

BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELOS DEFICIENTES DE NITRÓGENO

Adrián J. Acuña y Oscar H. Pucci

C.E.I.M.A.

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco,
Km 4, 9000 ,Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. E-mail: adrianjacuna@sinectis.com.ar

RESUMEN

El estudio de un suelo patagónico con una larga historia de contaminación de hidrocarburos mostró poseer una alta actividad de microorganismos diazotrofos los que son capaces de biodegradar dichos contaminantes. Para estudiar la utilización de hidrocarburos en condiciones de ausencia de nitrógeno se diseñaron sistemas de mineralización donde las relaciones C:N:P finales de cada una fueron: 100:0,003:0,003; 100:0,003:0,22 con agregado de benzoato; 100:0,003:0,22 con agregado de gas oil. Se observó que la relación C:N:P que logró mejores tasas de mineralización (229.92mg CO₂/Kg de suelo/día) y de biodegradación (35,70%) fue de 100:0,003:0,22 con agregado de gas-oil con respecto a los datos intrínsecos del suelo estudiado (C:N:P: 100:0,003:0,003; tasa de mineralización: 43,59 mgCO₂/Kg de suelo/día; porcentaje de biodegradación: 9,97%). De dicho suelo se aislaron 52 cepas bacterianas las cuales mostraron poseer la capacidad de crecer en medios libres de nitrógeno, de biodegradar gasoil en presencia de dicho nutriente y 11 de estas cepas mostraron una densidad óptica superior a 0,3 y alcanzando valores de hasta 0,9 a 690 nm en un caldo mineral sin nitrógeno suplementado con 0,1% de gasoil. Estos datos, sumados a la observación de que en aquellos sistemas deficientes en nitrógeno mostraron un incremento de iones nitratos, son indicios de la existencia de microorganismos fijadores de nitrógeno capaces de degradar hidrocarburos.

INTRODUCCION

En la Patagónia existe una intensa explotación petrolera por lo que es frecuente encontrar en sus paisajes grandes regiones contaminadas por petróleo. Su composición elemental es aproximadamente C: 83.0-87.0%, H: 10.0-14.0%, N :0.1-2.0%, O : 0.05-1.5%, S: 0.05-5.0% (31), donde estos átomos se agrupan en diversas combinaciones formando diferentes grupos de hidrocarburos, que al ser sometidos a una separación con solventes en una columna de silica-gel se obtienen las fracciones alifáticos, aromáticos y fracción polar o asfálténicos (10).

Debido a que los repetidos accidentes en la industria petrolera traen consigo grandes problemas ambientales, a aumentado dentro de la misma el interés en prevenir este tipo de acontecimientos, como así también el de reparar los daños producidos en la naturaleza.

Por ello, desde hace varios años, se han ido estudiando diferentes procedimientos para remediar los sitios contaminados, donde se ha observado que la biorremediación de los hidrocarburos derramados por parte de microorganismos es un método posible de llevar a cabo (1, 6, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 36, 37). Dentro de estos estudios se ha observado que existe un amplio número de géneros bacterianos que poseen esta capacidad degradativa, de los cuales podemos destacar a los géneros *Arthobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas* (21, 22, 26, 36), quedando fuera de esta lista

un sin número de géneros bacterianos debido a la alta toxicidad que poseen este tipo de compuestos (30). Para que todos estos microorganismos puedan llevar a cabo la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo, existen una serie de parámetros físicos, como ser humedad, aireación, pH, temperatura, etc (4, 10, 25), que deben encontrarse dentro de rangos óptimos para tal fin (4, 10), ocurriendo lo mismo para los diferentes nutrientes (3, 21, 25), donde se ha podido observar que los nutrientes limitantes para que este proceso ocurra son el nitrógeno y el fósforo (4, 6).

Cuando ocurre un derrame de petróleo en un suelo se origina un desequilibrio en la relación C:N:P (7, 11), induciendo una situación de deficiencia de nitrógeno muy grande que implican cambios en la estructura de la población bacteriana aumentando el número de bacterias capaces de degradar hidrocarburos (24).

Como ya ha sido largamente estudiado, para que los hidrocarburos contaminantes de un suelo sean biodegradados de forma aceptable, es necesaria una relación C:N 10:1 y C:P 10:0,1, cocientes que permiten el desarrollo de una buena producción de biomasa (10).

Sin embargo existen evidencias de que es posible llevar a cabo buenas biorremediaciones de dichos contaminantes con relaciones C:N mayores a las mencionadas. Eckford et al en 2002 aisló cepas bacterianas de un suelo de la Antártica contaminado con hidrocarburos que poseen la capacidad de fijar nitrógeno pero no de degradar hidrocarburos de forma simultánea, llegando a concluir que: i) este tipo de microorganismos pueden alternar momentos de biodegradación con momentos de fijación de nitrógeno, ii) es posible la asociación de microorganismos en donde unos poseen la capacidad de degradar hidrocarburos y los otros de fijar nitrógeno y iii) que la biodegradación es llevada a cabo gracias a la obtención de nitrógeno a partir de las células muertas presentes en los suelos. Tocalino et al en 1993 también llegó a concluir que los microorganismos que degradan hidrocarburos en suelos con importante deficiencia de nitrógeno lo hacen a expensas del nitrógeno aportado por los fijadores de este nutriente.

Si bien existen publicaciones donde se menciona la posibilidad de biodegradación de hidrocarburos en ambientes con déficit de nitrógeno (11,12,23,33), esto siempre es observado en presencia de comunidades bacterianas y no en cepas aisladas.

El número de microorganismos diazotrofos en los suelos patagónicos es elevado, como también la presencia de hidrocarburos del petróleo por lo que el objeto de este trabajo es determinar si es posible la biodegradación de hidrocarburos en un suelo patagónico contaminado con una marcada deficiencia de nitrógeno.

MATERIALES Y METODOS

Suelo: la muestra estudiada es correspondiente a un landfarming a la cual se le realizó el siguiente estudio:

Análisis físico-químico: Las determinaciones de aniones y cationes solubles así como la determinación de pH, se realizan a partir de un extracto de suelo con agua destilada, en una relación de 1:2,5 (17).

pH: Determinación potenciométrica con electrodo de vidrio (18).

Amonio y Urea: Método colorimétrico basado en la reacción del amoníaco, libre y/o liberado por hidrólisis de la urea, con fenol e hipoclorito en medio alcalino dando como resultado un complejo coloreado, el Azul de Indofenol que es leído en el espectrofotómetro a 540 nm.

Nitritos: Método colorimétrico basado en la diazotización del ácido sulfanílico con iones nitrito para luego copular con 1-naftilamina (13).

Nitratos: Método basado en la nitración del alcaloide brucina en presencia de ácido sulfúrico (14).

Humedad: Método gravimétrico (15).

Capacidad de retención de agua: Método según García Trejo, A. (16).

Densidad aparente: Según Allison, L. et al (2).

Densidad real: Según Allison, L. et al (2).

Porosidad: Según Allison, L. et al (2).

Determinación de Hidrocarburos: Extracción: Se realizó en un extractor de tipo Soxhlet con tricloroetano como solvente de extracción, los hidrocarburos extraídos son cuantificados gravimetricamente.

Separación de las fracciones de hidrocarburos: Los hidrocarburos obtenidos son separados en distintas fracciones por cromatografía en columna de silicagel. Como solvente de elución se utilizaron 250 ml. de Hexano, 150 ml. de Benceno y 150 ml. de Cloroformo-Metanol 1:1, las fracciones se tomaron de 25 ml. y se evaporaron hasta obtención de un residuo seco. El contenido de cada fracción se determinó gravimetricamente (10).

Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH): Método turbidimétrico basado en la extracción de hidrocarburos desde el suelo utilizando una mezcla de alcoholes, donde el componente primario es el metanol, para luego producir la emulsificación de los hidrocarburos contenidos en el extracto metanólico al entrar en contacto con agua destilada, la turbidez producida por dicha emulsificación es medida en espectrofotómetro a 585 nm., extrapolando este valor en una curva de calibración para obtener los valores de concentración (EPA/600/R-01/060) (9, 32, 35).

Preparación de la muestra: Se realiza una suspensión de 10 gramos de suelo en 90 ml de solución fisiológica y se homogeniza durante 30 minutos en agitador orbital a 150 rpm. Los recuentos bacterianos se determinaron por diseminación en superficie.

Medios de cultivo

Medio para diazotrofos: (MD)

Solución A: KH_2PO_4 0,1 g, K_2HPO_4 0,9 g, $\text{NaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{NaVO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, solución de elementos traza: SL6 3,0 ml, agar 15,0 g, agua destilada 900,0 ml.

Solución B: extracto de levadura 0,05 g, succinato de sodio 1,0 g, malato 2,0 g, agua destilada 50,0 ml.

Solución C: piruvato de sodio 1,0 g, D-manitol 2,0 g, D-glucosa 2,0 g, agua destilada 50,0 ml (8).

R₂A: extracto de levadura 0,5 g, peptona proteasa 0,5 g, casamino ácido 0,5 g, glucosa 0,5 g, almidón 0,5 g, piruvato de sodio 0,3 g, K_2HPO_4 0,3 g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 g, agar 14,0 g, agua destilada 1000,0 ml.

MBM: ClNa 5,0 g, PO_4HK_2 0,5 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ 0,5 g, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1,0 g, SO_4Mg 0,2 g, NO_3K 3,0 g, SO_4Fe 0,05 g, SL 10 B 10 ml, agua destilada 1000,0 ml.

MBM-PGO: ClNa 5,0 g, PO_4HK_2 0,5 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ 0,5 g, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1,0 g, SO_4Mg 0,2 g, NO_3K 3,0 g, SO_4Fe 0,05 g, SL 10 B 10 ml, Agar-agar 15 g, agua destilada 1000,0 ml. Luego de distribuir el medio en placa y una vez solidificado, esparcir sobre su superficie 30 μl . de una mezcla 1:1 de petróleo gas oil.

MBM-2-PGO: ClNa 5,0 g, PO_4HK_2 0,5 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,5 g, SO_4Na 1,0 g, SO_4Mg 0,2 g, SO_4Fe 0,05 g, SL 10 B 10 ml, extracto de levadura 0,025 g, Agar-agar 15 g, agua destilada 1000,0 ml. Luego de distribuir el medio en placa y una vez solidificado, esparcir sobre su superficie 30 μl . de una mezcla 1:1 de petróleo gas oil.

Test de Biodegradabilidad:

La biodegradabilidad de un suelo puede ser determinada midiendo el dióxido de carbono producido como resultado de la mineralización de hidrocarburos, el dióxido de carbono liberado del sistema se fija en hidróxido de sodio y el carbonato formado se titula con ácido clorhídrico (5).

Para la realización de los ensayos de mineralización de hidrocarburos en fase sólida se diseñaron 3 sistemas, cuya composición figura en la tabla 1.

A los sistemas planteados se les efectuó un seguimiento de mineralización de hidrocarburos 2 veces por semana midiendo el CO_2 producido. De forma paralela se realizaron mediciones de hidrocarburos en el suelo mensualmente por el método turbidimétrico (TPH). El seguimiento de variación de nutrientes nitrogenados se realizó de forma semanal. Una vez al mes se realizaron recuentos bacterianos.

El sistema constituido únicamente por el suelo (sistema intrínseco) se realizó con el objetivo de obtener la biodegradación intrínseca del suelo. El sistema adicionado con benzoato (benzoato S/N) se diseñó para estudiar como influye este compuesto aromático en la mineralización de los hidrocarburos presentes en el suelo. El sistema constituido por suelo y gas-oil (gasoil S/N) se diseñó para observar la capacidad de degradación de compuestos alifáticos en deficiencia de nitrógeno. La humedad como los fosfatos se incorporan en los sistemas para optimizar estos dos parámetros.

Tabla 1: Sistemas diseñados para mineralización de hidrocarburos en fase sólida.

	INTRINSECO	Benzoato S/N	Gasoil S/N
SUELO	150 gr	150 gr	150 gr
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0 gr	0 gr	0 gr
K_2HPO_3	0 gr	0,084 gr	0,084 gr
H_2O	0 gr	10 ml	10 ml

Gas oil	0 ml	0 ml	1,5 ml
Benzoato	0 ml	1,5 ml	0 ml

Curvas de crecimiento

De las placas utilizadas para la determinación de los recuentos de microorganismos se aislaron 52 cepas las cuales se probaron para determinar su capacidad de biodegradación de hidrocarburos y de crecer en medio libres de nitrógeno.

Para evaluar la capacidad de biodegradación se sembró las cepas en medio MBM-PGO, para observar la capacidad de desarrollar en ausencia de nitrógeno en medio MD, ambos medios se incubaron a 28°C durante 20 días. Para la evaluación de la capacidad de desarrollar en ausencia de nitrógeno y biodegradar hidrocarburos en forma simultanea, se preparó 10 ml de MBM con 0,1% de gas-oil para cada cepa, el cual se inoculó con 200 ul de una suspensión bacteriana con una absorbancia de 0,5 a 690 nm, se incubó en agitador orbital a 120 rpm durante 31 días y se realizó un seguimiento de producción de biomasa en espectrofotómetro a 690 nm.

RESULTADOS

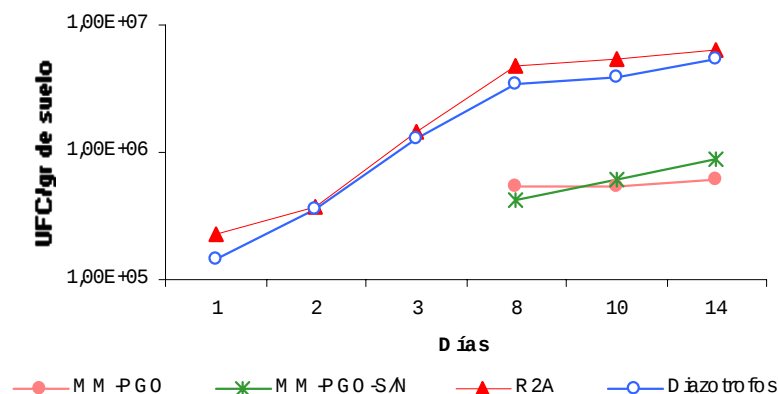
Caracterización de la muestra de suelo:

La muestra de suelo estudiada posee características fisico-químicas intrínsecas que la hacen apta para realizar estudios de biodegradación (Tabla 2). La humedad de la muestra como la capacidad de retención de agua son dos parámetros que muestran en conjunto la capacidad de la misma para retener en su interior agua suficiente para el desarrollo de biodegradación, la porosidad de un 45% muestra el buen estado de aireación del suelo para el desarrollo bacteriano y la neutralidad del pH indica que el desarrollo de microorganismos es posible. Se observa que existe un problema con respecto a la fuente de nitrógeno debido a que la misma está presente en la muestra en muy baja concentración.

Tabla 2: Caracterización fisico-química de la muestra de suelo.

1.A. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:	
HUMEDAD (%)	7
PH	7
DENSIDAD APARENTE (g/ml)	1,18
DENSIDAD REAL (g/ml)	2,15
POROSIDAD	45%
CAPACIDAD DE RETENCIÓN DEL AGUA(g agua/100g suelo)	38
1.B. CONTENIDO DE NUTRIENTES:	
Amonio (ppm)	0,49
Nitratos (ppm)	2,22
Nitritos (ppm)	0,96
Fosfatos (ppm)	5,46
Urea (ppm)	0,69
1.C. CONTENIDO DE HIDROCARBUROS:	

HC. TOTALES (%)	5,8
ALIFÁTICOS (%)	31,8
AROMÁTICOS (%)	28,7



HC ASFALTENOS (%)	39,5
-------------------	------

El contenido de hidrocarburos es de 5,8%, las fracciones de hidrocarburos alifáticos (31,8%) y la de aromáticos (28,7%) son las más susceptibles a ser degradadas por los microorganismos del suelo.

El recuento de bacterias (figura 1) heterótrofas totales estuvo en el orden de 10^6 (R_2A), de los que el 86% posee la capacidad de desarrollar en un medio libre de nitrógeno, el 10% degrada hidrocarburos en presencia de nitrógeno, y el 14% degrada hidrocarburos en ausencia de nitrógeno.

FIGURA 1: Caracterización bacteriológica del suelo.

Seguimiento de aparición de colonias. Diazotrofos: medio MD.

Ensayo de mineralización en fase sólida

La muestra de suelo posee una capacidad intrínseca de mineralización de hidrocarburos la que se ve mejorada con el agregado de humedad y fosfatos (figura 2).

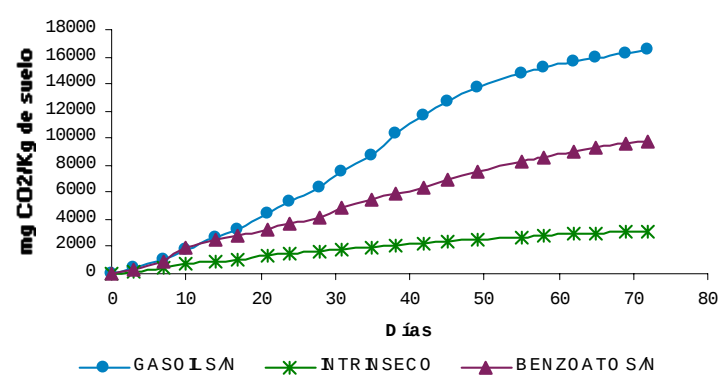
El sistema intrínseco posee una tasa de mineralización de 43,59 mgCO₂/Kg de suelo/día a pesar de su deficiente relación C:N:P (100:0,003:0,003), lo que se vio reflejado en un porcentaje de biodegradación de hidrocarburos de 8,97% luego de 72 días. Los iones nitrato aumentan en el suelo en función del tiempo (figura 3 A) haciendo suponer que existe una alta actividad de microorganismos capaces de fijar nitrógeno.

Los microorganismos incrementaron su número en todos los medios de cultivos empleados (tabla 3), encontrándose una misma tendencia en el aumento de bacterias capaces de desarrollar en ausencia de nitrógeno y que degradan hidrocarburos, así como también otros compuestos orgánicos como azúcares.

El sistema con agregado de benzoato posee una relación C:N:P de 100:0,003:0,22. En este sistema se observa como el fósforo y la humedad son dos factores de gran importancia en la biodegradación de hidrocarburos debido a que se observó un incremento en la tasa de mineralización (135,88

mgCO₂/Kg de suelo/día) y en el porcentaje de biodegradación (10,20%), luego de 72 días, con respecto al sistema anterior. En este sistema, como en el sistema anterior, el nitrato del suelo aumenta luego de un seguimiento de 72 días (figura 3 B).

FIGURA 2: Mineralización de hidrocarburos en fase sólida



Experiencia lleva a cabo durante 71 días.

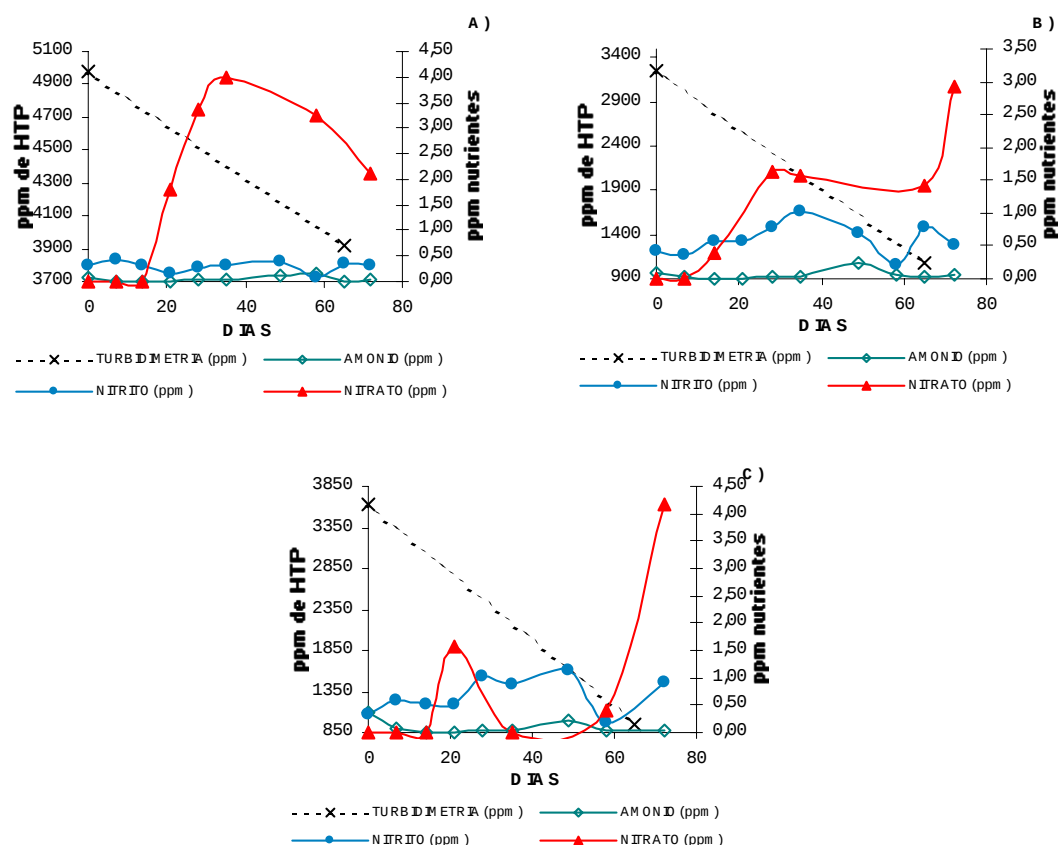
Tabla 3: Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo.

	Inicial	Intrínseco	Benzoato S/N	Gasoil S/N
MBM-PGO	6,00E+05	4,90E+07	4,30E+08	1,87E+09
MBM-PGO-S/N	8,80E+05	1,90E+08	5,40E+08	1,23E+10
R2A	6,25E+06	7,20E+08	1,33E+09	2,70E+10
DM	5,35E+06	1,16E+09	3,60E+08	9,00E+09

Los valores están expresados en UFC/ml.

El desarrollo bacteriano se vio favorecido por el incremento de fosfatos ya que el recuento de bacterias heterótrofas fue mayor que el sistema anterior al concluir la experiencia. Es de remarcar que los microorganismos capaces de desarrollar sin fuente de nitrógeno se observaron inhibidos ya que el recuento de bacterias que desarrollaron en el medio MD se observó disminuido en un logaritmo con respecto al sistema intrínseco (tabla 3), esto puede ser debido al efecto del benzoato incorporado al sistema, en dicha tabla se observa como aumentan los microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en presencia como en ausencia de nitrógeno en su medio de crecimiento.

FIGURA 3: Seguimiento de hidrocarburos y nutrientes nitrogenados.



A) Sistema intrínseco; B) Sistema benzoato S/N; C) Sistema gasoil S/N. HTP: Hidrocarburos totales del petróleo.

El sistema con agregado de gasoil posee la mayor tasa de mineralización de los 3 estudiados (229,92 mgCO₂/Kg de suelo/día), y el mayor porcentaje de biodegradación (35,70%). Estos valores son llamativos debido a que la relación C:N:P (100:0,003:0,22) no es la mas óptima para lograr grandes tasas de biodegradación de hidrocarburos. Es posible que al ser este suelo muy rico en microorganismos capaces de crecer en medios libres de nitrógeno, estos estén muy bien adaptados a esta situación de stress, como lo es el déficit de nitrógeno, y desarrollen en un gran número gracias al gasoil incorporado (tabla 3), en este sistema los recuentos de diazotrofos y bacterias heterótrofas degradadoras de hidrocarburos son elevados.

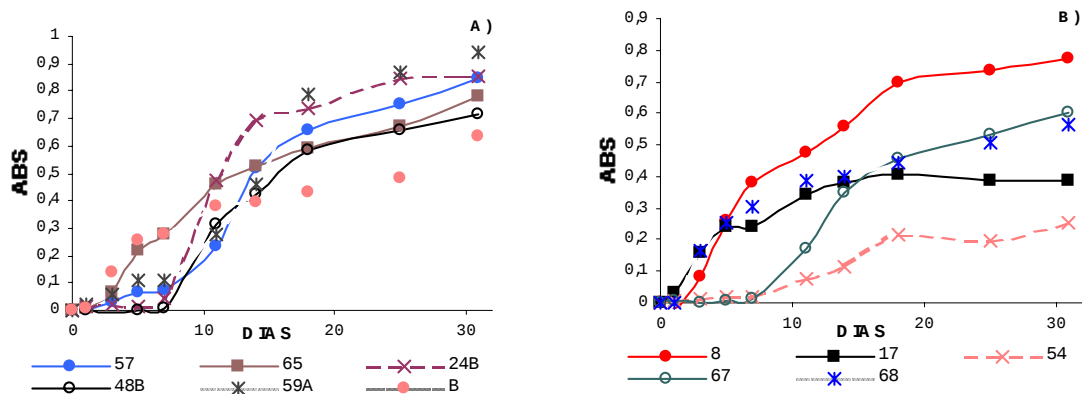
La producción de nitratos es inconstante (figura 3 C) y no parece relacionarse con ningún otro parámetro estudiado.

Curvas de crecimiento:

Las 52 cepas aisladas mostraron la capacidad de desarrollar en medio MD y en MBM-PGO, lo que permite determinar que este conjunto de microorganismos aislados son capaces de crecer en ausencia de nitrógeno y de biodegradar hidrocarburos. Solo un grupo de 11 cepas mostró la capacidad de incrementar su biomasa en el medio MBM con agregado de 0,1% de gas oil, las cuales

fueron 8, 17, 54, 57, 65, 67, 68, 24B, 48B, 59A y B (figura 4). El resto de los microorganismos mostraron densidades ópticas a 690 nm inferiores a 0,1 tomando estos resultados como negativos.

FIGURA 4: Curvas de crecimiento de cepas aisladas.



Se realizaron en MBM con 0,1% de gasoil y un seguimiento de 31 días con mediciones de D.O. a 690 nm.

DISCUSION

Una de las características que posee la muestra es la de acumular nitratos con el transcurso del tiempo, dando indicios de la posibilidad de la existencia de bacterias capaces de fijar nitrógeno en presencia de hidrocarburos (figuras 3 A, B y C). Es de destacar que el sistema intrínseco muestra como la comunidad bacteriana del suelo puede biodegradar hidrocarburos a pesar de las relaciones C:N:P 100:0,003:0,003 indicando la posibilidad de que la misma se encuentre perfectamente adaptada a el ambiente inhóspito en el cual se encuentra. Otra característica es que el número de microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos alifáticos (gasoil S/N) es mayor que aquellos que comparten la ruta de biodegradación de compuestos aromáticos como el benzoato (benzoato S/N) como se observa en la figura 2.

De todos los resultados expuestos, el suelo estudiado podría estar constituido por una comunidad bacteriana altamente especializada en biodegradar hidrocarburos en presencia de un déficit de nitrógeno importante, situación ya mencionada por Toccilino at all en 1993 y Ekford at all en 2002. Deni et al en 1999 enunció que en suelos con estas características existen comunidades bacterianas capaces de nitrificar, constituidas por microorganismos altamente especializados en captar el poco amonio disponible en el ambiente y oxidarlo, y otro grupo con una gran afinidad por el resultado de la oxidación del amonio, los nitritos, oxidándolos a nitratos. Esto de alguna manera podría explicar por que los nitratos de este suelo aumentan.

Esta comunidad altamente especializada podría esta constituida por diferentes grupos bacterianos en los cuales podríamos destacar: I) microorganismos capaces de fijar nitrógeno pero no de degradar hidrocarburos, II) microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos y no de fijar nitrógeno, III) microorganismos capaces de fijar nitrógeno y de degradar hidrocarburos simultáneamente (figura 4). Dichos grupos bacterianos podrían funcionar en forma conjunta en donde los del grupo II biodegraden hidrocarburos a expensas del nitrógeno aportado por los del grupo I y III, de esta

manera se producirían metabolitos intermedios de biodegradación que podrían ser utilizados como fuente de carbono para las bacterias del grupo I y puedan fijar nitrógeno. Cabe destacar la importancia de los microorganismos capaces de fijar nitrógeno y de biodegradar hidrocarburos en forma simultánea ya que los mismos serían los encargados de poner a funcionar esta comunidad actuando como generadores de fuente de nitrógeno y de metabolitos intermedios.

CONCLUSIONES

La muestra de suelo estudiada posee, intrínsecamente, una alta capacidad de degradación de hidrocarburos (43,59 mgCO₂/Kg de suelo).

La comunidad bacteriana posee la capacidad de producir mejores mineralizaciones en presencia de hidrocarburos alifáticos (229,92 mgCO₂/Kg de suelo), que en presencia de compuestos aromáticos (135,88 mgCO₂/Kg de suelo).

En suelos con altas relaciones C:N (como el estudiado C:N 100:0,003) existen un gran número de microorganismos capaces de desarrollar en medio de cultivo libres de nitrógeno.

En suelos con un elevado contenido de hidrocarburos se observa un enriquecimiento natural de microorganismos capaces de degradar estos compuestos en presencia como en ausencia de nitrógeno.

Cuando un suelo presenta una elevada relación C:N es común observar un aumento de los iones nitratos.

BIBLIOGRAFIA

Ahearan D, Meyers S (1972) The microbial degradation of oil pollutants. Center for wetland resources. LSU-SG-73-01.

Allison L et al. (1993) Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed L A Richards. Editorial Limusa. Séptima edición. México. Pag. 25-26.

Amatya P, Hettiaratchi J, Joshi R (2002) Biotreatment of flare pit waste. J.C.P.T. 2000-083.

Atlas R (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microb. Rev. 45:180.

Bartha R, Pramer D (1965). Note. Soil Science. 100-1.

Bartha R (1986). Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microb. Ecol. 12:155-172.

Deni J, Penninckx M (1999) Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. Appl. Environ. Microbiol. 65:4008-4013.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ) (1998) Catalogue of Strains. Fourth edition. Pag. 327.

Dexil corporation and Petroflag system (2001) Field measurement technologies for total petroleum hydrocarbons in soil. E.P.A. 600-R-01-092.

Dibble J, Batha R (1979) Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37:729-739.

Eckford R, Cook F, Saul D, Aislabie J, Foght J (2002) Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soil. Appl. Environ. Microbiol. 68:5181-5185.

Efroymson R, Alexander M (1991) Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. Appl. Environ. Microbiol. 57:1441-1447.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) Water Analysis. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pag. 226-229.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) Water Analysis. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pag. 229-233.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pag. 14.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pag. 15.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pag. 16.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. Mexico. Pag. 19.

Heider J, Spormann A, Reller H, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbial. Rev. 22:459-473.

Jobson A, Cook F, Westlake D (1972) Microbial utilization of crude oil. Appl. Environ. Microbiol. 23:1082-1089.

Laehy J, Colwell R (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54:305-315.

Peressutti S (2000) Dinámica de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en un ecosistema de suelo patagónico. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia, Comodoro Rivadavia, Argentina.

Piehler M, Swistak J, Pinckney J, Paerl H (1999) Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. Microb. Ecol. 38:69-78.

- Pinholt Y, Struwe S, Kjoller A (1979) Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecol.* 2:195-200.
- Pucci O, Bak M, Peressutti S, Estevao Belchior S, Álvarez H (1998) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Petrotecnia.* 6:54-59
- Pucci O, Back M, Peressutti S, Klein I, Härtig C, Wünsche L (1998) Biorremediación in situ de un area altamente contaminada con hidrocarburos en Cerro Dragón Patagonia, Argentina. P. 79-86 In *UFZ-Bericht* (ed). *Proceedings of Workshop-Bericht, Bioremediation of polluted areas.* La Plata, Argentina.
- Reynolds C, Bhunia P, Koenen B (1997) Soil remediation demonstration project: biodegradation of heavy fuel oils. Special report (US Army Corp of Engineers) 97-20.
- Scott C, Finnerty W (1976) A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon-oxidizing micro-organisms. *Jour. Gen. Microbiol.* 94:342-350.
- Shen J, Bartha B (1996) Metabolic efficiency and turnover of soil microbial communities in biodegradation tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2411-2415.
- Sikkema J, M. De Bont J, Toolman B (1995) Mechanisms of membrana toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59:201-222.
- Speight J (1991) *The chemistry and technology of petroleum.* Ed Marcel Dekker. Second Edition. NY. Cap. 7. Pag. 209-216
- Standard test method for screening fuel in soils (2001) ASTM. D 5831-96.
- Toccalino P, Jonson R, Boone D (1993) Nitrogen limitation and nitrogen fixation during alkane biodegradation in sandy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2977-2983.
- Tsao C, Song H, Bartha R (1998) Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4924-4929.
- Turbidimetric screening method for total recoverable petroleum hydrocarbons in soil (1998) Method 9074.
- Walker J, Colwell R (1976) Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:198-207.
- Watkinson R, Mogan P (1990) Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation.* 1:79-92.