiente, pudo observarse, cualitativamente, un mayor drenaje del agua incorporada en los tratamientos con perlita y con CB, que en los tratamientos con CROU. Posteriormente, en cada maceta se procedió a la siembra de agropiro alargado, a razón de 50 semillas por maceta.

Las macetas se situaron en el invernáculo en forma totalmente aleatorizada (Figura 2.3). El ensayo se desarrolló durante 291 días, a temperatura ambiente y con radiación solar natural, durante los meses de verano, otoño, invierno e inicio de la primavera en la ciudad de San Carlos de Bariloche (41°07' S, 71°19' O), Provincia de Río Negro, Argentina.

La ciudad de Bariloche se encuentra en el norte de la región andino-patagónica argentina, a unos 890 msnm. Se caracteriza por un clima templado-frío con estación seca (verano). La temperatura media anual es de 8,4 °C, registrándose 13 °C de máxima media y 3,7 °C de temperatura mínima media. La amplitud térmica llega

aproximadamente a los 10 °C y la cantidad media de heladas al año es de 113. En los meses de verano (enero y febrero), la temperatura diaria media es de 14 °C, durante el otoño (marzo, abril y mayo) de 6 a 12 °C, y en el invierno (junio, julio y agosto) de 4 °C, ascendiendo a 8 °C de temperatura media en el inicio de la primavera (septiembre y octubre). Las horas de luz efectivas son 6 a 11 durante la primavera y el verano, y de 3 a 7 durante el otoño y el invierno<sup>2</sup>.



**Figura 2.3.** Formulación de sustratos y armado de macetas (arriba, izquierda y derecha). Ensayo instalado en invernáculo en la primera etapa de crecimiento vegetal (centro y abajo). Nótese el depósito de sales, por ascenso capilar, en la superficie de las macetas.

<sup>2</sup> Estación Experimental Agropecuaria de Bariloche (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Informe meteorológico período 1982-2004.

El riego se realizó según el control gravimétrico del contenido de agua de cada maceta, considerando la “capacidad de contenedor”, es decir “la cantidad máxima de agua que puede retener o almacenar un sustrato en contenedor, tras saturación y drenaje natural”.

Para la evaluación del rendimiento vegetal de agropiro alargado en los sustratos conformados, se realizaron tres cortes de la biomasa aérea (a 2 cm desde la superficie del sustrato), a los 73, 177 y 291 días transcurridos desde la siembra. En cada instancia, la biomasa se secó en estufa (60 °C por 48 horas) y se pesó para su cuantificación (Laos et al., 2000). Una vez finalizado el ensayo de invernáculo, luego del tercer corte de biomasa aérea, los sustratos se retiraron de las macetas, se airearon y se separaron las raíces manualmente. Del material de cada maceta se tomó una muestra compuesta del sustrato para su caracterización final.

### **2.3.5 Ensayo de germinación**

Se realizaron ensayos de germinación utilizando como indicadores dos especies vegetales: ryegrass (*Lolium perenne*), especie sensible ampliamente utilizada como bioindicador (OCDE, 2006; Zubillaga y Lavado, 2006; Devesa-Rey et al., 2008); y agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*), especie halotolerante.

Los ensayos se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Zucconi y cols (1981 a), con un doble objetivo:

- i. Determinar la fitotoxicidad del recorte de perforación (lavado y sin lavar), en la especie indicadora sensible (ryegrass) y en la especie seleccionada para el ensayo de crecimiento vegetal (agropiro alargado).
- ii. Evaluar la germinación de agropiro alargado en los sustratos formulados.

En la metodología utilizada, la fitotoxicidad de un material o sustrato es evaluada mediante el “Índice de Germinación (IG)”. Este índice se calcula utilizando dos parámetros: la “germinación relativa de semillas” (GRS) y el “crecimiento relativo de raíces” (CRR) de la especie vegetal seleccionada, en extractos en agua destilada de los materiales o sustratos en evaluación. Para el cálculo, se utiliza como referencia el

número de semillas germinadas y el crecimiento de raíces (en cm) en agua destilada (poder germinativo).

De esta manera el Índice de Germinación se define mediante la siguiente ecuación:

$$IG (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100 \%}$$

Dónde:

GRS (%): N° de semillas germinadas en el extracto / N° de semillas germinadas en agua destilada.

CRR (%): Longitud promedio de raíces en el extracto / Longitud promedio de raíces en agua destilada.

Se realizó la suspensión de la muestra seca al aire (recorte de perforación o sustrato) en agua destilada en relación 1:10. La suspensión se agitó en sentido horizontal a 180 rpm durante una hora, y se centrifugó por 15 minutos a 2000 rpm. En placas de Petri, con una lámina de papel de filtro, se distribuyeron 20 semillas por placa de ryegrass o de agropiro alargado. Se prepararon 4 placas por cada muestra. En cada placa se dosificaron 3 mL del extracto 1:10 de cada muestra o de agua destilada (control del poder germinativo de la especie). Las placas se incubaron durante 7 días a  $25 \pm 1$  °C, en la oscuridad. Una vez finalizado el período de incubación, se contaron en cada placa el número de semillas germinadas y se midió el largo de raíz desarrollado por cada semilla germinada, para la determinación de los valores de GRS y de CRR, con los cuales se calculó el IG. Se consideraron como germinadas sólo aquellas semillas cuyas raíces tuvieron al menos 2 mm de largo. La longitud de las mismas se midió con un calibre extendiendo cuidadosamente la raíz.

### **2.3.6 Análisis químicos y físicos de recortes de perforación, enmiendas y sustratos**

En muestras secadas al aire y tamizadas por malla < 2 mm del recorte de perforación base agua (sin lavar y lavado), y de los sustratos (antes y después del

ensayo de invernáculo), se determinó: pH 1:2,5, CE 1:5, contenido de fósforo extractable, Nitrógeno Kjeldahl (NKj: N orgánico + N-NH<sub>4</sub>), cationes intercambiables + solubles (Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup>) (Richards, 1954; Sparks et al., 1996) y Carbono Soluble en Agua (CSA) (Laos et al., 2002).

El pH y la CE se determinaron potenciométricamente en extractos acuosos de las muestras en relación 1:2,5 y 1:5, respectivamente. Las suspensiones se agitaron en tubos de centrifuga horizontalmente (en el sentido del eje del tubo) a 180 rpm por 10 minutos, y luego se dejó decantar la fracción sólida por 10 minutos más, antes de realizar sendas mediciones mediante electrodo.

El fósforo extractable se analizó en una suspensión de la muestra en relación 1:100 en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M. La suspensión se agitó durante 30 minutos a 180 rpm y luego se filtró mediante papel de filtro grado 42 o banda azul. La determinación de P se realizó en este extracto mediante el método colorimétrico de molibdato-ácido ascórbico; las mediciones se realizaron por espectroscopía a 882 nm de longitud de onda.

El Nitrógeno Kjeldahl (NKj: N orgánico + N-NH<sub>4</sub>), se determinó por semi-micro Kjeldahl. La muestra (0,5 ± 0,1 g) fue digerida en ácido sulfúrico y en presencia de un catalizador a 450 °C por 1,5 horas, utilizando un bloque digestor. Luego, se realizó la destilación automatizada por arrastre de vapor con NaOH 8 N en exceso, y se burbujeó el amonio en la salida del destilador en una solución de ácido bórico al 2 %. Posteriormente, se procedió a la valoración de esta solución con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizando un indicador mixto.

Para la determinación de los cationes intercambiables + solubles (Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup>), se agitaron horizontalmente a 180 rpm y por 10 minutos, 5 g de muestra en 12 mL de acetato de amonio 1 N (pH 7,0). Luego se centrifugó hasta obtener un sobrenadante límpido, el cual se trasvasó a un matraz aforado de 50 mL. Esta extracción se realizó sobre la muestra cuatro veces en forma sucesiva y luego se llevó a volumen final. El extracto se filtró en papel de filtro grado 42 o banda azul. La cuantificación de los cationes se realizó mediante espectrometría de absorción atómica por comparación con estándares.

La cuantificación del Carbono Soluble en Agua (CSA) se realizó mediante reducción de cromo (Cr<sup>+3</sup>) medido por espectrofotometría a 600 nm. El CSA fue

extraído de la muestra en una suspensión en agua en relación 1:10, por agitación a 180 rpm durante 2 hs. El extracto se filtró por papel de filtro grado 42 o banda azul. Una alícuota de este extracto fue digerida en mezcla sulfocrómica a 150 °C durante dos horas. Luego, el cromo reducido es cuantificado por espectrofotometría por comparación con una curva estándar, utilizando biftalato de potasio como patrón.

En muestras secadas al aire y tamizadas por malla de 0,5 mm, se determinó Carbono Total (CT) y Nitrógeno Total (NT) mediante un analizador elemental carbono/nitrógeno (Thermo Finnigan®).

En las enmiendas orgánicas (CB y CROU), las determinaciones se realizaron en muestras sin tamizar. El pH y la CE se midieron potenciométricamente en extractos acuosos 1:10, agitados durante 10 minutos en sentido horizontal y con un período de decantación de la fase sólida de 10 minutos más, según lo recomendado por Laos et al. (2002). El resto de las variables se analizó de la misma manera que en los sustratos.

La textura del recorte de perforación (antes y después del lavado) se determinó en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la EEA Bariloche del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina). El pretratamiento de la muestra consistió en la digestión de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno y la posterior dispersión de la muestra, utilizando hexametáfosfato de sodio ((NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>). Las distintas fracciones granulométricas fueron determinadas mediante el método de la pipeta de Robinson que sigue el *Standard SSL PSDA method* (Soil Survey Staff, 2011). Se trata de una sedimentación discontinua donde una determinada cantidad de muestra de suelo dispersa en agua se introduce en una probeta con tapón de 1000 mL, se agita y al cabo de determinados intervalos de tiempo establecidos según la Ley de Stokes, se realizan extracciones con una pipeta de 20 mL a una profundidad fija. Permite la cuantificación y recogida de todas las fracciones de arcillas, limos gruesos y limos finos, determinando las arenas por tamizado posterior.

Para la evaluación de las características peligrosas del recorte de perforación (antes y después del lavado), se analizó mediante cromatografía gaseosa: concentración de hidrocarburos en el rango gasolina (*Gasoline Range Organics (GRO)*): alcanos de C6-C10 e hidrocarburos en el rango de ebullición de 60-170°C); concentración de hidrocarburos en el rango diésel (*Diesel Range Organics (DRO)*): alcanos de C10-C28 e hidrocarburos en el rango de ebullición de 170-430 °C);

Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos (BTEXs); concentración de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), definidos como contaminantes prioritarios para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Los análisis de hidrocarburos se realizaron según las normas de la USEPA-SW846 3550c, 8015c, 5021a y 8270d.

Los elementos potencialmente peligrosos (EPTs) (Ba, Cd, Cr Total, Ni, As, Se, Cu, Hg, Ag, Pb y Zn), regulados por la Ley Nacional N° 24051 de Residuos Peligrosos y su decreto reglamentario (831/93), fueron cuantificados en lixiviado (norma USEPA-SW846 1310b) por espectroscopía de absorción atómica (USEPA-SW846 7000b, 7010 y 7470a).

Los análisis de hidrocarburos y EPTs en recortes de perforación base agua, fueron contratados al Laboratorio INDUSER S.R.L (Buenos Aires, Argentina), que trabaja bajo la acreditación de la norma de calidad en laboratorios ISO 17025.

### **2.3.7 Actividad biológica en sustratos**

Antes del ensayo de crecimiento vegetal en invernáculo, se evaluó la actividad biológica de los sustratos utilizando como indicador la respiración microbiana. La evolución de CO<sub>2</sub> se midió utilizando una adaptación de la técnica descrita por Jäggi en 1976, para la estimación de la respiración en suelos mediante el entrapamiento del CO<sub>2</sub> liberado por la muestra en una trampa de hidróxido de sodio (Alef, 1995).

La muestra fresca (15 a 20 g), con el contenido de humedad natural posterior al proceso de humectación y drenaje de los sustratos (ver sección 2.3.4.2), se dispuso en un tubo plástico perforado (50 mL) para permitir la liberación del CO<sub>2</sub>. El tubo con la muestra se “acopla” en la abertura roscada de frascos “tipo Schott” tapa azul de 250 mL por tener similar diámetro, quedando así suspendido desde la abertura. En el fondo del frasco se dosificaron 10 mL de una solución de NaOH 0,5 N. Se dispusieron además de las muestras tres frascos “blanco”, sin muestra en el tubo perforado.

Los frascos se incubaron a 25 °C durante 72 horas. Transcurridas las primeras 24 hs. de incubación, se retiraron los frascos de la incubadora, se abrieron (lo cual permite el intercambio gaseoso) y se dosificó en cada frasco una solución de BaCl<sub>2</sub> 3N

en exceso para precipitar los carbonatos presentes en la trampa alcalina. Posteriormente, se midió el excedente de NaOH (no consumido por el CO<sub>2</sub>) mediante titulación con HCl (0,25 N).

Una vez realizada la titulación, y lavados los frascos, se renovaron los 10 ml de la solución de NaOH 0,5 N en cada frasco, y las mismas muestras continuaron el período de incubación hasta las 72 hs. El procedimiento de cuantificación mediante precipitación de los carbonatos y titulación del exceso de hidróxido de sodio descripto fue repetido a las 48 y 72 hs.

La cantidad de CO<sub>2</sub> liberada se calculó por la diferencia de gasto de HCl de la muestra y el promedio de los blancos. La tasa de respiración promedio (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en base seca), fue calculada a partir del promedio de la producción de CO<sub>2</sub> de los últimos dos días de incubación (Hue y Liu, 1995, Tognetti et al., 2007 a).

### 2.3.8 Análisis estadísticos de los resultados

El efecto debido al pretratamiento de lavado en los valores de las variables analizadas para la caracterización del recorte de perforación base agua, se evaluó mediante la técnica de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, para hallar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), y se utilizó la prueba *post-hoc* de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para la separación de medias.

El análisis exploratorio de los resultados obtenidos del ensayo de invernáculo se realizó mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP), técnica estadística de análisis multivariado. Luego, el conjunto de datos de cada variable se ajustó mediante modelos lineales generalizados (GLM) de efectos mixtos. El método de estimación fue el de “máxima verosimilitud restringida (REML)”. Como efectos fijos se especificaron los tratamientos (sustratos), y como efectos aleatorios las repeticiones (macetas). Las medidas de ajuste utilizadas para comparar los distintos modelos ajustados fueron AIC (*Criterio de Akaike*) y BIC (*Criterio Bayesiano de Información*).

Asimismo, en la selección de cada modelo se consideraron las correcciones necesarias para la verificación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores. Las diferencias entre los efectos principales

(tratamientos) fueron analizados por la prueba LSD de Fisher, con un límite de confianza  $\geq 95\%$ .

Finalmente, la correlación entre algunas variables de interés se evaluó mediante la determinación del coeficiente de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software INFOSTAT v. 2.015. (Di Rienzo et al., 2015).

## 2.4 Resultados y discusión

### 2.4.1 Caracterización del recorte de perforación base agua y efecto del pretratamiento de lavado

#### 2.4.1.1 Características físicas y químicas

Durante el proceso de lavado de los recortes de perforación se observó una muy importante pérdida de coloides por arrastre (aproximadamente un 40-50 % de la masa inicial), marcada reducción en el contenido de sales solubles (disminución de la CE) y el incremento en la concentración de algunos nutrientes (principalmente C y N). En la Tabla 2.4, se presentan los resultados de las variables físicas y químicas analizadas para la caracterización del recorte de perforación, antes y después del pretratamiento por lavado, a partir de los cuales se observan estos efectos debidos al lavado del material.

La pérdida de material coloidal podría explicar el cambio que se observó en la composición granulométrica del recorte de perforación luego del lavado. En el RBA sin lavar, el tamaño de partícula mayoritario del material (73%) correspondía a limo (0,05-0,002 mm), mientras que luego del lavado la mayor fracción (70 %) fue de arcilla (< 0,002 mm). De esta manera, el cambio en los porcentajes de tamaño de partícula podría deberse a la pérdida de materiales cementantes y/o coloidales que aglutinaban las partículas formando conglomerados de mayor tamaño.

Como se observa en la Tabla 2.4, el pretratamiento de lavado disminuyó significativamente el contenido de sales solubles, tal era su objetivo, impactando en el valor de CE del recorte de perforación base agua, que disminuyó de 137 a 10 dS m<sup>-1</sup>, en promedio. Mientras que el contenido de los cationes Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> (intercambiables + solubles) no tuvo cambios significativos, el lavado redujo significativamente la concentración de los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

El incremento en la concentración de algunos nutrientes luego del lavado, como el carbono total y el nitrógeno, podría deberse a la pérdida de masa del material, como ocurrió con el contenido total de hidrocarburos, según se muestra posteriormente en la sección 2.4.3. En particular, el marcado aumento en los valores de carbono total

podría explicarse debido a que en este parámetro se incluye principalmente el C proveniente de los hidrocarburos, los cuales aumentaron en proporción luego del lavado, probablemente debido a su baja solubilidad en agua. No obstante, el aumento en el valor de Nitrógeno total no puede explicarse directamente mediante los análisis realizados y los resultados obtenidos.

**Tabla 2.4.** Características del recorte de perforación base agua (RBA), antes y después del pretratamiento por lavado.

	RBA (sin lavar)	RBA (lavado)
Textura (%) (Arcilla/Limo/Arena)	14/73/13	70/20/11
Densidad aparente (g cm <sup>-3</sup> )	1,1 (<0,1) b	1,2 (<0,1) a
pH (H <sub>2</sub> O) 1:2,5	7,8 (0,1) b	8,2 (0,1) a
CE 1:5 (dS m <sup>-1</sup> )	137 (2) a	10 (0,3) b
CT (g kg <sup>-1</sup> )	39	75
N Kj (g kg <sup>-1</sup> )	0,4 (<0,1) b	0,7 (0,1) a
N Total (g kg <sup>-1</sup> )	0,3	0,7
C/N	130	107
P extractable (mg kg <sup>-1</sup> )	1,2 (0,8) a	2,3 (0,5) a
Ca <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	9,9 (0,3) a	9 (<0,1) a
K <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	1,1 (<0,1) a	0,4 (0,1) b
Na <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	144 (25) a	12,4 (0,2) b
Mg <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	0,1 (<0,1) a	0,1 (<0,1) a

Todos los valores son expresados en base seca, como el promedio de tres repeticiones. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el valor de la variable antes y después del lavado.

C/N: CT/NT

La concentración de Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup> corresponde a la fracción intercambiable + soluble, y se expresa en g kg<sup>-1</sup> para su comparación con otros autores y estandarización para el análisis estadístico.

#### 2.4.1.2 Fitotoxicidad

La fitotoxicidad del recorte de perforación, antes y después del pretratamiento de lavado, fue evaluada mediante el Índice de Germinación de ryegrass (*Lolium perenne*) y de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*), según se detalla en la sección 2.3.5.

Los resultados del ensayo de germinación, expuestos en la Tabla 2.5, indican que la fitotoxicidad del RBA sin lavar fue del 100 % para ambas especies vegetales, mientras que el lavado mejoró muy levemente la germinación de ryegrass y agropiro, probablemente debido a la reducción del contenido de sales solubles. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el IG de la especie más sensible (ryegrass) y de la especie más tolerante a la salinidad (agropiro). Además, la germinación de ambas especies fue muy baja ( $IG < 10\%$ ) en los extractos de RBA lavado, mostrando la elevada fitotoxicidad que presenta este material, incluso luego del pretratamiento realizado.

El valor guía o límite de fitotoxicidad de un material, evaluada a través del Índice de Germinación, no se encuentra totalmente definido en la literatura científica o en las normas ambientales internacionales. Dado que se utilizan distintas especies vegetales como indicadores, y distintas diluciones del residuo o material a analizar, no existe un método estandarizado que permita establecer valores de referencia (Mazzarino et al., 2012 a; Sastre-Conde et al., 2015). Sin embargo, existe cierto acuerdo en que el porcentaje de germinación que debe ser alcanzado, para considerar un material como “no fitotóxico”, debe ser mayor al 50 % - 80 % (Zucconi et al., 1981 a y b; Devesa-Rey et al. 2008; Mazzarino et al., 2012 a).

**Tabla 2.5.** Índice de Germinación de ryegrass (*Lolium perenne*) y agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*) en el recorte base agua, antes y después del lavado.

	RBA (sin lavar)			RBA (lavado)		
	GRS (%)	CRR (%)	IG (%)	GRS (%)	CRR (%)	IG (%)
Ryegrass ( <i>Lolium perenne</i> )	0	0	0	27 (15)	22 (17)	5,9
Agropiro alargado ( <i>Elytrigia elongata</i> )	0	0	0	38 (12)	25 (10)	9,5

GRS: Germinación relativa de semillas; CRR: Crecimiento relativo de raíces; IG: Índice de Germinación.

Los valores son expresados como el promedio de 4 placas de germinación (con 20 semillas) por muestra y de tres muestras por material. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

### 2.4.1.3 Características peligrosas

De acuerdo a lo indicado en el Capítulo 1, las características que clasifican a los recortes de perforación como un residuo peligroso, se asocian al contenido de hidrocarburos y, potencialmente, de elementos potencialmente peligrosos (Ba, Cr, Cd, Hg, Pb, As, Co, Ni, Zn, Mo y V). No obstante, las concentraciones que se determinan de este tipo de compuestos en muestras complejas, como los lodos, residuos y/o muestras ambientales, dependen ampliamente del tipo de técnica de extracción y cuantificación utilizada. En la Argentina, este aspecto se encuentra en revisión y discusión permanente por las partes interesadas en este proceso (autoridades de aplicación ambiental, empresas operadoras, laboratorios intervinientes, etc.), debido a las dificultades para su determinación precisa, la variedad de técnicas existentes y la falta de información sobre valores de línea de base en el país (Cantero et al., 2005; Laos et al., 2012).

Considerando la alternativa propuesta de disposición final de los recortes de perforación base agua como material de relleno y/o sustituto de suelo, debería tomarse como referencia lo establecido en el Anexo II (Tabla 9) del Decreto Reglamentario N° 831/93 de la Ley Nacional N° 24051 de Residuos Peligrosos. Allí se establecen valores límite en suelos para la concentración de hidrocarburos aromáticos mono (BTEXs; Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos) y policíclicos (HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) (Tabla 2.6), pero no fija un límite en el contenido total de hidrocarburos del petróleo, para considerar un suelo, sedimento o residuo como peligroso, debido a este aspecto.

No obstante, en los últimos años las provincias patagónicas argentinas han avanzado en la regulación ambiental de la actividad hidrocarburífera, instaurando en su legislación valores límite de contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y técnicas de referencia para su análisis en suelos, sedimentos y residuos. Se ha establecido una concentración del 1 % (10000 mg kg<sup>-1</sup>), como valor guía o límite de hidrocarburos totales en suelos, sedimentos, aguas subterráneas y residuos, en las Provincias de Neuquén (Disposición SMA N° 759/09) y Chubut (Decreto Provincial N° 1456/11). Mientras que la provincia de Santa Cruz establece un contenido de HTP del 2 % (20000 mg kg<sup>-1</sup>), para considerar un material como contaminado por

hidrocarburos.

Además, el Decreto N° 1456/11 de la Provincia de Chubut (de “Regulación a las prácticas y modalidades actuales utilizadas en la gestión de los residuos petroleros”), establece un nivel máximo de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  para la sumatoria de los 16 HAPs prioritarios establecidos por la USEPA, y un contenido máximo de  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  para un listado de 9 HAPs individuales (benzo(a)antraceno; benzo(a)pireno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; dibenzo(a,h)antraceno; fenantreno; indeno(1,2,3-cd)pireno; naftaleno; pireno). Estos valores coinciden con el límite establecido por el Decreto Reglamentario N° 831/93 de la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24051. Por otro lado, la Provincia de Neuquén establece, en su Disposición SMA N° 759/09, que “las fracciones correspondientes a Benceno, Tolueno, Etil-Benceno y Xilenos (BTEX) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP’S), se determinarán sujeto a requerimiento de la autoridad de aplicación”.

En la Provincia de Río Negro no se ha promulgado normativa que establezca un valor guía o límite para el contenido de HTP en suelos y residuos. Este requisito queda, por lo general, sujeto a criterio de las autoridades de aplicación pertinentes. No obstante, suelen tomarse como referencia los valores establecidos en el decreto reglamentario la Ley Nacional N° 24051, además de los resultados de evaluación de riesgo sitio-específicas realizadas según el caso.

En lo relativo al contenido de EPTs, el Anexo IV del Decreto 831/93 indica como característica de riesgo, entre otras, la potencial lixiviabilidad de constituyentes nocivos, para identificar un residuo como peligroso. De esta manera, se establecen valores límite en lixiviado (Anexo VI) de 11 elementos químicos, definidos como los de mayor peligrosidad (Ba, Cd, Cr Total, Ni, As, Se, Cu, Hg, Ag, Pb y Zn) (Tabla 2.6)

Considerando lo expuesto, el contenido de los hidrocarburos totales en el recorte de perforación base agua (sin lavar), expresado como la suma de los rangos gasolina (GRO: *Gasoline range organics*) y diésel (DRO: *Diesel range organics*), no superaría que el valor guía de referencia (Tabla 2.6). El pretratamiento de lavado incrementó la concentración de los compuestos menos solubles (fracción DRO), como se observa en la Tabla 2.6, probablemente debido a la pérdida de masa ocurrida durante el pretratamiento de lavado. Sin embargo, el valor de hidrocarburos totales (GRO + DRO) en el RBA luego del lavado (aproximadamente  $10100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), tampoco superó

significativamente el valor límite requerido.

Las concentraciones de BTEXs y HAPs en el RBA, antes y después del lavado (Tabla 2.6), no superaron los valores límite para suelos de uso agrícola, establecidos por el Decreto 831/93, al igual que los EPTs analizados en lixiviado. De esta manera, el recorte de perforación base agua no presenta contenidos de hidrocarburos o elementos peligrosos que excedan lo establecido por las normativas ambientales de aplicación en los niveles nacionales y provinciales.

No obstante, las características fitotóxicas del material, relacionadas principalmente al elevado contenido de sales, determinan la necesidad de definir estrategias que atenúen el impacto de su disposición final en el entorno ambiental. Asimismo, dada la variabilidad característica de este residuo, debido a los distintos fluidos de origen o formaciones geológicas atravesadas durante la perforación, así como los potenciales efectos posteriores que pueden manifestarse en mezclas tan complejas como los recortes de perforación, cada lote de material o caso debiera ser evaluado en forma particular y exhaustiva.

**Tabla 2.6.** Contenido de hidrocarburos y EPTs en el recorte de perforación base agua sin lavar y lavado.

	RBA Sin lavar	RBA Lavado	Nivel guía calidad de suelos <sup>(b)</sup> para uso agrícola (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Hidrocarburos del petróleo (mg kg<sup>-1</sup>)<sup>(a)</sup></b>			
GRO ( <i>Gasoline range organics</i> )	11,3	7,6	No aplica
DRO ( <i>Diesel range organics</i> )	4528	10110	No aplica
HTP (GRO + DRO)	4539	10120	No aplica
BTEX (Benceno; tolueno; etilbenceno; m,p-xileno; o-xileno)	< 0,05	< 0,05	0,05
<b>HAPs</b> (Naftaleno; acenaftileno; acenafteno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno; pireno; benzo(a)antraceno; criseno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; dibenzo(a,h)antraceno; benzo(g,h,i)perileno; indeno(1,2,3- cd)pireno)			
	< 0,1	< 0,1	0,1
<b>Metales en lixiviado (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
	RBA Sin lavar	RBA Lavado	Nivel guía en lixiviados <sup>(c)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )
Arsénico	< 0,10	< 0,10	1
Bario	< 1,0	< 1,0	100
Cadmio	< 0,05	< 0,05	0,5
Cobre	0,11	< 0,10	100
Cromo Total	< 0,10	< 0,10	5
Mercurio	< 0,01	< 0,8	0,1
Níquel	< 0,01	< 0,01	1,3
Plata	< 0,20	< 0,20	5
Plomo	< 0,50	< 0,50	1
Selenio	< 0,10	< 0,10	1
Zinc	0,54	0,93	500

HTP: Hidrocarburos totales del petróleo; HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos; GRO: alcanos de C6-C10 e hidrocarburos en el rango de ebullición de 60-170°C; DRO: alcanos de C10-C28 e hidrocarburos en el rango de ebullición de 170-430 °C.

<sup>(a)</sup> Todos los valores son expresados en base seca.

<sup>(b)</sup> Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24051 (Argentina), Dec. Reg. N° 831/93, Anexo II, Tabla 9: Niveles guía de calidad suelos

<sup>(c)</sup> Se toma como referencia el Anexo VI: Límites establecidos para los parámetros químicos de los barros, de la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24051 (Argentina), Dec. Reg. N° 831/93.

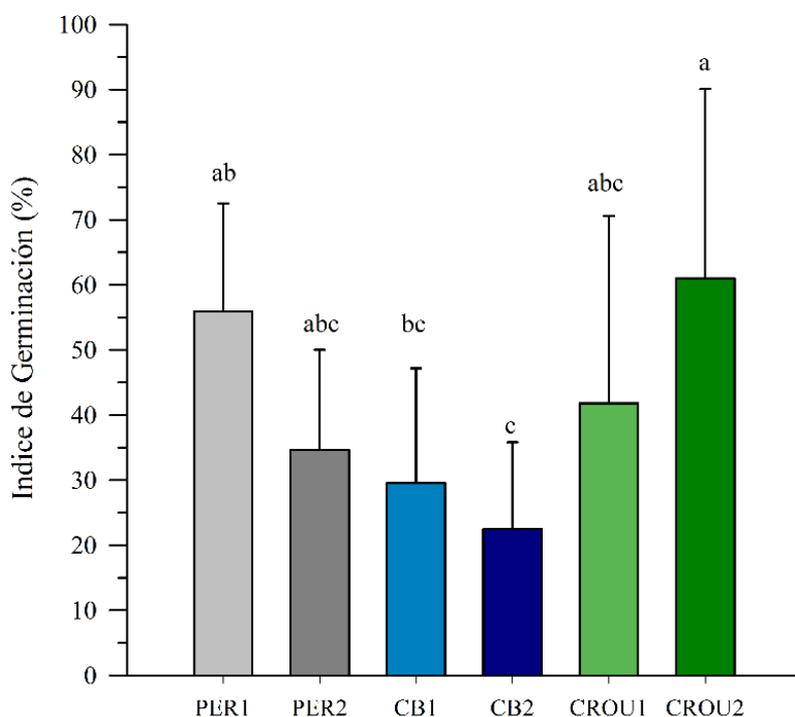
### 2.4.2 Germinación y rendimiento vegetal de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*) en los sustratos formulados

En los seis sustratos preparados con el RBA lavado y las distintas enmiendas utilizadas: compost de biosólidos (tratamientos CB 1 y CB 2), compost de residuos orgánicos urbanos (tratamientos CROU 1 y CROU 2) y perlita (tratamientos PER 1 y PER 2), se evaluó la germinación (en extracto en agua en relación 1:10) y el rendimiento vegetal de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*). El rendimiento vegetal se realizó midiendo la biomasa aérea seca acumulada durante 291 días de crecimiento en invernáculo. La composición en volumen y peso de los sustratos formulados puede repasarse en la sección 2.3.4 (Tabla 2.3).

En la Figura 2.4 se muestra la germinación de agropiro alargado en extractos de los distintos sustratos, evaluada a través del Índice de Germinación (IG) propuesto por Zucconi et al. (1981 a y b). El IG no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con CROU y los testigos (PER 1 y PER 2), mientras que los menores índices de germinación fueron observados en los sustratos con compost de biosólidos. Entre los sustratos formulados, los tratamientos CROU 2 y PER 1 fueron los únicos que superaron los valores de referencia de fitotoxicidad (IG: 50-80 %), alcanzando un porcentaje de germinación promedio del 61 % y del 56 %, respectivamente. Por otro lado, en ambos sustratos formulados con compost de biosólidos, el IG de agropiro alargado no superó el 30 %.

El agropiro alargado es una especie vegetal que puede germinar y crecer en conductividades eléctricas de entre 6,9 y 8,0 dS m<sup>-1</sup>, por lo cual se considera “tolerante” a la salinidad, de acuerdo a las categorías propuestas por Maas y Hoffman en 1977 (Barrett-Lennard 2002; Yadav et al., 2011). Sin embargo, la inhibición de la germinación de una especie vegetal puede deberse tanto a un elevado contenido de sales como a la presencia de diversos compuestos fitotóxicos, como amonio, fenoles o ácidos grasos volátiles. La posible presencia de este tipo de compuestos en los sustratos formulados pudo estar relacionada a la madurez de las enmiendas orgánicas utilizadas, o a la presencia de compuestos derivados de los hidrocarburos en el RBA (Zucconi et al, 1981 a y b; Zubillaga y Lavado, 2006; Mazzarino et al., 2012 a). Esta posibilidad

también se reflejó en el valor poco significativo del coeficiente de correlación de Pearson ( $p=0,22$ ) entre la conductividad eléctrica y el índice de germinación.



**Figura 2.4.** Germinación de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*) en suspensiones en agua (1:10) de los sustratos formulados. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los tratamientos.

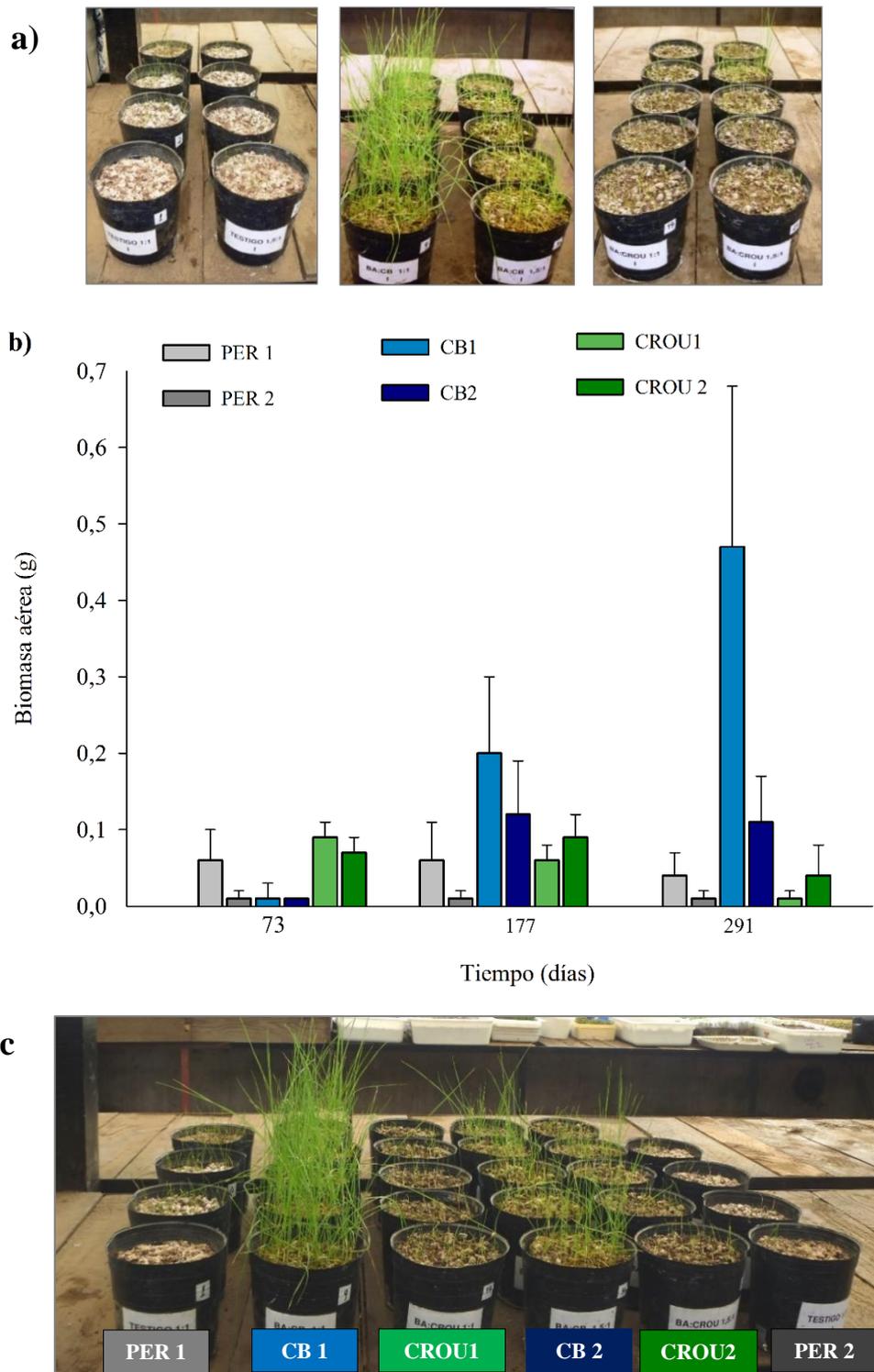
La biomasa aérea acumulada durante el ensayo de invernáculo, calculada como la suma de los cortes realizados a los 73, 177 y 291 días de crecimiento vegetal, fue significativamente mayor ( $p<0,05$ ) en el tratamiento con compost de biosólidos utilizado en proporción 1:1 en volumen (CB 1) (Figura 2.5). En este tratamiento el crecimiento de agropiro se ralentizó en los primeros 75-80 días posteriores a la siembra, y luego se aceleró, diferenciándose de los tratamientos testigo y con CROU. Al finalizar el ensayo, la biomasa acumulada en el tratamiento CB 1 fue cerca de 4 veces mayor que en los tratamientos con CROU y en los testigos con perlita. Entre los tratamientos CROU 1, CROU 2 y PER 1, no hubo diferencias significativas en la biomasa acumulada a lo largo del ensayo, mientras que el menor rendimiento vegetal

se observó en el tratamiento con la mayor proporción de RBA (PER 2).

Los resultados obtenidos del ensayo de germinación de agropiro alargado muestran una menor probabilidad de desarrollo de esta especie, menor IG, en los sustratos con compost de biosólidos; mientras que el rendimiento vegetal de agropiro en el ensayo de invernáculo fue significativamente mayor en el sustrato con la mayor proporción de CB. Estos resultados indicarían que los ensayos de germinación por sí mismos no resultarían suficientes a fin de evaluar el potencial crecimiento y desarrollo de una especie vegetal en sustratos con estas características.

En general, la germinación de la semilla es más sensible a factores ambientales que la planta una vez establecida (Sastre-Conde et al., 2015). En particular, en el agropiro alargado, también se ha observado mayor sensibilidad en la etapa germinativa que en la vegetativa (Bazzigaluppi et al., 2008; Jenkins et al., 2010). Además, en los ensayos de germinación actúan exclusivamente los efectos derivados de aquellas características químicas de un suelo o sustrato que pueden resultar fitotóxicas, mientras que el desarrollo vegetal también es afectado por las características físicas, y por los diferentes procesos que ocurren en un suelo o sustrato una vez sembrada la semilla.

El crecimiento y desarrollo de agropiro alargado en los sustratos formulados fue afectado probablemente por una combinación compleja de factores y procesos físicos, químicos y biológicos. Una mayor comprensión de estos procesos y factores puede contribuir significativamente en la evaluación de la potencialidad del uso de los recortes de perforación como sustituto de suelo, o material de relleno, para la revegetación y restauración de áreas degradadas. En función de ello, a través del estudio de las características físicas, químicas y biológicas iniciales de los sustratos empleados, y de la evolución de las mismas durante del ensayo de invernáculo, se evaluaron los factores que pueden haber afectado el rendimiento vegetal en los tratamientos planteados.



**Figura 2.5.** (a) Vista de tratamientos PER 1 y 2, CB 1 y 2 y CROU 1 y 2 (de izquierda a derecha) y (c) vista general del ensayo a los 291 días, antes del último corte de biomasa aérea. (b) Evolución de la biomasa aérea seca de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*) en tres cortes, a los 73, 177 y 291 días desde la siembra.

En primera instancia, se realizó un estudio exploratorio mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP), en el que se incluyeron: los resultados obtenidos de la caracterización química y física de los sustratos antes y después del ensayo de crecimiento vegetal; los resultados del ensayo de actividad biológica, realizado mediante el seguimiento de la evolución de CO<sub>2</sub> en incubaciones de los sustratos a temperatura y humedad controlada; y los resultados de germinación y biomasa aérea acumulada de agropiro alargado.

### **2.4.3 Análisis exploratorio de factores y procesos que influyeron en el rendimiento vegetal de agropiro alargado**

El Análisis de Componentes Principales es una técnica de análisis estadístico multivariado que permite la síntesis de la información, o reducción de las dimensiones (número de variables analizadas), hallando un conjunto nuevo de variables (“componentes principales”) no correlacionadas entre sí, que representen y expliquen la estructura de variación de los datos. Estos “ejes artificiales” o componentes principales, permiten obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables en un mismo espacio, denominados “*biplot*”, lo cual posibilita identificar en forma preliminar y exploratoria asociaciones entre variables (ángulos aproximadamente rectos entre los vectores sugieren que no hay correlación entre las variables que representan, ángulos obtusos indican correlación negativa y ángulos agudos correlación positiva), o entre variables y observaciones o individuos. El ACP se aplica a datos experimentales estandarizados, debido a que los datos usualmente difieren en sus unidades. La estandarización se realiza sustrayendo de cada observación la media general y dividiendo el resultado por la desviación estándar (Balzarini et al., 2008).

En la Figura 2.6 se presentan los *biplot* resultantes del ACP realizado con los valores de las variables analizadas en los sustratos formulados antes (Figura 2.6 a) y después (Figura 2.6 b) del ensayo de crecimiento vegetal en invernáculo. En el *biplot* de la Figura 2.6 b también se incluyeron los resultados de rendimiento vegetal (biomasa aérea acumulada) de la especie ensayada. En el *biplot* correspondiente al inicio del ensayo (Figura 2.6 a), la componente principal 1 (CP1) explica un 55,7 %

de la variabilidad total, mientras que la componente principal 2 (CP2), representa un 31,4 % de esta variabilidad. De esta manera, sumando la CP1 y la CP2, se explicaría un 87,1 % de la variabilidad total del conjunto de datos. En la Figura 2.6 b, las dos primeras componentes principales de este análisis explican el 90,0 % (CP1:68,7 % + CP2: 21,3 %) de la variabilidad entre los tratamientos o sustratos al finalizar el ensayo de crecimiento vegetal. Estos porcentajes se consideran suficientes para una interpretación preliminar de los efectos y factores de variabilidad de los resultados obtenidos.

La ubicación de los tratamientos en el plano del *biplot* de la Figura 2.6 a, y la correlación entre las variables medidas, permite observar el aporte de nutrientes de las enmiendas orgánicas al recorte de perforación. La CP 1 opone los tratamientos con enmiendas orgánicas (CB 1 y 2; CROU 1 y 2) respecto de los tratamientos testigo (PER 1 y 2). Los primeros, ubicados sobre el lado izquierdo, se asocian a las variables que representan el contenido de nutrientes (CT, NT, NKj, P extraíble,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  intercambiables + solubles) y a la actividad biológica ( $CO_2$ ). Los testigos con perlita, sobre el lado derecho, se asocian a las variables relacionadas con el contenido de sales solubles, como la conductividad eléctrica y el contenido de sodio intercambiable + soluble.

A partir de la CP 2 de este *biplot*, se observa que los tratamientos con compost de biosólidos estarían más relacionados con un mayor contenido de P extractable,  $Mg^{+2}$  y  $K^+$ , que los sustratos formulados con compost de residuos orgánicos urbanos, en los cuales los contenidos de carbono, nitrógeno y calcio serían más significativos. Esta componente principal también permite notar que los sustratos con CB se asocian a las variables relacionadas al contenido de sales solubles, como la CE y el contenido de sodio, en mayor medida que los tratamientos con CROU, que se ubican en el cuadrante opuesto a estas variables. En este sentido, también es fuerte la correlación entre la concentración de  $Na^+$  y la conductividad eléctrica. De esta manera, preliminarmente, la conductividad eléctrica de los sustratos podría estar dada mayormente por sales de sodio.

El Índice de Germinación se ubica en el sector inferior, tomando como referencia la CP2, oponiéndose lógicamente a las variables relacionadas a la concentración de sales. No obstante, no se destaca una asociación positiva con ninguno

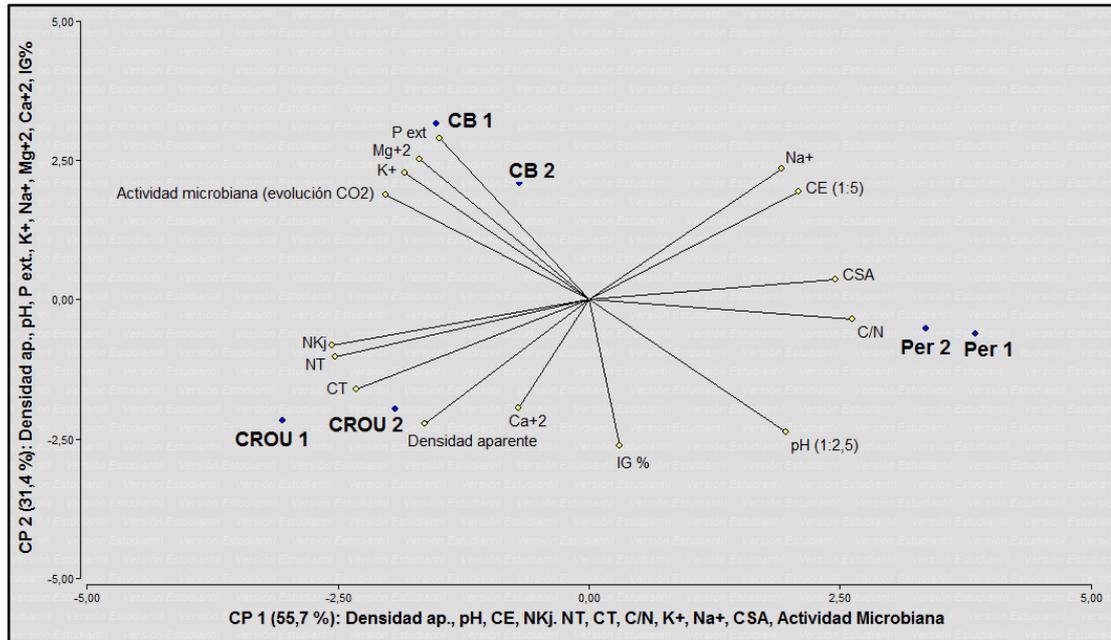
de los sustratos analizados.

Al finalizar el ensayo de crecimiento vegetal (Figura 2.6 b), el contenido de sales solubles, y en particular del catión sodio, que inicialmente se encontraban relacionadas a los sustratos formulados con compost de biosólidos y a los testigos con perlita, se ubican ahora en el cuadrante opuesto a los tratamientos con CB. Ello indicaría que en estos sustratos hubo un importante lavado de sales, y especialmente de sodio, durante el ensayo de crecimiento vegetal.

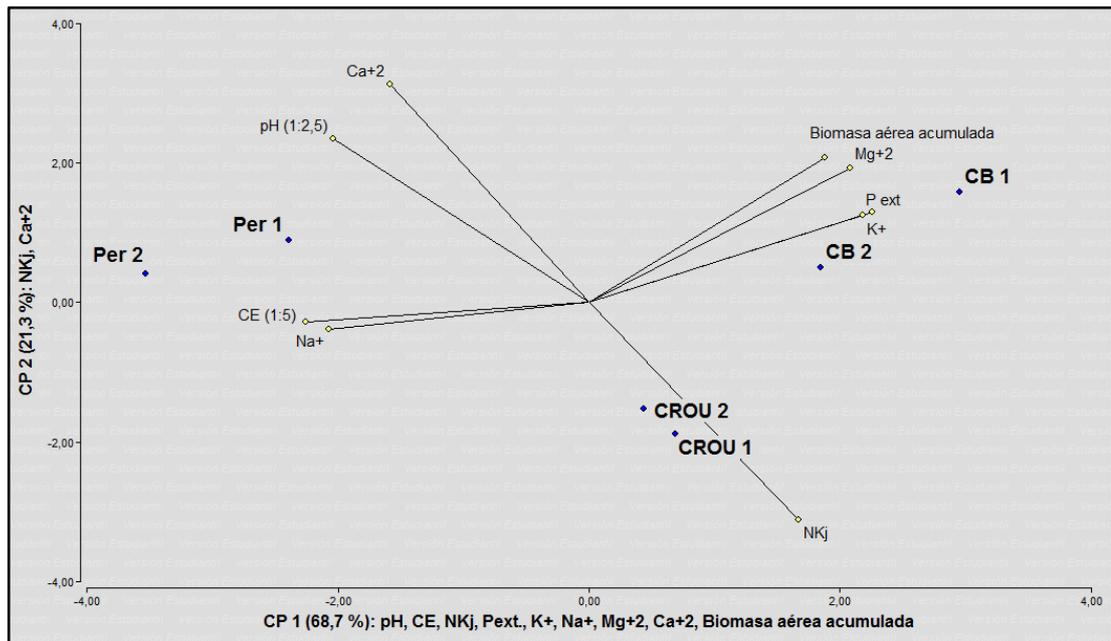
Al considerar los valores de densidad aparente de los sustratos en el análisis (Figura 2.6 a), se observa que los tratamientos formulados con CB y perlita presentan menores valores de densidad aparente, indicando posiblemente una mejor porosidad en estos sustratos, respecto de aquellos formulados con CROU. Esta condición física podría contribuir a explicar preliminarmente la pérdida de sales debido al riego en los sustratos con CB.

Finalmente, en el *biplot* correspondiente al final del ensayo, la biomasa aérea de agropiro alargado se asocia a los sustratos con CB, en los cuales ya se mostró que el rendimiento vegetal fue el mayor, en particular en el tratamiento CB 1. Además, esta variable también muestra una estrecha correlación con el contenido de fósforo, potasio y magnesio, y una correlación negativa con la CE y el contenido de sodio.

a)



b)



**Figura 2.6.** Representación gráfica (“biplot”) del ACP realizado sobre las variables analizadas en los sustratos: **(a)** antes y **(b)** después del ensayo de crecimiento vegetal en invernáculo. En cada componente principal se indican las variables que muestran mayor representación en el mismo (correlación  $\geq 0,6$ ).

#### 2.4.4 Contenido de nutrientes de los sustratos formulados

Los compost de residuos orgánicos urbanos suelen presentar un menor contenido de materia orgánica, y en especial de nitrógeno y fósforo, que los compost provenientes de biosólidos (Tognetti et al., 2007 a y b; Satti et al., 2012). Ello se verifica en la caracterización detallada en la Tabla 2.1 (Sección 2.3.3) de ambas enmiendas orgánicas utilizadas en este ensayo. Sin embargo, los sustratos formulados con CROU presentaron mayor concentración de carbono total, y casi el doble de nitrógeno total, que los tratamientos con CB, como se deduce del ACP realizado y se observa en la Tabla 2.7, donde se detallan los resultados obtenidos de las variables físicas y químicas medidas en los sustratos antes del ensayo de crecimiento vegetal.

Considerando que los sustratos fueron preparados a partir de proporciones en volumen, las diferentes densidades de las enmiendas orgánicas utilizadas (CROU > CB; ver Tabla 2.2) pueden haber modificado el aporte esperado de estos nutrientes. Específicamente, las dosis de CB fueron de 250 y 167 g/kg de RBA (materia seca) en los tratamientos CB 1 y CB 2, y de 667 y 444 g/kg RBA en CROU 1 y CROU 2, respectivamente (Tabla 2.3). Estas diferencias, en las dosis en masa de cada enmienda orgánica, explican las diferencias en las concentraciones de C y N medidas en los sustratos formulados con uno y otro tipo de compost. Lógicamente, este aspecto debe ser tenido en cuenta al utilizar formulaciones en volumen de sustratos y su impacto en la fertilidad de los mismos.

Por otro lado, como lo adelanta el análisis exploratorio realizado, el contenido de P extractable de los sustratos con compost de biosólidos fue prácticamente 3 veces mayor que en los tratamientos con CROU (Tabla 2.7), a pesar de la menor proporción en masa del CB, versus el CROU, en los respectivos sustratos. Esto se explica considerando que los biosólidos presentan, por lo general, una mayor concentración de fósforo respecto de otras materias primas compostadas, como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (Laos et al., 2002; Tognetti et al., 2007 a). El P extractable medido en el RBA lavado fue muy bajo ( $2,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), por lo cual su incorporación por medio de las enmiendas orgánicas es también fundamental para la mejora de su fertilidad, como lo es el aporte de nitrógeno.

Como el nitrógeno y el fósforo, el contenido de potasio, calcio y magnesio en las enmiendas orgánicas es atribuido al material de origen, y también es dependiente del proceso de compostaje; como ejemplo, los compost provenientes de la fracción orgánica de los residuos urbanos suelen presentar altos contenidos de calcio (Satti et al., 2012).

Al comparar el contenido inicial de cationes intercambiables y solubles de los sustratos enmendados, respecto de los testigos con perlita (Tabla 2.7), puede apreciarse el aporte de  $K^+$  y de  $Mg^{+2}$  por parte de ambas enmiendas orgánicas. Sin embargo, la concentración de  $Ca^{+2}$  no difiere significativamente entre los sustratos con o sin enmiendas orgánicas, a pesar del elevado contenido de calcio en ambas enmiendas, y en particular del CROU. El recorte de perforación presentó originalmente concentraciones importantes de calcio (9 a 10 g  $kg^{-1}$ ), tanto antes como después del lavado (Tabla 2.4, sección 2.4.1.1), por lo cual el RBA estaría contribuyendo también en el contenido de este nutriente, que además no fue perdido durante el pretratamiento de lavado. No obstante, la relación  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ , que suele utilizarse como un indicador de fertilidad y se recomienda que su valor no sea mayor a 20 (USEPA, 2007), fue adecuada sólo en ambos sustratos formulados con CB. En los tratamientos con perlita y CROU, los menores contenidos de  $Mg^{+2}$  hicieron que esta relación se eleve ampliamente por encima del valor límite recomendado.

**Tabla 2.7.** Caracterización inicial de los sustratos formulados

	PER 1	PER 2	CB 1	CB 2	CROU 1	CROU 2
Densidad aparente (g cm <sup>-3</sup> )	0,7 (<0,1)	0,8 (<0,1)	0,8 (<0,1)	0,9 (<0,1)	0,9 (<0,1)	1,0 (<0,1)
pH (H <sub>2</sub> O) 1:2,5	8,4 (0,1)	8,3 (<0,1)	7,2 (<0,1)	7,4 (0,1)	7,7 (<0,1)	7,9 (<0,1)
CE 1:5 (dS m <sup>-1</sup> )	9,1 (0,2)	9,5 (0,1)	8,6 (0,1)	9,2 (0,3)	6,8 (<0,1)	7,7 (0,1)
CT (g kg <sup>-1</sup> )	67,5	68	75	78,5	92	92
CSA (g kg <sup>-1</sup> )	5,7 (0,6)	4,6 (0,4)	3,8 (0,3)	4,3 (0,1)	3,3 (0,2)	3,5 (0,2)
NKj (g kg <sup>-1</sup> )	0,6 (<0,1)	0,7 (0,1)	2,3 (0,1)	1,8 (<0,1)	3,5 (0,1)	2,8 (0,1)
NT (g kg <sup>-1</sup> )	0,6	0,6	2,4	1,9	3,9	3,5
P extractable (mg kg <sup>-1</sup> )	1,3 (<0,1)	1,7 (0,3)	56,4 (8,2)	49,4 (4,1)	17 (2,8)	16 (1,1)
K <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	0,4 (0,1)	0,3 (<0,1)	0,8 (<0,1)	0,6 (<0,1)	0,6 (<0,1)	0,5 (<0,1)
Na <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	10 (0,2)	10,1 (0,5)	10,1 (1,6)	9,2 (<0,1)	6,5 (0,4)	7,2 (0,4)
Ca <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	8,9 (<0,1)	9,1 (0,3)	8,2 (0,1)	8,4 (<0,1)	11,8 (5,4)	8,2 (0,9)
Mg <sup>+2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	0,1 (<0,1)	0,1 (<0,1)	0,5 (<0,1)	0,3 (<0,1)	0,2 (<0,1)	0,2 (<0,1)
Ca <sup>+2</sup> / Mg <sup>+2</sup>	78	79	18	30	49	42

Todos los valores son expresados en base seca y como el promedio de tres repeticiones por tratamiento. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

La concentración de Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup> corresponde a la fracción intercambiable + solubles, y se expresa en g kg<sup>-1</sup> para su comparación con otros autores y estandarización para el análisis estadístico.

De acuerdo a lo adelantado en el análisis exploratorio realizado en la sección anterior, la fuerte correlación entre la biomasa aérea acumulada de agropiro alargado y el contenido de P, K<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup> en el tratamiento CB 1, puede contribuir parcialmente en la explicación del mayor rendimiento vegetal observado, dado que este tratamiento mostró contenidos más altos de estos nutrientes, respecto de los sustratos con CROU y perlita, según muestran los resultados obtenidos de la caracterización inicial de los sustratos formulados. Esta hipótesis puede apoyarse también en los coeficientes de Pearson, obtenidos para la correlación entre la biomasa acumulada de agropiro y el contenido inicial de nutrientes en los sustratos, presentados en la Tabla 2.8.

En la Tabla 2.8, también se observa que la relación Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup> tiene una fuerte correlación negativa con el rendimiento vegetal de agropiro, y esta relación es menor al valor de referencia (< 20) sólo en el tratamiento CB 1, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Por otro lado, lógicamente las correlaciones no significativas del contenido total de carbono y de nitrógeno con la biomasa aérea, se deben a que la relación entre estos nutrientes y el crecimiento vegetal no es lineal. Sin embargo, en los tratamientos con CROU, que presentan un mayor contenido de C y N, el rendimiento vegetal no se diferenció de los testigos.

**Tabla 2.8.** Correlación de Pearson entre la variable biomasa aérea acumulada de agropiro alargado (*Thynopirum ponticum*) y el contenido de nutrientes en los sustratos formulados.

		Coefficiente de Pearson ( <i>r</i> )	p-valor
Biomasa aérea acumulada de agropiro alargado ( <i>Thynopirum ponticum</i> )	CT	0,19	0,713
	NT	0,4	0,428
	N Kj	0,27	0,277
	<b>P ext.</b>	<b>0,55</b>	<b>0,009</b>
	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>0,93</b>	<b>0</b>
	Ca <sup>+2</sup>	-0,23	0,474
	<b>Mg<sup>+2</sup></b>	<b>0,92</b>	<b>0</b>
	<b>Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup></b>	<b>-0,81</b>	<b>0,001</b>

En negrita se indican las correlaciones significativas ( $p < 0,01$ ).

La disponibilidad de los macronutrientes para las plantas no es solo dependiente de su concentración inicial en el sustrato de crecimiento vegetal. Los compost maduros, por ejemplo, se consideran fertilizantes nitrogenados y fosforados de lenta liberación, porque mineralizan o liberan solamente una fracción de su contenido total de N y P, cuya mayor parte se encuentra en formas orgánicas y, por lo tanto, no inmediatamente disponible para las plantas (Laos et al., 2000; Tittarelli et al. 2007; Tognetti et al., 2008). La transformación de estos nutrientes a formas inorgánicas, en las que pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas, es un proceso primariamente biológico. Es por ello que este proceso es afectado por factores como la salinidad, el pH, la temperatura y la disponibilidad de agua y oxígeno (He et al., 2005; Mazzarino et al., 2012 a; Zhang et al., 2015).

Por otra parte, aun cuando se ha demostrado que la aplicación de enmiendas orgánicas puede mejorar el estado nutricional y el crecimiento de las plantas en suelos o materiales salinos (Stehouwer y Macneal, 2003; Lakhdar et al., 2009), si el estrés vegetal provocado por la salinidad es de mayor gravedad que la deficiencia de nutrientes, y la especie vegetal no es lo suficientemente tolerante, su crecimiento se verá igualmente limitado (Walker y Bernal, 2008).

Según puede deducirse preliminarmente del análisis exploratorio realizado mediante el ACP, las siguientes variables: densidad aparente, evolución del pH y del contenido de sales solubles y cationes intercambiables + solubles, y la actividad biológica, pueden haber afectado el crecimiento de la especie vegetal en los sustratos formulados con los recortes de perforación. Por lo tanto, se analizó su evolución en el ensayo de crecimiento vegetal.

#### **2.4.5 Características físicas de los sustratos: Densidad aparente**

La densidad aparente constituye un indicador frecuentemente utilizado del grado de estructuración de un suelo o sustrato. Menor densidad aparente implica una mayor macroporosidad, y por lo tanto una mejor conductividad hidráulica y oxigenación. La aplicación de enmiendas orgánicas ha demostrado mejorar significativamente este aspecto en los suelos en general (Khaleel et al., 1981; Zeytin y

Baran, 2003; Courtney y Mullen, 2008; Cellier et al., 2012) y, en particular, en suelos salino-sódicos (Tejada et al., 2006; Lakhdar et al., 2009; Chaganti y Crohn, 2015; Seenivasan et al., 2015), debido a que la incorporación de materia orgánica y el consecuente incremento de la actividad biológica, afectan positivamente los procesos de agregación de estos suelos que, por lo general, carecen de estructura.

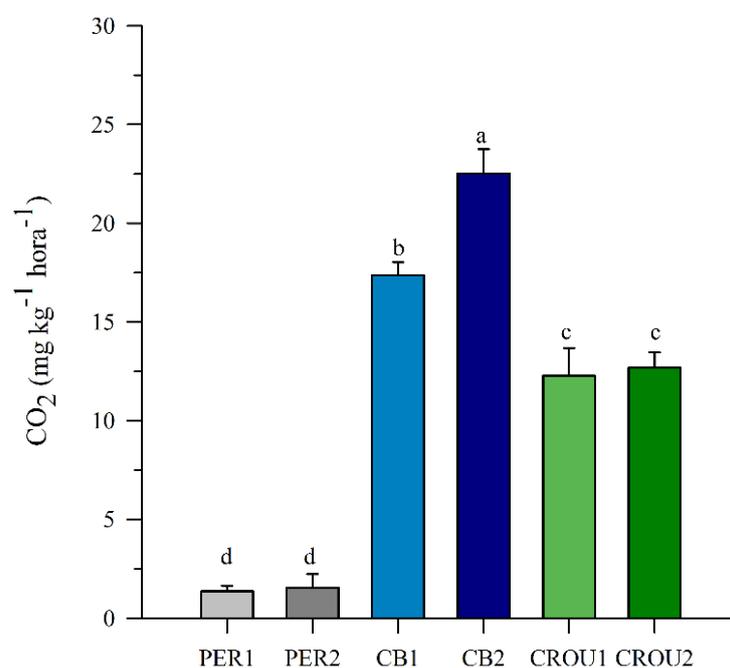
Entre los sustratos formulados hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de esta variable (Tabla 2.7), siendo los sustratos con CROU los de mayor densidad aparente. En segundo lugar se ubicaron los tratamientos con las menores proporciones de CB y perlita (CB 2 y PER 2), y la menor densidad aparente se observó en los sustratos con la mayor proporción de compost de biosólidos y de perlita (CB 1 y PER 1). Estos resultados coinciden con el análisis de componentes principales realizado, que asocia mayores valores de esta variable a los sustratos formulados con CROU y la ubica en forma opuesta a los sustratos con CB y perlita.

El compost de residuos orgánicos urbanos utilizado en este trabajo fue tamizado por malla de 0,5 cm en la planta de producción, presentando un tamaño de partícula menor que el compost de biosólidos. El CB presenta partículas de tamaño mayor, puesto que fue tamizado por malla de 1 cm y, además, esta enmienda suele presentar un particulado más grosero debido a los agentes estructurantes (virutas y chips de madera) utilizados durante su proceso de producción. Esta cualidad probablemente le confirió una mayor proporción de poros de mayor tamaño a los sustratos conformados con CB, respecto de los sustratos formulados con CROU, y, probablemente, un mejor grado de estructuración.

#### **2.4.6 Actividad biológica**

La actividad biológica en los sustratos fue evaluada mediante la medición del desprendimiento de  $\text{CO}_2$ , como resultado de la respiración microbiana, en incubaciones a 25 °C por un lapso de 72 horas. Los valores de  $\text{CO}_2$  liberado confirman lo observado mediante el análisis de componentes principales, siendo significativamente mayor la actividad biológica en los sustratos con compost de biosólidos. Entre los sustratos con CROU no hubo diferencias significativas en la

actividad biológica, al igual que entre los sustratos con perlita, en los cuales la actividad biológica fue la menor, de acuerdo a lo esperado (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Actividad respiratoria (evolución de CO<sub>2</sub>) en los sustratos incubados a 25 °C. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sustratos.

Como se expuso anteriormente, la comunidad microbiana es primariamente responsable de la fertilidad de un sustrato, debido al rol intransferible de los microorganismos en el ciclado y consecuente liberación de los nutrientes en formas disponibles para las plantas. Está bien establecido que la aplicación de enmiendas orgánicas en un suelo o sustrato estimula significativamente la actividad biológica, e incrementa la biomasa microbiana, debido al aporte de nutrientes y de una variedad de microorganismos (Laos et al., 2000; Kowaljow y Mazzarino, 2007; Tognetti et al., 2008). No obstante, los ambientes salinos pueden interferir en el acceso al agua y resultar tóxicos para aquellos microorganismos no adaptados a los mismos (Zahran, 1997).

La aplicación de enmiendas orgánicas ha mostrado aliviar el estrés osmótico para las comunidades microbianas en suelos salinos, debido principalmente a una mejor estructuración del suelo, lo que permite el lavado de sales y el incremento de la actividad enzimática y biológica (Pathak y Rao, 1998; Stehouwer y Macneal, 2003; Tejada et al., 2006; Ouni et al., 2013; Chaganti y Crohn, 2015). En este ensayo, la aplicación de compost de biosólidos y de residuos orgánicos urbanos a los recortes de perforación base agua tuvo también este efecto, dado que la liberación de CO<sub>2</sub> fue significativamente mayor en los sustratos formulados con CB y CROU, respecto de los sustratos testigo (PER 1 y 2). Sin embargo, resultan más difícil de explicar las diferencias observadas en la tasa de respiración microbiana, entre los sustratos con compost (CB versus CROU), dado que el contenido de nutrientes, y en particular del C fácilmente disponible reflejado por el valor de la fracción de carbono soluble en agua (CSA), son similares en los sustratos formulados con ambas enmiendas orgánicas (Tabla 2.7).

Estas diferencias podrían atribuirse a aptitudes físicas (porosidad, capacidad de retención de agua, etc.) que regulan factores vitales como la circulación de agua y oxígeno. No obstante, e independientemente de las diferencias observadas en la actividad biológica en los sustratos formulados con una u otra enmienda orgánica, la microflora activa de los sustratos con compost de biosólidos posiblemente contribuyó de manera significativa en la estructuración de estos sustratos, y en la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, se habría favorecido el rendimiento vegetal de agropiro alargado en el tratamiento con la mayor proporción de compost de biosólidos (CB 1), respecto del resto de los tratamientos.

#### **2.4.7 Evolución del pH y del contenido de sales solubles durante el ensayo de invernáculo**

En varios trabajos revisados por Lakhdar et al. (2009), las enmiendas orgánicas han mostrado funcionar como amortiguadores del pH en suelos salinos y/o alcalinos. Un pH muy alcalino, característico de estos suelos, puede condicionar la actividad biológica y/o las reacciones químicas y bioquímicas responsables de la disponibilidad

de los nutrientes para las plantas, además de dañar sus raíces. El valor del pH medido en el recorte de perforación una vez lavado fue alcalino (8,2). La aplicación de CB y CROU al recorte de perforación redujo levemente el pH del recorte de perforación, lo cual puede observarse al comparar el pH inicial de estos sustratos respecto del pH de los sustratos testigo formulados con perlita, en la Figura 2.8 a.

Durante el ensayo el invernáculo, el pH aumentó levemente en los tratamientos con compost de biosólidos, mientras que en los tratamientos con perlita y CROU disminuyó. Probablemente, la liberación de cationes debido a la actividad biológica sea una explicación posible para el incremento del pH en los tratamientos con CB. No obstante, los valores de esta variable en todos los sustratos formulados no excedieron significativamente el rango recomendado de pH (6 a 8) para un adecuado ciclado de nutrientes y desarrollo vegetal (González et al., 2011).

El contenido inicial de sales solubles (reflejado por el valor medido de CE en relación en agua 1:5) de todos los sustratos supera ampliamente el valor de referencia adoptado para clasificar un suelo como salino ( $4 \text{ dS m}^{-1}$  en pasta saturada) (Richards, 1954; Yadav et al., 2011). La CE inicial fue de 8 a  $9,5 \text{ dS m}^{-1}$  en los tratamientos con perlita y CB, mientras que en los sustratos con CROU fue levemente menor ( $6,8$  a  $7,7 \text{ dS m}^{-1}$ ) (Figura 2.8 b y Tabla 2.7). Mahdy (2011) y Ouni et al. (2013), entre otros, advierten del posible impacto en los valores de conductividad eléctrica al aplicar compost en suelos salinos, debido a las sales propias de las enmiendas, que pueden ser originarias de los materiales de origen o generadas durante el proceso de compostaje (Laos et al., 2002; Tognetti et al., 2007 b).

Durante el ensayo, la disminución del contenido de sales, debida al lavado o lixiviación por riego, fue significativa en todos los tratamientos (Figura 2.8 b). Sin embargo, en el sustrato con la mayor proporción de compost de biosólidos (CB 1), la pérdida de sales solubles fue notablemente elevada. En este tratamiento, el valor de CE se redujo en más del 50 % respecto del valor inicial, alcanzando un valor promedio de  $3,5 \text{ dS m}^{-1}$  al finalizar el ensayo, menor al valor de referencia para suelos salinos. La reducción del contenido de sales en el tratamiento CB 2 también fue muy importante: de una CE de  $9,2 \text{ dS m}^{-1}$ , en el inicio, a  $4,2 \text{ dS m}^{-1}$ , al finalizar el ensayo. En los tratamientos con CROU no hubo diferencias importantes en el contenido final de sales respecto de los sustratos con perlita; todos estos tratamientos alcanzaron

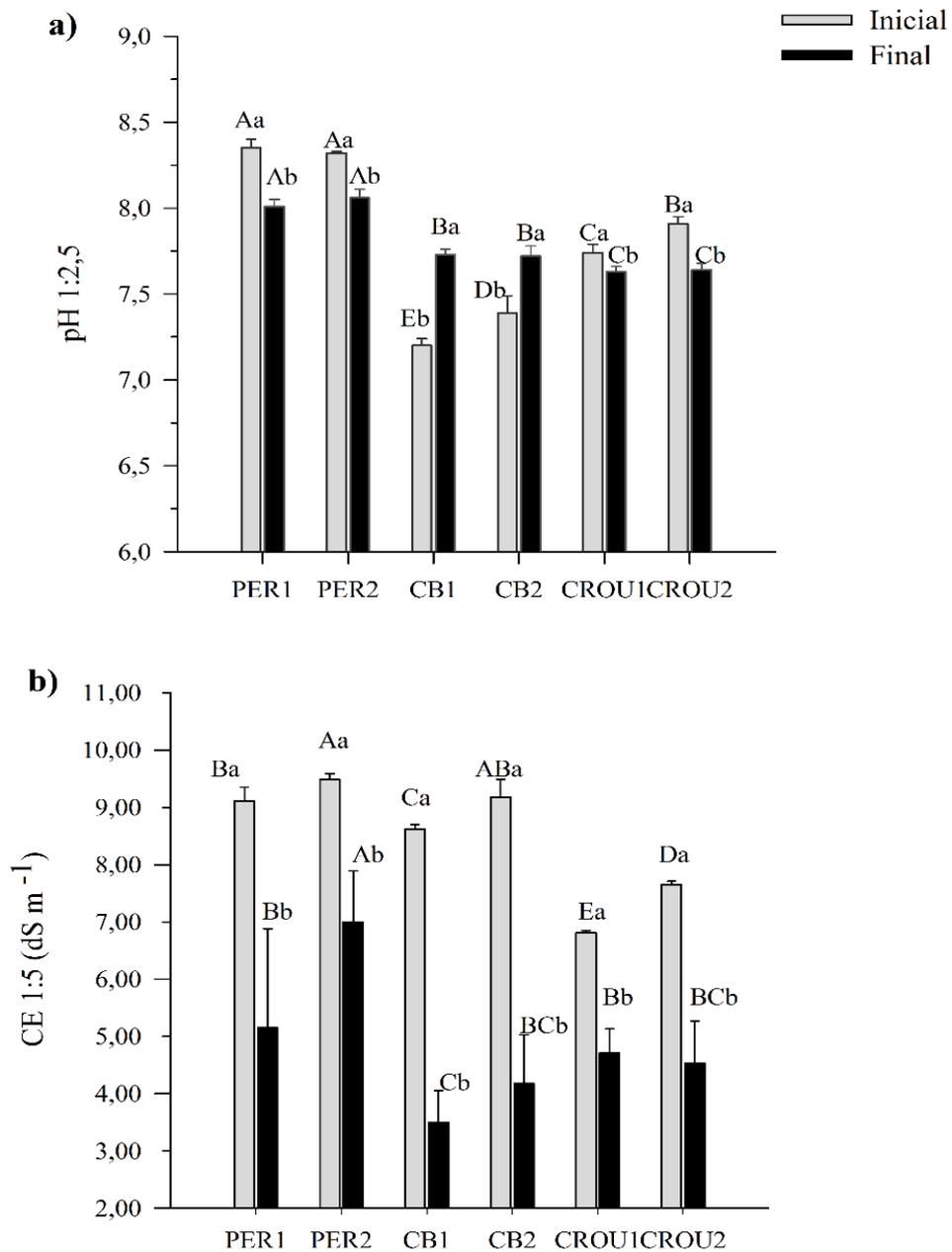
valores de CE entre 4 y 4,5 dS m<sup>-1</sup>, a excepción del tratamiento con la mayor fracción de RBA (PER 2) donde el lavado de sales fue menos eficiente (CE final: 6,5 dS m<sup>-1</sup> aproximadamente).

Si bien tanto ambas enmiendas orgánicas como la perlita, tuvieron un efecto positivo en el lavado de sales durante el ensayo de invernáculo, debido probablemente a la mejora en las propiedades hidráulicas del recorte de perforación, el efecto del compost de biosólidos en esta propiedad física parece haber sido más pronunciado. Preliminarmente, ello podría asociarse a los menores valores de densidad aparente medidos en los sustratos con CB respecto de los tratamientos con CROU (Tabla 2.7). Sin embargo, los sustratos con perlita también presentaron inicialmente valores similares de densidad aparente a los tratamientos con compost de biosólidos, pero ello no fue reflejado en la lixiviación de sales.

El efecto de la materia orgánica, y de la actividad biológica, en la agregación de las partículas en suelos salino-sódicos, con la consecuente mejora en las propiedades hidráulicas y el lavado de sales del perfil del suelo, ha sido verificado por varios autores, como se indica en la sección 2.4.5. En los sustratos con CB esta característica puede haber sido acentuada por el proceso de agregación de partículas a lo largo del ensayo, respecto de los sustratos con perlita. Sin embargo, el tipo de enmienda orgánica utilizada parece tener un papel importante en el alcance de este efecto. Por ejemplo, Walker y Bernal (2008), no observaron una disminución en la CE al aplicar a un suelo salino un residuo orgánico sin compostar, como la gallinaza, o un compost maduro proveniente de residuos del procesado de olivas y de algodón. En este trabajo, el compost de biosólidos tuvo un efecto muy diferente, respecto del compost de residuos orgánicos urbanos, en la mejora de la estructura del recorte de perforación y, por lo tanto, en el proceso de lavado de las sales.

La salinidad de un suelo o sustrato afecta severamente tanto la liberación y el ciclado de los nutrientes, como el desarrollo de las raíces vegetales, como es expuesto en la Introducción de este Capítulo. Naturalmente, y como es adelantado por el ACP (Figura 2.6 b), el rendimiento vegetal de agropiro alargado se correlaciona negativamente con la CE (Coeficiente de Pearson:  $r = -0,67$ ;  $p < 0,01$ ). De esta manera, probablemente la significativa reducción de la CE debido a una mejor estructura del sustrato, entre otros factores, ha potenciado el mayor desarrollo de agropiro en el

tratamiento con la mayor proporción de compost de biosólidos (CB 1).



**Figura 2.8. (a)** pH (1:2,5) y **(b)** conductividad eléctrica (1:5) en los sustratos antes y después del ensayo de crecimiento vegetal. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. Letras minúsculas diferentes, indican diferencias dentro del mismo tratamiento entre el inicio y el final del ensayo.

### 2.4.8 Cationes Intercambiables y Solubles

De acuerdo a lo observado mediante las técnicas exploratorias de análisis multivariado (ACP) y discutido en la sección 2.4.4 (Contenido de nutrientes), el contenido de cationes intercambiables + solubles varía de acuerdo al tipo de enmienda orgánica utilizada en los sustratos. El contenido inicial de  $\text{Ca}^{+2}$  fue similar en los sustratos con CROU y perlita, y menor en los tratamientos con CB (Figura 2.9 a). Por lo cual se observa el importante aporte de este nutriente tanto por el CROU como por el recorte de perforación. Los contenidos iniciales de  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  fueron significativamente mayores en el sustrato formulado con la mayor proporción de compost de biosólidos (CB 1), respecto del resto de los sustratos formulados (Figura 2.9 c y d). El contenido inicial de  $\text{Na}^{+}$  en los tratamientos con CB y con perlita fue mayor a la concentración inicial de este elemento en los tratamientos con CROU (Figura 2.9 b). Además, un elevado Coeficiente de Pearson ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,01$ ), confirma la fuerte correlación entre la conductividad eléctrica y el contenido de  $\text{Na}^{+}$ , observada previamente en el análisis de componentes principales. Por lo cual, se confirmaría que la mayor proporción de sales solubles están formadas por este catión en todos los sustratos, coincidiendo con la tendencia observada en los valores de conductividad eléctrica.

En un suelo o sustrato, los principios que regulan el comportamiento de los cationes de mayor importancia nutricional para las plantas, como el  $\text{Ca}^{+2}$ , el  $\text{Mg}^{+2}$  y el  $\text{K}^{+}$ , y también del catión sodio, son dependientes principalmente de reacciones químicas que tienen lugar entre el complejo de intercambio y la fase líquida, y se relacionan a la carga y tamaño del ion. Una mayor carga y un menor radio de hidratación (determinado por el tamaño del ion), implican mejor capacidad de interacción del catión con las partículas cargadas negativamente, por lo tanto una mayor capacidad de adsorción al complejo de intercambio. Estos principios determinan la siguiente secuencia general de adsorividad:  $\text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+}$ .

No obstante, la concentración de la solución que rodea el complejo de intercambio (fase líquida) y el grado de acidez, pueden afectar la proporción de cada catión adsorbido en el complejo. Naturalmente, una mayor concentración de uno u otro

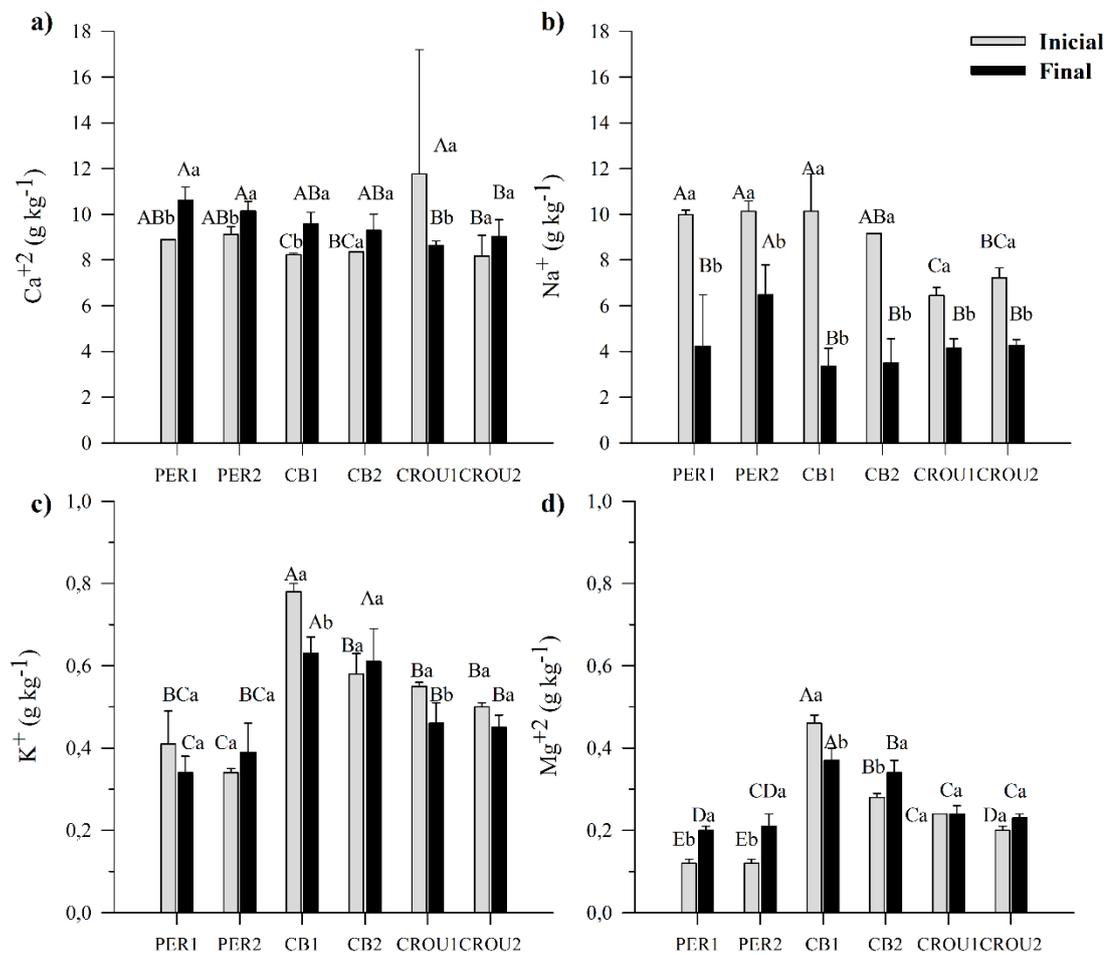
cación en la solución aumenta la probabilidad de saturación del complejo de intercambio con ese catión. Por otra parte, la dilución de la solución de suelo favorece la solubilización de los cationes monovalentes, que luego son perdidos por lixiviación, y favorece el ingreso al complejo de intercambio de los cationes divalentes (Ratto, 2011; Chaganti et al., 2015).

En este ensayo, considerando que el pH (1:2,5) se mantuvo por encima de la neutralidad en todos los tratamientos (Figura 2.8 a), el comportamiento observado de los cationes de intercambio y, lógicamente, los solubles, estaría más asociado a la dilución de la fase líquida debido al riego. Precisamente, en todos los tratamientos se verificó la pérdida por lixiviación de los cationes de menor tamaño y carga, como el sodio y el potasio (Figura 2.9 b y c), aunque este último en menor medida ya que su concentración no cambió significativamente luego del ensayo en los tratamientos PER 1 y 2, CB 2 y CROU 2. Por el contrario, los cationes divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  en general incrementaron su concentración a lo largo del ensayo (Figura 2.9 a y d). Excepciones fueron el  $\text{Ca}^{+2}$  en el tratamiento CROU 1 y el  $\text{Mg}^{+2}$  en el tratamiento CB 1, en los cuales probablemente el alto contenido inicial de estos elementos en sendos sustratos (ver Tabla 2.7) no permitió observar las diferencias antes y después del ensayo.

Asimismo, considerando la fuerte correlación observada entre los cationes  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y la biomasa aérea de agropiro alargado en la Tabla 2.8, la reducción en la concentración de estos cationes en el tratamiento CB 1 durante el ensayo de invernáculo, podría ser no sólo atribuida a la pérdida por lixiviación sino también a la absorción por la planta.

Una de las técnicas comúnmente utilizadas para la restauración de suelos salino-sódicos es la aplicación de yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), para que la mayor disponibilidad de calcio en la solución de suelo favorezca la competencia con el sodio en el complejo de intercambio, y éste último pueda eliminarse por lavado (Hanay et al., 2004; Seenivasan et al., 2015). El aporte de cationes divalentes debido a las enmiendas orgánicas, podría también contribuir a desplazar el equilibrio en el complejo de intercambio y favorecer la lixiviación del sodio. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no permiten apoyar esta hipótesis, dado que el recorte de perforación presenta originalmente un contenido importante de calcio. La disminución de sodio y el incremento de calcio y magnesio en la mayoría de los

tratamientos luego del ensayo de invernáculo, indicaría el reemplazo del catión monovalente ( $\text{Na}^+$ ) por los divalentes en el complejo de intercambio, debido probablemente a la lixiviación del sodio dada su mayor solubilidad.



**Figura 2.9.** Cationes intercambiables en los sustratos antes y después del ensayo de crecimiento vegetal: **(a)** calcio; **(b)** sodio; **(c)** potasio; **(d)**. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias dentro del mismo tratamiento entre el inicio y el final del ensayo.

## 2.5 Conclusiones

De acuerdo a la normativa ambiental vigente en la República Argentina, las características de los recortes de perforación base agua, permiten considerar su reuso como material de relleno en la restauración de áreas degradadas. No obstante, la evaluación de la peligrosidad potencial de este material será ineludible en cada caso particular, dada la amplia variabilidad en su composición química, dependiente de los fluidos utilizados en las operaciones de perforación y de las características de las formaciones geológicas de origen. Aun cuando el recorte de perforación base agua pueda ser clasificado, preliminarmente, como un residuo no peligroso, sus características químicas y físicas, especialmente su elevado contenido de sales y arcillas, hacen de este residuo un material extremadamente fitotóxico y poco apto como soporte para el crecimiento vegetal.

El pretratamiento de lavado con agua permitió una reducción significativa del contenido de sales, y la posterior aplicación de enmiendas orgánicas mejoró, de manera significativa, la fertilidad química y biológica y, por lo tanto, la aptitud del recorte de perforación base agua como sustrato de crecimiento vegetal. No obstante, el efecto en el rendimiento vegetal fue diferente en función del tipo y proporción de enmienda orgánica aplicada al recorte de perforación.

El efecto diferencial en la aptitud para el crecimiento vegetal, entre los sustratos formulados con compost de biosólidos respecto de los formulados con compost de residuos orgánicos urbanos, estuvo principalmente asociado a la mejora en las propiedades físicas del recorte de perforación. El mayor tamaño de partícula del compost de biosólidos probablemente generó una mejora significativa en la estructura del recorte de perforación, favoreciendo el lavado de sales, y en particular del sodio. Este efecto en las propiedades físicas, en conjunto con los beneficios del aporte de materia orgánica y nutrientes, posibilitó el desarrollo y crecimiento vegetal en los sustratos formulados con recortes de perforación y compost de biosólidos. De esta manera, la aplicación de enmiendas orgánicas de particulado grueso puede mejorar la aptitud de los recortes de perforación base agua como soporte de crecimiento vegetal, para su reuso en la restauración de áreas degradadas.

## CAPITULO 3

---

Biorremediación de recortes de perforación  
base oleosa mediante compostaje

## **3.1 Introducción**

### **3.1.1 Factores ambientales que regulan el proceso de biorremediación por compostaje**

Los principios que regulan el compostaje de materiales contaminados por compuestos orgánicos son similares a los que gobiernan el compostaje de los residuos orgánicos más fácilmente degradables. Las condiciones generales para el desarrollo exitoso del proceso de biorremediación son esencialmente las mismas que las de un tratamiento de compostaje de residuos orgánicos; aun cuando, la optimización del proceso de biodegradación de los contaminantes de interés, requiera que ciertas condiciones sean modificadas o controladas.

Dado que se trata de un proceso biológico, los factores claves son aquellos que regulan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos responsables de la degradación y transformación de la materia orgánica, y por lo tanto del contaminante. Estos factores, principalmente el contenido de nutrientes y sales, el pH, la disponibilidad de agua y oxígeno y la temperatura, son dependientes del material de partida así como del tipo de sistema de compostaje utilizado y su operación (Semple et al., 2001; Savage y Díaz, 2007)

En forma genérica, los microorganismos involucrados en la degradación de la materia orgánica utilizan 30 partes de carbono por una parte de nitrógeno (Márquez et al., 2008). En materiales muy contaminados con hidrocarburos, la elevada concentración de carbono orgánico, y la deficiencia de nitrógeno y fósforo, implica un desbalance severo en las relaciones C/N y C/P necesarias para un metabolismo microbiano activo, afectando la biodegradación de los compuestos de interés. Por lo cual, un factor limitante en los procesos de atenuación natural o de biodegradación de hidrocarburos, suele ser la deficiencia de nitrógeno y fósforo (Beaudin et al., 1999; Teng et al., 2010). De esta manera, la adecuada suplementación de N y P, derivada de aplicar proporciones convenientes de residuos orgánicos al material contaminado, es

de vital importancia y constituye una de las principales ventajas de este método de tratamiento.

La suficiencia o deficiencia de nitrógeno, o fósforo, para una actividad microbiana eficiente es indicada por las relaciones C/N y C/P, pero puede variar en función de la calidad del carbono, es decir de su accesibilidad o disponibilidad para los microorganismos. Las relaciones de carbono a nitrógeno o fósforo, deben utilizarse con cautela como un indicador de bioestimulación, ya que el total de los nutrientes estimados puede no estar fácilmente accesible (Sarkar et al., 2005).

El nitrógeno puede ser asimilado por la flora microbiana en forma de nitrógeno orgánico, amoníaco, nitritos y nitratos, y el fósforo en su forma soluble o reactiva (o- $PO_4$ ). En cambio, una de las principales variables que afectan el crecimiento de los microorganismos heterótrofos es la disponibilidad de compuestos orgánicos reducidos, que actúen como fuente de carbono y energía, por lo tanto una menor o mayor actividad microbiana dependerá no sólo la cantidad de carbono, sino de su estado de oxidación y accesibilidad (Boopathy, 2000).

De esta manera, la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano depende ampliamente de su biodegradabilidad y, en particular, de su biodisponibilidad (Huesemann et al., 2004). Por lo general, durante el tratamiento de un suelo o material contaminado, estas condiciones no suelen ser lo suficientemente favorables para el rendimiento esperado en la biodegradación de estos compuestos. Los residuos orgánicos proveen fuentes de carbono más lábiles, que pueden actuar como sustrato primario o secundario (co-sustrato), incentivando la actividad microbiana heterótrofa general, con la consecuente transformación o degradación de los compuestos contaminantes en forma directa o indirecta, mediante el ataque enzimático (Jorgensen et al., 2000; Van Gestel et al., 2003; Ros et al., 2010; Teng et al., 2010).

En un proceso de compostaje, la relación C/N recomendada para la degradación efectiva de la materia orgánica lábil de los residuos orgánicos, se encuentra en el rango de 25-35 (Rynk et al., 1992; Day y Shaw, 2005). En cambio, en los tratamientos de biorremediación de materiales contaminados por hidrocarburos, en los cuales usualmente se aplica fertilización inorgánica y la fuente de C más abundante son los hidrocarburos, la relación C/N de referencia suele ser de 10 a 20 (Huesemann et al.,

2004; Chaillan et al., 2006; Steliga et al., 2009). La relación C/P es considerada como un factor menos limitante, aunque esta relación y el tipo de fósforo disponible son muy dependientes del material de partida. No obstante, suele recomendarse un rango de C/P de 100 a 200, tanto para el compostaje de residuos orgánicos como para las estrategias de biorremediación de hidrocarburos con la aplicación de fertilización inorgánica (Beaudin et al., 1999; Day y Shaw, 2005; Rojas-Avelizapa et al., 2006).

De acuerdo a lo expuesto previamente, estos rangos deben ser tomados de manera relativa y no estricta, puesto que son muchos los factores que determinarán la degradación de la materia orgánica y/o del compuesto contaminante. Por ejemplo, en la biorremediación mediante compostaje, si el carbono fácilmente disponible de los residuos orgánicos se encuentra en exceso, podría ser utilizado como fuente de energía preferentemente sobre los hidrocarburos, retrasando su biodegradación (Namkoong et al., 2002; Antizar-Ladislao et al., 2005). Este aspecto puede constituir una limitación para alcanzar los objetivos de remediación propuestos mediante esta estrategia, aun cuando los compuestos orgánicos más lábiles, provenientes de los residuos orgánicos, actúen como co-sustratos favoreciendo la degradación de los compuestos más recalcitrantes (Zhang et al., 2011).

Los recortes de perforación presentan un elevado contenido de sales, que podrían inhibir el crecimiento microbiano y afectar el pH retardando, consecuentemente, la metabolización de los hidrocarburos. Condiciones de pH extremadamente ácidas o alcalinas pueden resultar inhibitorias para el desarrollo microbiano y afectar también la solubilidad de los nutrientes (Eweis et al., 1999). Por otro lado, la naturaleza hidrófoba de estos materiales puede dificultar la lixiviación de las sales solubles en agua; sin embargo, ha sido demostrado que en ambientes con altas concentraciones salinas existen poblaciones microbianas adaptadas (halotolerantes) con capacidades hidrocarburoclíticas (Rhykerd et al., 1995; Margesin y Schinner, 2001; Nicholson y Fathepure, 2004 y 2005). Asimismo, se han reportado experiencias exitosas de biorremediación de hidrocarburos en ambientes salinos, mediante la estimulación de la microflora y el favorecimiento de las condiciones para la lixiviación de las sales, aplicando residuos orgánicos y materiales estructurantes, como rastrojo de trigo (Moretto et al., 2005; Betancur-Galvis et al., 2006; Zhang et al., 2008).

El contenido de agua y la oxigenación adecuada son aspectos críticos a fin de lograr un proceso de compostaje exitoso. La disponibilidad de agua es imprescindible para las necesidades fisiológicas de los microorganismos, siendo un factor vital para el proceso de compostaje y también para la degradación biológica de los hidrocarburos. Una de las principales ventajas que aportan las tecnologías de compostaje para el tratamiento de materiales contaminados por hidrocarburos, es el aporte o aprovechamiento del agua contenida en los residuos orgánicos y su capacidad de retener la humedad (Vallini et al., 2002). Especialmente, considerando que en muchas áreas de explotación hidrocarburífera la disponibilidad de agua dulce para riego es muy restringida. Por otro lado, en un material con poca estructura, como los recortes de perforación, las condiciones para la aireación se verían muy favorecidas por el agregado de agentes estructurantes de amplia disponibilidad y bajo valor, como chips o viruta de madera, restos de poda, etc. La proporción de residuos orgánicos aplicada al material a tratar regulará también estos aspectos, considerando que es esencial que el contenido de agua de la masa de compostaje no afecte el flujo de oxígeno (Rojas-Avelizapa et al., 2006; Joo et al., 2007).

### **3.1.2 Dinámica de la comunidad microbiana**

La dinámica de la comunidad microbiana en el compostaje de materiales contaminados sería similar a la evolución microbiana en un proceso de compostaje de residuos orgánicos, aunque aún no se encuentra en estudio (Chen et al., 2015). No obstante, la abundancia y diversidad de microorganismos presentes en los residuos orgánicos favorece el potencial de la comunidad microbiana para la biodegradación de los compuestos de interés. Además, es esperable que la presencia del compuesto contaminante pueda incentivar el enriquecimiento de aquellas especies con las capacidades para su metabolización (Jorgensen et al., 2000; Van Gestel et al., 2003; Savage y Díaz, 2007). Sin embargo, la estructura y actividad de la comunidad microbiana será dependiente, en buen grado, de la cantidad y tipo de materia orgánica, y del tamaño de partícula de los materiales agregados, lo cual determinará la superficie específica disponible para el ataque microbiano (Tejada et al., 2008).

Durante el compostaje, la acción de los microorganismos degradará la materia orgánica lábil generando energía y provocando un incremento en la temperatura, que favorecerá la sucesión de las poblaciones microbianas y un aumento de su actividad metabólica, además de contribuir en la solubilización de los compuestos hidrocarbonados más recalcitrantes. De esta manera, la diversidad y actividad microbiana, en conjunto con la disponibilidad de nutrientes, puede promover altas tasas de degradación del contaminante (Jorgensen et al., 2000; Moreno Casco y Bernat, 2008). El calor metabólico generado provoca un incremento en la temperatura de la masa en compostaje, pudiendo alcanzar valores mayores a 45 °C, lo que se conoce como etapa termofílica, en la cual se considera que la degradación de materia orgánica es óptima. Sin embargo, cada especie microbiana requiere un intervalo óptimo de temperaturas para el desarrollo de su actividad metabólica potencial, y se ha establecido que la mayor actividad y biodiversidad microbiana (incluyendo bacterias, actinomicetos y hongos) se genera en el rango de 25 °C a 45 °C (Day y Shaw, 2005).

Los antecedentes hallados en la literatura son variables respecto del efecto de temperaturas termofílicas en la degradación de hidrocarburos. Algunos resultados indican un efecto positivo de altas temperaturas (50 °C), sólo cuando son mantenidas por períodos prolongados de tiempo (aproximadamente 30 días) (Beaudin et al., 1999; Hesnawi y McCartney, 2006). Sin embargo, un número mayor de autores reportan mejores porcentajes de degradación de hidrocarburos a temperaturas mesofílicas (25 °C a 45 °C) y, en particular, de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que representan el grupo de compuestos más resistentes a la degradación (Antizar-Ladislao et al., 2005 y 2007; Sayara et al., 2010 a). Estos efectos estarían asociados no sólo a la mayor cantidad y variedad de microorganismos que pueden desarrollarse en temperaturas mesofílicas, sino también al adecuado funcionamiento de las actividades enzimáticas asociadas con la degradación de estos compuestos (Van Gestel et al., 2003; Antizar-Ladislao et al., 2004).

La biodegradación de compuestos orgánicos es catalizada por enzimas producidas por los microorganismos. Generalmente, las enzimas son específicas de cada sustancia a degradar, es por ello que para la biodegradación de una mezcla compleja de compuestos, como son el petróleo y sus derivados, será necesaria una gran variedad de enzimas. De esta forma, la degradación de hidrocarburos en matrices

contaminadas es típicamente un proceso gradual, que implica la participación de varias especies de microorganismos, generalmente organizados en consorcios o cohortes microbianos.

Un consorcio microbiano consiste en varias poblaciones viviendo en estrecha proximidad e interactuando entre sí. Habitualmente, esta es una interacción positiva, donde un grupo de microorganismos se beneficia de las acciones del otro y, de esta forma, varias especies están involucradas en cada etapa de la mineralización o transformación de un compuesto. En este sistema predominarán las especies que mejor se adapten a un ambiente en particular, determinado principalmente por la presencia de una fuente de carbono y energía utilizable y por las condiciones particulares de humedad, temperatura o pH (Eweis et al., 1999).

El proceso de “cometabolismo” o “cooxidación” consiste en la transformación de aquellos compuestos orgánicos que no pueden ser utilizados como fuente de carbono o energía por algunos microorganismos, pero pueden ser potencialmente degradados por enzimas generadas para metabolizar otras sustancias. El término cometabolismo ha sido ampliamente empleado para describir el proceso donde un compuesto es transformado como producto de la actividad biológica, pero sin ser utilizado como sustrato para el crecimiento o como fuente de energía. Generalmente, los productos del cometabolismo son metabolitos o subproductos parcialmente oxidados o transformados, que pueden ser utilizados por otros microorganismos y de esta forma continuar hasta la degradación completa del compuesto contaminante, en condiciones ideales. El cometabolismo es uno de los mecanismos más importantes asociados a la degradación de muchos compuestos recalcitrantes, como por ejemplo los HAPs (Juwarkar et al., 2010; Teng et al., 2010).

De esta manera, la cooperación o asociación entre especies y el cometabolismo, son los principales elementos que explican la eficiencia de la microflora presente en ambientes contaminados para la eliminación de los contaminantes (Atlas, 1997). En el compostaje, ambos procesos pueden ser maximizados debido a la disponibilidad de cosustratos (aportados por los residuos orgánicos) y nutrientes, a la variedad de microorganismos, y a las condiciones ambientales propicias para el desarrollo microbiano, que pueden alcanzarse mediante el control de las variables del proceso de compostado.

### 3.1.3 Biodegradabilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos

En un proceso de biorremediación por compostaje, la reducción en la concentración y/o movilidad de los compuestos contaminantes se atribuye a dos mecanismos principales: la adsorción a la materia orgánica y la mineralización o degradación a compuestos más inocuos, mediada por la flora microbiana. Ambos mecanismos dependen tanto de las condiciones ambientales, como de la naturaleza de la matriz y de los compuestos contaminantes presentes. En el caso de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos, su eliminación se atribuye mayormente a la degradación microbiológica. No obstante, para que ello ocurra estos compuestos deben ser biodegradables y estar biodisponibles (Semple et al., 2001; Van Gestel et al., 2003; Chen et al., 2015).

En matrices sólidas, la remoción de los contaminantes orgánicos ocurre por lo general en dos fases: una fase inicial de remoción rápida seguida por una fase de reducción más lenta. Este comportamiento está relacionado a la dinámica de adsorción/desorción y de absorción (entrampamiento en los poros) del contaminante a la matriz. El grado de adsorción y absorción a la matriz es regulado, entre otros factores, por la concentración, volatilidad, solubilidad en agua y por la afinidad por la materia orgánica del contaminante, factor que en el caso del compostaje puede incrementarse. Estos factores son los que determinarán su disponibilidad para los microorganismos y, por lo tanto, el destino de los compuestos orgánicos (Semple et al., 2001; Huesemann et al., 2004; Grace Liu et al., 2013; Chen et al., 2015).

Por otro lado, dos parámetros importantes que afectan significativamente la tasa de biodegradación de un contaminante son su concentración y toxicidad. Una concentración muy pequeña puede no ser suficiente para inducir en la comunidad microbiana el desarrollo del sistema enzimático necesario para su metabolismo, mientras que concentraciones muy elevadas pueden resultar tóxicas generando una disminución o supresión de la actividad biológica (Alexander, 1994). La toxicidad constituye otro factor clave en la biorremediación; si la mezcla contaminante no es tóxica por sí misma para la comunidad microbiana, algunos de sus componentes pueden serlo. En matrices contaminadas por hidrocarburos del petróleo, la toxicidad

puede deberse a la presencia de alcoholes y solventes clorados, o de metales peligrosos en altas concentraciones.

El petróleo y sus derivados consisten en mezclas complejas de varias familias de compuestos: hidrocarburos saturados, que se subdividen según su conformación molecular en lineales (n-alcanos), ramificados (isoalcanos) y cíclicos (cicloalcanos); hidrocarburos insaturados (con dobles o triples enlaces), que no se encuentran en el petróleo crudo, pero están presentes en la mayoría de los productos de refinación; hidrocarburos aromáticos, formados por uno o más anillos bencénicos y con sustituyentes alquilados; y compuestos polares (resinas y asfaltenos) (TPHCWG, 1998). La conformación molecular de cada grupo de compuestos influirá en la viabilidad y velocidad de su degradación.

Los alcanos lineales son los hidrocarburos del petróleo más biodegradables debido a la simplicidad de su estructura molecular. La solubilidad de este grupo de compuestos es dependiente de su tamaño molecular, es decir del número de carbonos en la cadena, lo cual influirá en el alcance de su degradación. Sin embargo, existen evidencias de que los alcanos no necesariamente necesitan estar disueltos en agua para ser biodegradados, puesto que los microorganismos pueden superar esta limitación solubilizando estos compuestos mediante la excreción de biosurfactantes o facilitando la incorporación de estos compuestos insolubles mediante membranas lipofílicas (Huesemann et al., 2004). Por otro lado, una ramificación muy extensa o compleja del alcano también puede significar una dificultad para su metabolización microbiana. Los cicloalcanos son menos biodegradables que sus isómeros de cadena lineal, pero más biodegradables que los HAPs por ser, estos últimos, muy estables químicamente. La susceptibilidad a la degradación de los cicloalcanos tiende a decrecer con el incremento del número de anillos en su estructura, como es el caso de los hidrocarburos poliaromáticos (Van Hamme et al., 2003)

Los hidrocarburos poliaromáticos han demostrado ser muy resistentes a la degradación, en particular los de elevado peso molecular. La biodegradabilidad de los compuestos aromáticos disminuye con el incremento del número de anillos, la angularidad entre los mismos y el número de sustituyentes alquilo, debido a que estas características implican un decremento en la solubilidad y volatilidad y un aumento en la capacidad de adsorción a las partículas sólidas, dificultando el acceso de los

microorganismos degradadores (Antizar- Ladislao et al., 2004; Huesemann et al., 2004). No obstante, las enzimas requeridas para la degradación de los HAPs, pueden ser inducidas por la presencia de compuestos aromáticos de bajo peso molecular, como el naftaleno o el antraceno, o por otros cosustratos de mayor degradabilidad, como se indicó previamente (Atlas, 1991; Zhang et al., 2011).

Por otro lado, usualmente la fracción más liviana de los hidrocarburos es más rápidamente degradada que la fracción más pesada, siendo en general mineralizada, es decir convertida en dióxido de carbono y agua. El factor limitante para que lo mismo ocurra con las fracciones más pesadas, suele ser el escaso grado de solubilización de estos compuestos y su lenta liberación desde los poros de la matriz. En líneas generales, las transformaciones aerobias hacen que el producto de la metabolización sea un compuesto menos volátil, más soluble y más degradable que el original. Una excepción pueden ser los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales pueden degradarse a productos más volátiles, como resultado de la ruptura del anillo aromático y la formación de compuestos de menor peso molecular (Eweis et al., 1999).

De esta manera, la secuencia de mayor a menor degradabilidad sugerida para los hidrocarburos según su conformación molecular, podría definirse como: n-alcanos > alcanos ramificados > n-alkil aromáticos de bajo peso molecular > monoaromáticos > alcanos cíclicos > aromáticos polinucleares. En esta secuencia deben también contemplarse las diversas y posibles modificaciones debidas al peso molecular de los compuestos (Chikere et al., 2011).

De acuerdo a lo expuesto, el análisis y la comprensión de los aspectos relacionados a la matriz, los factores ambientales, la actividad de la comunidad microbiana y al tipo y concentración de los contaminantes presentes, resulta esencial para la optimización y aplicación de la estrategia de compostaje en la biorremediación de recortes de perforación base oleosa.

## 3.2 Hipótesis y Objetivos

De acuerdo a la siguiente **hipótesis**:

En un proceso biorremediación de materiales contaminados con hidrocarburos por compostaje, el grado de degradación de los hidrocarburos estará regulado por las condiciones ambientales y las características de la matriz, que dependen de la cantidad y el tipo de residuos orgánicos aplicados.

Se plantea como **objetivo general** de este capítulo:

Evaluar la biorremediación por compostaje con residuos orgánicos de cocina y jardín, usualmente disponibles en los yacimientos hidrocarburíferos, como estrategia de tratamiento de recortes de perforación base oleosa.

Como **objetivos específicos** se establecen:

- (i) Caracterizar los recortes de perforación base oleosa, a fin de evaluar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas que puedan influir en su biotratamiento mediante compostaje.
- (ii) Analizar el efecto de la proporción de residuos orgánicos de cocina y jardín aplicados a los recortes de perforación sobre:
  - ✓ Los factores que pueden resultar condicionantes del proceso de degradación de hidrocarburos, tales como el contenido de sales, pH y la disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno.
  - ✓ La concentración inicial, el porcentaje, y la velocidad de degradación de los hidrocarburos presentes en los recortes de perforación base oleosa, según su tipo y tamaño molecular.
  - ✓ La actividad microbiana y el crecimiento de las poblaciones microbianas cultivables heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos, y su relación con la reducción de los distintos tipos de hidrocarburos presentes en el recorte de perforación base oleosa.

### **3.3 Materiales y Métodos**

#### **3.3.1 Recolección de recortes de perforación y residuos orgánicos**

Los recortes de perforación de base oleosa (RBO) fueron colectados en el yacimiento localizado en el norte de la Provincia del Neuquén (Cuenca Neuquina), dónde fueron recolectados los recortes de perforación base agua, y tomados directamente en la locación del pozo, en forma previa a su traslado a los repositorios destinados a su almacenamiento para evitar su mezclado con suelos contaminado. Se recolectaron aproximadamente 600 kg de material, de apariencia lodosa, oscuro y con fuerte olor a hidrocarburos, en bolsas plásticas de 25 litros de capacidad y de alto micronaje. Las bolsas llenas fueron termoselladas para evitar fugas de la fracción líquida presente en el recorte (Figura 3.1). El material se trasladó al laboratorio dónde se realizó el ensayo en la ciudad de Bariloche, y fue almacenado en lugar fresco y oscuro, a una temperatura aproximada de 7 °C, hasta su utilización.

Los residuos orgánicos (RO) utilizados en la experiencia, fueron generados en el comedor de personal de una empresa localizada en la ciudad de Bariloche, y separados de la fracción inorgánica en origen. Estos residuos consistieron en restos de comidas crudas y cocidas (animales y vegetales) y de papel, proveniente de manteles individuales y servilletas. Los residuos fueron triturados mediante una trituradora eléctrica de cuchillas, con el fin de aumentar su superficie específica expuesta al ataque microbiano (Rynk et al., 1992) y homogeneizar el material. Al material triturado se le agregó un 20 % en volumen de recortes de césped, originados en los jardines de la misma empresa, y luego se volvió a homogeneizar manualmente (Figura 3.2).

Considerando que los recortes de perforación presentan muy poca estructuración y que los residuos orgánicos fueron triturados, se utilizaron chips de madera de pino no tratada, con tamaño promedio entre 1 a 3 cm de largo y 1 a 2 cm de ancho, como agente estructurante para el proceso de compostaje. Los chips fueron recolectados en un aserrado de la zona de Bariloche.

De los tres materiales originales (recortes de perforación, residuos orgánicos triturados y chips de madera), se tomaron muestras representativas para su caracterización química y microbiológica (Secciones 3.3.4 a 3.3.7).



**Figura 3.1.** Recolección de recortes de perforación base oleosa en locación: lengüetas de salida de separador a contenedores (izquierda arriba), colección desde contenedores y pesaje (derecha), y termosellado de bolsas (izquierda abajo).



**Figura 3.2.** Triturado y homogeneización de residuos orgánicos (izquierda y centro); recortes de césped y agente estructurante (chips de madera) (derecha).

### 3.3.2 Diseño experimental y monitoreo

El ensayo fue realizado en reactores elaborados con tambores plásticos de 60 L de capacidad útil con tapa. A cada tambor se le aplicó una capa de 3 cm de poliuretano expandido (para aumentar a aislación térmica, se le agregó un falso fondo, realizado con malla metálica, y una válvula para permitir la separación y colección de lixiviados (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Reactores (60 L) utilizados en la experiencia (izquierda y centro), con falso fondo de malla metálica y sistema de desagote para la separación y colección de lixiviados (derecha).

En cada reactor se dosificaron 30 litros de chips de madera (agente estructurante) más 30 litros de los siguientes sustratos: recortes de perforación base oleosa (0 % RO), dos mezclas con dos proporciones diferentes de RBO y RO en volumen (33 y 75 % de RO), y únicamente residuos orgánicos sin recortes de perforación (100 % RO), como referencia del proceso de compostaje de los residuos orgánicos utilizados.

De esta manera, se formularon 4 tratamientos con 3 repeticiones cada uno (12 reactores), según el porcentaje en volumen de RO aplicado. Previo a la dosificación de las mezclas en cada reactor, se registró el peso de cada componente (recorte de perforación, residuos orgánicos y chips de madera) y la mezcla fue homogeneizada.

La composición y proporciones en volumen, peso húmedo y peso seco, de los cuatro tratamientos dispuestos se detallan en la Tabla 3.1.

Los 12 reactores se dispusieron de manera totalmente aleatoria debajo de un tinglado abierto, instalación localizada en el exterior del laboratorio de trabajo, y sobreelevados a unos 20 cm del piso para permitir la colección de los lixiviados (Figura 3.4). La experiencia se desarrolló por un período de 151 días, entre los meses de diciembre de 2013 a abril de 2014 (verano e inicio del otoño). Se monitoreó y registró diariamente la temperatura ambiente, mediante un termómetro de máxima-mínima ubicado en el sitio de experimentación, y se realizó la medición de la temperatura de la masa en compostaje en el centro de cada reactor, utilizando sensores en lanzas de aproximadamente 40 cm conectados a un *Controlador Lógico Programable* o “PLC”. La temperatura de cada reactor se registró automáticamente cada 30 minutos durante todo el período de duración del ensayo (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Sitio de instalación del ensayo (izquierda arriba y abajo); reactores con lanzas de sensor de temperatura y PLC (derecha arriba); mezcla y reactor con monitoreo automático de temperatura (derecha abajo); y ensayo instalado (centro).

**Tabla 3.1.** Composición en volumen y peso (húmedo y seco) de los tratamientos formulados

Tratamiento % RO <sup>(a)</sup>	Volumen (L)					Peso húmedo (kg)				Peso seco (kg)				
	RBO	RO	AE	Total	Proporción RBO:RO	RBO	RO	AE	Total	RBO	RO	AE	Total	Proporción RBO:RO
0 % RO	30	0	30	60	1:0	37,0 (1)	0	10,7 (0,2)	48 (1)	30,4 (0,8)	0	4,9 (0,1)	35 (0,8)	1:0
33 % RO	20	10	30	60	1:0,5	24,4 (0,7)	5,6 (0,4)	9,4 (1,6)	40 (2)	20,1 (0,5)	1,2 (0,1)	4,3 (0,8)	26 (1)	1:0,1
75 % RO	7,5	22,5	30	60	1:3	8,4 (0,8)	13,1 (0,4)	8,0 (0,5)	27 (0,4)	6,9 (0,7)	2,8 (0,1)	3,7 (0,2)	13 (0,4)	1:0,4
100 % RO	0	30	30	60	0:1	0	17,0 (0,3)	9,3 (0,4)	26 (0,4)	0	3,6 (0,1)	4,3 (0,2)	8 (0,2)	0:1

RO: Residuos orgánicos; RBO: Recortes base oleosa; AE: Agente estructurante (chips de madera).

<sup>(a)</sup>Porcentaje de residuos orgánicos en 30 L de sustrato (mezcla sin agente estructurante).

Los valores de peso son el promedio de tres repeticiones (reactores) por tratamiento. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

Dos veces a tres veces por semana los reactores se destaparon, permitiendo el intercambio gaseoso, y se realizaron volteos manuales para la homogeneización y aireación del material. A los 14, 27 y 74 días desde el inicio del ensayo, se realizó la recolección de los lixiviados acumulados en la base del tambor. Sólo se recolectó una cantidad considerable de lixiviados en el tratamiento con 100 % de RO, mientras que en los sistemas con 0, 33 y 75 % de residuos orgánicos la acumulación de lixiviados fue mínima a nula.

### **3.3.3 Muestreo**

En el inicio de la experiencia (día 0), y a los 4, 8, 15, 30, 61, 94 y 151 días se tomaron dos muestras compuestas de cada reactor, de aproximadamente 150 g cada una. El muestreo se realizó mediante el uso de un barreno helicoidal (tipo “Edelman”) para muestreo de suelos. Cada muestra se conformó de tres submuestras tomadas en el fondo, en la parte media y en la parte superior del reactor.

Una de las muestras fue destinada al análisis y seguimiento de las siguientes variables: pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT), carbono soluble en agua (CSA), nitrógeno Kjeldahl (NKJ: N-orgánico + N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), fósforo extractable y degradación de hidrocarburos (Secciones 3.3.4 y 3.3.5). La otra muestra fue tomada en condiciones estériles, y almacenada a 4°C para su análisis microbiológico, consistente en el recuento de microorganismos heterótrofos y degradadores de hidrocarburos (Sección 3.3.6), y en la medición de la actividad de la enzima deshidrogenasa (Sección 3.3.7).

En cada tiempo de muestreo se determinó el contenido de humedad en cada reactor, secando en estufa 10 g de muestra a 70 °C (a fin de evitar la pérdida de compuestos volátiles) hasta peso constante.

### **3.3.4 Análisis químicos**

Para su análisis químico, las muestras correspondientes a todos los tratamientos y tiempos de muestreo, se dejaron secar al aire y fueron tamizadas por malla de 1 cm

con el objetivo de retirar el material estructurante (chips de madera). En el caso de los materiales originales (recortes de perforación, residuos orgánicos triturados y chips de madera), se utilizaron muestras secadas al aire sin tamizar.

En estas muestras se determinó por triplicado: pH, CE y CSA, en extractos acuosos en relación 1:10, con 2 horas de agitación horizontal de la muestra en tubos de centrifuga a 180 rpm. El pH y la CE se midieron potenciométricamente en esta suspensión, luego de 15 minutos de reposo y sin filtrar. El Carbono Soluble en Agua (CSA) se determinó en forma indirecta por digestión ácida de una alícuota de este extracto mezcla sulfocrómica a 150 °C durante dos horas. El cromo reducido ( $\text{Cr}^{+3}$ ) fue determinado espectrofotométricamente a 600 nm, y la cuantificación de C soluble se realizó por comparación con una curva estándar, utilizando biftalato de potasio como patrón. El P extractable se determinó únicamente en los materiales originales y las muestras iniciales (día 0) y finales (día 151) de cada tratamiento. El fósforo se extrajo en una solución 1:100 de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M. La suspensión se agitó durante 30 minutos a 180 rpm y luego se filtró mediante papel de filtro grado 42 o banda azul. La determinación de P extractable se realizó en esta suspensión por el método colorimétrico de molibdato-ácido ascórbico. La medición se realizó por espectroscopía a 882 nm de longitud de onda (Hue y Liu, 1995; Laos et al., 2002; Marín et al., 2006).

Posteriormente, las muestras fueron trituradas y tamizadas nuevamente por malla de 0,5 mm para la determinación de nitrógeno por semi-micro Kjeldahl (N orgánico + N- $\text{NH}_4$ ) (según lo detallado en la Sección 2.3.6 del presente documento) y del contenido de carbono orgánico total (COT), por el método de Walkley & Black (1934). Este método consiste en la oxidación húmeda de la muestra con dicromato de potasio en medio ácido. El calor desprendido, durante la incorporación de ácido sulfúrico, es el que permite la oxidación parcial del C. En este proceso se produce una reducción del dicromato, equivalente al contenido de C que es oxidado. El dicromato residual es luego titulado con sal ferrosa (Sparks et al., 1996). Estas determinaciones fueron realizadas por el Laboratorio de Aguas y Suelos de la EEA Bariloche del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

### 3.3.5 Identificación y cuantificación de hidrocarburos

El análisis y seguimiento de la degradación de hidrocarburos se realizó sólo en las muestras correspondientes a los tratamientos con recortes de perforación base oleosa: 0, 33 y 75 % RO. Además se realizó la identificación y cuantificación de los hidrocarburos presentes en los tres materiales originales utilizados en las mezclas: RBO, RO y chips de madera.

Los hidrocarburos fueron extraídos mediante sonicación (USEPA-SW846, 2007: Método 3550 c) e identificados y cuantificados por cromatografía gaseosa. Para la extracción se mezclaron, utilizando un vórtex, 5 g de muestra fresca y tamizada (<1 cm) con 5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (calcinado en mufla a 400 °C por 4 horas) y con 15 mL de un sistema de solventes compuesto por acetona y hexano (grado plaguicida) en relación 1:1 (v:v). Las muestras se sonicaron en baño de ultrasonido a 400 W de potencia y 30-40°C por 30 minutos. Luego se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Este procedimiento de extracción se realizó tres veces sucesivas en cada muestra. El solvente del extracto obtenido se evaporó bajo campana a temperatura ambiente y los hidrocarburos fueron resuspendidos en 5 mL de n-hexano (grado plaguicida).

Posteriormente, se realizó un procedimiento de purificación o limpieza de la suspensión en n-hexano, que tuvo el objetivo de retirar del extracto los compuestos orgánicos más polares provenientes de los residuos orgánicos. La purificación se realizó mediante columna de sílica gel (60 -120 mesh), activada al 100% (130 °C por 16 horas) y elución con n-hexano y diclorometano (grado plaguicida) (BC WLAP, 2004).

La identificación y cuantificación de hidrocarburos se realizó en un cromatógrafo gaseoso *Perkin Elmer Clarus 500*, equipado con una columna PE - 5HT (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm) y detector por ionización en llama (FID). Una alícuota de 5 µL del extracto purificado, filtrada mediante filtro de nylon de 0,45 µm, fue inyectada de manera “*splitless*” a 250 °C en el equipo, utilizando Helio a un caudal de 2 mL/min en como gas *carrier*. El programa de temperatura de la columna fue el

siguiente: 4 min a 50 °C, luego 4 °C/min hasta 150 °C, 10 °C/min hasta 280 °C, y luego estable por 13 minutos.

Utilizando soluciones patrón como estándares externos, se realizó la identificación de 18 n-alcanos (NJEPH Aliphatics Frac Check Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA) y de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Calibration Mix #5, Restek, Bellefonte, PA, USA), definidos como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Antizar-Ladislao et al., 2004). Luego se utilizó dibenzotiofeno 98 % y n-hexadecano 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como estándares internos para la cuantificación de los compuestos identificados.

Los alcanos y los HAPs identificados y cuantificados fueron divididos en grupos según su tamaño o peso molecular. En el caso de los alcanos según el número de carbonos en la cadena, y en el caso de los aromáticos, según el número de anillos bencénicos (Tabla 3.2). Se sumaron las concentraciones de los compuestos correspondientes a cada grupo obteniendo así las concentraciones totales según tipo (alcanos o HAPs) y tamaño (alcanos de menos de 10 carbonos, de 10 a 21 carbonos, de 22 a 35 carbonos y de 36 a 40 carbonos; aromáticos de 2 a 3 anillos y de 4 a 6 anillos).

La concentración de los Hidrocarburos Totales (HT) extraíbles fue determinada mediante el área total bajo la curva en el cromatograma de cada muestra, entre los tiempos de retención correspondientes al compuesto de menor peso molecular (n-nonano de 9 carbonos) y el de mayor peso molecular identificado (n-tetracontano de 40 carbonos).

**Tabla 3.2.** Hidrocarburos alcanos y aromáticos policíclicos identificados y cuantificados

<b>n-alcanos</b>	< C10	n-Nonano
	C10-C21	n-Decano; n-Dodecano; n-Tetradecano; n-Hexadecano; n-Octadecano; n-Eicosano; n-Heneicosano.
	C22-C35	n-Docosano; n-Tetracosano; n-Hexacosano; n-Octacosano; n-Triacontano; n-Dotriacontano; n-Tetratriacontano.
	C36-C40	n-Hexatriacontano; n-Octatriacontano; n-Tetracontano.
<b>HAPs</b>	2-3 anillos	Naftaleno; Acenaftileno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluorantreno.
	4-6 anillos	Pireno; Benzo(a)antraceno; Criseno; Benzo(b)fluoranteno; Benzo(k)fluoranteno; Benzo(a)pireno; Indeno(1,2,3-cd)pireno; Dibenzo(a,h)antraceno; Benzo(g,h,i)perileno.

### 3.3.6 Recuento de microorganismos heterótrofos e hidrocarburolíticos cultivables

En muestra fresca sin tamizar de los materiales originales utilizados en las mezclas (RBO, RO y agente estructurante), y de todos los tratamientos en cada tiempo de muestreo, se realizó el recuento de bacterias aerobias heterótrofas y degradadores de hidrocarburos totales, alifáticos y aromáticos, utilizando medios de cultivo selectivos según la fuente de carbono disponible.

En condiciones estériles, se inocularon 10 g de cada muestra en 90 mL de solución fisiológica (0,85 % p/v NaCl) estéril. Esta suspensión se agitó durante 30 minutos a 150 rpm. A partir de esta suspensión (dilución  $10^{-1}$ ) se realizaron diluciones seriadas al décimo en tubos de solución fisiológica. Para el recuento de bacterias

aerobias heterótrofas cultivables, se procedió a la siembra por duplicado de 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución por extensión en superficie, en placa de agar R2A (Tabla 3.3) suplementado con Cicloheximida (antifúngico) al 7 % p/p (Reasoner y Geldreich, 1985). Las placas fueron incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 7 días y luego se procedió al recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los resultados se expresaron por gramo de muestra seca ( $\text{UFC g}^{-1} \text{ms}$ ).

El recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos se realizó por la técnica del Número más Probable (NMP) utilizando un medio mineral líquido estéril, cuya composición se detalla en la Tabla 3.4. El medio mineral fue suplementado con 1 mL por litro de una solución al 0,1 % p/v de resazurina, como indicador de color óxido-reducción, y dosificado en microplacas estériles descartables de 96 pocillos, a razón de 180  $\mu\text{L}$ /pocillo. En cada pocillo se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de gasoil estéril o 5  $\mu\text{L}$  de n-hexadecano estéril como única fuente de C, para el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos totales y degradadoras de alcanos, respectivamente. El recuento bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos se realizó utilizando medio mineral sin suplementar con resazurina y con 10  $\mu\text{L}$  de una solución de HAPs (fenantreno, 10 g; antraceno, 1 g; fluoreno, 1 g; dibenzotiofeno, 1 g; pentano, 1000 ml) como fuente de carbono.

Las microplacas se incubaron durante 21 días  $25 \pm 1$  °C. Para el conteo de bacterias degradadoras de hidrocarburos totales y alcanos, se consideraron positivos aquellos tubos dónde hubo viraje del indicador del color violeta original a color rosado. Entre los pocillos suplementados con la solución de HAPs, se consideraron positivos aquellos que presentaron turbidez y la aparición de un color amarillo a marrón. Los resultados se expresaron por gramo de muestra seca como:  $\text{NMP g}^{-1} \text{ms}$  (Wrenn y Venosa, 1996; Morelli et al., 2005).

**Tabla 3.3.** Composición de medio de cultivo R2A agar para recuento de bacterias aerobias heterótrofas

Medio R2A modificado	
Extracto de Levadura	0,5 g
Peptona	1 g
Glucosa	0,5 g
Almidón	0,5 g
Piruvato	0,3 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	0,3 g
SO <sub>4</sub> Mg	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
Cicloheximida ( <i>Aciditone 7 %</i> )	7 mg/100 mL

**Tabla 3.4.** Composición medio mineral para recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos (sin fuente de C)

Medio mineral líquido	
NaCl	5 g
NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	1 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Agua destilada	1000 ml

### 3.3.7 Actividad de la enzima deshidrogenasa

La medición de la actividad de la enzima deshidrogenasa se realizó mediante la técnica propuesta por Tabatabai (1994), en muestras de los cuatro tratamientos en

cada tiempo de muestreo. Se prepararon por triplicado tubos de ensayo con 1 g de muestra tamizada (< 1 cm) y molida, con el agregado de una pizca de  $\text{CaCO}_3$ , 0,2 mL de solución de TTC (2,3,5-trifenil tetrazolium cloruro) al 3% p/v y 1 mL de agua destilada, más un tubo sin muestra (blanco). Los tubos fueron incubados en la oscuridad a 37 °C por 24 horas. Durante la incubación, el TTC actúa como sustrato y es reducido a TPF (2,3,5-trifenil formazan). Luego de la incubación, el TPF resultante fue extraído mediante agitación en vortex con dos alícuotas de 10 mL de metanol en forma sucesiva. Los extractos fueron combinados, filtrados en papel de filtro común, y llevados a 20 mL de volumen final. La concentración de TPF fue determinada por espectrofotometría a 485 nm, utilizando una curva de calibración con soluciones patrón de TPF en metanol. Los resultados son expresados como  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , considerando la producción de TPF por hora de incubación por cada gramo de muestra seca.

### 3.3.8 Análisis estadístico de los resultados

El conjunto de datos longitudinales (medidas repetidas en el tiempo) de cada variable se modeló utilizando Modelos Lineales Generales (MLG) de efectos mixtos. El método de estimación fue el de “máxima verosimilitud restringida (REML)”. Las medidas de ajuste utilizadas para comparar los distintos modelos propuestos fueron AIC (Criterio de Akaike) y BIC (Criterio Bayesiano de Información). Luego de evaluar distintos efectos fijos y aleatorios, y seleccionar los modelos de mejor ajuste mediante estos criterios, se especificaron como efectos fijos, para todas las variables, el tiempo de tratamiento (días), el porcentaje de residuos orgánicos aplicado (% RO: tratamientos) y la interacción tiempo - % RO.

En la selección de cada modelo se consideraron las correcciones necesarias para la verificación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores. Las diferencias entre los efectos principales especificados fueron analizadas por la prueba LSD de Fisher, con un límite de confianza  $\geq 95\%$ .

Para los grupos de datos no longitudinales, se utilizó la técnica de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, y la prueba post-hoc de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para la separación de medias.

El análisis de la variabilidad existente entre los tratamientos y de la correlación entre las distintas variables, se realizó mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP se aplicó a datos experimentales estandarizados, debido a que los datos difieren en sus unidades. La estandarización se realizó sustrayendo de cada observación la media general y dividiendo el resultado por la desviación estándar. Todos los análisis se realizaron con el programa INFOSTAT v. 2015 (Di Rienzo et al., 2015).

## 3.4 Resultados y Discusión

### 3.4.1 Caracterización química de los materiales originales y de las mezclas a compostar

La caracterización de los materiales de partida es fundamental para conocer no sólo la concentración de el o los contaminantes objetivo, sino también los valores de aquellas variables que pueden afectar la actividad microbiana y condicionar el proceso biodegradativo en las mezclas a compostar. Particularmente, el pH y el contenido de sales y nutrientes en los materiales de partida, así como la potencial disponibilidad de agua y oxígeno, constituyen indicadores importantes sobre la forma en la que podría desarrollarse el proceso. En la Tabla 3.5, se detallan los valores de estas variables medidos en los recortes de perforación, los residuos orgánicos y en el agente estructurante utilizado. En la Tabla 3.6, los resultados obtenidos en las muestras tomadas al inicio del ensayo (0 días) en cada tratamiento.

**Tabla 3.5.** Caracterización química de los materiales originales utilizados en la experiencia

	RBO	RO	AE
Humedad (%)	18	79	54
pH (H <sub>2</sub> O) 1:10	8,5	8,9	6,0
CE 1:10 (dS m <sup>-1</sup> )	5,0	7,1	0,1
CSA (g kg <sup>-1</sup> )	3,0	37,5	1,1
COT (g kg <sup>-1</sup> )	72	393	485
NKj (g kg <sup>-1</sup> )	0,4	31,2	4,2
P extraíble (ug g <sup>-1</sup> )	5	802	64
C/N	195	13	115

RO: Residuos orgánicos; RBO: Recortes base oleosa; AE: Agente estructurante (chips de madera).

C/N: COT/NKj

Todos los valores son expresados en base seca.

**Tabla 3.6.** Caracterización química de las mezclas a compostar

	0 % RO	33 % RO	75 % RO	100 % RO
Humedad (%)	27 (8)	35 (2)	55 (2)	70 (2)
pH (H <sub>2</sub> O) 1:10	8,3 (0,1) a	8,0 (0,2) ab	7,0 (0,2) c	7,6 (0,3) bc
CE 1:10 (dS m <sup>-1</sup> )	3,6 (0,1) a	3,4 (0,5) a	3,6 (0,3) a	3,5 (0,2) a
CSA (g kg <sup>-1</sup> )	2,4 (0,1) c	3,2 (0,3) c	6,0 (0,3) b	21,0 (4,5) a
COT (g kg <sup>-1</sup> )	65 (4) c	69 (6) c	92 (15) b	320 (10) a
NKj (g kg <sup>-1</sup> )	0,3 (0,1) c	0,9 (0,3) c	3,8 (0,6) b	31,0 (5,9) a
P extractable (ug g <sup>-1</sup> )	8 (1) c	18 (3) bc	76 (21) b	804 (176) a
C/N	208 (6)	81 (21)	24 (2)	11 (2)
C/P	8040 (1074)	3763 (383)	1262 (307)	412 (98)

C/N: COT/NKj ; C/P: COT/P ext.

Todos los valores son expresados en base seca y como el promedio de tres repeticiones (reactores) por tratamiento. El desvío estándar se indica entre paréntesis.

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

Tanto en el recorte de perforación base oleosa como en los residuos orgánicos el pH resultó ligeramente alcalino, mientras que en los chips de madera el valor de pH fue ligeramente ácido. No obstante, entre las mezclas a compostar, aquellas con mayor proporción de residuos orgánicos (75 y 100 % RO) presentaron un valor de pH inicial más cercano a la neutralidad, en tanto que las mezclas con 0 y 33 % de RO tuvieron un valor de pH levemente superior a 8. Aun así, el compostaje puede darse en un rango relativamente amplio de pH (5,5 a 9) de los materiales de partida, debido a la capacidad de amortiguación del proceso, y a la variedad de microorganismos presentes, que pueden desarrollarse en distintos rangos de pH (Rynk et al., 1992; Day y Shaw, 2005).

El contenido de sales solubles, reflejado por los valores de conductividad eléctrica, fue elevado tanto en el recorte de perforación como en los residuos orgánicos (5 y 7 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente), considerando que la CE es medida en una dilución de 1:10. En el RBO las sales provienen probablemente de los aditivos agregados a los fluidos de perforación de origen. En el caso de los residuos orgánicos utilizados, el proceso de triturado puede haber contribuido a la liberación de sales solubles y el consecuente incremento del valor de CE (Tognetti et al., 2007 b), así como la sal de mesa agregada en las comidas cocidas. El aporte de sales debido al agente estructurante (chips de madera) es poco significativo. En todas las mezclas a compostar (0 , 33, 75 y 100 % RO), el valor inicial de CE fue de aproximadamente 3,5 dS m<sup>-1</sup>, sin diferencias

significativas entre los tratamientos y menor que el de los componentes originales (RBO y RO). Esto podría atribuirse a un efecto de dilución de la muestra debido a los chips de madera de tamaño menor a 1 cm, que no fueron retenidos durante el tamizado de la muestra.

El valor de carbono orgánico total medido en los tratamientos incluye todos aquellos compuestos carbonados que son susceptibles de ser oxidados en los diferentes procesos, tanto biológicos como químicos, que pueden darse a lo largo del compostaje. Dentro de este parámetro se incluye todo el carbono potencialmente oxidable proveniente de los residuos orgánicos, así como el proveniente de los hidrocarburos. La fracción de este carbono más fácilmente degradable o accesible para los microorganismos sería la soluble en agua (CSA), y por lo tanto esta fracción puede tomarse como un indicador de la actividad microbiana potencial (Marin et al., 2006; Teng et al., 2010; Mazzarino et al., 2012 a).

En el tratamiento con el 100 % de RO, los contenidos de COT y de CSA fueron lógicamente mayores a todos los tratamientos, puesto que es una matriz predominantemente orgánica y que el carbono proveniente de los residuos orgánicos es más lábil que el proveniente de los hidrocarburos. Por otro lado, entre las mezclas con recortes de perforación, los valores de COT y de CSA fueron mayores en el tratamiento con 75 % de RO, respecto de los tratamientos con 0 y 33 % de RO, entre los cuales no hubo diferencias significativas en el contenido de carbono total y soluble en agua. Evidentemente, la aplicación del 75 % de residuos orgánicos en volumen (equivalente a 1:0,4 RBO:RO en peso seco) incrementó el carbono soluble en agua respecto del tratamientos sin residuos orgánicos (0 % RO), pero la proporción en peso de residuos orgánicos incorporada en el tratamiento con el 33 % de RO (1:0,1 RBO:RO), no fue suficiente para incrementar significativamente la cantidad de C fácilmente disponible para los microorganismos, respecto de lo aportado por los hidrocarburos del recorte de perforación.

El bajo contenido de nitrógeno ( $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ ) en el RBO da como resultado una elevada relación C/N (195) que se encuentra distante a los rangos recomendados (C/N: 25 a 35) para un proceso de compostaje satisfactorio. Como se indicó en la introducción de este Capítulo, este desbalance en el contenido de nutrientes puede menguar el desarrollo de la actividad microbiana, indicando la necesidad de

suplementar nutrientes en los recortes de perforación para la estimulación de la biodegradación de los hidrocarburos. El residuo orgánico presenta contenidos de nitrógeno y fósforo que pueden ser suficientes para estimular la biodegradación, pero ello dependerá de la proporción en masa seca de residuo en la mezcla a compostar. En la mezcla con el 75 % de RO la relación C/N ( $24 \pm 2$ ) fue la más cercana a la recomendada, y fue mejor aún que en el tratamiento con el 100 % de RO, donde esta proporción resultó menor a lo sugerido ( $11 \pm 2$ ). Por otro lado, la aplicación del 33 % de RO mejoró la relación C/N inicial respecto el tratamiento sin residuos orgánicos, pero aun así esta relación fue muy elevada ( $81 \pm 21$ ), dado que se considera que una relación C/N  $> 40$  puede implicar una reducción muy importante en la actividad microbiológica por la falta de nitrógeno para la síntesis proteica (Márquez et al., 2008).

A pesar del aporte de fósforo de los residuos orgánicos, el contenido inicial de fósforo disponible (expresado como P extraíble) podría ser deficiente en todos los tratamientos, debido a que la relación C/P dista mucho del rango recomendado para el proceso de compostaje (100-200) en todas las mezclas formuladas. No obstante, el contenido de P constituye un factor menos limitante para el desarrollo del proceso que una adecuada relación C/N (Beaudin et al., 1999; Márquez et al., 2008).

Como se indica en párrafos anteriores, en el valor de COT, con el cuál son calculadas las relaciones C/N y C/P, se incluyen fracciones de C lábiles (proteínas, carbohidratos, lípidos de pequeño tamaño molecular, hidrocarburos de conformación molecular simple, etc.), que pueden ser degradados por la flora microbiana con relativa facilidad, y fracciones más recalcitrantes, como biopolímeros o hidrocarburos de mayor tamaño y complejidad química. Entonces, si se considera el CSA como la fracción de carbono más fácilmente degradable, la proporción de carbono lábil respecto del COT es pequeña (3-7 %) en todos los tratamientos; esto podría afectar la actividad microbiana independientemente de que las razones C/N o C/P indiquen que el balance de nutrientes sea el adecuado. No obstante, esta situación puede cambiar a lo largo del proceso de compostaje, debido a la solubilización y transformación a formas más disponibles de las distintas fracciones iniciales de carbono, como consecuencia del ataque microbiano y las reacciones químicas durante el proceso.

### 3.4.2 Densidad de las mezclas a compostar

La densidad aparente constituye un indicador muy utilizado para evaluar indirectamente la porosidad de las materias primas a compostar y, por lo tanto, la capacidad de alojar aire y asegurar la presencia de oxígeno suficiente para el proceso aeróbico (Day y Shaw, 2005). En lodos y materiales contaminados por hidrocarburos, la utilización de un agente estructurante, como chips de madera o restos de poda, ha demostrado incrementar la difusión de oxígeno en la masa en tratamiento (Marin et al., 2006). Los recortes de perforación suelen ser materiales compuestos por partículas muy finas (arcillas y rocas pulverizadas), por lo cual el riesgo de compactación es muy alto con la consecuente deficiencia en la circulación de oxígeno. Con el fin de optimizar la oxigenación, y considerando que el residuo orgánico fue triturado, se incorporó en todos los reactores utilizados para el ensayo un volumen fijo de chips de madera (30 L), equivalente al volumen de materia prima a compostar (recortes de perforación y/o residuos orgánicos triturados).

Considerando el peso húmedo de la mezcla a compostar, una vez dosificada en cada reactor, y su volumen total (60 L), se calculó la densidad aparente obteniendo los siguientes valores promedio (de las tres repeticiones o tambores): 0,8, 0,7, 0,5 y 0,4 kg L<sup>-1</sup>, para los tratamientos 0, 33, 75 y 100 % de RO, respectivamente. Se observa que conforme se incrementó la cantidad de RO la densidad aparente de la mezcla a compostar disminuyó. Por lo tanto, entre las mezclas que contienen RBO, el grado de porosidad más favorable es observado en el tratamiento con el 75 % de RO. No obstante, en los tratamientos con 0 y 33 % RO, los valores de densidad aparente alcanzados mediante el agregado del estructurante también garantizarían una suficiente circulación de oxígeno, dado que densidades aparentes menores a 0,7 - 0,8 kg L<sup>-1</sup> se consideran adecuadas para el proceso de compostaje (Rynk et al., 1992).

### 3.4.3 Contenido inicial de hidrocarburos según tipo y tamaño molecular

En la Tabla 3.7 se detalla la concentración inicial de hidrocarburos totales y de cada grupo de hidrocarburos identificados y cuantificados (Sección 3.3.5; Tabla

3.2), en las mezclas a compostar que contienen recortes de perforación (tratamientos 0, 33 y 75 % RO), y en los materiales originales (recortes de perforación, residuos orgánicos y chips de madera), con el fin de estimar la contribución de los compuestos extraídos de los residuos orgánicos y del agente estructurante en la concentración inicial de hidrocarburos en cada tratamiento.

En ninguno de los tres materiales originales (RO, BO y AE), fueron detectados alcanos de cadena < 10 carbonos y potencialmente volátiles. Asimismo, no se cuantificaron alcanos de elevado peso molecular (C36-C40) en el recorte de perforación ni en el agente estructurante, pero si en el residuo orgánico en concentración significativa. No obstante, la concentración de hidrocarburos totales, de alcanos y de aromáticos policíclicos (HAPs) en el residuo orgánico (RO) representa un 15-20 % de la concentración de estos compuestos medida en el recorte de perforación. Es llamativa esta concentración de hidrocarburos totales determinada en el residuo orgánico, aproximadamente 10600 mg kg<sup>-1</sup>, que ronda los valores de referencia estipulados por la normativa vigente (ver sección 2.4.1.3), para considerar un suelo o material como residuo peligroso o contaminado por hidrocarburos del petróleo

El petróleo y sus derivados constituyen mezclas complejas de compuestos químicos, lo cual genera que las técnicas analíticas utilizadas comúnmente para su identificación y cuantificación en muestras ambientales, presenten limitaciones que pueden influir en la determinación y comprensión de los resultados (TPHCWG, 1998). Estas limitaciones se acentúan cuando se trata de muestras que contienen materiales contaminados y residuos orgánicos, ya que con los procedimientos analíticos de extracción de hidrocarburos, inevitablemente también se extraen de la muestra compuestos provenientes de los residuos orgánicos (aceites y grasas). Aún con la aplicación de técnicas de remoción de estos compuestos interferentes en una fase sólida de sílica o alúmina (técnicas de “*clean-up*”), la eliminación suele no ser completamente efectiva y una fracción de los mismos pueden ser cuantificados como hidrocarburos del petróleo, generando una sobreestimación de las concentraciones de los compuestos de interés (Rojas-Avelizapa et al., 2006; Laos et al., 2012). Este aspecto debe ser cuidadosamente considerado en el monitoreo del proceso, y en la selección y puesta a punto de la técnica de análisis de hidrocarburos a utilizar.

En este trabajo, el procedimiento de limpieza aplicado en los extractos de las muestras de residuos orgánicos puede no haber sido completamente efectivo y algunos componentes pueden haber superado este pretratamiento, siendo luego identificados y cuantificados como hidrocarburos en el CG-FID. Por ejemplo, en el cromatograma obtenido de la muestra del residuo orgánico se observó una señal prominente en el tiempo de retención correspondiente al estándar n-Hexatriacontano (36 carbonos) (Figura 3.5 a). Esta señal fue también observada en los cromatogramas de las mezclas con 33 y 75 % de RO (Figura 3.5 e y f), pero no en los cromatogramas del agente estructurante utilizado (Figura 3.5 b) o del recorte de perforación (Figura 3.5 c). Esta señal puede corresponder a compuestos o biomoléculas de elevado peso molecular, por ejemplo biopolímeros como la lignina, proveniente de los residuos vegetales, o de los restos de césped incorporados a los residuos orgánicos, que no han sido retenidos en el proceso de purificación (“*clean-up*”) de los extractos.

Aún considerando lo expuesto, la elevada concentración de HAPs en los residuos orgánicos llama particularmente la atención. Zhang et al. (2011), también observaron concentraciones importantes de los 16 HAPs listados como prioritarios por la USEPA, en residuos conformados por restos cocina y de poda. No obstante, el valor cuantificado (aproximadamente  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) puede resultar muy elevado para este tipo de residuos.

Además de las consideraciones sobre la eficiencia del proceso de limpieza de los extractos, podrían considerarse otros factores inherentes al análisis de las muestras, tales como la especificidad de la técnica de identificación y cuantificación utilizada (CG-FID), pero también otras fuentes potenciales de los HAPs presentes en los residuos orgánicos. En este sentido, una alternativa posible podría ser que el muestreo del césped utilizado en la mezcla preparada de residuos orgánicos (20 % en peso; ver sección 3.3.1) fue posterior a la caída de cenizas volcánicas provenientes del Puyehue-Cordón Caulle, acontecida en la ciudad de Bariloche en el mes de Junio del 2011. Es conocido, y ha sido ampliamente referenciado (Wilcke, 2007 y Wang et al., 2017, entre otros), que las erupciones volcánicas constituyen una de las mayores fuentes naturales de hidrocarburos aromáticos policíclicos, por lo cual ello podría ser una posible explicación para un contenido de HAPs relativamente mayor a lo frecuente en un suelo de uso agrícola o residencial del cual provienen los recortes de césped utilizados, no

así para un suelo de uso industrial, según el decreto reglamentario de la Ley Nacional N° 24051.

Los chips utilizados como estructurante provienen de maderas que no fueron tratadas con productos conservantes, por lo cual su contribución en la concentración inicial de hidrocarburos fue poco importante respecto de los residuos orgánicos. Esto constituye un aspecto importante, puesto que es común la utilización de chips o virutas de madera tratada como agentes estructurantes, y se ha demostrado su aporte en el incremento en la concentración de hidrocarburos, lo cual representa una desventaja para el proceso de biorremediación (Semple et al., 2001).

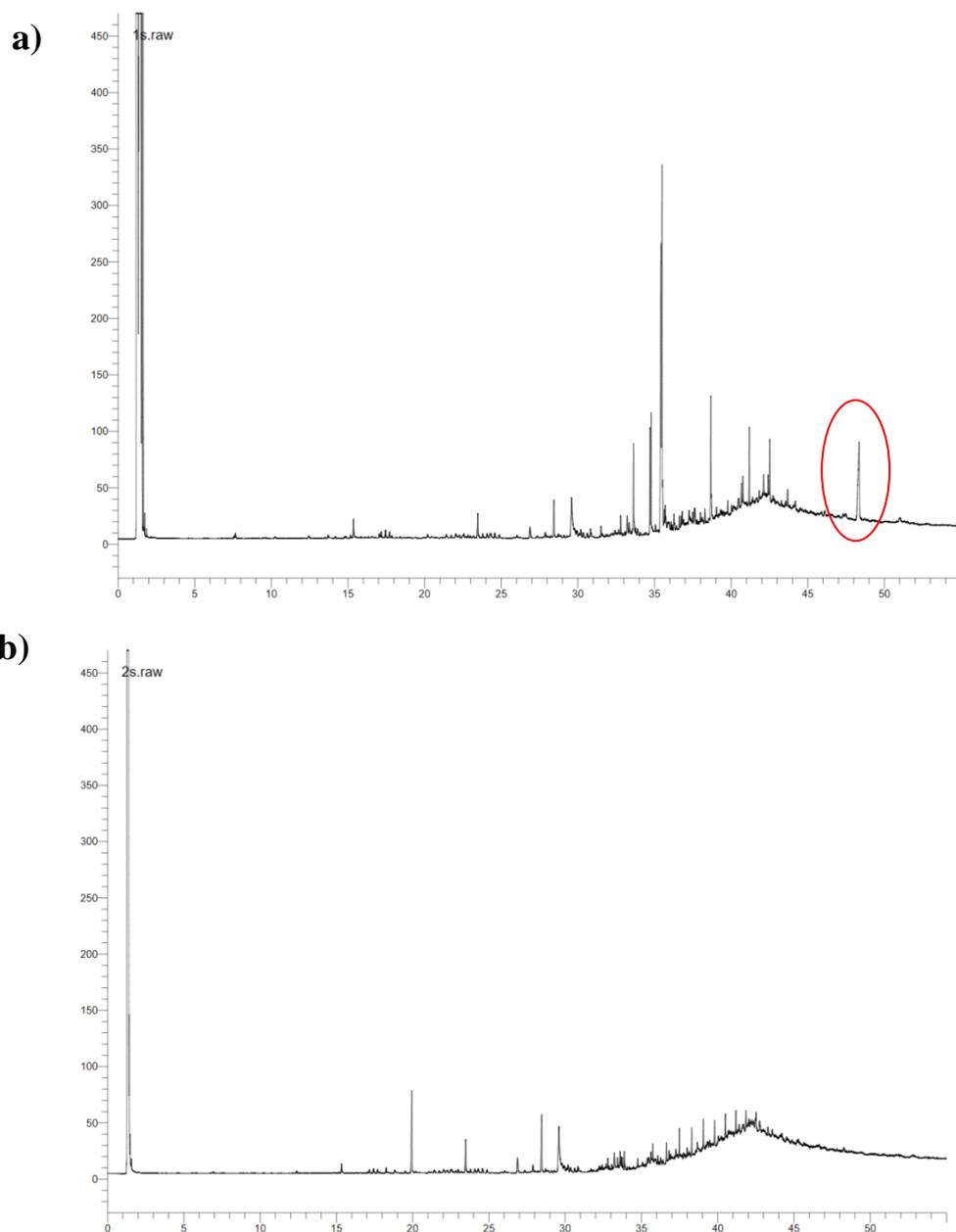
**Tabla 3.7.** Concentración inicial de hidrocarburos en los tratamientos con recortes de perforación (0, 33 y 75 % RO) y en los componentes originales de las mezclas a compostar

Hidrocarburos (mg kg <sup>-1</sup> )	RBO	RO	AE	0 % RO		33 % RO		75 % RO	
Alcanos < C10	nd <sup>(a)</sup>	nd	nd	nd		nd		nd	
Alcanos C10-C21	4577	461	40	2897 (888)	a	2264 (280)	ab	1329 (327)	b
Alcanos C22-C35	2158	182	157	1156 (67)	a	875 (93)	b	696 (56)	b
Alcanos C36-C40	0	419	0	39 (4)	b	42 (12)	ab	146 (44)	a
Alcanos totales	6735	1062	197	4092 (956)	a	3181 (453)	ab	2171 (298)	b
HAPs 2-3anillos	439	33	18	283 (33)	a	191 (45)	b	195 (51)	b
HAPs 4-6anillos	188	86	1,3	97 (25)	a	118 (45)	a	130 (19)	a
HAPS totales	627	119	19,3	380 (9)	a	309 (37)	b	325 (62)	ab
HT	49372	10615	2799	29186 (2827)	a	21840 (3733)	ab	17165 (2794)	b

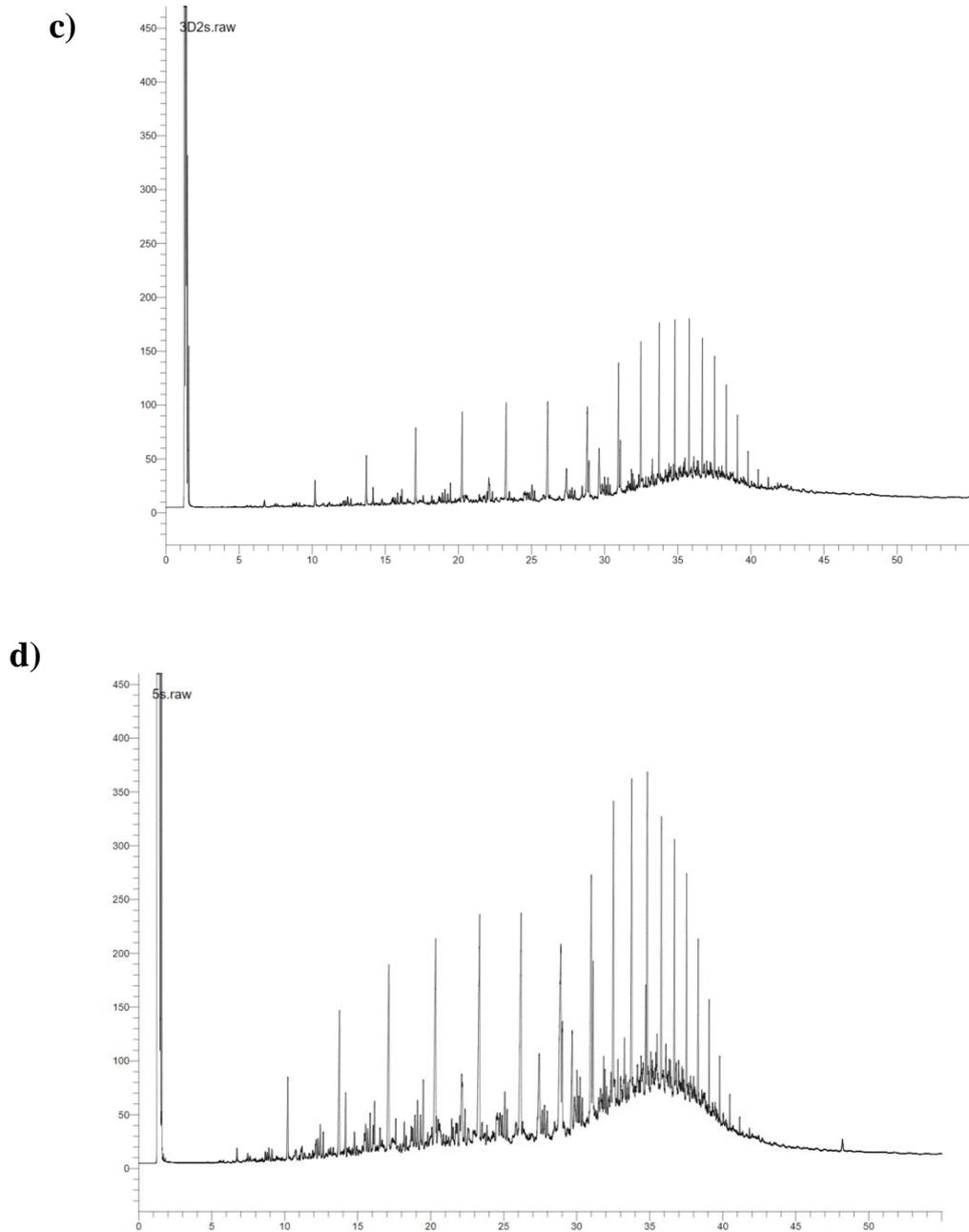
RO: Residuos orgánicos; RBO: Recortes base oleosa; AE: Agente estructurante (chips de madera); HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos; HT: Hidrocarburos totales.

<sup>(a)</sup> nd = no detectable.

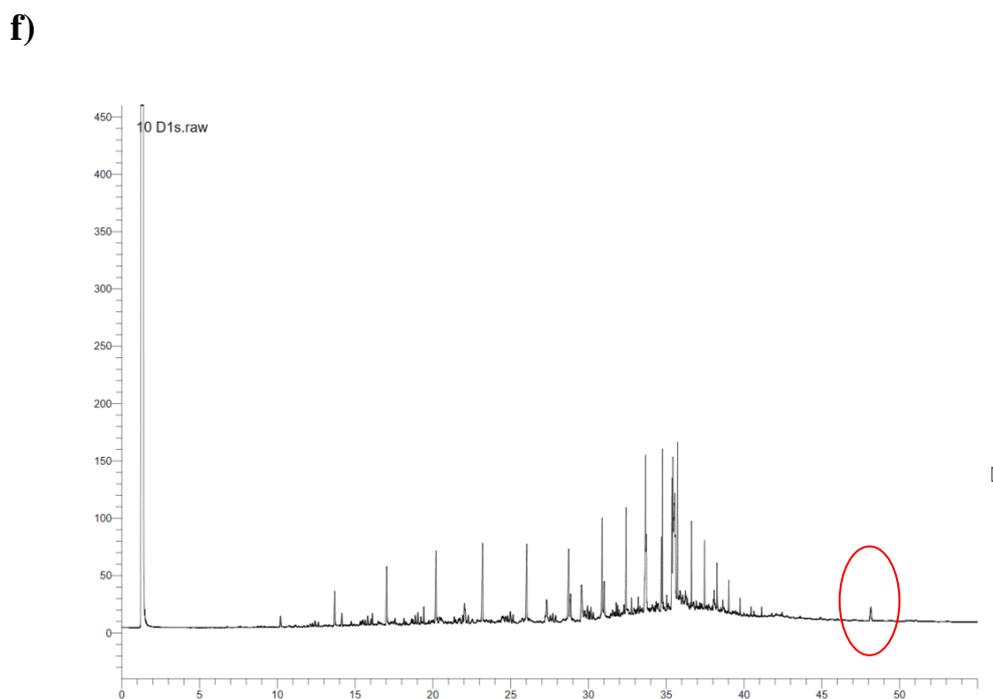
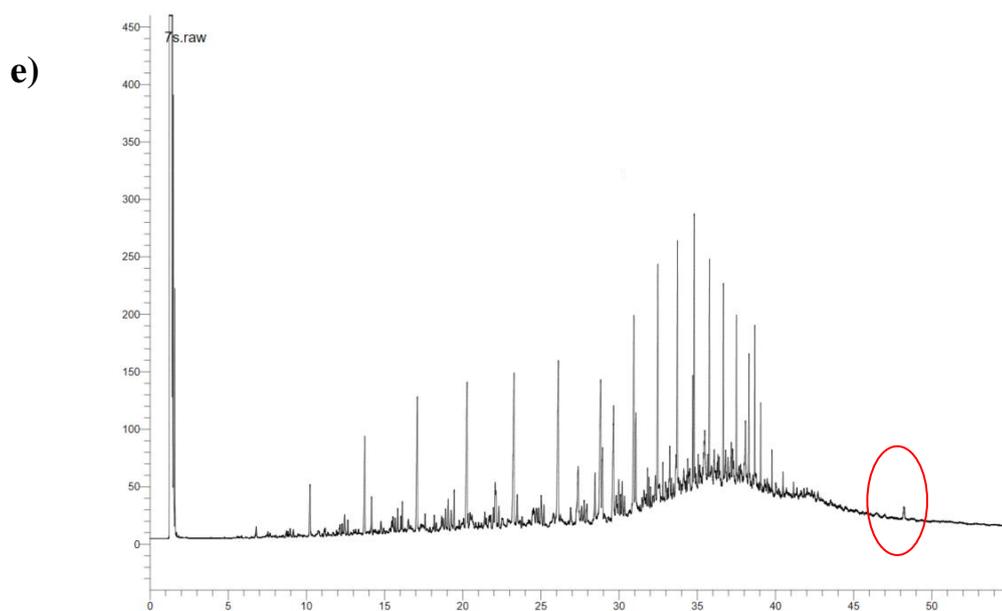
Todos los valores son expresados en base seca y como el promedio de tres repeticiones (reactores) por tratamiento. El desvío estándar se indica entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos.



**Figura 3.5. a y b.** Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras de residuos orgánicos **(a)** y del agente estructurante **(b)**. En la Figura 3.5 a., se indica con un círculo la señal identificada como alcanos de elevado peso molecular (C36-C40).



**Figura 3.6. c y d.** Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras del recorte de perforación base oleosa (extracto diluido al 50 %) (c) y mezcla inicial (“tiempo cero”) del tratamiento 0 % RO (d).



**Figura 3.7. e y f.** Cromatogramas típicos con el perfil de hidrocarburos obtenido de las muestras de las mezclas iniciales (“tiempo cero”) del tratamiento 33 % RO (e) y del tratamiento 75 % RO (f). Se indica con un círculo la señal identificada como alcanos de elevado peso molecular (C36-C40).

En el tratamiento con el 75 % de RO, la concentración inicial de HT fue aproximadamente el 50 % de la concentración de hidrocarburos totales presentes en el tratamiento con 0 % de RO, a pesar de la potencial contribución de los compuestos extraíbles del residuo orgánico en la concentración de hidrocarburos totales. Por otro lado, en el tratamiento con un 33 % de RO la concentración de HT no fue significativamente diferente de la mezcla sin residuos orgánicos.

En el tratamiento 0 % RO, el contenido de alcanos de 10 a 35 carbonos fue mayor a todos los tratamientos, mientras que la concentración de alcanos de elevado peso molecular (36 a 40 C) fue aproximadamente cuatro veces superior en la mezcla con 75 % de RO, ratificando la contribución de estos compuestos por parte de los residuos orgánicos. La fracción aromática más ligera (HAPs de 2 a 3 anillos) fue mayor en el tratamiento 0 % RO, y no hubo diferencias en las concentraciones iniciales de estos compuestos entre los tratamientos con el 33 y el 75% de RO. Sin embargo, la concentración de HAPs de 4 a 6 anillos fue similar para todos los sistemas, mostrando el posible aporte por los residuos orgánicos de HAPs de alto peso molecular o compuestos orgánicos detectados como tales.

Se observa que las concentraciones medidas no son proporcionales a la concentración total que debería obtenerse al calcular el aporte de HT de cada componente de las mezclas (RBO y RO), de acuerdo a su proporción en masa seca. Existe una diferencia de aproximadamente el 40 % entre el cálculo teórico, considerando la concentración de HT y la proporción en masa base seca de cada componente en la mezcla, y el valor efectivamente medido en cada tratamiento al inicio del ensayo. Esto puede atribuirse a un efecto de dilución por la incorporación en la muestra de chips < 1 cm que no fueron retenidos durante el tamizado, al igual que lo observado previamente en los valores de CE en las mezclas iniciales.

Joo et al. (2007) asumen que materiales con más del 3 % de hidrocarburos totales pueden inhibir el desarrollo microbiano, y una dilución debería llevarse a cabo para reducir la concentración de hidrocarburos, en forma previa al tratamiento biológico. Además de las todas las ventajas descritas anteriormente, la aplicación de residuos orgánicos a materiales muy contaminados por hidrocarburos, genera un “efecto de dilución” del contaminante por el aumento en la masa del material a tratar, como se observa en las concentraciones iniciales de los distintos tipos de hidrocarburos

en las mezclas preparadas (Tabla 3.7). Este efecto representa una ventaja de este tipo de estrategias, ya que disminuye la toxicidad dada por una elevada concentración inicial de hidrocarburos en el material, mejorando la eficiencia y posibilidades de éxito del tratamiento (Vallini et al., 2002; Marin et al., 2006).

#### **3.4.4 Evolución de la temperatura y el contenido de humedad durante el proceso de compostaje**

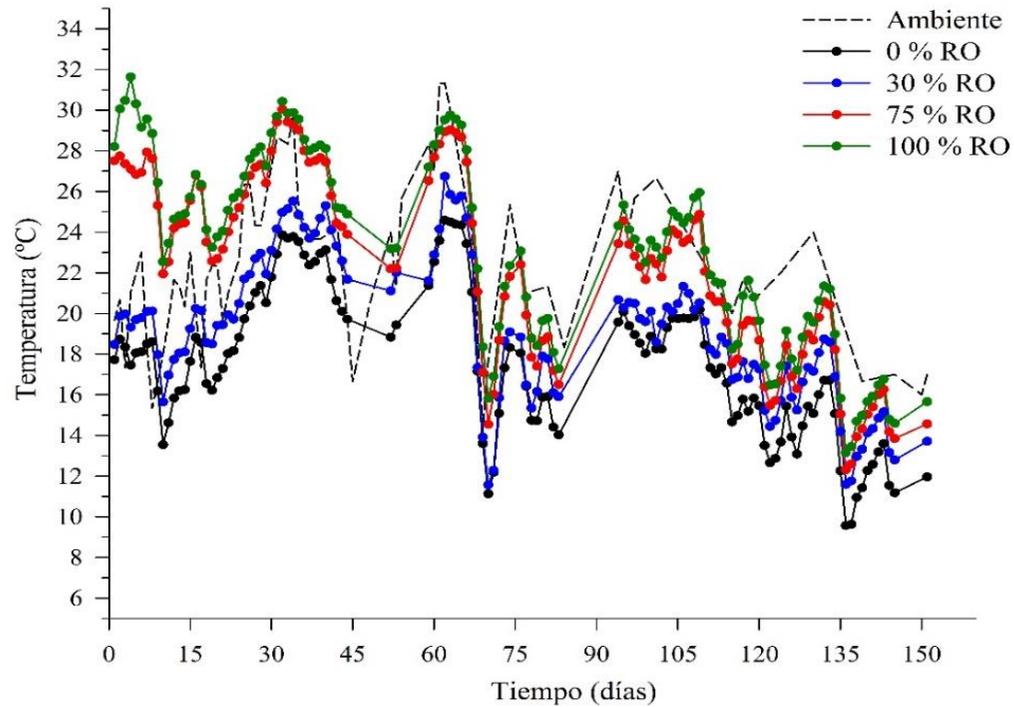
A lo largo del ensayo de compostaje, el perfil de temperatura de todos los tratamientos siguió la evolución de la temperatura ambiente y no se alcanzaron temperaturas termofílicas ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ) en ninguno de los reactores. La temperatura en el interior de todos los reactores se mantuvo entre  $15$  y  $30^{\circ}\text{C}$  durante los primeros 65 días de la experiencia y, a partir de los 70 días, descendió gradualmente hasta los  $10^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose en este rango hasta el final del ensayo (Figura 3.6). En los tratamientos con mayor proporción de residuos orgánicos (75 y 100 % RO), dónde podría esperarse una mayor diferencia respecto de la temperatura ambiente (debido a la mayor actividad microbológica), las temperaturas de los reactores sólo superaron en algunos grados la temperatura exterior en los primeros 15 días de proceso.

En el proceso de compostaje, la evolución de la temperatura está asociada a la generación de calor como consecuencia de las reacciones metabólicas de degradación de la materia orgánica. Sin embargo, factores como el volumen o masa del material en compostaje, el mecanismo de aireación utilizado y la temperatura ambiental, influyen tanto en la generación como en la conservación del calor, delineando el perfil de la temperatura durante el proceso (Márquez et al., 2008). Asimismo, el tipo de carbono o materia orgánica disponible, puede influir considerablemente en la actividad metabólica y por lo tanto en las temperaturas que desarrolle la masa en compostaje. En una matriz con una proporción importante de hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono, alcanzar temperaturas en el rango termofílico por autocalentamiento será menos probable (Marin et al., 2006; Zhang et al., 2011).

Considerando que el perfil de temperaturas fue muy similar entre los tratamientos 0 % RO y 100 % RO, en los cuales la actividad biológica probablemente

fue muy diferente, puede hipotetizarse que el calor generado y conservado por la cantidad de masa en compostaje, no fue el suficiente para alcanzar las temperaturas termofílicas esperadas. Por lo cual, independientemente de la composición de la mezcla, esto podría atribuirse a la falta de “masa crítica” o de oxigenación suficientes.

De esta manera, los efectos de una variación acentuada de la temperatura y, en particular, el efecto de temperaturas termofílicas, no pudieron ser evaluados en la biodegradación de los hidrocarburos presentes en los recortes de perforación. No obstante, en el contexto del compostaje utilizado como técnica de biorremediación, las altas temperaturas ( $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pueden no ser siempre deseables, debido a que la mayor probabilidad de un buen desarrollo de los sistemas enzimáticos y de la comunidad microbiana degradadora es más probable en el rango de temperaturas mesofílicas (25 a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), como se analiza en la sección introductoria de este capítulo.



**Figura 3.8.** Perfil de temperatura por tratamiento. Cada punto representa la media de las tres repeticiones (reactores) de las temperaturas medias diarias registradas en cada reactor. La temperatura ambiente es la media diaria registrada mediante termómetro de máxima-mínima ubicado en el sitio donde se realizó el ensayo.

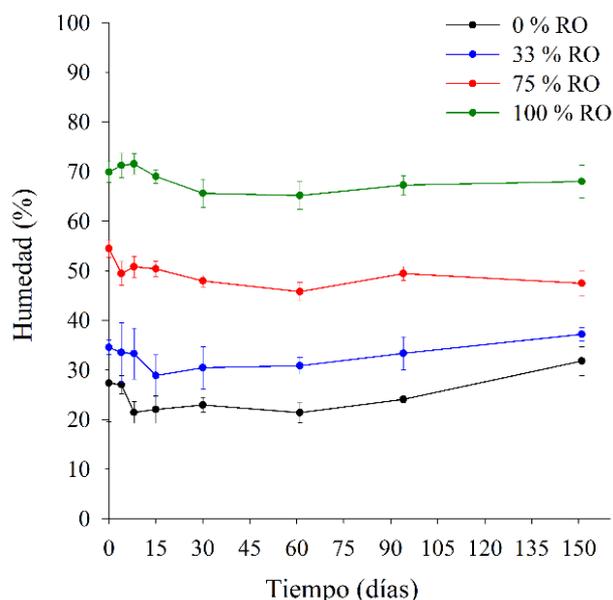
El rango recomendado para el porcentaje de humedad de la masa en compostaje es del 40 al 65 %. La actividad biológica puede inhibirse si el porcentaje de humedad es menor al 15 %, mientras que un contenido de agua mayor al 70-80 % puede afectar la difusión de oxígeno debido a la ocupación del espacio poroso por el agua, originando condiciones de anaerobiosis y la posible emisión de olores. Además, el oxígeno es fundamental para las reacciones bioquímicas del metabolismo aeróbico y la degradación de los hidrocarburos (Rynk et al., 1992; USEPA, 1994; Vallini et al., 2002; Teng et al., 2010). Como se indicó previamente, el aporte y retención de agua por parte de los residuos orgánicos, representa una de las ventajas más importantes de la utilización de la tecnología de compostaje para la biorremediación de materiales contaminados por hidrocarburos.

El contenido de humedad en los reactores fue monitoreado durante el período de experimentación (Figura 3.7). En el tratamiento con 75 % de RO el porcentaje de humedad se mantuvo entre 45 y 55 % a lo largo de todo el ensayo, mientras que en el tratamiento de compostaje de residuos orgánicos (100 % RO) la humedad fluctuó entre el 65 y el 75 %. Así, el porcentaje de humedad en el tratamiento con el 75 % de RO se mantuvo en el rango recomendado, mientras que en el tratamiento con 100 % de RO, se encontró levemente por encima. Ello también podría contribuir a explicar que en este tratamiento no se hayan alcanzado temperaturas termofílicas; no obstante, en estos reactores no se detectaron olores desagradables, indicadores de condiciones de anaerobiosis del proceso.

La aplicación de un 33 % de RO no mejoró el contenido de humedad respecto de no utilizar residuos orgánicos: tanto en el tratamiento 0 % RO como en 33 % RO, el porcentaje de humedad era menor al 40 % al iniciar la experiencia. En ambos tratamientos, se realizaron tres intentos de riego, uno al principio y luego en dos instancias a lo largo de la experiencia. Sin embargo, el agua agregada no fue absorbida por el material, probablemente debido a la hidrofobicidad debida al elevado contenido de hidrocarburos de los recortes de perforación. De esta manera, en estos tratamientos, el porcentaje de humedad se mantuvo por debajo del 40 % durante los 151 días de duración de la experiencia, y la actividad biológica pudo verse afectada por una menor disponibilidad de agua. En una experiencia de compostaje de lodos de refinería de

petróleo, Marín y colaboradores (2006) también indicaron dificultades para el riego de las pilas en compostaje, dada la naturaleza hidrofóbica del material.

Estos resultados muestran que la aplicación de proporciones convenientes de residuos orgánicos a materiales contaminados, puede ajustar los valores de humedad a los recomendados para una actividad biológica adecuada, permitiendo reducir la necesidad de riego durante el tratamiento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este factor depende del tipo o sistema de compostaje que se utilice, ya que en sistemas abiertos, o biopilas sin cobertura, el comportamiento de esta variable puede ser muy diferente debido a la pérdida o ganancia de humedad según las condiciones climáticas.



**Figura 3.9.** Evolución de la humedad gravimétrica durante el proceso de compostaje en todos los tratamientos. Los valores son el promedio de tres repeticiones por tratamiento y las barras verticales indican el desvío estándar.

### 3.4.5 pH y conductividad eléctrica

Durante los primeros 15 días del ensayo, el tratamiento con 100 % de RO (cuyo valor inicial promedio de pH fue de 7,6), presentó un leve acidificación y luego el pH

comenzó a aumentar gradualmente hasta alcanzar valores cercanos a 9 sobre el final del ensayo (Figura 3.8 a). En el tratamiento con el 75 % de RO también se observó una leve reducción inicial del pH y posterior alcalinización, aunque en menor medida que en el tratamiento de compostaje sólo de residuos orgánicos. No obstante, el pH medido en estos reactores se mantuvo dentro de un rango cercano a la neutralidad (7 a 7,5), por debajo del resto de los tratamientos con RBO, a lo largo de todo el proceso. En los tratamientos sin RO y con 33 % RO no hubo cambios significativos del pH durante el período de experimentación, fluctuando entre valores de 7,5 a 8,5 a lo largo del ensayo ( $p > 0,05$ ).

Este comportamiento es común en un proceso de compostaje de residuos orgánicos, dónde se produce una disminución del pH en la primera etapa del proceso, debido a la producción de ácidos orgánicos como resultado de la descomposición biológica de la materia orgánica. Luego, ocurre una progresiva alcalinización del medio, debida a la generación de amoníaco por la degradación de proteínas y liberación de cationes de los tejidos vegetales, entre otros factores (Márquez et al., 2008).

La actividad microbiana tiene su mejor desarrollo en un rango de pH de 6,5 a 8 (Sarkar et al., 2005); sin embargo el compostaje puede evolucionar exitosamente en un rango más amplio de pH (5,5 a 9), debido a la capacidad de amortiguación del proceso y a la variedad de microorganismos presentes, como ya se indicó anteriormente. La evolución del pH durante el ensayo, indicaría que este factor no habría sido limitante para el desarrollo del proceso biooxidativo en ninguno de los tratamientos.

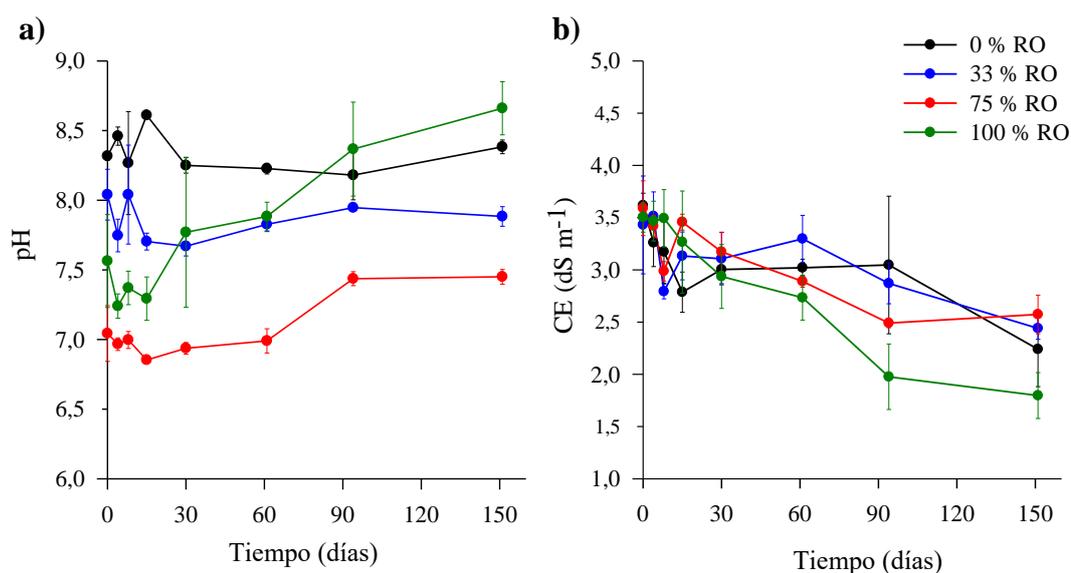
Los recortes de perforación poseen un elevado contenido de sales solubles, debido a los aditivos utilizados en la formulación de los lodos de perforación que los originan. Esta característica puede ser restrictiva para la aplicación de métodos biológicos de tratamiento, debido a que la salinidad reduce la disponibilidad de agua y nutrientes, inhibiendo el crecimiento microbiano y limitando la biodegradación de los hidrocarburos (Rhykerd et al., 1995). Por otra parte, en materiales impregnados por hidrocarburos de petróleo, la hidrofobicidad limita la lixiviación de las sales mediante de la infiltración de agua (Zhang et al., 2008; Chowdhury et al., 2011).

Según se indicó previamente, en los tratamientos que contenían RBO, la conductividad eléctrica media inicial fue de  $3,5 \text{ dS m}^{-1}$ . Este valor se redujo levemente durante el ensayo y finalizó en un promedio de  $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ , sin diferencias significativas entre estos tratamientos (0, 33 y 75 % de RO), tanto al inicio como al final del ensayo ( $p > 0,05$ ) (Figura 3.8 b). En el tratamiento sin recortes de perforación (100 % RO), el valor de CE inicial fue similar a los otros tratamientos, debido probablemente al contenido de sales propio del residuo orgánico triturado. Sin embargo, hubo una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el valor de CE, alcanzando un promedio de  $1,82 \text{ dS m}^{-1}$  al finalizar el ensayo.

En el compostaje, el contenido de sales solubles depende esencialmente de las características de los materiales de partida y en menor medida puede aumentar por la generación de iones debido a la mineralización de la materia orgánica, particularmente en sistemas cerrados. Por el contrario, en sistemas abiertos, tales como biopilas, hileras o reactores con separación de lixiviados, la CE tiende a disminuir durante el proceso debido al lavado de las sales por lixiviación con el agua proveniente de los residuos o aplicada mediante riego (Laos et al. 2002; Cáceres et al., 2006).

Como se describió en la sección 3.3.2, a los 14, 27 y 74 días desde el inicio del ensayo, se colectaron lixiviados en cantidades importantes en los reactores correspondientes al tratamiento 100 % RO, por lo cual la pérdida de sales observada en este tratamiento puede atribuirse a la lixiviación junto con el agua aportada por los residuos. Sin embargo, en los reactores de los tratamientos con recortes de perforación, la leve reducción del contenido de sales puede deberse al lavado durante los riegos realizados, o a la mínima lixiviación junto con alguna fracción del agua contenida en los residuos orgánicos.

La escasa lixiviación en los tratamientos con RBO, podría ser explicada por la naturaleza arcillosa de los recortes de perforación, que pudo contribuir en la absorción del agua libre a pesar la hidrofobicidad debida a los hidrocarburos, o por una tasa de evaporación lo suficientemente elevada como para contrarrestar la generación y percolación de agua libre. Además debe considerarse que en estos tratamientos, la proporción de RO es mucho menor que en el tratamiento con el 100 % de RO, y por lo tanto también es menor el aporte de agua.



**Figura 3.10.** Evolución del (a) pH y (b) conductividad eléctrica (CE) en relación 1:10, en todos los tratamientos. Los valores son el promedio de tres repeticiones por tratamiento y las barras indican la desviación estándar.

### 3.4.6 Disponibilidad de nutrientes

En el tratamiento de compostaje de residuos orgánicos (100 % RO) la evolución del carbono orgánico total mostró un patrón diferente respecto de la fracción de C soluble en agua. En este tratamiento el COT disminuyó en forma significativa ( $p < 0,05$ ) recién luego de 30 días de compostaje, indicando el resultado de la mineralización de la materia orgánica. Sin embargo, a partir de los 60 días de tratamiento, el COT comenzó a aumentar y su concentración final (a los 151 días) fue mayor que al inicio del ensayo ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.9 a). En contraste, el CSA mostró un marcado descenso hasta los 60 días de proceso y luego comenzó a estabilizarse (Figura 3.9 b), de acuerdo a lo esperado en un sistema de compostaje, donde el carbono lábil es rápidamente consumido por los microorganismos durante la etapa de gran actividad biológica inicial, la cual luego disminuye junto con el sustrato disponible (Moreno Casco y Bernat, 2008).

Entre los tratamientos con recortes de perforación, en el tratamiento 75 % RO la evolución del COT mostró un patrón similar a 100 % RO, independientemente del

menor contenido inicial de COT (Figura 3.9 a). No obstante, en 75 % RO la reducción del CSA no fue abrupta en la primera etapa del ensayo, como en el tratamiento sin recortes de perforación (Figura 3.9 b). Ello indicaría una menor actividad biológica en 75 % RO, posiblemente debido no sólo a la menor disponibilidad de C lábil, sino también a otros factores limitantes probablemente debidos al recorte de perforación. Luego de los 60 días de compostaje, el contenido de CSA se mantuvo en niveles superiores respecto al tratamiento 100 % RO ( $p < 0,05$ ), hasta finalizar el ensayo. Esto puede ser producto de metabolitos intermedios de la degradación de hidrocarburos y/u otros productos del metabolismo microbiano solubles en agua, que pudieron favorecer la continuidad de la actividad microbiana.

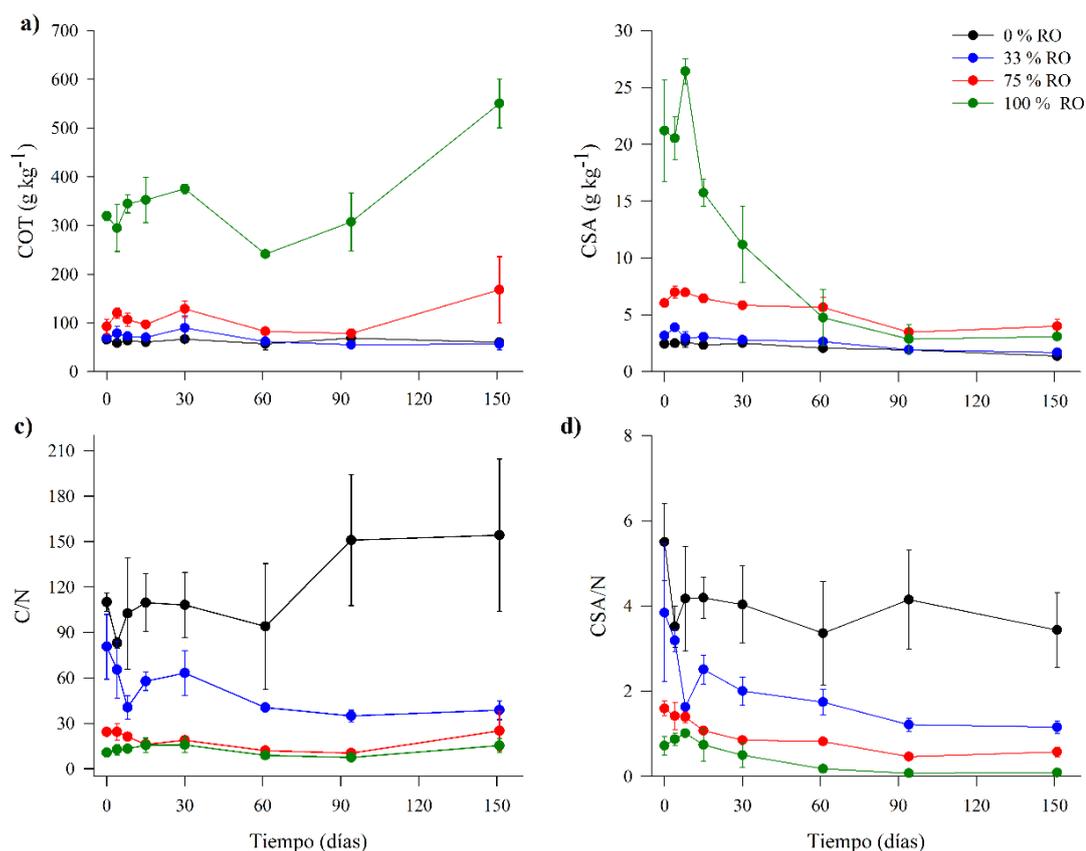
Entre los tratamientos con 0 y 33 % RO no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la evolución de ambos tipos de carbono a largo de todo el ensayo (Figura 3.9 a y b), lo cual indica las similitudes en los tipos de C presentes en estos tratamientos. Particularmente, el hecho de que no se observe una reducción significativa del COT o del CSA mostraría no sólo que las fracciones mayoritarias de carbono son más recalcitrantes, sino también una menor actividad biológica en estos tratamientos. No obstante, considerando que en las muestras tomadas puedan encontrarse chips de madera  $< 1$  cm, parte del COT medido a lo largo del proceso, pudo provenir de los chips no retenidos por el tamizado y no necesariamente de los hidrocarburos.

Este comportamiento muestra la degradabilidad de los distintos tipos de carbono presentes en los materiales en tratamiento. Las fracciones más lábiles, representadas por el CSA, fueron degradadas y mineralizadas en la fase inicial del proceso, mientras que una fracción más recalcitrante, incluida en el COT, no se redujo e incluso aumentó su concentración debido a la reducción de la masa del material (dada por la pérdida de agua y/o pérdida de materia orgánica por mineralización), lo cual puede ser común en un proceso de compostaje (Márquez et al., 2008). Esta fracción más recalcitrante probablemente está formada por moléculas complejas altamente resistentes a la degradación, como la celulosa, hemicelulosa o lignina, provenientes de los residuos vegetales (Huang et al., 2010) o de aquellos chips  $< 1$  cm no retenidos en el tamizado de la muestra.

Para el desarrollo exitoso del proceso de compostaje y, consecuentemente, para la biodegradación de hidrocarburos, el carbono y el nitrógeno no sólo deben estar en forma biodisponible, sino en un balance adecuado. La disponibilidad de estos nutrientes dependerá no sólo de la naturaleza (degradabilidad del carbono) y cantidad de materia orgánica incorporada, sino de la forma en la que se desarrolle el proceso. Como se indicó previamente, para el compostaje se considera que la relación C/N de los materiales de partida es teóricamente óptima en el intervalo de 25 a 35. No obstante, en la biorremediación de suelos y materiales contaminados, donde la fuente de C más abundante son los hidrocarburos, la relación C/N de referencia suele ser de 10 a 20.

Durante el compostaje, la relación C/N debiera disminuir debido a la mineralización de la materia orgánica, y pérdida de parte del C en forma de CO<sub>2</sub>, y a que gran parte del N es reutilizado luego de liberado desde la biomasa muerta (Day y Shaw, 2005). Sin embargo, si el carbono está poco biodisponible o el N es deficiente, la actividad biológica será menor, el proceso de degradación más lento y la relación C/N puede no mostrar cambios significativos. Por el contrario, si el nitrógeno se encuentra en exceso ( $C/N \approx 2$ ) el proceso será más activo y rápido, pero se agotaría rápidamente la reserva de oxígeno generando condiciones anóxicas con el riesgo de la pérdida N en forma amoniacal, que además puede resultar tóxico (Vallini et al., 2002; Sarkar et al., 2005)

En este trabajo, la evolución de la relación C/N (COT/NKJ) durante el ensayo respondió a la degradabilidad de la fuente de C y, lógicamente, a la cantidad de nitrógeno disponibles en cada sistema. En ninguno de los cuatro tratamientos pudieron apreciarse cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la razón C/N a lo largo de los 151 días de experimentación (Figura 3.9 c). Sin embargo, la relación entre la fracción más degradable de carbono (CSA) y el nitrógeno (CSA/NKj) si se redujo en los tres tratamientos con residuos orgánicos (33, 75 y 100 % RO), y no mostró cambios en el tratamiento sin RO (Figura 3.9 d). Esta diferencia en la evolución de las relaciones C/N, responde a la proporción de C lábil en los distintos tratamientos, el cuál fue aportado principalmente por el residuo orgánico. Por otro lado, dadas las proporciones de C más y menos lábil en las muestras analizadas, la evolución de esta relación (CSA/NKj) puede constituir un indicador más representativo de la actividad microbiana en cada sistema estudiado, que la relación COT/NKj.



**Figura 3.11.** Evolución de: **(a)** carbono orgánico total (COT), **(b)** carbono soluble en agua (CSA), **(c)** relación C/N (COT/NKj) y **(d)** relación CSA/N, en todos los tratamientos durante el ensayo. Los valores son el promedio de tres réplicas por tratamiento y son expresados en base seca. Las barras indican el desvío estándar.

### 3.4.7 Biodegradación de hidrocarburos

#### 3.4.7.1 Porcentaje de remoción

En los 151 días de ensayo, el mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos totales (HT) fue observado en el tratamiento con el 75 % RO (82 %), mientras que entre los tratamientos sin residuos orgánicos y con el 33 % de RO no hubo diferencias significativas, alcanzando el 50 % y el 38 % de degradación de HT, respectivamente (Figura 3.10 a). La remoción de alcanos y HAPs totales presentó una tendencia similar a los HT. La degradación de alcanos fue del 96 % en el tratamiento con la mayor proporción de residuos orgánicos (75 % RO), y no hubo diferencias en

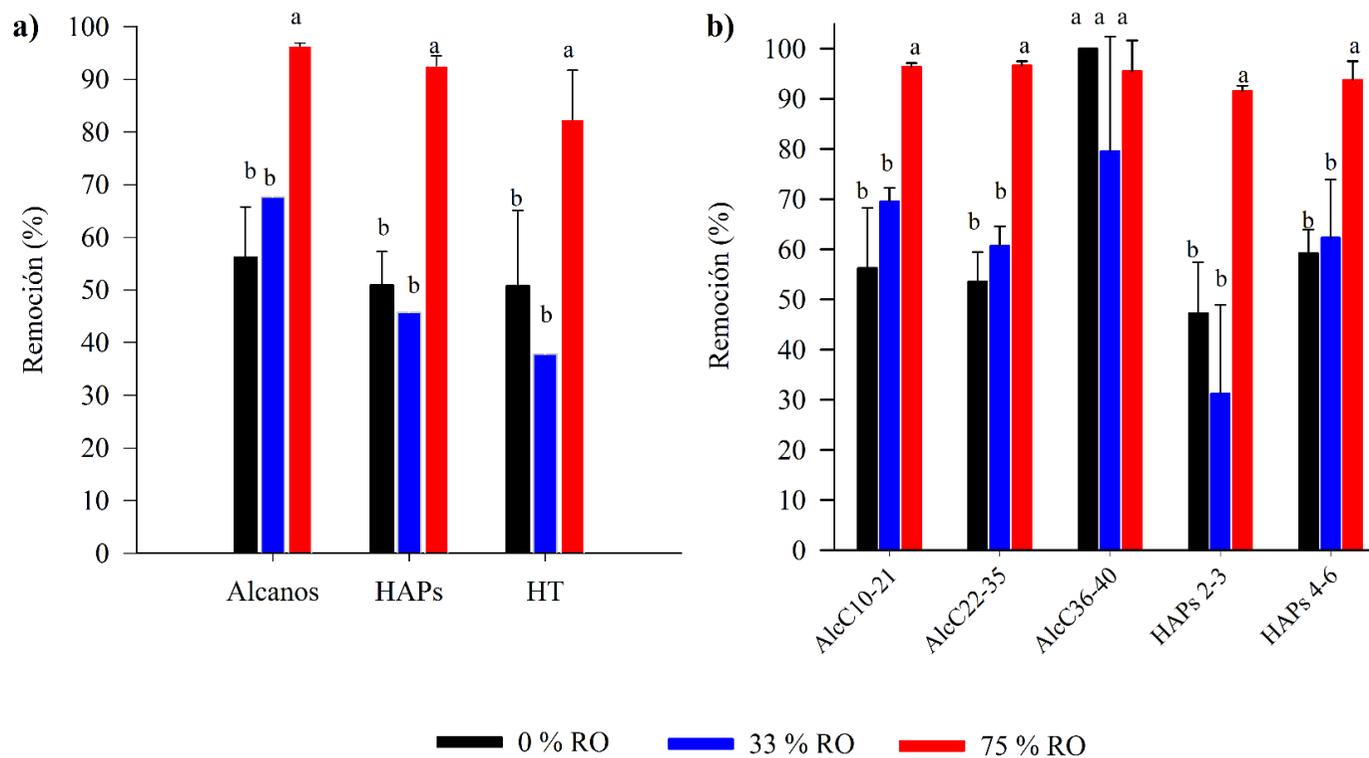
el porcentaje de degradación entre los tratamientos con 0 y 33 % de RO (56 % y 68 %, respectivamente). La degradación de HAPs, compuestos usualmente muy recalcitrantes, fue muy elevada en el tratamiento con el 75 % de RO (93 %), y estuvo entre el 45 y 50 % en los tratamientos sin residuos orgánicos y con el 33 % de RO.

En la Tabla 3.8 se detallan los valores de concentración inicial (día 0) y al finalizar el ensayo de compostaje (151 días), para cada grupo de hidrocarburos analizados (alcanos, HAPs y totales) por tratamiento (0, 33 y 75 % de RO).

El efecto de la proporción de residuos orgánicos en la biodegradación de hidrocarburos constituye un aspecto controversial en el compostaje de materiales contaminados. La comparación entre los diferentes estudios reportados es compleja, debido a los distintos residuos orgánicos utilizados en el compostaje, las escalas de ensayo, el tipo y concentración del contaminante, y las técnicas analíticas utilizadas para su determinación. Además, en muchos casos las proporciones utilizadas en las mezclas de partida se informan sin considerar el contenido de humedad de los residuos orgánicos, el cual es muy variable, haciendo aún más difícil la comparación y unificación de criterios en este sentido.

No obstante lo antedicho, algunos autores previenen sobre el riesgo de que mientras mayores son las proporciones de residuos orgánicos aplicadas, la biodegradación podría volverse menos eficiente, debido a la preferencia de la microflora por el carbono fácilmente disponible, aportado por el residuo orgánico, respecto del hidrocarburo. Por otra parte, pequeñas cantidades de residuos orgánicos pueden no ser suficientes para activar el proceso oxidativo y diferenciarse de un proceso de biorremediación por otras técnicas sin el agregado de una enmienda orgánica (Namkoong et al., 2002; Antizar-Ladislao et al., 2005; Joo et al., 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden parcialmente con estos autores, puesto que la aplicación de una proporción de 1:0,1 recorte:residuo en peso seco (33 % RO), no fue suficiente para favorecer la biodegradación de los hidrocarburos presentes en los recortes de perforación respecto de no aplicar residuos orgánicos (tratamiento 0 % RO). No obstante, se alcanzaron porcentajes de degradación muy elevados (> 80 %) de todos los tipos de hidrocarburos (lineales y aromáticos) al aplicar un 75 % de residuos orgánicos en volumen al recorte de perforación, que es equivalente a una proporción de 1:0,4 (RBO:RO) en peso seco.



**Figura 3.12.** Porcentaje de remoción de hidrocarburos por tratamiento: **(a)** hidrocarburos totales (HT), alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) totales; **(b)** alcanos y HAPs agrupados por tamaño molecular, según número de carbonos o de anillos, respectivamente. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos.

**Tabla 3.8.** Concentración inicial (0 días) y final (151 días) de hidrocarburos en los tratamientos con recortes de perforación (0, 33 y 75 % RO)

	0 % RO		33 % RO		75 % RO	
	0 días	151 días	0 días	151 días	0 días	151 días
Alcanos totales (mg kg <sup>-1</sup> )	4081 (956)	1731 (192)	3228 (453)	1048 (170)	2171 (298)	78 (5)
HAPS totales (mg kg <sup>-1</sup> )	380 (9)	186 (21)	309 (37)	167 (15)	325 (62)	24 (4)
HT (mg kg <sup>-1</sup> )	29186 (2827)	14406 (4499)	21840 (2639)	13298 (1944)	17165 (2794)	2852 (1185)

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos; HT: Hidrocarburos totales.

Todos los valores son expresados en base seca y como el promedio de tres repeticiones (reactores) por tratamiento. El desvío estándar se indica entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos.

Al analizar más específicamente los porcentajes de remoción según el tipo y tamaño molecular de los hidrocarburos, la tendencia de los resultados entre los tratamientos es similar a la observada para HT, alcanos y HAPs totales (Figura 3.10 a). La remoción de hidrocarburos lineales desde 10 hasta 35 carbonos, fue significativamente mayor en el tratamiento con el 75 % de RO, mientras que no hubo diferencias entre el tratamiento sin residuos orgánicos y con el 33 % de RO. De igual manera ocurrió con ambos tipos de HAPs (2-3 y 4-6 anillos). No obstante, la remoción de los alcanos de elevado peso molecular (36 a 40 C), tuvo un comportamiento diferente. Estos compuestos, que deberían ser hipotéticamente más recalcitrantes por su baja solubilidad en agua, fueron ampliamente removidos (> 80 %) y de manera similar en los tres tratamientos. Esto puede ser atribuido al error propio de la medición de pequeñas concentraciones de estos compuestos en los tratamientos con 0 y 33 % de RO, debido a que los mismos parecen provenir principalmente de los residuos orgánicos utilizados, como se muestra en la sección 3.4.3.

Entre los factores que regulan la eficiencia en la degradación y/o remoción de hidrocarburos de suelos y materiales contaminados, la conformación y tamaño molecular de los hidrocarburos es relevante, como se indica en la Introducción de este capítulo. En el presente trabajo, en el tratamiento con el 75 % de residuos orgánicos se alcanzaron porcentajes de remoción mayores al 90 %, tanto para los aromáticos livianos de 2-3 anillos (92 %), como para los más recalcitrantes de 4 a 6 anillos (94 %).

En ensayos de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compostaje con residuos de cocina y jardín, Antizar Ladislao et al. (2005 a y b) observaron un 71 a 77 % de reducción promedio de HAPs de 4 a 6 anillos, y Zhang et al., (2011) midieron un porcentaje de degradación del 42 % al 65 % de HAPs de elevado peso molecular. Por otro lado, Moretto et al. (2005) observaron una disminución del 70 % de los HAPs de un suelo contaminado con residuos de hollín y muy alcalino, luego de 130 días de compostaje con biosólidos. Entre las escasas experiencias de biorremediación por compostaje de recortes de perforación base oleosa halladas, Ayotamuno y colaboradores (2009) midieron una reducción de prácticamente el 100 % de HAPs de 2-3 anillos y del 82% de aromáticos de 4-6 anillos, en el compostaje de recortes de perforación con suelo fértil y estiércol de ave.

En varios casos, la degradación de muchos de los HAPs de elevado peso molecular (> 4 anillos bencénicos) es atribuida a procesos de cometabolismo, dado que no siempre pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de C y energía (Van Hamme et al., 2003; Couling et al., 2010; Teng et al., 2010). Por lo tanto, a través del incremento de la actividad microbiana y enzimática, debido a la incorporación de residuos orgánicos, se pueden favorecer estos procesos cometabólicos y, consecuentemente, la degradación de estos compuestos recalcitrantes durante el compostaje.

Cabe aclarar que, debido a las condiciones experimentales y a la escala del ensayo, no se cuantificaron las posibles pérdidas de hidrocarburos por volatilización a lo largo de la experiencia. Sin embargo, varios autores reportaron que las pérdidas abióticas de hidrocarburos debido a la volatilización son poco significativas (2 al 5 % de la concentración inicial) respecto de la degradación biológica de hidrocarburos en experiencias de biorremediación por compostaje (Beaudin et al., 1999; Namkoong et al., 2002; Hesnawi y McCartney, 2006; Sayara et al., 2010 b)

#### **3.4.7.2 Velocidad de degradación**

En la optimización de estrategias de biorremediación de materiales contaminados con hidrocarburos, el tiempo que lleve alcanzar los objetivos de remediación determinará la duración del tratamiento. Lógicamente, mientras mayor sea la velocidad o tasa de degradación alcanzada (es decir, mayor reducción en la concentración de los hidrocarburos por unidad de tiempo) menor será la duración del tratamiento. Este factor es muy importante puesto que se encuentra ampliamente relacionado a los costos, logística y factibilidad de la estrategia de remediación utilizada. La reducción del tiempo de tratamiento implica menores costos relacionados al uso de maquinarias y otros recursos. Por ejemplo, las áreas destinadas al tratamiento de estos materiales son restringidas, por lo tanto cuanto antes sea liberado el espacio antes podrá iniciarse el tratamiento de un nuevo lote del material contaminado. Además, la duración suele considerarse una de las posibles desventajas de los métodos biológicos de tratamiento, frente a otras técnicas como las fisicoquímicas (Boopathy, 2000).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la proporción de residuos orgánicos en la velocidad de degradación de los hidrocarburos presentes en los recortes de perforación, se modeló la concentración de hidrocarburos totales y de la suma de alcanos y de HAPs en función del tiempo, en los tres tratamientos con RBO. Para ello se utilizó una función logística de tres parámetros de acuerdo a lo propuesto por Ibarrolaza et al., (2011). Esta función es representada por la siguiente ecuación:

$$C = \frac{C_0}{1 + \left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^b}$$

Donde:

**C** es la concentración de HT, alcanos o HAPs totales en  $\text{mg kg}^{-1}$ ,

**C<sub>0</sub>** es la concentración inicial de cada tipo de hidrocarburos en  $\text{mg kg}^{-1}$ ,

**t** es el tiempo en días,

**t<sub>1/2</sub>** es el tiempo de vida media de cada grupo de hidrocarburos (en días),

**b** es el parámetro de la pendiente.

El ajuste de la ecuación se obtuvo mediante una regresión no lineal utilizando Sigma Plot V10, *Systat Software Inc.* La Tabla 3.8 muestra los parámetros de ajuste del modelo obtenido para cada tratamiento. La derivación de la ecuación estimada mediante el modelo de degradación utilizado, permitió la aproximación de la tasa o velocidad de degradación de cada grupo de hidrocarburos.

**Tabla 3.9.** Parámetros de ajuste del modelo de biodegradación de hidrocarburos totales, alcanos y HAPs para cada tratamiento

	Alcanos Totales			HAPs Totales			Hidrocarburos Totales		
	b ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ )	t <sub>1/2</sub> (días)	r	b ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ )	t <sub>1/2</sub> (días)	r	b ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ )	t <sub>1/2</sub> (días)	r
0% RO	5,8 ± 0,7	144 ± 3	0,991	sa <sup>(a)</sup>	sa	sa	6 ± 1	148 ± 5	0,9723
33% RO	5 ± 1	123 ± 9	0,941	3,6 ± 0,5	107 ± 4	0,9857	4 ± 2	143 ± 15	0,8819
75% RO	1,0 ± 0,3	16 ± 6	0,977	1,0 ± 0,3	25 ± 7	0,9584	13 ± 7	133 ± 9	0,9931

b: parametro de pendiente; t<sub>1/2</sub>: vida media de los hidrocarburos; r: coeficiente de correlación.

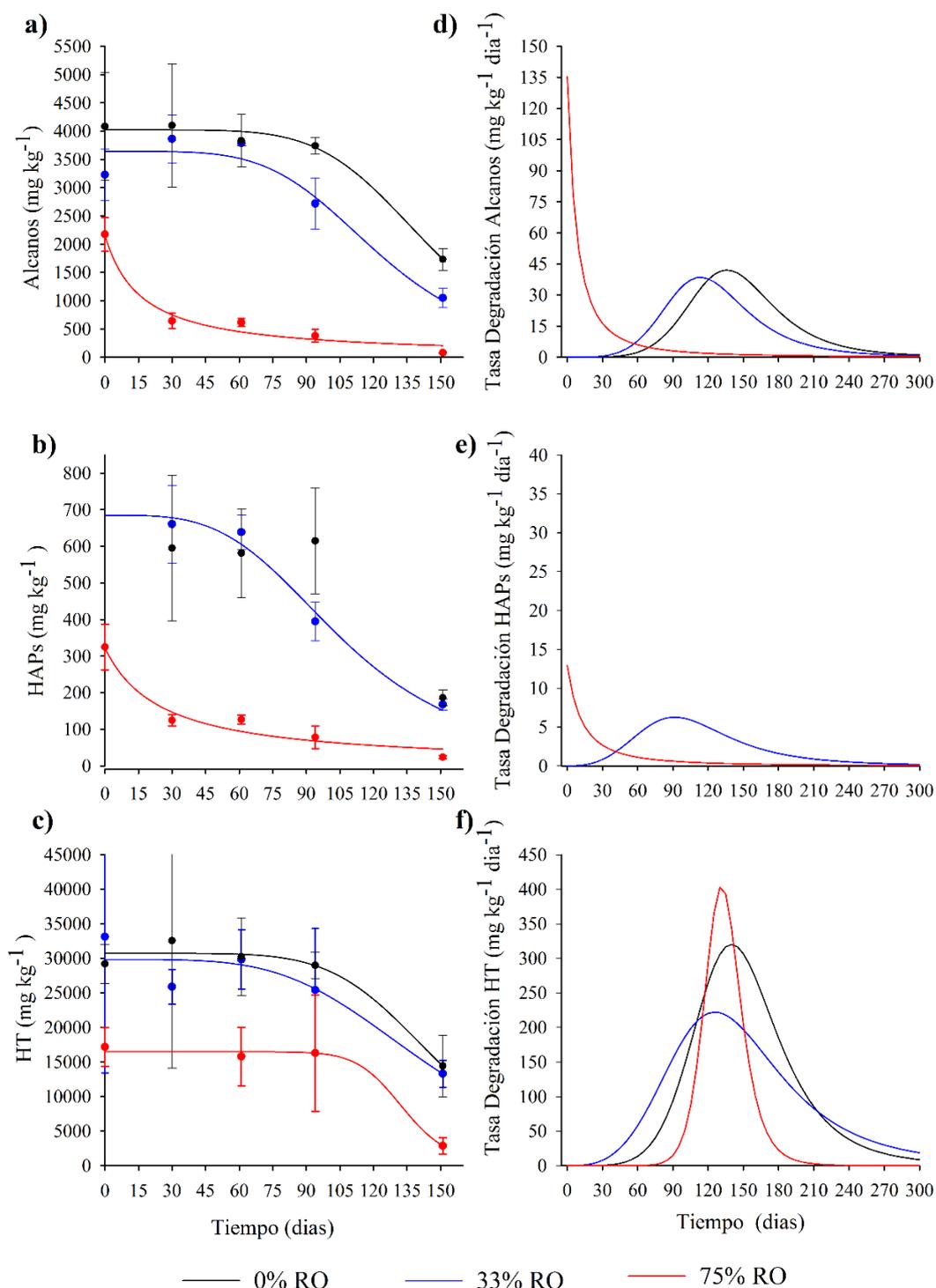
<sup>(a)</sup> sa (sin ajuste): En el tratamiento 0% RO los valores de HAPs totales no pudieron ser ajustados al modelo

Para una primera aproximación a la velocidad de degradación de los hidrocarburos en cada tratamiento, puede analizarse el “tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ )”. Este parámetro indica el período de tiempo necesario para que la concentración del contaminante alcance el 50 % de su concentración inicial. De acuerdo a lo indicado en la Tabla 3.8, la vida media de los alcanos fue aproximadamente 10 veces menor en el tratamiento con el 75 % de RO respecto de los tratamientos con 0 y 33% de RO, entre los cuales hubo sólo entre 10 y 15 días de diferencia. Por otro lado, la vida media de los HAPs en el tratamiento 75 % RO fue cuatro veces menor que en el tratamiento con 33 % de RO. Estos resultados se corresponden con las diferencias observadas entre los tratamientos indicadas por el porcentaje de degradación ( $75 \% RO > 33\% RO \approx 0\% RO$ ) de hidrocarburos. Los datos correspondientes a la concentración de HAPs en el tratamiento sin residuos orgánicos (0 % RO) no pudieron ajustarse según el modelo utilizado, debido a la amplia variabilidad intrínseca de la serie de datos.

En la Figura 3.11, pueden observarse los gráficos correspondientes a la evolución en la concentración (Figura 3.11: a, b y c) y de la tasa de degradación de hidrocarburos (según el modelo de degradación propuesto) en función del tiempo (Figura 3.11: d, e y f), para los tres grupos de hidrocarburos analizados (HT, alcanos y HAPs totales) en cada tratamiento. En estos gráficos pueden observarse las diferencias en los patrones de degradación entre los tratamientos para cada tipo de hidrocarburos. A primera vista, la principal diferencia entre los tratamientos radica en la existencia o no de una fase de retraso o “*fase lag*” en la reducción de la concentración de hidrocarburos.

En los procesos de biorremediación la “*fase lag*” o “fase de latencia”, representa el período de tiempo necesario para la adaptación de la comunidad microbiana a un nuevo ambiente o a la presencia del contaminante. Aunque este proceso aun no es totalmente comprendido, se considera que es controlado principalmente por los siguientes factores: la capacidad de utilizar los sustratos disponibles en el medio como fuente de carbono y energía, y/o desarrollar nuevas poblaciones con capacidades metabólicas específicas para biodegradar los compuestos de interés; el tipo y concentración del contaminante, que influirá en la toxicidad del medio; las interacciones con la flora microbiana nativa; y el tiempo y tipo de interacción entre y la matriz y el contaminante, que regulará su biodisponibilidad

(Huesemann et al., 2004; Couling et al., 2010). La existencia y duración de la fase de latencia, en conjunto con la velocidad con que serán degradados o transformados los contaminantes una vez establecida la comunidad degradadora, determinarán el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar los valores objetivo de remediación.



**Figura 3.13.** Concentración (izquierda) y tasa de remoción de hidrocarburos (derecha) en función del tiempo por tipo de hidrocarburos: **(a, d)** alcanos totales, **(b,e)** HAPs totales, e **(c,f)** hidrocarburos totales (HT). Los valores de concentración son el promedio de tres réplicas (reactores) por tratamiento y se expresan en base seca. Las barras verticales indican el desvío estándar.

En el tratamiento 75 % RO no se produjo una fase de latencia y la reducción de la concentración de alcanos y de aromáticos comenzó en forma inmediata (Figura 3.11, a y b). La mayor tasa de degradación en este tratamiento se observó en los primeros 15-30 días, en los cuales la degradación de alcanos fue aproximadamente 10 veces más rápida que la de HAPs, como puede esperarse debido a la mayor biodegradabilidad de los primeros (Figura 3.11, d y e). Después de este período, la tasa de degradación disminuye manteniéndose prácticamente constante hasta la finalización del ensayo, para ambos tipos de hidrocarburos. Esto puede deberse a la reducción de sustrato y nutrientes, que ya fueron consumidos durante la primera fase de alta actividad biológica.

Por el contrario, en el tratamiento con el 33 % de RO, la degradación de alcanos y HAPs comenzó a ser notable después de alrededor de 60 días de compostaje, mientras que en el tratamiento sin residuos orgánicos (0 % RO), la degradación de ambos tipos de hidrocarburos puede notarse recién luego de casi 90 días de tratamiento (Figura 3.11, a y b). Por lo tanto, la velocidad de degradación de alcanos comienza a crecer luego de 60 y de casi 90 días para los tratamientos con el 33 % y con el 0 % de RO, respectivamente (Figura 3.11 d). Por otro lado, en 33 % RO la degradación de HAPs se acelera recién después de 30 días de ensayo (Figura 3.11 e). De la misma manera que en el tratamiento con 75 % de RO, en 33 % RO la velocidad de degradación máxima de alcanos (alcanzada alrededor de los 100 días) es aproximadamente 10 veces mayor que la de los hidrocarburos poliaromáticos.

Los gráficos que muestran la evolución de la concentración de alcanos, HAPs e hidrocarburos totales en función del tiempo (Figuras 3.11 a, b y c), corresponden a un ajuste de los datos realizado por regresión no lineal. Los datos correspondientes al tiempo cero (expresados en la Tabla 3.7) quedaron por debajo de la proyección o extrapolación del modelo. No obstante, el aumento de la concentración de HAPs, observado entre el tiempo cero y los 30 días de tratamiento, podría deberse a la pérdida de masa inicial por pérdida de agua, característica de un proceso de compostaje. Es común, en la fase inicial de un proceso de compostaje, el incremento en la concentración de sustancias poco solubles como los HAPs.

Estos resultados muestran el efecto de la proporción de residuos orgánicos en los factores que regulan la adaptación de la comunidad microbiana, así como en su actividad metabólica degradadora. En el tratamiento con 75 % de RO, probablemente la menor concentración inicial de hidrocarburos, que implicó una menor toxicidad, así como la suficiencia de otras fuentes de C lábiles y energía, permitieron un rápido establecimiento de las poblaciones microbianas degradadoras, eliminando la fase de retraso en la degradación de los hidrocarburos. Mientras que en los tratamientos con 0 y 33 % de RO, el desarrollo de la comunidad microbiana degradadora llevó de 60 a 90 días. Por otro lado, una vez que se inició el proceso de degradación efectiva en estos tratamientos, las tasas de remoción de alcanos y HAPs fueron notablemente menores a las tasas observadas en el tratamiento con el 75 % de residuos orgánicos. Esto responde probablemente a la falta de condiciones ambientales adecuadas para el estímulo y mantenimiento de la actividad biológica, tales como el contenido de nutrientes y la disponibilidad de agua y oxígeno, lo cual fue discutido en secciones anteriores.

A pesar las diferentes tasas de biodegradación calculadas para alcanos y para HAPs, los porcentajes de degradación de alcanos y de aromáticos fueron similares dentro de cada tratamiento (Figura 3.11 a). Esto indicaría que el tiempo experimental (151 días) habría sido suficiente para observar la potencial degradación de ambos tipos de hidrocarburos, de acuerdo a las condiciones propias de cada tratamiento. Es decir, dadas las diferentes tasas de degradación, tiempos experimentales más cortos probablemente habrían resultado en la medición de diferentes porcentajes de degradación entre los compuestos menos y más recalcitrantes.

La degradación de hidrocarburos totales presentó un comportamiento diferente al de alcanos y de HAPs. La reducción de los HT comenzó después de aproximadamente 60 días de compostaje para el tratamiento con el 33 % de RO, y luego de 90 días para los tratamientos con 0 y 75 % de RO (Figura 3.11 c). La fase de latencia que, en este caso, se observa en el tratamiento 75 % RO podría atribuirse a la contribución de compuestos recalcitrantes por parte de los residuos orgánicos, como biopolímeros extraídos de los residuos vegetales y no retenidos en el proceso de purificación (“*clean-up*”) del extracto, de acuerdo a lo indicado previamente. Sin embargo, una vez superada la fase de latencia, la tasa de degradación máxima de

hidrocarburos totales (alcanzada a los 120 días aproximadamente) fue también mayor en el tratamiento con el 75 % RO, respecto de los tratamientos 0 y 33% RO (Figura 3.11 f).

Estos resultados también indican que las condiciones ambientales en el tratamiento con 75 % RO fueron las más adecuadas para la biodegradación de los hidrocarburos. No obstante, las diferencias observadas en los patrones de degradación entre alcanos o HAPs en oposición a los hidrocarburos totales, indica que el aporte de compuestos recalcitrantes, aunque no peligrosos, por parte de los residuos orgánicos debe tenerse en cuenta al evaluar y establecer las técnicas analíticas a utilizar en el seguimiento de la evolución de los hidrocarburos en estos procesos.

En el monitoreo y la determinación de puntos finales de remediación, suelen utilizarse parámetros generales para determinar la concentración de hidrocarburos del petróleo presentes en un sitio o material contaminado, tales como HTP (Hidrocarburos Totales del Petróleo) o el total de compuestos extraíbles en determinado solvente, cuantificados gravimétricamente o por técnicas instrumentales. Sin embargo, la información brindada por este tipo de indicadores es muy restringida para su utilización en la determinación de niveles de riesgo o puntos finales de remediación, debido a que el petróleo y sus derivados son mezclas muy complejas de infinidad de compuestos químicos, que interactúan con el medio de diferentes maneras y presentan diversa toxicidad. Es por ello que, además de la información brindada por los valores guía de hidrocarburos, lo recomendado es establecer estándares de remediación basados en evaluaciones de riesgo para cada caso particular (TPHCWG, 1998; McMillen et al., 2002).

Finalmente, cabe aclarar que considerando que en las estrategias de biorremediación por compostaje, es muy complejo el análisis de muestras y la distinción entre los compuestos extraíbles provenientes del petróleo de los derivados del residuo o enmienda orgánica, en este trabajo se informan pero no se discuten las concentraciones finales de los distintos tipos de hidrocarburos alcanzados en los tratamientos propuestos. En mayor medida, se intenta evaluar las limitaciones y factores que afectan el proceso y que pueden ser manipulados a fin de optimizar la biodegradación de los compuestos de interés.

### 3.4.8 Recuento y actividad microbiana

Con el fin de evaluar el efecto de la incorporación de residuos orgánicos en el establecimiento y crecimiento de la comunidad microbiana en los tratamientos desarrollados, se realizó el recuento de bacterias cultivables aerobias heterótrofas, y degradadoras de hidrocarburos totales, alcanos e hidrocarburos aromáticos, en cada instancia de muestreo. Para ello se utilizaron medios de cultivo selectivo según la fuente de carbono disponible: diésel estéril, para el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos totales; n-hexadecano, para bacterias degradadoras de alifáticos; solución de fenantreno, antraceno, fluoreno y dibenzotiofeno, para bacterias degradadoras de aromáticos.

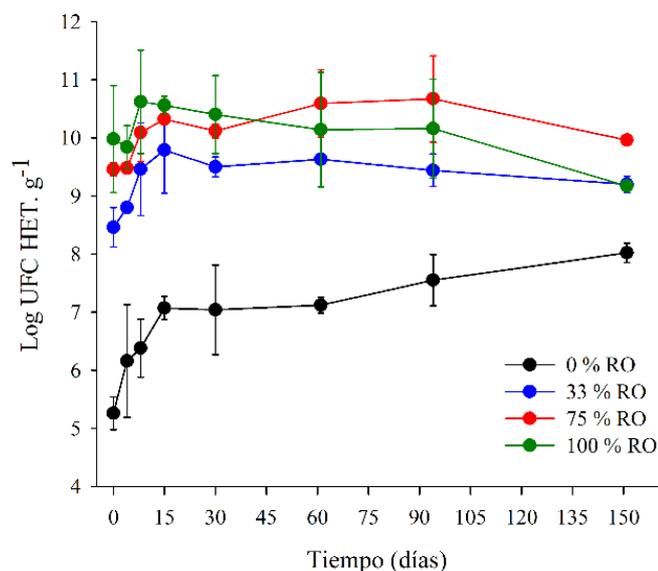
No obstante, debe considerarse que en muestras tan complejas, como las provenientes de suelos y aguas contaminadas o de residuos orgánicos, el recuento de microorganismos mediante técnicas de cultivo es limitado. Se estima que en muestras ambientales puede cultivarse menos del 1 % de las especies presentes (Chikere et al., 2011). Aun así, en este trabajo, estas técnicas permitieron obtener una aproximación comparativa del desarrollo microbiano en los sistemas bajo estudio.

En la Figura 3.12 se muestran las curvas con el logaritmo del recuento de bacterias heterótrofas cultivables (UFC g<sup>-1</sup>) obtenido para cada tratamiento, en cada instancia de muestreo. Como podría esperarse, los recuentos de microorganismos heterótrofos en los tres tratamientos que contienen residuos orgánicos fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) a los recuentos obtenidos en el tratamiento sin residuos orgánicos a lo largo de todo el ensayo. Además, en todos los tratamientos los mayores recuentos de microorganismos heterótrofos se obtuvieron durante los primeros 15 días de experimentación y luego el número de microorganismos comenzó a estabilizarse.

Particularmente, en el sistema de compostaje de residuos orgánicos (100 % RO), luego de 30-60 días la población heterótrofa comenzó a decrecer, coincidiendo con la disminución del carbono más fácilmente disponible (fracción soluble en agua: CSA) (ver Figura 3.9 b), mientras que en el tratamiento con el 75 % de RO, los recuentos de microorganismos heterótrofos se mantuvieron estables, incluso levemente

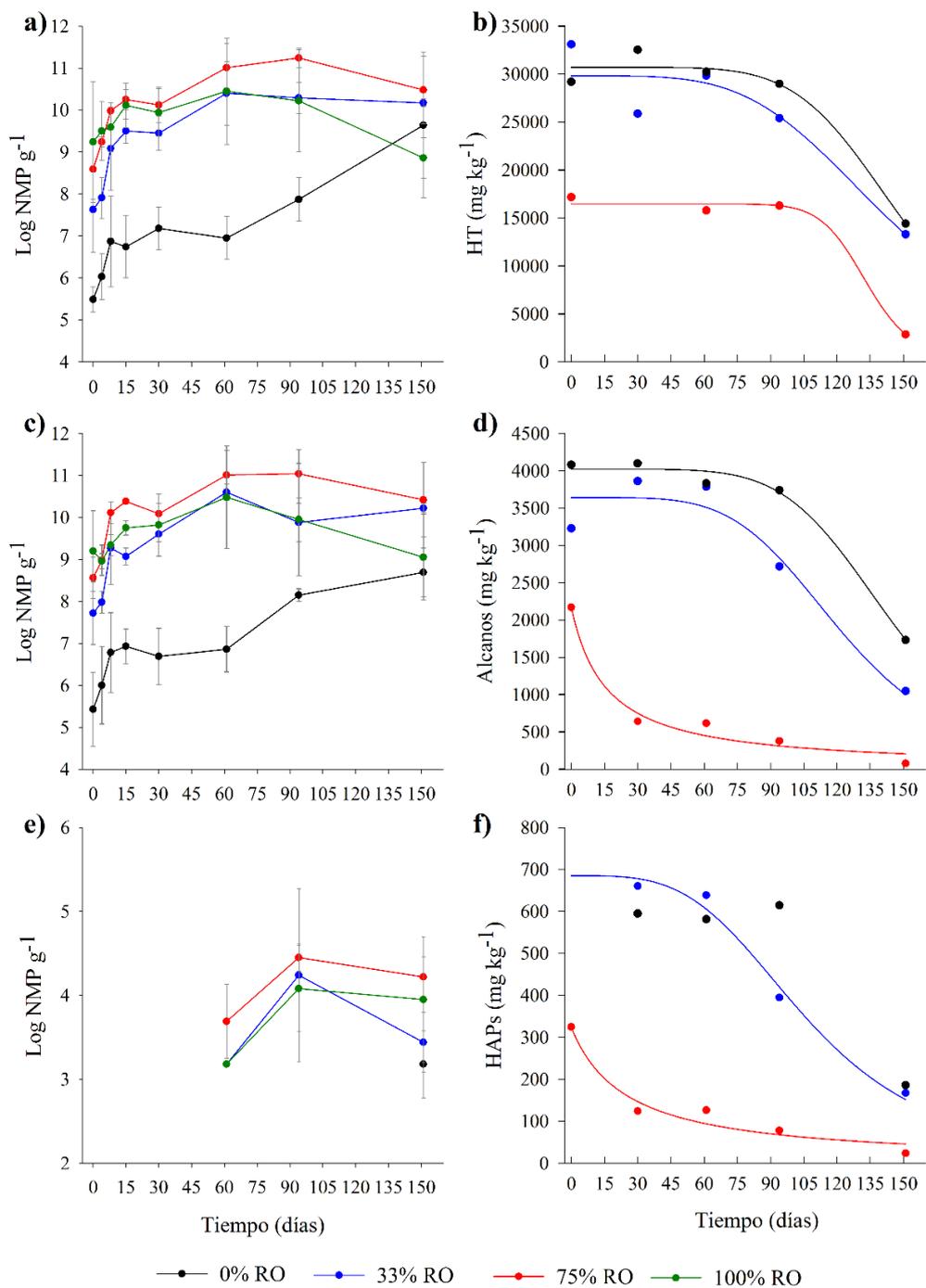
por encima de los recuentos en el tratamiento 100 % RO, hasta el final del ensayo. Además, el recuento de heterótrofos realizado en el último muestreo arrojó valores mayores ( $p < 0,05$ ) en 75 % RO que en 100 % RO.

Posiblemente, los productos del metabolismo microbiano y quizás algunas fracciones solubles de los hidrocarburos, pueden haber constituido una fuente de carbono y energía disponible a más largo plazo para las poblaciones microbianas presentes, que el carbono lábil proveniente directamente del residuo orgánico. Esto puede también puede observarse en la Figura 3.9 b, donde el contenido de CSA del tratamiento 75 % RO se mantiene por encima del tratamiento 100 % RO en la última etapa del ensayo.



**Figura 3.14.** Recuento de poblaciones bacterianas aerobias heterótrofas cultivables durante el ensayo. Los valores corresponden al logaritmo de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra seca, y son el promedio de tres réplicas por tratamiento. Las barras indican el desvío estándar.

En la Figura 3.13 se comparan los recuentos obtenidos de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos, con la curva de concentración en función del tiempo para cada tipo de hidrocarburos: totales, alcanos y aromáticos. Los recuentos de degradadores de hidrocarburos totales y alifáticos fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los tres tratamientos con residuos orgánicos respecto del tratamiento sin residuos orgánicos, durante todo el período de experimentación (Figura 3.13, a y c). Esto muestra el importante aporte de los residuos orgánicos de microorganismos con la capacidad metabólica de utilizar los hidrocarburos como sustrato. Incluso, se distingue la selección de las poblaciones de acuerdo al sustrato disponible ya que, luego de los primeros días de ensayo, el crecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos fue mayor en el tratamiento 75 % RO que en el tratamiento sin recortes de perforación (100 % RO) (Figura 3.13, a y c).



**Figura 3.15.** Recuento de poblaciones bacterianas cultivables en función del tiempo (izquierda) por tratamiento: **(a)** degradadoras de HT, **(c)** degradadoras de alcanos, y **(e)** degradadoras de HAPs, en comparación con las curvas de degradación de hidrocarburos (derecha): **(b)** HT, **(d)** alcanos totales, **(f)** HAPs totales. Los valores corresponden al logaritmo del número más probable (NMP) de células por gramo de muestra seca, y son el promedio de tres réplicas por tratamiento. Las barras indican el desvío estándar.

Al comparar los recuentos de microorganismos degradadores de hidrocarburos totales (realizados utilizando diésel estéril, como fuente de carbono en el medio de cultivo), con las curvas de degradación de HT en función del tiempo en los distintos tratamientos, se observa que el mayor incremento en estos recuentos se da en los primeros 15 a 60 días y no coincide con el decaimiento en la concentración de hidrocarburos, que se observa más marcadamente luego de los 60-90 días. Esto contribuiría a explicar que son extraídos y cuantificados como HT, compuestos provenientes de los residuos orgánicos de menor degradabilidad que parte de los hidrocarburos presentes.

En el caso de los degradadores de compuestos alifáticos, los recuentos son mayores durante los primeros 15 días, y esto tampoco coincide con la mayor tasa de degradación de este tipo de hidrocarburos, que se puede observar recién luego de 30 y 60 días en los tratamientos con el 33 y 0 % de RO, respectivamente. Las limitaciones mencionadas de las técnicas de cultivo y recuento de microorganismos en muestras tan complejas podrían explicar estas diferencias. Contrariamente, en el tratamiento con el 75 % RO los mayores recuentos de microorganismos degradadores de alcanos coinciden con el período de mayor tasa de reducción de este tipo de hidrocarburos (Figura 3.13, c y d).

Finalmente, en el recuento de microorganismos utilizando una solución de HAPs como fuente de carbono, sólo se observaron recuentos positivos (>1000 NMP de bacterias por gramo de muestra seca) en los tratamientos con residuos orgánicos (33, 75 y 100 % RO) después de 60 días de ensayo. Por otro lado, en el tratamiento sin residuos orgánicos sólo se obtuvo un recuento positivo en el muestreo final (151 días) (Figura 3.13 e). Esto confirma la recalcitrancia de este tipo de compuestos y la alta especificidad metabólica necesaria para su biodegradación, además de la complejidad del cultivo de microorganismos degradadores de este tipo de compuestos, como lo han informado otros autores (Del Panno et al., 2005). Sin embargo, pudo observarse una reducción en la concentración de HAPs en todos los tratamientos con recortes de perforación (Figura 3.13 f), por lo cual puede contemplarse la actuación de mecanismos indirectos de degradación (como el cometabolismo o cooxidación), de acuerdo a lo indicado en la sección introductoria de este capítulo.

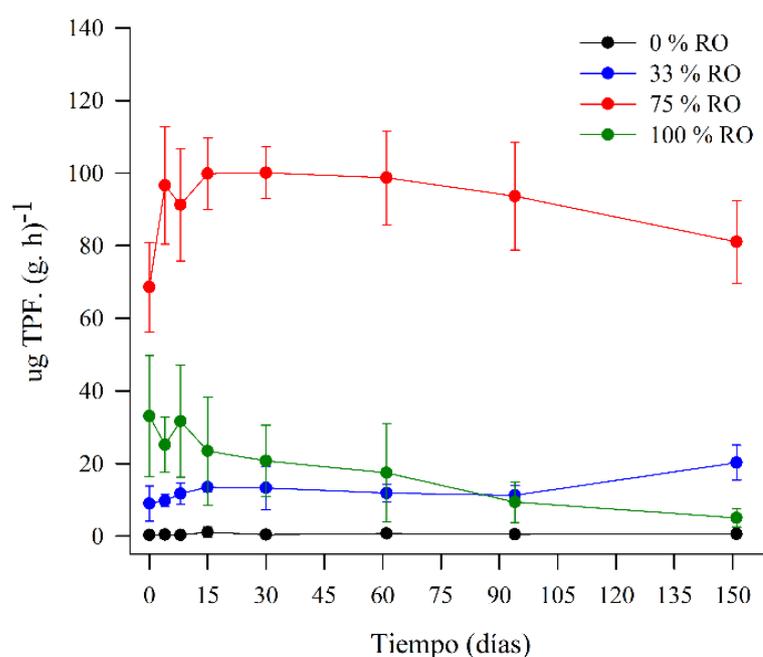
El cultivo de microorganismos en medios selectivos según la fuente de C utilizada, permitió verificar el aporte significativo de microorganismos con capacidad degradadora de los tipos de hidrocarburos por parte de los residuos orgánicos y probablemente también del agente estructurante. Esto coincide con lo expuesto por otros autores, que obtuvieron mayores recuentos de microorganismos degradadores de hidrocarburos en suelos contaminados enmendados con biosólidos o guano bovino (Ros et al., 2010; Agamuthu et al., 2013), o con residuos de cocina y jardín y/o agroindustriales (Van Gestel et al., 2003; Wang et al., 2011), respecto de los recuentos obtenidos en suelos contaminados sin enmendar.

Actualmente, el uso de métodos independientes del cultivo (PLFA, PCR-DGGE, metagenómica, etc.) para el estudio de la estructura, diversidad y dinámica de las comunidades microbianas involucradas en procesos de biorremediación por compostaje, han permitido obtener mayor certeza en el efecto positivo de la incorporación de residuos o materia orgánica en la comunidad degradadora de hidrocarburos. Estos estudios indican que los residuos orgánicos no sólo aportan microorganismos en cantidad y variedad, influyendo en la biodiversidad de la comunidad microbiana, si no también favorecen ampliamente el establecimiento y actividad de la flora microbiana degradadora, con el consecuente incremento en la degradación y transformación de los compuestos de interés (Gandolfi et al., 2010; Liu et al., 2010; Zhang et al., 2011; Lin et al., 2012; Taccari et al., 2012; Días et al., 2014).

La actividad de las enzimas deshidrogenasas es un indicador ampliamente utilizado de la actividad microbiana aeróbica global de un suelo o de un proceso de compostaje. Dado que estas son enzimas exclusivamente intracelulares y están activas sólo en células vivas, su actividad puede indicar el potencial oxidativo o catabólico de una comunidad microbiana; además ha sido positivamente correlacionada a la actividad respiratoria, medida mediante la evolución de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub> (Alef, 1995; Tiquia, 2005).

En este trabajo, este indicador mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el tratamiento con el 75 % de RO y los tres tratamientos restantes (0, 33 y 100 % RO) (Figura 3.14). La evolución de la enzima deshidrogenasa en el tratamiento con el 75 % de RO indica una elevada actividad microbiana a lo largo de todo el ensayo y

contribuye a explicar los altos porcentajes de degradación de hidrocarburos alcanzados en este tratamiento. Por otro lado, este indicador también verifica que en el tratamiento con el 33 % de RO, la proporción de residuos no fue suficiente para el desarrollo de una actividad biológica diferente del tratamiento sin residuos orgánicos, lo cual es reflejado también en los porcentajes de degradación de hidrocarburos alcanzados en estos sistemas.



**Figura 3.16.** Actividad de la enzima deshidrogenasa. Los valores son el promedio de tres réplicas por tratamiento. Las barras indican el desvío estándar.

La actividad de la enzima deshidrogenasa se midió a lo largo del ensayo en todos los tratamientos, como un indicador de la actividad biológica global, pero en particular de la actividad metabólica relacionada al uso de hidrocarburos como sustrato. Existe cierta controversia en la correlación de la actividad deshidrogenasa con la degradación o el catabolismo, específicamente, de hidrocarburos como fuente de C y energía. Algunos autores han encontrado una correlación negativa entre la actividad de estas enzimas y el contenido de hidrocarburos (Riffaldi et al., 2006;

Dawson et al., 2007; Tejada et al., 2008), mientras que otros autores relacionan la actividad de la enzima deshidrogenasa con la presencia de hidrocarburos, y su utilización como sustrato para la actividad microbiológica (Marin et al., 2005; Saviozzi et al., 2009; Alhama Rodríguez, 2013). Sin embargo, existe un consenso general en el efecto positivo de la incorporación de enmiendas o residuos orgánicos sobre esta actividad enzimática (Namkoong et al., 2002; Lee et al., 2008).

Como se indicó anteriormente, en este trabajo la actividad de la enzima deshidrogenasa fue aproximadamente tres veces mayor en el tratamiento con el 75 % de RO, respecto del tratamiento de compostaje de residuos orgánicos (100 % RO), por lo cual podría inferirse cierta influencia de la fuente de C dada por el hidrocarburo en la actividad de esta enzima. A fin lograr una mayor comprensión de la relación entre la actividad deshidrogenasa de los sistemas estudiados y el uso de hidrocarburos como sustrato por parte de la comunidad microbiana, se evaluó, mediante un análisis de correlación de Pearson (Tabla 3.9) (INFOSTAT v. 2.015), la asociación lineal o correlación existente entre los valores muestrales estandarizados de la actividad deshidrogenasa y la concentración de los distintos tipos de hidrocarburos analizados, el contenido de nutrientes y los recuentos microbianos.

Según lo indicado en la Tabla 3.9, existe una correlación positiva esperable de la actividad deshidrogenasa con los recuentos microbianos y el contenido de nutrientes, y fuertemente negativa con la relación C/N y el pH, debido a la alta sensibilidad de toda actividad enzimática a las variaciones en este parámetro. Sin embargo, la correlación de la actividad de la enzima deshidrogenasa con los distintos grupos de hidrocarburos analizados, resultó significativa pero en sentido negativo, lo cual implicaría un efecto perjudicial de la concentración de hidrocarburos sobre esta actividad enzimática.

Tejada et al. (2008), Dawson et al. (2007) y Riffaldi et al. (2006) asocian la correlación negativa entre la actividad de la enzima deshidrogenasa y la presencia de hidrocarburos, a un efecto de toxicidad de los hidrocarburos sobre la comunidad microbiana. Considerando estos antecedentes, la menor concentración inicial de hidrocarburos en los reactores correspondientes al tratamiento con el 75 % de RO pudo haber favorecido también la elevada actividad de esta enzima, respecto de los tratamientos con 0 y 33 % de RO. Asimismo, podría hipotetizarse sobre un efecto

sinérgico entre el aporte de microorganismos y nutrientes fácilmente disponibles, y la presencia de hidrocarburos, como una fuente de carbono, para explicar la elevada actividad de la enzima deshidrogenasa en el tratamiento 75 % RO.

**Tabla 3.10.** Correlación de la actividad de la enzima deshidrogenasa con otras variables de interés, analizada mediante el análisis de correlación de Pearson. En negrita se destacan las correlaciones significativas

	<b>Actividad Deshidrogenasa</b>	
	<b>Coefficiente de Pearson</b>	<b>p - valor</b>
Alcanos C10-C21	<b>-0,75</b>	< 0,0001
Alcanos C22-C35	<b>-0,71</b>	< 0,0001
Alcanos C36-C40	-0,02	0,9010
Alcanos totales	<b>-0,75</b>	< 0,0001
HAPs 2-3anillos	<b>-0,65</b>	< 0,0001
HAPs 4-6anillos	<b>-0,47</b>	0,0015
HAPS totales	<b>-0,62</b>	< 0,0001
HT	<b>-0,57</b>	0,0001
Recuento bacterias Heterótrofas	<b>0,44</b>	0,0035
Recuento bacterias degradadoras HT	<b>0,41</b>	0,0070
Recuento bacterias degradadoras Alcanos	<b>0,48</b>	0,0014
Recuento bacterias degradadoras HAPs	0,04	0,8076
pH (1:10)	<b>-0,90</b>	< 0,0001
CE (1:10)	-0,10	0,5321
CSA	<b>0,85</b>	< 0,0001
COT	<b>0,60</b>	< 0,0001
Nitrógeno Total (Norgánico + N-NH <sub>4</sub> )	<b>0,97</b>	< 0,0001
C/N	<b>-0,67</b>	< 0,0001

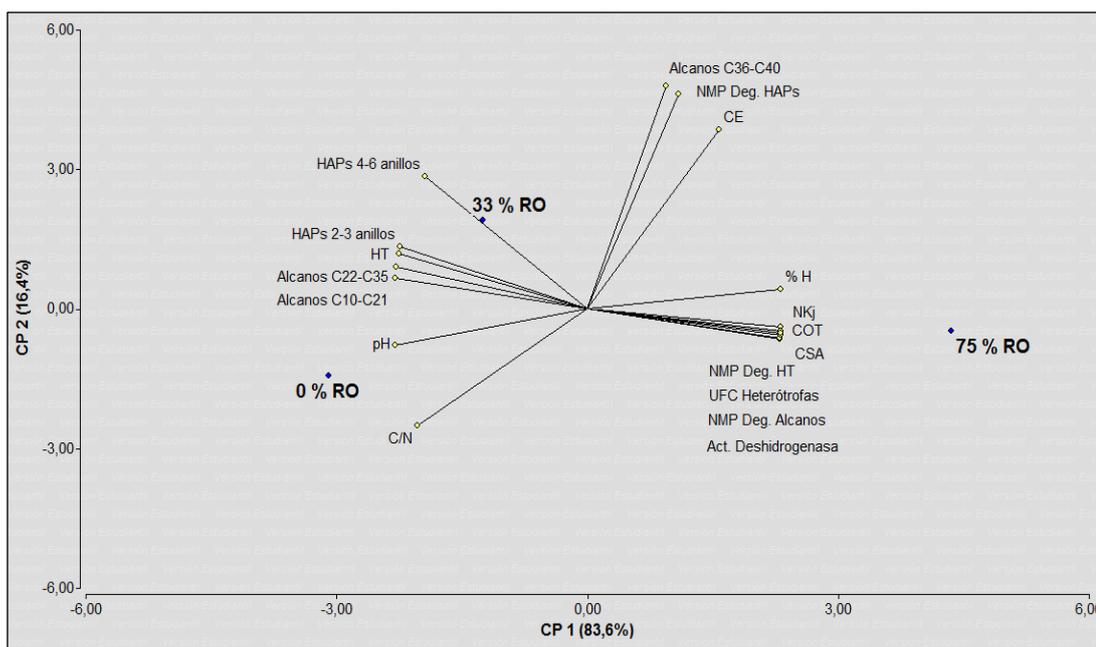
HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

n = 42

### 3.4.9 Análisis integral de los resultados

A modo de cierre e integración de los resultados obtenidos, y con el fin de sintetizar cuales fueron los principales factores que influyeron en la biorremediación de los recortes de perforación mediante la estrategia de compostaje, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Como ya se detalló en el Capítulo 2, esta técnica de análisis estadístico multivariado permite la síntesis de la información, o reducción de las dimensiones, hallando nuevas variables que representen y expliquen la estructura de variación de los datos.

Este análisis se realizó considerando los datos estandarizados de las variables en los tres tratamientos con recortes de perforación (0, 33 y 75 % RO), con excepción de los datos de temperatura. La Figura 3.15 muestra el *biplot* obtenido. En el componente principal 1 (CP 1) se explica un 84,6 % de la variabilidad total de los datos, mientras que en el componente principal 2 (CP 2) es representado un 15,4 % de la variación de los datos obtenidos, por lo tanto el CP 1 y el CP 2 en suma explican la variabilidad total del conjunto de datos (100%).



**Figura 3.17.** *Biplot* donde son representados los dos primeros componentes principales (CP 1 y CP 2), las variables analizadas y los tratamientos con RBO (0, 33 y 75 % RO).

Las variables con mayor representación (correlación  $\geq 0,6$ ) en la CP 1 son: porcentaje de humedad (% H); contenido de alcanos (C10-C21; C22-C35) y de HAPs de 2 a 3 y de 4 a 6 anillos; contenido de HT; UFC de Heterótrofas y el NMP de degradadores de alcanos e hidrocarburos totales; actividad deshidrogenasa; pH; contenido de NKj, COT, CSA y la relación C/N. En la CP 2: los alcanos de C36-C40, la CE y el NMP de degradadores de HAPs.

Según se observa en la Figura 3.15, el CP 1 separa y opone en el plano a los tratamientos con 0 y 33% de RO, respecto del tratamiento con el 75 % RO. Los dos primeros se encuentran asociados a la concentración de hidrocarburos, pH y relación C/N, mientras que el tratamiento 75 % RO, se asocia con el contenido y proporción de nutrientes (CSA, COT, NKj, menor C/N), el contenido de agua, la actividad de la enzima deshidrogenasa y el recuento de microorganismos. De esta manera, se observa la importancia del efecto de la proporción de residuos orgánicos sobre las variables que podrían asociarse a un mayor desarrollo de la actividad biológica y a una menor toxicidad, explicando la mayor degradación de hidrocarburos en el tratamiento con 75 % de RO.

Por otra parte, el CP 2 se encuentra correlacionado con las variables de conductividad eléctrica, recuento de microorganismos degradadores de HAPs, y la concentración de alcanos de mayor peso molecular (36 a 40 carbonos). La evolución de estas variables parece ser más independiente de las proporciones de las mezclas entre recortes de perforación y residuos orgánicos conformadas, puesto que se encuentran más lejanas en el plano de los puntos indicados para los tratamientos. Por lo tanto, esto indicaría una baja influencia de los valores de CE en el desarrollo del proceso y en la reducción de los hidrocarburos. Particularmente, el elevado porcentaje de degradación de hidrocarburos observado en el tratamiento con el 75 % de RO muestra que el contenido de sales solubles no afectó significativamente la actividad microbiana degradadora, según se observa en los recuentos microbianos y en la actividad de la enzima deshidrogenasa. Por otro lado, la baja correlación de la concentración de alcanos de 36-40 carbonos con los restantes grupos de hidrocarburos, y la menor distancia, en el plano, de esta variable al tratamiento con el 75 % de RO respecto de tratamientos con el 0 y 33% de RO, contribuiría con la hipótesis de que este tipo de compuestos provienen mayoritariamente los residuos orgánicos.

### 3.5 Conclusiones

Los recortes de perforación base oleosa constituyen un material residual complejo, cuyas características físicas, como la falta de estructura, y químicas, asociadas principalmente a un contenido muy elevado de sales e hidrocarburos, dificultan su tratamiento mediante los métodos biológicos utilizados comúnmente para la biorremediación de suelos o materiales contaminados por hidrocarburos del petróleo. Los resultados detallados en este capítulo muestran que el compostaje con residuos orgánicos resulta una estrategia viable para el tratamiento de recortes de perforación base oleosa, posibilitando además el tratamiento conjunto con otros residuos generados en los yacimientos hidrocarburíferos.

No obstante, la aplicación de una proporción adecuada de residuos orgánicos parece ser relevante en la eficacia de la biodegradación de los hidrocarburos presentes en los recortes de perforación. La aplicación de residuos orgánicos en una relación de 1:0,4 (recorte:residuo orgánico) en peso seco, proveyó condiciones ambientales adecuadas, generando un rápido desarrollo la comunidad microbiana degradadora, lo cual permitió un elevado porcentaje de remoción de hidrocarburos, e incluso de aquellos compuestos muy recalcitrantes, como los poliaromáticos de elevado peso molecular. Por otra parte, la aplicación de una proporción de 1:0,1 (en peso seco) no fue más efectiva que no aplicar residuos orgánicos en la biorremediación del recorte de perforación.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitirían restarle importancia al elevado contenido de sales de los recortes de perforación, como un factor limitante para el proceso biodegradativo. Asimismo, considerar el efecto de la incorporación de residuos orgánicos en la dilución de la concentración inicial de hidrocarburos, y por lo tanto de su toxicidad, como una ventaja de la biorremediación por compostaje de materiales muy contaminados por hidrocarburos, como los recortes de perforación base oleosa.

## CAPITULO 4

---

Conclusiones y recomendaciones finales,  
líneas de trabajo futuro

#### **4.1 Factibilidad de reuso de recortes de perforación base agua como material de relleno en la restauración de áreas degradadas**

La tendencia operativa en la región patagónica argentina, y también a nivel internacional, marca el uso de fluidos base agua para la perforación de pozos de gas y petróleo, dados los menores costos económicos y ambientales derivados de su utilización respecto de los fluidos base oleosa, como se indicó en el Capítulo 1 de este trabajo de tesis. Por lo cual, probablemente la generación de recortes de perforación base agua demande mayor atención en la evaluación de alternativas para su reuso o disposición final. A pesar de que en este tipo de recortes de perforación el contenido de hidrocarburos no suele ser el factor limitante para su disposición o reuso, el elevado contenido de sales que presentan si lo es.

Por otro lado, de acuerdo a lo indicado en el capítulo introductorio, el contenido de compuestos y elementos tóxicos en los recortes de perforación base acuosa puede resultar muy variable, según el fluido de perforación utilizado en cada pozo y la formación geológica atravesada. Por lo tanto la reutilización de recortes de perforación base agua, como material de relleno para la revegetación y restauración de áreas degradadas requiere, de manera preliminar e ineludible, del análisis y evaluación exhaustiva de sus características de peligrosidad y/o toxicidad, a fin de descartar potenciales riesgos ambientales de mayor gravedad.

Independientemente de los resultados obtenidos en el diagnóstico previo realizado, es recomendable el desarrollo de un plan de monitoreo del área de disposición del material así como evaluaciones de riesgo ambiental pertinentes, a fin de detectar o predecir migraciones de contaminantes desde el material, y potenciales impactos no deseados en el medio. Por ejemplo, si el recorte de perforación presenta contenidos elevados de EPTs, la exposición a los factores ambientales puede solubilizar u originar distintas formas de especiación de los metales respecto del estado inicial, favoreciendo su migración o posible ingreso a la cadena trófica.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la aplicación de enmiendas orgánicas estables (compost), pueden mejorar la fertilidad y estructura de los recortes base acuosa y estimular la colonización de la vegetación, transformando este residuo en un recurso para la restauración de áreas degradadas que han perdido el horizonte fértil y están expuestas a erosión y compactación, muy comunes en los yacimientos hidrocarburíferos. Esta estrategia además puede contribuir en la solución de la problemática de disposición de los residuos orgánicos urbanos y/o agroindustriales en la región patagónica.

No obstante, para el desarrollo a mayor escala de esta estrategia de reuso se deben contemplar la realización de ensayos piloto en parcelas monitoreadas para evaluar el crecimiento vegetal en condiciones climáticas adversas, como suelen ser las de la región patagónica, y el monitoreo de la potencial migración de compuestos o elementos peligrosos, como se indicó previamente. En ese sentido, también la evaluación ambiental previa, teniendo en cuenta las condiciones geomorfológicas e hidrológicas del sitio de disposición será de importancia. Estas precauciones no deben ser tomadas sólo considerando los componentes de los recortes de perforación, si no también que la aplicación de enmiendas orgánicas, aún en dosis adecuadas, puede implicar la pérdida de fósforo o nitratos por escorrentía o lixiviación, con riesgos de contaminación de cuerpos de agua superficiales y/o subterráneos.

Finalmente, según estos resultados, el uso de enmiendas orgánicas puede colaborar ampliamente en el lavado de sales presentes en los recortes de perforación base agua, dado su efecto positivo en su estructura. No obstante, en el ensayo descrito en el Capítulo 2 de este trabajo, fue necesario un pretratamiento de lavado con agua corriente para la reducción del elevado contenido de sales del recorte de perforación base agua, en forma previa a la aplicación de las enmiendas orgánicas. Esta operación probablemente sea de reducida viabilidad en gran escala, dada la baja disponibilidad de agua en los yacimientos hidrocarburíferos; además esto representa un esquema de uso poco racional de este recurso preciado, como lo es el agua dulce. Por otra parte, este tipo de pretratamiento generaría un efluente secundario, el agua de lavado, de difícil disposición, originando un problema adicional.

Considerando este aspecto, mayores esfuerzos en el rediseño de los fluidos de perforación utilizados debieran ser desarrollados por las compañías prestadoras de este

servicio, a fin de reducir el contenido o tipo de aditivos formulados con sales, principalmente de sodio. Asimismo, la optimización de la operación de perforación para la reducción del volumen de recorte generado y del contenido de agua del mismo, también constituyen aspectos claves para la gestión de esta corriente de desecho.

#### **4.1.1 Trabajo futuro**

Para la aplicación de este tipo de estrategias de gestión de recortes de perforación base agua, los esfuerzos de investigación y desarrollo futuro debieran enfocarse en tres grandes ejes:

- ✓ La búsqueda de alternativas para la reducción del contenido de sales de los recortes, independientemente de aquellas tomadas en el origen del problema, es decir en el diseño de los fluidos de perforación y en la operación. Por ejemplo, una alternativa a evaluar puede ser la enmienda de los recortes con sales de calcio, para favorecer el reemplazo del sodio en el complejo de intercambio y su lixiviación.
- ✓ La evaluación de los efectos de la utilización de otras enmiendas orgánicas en la aptitud del recorte base agua como sustrato para el crecimiento vegetal, como composts producidos a partir de residuos agroindustriales generados en la región patagónica.
- ✓ La evaluación del crecimiento y desarrollo de especies vegetales nativas del monte y estepa patagónicas en sustratos formulados con recortes de perforación y enmiendas orgánicas; y el estudio del reuso o disposición de estos materiales en los procesos de restauración ecológica de los sitios degradados.

## **4.2 Biorremediación de recortes de perforación base oleosa por compostaje**

### **4.2.1 Consideraciones para el escalado y aplicación a campo**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de biorremediación de recortes base oleosa por compostaje con residuos orgánicos de cocina y jardín, descrito en el Capítulo 3 del presente documento, la aplicación de esta tecnología puede resultar efectiva para la biorremediación de los recortes de perforación. Las mayores ventajas, respecto de otras técnicas de tratamiento, se encuentran asociadas las mejoras que pueden implementarse en la reducción de la toxicidad inicial del material, la aireación y la disponibilidad de agua, y el aporte de nutrientes, con la consecuente aceleración del proceso biodegradativo y la reducción de los tiempos de tratamiento. Además, el tratamiento simultáneo de más de un residuo generado en las áreas de explotación petrolera.

En la bibliografía de referencia, se aprecian importantes esfuerzos en ensayos a escala de laboratorio o piloto, para la determinación de aquellas proporciones de residuos orgánicos que optimicen el proceso biodegradativo en el compostaje de materiales contaminados con hidrocarburos. Sin embargo, las condiciones para el desarrollo biológico son dependientes del tipo de residuo orgánico, agente estructurante a utilizar, tipo de material a sanear y de la escala de tratamiento. De esta manera, lo acertado será ajustar las proporciones evaluando cada caso particular, lo cual permitirá el ahorro de recursos económicos y de tiempo. Además, la variabilidad característica de los recortes de perforación base oleosa, debido al tipo de fluido utilizado y a la formación geológica atravesada en cada pozo perforado, requerirá de un muestreo representativo y análisis de las variables de mayor interés de cada lote de residuo a tratar.

No obstante, según los resultados obtenidos en este trabajo, proporciones en peso seco de recorte y residuos tan bajas como 1:0,1 pueden resultar insuficientes para el desarrollo exitoso del proceso, mientras que una proporción de 1:0,4 presentó alta eficacia en la degradación de los hidrocarburos. Este rango podría constituir una guía

o punto de partida para la evaluación de esta tecnología en una fase piloto inicial o experiencias a campo. A esta escala podrían evaluarse proporciones intermedias entre ambas relaciones recorte:residuo, además de la utilización de otros tipos de residuos orgánicos, como por ejemplo biosólidos o agroindustriales. Dadas las potenciales dificultades logísticas para la obtención, y transporte hasta el área de tratamiento, de cantidades suficientes de residuos orgánicos, debe considerarse la necesidad de utilizar una mínima cantidad de residuos orgánicos, pero que provea las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la actividad biológica y de las comunidades microbianas degradadoras.

En este sentido, una caracterización acabada de los sustratos o mezclas a ser compostados proporciona información valiosa y necesaria, en particular relacionada al contenido y disponibilidad de nutrientes, y al contenido inicial de hidrocarburos. Asimismo, en esta instancia y en las siguientes, debe realizarse el esfuerzo de lograr la mayor representatividad posible en el diseño del muestreo, considerando la gran heterogeneidad y variabilidad de las muestras de este tipo de sistemas, que pueden afectar un adecuado monitoreo del proceso.

De acuerdo a lo expuesto, para la optimización de los parámetros del proceso (principalmente grado de toxicidad para la comunidad microbiana degradadora, pH y disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno), se requerirá de la ejecución de experiencias piloto a campo, dónde seguramente las variables ambientales pueden ser muy diferentes, y por lo tanto el desarrollo del proceso debe ser estudiado en estas condiciones, a fin de evaluar y ajustar las mejores proporciones de recortes de perforación y residuos orgánicos.

El escalado o aplicación a campo de la estrategia de compostaje para el tratamiento de recortes de perforación base oleosa, implicará el diseño e implementación de sistemas de compostaje que pueden ser abiertos (biopilas o hileras), aunque adecuadamente protegidos de los fuertes vientos o las precipitaciones torrenciales, o cerrados (compostadores industriales o silobolsa). Sin embargo, dado los grandes volúmenes de material a tratar, el uso de sistemas cerrados puede ser complejo y costoso, aun cuando estos sistemas podrían permitir un mayor control de las variables ambientales del proceso.

La aireación u oxigenación es una variable de operación muy importante, y la que más puede incidir en los costos para la aplicación de estas tecnologías de remediación, ya sea por la energía utilizada en sistemas con aireación forzada o las maquinarias empleadas para el volteo y homogeneización del material. No obstante, de acuerdo a los resultados obtenidos, tanto la utilización de materiales estructurantes como la aplicación de proporciones adecuadas de residuos orgánicos, pueden influir positivamente en este aspecto, favoreciendo una reducción en la necesidad de volteo para la oxigenación del material. Este aspecto debe ser ampliamente considerado en el diseño y aplicación de esta estrategia de tratamiento.

De la misma manera, el aporte del agua contenida en los residuos orgánicos puede minimizar la necesidad de riego durante el biotratamiento, representando una ventaja operativa debido a la escasez de agua dulce en muchas áreas de explotación hidrocarburífera. Sin embargo, el “flujo de agua” (es decir, la pérdida de agua por volatilización o lixiviación) particularmente en los sistemas abiertos de compostaje, es dependiente de las condiciones climáticas y también operativas (por ejemplo, la frecuencia de volteo). Por lo cual, tanto las condiciones de humedad óptimas para un proceso adecuado como la generación de lixiviados que, al no ser evacuados, puedan favorecer condiciones anóxicas en algunos sectores del material en tratamiento, constituyen aspectos que deben ser cuidadosamente monitoreados. Considerando estos aspectos, la impermeabilización del área de tratamiento y un sistema de recolección y tratamiento de lixiviados deben ser previstos a fin de evitar la contaminación del suelo y/o cuerpos de agua subterráneos o superficiales.

En un proceso en gran escala o a campo de biorremediación por compostaje, dónde estén garantizadas las condiciones óptimas de oxigenación y humedad, podría ser esperable alcanzar mayores temperaturas a las obtenidas en el ensayo realizado en este trabajo, y analizado en el Capítulo 3, dada la mayor masa de material en compostaje que implicaría una biopila o hilera. Por lo cual este aspecto también debe ser monitoreado, considerando lo expuesto en dicho capítulo sobre el efecto potencialmente perjudicial de temperaturas muy altas en la flora microbiana degradadora de hidrocarburos. El volteo suele ser una práctica utilizada comúnmente para el enfriamiento de pilas de compostaje que han alcanzado o mantenido, por períodos de tiempo muy largos, temperaturas mayores a las deseadas. No obstante, aun

cuando temperaturas mesofílicas (25 °C a 45 °C) sean las óptimas para un proceso de biodegradación de hidrocarburos, al utilizar residuos orgánicos debe ser considerada la evaluación del contenido de patógenos en el producto obtenido, que no es sanitizado, en forma previa a su disposición final o reutilización.

Por otro lado, en matrices con altos contenido de nitrógeno, la combinación de un pH mayor a 8,5 con temperaturas en el rango termofílico (>45 °C) puede favorecer la pérdida de nitrógeno en forma de amonio. Dado los valores alcalinos de pH del recorte de perforación base oleosa, en escalas de tratamiento donde se puedan alcanzar temperaturas termofílicas, este es un aspecto a observar, no sólo por la pérdida de nitrógeno, que es un nutriente esencial, sino también por la generación de olores desagradables durante el proceso.

Finalmente, cabe mencionar que cuando sólo se utilizan parámetros generales para el monitoreo y determinación de puntos finales de remediación de materiales contaminados, como "hidrocarburos totales" o HTP (Hidrocarburos Totales del Petróleo), o el total de compuestos extraíbles en determinado solvente orgánico o por determinada técnica analítica, la información brindada por este tipo de indicadores es restringida para su utilización en la determinación de niveles de riesgo o puntos finales de remediación. El petróleo y sus derivados son mezclas muy complejas de infinidad de compuestos químicos, que interactúan con el medio de diferentes maneras y presentan diversos niveles de toxicidad. Por lo cual, la identificación y cuantificación de grupos o de compuestos individuales presentes en los sitios o materiales contaminados, en particular aquellos de mayor toxicidad o recalcitrancia, como por ejemplo los HAPs, permitiría evaluar de manera más precisa el nivel de riesgo. Además, esta caracterización más exhaustiva está siendo exigida más frecuentemente por la normativa y autoridades de aplicación ambiental.

#### **4.2.2 Trabajo futuro**

La aplicación de tecnologías de compostaje para el tratamiento de recortes de perforación puede ser valorada como una alternativa de tratamiento integral y sustentable. El producto resultante del tratamiento también puede ser usado como

material de relleno o restauración de sitios o áreas degradadas en los yacimientos hidrocarburíferos, considerando el elevado contenido de materia orgánica y nutrientes resultantes del tratamiento aplicado. Esta alternativa puede considerarse siempre que sean descartados previamente o monitoreados rigurosamente los riesgos asociados al contenido remanente de hidrocarburos o la potencial movilización de elementos potencialmente peligrosos (o EPTs).

McMillen et al. (2002), Choi et al. (2005) y Choi y Chang (2009), han evaluado el crecimiento y desarrollo vegetal en recortes de perforación remediados mediante compostaje con resultados exitosos. Además de la optimización del proceso de biorremediación, continuar esta línea de trabajo, evaluando el crecimiento de especies nativas del monte y estepa patagónica, puede generar una alternativa tecnológica que complete el ciclo de tratamiento y disposición final de este material residual.

Por otro lado, cabe también subrayar la necesaria evaluación de otro tipo de residuos orgánicos en la biorremediación por compostaje de recortes base oleosa, como se indicó previamente. Los residuos orgánicos provenientes de cocina y/o jardín pueden resultar insuficientes, dados los volúmenes de recortes a tratar y las dificultades para su obtención, Por lo cual, la utilización de residuos de origen agroindustrial, de características más homogéneas y de menor dificultad para su obtención, puede hacer más factible la aplicación de este tipo de tecnologías.

## Referencias bibliográficas

---

- Agamuthu P., Tan Y.S., Fauziah S.H., 2013. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environ. Sci.* 18, 694-702.
- Agnusdei M., Castaño J., Marino A., 2011. Recuperando a un viejo aliado. *Visión Rural XVIII* 86, 18-24.
- Al-Ansary M. S. y Al-Tabbaa A., 2007. Stabilization/solidification of synthetic petroleum drill cuttings. *J. Haz. Mat.* 141, 410-421.
- Alef K., 1995. Estimation of microbial activities. En: Alef K. y Nannipieri P. (eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, San Diego, USA, 576 pp.
- Alexander M., 1994. *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, San Diego, USA, 302 pp.
- Alhama Rodríguez I., 2013. Reciclado en suelos de lodos de refinería: Nuevas aproximaciones para la biodegradación de hidrocarburos mediante el manejo de enmiendas orgánicas. Tesis Doctoral, Departamento de Química Agrícola, Geología y edafología, Universidad de Murcia, España, 280 pp. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/128510/TIRA.pdf?sequence=1>
- Antizar-Ladislao B., Lopez Real J.M., Beck A.J., 2004. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated waste using composting approaches. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 34, 249-289.
- Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J., Beck A.J., 2005. In-vessel composting-bioremediation of aged coal tar soil: effect of temperature and soil/green waste amendment ratio. *Environ. Int.* 31, 173-178.
- Antizar-Ladislao B., Beck A.J., Spanova K., Lopez-Real J., Rusell N.J., 2007. The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *J. Hazard. Mater.* 144, 340-347.
- Arce-Ortega J.M., Rojas-Avelizapa N.G., Rodríguez-Vázquez R., 2004. Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *J. Environ. Sci. Heal. A* 39, 1535-1545.
- Atlas R.M., 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, 149 - 156.
- Atlas R.M., 1997. Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana. En: Levin M.A. y Gealt M.A. (eds.), *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*, Mc Graw-hill / Interamericana de España, Madrid, España, pp. 21-40.

- Ayotamuno J.M., Okparanma R.N., Araka P.P., 2009. Bioaugmentation and composting of oil-field drill-cuttings containing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *J. Food. Agric. Environ.* 7, 658-664.
- Ball A.S., Stewart R.J., Schliephake K., 2012. A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cuttings. *Waste Manag. Research* 30, 457-473.
- Balzarini M.G., González L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W., 2008. Manual del Usuario (Infostat), Editorial Brujas, Córdoba, Argentina
- Barrett-Lennard E.G., 2002. Restoration of saline land through revegetation. *Agr. Water Manage.* 53, 213-226.
- Bauder T., Barbarick K.A., Ippolito J., Shanahan J.F., Ayres P.D., 2005. Soil properties affecting wheat yields following drilling-fluid application. *J. Environ. Qual.* 34, 1687-1696.
- Bazzigalupi O., Pistorale S. M., Andrés A.N., 2008. Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Cien. Inv. Agr.* 35, 277-285.
- BC WLAP, 2004. Analytical Method 10 for Contaminated Sites: Silica gel cleanup of extractable petroleum hydrocarbons, Rev. 1.0. British Columbia Ministry of Water, Land & Air Protection, Canada, 15 pp.
- Beaudin N., Caron R.F., Legros R., Ramsay J., Ramsay B., 1999. Identification of the key factors affecting composting of a weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation* 10, 127-133.
- Betancur-Galvis L.A., Alvarez-Bernal D., Ramos-Valdivia A.C., Dendooven L., 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco, *Chemosphere* 62, 1749-1760.
- Boopathy R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technol.* 74, 63-67.
- Breuer E., Shimmield G., Peppe O., 2008. Assessment of metal concentrations found within a North Sea drill cuttings pile. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1310-1322.
- Cáceres R., Flotats X., Marfà O., 2006. Changes in the chemical and physicochemical properties of the solid fraction of cattle slurry during composting using different aeration strategies. *Waste Man.* 10, 1081-1091.
- Candler J. y Friedheim J., 2006. Designing environmental performance into new drilling fluids and waste management technology. 13<sup>th</sup> International Petroleum Environmental Conference (IPEC), San Antonio, Texas, USA, 18 pp.

- Cantero J., Videla S., Gálvez J., Vardaro S., Tettamanti G., López A., Ercoli E. 2005. Límites prácticos de biorremediación de suelos afectados por petróleo. 6° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo, Instituto Argentino del Petróleo y Gas (IAPG), octubre-noviembre de 2005, Neuquén, Argentina, 23 pp.
- Cellier A., Francou C., Houot S., Ballini C., Gauquelin T., Baldy V., 2012. Use of urban composts for the regeneration of a burnt Mediterranean soil: A laboratory approach. *J. Environ. Manage.* 95, S238 – S244.
- Chaganti V. N. y Crohn D. M., 2015. Evaluating the relative contribution of physiochemical and biological factors in ameliorating a saline-sodic soil amended with composts and biochar and leached with reclaimed water. *Geoderma* 259-260, 45- 55.
- Chaganti V. N., Crohn D. M., Simunek J., 2015. Leaching and reclamation of a biochar and compost amended saline-sodic soil with moderate SAR reclaimed water. *Agr. Water Manage.* 158, 255–265.
- Chaillan F., Chaîneau C.H., Point V., Saliot A., Oudot J., 2006. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environ. Pollut.* 144, 255-265.
- Chaîneau C., Morel J., Oudot J., 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1615-1621.
- Chen M., Xu P., Zeng G., Yang C., Huang D., Zhang J., 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33, 745-755.
- Chiappori L., Follis E., Kocina S. Luna R. 2013. Utilización de recortes de perforación en la construcción de locaciones. *Revista Petrotecnia*, Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG), pp. 12-24.
- Chica Pérez A.F. y García Morales J.L., 2008. Aspectos técnicos en el desarrollo y control del proceso de compostaje. En: Moreno Casco J. y Moral Herrero R. (eds.), *Compostaje*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 305-328.
- Chikere C.B., Okpokwasili G.C., Chikere B.O., 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech.* 1, 117-138.
- Choi W.J., Chang S.X., Hao X., 2005. White spruce response to co-composted hydrocarbon-contaminated drilling waste: effects of compost age and nitrogen fertilization. *J. Environ. Qual.* 34, 1319-1327.

- Choi W.J. y Chang S.X., 2009. Technical Note: Nitrogen fertilization effects on the degradation of aged diesel oil in composted drilling wastes. *Int. J. Phytoremediat.* 11, 441-450.
- Chowdhury N., Marschner P., Burns R.G., 2011. Soil microbial activity and community composition: Impact of changes in matric and osmotic potential. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1229-1236.
- Couling N.R., Towell M.G., Semple K.T., 2010. The simultaneous effects of PAH concentration, contaminant mixture and repeated application on the development of catabolic activity in soil. *Environ. Pollut.* 158, 3411 - 3420.
- Courtney R.G. y Mullen G.J., 2008. Soil quality and barley growth as influenced by the land application of two compost types. *Bioresour. Technol.* 99, 2913 – 2918.
- Dawson J.J.C., Godsiffe E.J., Thompson I.P., Ralebitso-Senior T.K., Killham K.S., Paton G.I., 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon-impacted soils. *Soil Biol. Biochem.* 39, 164-177.
- Day M. y Shaw K., 2005. Procesos biológicos, químicos y físicos del compostaje. En: Stoffella P.J. y Kahn B.A. (eds.), *Utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícola*, Mundi Prensa, Madrid, España, pp. 17- 49.
- Del Panno M.T, Morelli I. S. Engelen B., Berthe-Corti L., 2005. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 305-316.
- Devesa-Rey R., Moldes A. B., Díaz-Fierros F., Barral M.T., 2008. Toxicity of Anllóns river sediment extracts using Microtox and the Zucconi phytotoxicity test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 225–230.
- Días R.L., Ruberto L., Calabró A., Lo Balbo A., Del Panno M.T, Mac Cormack W.P., 2014. Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated antarctic soil. *Polar Biol.* 38, 677-687.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W., 2015. *INFOSTAT versión 2015*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Elshorbagy W. y Alkamali A., 2005. Solid wastes generation from oil and gas industries in United Arab Emirates. *J. Haz. Mat.* B120, 89-99.
- Eweis J.B, Ergas S.J., Chang D.P., Schroeder E.D., 1999. *Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisicoquímicos*, McGraw Hill / Interamericana de España, Madrid, España, 327 pp.

- Fantín L., Wagner-Manslau A., Gwyther N., 2005. Tratamiento de corrientes de desechos oleosos dentro de yacimientos petrolíferos y gasíferos. 6° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, Instituto Argentino del Petróleo y Gas (IAPG), Neuquén, Argentina, 15 pp.
- Filippov L., Thomas F., Filippova I., Yvon J., Morillon-Jeanmaire A., 2009. Stabilization of NaCl-containing cuttings wastes in cement concrete by in situ formed mineral phases. *J. Haz. Mat.* 171, 731-738.
- Gandolfi I., Sicolo M., Franzetti A., Fontanarosa E., Santagostino A., Bestetti G., 2010. Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource Technol.* 101, 568-575.
- García Izquierdo C. y Lobo Bedmar M.C., 2008. Rehabilitación de suelos degradados y contaminados mediante la aplicación de compost. En: Moreno Casco J. y Moral Herrero R. (eds.), *Compostaje*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 427-448.
- Geehan T., Gilmour A., Guo Q., 2007. Tecnología de avanzada en el manejo de residuos de perforación. *Oilfield Review* 18, 60-74.
- Getliff J., McEwen G., Ross S., Richards R., Norman M., 2002. Drilling fluid design and the use of vermiculture for the remediation of drill cuttings. AADE-02-DFWM-HO-16, AADE 2002 Technology Conference "Drilling & Completion Fluids and Waste Management", Houston, Texas, USA, 20 pp. [www.aade.org/app/download/7238841523/AADE-02-DFWM-HO-16.pdf](http://www.aade.org/app/download/7238841523/AADE-02-DFWM-HO-16.pdf)
- González M., Marbán L., Conti M.E., 2011. Reacción del suelo. En: Conti M.E y Giuffré L. (eds.), *Edafología, bases y aplicaciones ambientales argentinas*, 1 ed., Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 297 – 314.
- Grace Liu P. W., Chang T. C., Chen C.H., Wang M. Z., Hsu H.W., 2013. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85, 661-670.
- Grant A. y Briggs A. D., 2002. Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts?. *Mar. Environ. Res.* 53, 95-116.
- Hanay A., Büyüksonmez F., Kiziloglu F.M., Canbolat M.Y., 2004. Reclamation of saline-sodic soils with gypsum and MSW compost. *Compost Sci. Util.* 12, 175-179.
- Haut R.C., Rogers J.D., McDole B.W., Burnett D., Olatubi O., 2007. Minimizing waste during drilling operations. AADE-07-NTCE-54, AADE National

- Technical Conference and Exhibition, April 2007, Houston, Texas, USA, 10 pp. <http://files.harc.edu/Projects/OurWork/MinimizingWasteDrilling.pdf>
- He Z., Yang X., Kahn B.A., Stoffella P.J., Calvert D.V., 2005. Ventajas que suponen la utilización de compost para la nutrición fosfórica, potásica, cálcica, magnésica y de micronutrientes. En: Stoffella P.J. y Kahn B.A. (eds.), Utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícola, Mundi Prensa, Madrid, España, pp. 307-322.
- Hesnawi R.M. y McCartney D.M., 2006. Impact of compost amendments and operating temperature on diesel fuel bioremediation. *J. Environ. Eng. Sci.* 5, 37-45.
- Hester M. W., Shaffer G. P., Willis J. M., DesRoches D. J., 2002. Restored drill cuttings for wetland creation: results of a mesocosm approach to emulate field conditions under varying salinity and hydrologic conditions. DOE/BC/14849-6, Final Report, National Energy Technology Laboratory National Petroleum Technology Office, U.S. Department of Energy, Tulsa, Oklahoma, USA, 110 pp.
- Holdway D., 2002. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 185-203.
- Huang D.L., Zeng G. M., Feng C. L., Hu S., Lai C., Zhao M. H., Su F.F., Tang, L., Liu H.L., 2010. Changes in microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technol.* 101, 4062-4067.
- Hue N.V. y Liu J., 1995. Predicting compost stability. *Compost Sci. Util.* 3, 8 -15.
- Huesemann M.H., Hausmann T.S., Fortman T.J., 2004. Does bioavailability limit biodegradation?. A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation* 15, 261-274.
- Ibarrolaza A. Coppotelli B.M., Del Panno M.T., Donati E.R., Morelli I.S., 2011. Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene and Cr (VI)-contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 111, 26-35.
- Imarhiagbe E. E., Atuanya E. I., Ogiehor I. S., 2013. Co-composting of non-aqueous drilling fluid contaminated cuttings from Ologbo active oilfield with organic manure. *Nig. J. Biotech.* 26, 79-88.
- IAPG, 2009. Consideraciones ambientales para la construcción de locaciones y la gestión de lodos y recortes durante la perforación de pozos. Práctica recomendada, PR IAPG-SS-01-2009-00, Rev. 00, Instituto Argentino del

Petróleo y el Gas (IAPG), 30 pp.  
[http://www.iapg.org.ar/web\\_iapg/sectores/practicas/practicas.htm](http://www.iapg.org.ar/web_iapg/sectores/practicas/practicas.htm)

IPIECA-OGP, 2009. Drilling fluids and health risk management: A guide for drilling personnel, managers and health professionals in the oil and gas industry. OGP Report N° 396, Health Committee by the Drilling Fluids Task Force, International Petroleum Ind. Environ. Conservation Association-International Association of Oil & Gas Producers, United Kingdom, 60 pp.  
<http://www.ogp.org.uk/pubs/396.pdf>

Jenkins S., Barrett-Lennard E. G., Rengel Z., 2010. Impacts of waterlogging and salinity on puccinellia (*Puccinellia ciliata*) and tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*): zonation on saltland with a shallow water table, plant growth, and Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations in the leaves. *Plant Soil* 329, 91-104.

Joel O. y Amajuoyi C., 2009. Determination of selected physicochemical parameters and heavy metals in a drilling cutting dump site at Ezeogwu–Owaza, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 13, 27-3.

Joo H.S., Shoda M., Phae C.G., 2007. Degradation of diesel oil in soil using a food waste composting process. *Biodegradation* 18, 597-605.

Jorgensen, K., Puustinen, J., Suortti, A., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pollut.* 107, 245-254.

Juwarkar A.A., Sing S.K., Mudhoo A., 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 9, 215–288.

Kelley S. y Mendelssohn I. A., 1995. An evaluation of stabilized, water-based drilled cuttings and organic compost as potential sediment sources for marsh restoration and creation in coastal Louisiana. *Ecol. Eng.* 5, 497-517.

Khaleel R., Reddy K. R., Overcash M. R., 1981. Changes in soil physical properties due to organic waste applications: a review. *J. Environ. Qual.* 10, 133-141.

Kisic I., Mesic S., Basic F., Brkic V., Mesic M., Durn G., Zgorelec Z., Bertovic L., 2009. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma* 149, 209-216.

Kowaljaw E., Mazzarino M.J., 2007. Soil restoration in semiarid Patagonia: Chemical and biological response to different compost quality. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1580–1588.

Lakhdar A., Rabhi M., Ghnaya T., Montemurro F., Jedidi N., Abdellya C., 2009. Effectiveness of compost use in salt-affected soil. *Review. J. Haz. Mat.* 171, 29-37.

- Laos F., Satti P., Walter I., Mazzarino M.J., Moyano S., 2000. Nutrient availability of composted and noncomposted residues in a Patagonian Xeric Mollisol. *Biol Fertil Soils* 31, 462 – 469.
- Laos F., Mazzarino M.J., Walter I., Roselli L., Satti P., Moyano S., 2002. Composting of fish offal and biosolids in northwestern Patagonia. *Bioresource Technol.* 81, 179-186.
- Laos F., Mazzarino M.J., Roselli L., Satti P., 2012. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. En: M.J. Mazzarino, P. Satti (eds.), *Compostaje en Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*, Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, pp. 257-270.
- Lavado R.S., 2012. Origen del compost, proceso y compostaje y potencialidad de uso. En: M.J. Mazzarino, P. Satti (eds.), *Compostaje en Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*, Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, pp. 3-12.
- Lee S.H., Oh B. I., Kim J. G., 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technol.* 99, 2578-2587.
- Leuterman A., Candler J.E., Rabke S. P., Staples T., 1999. Meeting the challenges of onshore management of drilling fluid waste with traditional and advanced technologies. 6<sup>th</sup> Annual International Petroleum Environ. Conf. (IPEC), Houston, Texas, USA, 18 pp. <http://ipec.utulsa.edu/Conf/6thIPEC.pdf>
- Lin C., Sheu D.S., Lin T.C., Kao C.M., Grasso D., 2012. Thermophilic biodegradation of diesel oil in food waste composting processes without bioaugmentation. *Environ. Eng. Sci.* 29, 117-123.
- Liu W., Luo Y., Teng Y., Li Z., Ma L.Q., 2010. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environ. Geochem. Health* 32, 23–29.
- Maas, E.V., Hoffman, G.J., 1977. Crop salt tolerance—current assessment. *J. Irrig. Drainage, Div. Am. Soc. Civil Eng.* 103, 115–134.
- McCosh K. y Getliff J., 2003. Drilling fluid chemicals and earthworm toxicity. 10<sup>th</sup> Annual International Petroleum Environmental Conference (IPEC), Houston, Texas, USA, 16 pp. [http://ipec.utulsa.edu/Conf2003/Papers/mccosh\\_getliff\\_31.pdf](http://ipec.utulsa.edu/Conf2003/Papers/mccosh_getliff_31.pdf)
- Mahdy A.M., 2011. Soil properties and wheat growth and nutrients as affected by compost amendment under saline water irrigation. *Pedosphere* 21, 773-781.
- Margesin R., Schinner F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 650 – 663.

- Marín J.A., Hernández T., García C., 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98, 185-195.
- Marín J.A., Moreno J.L., Hernández T., García C., 2006. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation* 17, 251-261.
- Márquez P.B., Díaz Blanco M.J, Cabrera Capitán F., 2008. Factores que afectan el proceso de compostaje. En: Moreno Casco J. y Moral Herrero R. (eds.), *Compostaje*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 93-110.
- Marschner P., Kandeler E., Marschner B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35, 453-461.
- Mazzarino M.J. y Satti P.S., 2012. *Compostaje en Argentina: Experiencias de producción, calidad y uso*. UNRN-Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, 349 pp.
- Mazzarino M.J., Satti P., Roselli L., 2012 a. Indicadores de estabilidad, madurez y calidad de compost. En: M.J. Mazzarino, P. Satti (eds.), *Compostaje en Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*, UNRN-Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, pp. 13-28.
- Mazzarino M.J., Satti P., Laos F., Roselli L., Crego M.P., Kowaljow E., Fernández H., Poulsen L. 2012 b. Compostaje de biosólidos: 12 años de la planta de Bariloche. En: M.J. Mazzarino, P. Satti (eds.), *Compostaje en Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*, UNRN-Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, pp. 99 - 106.
- McMillen S., Smart R., Bernier R., 2002. Biotreating E&P Wastes: Lessons learned from 1992-2002. 9<sup>th</sup> Annual International Petroleum Environmental Conference (IPEC), Albuquerque, NM, USA, 14 pp. [http://ipec.utulsa.edu/Ipec/Conf2002/mcmillen\\_smart\\_bernier\\_122.pdf](http://ipec.utulsa.edu/Ipec/Conf2002/mcmillen_smart_bernier_122.pdf).
- Medaura M., Barbeito M., Clausen R., Videla S., Ercoli E., 2005. Compostaje: Un nuevo enfoque a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. 6<sup>o</sup> Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, Instituto Argentino del Petróleo y Gas (IAPG), Neuquén, Argentina.
- Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362-1375.
- Méndez-Natera J.R., Otahola-Gómez V.A., Pereira-Garantón R.E., Simosa-Mallé J.A., Tellis L., Zabala E., 2007. Comparación del desecho de un fluido de

perforación base agua no disperso con la fertilización química en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*). IDESIA Chile 25, 7-20.

- Miñón D.P., Silva M.A., Colabelli M.R., González G.M. Enrique M.L., Viretto P.E., 2015. Características productivas del agropiro en la norpatagonia. En: Tecnología aplicada para el establecimiento y manejo de pasturas de agropiro en ambientes de secano en el noreste patagónico, Informe técnico N° 38, año 9, N° 20, EEA Valle Inferior del Río Negro – Convenio Provincia de Río Negro-INTA, Argentina, pp. 1 – 10.
- Morelli I.S., Del Panno M.T., De Antoni G.L., Paineira M.T., 2005. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. Int. Biodeter. Biodegr. 55, 271-278.
- Moreno Casco J. y Bernat S.M., 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno Casco J. y Moral Herrero R. (eds.), Compostaje, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 111- 140.
- Moretto L.M., Silvestri S., Ugo P., Zorzi G., Abbondanzi F., Baiocchi C., Iacondini A., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. J. Haz. Mat. B126, 141-148.
- Namkoong W., Young E.Y., Park J.S., Choi J.Y., 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environ. Pollut. 119, 23-31.
- Neff J. M., 2008. Estimation of bioavailability of metals from drilling mud barite. Integr. Environ. Assess. Manag 4, 184-193.
- Nicholson C.A. y Fathepure B.Z., 2004. Biodegradation on benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. Appl. Environ. Microb. 70, 1222-1225.
- Nicholson C.A. y Fathepure B.Z., 2005. Aerobic biodegradation of benzene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. FEMS Microbiol. Lett. 245, 257-262.
- Norman M., Ross S., McEwen G., Getliff J. 2002. Minimizing environmental impacts and maximizing hole stability; the significance of drilling with synthetic fluids in New Zealand. New Zealand Petroleum Conference Proceedings, February 2002, Auckland, New Zealand, pp. 1-12.
- OCDE, 2006. Guidelines for the testing of chemicals: Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test, N° 208, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), 21 pp. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>
- Ochoa M.A., 1994. Producción de forraje en suelos salinos. Informe E.E.A. INTA Rama Caída, Mendoza, Argentina, 11 pp. <http://www.produccion->

[animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/suelos\\_salinos/26-produccion\\_forraje\\_en\\_suelos\\_salinos.pdf](http://animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/suelos_salinos/26-produccion_forraje_en_suelos_salinos.pdf)

- OGP, 2003. Environmental aspects of the use and disposal of non-aqueous drilling fluids associated with offshore oil & gas operations. Report N° 342, International Association of Oil & Gas Producers (OGP), United Kingdom, 114 pp. [www.ogp.org.uk/pubs/342.pdf](http://www.ogp.org.uk/pubs/342.pdf)
- Okparanma R.N., Ayotamuno J.M., Peremelade P.A., 2009. Bioremediation of hydrocarbon contaminated-oil field drill-cuttings with bacterial isolates. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 3, 131-140.
- Onwukwe S.I. y Nwakaudu M.S., 2012. Drilling wastes generation and management approach. *Int. J. of Environ. Sci. Develop.* 3, 252-257.
- Ouni Y., Lakhdar A., Scelzab R., Scotti R., Abdelly C., Barhoumi Z., Rao M.A., 2013. Effects of two composts and two grasses on microbial biomass and biological activity in a salt-affected soil. *Ecol. Eng.* 60, 363 – 369.
- Paiuk B., 2005. Nuevas tecnologías en emulsiones inversas. 6° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Ind. del Petróleo y del Gas - Instituto Argentino de Petróleo y Gas (IAPG), Neuquén, Argentina, 14 pp.
- Parenteau S. y Lyon F., 2001. Composting: A biotreatment process for hydrocarbon contaminated drilling wastes. 8<sup>th</sup> Annual International Petroleum Environmental Conference (IPEC), Houston, TX, USA, 16 pp. [http://ipec.utulsa.edu/Conf2001/parenteau\\_10.pdf](http://ipec.utulsa.edu/Conf2001/parenteau_10.pdf)
- Pathak H. y Rao D. L. N., 1998. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 695 - 702.
- Pozzo Ardizzi G., 2000. Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera por la metodología de biodegradación con bioaumentación. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), Porto Alegre, Brasil, 22 pp. <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/resisoli/iii-130.pdf>
- Ratto S.E., 2011. Coloides e intercambio de iones. En: Conti M.E y Giuffré L. (eds.), *Edafología, bases y aplicaciones ambientales argentinas*, 1 ed., Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 255 - 296.
- Reasoner D. y Geldreich E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microb.* 49, 1 - 7.
- Reis J.C., 1996. *Environmental control in petroleum engineering*. Gulf Publishing Company, Houston, Texas, USA, 287 pp.

- Rhykerd R.L., Weaver E.W., McInnes K.J., 1995. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environ. Pollut.* 90, 127-130.
- Richards L.A., 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. United States Salinity Laboratory Staff, Agriculture Handbook N° 60, United States Department of Agriculture, USA, 166 pp.
- Riffaldi R., Levi-Minzi R., Cardelli R., Palumbo S., Saviozzi A., 2006. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 170, 3-15.
- Rojas-Avelizapa N., Olvera-Barrera E., Fernández-Linares L., 2005. Feasibility study of bioremediation of a drilling-waste-polluted soil: stimulation of microbial activities and hydrocarbon removal. *J. Environ. Sci. Health Part A* 40, 2189–2201.
- Rojas-Avelizapa N.G., Roldán-Carrillo T.G., Arce-Ortega J.M., Ramírez-Islas M.E., Zegarra-Martínez H.G., Fernández-Linares L.C., 2006. Enhancement of hydrocarbon removal in a clay and drilling waste polluted soil. *Soil and Sediment Contamination* 15, 417-428.
- Rojas-Avelizapa N., Roldán-Castillo T., Zegarra-Martínez H., Muñoz-Colunga A., Fernández-Linares L., 2007. A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere* 66, 1595-1600.
- Ros M., Rodríguez C., García C., Hernández T., 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technol.* 101, 6919-6923.
- Rynk R., Van de Kamp, M., Willson, G.B., Singley, M.E., Richard, T.L., Kolega, J.J., Gouin, F.R., Laliberty Jr., L., Kay, D., Murphy, D.W., Hoitink, H.A., Brinton, W.F., 1992. On-farm Composting Handbook. Natural Resources, Agriculture, and Engineering Service. NRAES-54, Cooperative Extension, Ithaca, NY, USA, 186 pp.
- Sadiq R., Husain T., Veitch B., Bose N., 2003. Evaluation of generic types of drilling fluid using a risk-based analytic hierarchy process. *Environ. Manage.* 32, 778-787.
- Sánchez F.I. y Rubio Delgado J.L., 2008. Efecto de la aplicación de composta sobre las propiedades físicas y químicas del suelo. En: Moreno Casco J. y Moral Herrero R. (eds.), *Compostaje*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 305-328.
- Saretsky M., Wilson M., Wyse S., 2002. Bioremediation of drill cuttings in an arid climate. 9<sup>th</sup> Annual International Petroleum Environ. Conference (IPEC) Albuquerque, New México, USA, 8 pp.  
[http://ipec.utulsa.edu/Conf2002/saretsky\\_3.pdf](http://ipec.utulsa.edu/Conf2002/saretsky_3.pdf)

- Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S., 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. *Environ. Pollut.* 136, 187-195.
- Sastre-Conde I., Lobo M. C., Beltrán-Hernández R. I., Poggi-Varaldo H.M., 2015. Remediation of saline soils by a two-step process: Washing and amendment with sludge. *Geoderma* 247-248, 140 – 150.
- Satti P., Mazzarino M.J., Laos F., Roselli L., Crego M.P., 2012. Compostaje de materiales de diferente origen: Experiencias del Grupo de Suelos del CRUB. En: M.J. Mazzarino, P. Satti (eds.), *Compostaje en Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*, UNRN-Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina, pp. 75-98.
- Savage G.M. y Díaz L.F., 2007. Bioremediation. En: Díaz L.F., De Bertoldi M., Bidlingmaier W. y Stentiford E. (eds.). *Compost Science and Technology*, 1° ed., Waste Management Series 8, Elsevier Science, Amsterdam, Holanda, pp. 159-175.
- Saviozzi A., Cardelli R., Cozzolino M., 2009. Bioremediation with compost of a diesel-contaminated soil: monitoring by dehydrogenase activity and basal respiration. *Compost Sci. Util.* 17, 55-60.
- Sayara T., Sarrá M., Sánchez A., 2010 a. Optimization and enhancement of soil bioremediation by composting using the experimental design technique. *Biodegradation* 21, 345-356.
- Sayara T., Sarrá M., Sánchez A., 2010 b. Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting, *J. Hazard. Mater.* 179, 999-1006.
- Sayara T., Borràs E., Caminal G., Sarrà M., Sánchez A., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 859-865.
- Scheibili F.J., 2002. Co-composting treatment of hydrocarbon impaired drilling wastes. ESAA Remediation Technologies Symposium, Oct. 2002, Alberta, Canadá, 12 pp. <http://www.esaa.org/wp-content/uploads/2015/06/02-24ScheibliPaper.pdf>
- Seenivasan R., Prasath V., Mohanraj R., 2015. Restoration of sodic soils involving chemical and biological amendments and phytoremediation by *Eucalyptus camaldulensis* in a semiarid region. *Environ. Geochem. Health* 37, 575-86.

- Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollut.* 112, 269-283.
- Soil Survey Staff, 2011. "Soil Survey Laboratory Information Manual". Soil Survey Investigations Report No. 45, Version 2.0. R. Burt (ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, 530 pp.
- Sparks D.L. (ed.), Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., Sumner M.E., 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*, Book Series N° 5, SSSA, ASA, Madison, USA, 1390 pp.
- Sparks D.L., 2003. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, Elsevier Science, USA. 367 pp.
- Stehouwer R.C y Macneal K., 2003. Use of yard trimmings for restoration of saline soil incineration ash. *Compost Sci. Util.* 11, 51-60.
- Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P., 2009. Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes. *Water Air Soil Pollut.* 202, 211 - 228.
- Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P., 2010. Optimisation research of petroleum hydrocarbon biodegradation in weathered drilling wastes from waste pits. *Waste Manage. Res.* 28, 1065-1075.
- Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P., 2012. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technol.* 125, 1-10.
- Stoffella P.J. y Khan B.A. (eds.), 2005. *Utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícola*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 397 pp.
- Tabatabai M.A., 1994. Soil Enzymes. En: Mickelson S. H. y Bigham J. M. (eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, Book Series N° 5, SSSA, ASA, Madison, USA, 1121 pp.
- Taccari M., Milanovic V., Comitini F., Casucci C., Ciani M., 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacteria community. *Int. Biodeter. Biodegr.* 66, 39-46.
- Tejada M. y González J.L., 2003. Effects of the application of a compost originating from crushed cotton gin residues on wheat yield under dryland conditions. *Europ. J. Agronomy* 19, 357 – 368.
- Tejada M., García C., González J.L., Hernández M.T., 2006. Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: Influence on the physical, chemical and biological properties of soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1413-1421.

- Tejada M., González J.L., Hernández M.T., García C., 2008. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties. *Bioresource Technol.* 99, 2872-2880.
- Teng Y., Yongming L., Lifeng P., Dexun Z., Zhengao L., Christie P., 2010. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation* 21, 167-178.
- Terzaghi C., Buffagni M., Cantelli D., Bonfanti P., Camatini M., 1998. Physical-chemical and ecotoxicological evaluation of water-based drilling fluids used in Italian off-shore. *Chemosphere* 37, 2859-2871.
- Tiquia S.M., 2005. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J. Appl. Microbiol.* 99, 816-828.
- Tittarelli F., Petruzzelli G., Pezzarossa B., Civilini M., Benedetti A., Sequi P., 2007. Quality and agronomic use of compost. En: Díaz L.F., De Bertoldi M., Bidlingmaier W. y Stentiford E. (eds.). *Compost Science and Technology*, 1º ed., Waste Management Series 8, Elsevier Science, Amsterdam, Holanda, pp. 119-157.
- TMECC, 2001. Methods 03.01-A and 03.01-B: Quick-test for bulk density, porosity/pore space, free airspace and water-holding capacity of compost. En: The United States Composting Council, *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*, N.Y., USA.
- Tognetti C., Mazzarino M.J., Laos F., 2007 a. Cocomposting biosolids and municipal organic waste: effects of process management on stabilization and quality. *Biol. Fertil. Soils* 43, 387 - 397.
- Tognetti C., Mazzarino M.J., Laos F., 2007 b. Improving the quality of municipal organic waste compost. *Bioresource Technol.* 98, 1067-1076.
- Tognetti C., Mazzarino M.J., Laos F., 2008. Compost of municipal organic waste: Effects of different management practices on degradability and nutrient release capacity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2290-2295.
- TPHCWG, 1998. Analysis of petroleum hydrocarbon in environmental media, Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, Volume 1, Wade Weisman (ed.), Amherst Scientific Publishers, Massachusetts, USA, 98 pp.
- Universo YPF, 2010. Con energías renovadas: Gestión Integral de Residuos Yacimiento El Portón, Revista Universo YPF N° 8, Jun-Ago. 2010, YPF S.A, Argentina, pp. 20-23.
- US DOE, 2016. Drilling Waste Management Information System. Argonne National Laboratory, ChevronTexaco and Marathon, U.S. Department of Energy's

(DOE's) Natural Gas & Oil Technology Partnership Program.  
<http://web.ead.anl.gov/dwm>

USEPA, 1994. Composting yard trimmings and municipal solid waste. EPA 530-R-94-003, United States Environmental Protection Agency (USEPA), Office of Solid Waste and Emergency Response, USA, 141 pp.

USEPA, 2000 a. Profile of the oil and gas extraction industry, Sector Notebook Project. EPA/310-R-99-006, Office of Compliance, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, 165 pp.

USEPA, 2000 b. Development document for final effluent limitations guidelines and standards for synthetic-based drilling fluids and other non-aqueous drilling fluids in the oil and gas extraction point source category. EPA-821-B-00-013, Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, 398 pp.

USEPA, 2007. The use of soil amendments for remediation, revitalization and reuse. EPA 542-R-07-013, United States Environmental Protection Agency, Solid Waste and Emergency Response, USA, 59 pp.

USEPA-SW846, 1994. Method 7470: Mercury in liquid waste (manual cold-vapor technique), Rev. 1, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 6 pp.

USEPA-SW846, 2004. Method 1310 b: Extraction procedure toxicity test method and structural integrity test, Rev. 2, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 18 pp.

USEPA-SW846, 2007. Method 3550c: Ultrasonic Extraction, Rev. 3, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 17 pp.

USEPA-SW846, 2007. Method 7000 b: Flame atomic absorption spectrophotometry, Rev. 2, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 23 pp.

USEPA-SW846, 2007. Method 7010: Graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, Rev. 0, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 24 pp.

USEPA-SW846, 2007. Method 8015c: Nonhalogenated organics by gas chromatography, Rev. 3, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 36 pp.

- USEPA-SW846, 2014. Method 5021a: Volatile Organic Compounds (VOCs) in various sample matrices using equilibrium headspace analysis, Rev. 2, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 31 pp.
- USEPA-SW846, 2014. Method 8270 d: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry, Rev. 5, Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods Compendium. United States Environmental Protection Agency, USA, 71 pp.
- Vallini G., Di Gregorio S., Pera A., Cunha Quada A.C.F., 2002. Exploitation of composting management for either reclamation of organic wastes or solid-phase treatment of contaminated environmental matrices. *Environ. Rev.* 10, 195-207.
- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., Ryckeboer, J., 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ. Pollut.* 125, 361-368.
- Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 67, 503 - 549.
- Vardaro S., Videla S., Ercoli E., Calleja C., 2005. Problemática ambiental generada por el uso de emulsión inversa en perforación petrolera. 6° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Ind. del Petróleo y del Gas - Instituto Argentino de Petróleo y Gas (IAPG), Neuquén, Argentina, 9 pp.
- Vecchioli G., Costanza O., Selenco J., 2003. Biorremediación de suelos asistida con residuos industriales. 5° Jornadas de Preservación del Aire, Agua y Suelo en la Ind. del Petróleo y del Gas, Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG), Mendoza, Argentina, 8 pp.
- Veil J.A., Burke C.J., Moses D.O., 1995. Synthetic drilling fluids: A pollution prevention opportunity for the oil and gas industry. 68<sup>th</sup> Annual Conference and Exposition of the Water Environment Federation, Miami, USA, 11 pp. <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/184270>
- Walker D.J y Bernal M. P., 2008. The effects of olive mill waste compost and poultry manure on the availability and plant uptake of nutrients in a highly saline soil. *Bioresource Technol.* 99, 396 – 403.
- Wang C. H., Wu S. H., Zhou S. L., Shi Y. X., Song J., 2017. Characteristics and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils: A Review. *Pedosphere.* 27, 17-26.

- Wang Z., Xu Y., Zhao J. Li F., Gao D., Xing B., 2011. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *J. Haz. Mat.* 190, 677-685.
- Ward O.P., 2004. The industrial sustainability of bioremediation processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1- 4.
- Wilcke W., 2007. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma* 141, 157–166.
- Willis J., Hester M., Shaffer G., 2005. A mesocosm evaluation of processed drill cuttings for wetland restoration. *Ecol. Eng.* 25, 41-50.
- Wojtanowicz A.K., 2008. Oilfield waste disposal control. En: Orszulik S.T. (ed.), *Environmental Technology in the Oil Industry*, Springer Verlag, Netherlands, pp. 123–154.
- Wrenn B.A. y Venosa A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252 - 258.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S., 2011. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J. Environ. Biol.* 32, 667 - 685.
- Zahrán H.H., 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 211–223.
- Zeytin S. y Baran A., 2003. Influences of composted hazelnut husk on some physical properties of soils. *Bioresource Technol.* 88, 241-244.
- Zhang K., Hua X. F., Han H. L., Wang J., Miao C. C., Xu Y. Y., Huang Z. D. Zhang H., Yang J. M., Jin W. B., Liu Y. M, Liu Z., 2008. Enhanced bioaugmentation of petroleum and salt contaminated soil using wheat straw. *Chemosphere* 73, 1387-1392.
- Zhang Y., Zhu Y-G., Houot S., Qiao M., Nunan N., Garnier P., 2011. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated soil through composting with fresh organic wastes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1574-1584.
- Zhang T., Wang T., Liu K.S., Wang L., Wang K., Zhou Y., 2015. Effects of different amendments for the reclamation of coastal saline soil on soil nutrient dynamics and electrical conductivity responses. *Agr. Water Manage.* 159, 115-122.
- Ziegenfuss P.S. y Williams R.T., 1991. Hazardous materials composting. *J. Haz. Mat.* 28, 91-99.

- Zubillaga M.S y Lavado R.S., 2006. Phytotoxicity of biosolids composts at different degrees of maturity compared to biosolids and animal manures. *Compost Sci. Util.* 14, 267-270.
- Zucconi F., Forte M., Monaco A., De Bertoldi M., 1981 a. Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle* 22, 27-29.
- Zucconi F., Pera A., Forte M. De Bertoldi M., 1981 b. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.
- Zucconi F. y De Bertoldi M., 1987. Compost specifications for the production and characterization of compost from MSW. En: De Bertoldi M., Ferranti M.P., L'Hermite P., Zucconi F. (eds), *Compost: production, quality and use*, Comm. of the European Communities, Elsevier Applied Science, Londres, Reino Unido, pp 30-50.

## Trabajo de respaldo

---

### Bioremediation of heavily hydrocarbon-contaminated drilling wastes by composting

G. Paladino, J. P. Arrigoni, P. Satti, I. Morelli, V. Mora, F. Laos  
Int. J. Environ. Sci. Technol. 13(9): 2227-2238.  
DOI 10.1007/s13762-016-1057-5

# *Bioremediation of heavily hydrocarbon-contaminated drilling wastes by composting*

**G. Paladino, J. P. Arrigoni, P. Satti,  
I. Morelli, V. Mora & F. Laos**

**International Journal of  
Environmental Science and  
Technology**

ISSN 1735-1472  
Volume 13  
Number 9

Int. J. Environ. Sci. Technol. (2016)  
13:2227-2238  
DOI 10.1007/s13762-016-1057-5



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Islamic Azad University (IAU). This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Bioremediation of heavily hydrocarbon-contaminated drilling wastes by composting

G. Paladino<sup>1,2</sup> · J. P. Arrigoni<sup>2</sup> · P. Satti<sup>2,3</sup> · I. Morelli<sup>4,5</sup> · V. Mora<sup>5</sup> · F. Laos<sup>2</sup>

Received: 10 December 2015 / Revised: 19 April 2016 / Accepted: 27 June 2016 / Published online: 12 July 2016  
 © Islamic Azad University (IAU) 2016

**Abstract** Oil-based drilling cuttings comprise a large and hazardous waste stream generated by oil and gas wells drilling operations. Oil-based cuttings are muddy materials with high contents of salts and hydrocarbons. Composting strategies have shown to be effective in the biodegradation of petroleum hydrocarbons, and it offers numerous advantages in comparison with other bioremediation methods. In order to assess the effectiveness of drilling cuttings bioremediation by composting with food and garden wastes, an experiment was conducted in 60-L reactors for 151 days. Four treatments were carried out: only oil-based cuttings, two proportions (in a volume basis) of organic wastes to drilling cuttings (33 and 75 %) and only organic wastes (as a traditional composting reference), with pine-tree woodchips as bulking agent. High degradation percentages of total hydrocarbons ( $\approx 82$  %), n-alkanes ( $\approx 96$  %) and the 16 USEPA-listed polycyclic aromatic hydrocarbons ( $\approx 93$  %) were reached in the treatment with 75 % of organic wastes, and applying 33 % of organic wastes was not more effective than not applying organic

wastes for the drilling cuttings hydrocarbons biodegradation. Furthermore, in the treatment with 75 % of organic wastes, alkanes half-life and polycyclic aromatic hydrocarbons half-life were about 10 times and four times lower, respectively, than those in the treatment with 33 % of organic wastes. Possibly, lower hydrocarbons and salts initial concentrations (i.e., lower toxicity), higher microbial counts, adequate nutrient proportions and water content supported a high biological activity with a consequent elevated biodegradation rate in the treatment with 75 % of organic wastes.

**Keywords** Drilling wastes treatment · Hydrocarbons biodegradation · Oil-based drilling cuttings · Organic wastes

## Introduction

Oil-based drilling cuttings are one of the largest fractions of the hazardous wastes generated by oil and gas wells drilling operations. This waste stream is composed of spent drilling fluids and borehole rock cuttings. Oil-based cuttings are muddy consistency materials with high contents of salts and hydrocarbons, which come from drilling fluid additives and the reservoir geological formation (Arce-Ortega et al. 2004; Ball et al. 2012). Proper management of drilling cuttings is a current concern for oil companies and environmental protection authorities, since toxicity and high rate of generation of this waste make it difficult to achieve effective treatment solutions at acceptable costs (Onwukwe and Nwakaudu 2012).

Composting bioremediation strategies rely on organic wastes (i.e., composting feedstock) application to contaminated materials, with the aim of promoting biological

✉ G. Paladino  
gabrielapaladino@gmail.com

<sup>1</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina  
<sup>2</sup> Universidad Nacional de Río Negro, Sede Andina, Mitre 630, 8400 Bariloche, Río Negro, Argentina  
<sup>3</sup> Universidad Nacional del Comahue, CRUB, Quintral 1250, 8400 Bariloche, Río Negro, Argentina  
<sup>4</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC – PBA), La Plata, Argentina  
<sup>5</sup> CINDEFI, Universidad Nacional de La Plata, CCT La Plata, CONICET, Calle 50 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina

activity and, consequently, the biodegradation of pollutants. Organic wastes application provides a broad range of microorganisms and readily available nutrients and improves structure and water retaining capacity of the material undergoing treatment. In addition, this low-cost strategy allows processing of large volumes of wastes, with the extra benefit of simultaneous treatment of more than one waste streams (Savage and Díaz 2007; Chen et al. 2015). In oilfields staff offices and accommodation camps, available wastes are food, gardening and wood refuses (Elshorbagy and Alkamali 2005). Thus, using these types of organic wastes for the remediation of drilling cuttings could greatly cooperate with oilfields waste management programs.

Governing factors affecting composting bioremediation (i.e., nutrients content, pH and oxygen and water availability) depend on the amount and type of the organic wastes applied. In heavily hydrocarbon-contaminated materials, high-carbon concentration can lead to a C/N ratio imbalance, due to nitrogen deficiency, greatly affecting microbial activity. Thus, the amount of N supplied by organic wastes is of vital importance. However, if large amounts of organic wastes are applied, this carbon source could be preferentially degraded over the target compounds and hydrocarbon biodegradation may be delayed (Namkoong et al. 2002; Antizar-Ladislao et al. 2005). Likewise, even though water provided by organic wastes is an advantage in composting bioremediation strategies, it is essential that the water content of the composting mass does not affect oxygen flow (Joo et al. 2007).

On the other hand, the adsorption/desorption processes of the contaminant to the matrix are regulated not only by pollutants volatility, water solubility and affinity for organic matter, but also by matrix porosity and composition. These factors, which are highly dependent on the mixtures to be composted, and therefore on the type and the amount of organic wastes applied, will regulate contaminants bioavailability and biodegradability (Huesemann et al. 2004; Grace Liu et al. 2013).

Oil-based drilling cuttings are a biologically impoverished and cohesive oil-rich silts and clays admixture (Ball et al. 2012), very different from a hydrocarbon-contaminated soil. Bioremediation of contaminated soils by composting has been extensively reported in scientific literature, and these methods have proven to be effective in petroleum hydrocarbons degradation (Van Gestel et al. 2003; Antizar-Ladislao et al. 2004; Moretto et al. 2005; Joo et al. 2007; Zhang et al. 2011; Laos et al. 2012; Chen et al. 2015). However, drilling cuttings composting bioremediation reports are scarce in scientific literature. In the few studies found, only two types of organic wastes were used: poultry manure (Saretsky et al. 2002; Ayotamuno et al.

2009) and straw with the addition of inorganic fertilization (Rojas-Avelizapa et al. 2007). In these trials, high hydrocarbons removal efficiency was attained (60–90 %). Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no reports of trials using food and gardening organic wastes for the bioremediation of drilling cuttings by composting.

The overall objective of this work was to assess the remediation of heavily hydrocarbon-contaminated drilling cuttings through composting, using food and garden wastes. Particularly, we attempted to study the effect of applying different proportions of organic wastes on hydrocarbons biodegradation according to their type and molecular weight.

This study was carried out from December 2013 to April 2014, in the Environmental Sciences Laboratory of the Universidad Nacional de Río Negro—Sede Andina.

## Materials and methods

### Collection and pretreatment of drilling cuttings and organic wastes

Oil-based drilling cuttings (OBCs) were collected in an oilfield located in the north of Argentine Patagonia region. In order to prevent mixing with contaminated soil, OBCs were taken directly from the well site, before they were transported to the storage repositories. Source separated organic wastes were collected from a company staff buffet. These consisted of refuses from raw vegetables, cooked meals and napkins paper. Fresh organic wastes (OW) were shredded (rough particle size < 3 cm), in order to increase its specific surface, homogenized and mixed with 20 % by volume of grass clippings. Pine-tree woodchips (WChs), with a prevailing diameter of 1–3 cm and made from untreated wood, were used as bulking agent. Representative samples of the three raw materials (OBCs, OW and WChs) were taken for chemical analyses.

### Experimental design and monitoring

Twelve plastic drums with lid (60 L) were used as reactors for the experiment. Reactors were thermally insulated with a 3-cm-thick layer of polyurethane foam. A metal mesh was placed 10 cm up from the drum bottom to allow leachates separation and collection. Four treatments were conducted. In each treatment, 30 L of woodchips was mixed with 30 L of the following composting mixtures, to reach a final volume of 60 L: OBC alone (0 % OW), two proportions in volume of OBC and OW (33 and 75 % OW), and only OW (100 % OW). The last one was used as a traditional composting reference. Each treatment was run in triplicate. Treatments composition is detailed in Table 1.

**Table 1** Composting mixture proportions in performed treatments

Treatment (% OW) <sup>a</sup>	Volume (L) <sup>b</sup>				OBC:OW (v:v)	Dry weight (kg) <sup>b</sup>				OBC:OW (dw:dw)	Water content <sup>b</sup> (%)
	OBC	OW	WCh	Total		OBC	OW	WCh	Total		
0	30	0	30	60	1:0	30.3	0	4.9	35.2	1:0	27
33	20	10	30	60	1:0.5	20.0	1.2	4.3	25.5	1:0.1	35
75	7.5	22.5	30	60	1:3	7.0	2.8	3.7	13.5	1:0.4	55
100	0	30	30	60	0:1	0	3.6	4.3	7.9	0:1	70

<sup>a</sup> OW percentage in volume

<sup>b</sup> Values are the means of three replicates (i.e., reactors) per treatment

The composting experiment was conducted outside during 151 days, from December 2013 to April 2014 (summer and early autumn). Using temperature probes connected to a data logger, each reactor temperature was recorded automatically every 30 min. Ambient temperature was monitored with a maximum–minimum thermometer. In order to allow air exchange and homogenize, reactors were uncovered twice a week and composting mass was manually turned.

### Sampling

One composite sample was taken from each reactor at 0, 4, 8, 15, 30, 61, 94 and 151 days, for hydrocarbons analysis and chemical characterization. Composite samples, of approximately 150 g each, consisted of three subsamples, taken at the bottom, in the middle and at the top of the reactor. Sampling was done with an Edelman-type auger. In addition, at the beginning of the experiment, one composite sample was taken under sterile conditions for microbiological analysis. In every sampling instance, gravimetric water content was determined by oven drying 10 g of sample at 70 °C (to avoid volatile compounds losses) to constant weight.

### Chemical analysis

Air-dried samples were sieved (<1 cm) in order to remove woodchips. Electrical conductivity (EC) and pH were measured in 1:10 ratio water extracts. Phosphorus was extracted in NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M (1:100) and determined by the molybdate–ascorbic acid method (Laos et al. 2002). Total nitrogen (TN: organic N + N-NH<sub>4</sub>) was determined by semimicro Kjeldahl and total organic carbon (TOC) by the Walkley–Black method (Sparks et al. 1996).

### Microbiological analysis

The enumeration of heterotrophic and hydrocarbon-degrading bacteria was performed in fresh unsieved samples, using selective culture methods. Serial tenfold sample

dilutions were spread on plates with R2A agar medium supplemented with cycloheximide (7 % w/v), for cultivable heterotrophic aerobic bacteria count (Reasoner and Geldreich 1985). Enumeration of hydrocarbon-degrading bacteria was performed by the most probable number (MPN) technique, using a mineral liquid medium in 96-well microtiter plates. For total hydrocarbon, alkane and PAH-degrading bacteria counts, sterile diesel oil, n-hexadecane and a PAHs solution were used as a sole carbon source, respectively; 1 mL per liter of resazurin (0.1 % w/v) was used as a color indicator in the liquid medium, except for PAH counts. The plates were incubated at 25 ± 1 °C for 7 days for cultivable heterotrophic bacterial growth and for 21 days for hydrocarbon degraders (Wrenn and Venosa 1996; Morelli et al. 2005).

### Hydrocarbons analysis

Hydrocarbons were analyzed only in 0, 33 and 75 % OW samples. Hydrocarbons were extracted by sonication and quantified by gas chromatography (GC) (US EPA 2007). Briefly, 5 g of moist and sieved (<1 cm) sample was mixed with 5 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (purified by heating at 400 °C for 4 h). Hydrocarbons were extracted with 15 mL of acetone:hexane 1:1 (v:v) in an ultrasonic bath (400 W at 30–40 °C for 30 min). Each sample extraction was repeated three times, and supernatants were combined in one. This hydrocarbon suspension was purified on a 100 % activated silica gel column (60–120 mesh), in order to retain polar extracted compounds from organic wastes (British Columbia MELP Canada 2004); 5 µL aliquot of purified extract was splitless injected (250 °C) into the Perkin-Elmer *Clarus 500* GC, equipped with a PE-5HT column (30 m × 0.25 mm × 0.10 µm) and a flame ionization detector (FID). Helium was used as the carrier gas at a flow of 2 ml/min. The GC column temperature program was 4 min at 50 °C, 4 °C/min up to 150 °C, 10 °C/min up to 280 °C, and hold for 13 min. Stock solutions were used as external standards for the identification of 18 n-alkanes (NJEPH Aliphatics Frac. Check Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA) and the 16 USEPA-listed PAHs (Calibration Mix #5, Restek, Bellefonte, PA, USA) (Table 2).



**Table 2** Identified and quantified n-alkanes and PAHs

<i>n-alkanes</i>	
<C10	n-nonane
C10–C21	n-decane; n-dodecane; n-tetradecane; n-hexadecane; n-octadecane; n-eicosane; n-heneicosane
C22–C35	n-docosane; n-tetracosane; n-hexacosane; n-octacosane; n-triacontane; n-dotriacontane; n-tetracontane
C36–C40	n-hexatriacontane; n-octatriacontane; n-tetracontane
<i>PAHs</i>	
2–3 rings	naphtalene; acenaphthylene; acenaphthene; fluorene; phenanthrene; anthracene; fluoranthrene
4–6 rings	pyrene; benzo(a)anthracene; crysene; benzo(b)fluoranthene; benzo(k)fluoranthene; benzo(a)pyrene; indeno(1,2,3-cd)pyrene; dibenz(a,h)anthracene; benzo(g,h,i)perylene

Dibenzothiophene 98 % and n-hexadecane 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were employed as internal standards for compounds quantification once identified. In each sample chromatogram, the concentration of extracted total hydrocarbon (TH) was quantified by the area under the curve between retention times corresponding to n-nonane (C9) and n-tetracontane (C40).

### Statistical analysis

Longitudinal datasets were modeled using generalized linear model (GLM). Days, OW percentage (i.e., treatments) and time–OW % interaction were specified as fixed effects. Main effects means differences were analyzed by LSD Fisher test, with a confidence limit  $\geq 95$  %. For non-longitudinal data, one-way ANOVA was used to determine significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments and post hoc Tukey tests ( $\alpha = 0.05$ ) were applied for means separation. All analyses were performed with INFOSTAT v. 2015 software (Di Rienzo et al. 2015).

## Results and discussion

### Raw materials and composting mixtures characterization

#### *Chemical characteristics and hydrocarbons content*

Raw materials characteristics are detailed in Table 3. Both OW and OBC showed high EC values, considering that EC was measured in a tenfold dilution. Organic wastes shredding may have contributed to the release of soluble salts. In cooked meals, added salt could also account for high EC values that were measured in OW. Organic wastes TH, total alkanes and total PAH concentrations were around 15–20 % of those determined in OBC, whereas woodchips hydrocarbon concentrations were negligible. Alkanes <10 carbons (potentially volatile) were not detected in any of the three primary materials. Alkanes of high molecular weight (C36–C40) were not detected in

**Table 3** Drilling cuttings, organic wastes and bulking agent characterization

	OBCs	OW	Woodchips
Water content (%)	18	79	54
pH (H <sub>2</sub> O) 1:10	8.5	8.9	6.0
EC 1:10 (dS m <sup>-1</sup> )	5.0	7.1	0.1
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	72	393	485
TN (g kg <sup>-1</sup> )	0.4	31.2	4.2
Extractable P (ug g <sup>-1</sup> )	5	802	64
C/N	180	13	116
Alk < C10 (mg kg <sup>-1</sup> )	nd <sup>a</sup>	nd	nd
Alk C10–C21 (mg kg <sup>-1</sup> )	4577	461	40
Alk C22–C35 (mg kg <sup>-1</sup> )	2158	182	157
Alk C36–C40 (mg kg <sup>-1</sup> )	nd	419	nd
Total alkanes (mg kg <sup>-1</sup> )	6735	1062	197
PAHs 2–3 rings (mg kg <sup>-1</sup> )	439	33	18
PAHs 4–6 rings (mg kg <sup>-1</sup> )	188	86	1.3
Total PAHs (mg kg <sup>-1</sup> )	627	119	19
TH (mg kg <sup>-1</sup> )	49,372	10,615	2799

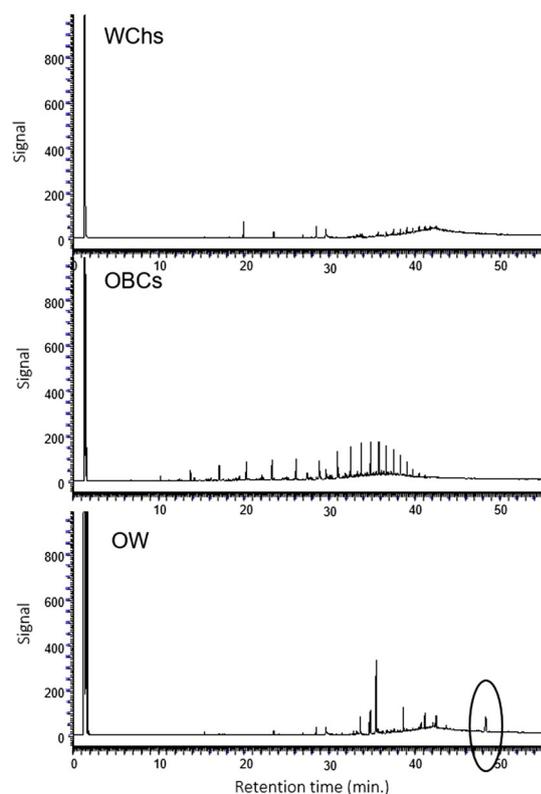
Values are expressed on a dry weight basis

EC electrical conductivity, TOC total organic carbon, TN Organic N + N-NH<sub>4</sub>; TH total hydrocarbons

<sup>a</sup> nd = no detectable

OBC and woodchips. However, a prominent signal was observed in OW chromatogram, which matched to n-hexatriacontane (36 carbons) standard retention time (Fig. 1). Probably, these compounds are large biomolecules (i.e., biopolymers) from vegetables and grass clippings that were not retained during the extract cleanup process. This signal was also observed in 33 and 75 % OW samples.

Initial composting mixture characteristics are presented in Table 4. EC values were around 3.5 dS m<sup>-1</sup> in all composting mixtures. Thus, organic waste application had no positive effect on electrical conductivity values. In 0 and 100 % OW initial mixtures, average EC was quite different from OBC and OW alone. This could be attributed to a sample dilution effect owed to woodchips that were not retained during sample sieving. The C/N (TOC/



**Fig. 1** Woodchips (WChs), drilling cutting (OBCs) and organic waste (OW) chromatograms (GC-FID). n-hexatriacontane signal is circled in OW chromatogram

TN) ratio of 75 % OW was the closest to the recommended range (25–30) for composting (Rynk et al. 1992). High C/N ratios in 0 and 33 % OW suggest a nitrogen deficit in these mixtures, since a C/N ratio  $> 40$  could imply an important reduction in the biological activity because of the lack of N for protein synthesis (Márquez et al. 2008).

Organic waste incorporation promoted a pollutant dilution effect in 75 % OW initial composting mixture, even though OW extractable compounds did contribute to TH values. In 75 % OW, TH concentration was about one half of that in 0 % OW, while initial TH value in 33 % OW was not significantly different from that in 0 % OW. In some cases, dense toxic matrices can inhibit microbial growth, and thus, dilution should be carried out prior to biological treatment. Besides other important benefits, the application of organic wastes to highly contaminated materials produces a pollutant “dilution effect” that reduce initial matrix toxicity (Vallini et al. 2002; Joo et al. 2007).

On the other hand, it is also noticeable that hydrocarbons measured in the initial composting mixtures are not proportional to the sum of the hydrocarbons contribution of each mixture component alone (OW or OBC), in a dry weight basis. This difference, of about 40 %, could be attributed to a sample dilution effect owed to woodchips

not retained during sample sieving, as it was indicated before for initial EC values.

Reasonably, C10–C35 alkanes concentration was greater in the treatment with the higher OBC proportion (0 % OW). On the contrary, the concentration of C36–C40 alkanes was about four times higher in 75 % OW, ratifying the contribution of such compounds by the organic wastes. Light aromatic fraction (2–3 rings) was also reasonably higher in 0 % OW. However, there were no differences in the initial concentrations of these compounds between 33 and 75 % OW, and heavier PAH (4–6 rings) concentrations were the same for all systems. This shows the contribution of mostly high molecular weight PAHs by the organic wastes.

It can be seen that a comprehensive characterization of the substrates to be composted provides valuable and necessary information in order to determine optimal environmental conditions for successful degrading microbial activity. In addition, organic wastes hydrocarbon-like compounds contribution should be considered in composting bioremediation processes, mainly when general parameters like “total hydrocarbons” or TPH (total petroleum hydrocarbons) are used to monitor biodegradation.

#### *Enumeration of heterotrophic and hydrocarbon-degrading bacteria*

In 33 and 75 % OW treatments, the initial counts of heterotrophic, total hydrocarbon-degrading and aliphatic-degrading bacteria were approximately threefold higher than 0 % OW bacteria counts (Table 5). These values show that biodiversity and abundance of microorganisms present in organic wastes ensure the contribution of populations with the metabolic potential to break down the target contaminant. On the other hand, PAH degraders showed low counts ( $<10^3$  MPN  $g^{-1}$ ) in all initial composting mixtures. This confirms the recalcitrance of such compounds and the higher metabolic specificity required for their biodegradation (Antizar-Ladislao et al. 2004). Nevertheless, it should be considered that in such complex samples, culturable bacteria enumeration is limited. In fact, it is estimated that less than 1 % of environmental isolates are culturable (Chikere et al. 2011), though these techniques only allow a comparative approach.

#### **The composting process**

##### *Temperature and moisture content monitoring*

During the experiment, none of the reactors reached typical composting thermophilic temperatures ( $>45$  °C), as it would be expected in the treatments with the highest



**Table 4** Composting mixtures initial characterization

	0 % OW			33 % OW			75 % OW			100 % OW		
pH (H <sub>2</sub> O) 1:10	8.3	(0.1)	a	8.0	(0.2)	ab	7.0	(0.2)	c	7.6	(0.3)	bc
EC 1:10 (dS m <sup>-1</sup> )	3.6	(0.1)	a	3.4	(0.5)	a	3.6	(0.3)	a	3.5	(0.2)	a
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	65	(4)	c	69	(6)	c	92	(15)	b	320	(10)	a
TN (g kg <sup>-1</sup> )	0.3	(0.1)	c	0.9	(0.3)	c	3.8	(0.6)	b	31	(5.9)	a
Ext. P (ug g <sup>-1</sup> )	8	(1)	c	18	(3)	bc	76	(21)	b	804	(176)	a
C/N	208	(6)	a	81	(21)	b	24	(2)	c	11	(2)	c
N/P	39	(5)	a	48	(11)	a	52	(10)	a	40	(15)	a
Alk < C10 (mg kg <sup>-1</sup> )	nd <sup>a</sup>			nd			nd			nm <sup>b</sup>		
Alk C10–C21 (mg kg <sup>-1</sup> )	2897	(888)	a	2264	(280)	ab	1329	(327)	b	nm		
Alk C22–C35 (mg kg <sup>-1</sup> )	1156	(67)	a	875	(93)	b	696	(56)	b	nm		
Alk C36–C40 (mg kg <sup>-1</sup> )	39	(4)	b	42	(12)	ab	146	(44)	a	nm		
Total alkanes (mg kg <sup>-1</sup> )	4092	(956)	a	3181	(453)	ab	2171	(298)	b	nm		
PAHs 2–3 rings (mg kg <sup>-1</sup> )	283	(33)	a	191	(45)	b	195	(51)	b	nm		
PAHs 4–6 rings (mg kg <sup>-1</sup> )	97	(25)	a	118	(45)	a	130	(19)	a	nm		
Total PAHs (mg kg <sup>-1</sup> )	380	(9)	a	309	(37)	a	325	(62)	a	nm		
TH (mg kg <sup>-1</sup> )	29,186	(2827)	a	21,840	(3733)	ab	17,165	(2794)	b	nm		

Values are expressed on a dry weight basis and are the means of three replicates per treatment. SD is indicated in parenthesis

Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

<sup>a</sup> nd = not detectable/<sup>b</sup>nm: not measured

**Table 5** Heterotrophic and hydrocarbon-degrading bacteria counts in initial composting mixtures

	0 % OW	33 % OW	75 % OW	100 % OW
Heterotrophs (UFC g <sup>-1</sup> )	nc <sup>a</sup>	$3.6 \times 10^8$	$3.0 \times 10^9$	$3.8 \times 10^{10}$
TH degraders (MPN g <sup>-1</sup> )	$3.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^8$	$9.3 \times 10^8$	$1.7 \times 10^{10}$
Alk degraders (MPN g <sup>-1</sup> )	$9.7 \times 10^5$	$9.8 \times 10^7$	$5.2 \times 10^8$	$4.6 \times 10^9$
PAH degraders (MPN g <sup>-1</sup> )	<1500	<1500	<1500	<1500

All values are expressed on dry weight basis

<sup>a</sup> no count: number of colonies < 30

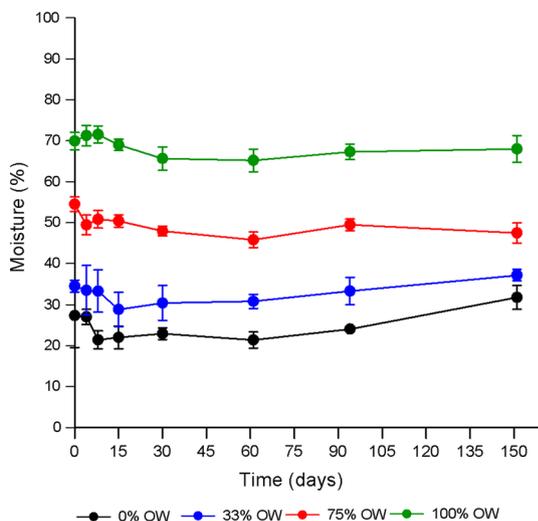
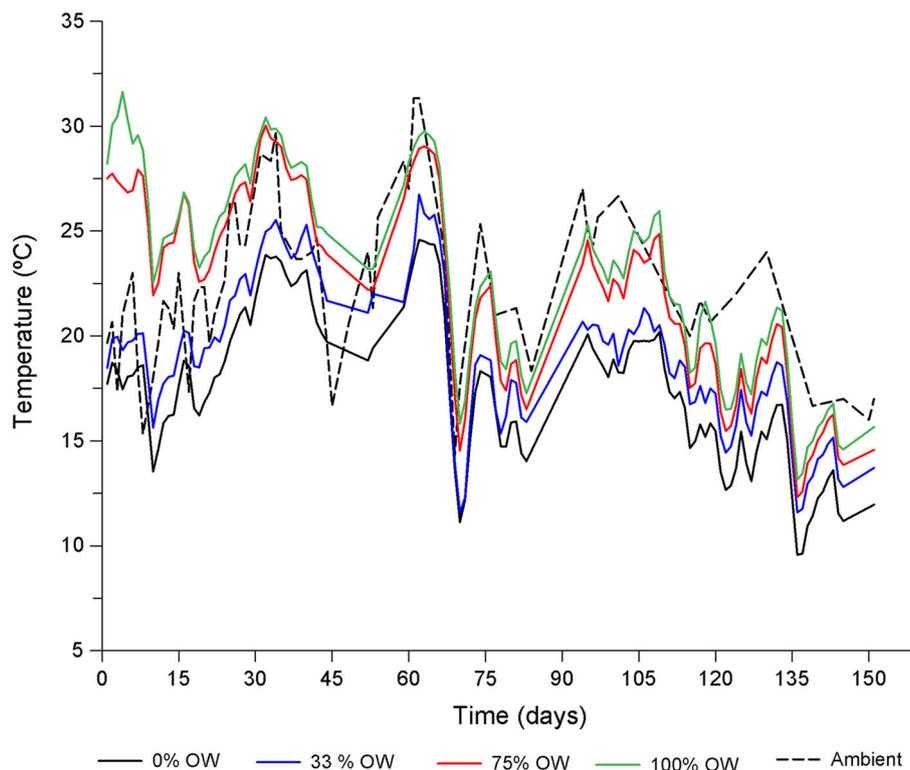
proportion of organic wastes (i.e., in 75 and 100 % OW) (Fig. 2). All reactors temperature fluctuated between 15 and 30 °C during the first 65 days and then started a gradual temperature decrease, reaching average values of 10–15 °C at the end of the experiment. As the same temperature pattern was observed in all treatments, including 100 % OW, it could be supposed that the amount of composting mass could not generate and retain enough heat to reach thermophilic temperatures. Consequently, the effects on hydrocarbons biodegradation of typical high temperatures of the composting process could not be assessed in this study.

Nevertheless, in the context of composting as a bioremediation strategy, high temperatures (>45 °C) are not always desired as they are in traditional composting for meeting regulatory requirements in pathogen control (Antizar-Ladislao et al. 2007). In fact, several authors report higher hydrocarbon degradation rates, particularly of PAHs,

at mesophilic (25–45 °C) than at thermophilic temperatures. This would be associated with the variety of microorganisms, and the proper functioning of the enzymatic systems related to the degradation of target compounds, within mesophilic temperature range (Van Gestel et al. 2003; Antizar-Ladislao et al. 2004, 2007; Sayara et al. 2010).

The water incorporated along with the organic wastes can regulate moisture for proper biological activity, reducing or even avoiding the need for irrigation, when appropriate wastes proportions are applied. In this study, no irrigation was performed and reactors moisture content was monitored during the entire experiment (Fig. 3), in order to evaluate this effect. In 75 % OW moisture content remained within the recommended range for composting 50–70 % (Márquez et al. 2008), and in 0 and 33 % OW, moisture content was below 40 % during the entire process. Therefore, the biological activity in 0 and 33 % OW treatments might have resulted limited.

**Fig. 2** Temperature profiles during composting. Data series are the mean of temperatures recorded in each reactor per day. Values are the average of three replicates per treatment



**Fig. 3** Moisture profiles during composting process. Values are the average of three replicates per treatment and bars indicate standard deviation

*pH and electrical conductivity*

In 75 % OW, pH values remained within 7.0–7.5 throughout the experimental period and were significantly different ( $p < 0.05$ ) from pH values in 0 and 33 % OW, which remained between 8.0 and 8.5 (Fig. 4a). Nevertheless, these pH values are not considered restrictive since,

due to the buffering capacity of the process and the broad spectrum of the microorganisms involved, composting may work over a wide pH range (5.5–9) (Rynk et al. 1992).

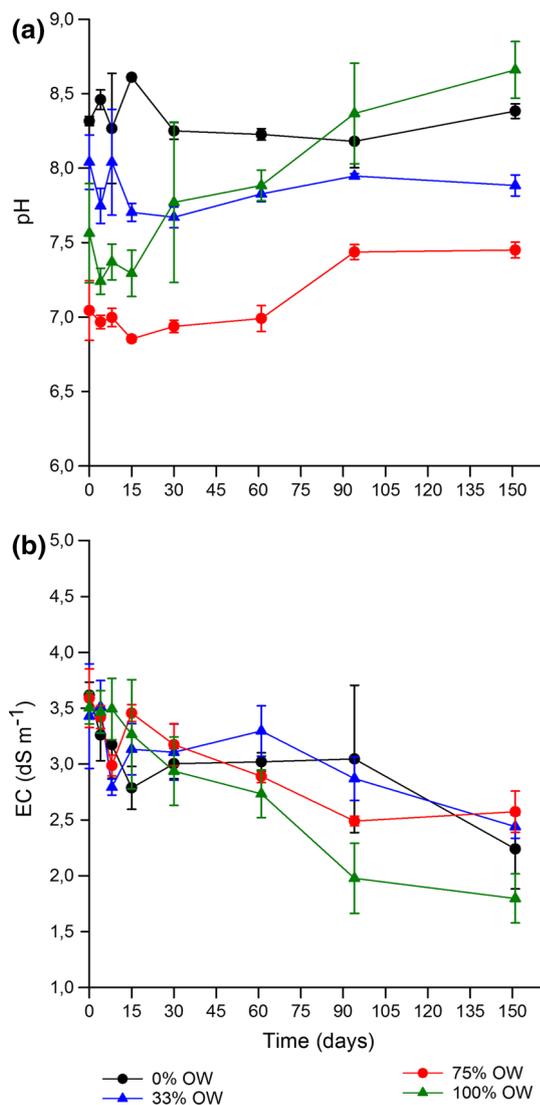
After 151 days of composting, EC values started at  $3.5 \text{ dS m}^{-1}$  in all treatments with drilling cuttings, as was stated previously, and ended around  $2.5 \text{ dS m}^{-1}$ , with no significant differences between treatments ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4b). Differently, in 100 % OW final average EC value was significantly lower ( $p < 0.05$ ), reaching approximately  $1.8 \text{ dS m}^{-1}$ .

During composting, salts loss is mainly owed to the leaching of the water contained in primary materials or owed to irrigation (Laos et al. 2002). In this study, leachates were collected in large amounts in 100 % OW, but practically no leachates were accumulated in reactors with OBC. Probably, OBC clayey nature could have increased water absorption, preventing leaching and therefore the washing out of soluble salts.

**Hydrocarbons removal**

*Hydrocarbons degradation percentage*

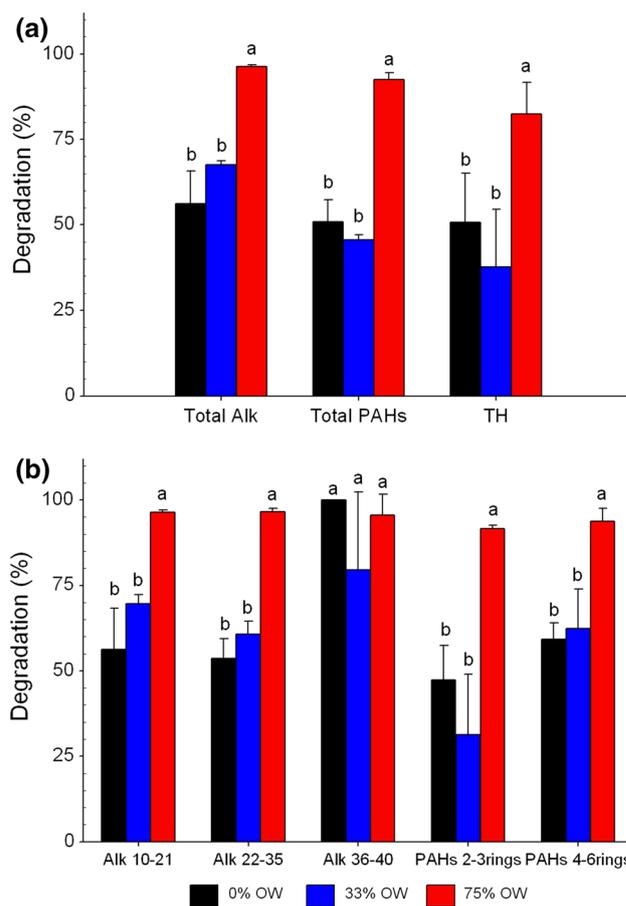
In 75 % OW treatment, the highest degradation percentages of TH ( $\approx 82 \%$ ), total alkanes ( $\approx 96 \%$ ) and PAHs ( $\approx 93 \%$ ) were reached after 151 days of composting (Fig. 5a). Between 0 and 33 % OW treatments, there were



**Fig. 4** Evolution of **a** pH and **b** electrical conductivity. Values are the average of three replicates per treatment and *bars* indicate standard deviation

no significant differences in hydrocarbon degradation percentages. Both treatments reached 40–50 % of TH and PAHs degradation and 55–70 % removal of alkanes. The tendency was the same for the alkanes and aromatics grouped by molecular size (see Table 2), except for the C36–C40 alkanes removal percentages, which showed a different tendency (Fig. 5b). Degradation of these compounds reached 80–100 % in 0 and 33 % OW. This may be attributable to low initial concentrations of this aliphatic fraction in these treatments (see Table 4), since this fraction derived mainly from organic wastes.

Because of different contaminated matrices studied and organic wastes applied, a comparative analysis of hydrocarbons biodegradation efficiency with other composting bioremediation studies is difficult. Nevertheless, the results



**Fig. 5** Hydrocarbons degradation percentage per treatment: **a** total hydrocarbons, total alkanes and total PAHs; **b** alkanes and PAHs grouped by molecular size. Values are the average of three replicates per treatment, and *bars* indicate standard deviation. *Different letters* indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

obtained in this work support other authors reports, in which organic waste small proportions, such as 33 % v/v (equivalent to 1:0.1 OBC:OW, in a dry weight basis), did not improve biodegradation (Namkoong et al. 2002; Antizar-Ladislao et al. 2005; Joo et al. 2007).

Finally, it should be made clear that, since several authors reported that hydrocarbon losses due to volatilization were not significant with respect to biological degradation (2–5 % of the initial concentration) (Namkoong et al. 2002; Hesnawi and McCartney 2006; Sayara et al. 2010), it was not considered necessary to measure abiotic hydrocarbon losses, in order to assess the actual composting impacting factors in drilling cuttings hydrocarbons removal efficiency.

*Hydrocarbons degradation rates*

Total hydrocarbons, total alkanes and total PAHs degradation were modeled using a three-parameter logistic

**Table 6** Model parameters of total hydrocarbons (TH), total alkanes and total PAHs biodegradation

	Total alkanes			Total PAHs			TH		
	$b$ (mg kg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (days)	$r$	$b$ (mg kg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (days)	$r$	$b$ (mg kg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (days)	$r$
0 % OW	5.8 ± 0.7	144 ± 3	0.9907	na <sup>a</sup>	na	na	6 ± 1	148 ± 5	0.9723
33 % OW	5 ± 1	123 ± 9	0.9407	3.6 ± 0.5	107 ± 4	0.9857	4 ± 2	143 ± 15	0.8819
75 % OW	1.0 ± 0.3	16 ± 6	0.9768	1.0 ± 0.3	25 ± 7	0.9584	13 ± 7	133 ± 9	0.9931

$b$  slope parameter,  $t_{1/2}$ : hydrocarbons half-life,  $r$  correlation coefficient

<sup>a</sup> PAHs concentration could not be adjusted to the model used

function. The model is described by the following equation  $C = C_0/1 + (t/t_{1/2})^b$ , where  $C$  is TH, alkanes or PAHs concentration (mg kg<sup>-1</sup> dw);  $C_0$  is the hydrocarbons initial concentration;  $t$  is time (days);  $t_{1/2}$  is hydrocarbons half-life time (days); and  $b$  is the slope parameter (mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) (Ibarrolaza et al. 2011).

The adjustment was obtained by nonlinear regression using Sigma Plot V10, Systat Software Inc. Table 6 details model parameters for each treatment. The differentiation of the estimated degradation model equation allowed approximating hydrocarbons degradation rates (mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>).

Pollutant half-life is essentially related to the existence and length of a lag phase in pollutant concentration decay. Alkanes half-life was about 10 times lower in 75 % OW than in 0 % OW and in 33 % OW. PAHs half-life in 75 % OW was about one-fourth of that in 33 % OW. Unfortunately, due to broad intrinsic variability, PAHs data of 0 % OW could not be adjusted to the model used.

The lag phase, which shows the microbial adaptation time, is an interesting biodegradation parameter, and it is suggested as a good indicator of a microbial community catabolic potential (Couling et al. 2010). In 75 % OW, there was not a lag phase, and thus, alkanes and PAHs biodegradation started immediately. On the contrary, in 0 and 33 % OW both alkanes and PAH concentrations started to decay after 60 and 90 days of composting, respectively (Fig. 6a, b).

Consistently, alkanes and PAHs degradation rates showed that reduction in these compounds was faster within the first 15 days in 75 % OW (Fig. 6d, e) and that a lag phase did not occur. However, alkanes degradation was about ten times faster than PAHs degradation in this treatment, as it would be expected. After this period, 75 % OW degradation rate declines, probably because of the run out of substrate and nutrients already consumed in the first phase of high biological activity, like usually occurs in traditional composting systems.

In 0 and 33 % OW treatments, alkanes biodegradation rate increased only after 60 days of composting, which confirms the time needed for microbial adaptation. In 33 % OW, also alkanes degradation was around ten times faster

than PAHs degradation. Even after overcoming the lag phase, 0 and 33 % OW biodegradation rates were not as high as in 75 % OW. This probably responds to the lack of adequate environmental conditions for the stimulation of biological activity, such as nutrient and water content, in 0 and 33 % OW, as was stated in previous Sects. (3.1.1 and 3.2.1).

Even though hydrocarbons biodegradation efficiency depends on many factors, the evidence shows that the one of the main principles controlling biodegradation degree is molecular configuration. Biodegradability sequence is recognized near to: n-alkanes > branched alkanes > n-alkyl low molecular weight aromatics > monoaromatics > cyclic alkanes > polynuclear aromatics (Chikere et al. 2011). These assumptions are confirmed by the differences observed between alkanes and PAHs biodegradation rates within each treatment.

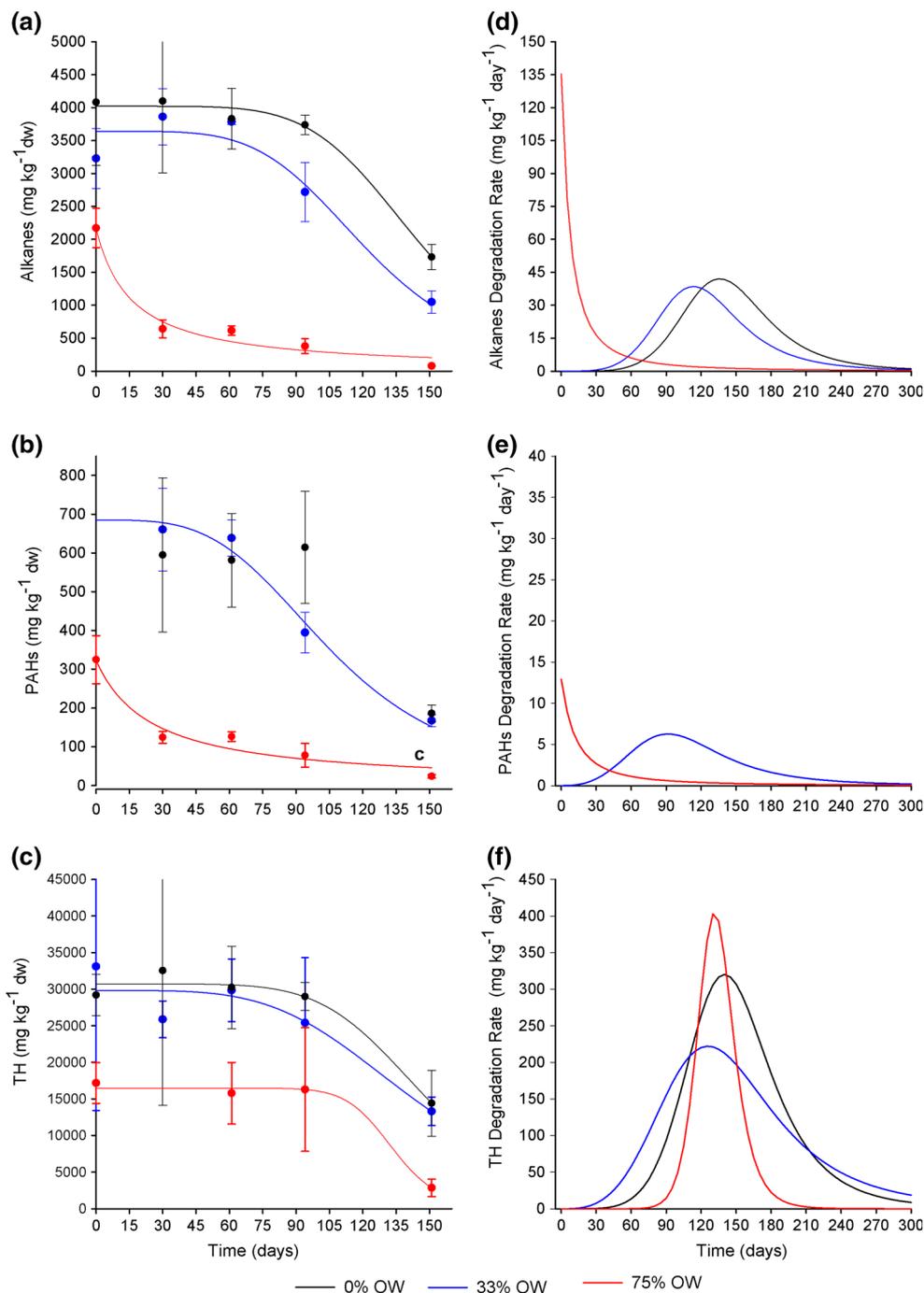
TH degradation curves (Fig. 6c, f) show a different situation. TH decay starts after about 60–90 days of composting for all treatments. The extended lag phase observed for TH degradation in 75 % OW could be attributed to the contribution of extractable recalcitrant compounds, such as lignin, from lignocellulosic organic wastes (see Sect. 3.1.1). Lignin is difficult to degrade and is chemically bonded with hemicellulose. In addition, this complex enwraps cellulose, slowing down these carbohydrates degradation (Huang et al. 2010). Despite the fact that TH half-life is similar for all treatments, degradation rate was also relatively higher in 75 % OW than in 0 and 33 % OW.

## Conclusion

In heavily contaminated oil-based drilling cuttings, the effect of applying appropriate proportions of organic wastes has been relevant for hydrocarbons removal efficiency. Applying a 75 % of organic wastes in a volume basis (equivalent to a proportion of 1:0.4 OBC:OW in a dry weight basis) was highly effective in hydrocarbons removal efficiency, including recalcitrant compounds, such as heavy PAHs, despite salts concentration. In contrast, the application of 33 % of organic wastes by volume (1:0.1



**Fig. 6** Modeled evolution of hydrocarbons concentration and degradation rate: **a, d** total alkanes, **b, e** total PAHs and **c, f** total hydrocarbons. Values are the average of three replicates per treatment. *Bars* indicate standard deviation in concentration versus time graphics. Due to broad intrinsic variability, PAHs data of 0 % OW could not be adjusted to the model used



OBC:OW, dry weight basis) was not more effective for hydrocarbon removal than not applying organic wastes. Microorganisms incorporated along with the organic waste, adequate nutrients proportions, suitable water content and a lower initial concentration of hydrocarbons probably supported a high biological activity and a consequent high biodegradation rate in 75 % OW.

Similar degradation percentages were observed for light and heavy alkanes and aromatics within each treatment.

This shows that experimental time (151 days) was sufficient in order to detect the potential removal of both hydrocarbon types, according to each treatment particular environmental conditions, despite the different biodegradation rates observed for alkanes and PAHs. Given this difference, shorter experimental times probably would have resulted in measuring different degradation percentages between the more and the less recalcitrant compounds. This is an important aspect to take into consideration, since

treatment time consumption is a major factor affecting the choice of biological methods as a remediation alternative, and widely influences associated costs.

We consider that composting is a promising strategy for the treatment of heavily contaminated oil-based drilling cuttings. Future efforts should be associated with the assessment of using composted material (nutrients rich) for soil regeneration and revegetation of degraded areas, which are very common in oilfields, as an alternative for proper final disposal.

**Acknowledgments** This research was funded by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (MinCyT, Argentina), Grant no PICT 083/09, and the Universidad Nacional de Río Negro (Grant no PI: 40-B-149/11). We are also grateful to Mrs. Bárbara Pérez, for English review, and to Mr. Rodrigo Contreras and T.S.B S.A Company, for their support, collaboration and interest in our work.

## References

- Antizar-Ladislao B, Lopez Real JM, Beck AJ (2004) Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated waste using composting approaches. *Crit Rev Env Sci Tec* 34:249–289
- Antizar-Ladislao B, Lopez-Real J, Beck AJ (2005) In-vessel composting-bioremediation of aged coal tar soil: effect of temperature and soil/green waste amendment ratio. *Environ Int* 31:173–178
- Antizar-Ladislao B, Beck AJ, Spanova K, Lopez-Real J, Rusell NJ (2007) The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *J Hazard Mater* 144:340–347
- Arce-Ortega JM, Rojas-Avelizapa NG, Rodríguez-Vázquez R (2004) Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *J Environ Sci Heal A* 39:1535–1545
- Ayotamuno JM, Okparanma RN, Araka PP (2009) Bioaugmentation and composting of oil-field drill-cuttings containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Food Agric Environ* 7:658–664
- Ball AS, Stewart RJ, Schliephake K (2012) A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cuttings. *Waste Manag Research* 30:457–473
- British Columbia Ministry of Environment, Lands and Parks (MELP) (2004). CSR-Analytical Method 10, Silica Gel Clean Up of EPH, Version 1.0, Canada, 15 pp
- Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J (2015) Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnol Adv* 33:745–755
- Chikere CB, Okpokwasili GC, Chikere BO (2011) Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech* 1:117–138
- Couling NR, Towell MG, Semple KT (2010) The simultaneous effects of PAH concentration, contaminant mixture and repeated application on the development of catabolic activity in soil. *Environ Pollut* 158:3411–3420
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW (2015). InfoStat v. 2015. InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Elshorbagy W, Alkamali A (2005) Solid wastes generation from oil and gas industries in United Arab Emirates. *J Haz Mat* B120:89–99
- Grace Liu P-W, Chang TC, Chen C-H, Wang M-Z, Hsu H-W (2013) Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr* 85:661–670
- Hesnawi RM, McCartney DM (2006) Impact of compost amendments and operating temperature on diesel fuel bioremediation. *J Environ Eng Sci* 5:37–45
- Huang DL, Zeng G-M, Feng C-L, Hu S, Lai C, Zhao M-H, Su F-F, Tang L, Liu H-L (2010) Changes in microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresour Technol* 101:4062–4067
- Huesemann MH, Hausmann TS, Fortman TJ (2004) Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation* 15:261–274
- Ibarrolaza A, Coppotelli BM, Del Panno MT, Donati ER, Morelli IS (2011) Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene and Cr(VI)-contaminated soil. *J Appl Microbiol* 111:26–35
- Joo H-S, Shoda M, Phae C-G (2007) Degradation of diesel oil in soil using food waste composting process. *Biodegradation* 18:597–605
- Laos F, Mazzarino MJ, Walter I, Roselli L, Satti P, Moyano S (2002) Composting of fish offal and biosolids in northwestern Patagonia. *Bioresour Technol* 81:179–186
- Laos F, Mazzarino MJ, Roselli L, Satti P (2012) Petroleum hydrocarbons-contaminated soils remediation. In: Mazzarino MJ, Satti P (eds) *Composting in Argentina: production, quality and use experiences*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, pp 257–270 (In Spanish)
- Márquez PB, Díaz Blanco MJ, Cabrera Capitán F (2008). Factors affecting the composting process. In: Moreno Casco J, Moral Herrero R (eds) *Composting*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp 93–109. (In Spanish)
- Morelli IS, Del Panno MT, De Antoni GL, Paineira MT (2005) Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr* 55:271–278
- Moretto LM, Silvestri S, Ugo P, Zorzi G, Abbondanzi F, Baiocchi C, Iacondini A (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. *J Haz Mat* B126:141–148
- Namkoong W, Young E-Y, Park J-S, Choi J-Y (2002) Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environ Pollut* 119:23–31
- Onwukwe SI, Nwakaudu MS (2012) Drilling wastes generation and management approach. *Int J Environ Sci Dev* 3:252–257
- Reasoner D, Geldreich E (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microb* 49:1–7
- Rojas-Avelizapa N, Roldán-Castillo T, Zegarra-Martínez H, Muñoz-Colunga A, Fernández-Linares L (2007) A field trial for an ex situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere* 66:1595–1600
- Rynk R, Van de Kamp M, Willson GB, Singley ME, Richard TL, Kolega JJ, Gouin FR, Laliberty Jr. L, Kay D, Murphy DW, Hoytink HA, Brinton WF (1992). *On-farm composting handbook*. Natural resources, agriculture, and engineering service. NRAES-54, Cooperative Extension, Ithaca, NY, USA, 186 p
- Saretsky M, Wilson M, Wyse S (2002). Bioremediation of drill cuttings in an arid climate. 9th Annual International Petroleum Environ. Conference (IPEC) Proceedings, Albuquerque, New



- México, USA, 8 p. [http://ipec.utulsa.edu/Conf2002/saretsky\\_3.pdf](http://ipec.utulsa.edu/Conf2002/saretsky_3.pdf). last access Sept 2015
- Savage GM, Díaz LF (2007) Bioremediation. In: Díaz LF, De Bertoldi M, Bidlingmaier W, Stentiford E (eds) Compost science and technology, 10 ed., Waste Management Series 8, Elsevier Science, Amsterdam, pp 159–175
- Sayara T, Sarrá M, Sánchez A (2010) Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *J Hazard Mater* 179:999–1006
- Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT, Sumner ME (1996) Methods of soil analysis, part 3, chemical methods, SSSA bookSeries No 5, SSSA, ASA, Madison, USA, 1390 p
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2007). SW-846, Method 3550c, Ultrasonic extraction, Rev. 3, USA, 17 p
- Vallini G, Di Gregorio S, Pera A, Cunha Quada ACF (2002) Exploitation of composting management for either reclamation of organic wastes or solid-phase treatment of contaminated environmental matrices. *Environ Rev* 10:195–207
- Van Gestel K, Mergaert J, Swings J, Coosemans J, Ryckeboer J (2003) Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ Pollut* 125:361–368
- Wrenn BA, Venosa AD (1996) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. *Can J Microbiol* 42:252–258
- Zhang Y, Zhu Y-G, Houot S, Qiao M, Nunan N, Garnier P (2011) Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated soil through composting with fresh organic wastes. *Environ Sci Pollut Res* 18:1574–1584

