

INVESTIGACIÓN
2010



**BIOSOLVENTES COMO AGENTES
LIMPIADORES DE DERRAMES DE
PETRÓLEO EN ZONAS COSTERAS**

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

Claudio Bravo Linares

Profesor Auxiliar, Director de Proyecto
Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Químicas

Equipo Investigador

Luis Ovando Fuentealba

Bioquímico, Asistente de Proyecto
Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Químicas

Índice

| | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 4 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| 3.1. Hipótesis de trabajo | 5 |
| 3.2. Objetivos generales | 5 |
| 3.3. Objetivos específicos | 5 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 5 |
| 4.1. Materiales | 5 |
| 4.2. Montaje del experimento | 5 |
| 4.3. Extracción y análisis de la muestra | 6 |
| 4.4. Análisis de datos | 6 |
| 4.5. Plan de trabajo | 6 |
| 5. RESULTADOS | 6 |
| 5.1. Zona alta del intermareal | 7 |
| 5.2. Zona media del intermareal | 10 |
| 5.3. Zona baja del intermareal | 12 |
| 6. DISCUSIÓN | 14 |
| 7. CONCLUSIONES | 14 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 15 |

1. RESUMEN

El uso de biosolventes como agente de limpieza para remover vertidos de petróleo crudo o sus derivados en sistemas costeros es una de las técnicas más usadas y aceptadas en la actualidad debido a ser una sustancia biodegradable con un alto rendimiento de limpieza. El biosolvente actúa principalmente por 2 mecanismos: remoción física del petróleo por afinidad y estimulación de la biodegradación del petróleo por microorganismos locales. El siguiente estudio se enfocó en encontrar condiciones favorables que permitan obtener un mejor rendimiento de degradación del petróleo crudo para las 3 principales zonas del intermareal (alta, media y baja), asistido con el uso de una mezcla de biosolvente, nutrientes y utilizando técnicas de diseño experimental mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM). Los datos obtenidos muestran que existe un fuerte efecto de la remoción del petróleo crudo dado principalmente por las mareas, encontrándose que para los controles de petróleo existe un porcentaje de remoción de un 34, 87 y 100% para las zonas alta, media y baja del intermareal respectivamente durante los primeros 10 días de experimentación. Por otro lado, a través del modelamiento del tipo cubico centrado en las caras (CCF), se estableció que las condiciones óptimas de limpieza dadas para las zonas alta y media del intermareal son la aplicación de biosolvente y nutrientes el día posterior al evento de contaminación usando nutrientes de tipo inorgánico y una cantidad de biosolvente en proporción 1:2 petróleo:biosolvente.

PALABRAS CLAVE: Biosolvente; Degradación de Hidrocarburos; Metodología de superficie de respuesta (RSM); *n*-alcanos.

2. INTRODUCCIÓN

La obtención del petróleo proviene principalmente de reservas naturales marinas por lo que luego de su extracción es transportado por buques petroleros u oleoductos hacia el continente, sin embargo, tanto en la exploración de yacimientos como en el transporte del crudo existe el riesgo de que los sistemas de transporte sufran daños (debido a inclemencias climáticas, fallas mecánicas u otros factores) y con ello el petróleo sea liberado al ambiente sin tener control de su destino.

Una vez que el petróleo ha sido derramado, flota sobre la superficie del mar debido a sus características hidrofóbicas y su baja densidad. Además, desde que el petróleo es derramado y expuesto al ambiente está sujeto a diversos procesos de modificaciones en su composición tales como evaporación, disolución, biodegradación, fotooxidación, etc. Estos cambios en la composición del petróleo se les denominan como “*weathering del petróleo*” (1).

La extensión de la mancha de petróleo sobre el mar ocasiona grandes daños ecológicos durante su travesía hacia las costas, principalmente por fitotoxicidad del petróleo (2) y la privación de luz que inhiben la fotosíntesis de algas y fitoplancton afectando también con esto a las demás cadenas tróficas. No obstante, las zonas mayormente afectadas por estos derrames terminan siendo las playas y roqueríos en las costas y el desastre ecológico que ahí se ocasiona es muy común de ver hoy en día. Como las playas son los lugares más accesibles y recorridos, es ahí donde se comienza el proceso de limpieza el cual consta de dos etapas: una primera etapa o etapa de limpieza gruesa donde se recupera la mayor parte del petróleo derramado por medios físicos y/o mecánicos, luego una segunda etapa o etapa de limpieza fina en la cual se hace uso de agentes de limpieza para eliminar el petróleo remanente de las playas (3,6), principalmente la fracción de hidrocarburos alifáticos del petróleo (4).

Cabe mencionar que estos sistemas costeros afectados pese a estar en una misma ubicación geográfica poseen distintas condiciones físico-químicas, nutricionales y microbiológicas a medida que el sistema se adentra al contacto con el agua de mar, debido a esto se puede clasificar el sistema costero en 3 principales zonas denominadas zonas intermareales. La primera zona denominada zona alta del intermareal es el comienzo de la playa y que su principal característica es poseer un bajo porcentaje de humedad y en algunos lugares se puede entremezclar con vegetación terrestre. La segunda zona es la zona media del intermareal y es aquella que entra en contacto con el agua de mar sólo bajo los ciclos altos de la marea, posee un porcentaje de humedad mayor que la zona alta debido al contacto de las mareas y se puede encontrar una población microbiana distinta. Finalmente, se define la última zona como la zona baja del intermareal y que es aquella que está la mayor parte del tiempo en contacto directo con el agua de mar y es visible con la recogida del mar, posee un porcentaje de humedad mucho mayor a las anteriores, abundan organismos marinos pequeños y microorganismos diversos.

Para poder limpiar de forma general el sistema costero se utilizaron durante algún tiempo dispersantes como agentes de limpieza (5,6), pero debido a la alta toxicidad que mostraban han sido reemplazados por métodos menos nocivos y que puedan ser biodegradables. Uno de los agentes de limpieza mejor aceptados actualmente es el uso de biosolventes en base a esteres sintetizados a partir de ácidos grasos, ya que tienen la ventaja de ser biodegradables y otorgar un buen rendimiento de limpieza física y además produce un efecto sinérgico en la biodegradación del petróleo (7,8). Otra forma de aumentar la degradación de hidrocarburos del petróleo en las zonas costeras es aplicando nutrientes que estimulan el desarrollo de los microorganismos locales encargados de la biodegradación del petróleo (9).

Otra etapa fundamental en el proceso de limpieza fina es la evaluación del proceso de degradación en el tiempo, como parte del control y optimización del sistema. Para poder evaluar el proceso de degradación biológica o biodegradación, se emplea la identificación de hidrocarburos del petróleo (TPH) y algunos biomarcadores en el sitio de contaminación (10), los cuales tienen la particularidad de ser más resistentes a la degradación biológica (no biodegradables).

Los biomarcadores que se usan comúnmente para evaluar procesos de degradación en periodos iniciales (90 días aproximadamente) son los isoprenoides pristano y fitano (10,11) sin embargo podrían perder eficacia después de un periodo prolongado de tiempo debido principalmente a procesos de degradación de los mismos. Uno de los biomarcadores más resistentes es el C_{30} -17 α (H), 21 β (H)-hopano y es el que se usa en la actualidad como estándar interno para evaluar la biodegradación del petróleo durante periodos más largos (12).

En la actualidad se puede observar la gran cantidad de eventos de derrames de petróleos que suceden, lo cual proporciona un gran problema económico y ecológico en las zonas del derrame. Por otro lado no sólo se ven afectadas las industrias petroleras y la biota local, sino que además las comunidades pesqueras, el turismo y por supuesto las localidades cercanas.

La biodegradación natural del petróleo es un proceso lento que se puede extender por años (13), debido a esto el proceso de limpieza se hace fundamental para lograr disminuir el tiempo de recuperación de las zonas afectadas. El uso de dispersantes como agentes de limpieza está en gran decadencia puesto que los efectos nocivos que trae a la salud de los organismos son incluso peores que aquellos provocados por el petróleo mismo, por tanto, urge el desarrollo de alternativas menos nocivas e igual o más eficientes que estos. Uno de ellos es el biosolvente, el cual posee gran afinidad por los hidrocarburos del petróleo y posee características fisicoquímicas similares a este, sin embargo es más asimilable para los microorganismos presentes.

No obstante, la interacción biosolvente/petróleo en las zonas costera se ve afectada principalmente por los distintos ciclos de marea que ocurren durante el día y debido a que ambos son compuestos apolares la eficiencia de limpieza debido a la interacción entre ambos puede verse afectada en el tiempo. Por otro lado también se ha reportado una penetración del petróleo en la arena de hasta 1 metro (14). Por lo que es importante desarrollar estudios de zonas intermareales para poder conocer los cambios que se producen en la composición química del petróleo al ser asistida con biosolventes como agente de limpieza.

3. OBJETIVOS

3.1. Hipótesis de trabajo

El uso de biosolventes estimula la degradación del petróleo y esta degradación podría ser distinta en las diferentes

zonas del intermareal (alto, medio y bajo) e incrementada con el uso de nutrientes.

Dentro de las preguntas que se busca responder tendremos:

- ¿Qué proporciones de biosolvente serán las óptimas para obtener un buen rendimiento de la biodegradación del petróleo?
- ¿Qué efecto producirá si agregamos además fertilizantes en la matriz a tratar?
- ¿En qué momento de la aplicación de biosolvente se obtiene un mejor rendimiento de la degradación del petróleo. Antes, durante o después del evento de contaminación?

3.2. Objetivos generales

Optimizar el proceso de limpieza asistida con biosolventes, evaluando el aumento en el proceso de degradación del petróleo crudo en playas de arena.

3.3. Objetivos específicos

Obtener las condiciones óptimas de las variables involucradas en el estudio (tiempos de aplicación, proporción de biosolvente y tipo de nutrientes) que logren los mejores resultados de degradación del petróleo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Para el estudio se dispuso de: Sonicador Elmasonic E30H (Elma); Rotavapor IKA® RV05 basic y Baño IKA® HB05.06 CN (Arquimed); Cromatógrafo de Gases Focus GC acoplado con Espectrómetro de Masas DSQ II (Thermo Scientific); Columna para cromatografía Rtx®-5MS (Restek); Balanza Granataria LTECH 1500 (Arquimed); Balanza semi-analítica AND GF-400 (Arquimed); Material de vidrio en general (frascos, viales, pipetas Pasteur, etc.).

Los reactivos y sustratos principales ocupados en el experimento fueron: petróleo crudo (tipo caño limón); Fertilizante Orgánico Urea (ERGO); Fertilizante Inorgánico super triple (Best Garden); Biosolvente (sintetizado a partir de la esterificación de ácidos grasos en presencia de metanol e hidróxido de sodio como catalizador de la reacción) y la matriz de arena de playas locales. Los procesos de extracción de muestra y análisis requieren el uso de una mezcla de solventes orgánicos diclorometano:hexano 1:1 (ambos de Merck) tanto para la extracción de la muestra como para alguna dilución posterior que se requiera hacer y para la cuantificación se utilizó el estándar interno 1-clorooctadecano (Supelco).

4.2. Montaje del experimento

El experimento fue separado en 3 grupos según la zona intermareal estudiada (marea alta, media y baja) para la cual se realizó una matriz experimental en el programa

MODDE 9.0 según el diseño del tipo cubico centrado en las caras (CCF: Cubic Center Face) para estudiar los factores involucrados (controlables) y la respuesta obtenida de cada zona del intermareal en estudio. Esta matriz fue diseñada considerando 3 factores requeridos en el estudio: Tiempo de aplicación del biosolvente (aplicación previa a la llegada del petróleo en la zona costera, durante su llegada o posterior a ella), utilización de nutrientes (orgánicos –urea–, inorgánicos –sales– o una mezcla de ellos) y la relación de petróleo:biosolvente utilizada (1:1, 1:2 o 2:1). Cada matriz consta de un número de 17 experimentos (14 más 1 valor central en triplicado).

Cada uno de los 17 experimentos se realizó agregando 200g de muestra de arena en matraces erlenmeyer de 250mL, esto fue realizado para las 3 zonas del intermareal estudiadas. A cada matriz de arena intermareal se le agregó el 1% de la masa de arena en volumen de petróleo, es decir 2 mL de petróleo para cada 200g de arena, esto se mezcló para dar un sistema homogéneo. Las cantidades de biosolvente y los tiempos de aplicación están definidos para cada experimento según la proporción de petróleo:biosolvente. Los nutrientes utilizados fueron preparados previamente en una solución de concentración 10 g/L cada uno y la cual se agregó a cada experimento en relación 1:1 con respecto al biosolvente incorporado.

4.3. Extracción y análisis de la muestra

El petróleo de la muestra se extrajo con una solución de diclorometano:hexano 1:1 la cual fue asistida por un baño de ultrasonido para acelerar el proceso, posteriormente se tomaron 450 μ L de la fase orgánica líquida y fue llevada a un vial de 1,8mL para el análisis. Las muestras extraídas fueron analizadas por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas y los datos obtenidos de los correspondientes cromatogramas fueron trabajados bajo análisis estadísticos. El análisis por cromatografía gaseosa fue principalmente de hidrocarburos alifáticos (n -C₁₀ al n -C₃₃).

4.4. Análisis de datos

Los datos fueron analizados estadísticamente ocupando herramientas como estadística descriptiva y metodología de superficie de respuesta (RSM).

4.5. Plan de trabajo

Descripción de las actividades

Adquisición de material: Compra de los materiales (reactivos, fungibles, equipos, etc.) necesarios para el desarrollo completo de los experimentos propuestos para el año respectivo.

Configurar y probar metodologías analíticas: Desarrollar y probar todas las metodologías analíticas para ser empleadas a través de este proyecto a fin de identificar y cuantificar los compuestos involucrados.

Construcción de microcosmos: Construir microcosmos como se indica en el proyecto a fin de conocer los parámetros que afectan a la eliminación y la biodegradación de petróleo crudo.

Experimento con microcosmos: Los parámetros más importantes a ser estudiados en los experimentos con microcosmos. Tales factores será la adición de biosolventes en diferentes cantidades y proporciones (de acuerdo con el contaminante), mezclar biosolventes con nutrientes, dentro de otras.

Análisis de las muestras: Realizar todos los procedimientos analíticos de extracciones como de análisis a fin de identificar y cuantificar las sustancias químicas involucradas en este proyecto.

Análisis de los datos y la evaluación: evaluar los resultados obtenidos con el fin de entender los procesos involucrados, seguir experimentando o repetirlos si es necesario.

5. RESULTADOS

Los 3 factores descritos fueron estudiados para definir una sola respuesta, la cual corresponde al porcentaje de degradación de TPH durante los primeros 10 días de experimentación, ya que según lo demostrado en un informe preliminar hasta los primeros 10 días se produce la un decaimiento lineal de los hidrocarburos del petróleo y posterior a estos días la degradación fue mínima.

Para cada una de las zonas intermareales estudiadas se incluyó los datos de un control de petróleo para descartar procesos de weathering fisicoquímicos (incluyendo

| Año | Actividades | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|---|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | | Adquisición de materiales | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| | Implementación de metodologías analíticas | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| 1er | Construcción de los microcosmos | | | ■ | ■ | | | | | | | | |
| | Experimentación con microcosmos | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| | Análisis de muestras | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| | Análisis de datos | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| | Escritura de reporte final | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ |

el efecto de las mareas en las zonas baja y media del intermareal) que pueden llevar a concluir falsos positivos y se realizó un blanco de arena para determinar la presencia de hidrocarburos en cada una de las matrices de arena estudiada no encontrándose presencia de estos (datos no mostrados).

El cálculo general de la degradación de hidrocarburos para los 17 experimentos fue desarrollado a partir de la Fórmula 1, la cual incluye además un factor de corrección que descarta el proceso de degradación del control para la zona del intermareal estudiada (factor no aplicado a la zona baja).

$$\% Deg_{muestra} = \left(100 - \left(\frac{TPH_{día\ 10} \times 100}{TPH_{día\ -1\ 0}} \right) \right) \times \left(\frac{100 - \% Deg_{control}}{100} \right)$$

Fórmula 1. Cálculo del porcentaje de degradación de hidrocarburos para todas las muestras.

5.1. Zona Alta del intermareal

Se encontró que para el estudio en marea alta el control de petróleo alcanzó un porcentaje de degradación de un

34% (Tabla 1) lo cual fue incluido en la fórmula 1 para poder determinar el valor de porcentaje de degradación para el set de 17 experimentos estudiados (Tabla 2). Además se incluyó en paralelo el triplicado de una muestra (N16) para estudiar la homogeneidad del sistema y poder determinar el porcentaje de desviación estándar (Tabla 3) el cual alcanzó un 38% que representa al set experimental completo.

Tabla 1. Porcentaje de degradación de un control de petróleo en marea alta.

| Días | 0 | 2 | 6 | 10 |
|-------|---|----|----|----|
| % Deg | 0 | 10 | 33 | 34 |

Los datos de porcentaje de degradación a 10 días para el set experimental fueron llevados a la matriz diseñada en el programa MODDE 9.0 (Tabla 4) para realizar el estudio estadístico e interpretación de datos usando el análisis mediante metodología de superficie de respuesta (RSM). Para la muestra N16 se utilizó el valor promedio del triplicado.

Tabla 2. Porcentaje de degradación para los 17 experimentos estudiados en la matriz de marea alta.

| | -1 | 0 | 2 | 6 | 10 | | %Deg (10 días) |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|--|----------------|
| N1 | 0.000 | 510.140 | 512.864 | 509.737 | 412.825 | | 12.6 |
| N2 | 503.264 | 489.305 | 477.931 | 419.617 | 399.394 | | 13.6 |
| N3 | 0.000 | 476.130 | 471.320 | 448.229 | 360.148 | | 16.1 |
| N4 | 732.329 | 527.314 | 527.314 | 372.531 | 333.059 | | 36.0 |
| N5 | 0.000 | 528.039 | 405.766 | 462.890 | 387.647 | | 17.5 |
| N6 | 722.854 | 531.905 | 438.942 | 471.508 | 366.746 | | 32.5 |
| N7 | 0.000 | 505.169 | 480.495 | 468.748 | 295.296 | | 27.4 |
| N8 | 504.039 | 435.294 | 485.923 | 424.482 | 453.946 | | 6.6 |
| N9 | 0.000 | 468.046 | 421.471 | 472.755 | 431.639 | | 5.1 |
| N10 | 717.410 | 434.829 | 456.572 | 446.882 | 392.784 | | 29.9 |
| N11 | - | 414.163 | 460.125 | 526.532 | 405.559 | | 1.4 |
| N12 | - | 393.118 | 451.164 | 456.632 | 392.884 | | 0.0 |
| N13 | - | 424.185 | 467.650 | 559.181 | 419.707 | | 0.7 |
| N14 | - | 442.610 | 453.668 | 492.087 | 560.051 | | 0.0 |
| N15 | - | 479.761 | 477.494 | 490.078 | 429.483 | | 6.9 |
| N16A | - | 447.195 | 424.542 | 445.886 | 431.880 | | 2.3 |
| N16B | - | 447.195 | 424.542 | 408.711 | 412.392 | | 5.1 |
| N16C | - | 447.195 | 424.542 | 427.955 | 419.419 | | 4.1 |
| N17 | - | 470.906 | 418.953 | 482.209 | 465.496 | | 0.8 |

Tabla 3. Porcentaje de degradación en triplicado de la muestra N16 para determinar valor promedio y porcentaje de desviación estándar.

| | A | B | C | Promedio | SD | %SD |
|-----|-------|-------|-------|----------|-------|--------|
| N16 | 2.260 | 5.136 | 4.099 | 3.832 | 1.457 | 38.010 |

Tabla 4. Matriz de diseño experimental para las muestras de marea alta.

| Exp | Tiempo de aplicación ¹ | Nutriente Orgánico/ Inorgánico ² | Proporción Petróleo/ Biosolvente ³ | % Deg (10 días) |
|-----|-----------------------------------|--|--|-----------------|
| N1 | -1 | 0 | 33.3 | 12.6 |
| N2 | 1 | 0 | 33.3 | 13.6 |
| N3 | -1 | 100 | 33.3 | 16.1 |
| N4 | 1 | 100 | 33.3 | 36.0 |
| N5 | -1 | 0 | 66.6 | 17.5 |
| N6 | 1 | 0 | 66.6 | 32.5 |
| N7 | -1 | 100 | 66.6 | 27.4 |
| N8 | 1 | 100 | 66.6 | 6.6 |
| N9 | -1 | 50 | 49.95 | 5.1 |
| N10 | 1 | 50 | 49.95 | 29.9 |
| N11 | 0 | 0 | 49.95 | 1.4 |
| N12 | 0 | 100 | 49.95 | 0.0 |
| N13 | 0 | 50 | 33.3 | 0.7 |
| N14 | 0 | 50 | 66.6 | 0.0 |
| N15 | 0 | 50 | 49.95 | 6.9 |
| N16 | 0 | 50 | 49.95 | 3.8 |
| N17 | 0 | 50 | 49.95 | 0.8 |

¹ Los valores significan: -1 (Aplicación de biosolvente un día antes de la contaminación), 0 (Aplicación inmediata) y 1 (Aplicación un día después).

² Los valores significan: 0 (Uso sólo de nutriente inorgánico), 100 (Uso sólo de nutriente orgánico) y 50 (Uso de mezcla de nutrientes en relación 1:1)

³ Los valores significan: 33.33 (Proporción de Petróleo:Biosolvente 2:1), 66.66 (Proporción 1:2) y 49.95 (Proporción 1:1).

La matriz de datos anterior fue diseñada para dar una superficie de respuesta de acuerdo al modelamiento del tipo cubico centrado en las caras (CCF). Los datos fueron ajustados por análisis parcial de mínimos cuadrados (PLS).

Entonces, para el desarrollo experimental en marea alta se logró observar que dentro de las 3 variables estudiadas el "Tiempo de aplicación" ejerce un mayor efecto sobre la degradación de hidrocarburos del petróleo seguido del "Tipo de nutriente" utilizado y finalmente el factor de menor importancia seria la "proporción de petróleo:biosolvente" utilizada (Figura 1). Se observó además que todos los factores estudiados ejercen un efecto positivo sobre la respuesta estudiada (% Degradación a 10 días), sin embargo, se observó que para la interacción entre las variable estudiadas hay un efecto negativo (antagónico) por lo cual se concluye que no hay efectos sinérgicos entre estas (Figura 2).

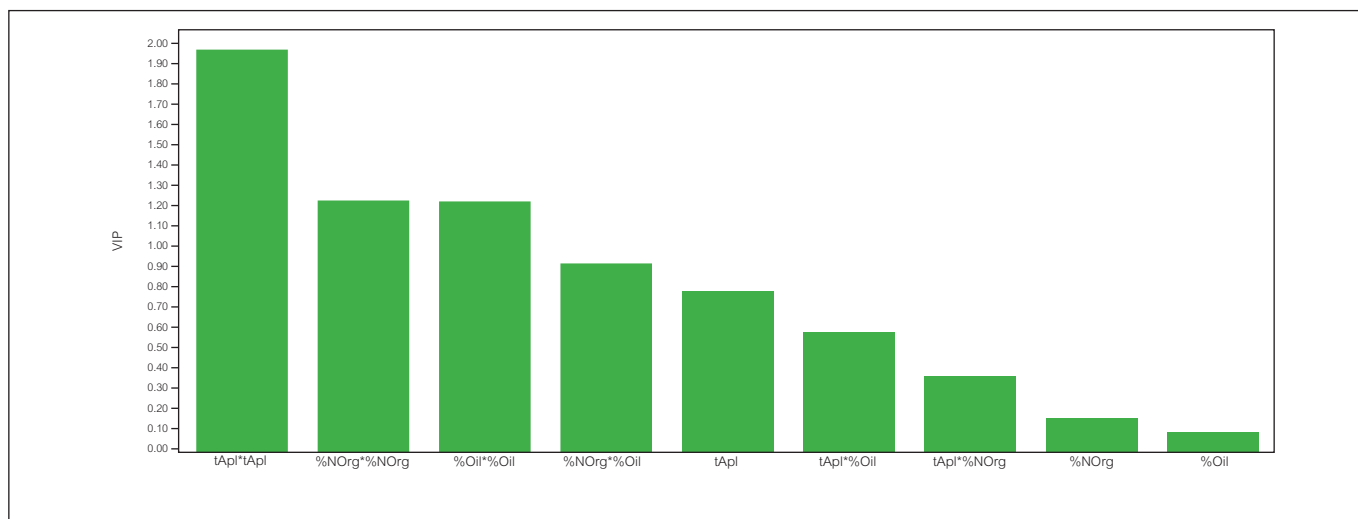


Figura 1. Gráfico de importancia de las variables (VIP) para la zona alta del intermareal.

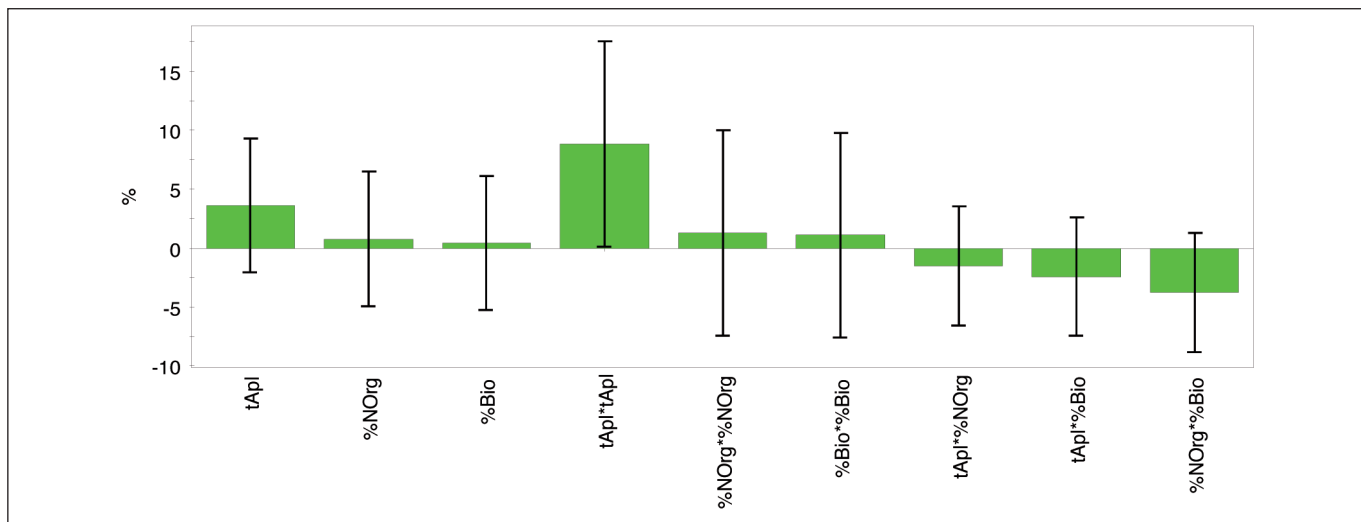


Figura 2. Gráfico de coeficientes para demostrar el efecto sinérgico o antagónico de las variables sobre la respuesta estudiada para la zona alta del intermareal.

Finalmente los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos (Figuras 3 y 4) indican que se obtienen 2 respuestas óptimas, ambas aplicando biosolvente el día posterior al evento de contaminación, una utilizando nutrientes del tipo orgánico y una proporción de petróleo:biosolvente de 2:1 mientras que la otra es

utilizando nutrientes del tipo inorgánico y una proporción de petróleo:biosolvente de 1:2, siendo mayor la respuesta para la primera condición. Esta situación de 2 respuestas óptimas se observa mejor en la figura 4C, la cual se conoce como superficie "tipo montura" y que indica 2 máximos en el modelo.

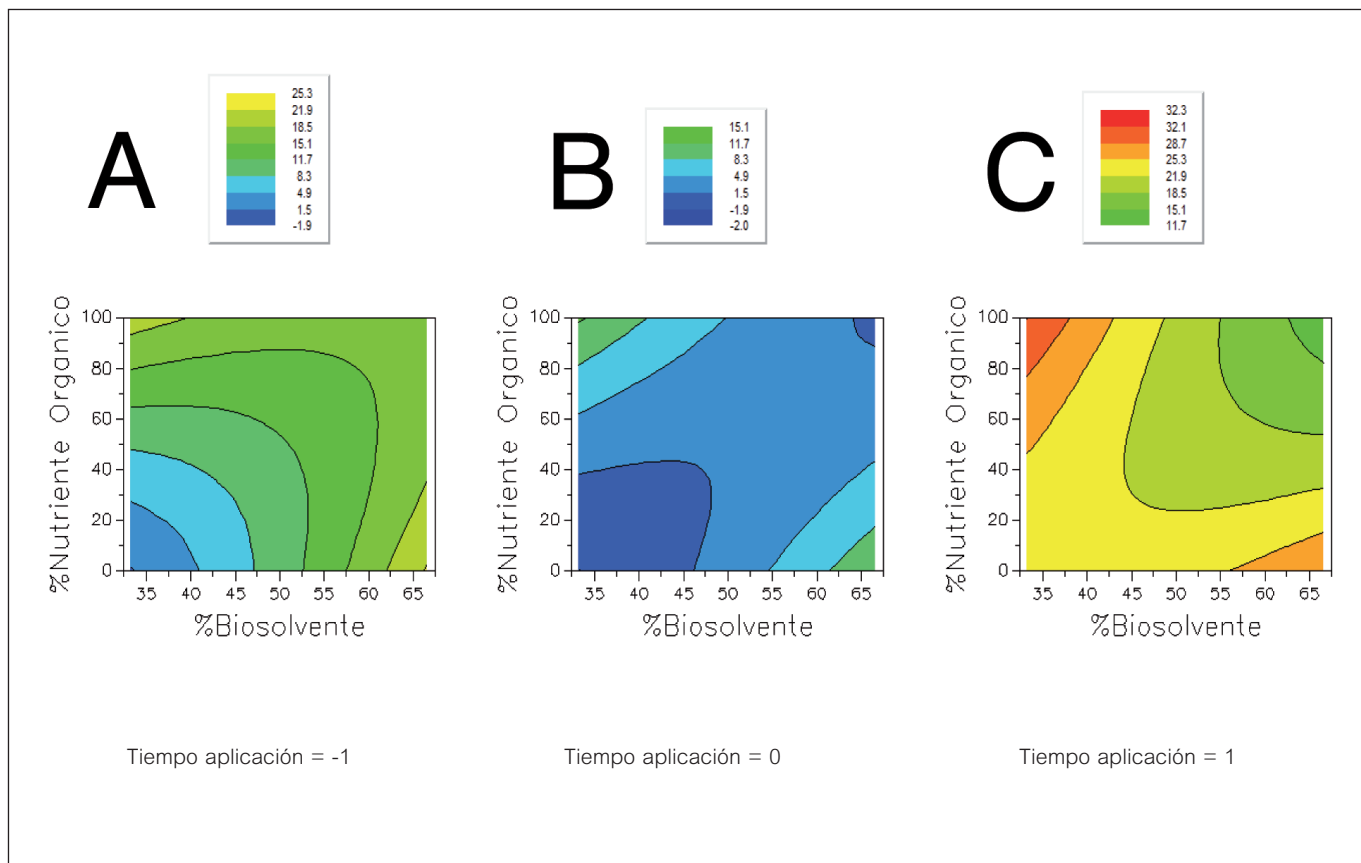


Figura 3. Gráfico de contorno para el tiempo de aplicación del biosolvente estudiado (A, B y C) en la zona alta del intermareal.

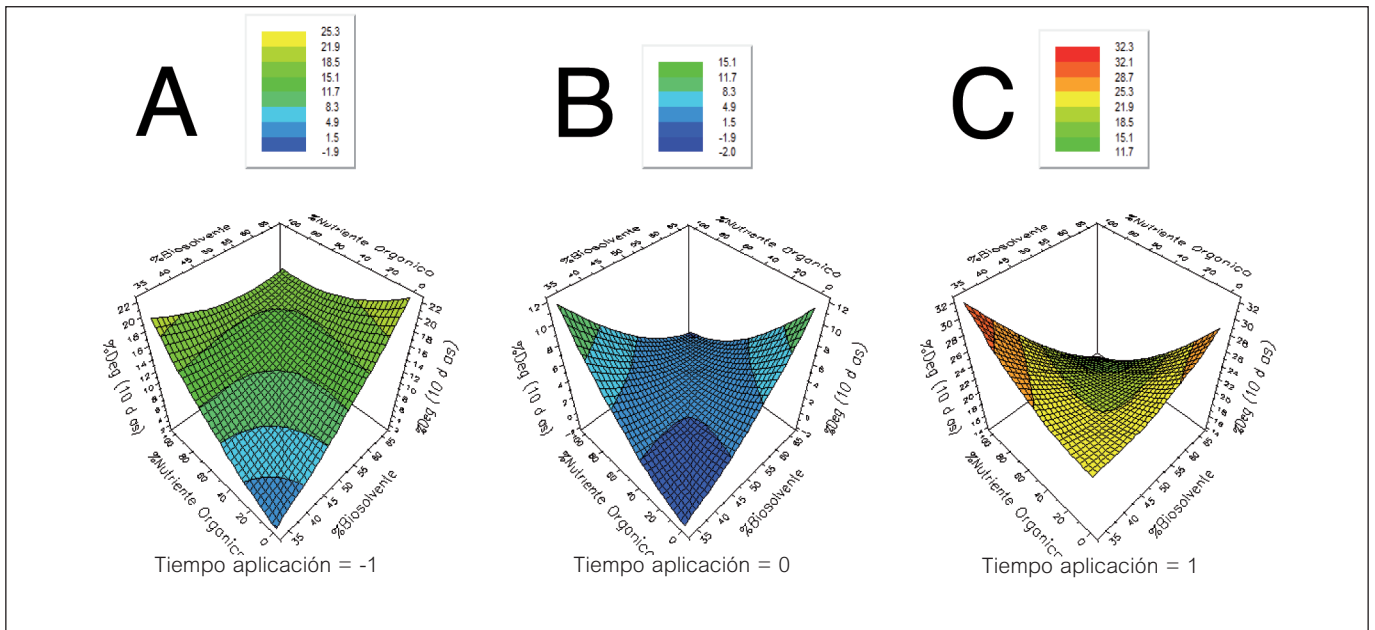


Figura 4. Gráfico de superficie de respuesta. La imagen muestra 3 gráficos de superficie de respuesta con diferentes valores para el tiempo de aplicación del biosolvente estudiado (A, B y C), indicando lo mismo descrito en el grafico anterior pero demostrando además el ajuste de tipo montura con 2 máximos.

5.2. Zona Media del intermareal.

Para el estudio en la zona media del intermareal el control de petróleo alcanzó un porcentaje de degradación de un 87% (Tabla 5), se puede ver además los valores de TPH y porcentaje de degradación obtenidos en la tabla 6 y la matriz de datos generada por el programa en la tabla 8. El porcentaje de desviación estándar de este sistema (Tabla 7) alcanzó un 2%, demostrando que hubo una

mejor homogeneidad del sistema que para el estudio en marea alta.

Tabla 5. Porcentaje de degradación de un control de petróleo en marea media.

| Dias | 0 | 2 | 6 | 10 |
|-------|---|---|----|----|
| % Deg | 0 | 2 | 70 | 87 |

Tabla 6. Porcentaje de degradación para los 17 experimentos estudiados en la matriz de marea media.

| | -1 | 0 | 2 | 6 | 10 | % Deg (10 días) |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
| N1 | 0.000 | 662.469 | 558.785 | 152.244 | 146.167 | 10.1 |
| N2 | 735.280 | 494.956 | 263.295 | 164.947 | 52.194 | 12.1 |
| N3 | 0.000 | 711.878 | 392.276 | 0.000 | 0.000 | 13.0 |
| N4 | 652.326 | 438.782 | 361.249 | 101.707 | 30.631 | 12.4 |
| N5 | 0.000 | 697.731 | 348.790 | 58.758 | 5.420 | 12.9 |
| N6 | 680.906 | 463.023 | 214.505 | 0.000 | 0.000 | 13.0 |
| N7 | 0.000 | 690.427 | 361.662 | 15.915 | 15.522 | 12.7 |
| N8 | 663.762 | 477.526 | 312.614 | 92.617 | 13.662 | 12.7 |
| N9 | 0.000 | 604.186 | 251.062 | 0.000 | 0.000 | 13.0 |
| N10 | 640.451 | 392.701 | 309.480 | 92.678 | 0.000 | 13.0 |
| N11 | - | 548.419 | 293.590 | 90.102 | 26.910 | 12.4 |
| N12 | - | 603.743 | 534.370 | 172.758 | 156.159 | 9.6 |
| N13 | - | 668.070 | 462.372 | 285.604 | 88.943 | 11.3 |
| N14 | - | 665.851 | 301.192 | 98.538 | 41.484 | 12.2 |
| N15 | - | 598.226 | 565.726 | 297.828 | 176.878 | 9.2 |
| N16A | - | 635.229 | 326.351 | 117.425 | 21.968 | 12.6 |
| N16B | - | 568.796 | 402.289 | 73.252 | 14.870 | 12.7 |
| N16C | - | 538.261 | 439.522 | 42.216 | 35.006 | 12.2 |
| N17 | - | 538.070 | 367.754 | 164.417 | 132.171 | 9.8 |

Tabla 7. Porcentaje de degradación en triplicado de la muestra N16 para determinar valor promedio y porcentaje de desviación estándar.

| | A | B | C | | Promedio | SD | %SD |
|-----|--------|-------|-------|--|----------|-------|--------|
| N16 | 12.550 | 5.136 | 4.099 | | 12.455 | 1.457 | 38.010 |

Tabla 8. Matriz de diseño experimental para las muestras de marea media.

| Exp | Tiempo de aplicación ¹ | Nutriente Orgánico/ Inorgánico ² | Proporción Petróleo/ Biosolvente ³ | %Deg (10 días) |
|-----|-----------------------------------|---|---|----------------|
| N1 | -1 | 0 | 33.3 | 10.1 |
| N2 | 1 | 0 | 33.3 | 12.1 |
| N3 | -1 | 100 | 33.3 | 13.0 |
| N4 | 1 | 100 | 33.3 | 12.4 |
| N5 | -1 | 0 | 66.6 | 12.9 |
| N6 | 1 | 0 | 66.6 | 13.0 |
| N7 | -1 | 100 | 66.6 | 12.7 |
| N8 | 1 | 100 | 66.6 | 12.7 |
| N9 | -1 | 50 | 49.95 | 13.0 |
| N10 | 1 | 50 | 49.95 | 13.0 |
| N11 | 0 | 0 | 49.95 | 12.4 |
| N12 | 0 | 100 | 49.95 | 9.6 |
| N13 | 0 | 50 | 33.3 | 11.3 |
| N14 | 0 | 50 | 66.6 | 12.2 |
| N15 | 0 | 50 | 49.95 | 9.2 |
| N16 | 0 | 50 | 49.95 | 12.5 |
| N17 | 0 | 50 | 49.95 | 9.8 |

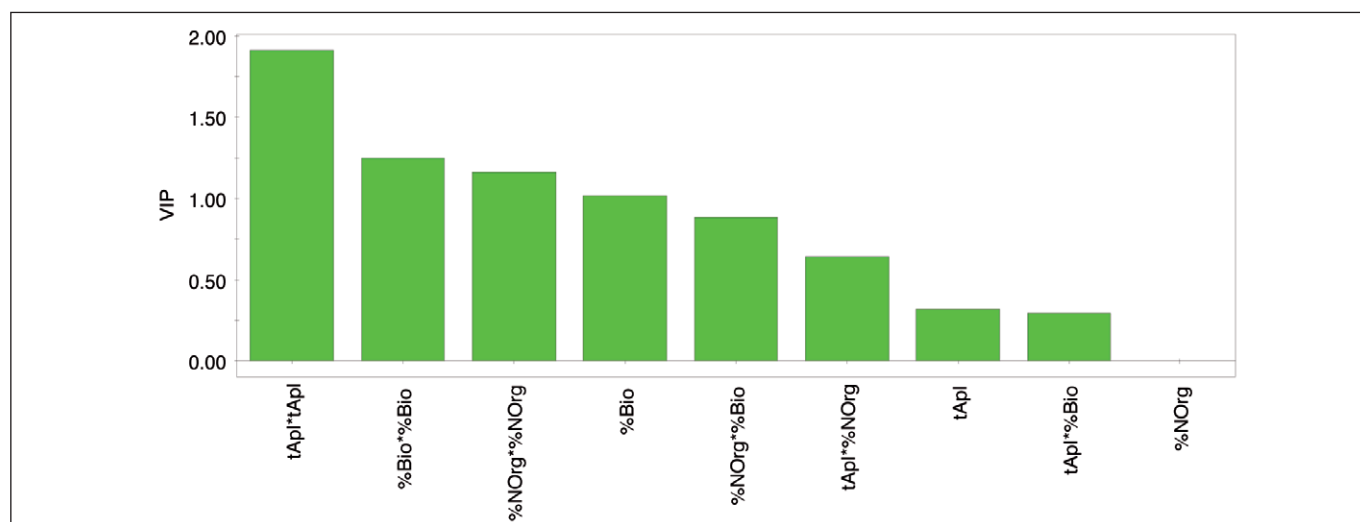
¹ Los valores significan: -1 (Aplicación de biosolvente un día antes de la contaminación), 0 (Aplicación inmediata) y 1 (Aplicación un día después).

² Los valores significan: 0 (Uso sólo de nutriente inorgánico), 100 (Uso sólo de nutriente orgánico) y 50 (Uso de mezcla de nutrientes en relación 1:1)

³ Los valores significan: 33.33 (Proporción de Petróleo:Biosolvente 2:1), 66.66 (Proporción 1:2) y 49.95 (Proporción 1:1).

Para los experimentos que representan la zona media del intermareal, se observó que la variable que ejerce un

mayor efecto sobre la degradación de hidrocarburos del petróleo es la “proporción de petróleo:biosolvente” seguido del “Tiempo de aplicación” de biosolvente y finalmente el factor de menor importancia sería el “Tipo de nutriente” utilizado (Figura 5). Se observó también que al igual que el estudio en la zona de marea alta la interacción entre las variable estudiadas tienen un efecto antagónico mientras que el de las variables sobre la respuesta es relativo (Figura 6).

**Figura 5.** Gráfico de importancia de las variables (VIP) para la zona media del intermareal.

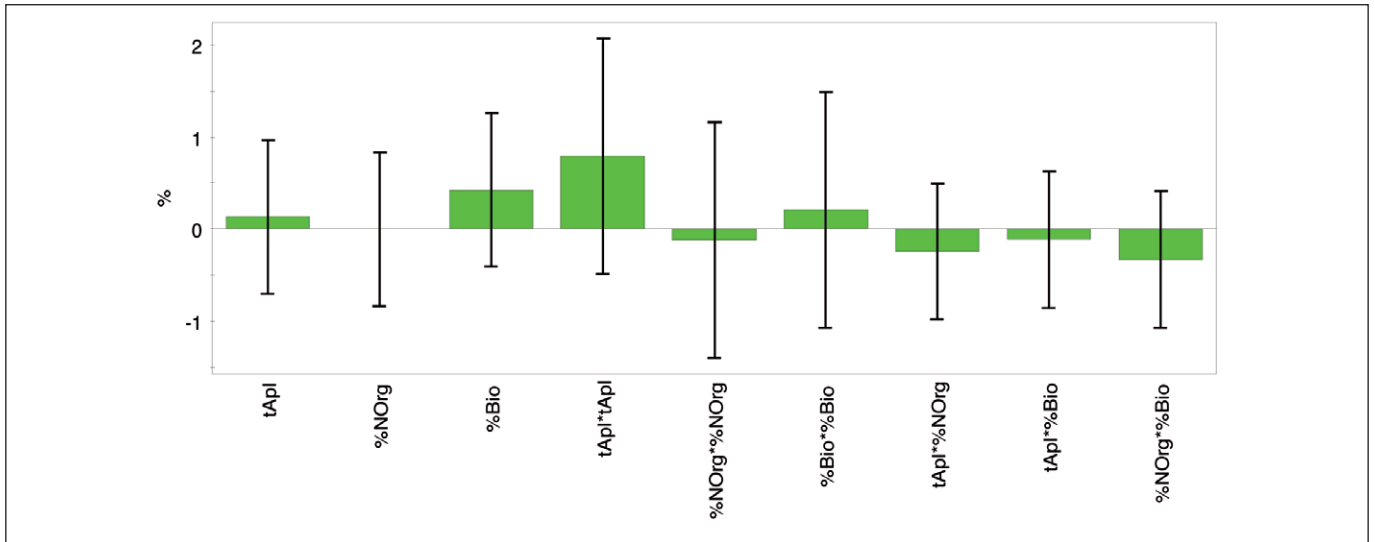


Figura 6. Gráfico de coeficientes para demostrar el efecto sinérgico o antagonico de las variables sobre la respuesta estudiada para la zona media del intermareal.

Los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos para esta marea (Figuras 7 y 8) indican una mejor respuesta aplicando biosolvente el día posterior al evento de contaminación al igual que en marea alta y utilizando nutrientes del tipo inorgánico con una proporción de petróleo:biosolvente de 1:2 (Figura 8C). Además se puede encontrar otra buena respuesta (aunque de menor grado que la primera) con aplicación previa de biosolvente en proporción 1:2 de petróleo:biosolvente y con el uso de una mezcla de nutrientes (Figura 8A).

5.3. Zona Baja del intermareal

Para el estudio en marea baja el control de petróleo alcanzó un porcentaje de degradación de un 100% (Tabla 9) por lo que es ilógico incluir este factor de corrección en

la fórmula 1, demostrándose la gran importancia de la marea en la depuración de esta zona. El porcentaje de desviación estándar para el set experimental (Tabla 11) fue de un 0.6%. Debido a esto y a que se obtuvo un porcentaje de degradación similar para la mayor parte de los 17 experimentos (Tabla 10) resulta ilógico pensar en incluir estos datos en la matriz de diseño para obtener una superficie de respuesta, por lo que para el tratamiento de datos de este set experimental no se lleva a modelamiento.

Tabla 9. Porcentaje de degradación de un control de petróleo en marea baja.

| Dias | 0 | 2 | 6 | 10 |
|-------|---|----|-----|-----|
| % Deg | 0 | 62 | 100 | 100 |

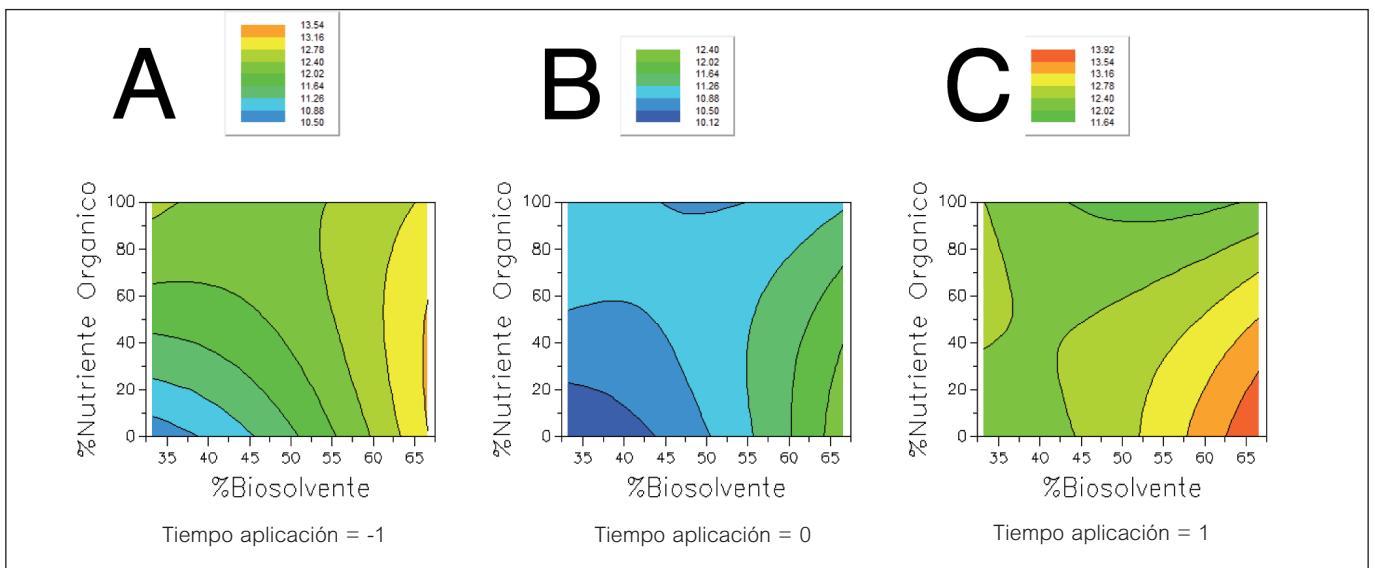


Figura 7. Gráfico de contorno para el tiempo de aplicación del biosolvente estudiado (A, B y C) en la zona media del intermareal..

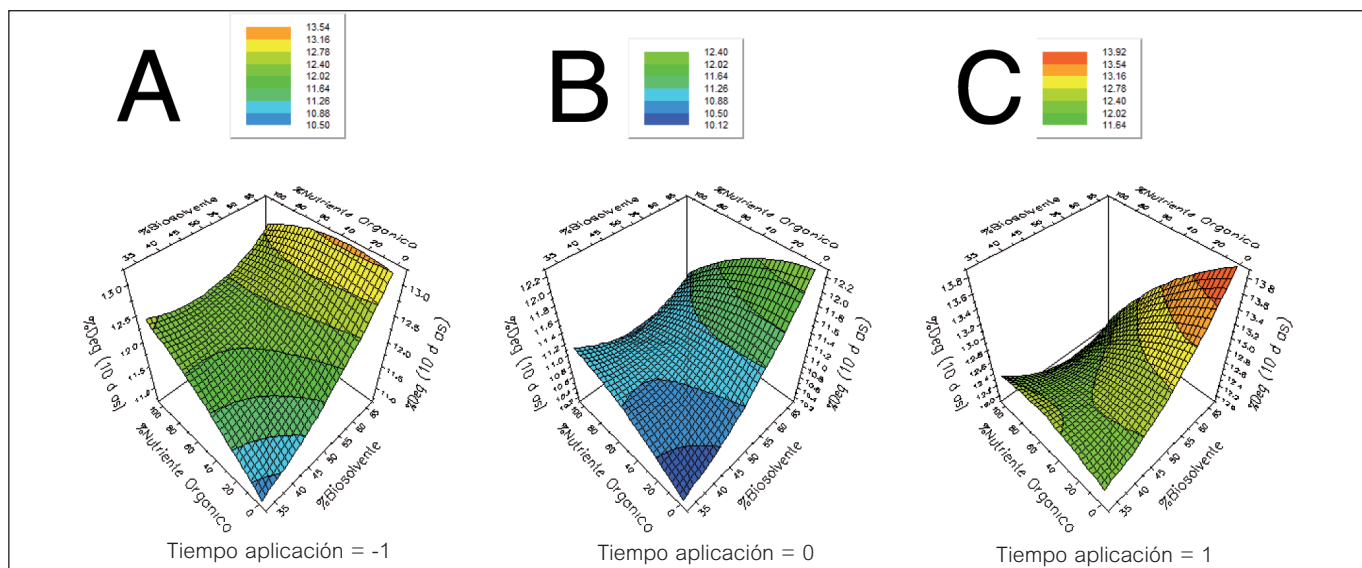


Figura 8. Gráfico de superficie de respuesta. La imagen muestra 3 gráficos de superficie de respuesta con diferentes valores para el tiempo de aplicación del biosolvente estudiado (A, B y C), encontrándose un valor óptimo en el gráfico C y otro en el gráfico A.

Tabla 10. Matriz de diseño experimental para las muestras de marea baja.

| | -1 | 0 | 2 | 6 | 10 | % Deg (10 días) |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
| N1 | 0.000 | 574.585 | 257.311 | 111.748 | 21.891 | 96.2 |
| N2 | 575.558 | 190.092 | 18.616 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N3 | 0.000 | 459.010 | 348.558 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N4 | 708.908 | 265.662 | 97.999 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N5 | 0.000 | 590.075 | 302.045 | 69.184 | 0.000 | 100.0 |
| N6 | 684.448 | 223.988 | 39.051 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N7 | 0.000 | 617.329 | 465.342 | 308.049 | 308.511 | 50.0 |
| N8 | 560.381 | 560.381 | 304.482 | 87.024 | 45.674 | 91.8 |
| N9 | 0.000 | 341.488 | 341.488 | 147.738 | 0.000 | 100.0 |
| N10 | 668.638 | 254.590 | 166.635 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N11 | - | 511.197 | 161.164 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N12 | - | 606.379 | 308.585 | 30.295 | 35.545 | 94.1 |
| N13 | - | 563.548 | 397.819 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N14 | - | 526.967 | 76.535 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N15 | - | 579.634 | 304.936 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N16A | - | 565.310 | 365.023 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N16B | - | 509.450 | 389.723 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |
| N16C | - | 649.115 | 446.415 | 166.118 | 7.092 | 98.9 |
| N17 | - | 628.108 | 338.397 | 0.000 | 0.000 | 100.0 |

Tabla 11. Porcentaje de degradación en triplicado de la muestra N16 para determinar valor promedio y porcentaje de desviación estándar.

| | A | B | C | Promedio | SD | %SD |
|-----|---------|---------|--------|----------|-------|-------|
| N16 | 100.000 | 100.000 | 98.907 | 99.636 | 0.631 | 0.633 |

6. DISCUSIÓN

Los 3 set experimentales más el estudio de los blancos demuestran que el efecto de las mareas es sin duda el principal mecanismo de depuración dependiente de la zona costera contaminada. Encontrándose que sólo para el porcentaje de degradación en los controles de petróleo se alcanza un 100% de eliminación de hidrocarburos totales en la zona con mayor tiempo de exposición al efecto de las mareas (marea baja), seguido de un 87% para aquella zona del intermareal que le sigue (mare media) y la cual presenta un tiempo de exposición al agua de mar menor (dado principalmente por las subidas de marea) y finalmente con un 34% de degradación de hidrocarburos en el control la zona más alta del intermareal (la cual presenta una exposición nulo al agua de mar) es aquella que posee un menor porcentaje de degradación durante los 10 primeros días de experimentación. Esto demuestra que el efecto de las mareas por si solo es capaz de realizar remoción física completa del petróleo en la zona más baja del intermareal pero no así en aquellas zonas donde la marea tiene menor acceso (zona de marea media) o acceso nulo (zona de marea alta). No obstante, esta situación podría cambiar si se considera que la limpieza del hidrocarburo derramado se realice varios días después de ocurrido el derrame, implicando que el petróleo pierda gran parte de sus componentes volátiles lo que hace que este se haga más espeso y tengo una mayor adherencia a los sustratos, no siendo removido tan fácilmente por medios físicos como las maras.

A pesar de demostrarse la importancia del efecto de las mareas en la remoción del petróleo en las zonas más bajas del intermareal esto no significa que el contaminante haya sido degradado o desaparecido del lugar, y debido a que este estudio se realiza como una simulación de limpieza en zonas costeras sólo a nivel superficial, se puede sospechar que el petróleo se mantenga remanente a nivel de profundidad. Además se debe considerar que aquella cantidad de petróleo removido físicamente por la acción de las olas pasa del sistema costero arenoso al sistema acuático para ser dispersado al mar y distribuido nuevamente en otro sitio, por lo que resulta de suma importancia y necesidad asistir este tipo de técnica con otras que permitan recuperar o degradar el petróleo que regresa del sistema marino.

Dejando de lado los resultados del estudio en la zona baja del intermareal (debido al alto porcentaje de eliminación del petróleo obtenido) se observó que en el resto de las zonas la aplicación de biosolvente posterior al evento de contaminación entrega mejores respuestas de degradación que la aplicación previa o inmediata. Otro punto interesante es que tanto para marea media y alta se alcanza condiciones óptimas de degradación en diferentes puntos del modelo, lo que indica que estas zonas si bien coinciden en que el tiempo de aplicación óptimo es el día posterior a la llegada del contaminante (Figuras 3 y 7 C), las condiciones de proporcionalidad del biosolvente respecto al petróleo y del tipo de nutriente agregado son

opuestas. Se establece para la zona media del intermareal un valor óptimo en el proceso de degradación utilizando nutrientes del tipo inorgánico y proporciones de petróleo:biosolvente 1:2, mientras que para la zona alta del intermareal se da esta condición utilizando nutrientes del tipo orgánico y proporciones de petróleo:biosolvente 2:1. No obstante existe un punto de inflexión para ambos, debido a que en la zona alta del intermareal se encuentra una segunda condición que alcanza un valor óptimo de degradación y el cual coincide con las condiciones establecidas para la zona media, proponiéndose finalmente como condición óptima general la aplicación posterior de biosolvente en relación 1:2 petróleo:biosolvente con el uso de nutrientes inorgánicos.

Debido a que el estudio de la zona alta del intermareal entrega 2 condiciones óptimas para la obtención de un alto valor en el porcentaje de degradación del petróleo y una de las cuales coincide con las condiciones óptimas halladas en el estudio de la zona media, es que se establece una condición en común aplicada en el estudio y que sería el uso de biosolventes en proporción 1:2 petróleo biosolvente con el uso de nutrientes inorgánicos aplicados el día posterior al evento de contaminación. No obstante, se debe dejar en claro que como el diseño experimental es del tipo cubico centrado en las caras no se puede definir si se encuentra una mejor respuesta fuera de los máximos y mínimos establecidos para cada factor estudiado, es decir, no podemos suponer que la aplicación de biosolvente mas allá de un día después del evento de contaminación o aumentando la cantidad de biosolvente agregado al sistema tenga una mejor respuesta, para esto es necesario indagar en otros modelos experimentales como el central compuesto circunscrito (CCC) representado esta la principal limitación del modelo.

Finalmente se da a conocer que debido al efecto de las mareas los sistemas costeros poseen un sistema natural de depuración que le permite remover parte del petróleo a nivel superficial, pero tal vez no necesariamente se de la misma condición a nivel de profundidad, debido a que se sabe que el petróleo es capaz de dispersarse a nivel sub-superficial en la arena. Además, este mismo efecto de remoción por las mareas permite que el petróleo en las costas regrese al sistema acuático pero esto solo significa desplazar el contaminante de una matriz a otra, por lo que es necesario además, evaluar el efecto del biosolvente como agente de limpieza en sistemas acuáticos o bien investigar en nuevas técnicas que permitan degradar el crudo en estos sistemas.

7. CONCLUSIONES

- El efecto de las mareas es capaz de remover exitosamente el 100% del petróleo en la zona más baja del intermareal, mientras que en la zona media se alcanza un porcentaje de un 87%.
- Para la zona más alta del intermareal que no tiene contacto con las mareas presenta un 34% de elimi-

nación el cual se debe principalmente al efecto de evaporación de las fracciones más volátiles del petróleo.

- El tiempo de aplicación de la mezcla de biosolvente y nutrientes un día después del evento de contaminación entrega mejores resultados para las zonas alta y media del intermareal que los tiempos de aplicación previo o durante el evento de contaminación, siendo además el factor de mayor importancia estudiado.
- Los resultados obtenidos en el estudio de la zona alta del intermareal hacen que sea innecesario realizar modelamiento en la matriz de diseño experimental, concluyéndose que el efecto de las mareas por sí sólo logra remover la totalidad del contaminante para el tiempo estudiado en esta zona.
- Las condiciones óptimas encontradas para las zonas media y alta del intermareal incluyen un punto de inflexión en ambas que se define como respuesta óptima del estudio en general. Esta consiste en la aplicación de la mezcla de biosolventes posterior al evento de contaminación, con uso de nutrientes inorgánico y una proporción de petróleo: biosolvente 1:2.
- De los resultados de esta investigación se ve la necesidad de proyectar el estudio de la degradación de petróleo crudo a nivel sub-superficial en las mismas zonas estudiadas y posiblemente los efectos del biosolvente sobre la degradación de hidrocarburos en el sistema marino acuático.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Behavior and Fate of Oil. In: Oil in the Sea III: Inputs, fates, and effects. pp. 89–102. NATIONAL ACADEMY PRESS. Washington, D.C. 1985.
2. James, E. Armstrong and John A. Calder. 1978. Inhibition of Light-Induced pH Increase and O₂ Evolution of Marine Microalgae by Water-Soluble Components of Crude and Refined Oils. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:858-862.
3. <http://www.epa.gov/osweroe1/content/learning/oiltech.htm>
4. Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1:63-70.
5. John, N. Boyd, Debra, K. Scholz and Ann, H. Walker. 2001. Effects of oil and chemically dispersed oil in the environment: weathering process. In: International Oil Spill Conference. Prepared by Scientific & Environmental Associates, Inc. iosc.org
6. Lunel, T., Lee, K., Swannell, R., Woddy, P. Rusin, J., Bailey, N. Halliwell, C., Davis, L., Sommerville, M., Dobie, A., Mitchell, D. McDonagh, M. 1996. Shoreline cleanup during the Sea Empress incident: the cleanup operation and the role of surf washing dispersants and bioremediation. In: International Oil Spill Conference. Proceedings of the Nineteenth Arctic and Marine Oil Spill Programme, Technical Seminar, Environment Canada. Ontario, pp. 141-148.
7. Stephen, M., Mudge & Gloria Pereira. 1999. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results. *Spill Sci. Tech. Bull.* 5:353-355.
8. Jorgelina, C., Pasqualino, Daniel Montané, Joan Salvadó. 2006. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy.* 30:874-879.
9. Young-Sook, Oh, Doo-Seup Sim and Sang-Jin Kim. 2001. Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Marine Pollution Bulletin.* 42:1367-1372.
10. Robert, D. Morrison and Brian L. Murphy. Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. In: Environmental Forensics. Contaminant specific guide. pp. 339–407. 2006.
11. Jared A. DeMello, Catherine A. Carmichael, Emily E. Peacock, Robert K. Nelson, J. Samuel Arey and Christopher M. Reddy. 2007. Determining the extent of weathering of spilled fuel in contaminated soil using the diastereomers of pristane and phytane. *Organic Geochemistry.* 38: 2131-2134.
12. A.D. Venosa, M.T. Suidan, D. King and B.A. Wrenn. 1997. Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:131-139.
13. A.J. Southward. 1982. An ecologist's view of the implications of the observed physiological and biochemical effects of petroleum compounds on marine organisms and ecosystems. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 297:241-255.
14. Nicholas J. Miller and Stephen M. Mudge. 1997. The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. *Spill. Sci. Technol. Bull.* 4:17-33.