

ANALISIS Y EVALUACION DE PARAMETROS CRITICOS EN BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELO

Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, M.; Bauzá, J..
Laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Introducción

La aplicación de técnicas de biorremediación de suelos en escala exige un intenso monitoreo y control de variables operacionales. No todas ellas revisten la misma importancia. Sólo algunas resultan críticas para la obtención de resultados exitosos. En este trabajo se presentan algunos criterios para monitorear y controlar variables de proceso críticas en degradación en sistemas de fase sólida, es decir, en condiciones de contenido de agua libre mínima. Dichos criterios son de aplicación genérica a los diversos métodos de tratamiento biológico en suelo tales como landfarming, acumulación aireada, biorrestauración, etc. La selección de técnicas de muestreo y técnicas analíticas también resulta de fundamental importancia, pues los sistemas en fase sólida son sistemas intrínsecamente heterogéneos y por tanto no siempre fáciles de evaluar. La experiencia realizada en tratamiento de diversos tipos de residuos de hidrocarburos en suelos distintos, bajo condiciones climáticas muy variadas, nos permite presentar algunos criterios de carácter general.

Tratamiento biológico de suelos

El tratamiento biológico de suelos contaminados involucra el uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares. Los procesos biológicos se aplican frecuentemente al tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Se pueden aplicar técnicas in-situ (en el lugar donde se encuentra el suelo contaminado) o ex-situ (cuando el suelo se traslada a una instalación para su tratamiento). El tratamiento ex-situ de suelos, sedimentos y otros sólidos contaminados con hidrocarburos se puede realizar en un variado número de procesos en fase sólida y en fase lodo. Los procesos en fase sólida son aquellos en donde el suelo se trata con un contenido de agua mínima. En el caso de los procesos en fase lodo se suspende el suelo en agua (LaGrega et al, 1996). Una ventaja de los procesos en fase sólida es que las bajas velocidades de transferencia de materia permiten trabajar a niveles de contaminación que serían tóxicos para los microorganismos si se realizaran en fase líquida. Por otro lado los sistemas sólidos son capaces de sustentar el crecimiento de microorganismos que no desarrollan bien en fase líquida (hongos) y producen complejos enzimáticos capaces de oxidar compuestos complejos (Cookson, 1995). Los parámetros críticos a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macroambientales, presencia de inhibidores y biodisponibilidad del contaminante.

Tipo y concentración de contaminante

Tipo de hidrocarburos. La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. No todos los compuestos se degradan con la misma facilidad (Niemi et al, 1987):

- Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan fácilmente, pero cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles para la degradación. De la misma forma, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados.
- Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo. También se pueden degradar los compuestos aromáticos policlorados como los policlorobencenos cuya biodegradabilidad disminuye al aumentar el número de átomos de Cloro en la molécula.
- Los compuestos nitrogenados y azufrados se degradan lentamente. Los compuestos más resistentes al ataque microbiano son las fibras sintéticas, aunque se están aislando microorganismos capaces de degradar estos compuestos (Niemi et al 1987; Rochkind et al, 1986; Vogel et al, 1987).

En nuestras experiencias se ha trabajado con hidrocarburos de diferentes orígenes: derrames de combustibles y crudos (pesados y livianos), fondos de pileta de evaporación de crudos pesados y livianos, residuos laminares de oleoductos, residuos operativos de refinería y residuos operativos de yacimientos, verificándose diferentes respuestas para cada tipo de hidrocarburo.

Concentración de hidrocarburos. Cuando la concentración de contaminante es alta puede ocurrir que se produzca inhibición del desarrollo microbiano (disminuya su capacidad de metabolización) o si es muy alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran (LaGrega et al, 1996). Se han registrado en ensayos de campo procesos biológicos a concentraciones de hasta 30 %, medido por extracción sucesiva con solventes (Ercoli y otros, 1998). Por encima del 30 % se han observado casos donde la velocidad es muy baja pero no nula. En estos casos se ha utilizado la técnica de bioaumentación basada en incorporación de microorganismos adaptados a altas concentraciones. Se ha observado desarrollo de hongos a concentraciones superiores al 25 %, en donde estos crecen sobre el hidrocarburo o en las interfases suelo - hidrocarburo y en las grietas y fisuras que se encuentran en los trozos o grumos de contaminante. En este caso el ataque comienza desde la periferia al centro del aglomerado suelo-hidrocarburo, en forma similar al proceso de agotamiento de una pastilla de catalizador. Este fenómeno se acompaña por un aumento de la porosidad. En una segunda etapa el grumo se disgrega y aumenta su superficie específica con el consiguiente incremento de velocidad de reacción, que se ve acelerada cuando la concentración disminuye, ya que desaparecen los fenómenos de inhibición.

Antigüedad de la contaminación. A medida que transcurre el tiempo después de un derrame se va modificando la composición del hidrocarburo por acción de los agentes ambientales. Primero se pierden los volátiles y después se produce la eliminación de parafinas, ya sea por evaporación, por actividad fotoquímica o actividad biológica; luego se eliminan otros componentes. Como resultado de ello el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar; por lo que la velocidad de reacción disminuye a medida que transcurre el tiempo.

Presencia de microorganismos

Los microorganismos pueden degradar hidrocarburos y otras sustancias contaminantes en forma de cultivos puros (especie única) o cultivos mixtos (varias especies que mantienen una relación simbiótica). Cuando se trata de este último caso, el tratamiento biológico implica una compleja interacción de especies microbianas. La velocidad de crecimiento y la utilización de sustratos es generalmente superior en cultivos mixtos que en cultivos puros. En una mezcla de

poblaciones los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos. Además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo y produciendo intercambio de material genético (Tiedje et al, 1990, Leahy et al, 1989; Roberts, et al, 1989). Si bien la mayor parte de las sustancias orgánicas son degradables por vía biológica, existe una gran cantidad de compuestos que resisten la biodegradación (se los denomina recalcitrantes) o esta ocurre tan lentamente que hace ineficaz el tratamiento biológico en forma práctica. Sin embargo, se han logrado aislar microorganismos capaces de degradar compuestos considerados recalcitrantes, o de modificarlos químicamente de forma que permitan la acción degradadora de otros microorganismos (LaGrega et al, 1996). Para el caso del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 10^3 a 10^4 UFC/g suelo (UFC: unidades formadoras de colonias) y de microorganismos heterótrofos totales de 10^5 a 10^6 UFC/g de suelo. En estos caso generalmente no se necesita inoculación. Si esta masa crítica no es suficiente se pueden incorporar microorganismos al suelo mediante inoculación o a través el proceso conocido como bioaumentación. También se puede lograr un incremento importante estimulando la población microbiana existente por incorporación de nutrientes.

Inoculación. Este proceso incorpora microorganismos al suelo para realizar una función específica, como es la degradación de contaminantes. Los microorganismos pueden ser comerciales o preparados para un fin específico. La inoculación se usa cuando los microorganismos del suelo no pueden degradar el contaminante presente, o cuando se producen inhibición por presencia de sales o metales pesados o cuando no alcanzan la masa crítica necesaria. Como desventaja, los microorganismos inoculados pueden desplazar a los existentes en el suelo por competición y lograr poco efecto degradativo (detener el proceso) o bien pueden no adaptarse a las condiciones ambientales del lugar. También puede ocurrir que no puedan competir con los microorganismos locales y el efecto es nulo.

Bioaumentación. Este proceso implica incrementar drásticamente la masa microbiana del suelo mediante la adición de microorganismos similares a los presentes en el suelo obtenidos mediante cultivo en reactores biológicos. Los microorganismos se obtienen del suelo contaminado del lugar. En laboratorio se definen los consorcios microbianos más adecuados en base a tolerancia a sales y sustancias inhibidoras y también a la capacidad de degradación de hidrocarburos. De esta forma se pueden tener consorcios que actúan en forma simbiótica y que resisten concentraciones de 10 % de crudo en medio líquido (sin restricciones de transferencia de masa) y hasta 13 % de NaCl en el medio, según nuestra experiencia. Una vez obtenido el consorcio más adecuado se produce una masa importante de microorganismos y se llevan a campo para reforzar la actividad de los que ya existen en el mismo. En algunos casos, dependiendo del tipo de contaminante presente, puede ser necesario inocular varias veces.

Cometabolismo. Se da en casos de sustratos complejos donde los microorganismos consumen un compuesto y producen enzimas para transformar otro compuesto, sobre el que no pueden crecer, en uno asimilable por su metabolismo.

Nutrientes:

Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de Carbono, Fósforo, Nitrógeno y oligoelementos o elementos minoritarios (micronutrientes). La fuente de carbono en nuestro caso es el

contaminante, y proporciona el carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos (CO_2 , agua, enzimas) y microorganismos (debido a la reproducción de los mismos). La fuente de Nitrógeno proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas. Dado que la utilización de estos compuestos es muy rápida los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol. La fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación. Dado que la utilización de este compuesto es muy rápida, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. También se pueden utilizar fertilizantes de origen orgánico como estiércol. Este parámetro es de importancia crítica para el buen desarrollo del proceso. La fuente de oligoelementos constituye un conjunto variado de elementos como hierro, cobre, zinc, azufre, cobalto, manganeso, magnesio, calcio y otros compuestos que dependen del tipo de microorganismo y del proceso que se realiza. Las concentraciones de los mismos son muy pequeñas (menos de 1 ppm en total). Normalmente no se incorporan en los procesos de campo ya que el suelo provee estos elementos en cantidades suficientes aunque en algunos casos se han debido incorporar algunos gramos por hectárea para tratar algún contaminante muy específico y el suelo no poseía ese elemento. También es necesario disponer de potasio en concentraciones bajas. Normalmente los suelos poseen potasio en cantidades suficientes. La dosificación de Nitrógeno y Fósforo se realiza en función de la concentración de contaminante de acuerdo a una relación que vincula C:N:P que varía según los autores entre 100:10:1 a 100:2:0,2 según la técnica con que se mida la concentración de hidrocarburo que se toma como referencia y que aporta un 80 % de su masa como carbono al proceso, la velocidad de degradación esperada y un balance de masa del material en tratamiento y del aporte de cada fertilizante del elemento considerado.

Aireación

La presencia de oxígeno es importante para la degradación de hidrocarburos, ya que es un proceso aeróbico, si bien se han realizado procesos anaeróbicos exitosos a baja velocidad. En el caso de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos puede ser necesaria una etapa anaerobia para realizar el proceso de degradación. En caso de otros tipos de contaminantes la forma más adecuada de degradarlos es la anaeróbica (caso de los PCB) seguida de una etapa aeróbica para degradar los productos parcialmente tratados en la etapa anterior. Hay que destacar que en todos los casos el proceso anaeróbico es más lento que el aeróbico. En los procesos de campo la aireación se produce por remoción del suelo con herramientas agrícolas. Estos tratamientos responden de diferente manera de acuerdo a la frecuencia de remoción (Figuras 1 y 2).

Condiciones ambientales

pH. El pH del suelo es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8. Cuando el pH excede 8 se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo. Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al suelo. En todos los casos de modificación del pH del suelo se deben realizar ensayos previos para definir la masa a incorporar de azufre o carbonato según el caso. Cuando se encuentran metales pesados en el terreno a muy altas concentraciones se debe trabajar a un pH que mantenga el metal inmovilizado o en forma no soluble (pH alto), para disminuir la toxicidad de los microorganismos. En estos casos es conveniente evaluar la posibilidad de trabajar a pH distintos

de los óptimos para evitar efectos tóxicos. Se han registrado procesos de biodegradación de hidrocarburos a pH superior a 8.

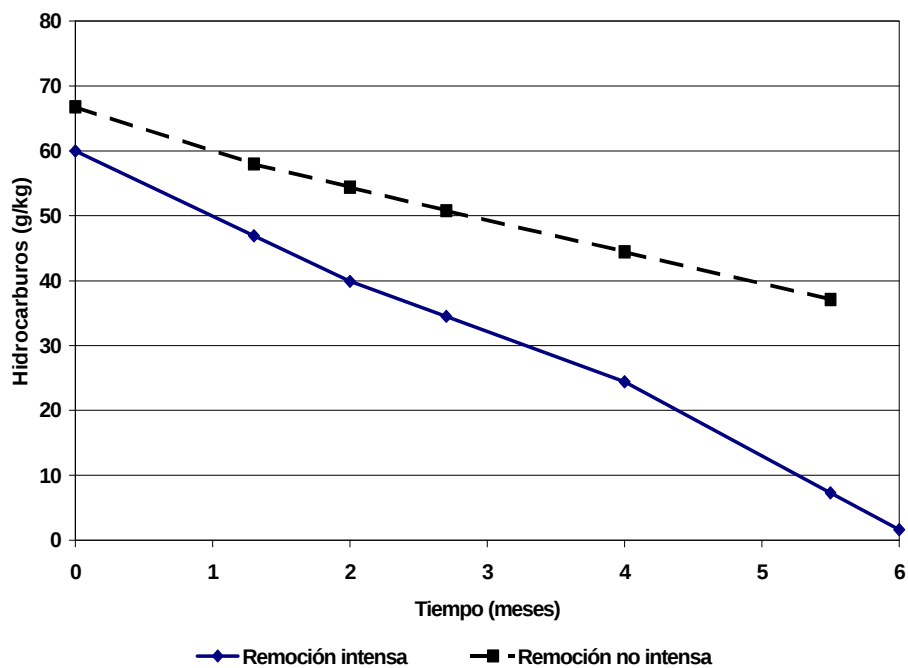


Figura 1. Efecto de la remoción en procesos de landfarming

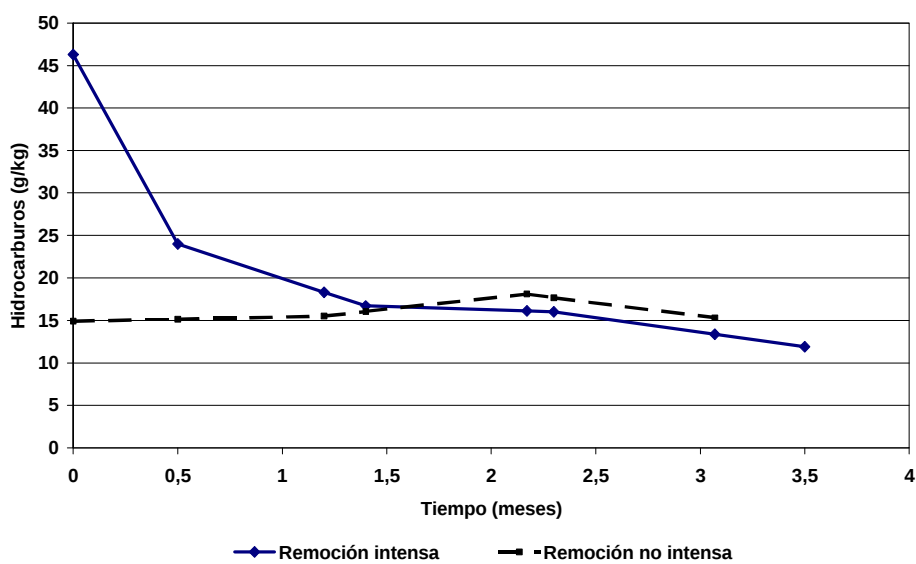


Figura 2. Efecto de la remoción en biodegradación por la técnica de acumulación aireada

Humedad. El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad del orden del 70 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación, que depende de cada tipo de suelo. Un exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide el desarrollo de los microorganismos.

Temperatura. La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente, dependiendo del tipo de microorganismos disponibles. Normalmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 ° C y 40 ° C, (los microorganismos que trabajan a estas temperaturas se denominan mesófilos). La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando supera los 40 ° C se produce una disminución de la actividad microbiana, o bien se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas, como ocurre en los procesos de compostaje en donde se alcanzan temperaturas de 65 ° C. Durante el cambio de poblaciones se produce una disminución de la actividad microbiana. Se han registrado procesos de campo en donde la temperatura del suelo empetrolado alcanzó 70 ° C, y se mantuvo la actividad degradadora (Ercoli y otros, 1997). En el caso de bajas temperaturas del suelo (por debajo de 15 °C) se ha registrado actividad biológica (estos microorganismos se llaman criófilos). Las velocidades de degradación disminuyen pero no se detienen. En algunas experiencias realizadas por nuestro Laboratorio se ha trabajado con microorganismos criófilos a velocidades altas. Se han encontrado microorganismos criófilos en la Patagonia con capacidad degradativa importante. También se han detectado en Neuquén (zona de Puesto Hernández) microorganismos criófilos degradadores de hidrocarburos que no prosperan a 25 ° C y sí a 10 ° C (se encuentran en estudio). En los procesos de acumulación aireada la actividad microbiana produce un aumento de la temperatura del suelo llevándolo a rangos entre 20 ° C y 45 ° C cuando la temperatura ambiente oscila entre 1° C y 15 ° C con muy buenos resultados degradativos.

Presencia de metales y sales

Los metales y las sales en altas concentraciones intoxican a los microorganismos o actúan como biocidas. Entre estos se incluyen metales pesados, sodio en alta concentración, sales inorgánicas (NaCl, sulfatos, carbonatos, etc). En general la presencia de sales y metales disminuye la velocidad de degradación en forma importante a menos que se disponga de microorganismos tolerantes en el lugar de tratamiento o se haya producido una bioaumentación con consorcios resistentes. En el caso de los metales se puede aumentar el pH del suelo para inmovilizarlos y así disminuir la toxicidad sobre los microorganismos. Si se tienen suelos muy contaminados con metales o sales se deberían diluir con suelo limpio para poder llevar a cabo el proceso biológico. En nuestro caso se ha podido trabajar con altas concentraciones de metales tóxicos y con alta salinidad en distintas condiciones de trabajo, las velocidades de degradación han sido aceptables, ya que se trabajó con pH neutro o alcalino y se evitó la influencia de los metales tóxicos (disminuyó su disponibilidad). Los microorganismos no degradan contaminantes inorgánicos, sólo pueden alterar su forma química (por ejemplo los sulfuros insolubles transformarlos a sulfatos más solubles; o a la inversa) de forma de inmovilizarlos o eliminarlos del lugar mediante lixiviación de los compuestos solubles por el agua de lluvia o volatilización. Algunos microorganismos fijan sobre su estructura celular metales en forma activa (metabólica) o pasiva (absorción y adsorción) reteniéndolos e impidiendo que migren. Esta característica es importante para los procesos de tratamiento biológico de aguas contaminadas con metales tóxicos.

Biodisponibilidad

La degradación de un contaminante en suelo depende de una serie de factores, entre ellos, actividad de los microorganismos y transferencia de masa desde el suelo hasta el microorganismo. En estudios de campo, el incremento de la capacidad de los microorganismos no siempre conduce a un aumento de la velocidad de degradación. Este hecho es aun más evidente en derrames o contaminaciones antiguas. Hay experimentos en donde se incorporó el contaminante fresco y fue inmediatamente degradado por los microorganismos presentes en el suelo. La reducción de la biodisponibilidad en el tiempo se debe a un proceso de envejecimiento. Entre las posibles causas se mencionan reacciones de oxidación química que incorporan el contaminante dentro de la materia orgánica, difusión lenta dentro de los poros muy pequeños y adsorción en las paredes de los mismos, y también la formación de películas semirígidas alrededor de los líquidos en fase no acuosa con una alta resistencia a la transferencia de masa en acuíferos y reactores slurry.

Análisis de otros factores importantes en biodegradación de hidrocarburos en suelo: toma de muestras y análisis químicos.

Toma de muestras. Es importante que las muestras sean totalmente representativas del área a evaluar, tanto en evaluación del sitio como en el seguimiento de proceso. Los métodos de análisis deben ser uniformes con el muestreo diseñado y los objetivos a alcanzar. El análisis y diseño del plan de muestreo debe coincidir. Se pueden usar distintos tipos de diseño de muestreo: muestreo aleatorio simple, muestreo estratificado aleatorio, muestreo sistemático simple y muestreo aleatorio secuencial. Los métodos aleatorios exigen necesariamente hacer declaraciones de confianza o probabilidad sobre los resultados del muestreo. Los resultados desde tales muestreos no pueden generalizarse al área entera de muestreo y ninguna declaración de probabilidad pueden hacerse cuando la toma de muestra emplea el método del mejor juicio técnico o mejor criterio técnico. Este tipo de muestreo puede justificarse, por ejemplo, durante la investigación preliminar de sitio y la evaluación se sostiene con conocimiento considerable de las fuentes e historia de contaminación.

Análisis químicos. Los hidrocarburos de petróleo constituyen un número muy grande de compuestos químicos, los mismos se pueden agrupar según grupos de compuestos o bien productos industriales. Para determinar esta diversidad de compuestos se pueden utilizar varias técnicas analíticas. Tanto en suelo como en agua los hidrocarburos deben ser extraídos con un solvente adecuado y posteriormente los compuestos que han sido solubilizados son analizados por varios métodos. El tipo de hidrocarburo que se desee analizar indicará el solvente a utilizar, ya que este debe solubilizar el o los hidrocarburos en consideración (tabla 1). Todas tienen ventajas y desventajas, las cuales deben ser evaluadas antes de su selección para el uso. Se deben tener en cuenta la acción de interferentes y también de pérdidas de compuestos durante la toma de muestras y transporte de las mismas, que pueden invalidar los análisis posteriores.

Cuando se comparan concentraciones de hidrocarburo en procesos de campo medidas con técnicas analíticas diferentes se han encontrado diferencias importantes que dependen de la técnica utilizada y del tipo de hidrocarburo analizado (figura 3)

Técnica	Hidrocarburos considerados	Usos
Inmunoensayo	TPH Total, medida de constituyentes	Monitoreo de campo, más apropiado para suelo y agua
Métodos basados en cromatografía en fase gaseosa	BETX, gasolina, gasoil, JP, aceites lubricantes	Estudios de laboratorio aptos para aplicación de campo, adaptable a todos los medios
Métodos basados en espectrofotometría infrarroja	TPH total, aceites y grasas	Estudios de laboratorio. Monitoreo de campo más apropiado para agua y suelo
Métodos gravimétricos	TPH total, aceites y grasas	Estudios de laboratorio más adecuado para agua, sedimentos y lodos. Monitoreo de campo cuando hay altas concentraciones
Métodos basados en cromatografía gas-masa	Constituyentes semivolátiles	Laboratorio y campo, puede ser adaptado para todos los medios
Métodos basados en la medición de gas del suelo	Compuestos volátiles o semivolátiles	Monitoreo de campo en situaciones de emergencia. Sirven para detectar cualitativamente existencia de contaminación pero no ausencia.
Métodos basados en cromatografía en capa fina	TPH total, saturados, HAP's	Estudios de laboratorio, se pueden aplicar a campo en algunas condiciones

Tabla 1. Técnicas analíticas usadas en determinación de hidrocarburos

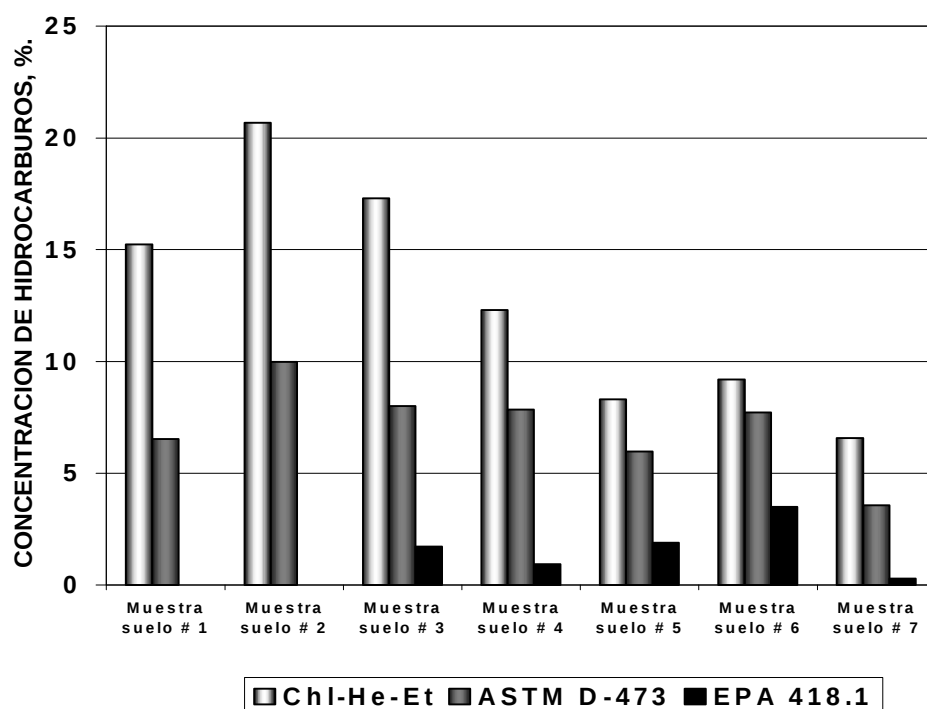


Figura 3. Influencia de la técnica analítica en la determinación de hidrocarburos

Bibliografía

A.S.T.M., *Annual Book of A.S.T.M. Standards*. Part 23, pag 271-273. 1980.

Arendt, F., y otros tres editores, *Contaminated Soil'93*, Volume I -II. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 1993.

Ahlert, R.C. and D.S Kosson, *Aerobic Mineralization of Organic Contaminants Bound in Soil Fines*, Third International Conference of New Frontiers for Hazardous Waste Management, Pittsburgh, Pennsylvania, sept, 1989.

Anonymous: "Methods for the Analysis of Oil in Water and Soil. Report N° 9/72". Stichting Concauwe, The Hague, Belgium. 1972.

Aust S.D. y J.A.Bumpus. *Biodegradation of Halogenated Hydrocarbons*. National Environmental Publications Information. EPA. Environmental Research Brief. 1.600M87012. 1987

Balba M.T., Al-Daher R. and Al-Awadhi N. *Bioremediation of Oil- Contaminated desert Soil: the Kuwaiti Experience*. Environment International, Vol. 24, N° 1/2, pp. 163-173. 1997

Bachmann A. And Zehnder, A. J. B. *Engineering Significance of Fundamental Concepts in Xenobiotics Biodegradation in Soil*. Contaminated Soil 88. Kluwer Academic Publishers. 1988.

Bayley and Ollis: *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2 nd edition. MacGraw-Hill. 1986.

Bitzi, U., Egli, T. and Hamer, G. *The Biodegradation of Mixtures of Organic Solvents by Mixed and Monocultures of Bacteria*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 37, Pp. 1037 - 1042. 1991.

Bonnier, P.E. et al. *Sludge farming: a technique for the disposal of oily refinery wastes*. Report no 3/80. CONCAWE, Den Haag, March. 1980

Breidenbach C. and Müller R. *Which Parameters Influence the Degradative Abilities of Added Microorganisms in soil?*. Contaminated Soil'95, 1163-1164. 1995.

Cookson , J. T. Jr. *Bioremediation Engineering Design and application*. Mc Graw Hill, Inc. cap 8 pp 305-358. 1995.

Chaineau, C.H. , J.L. Morel, J. Oudot, *Microbial Degradation in Soil Microcosms of Fuel Oil Hydrocarbons from Drilling Cuttings*. Environmental Science & Technology : 29 (6), 1615-1621. 1995

De Kreuk et al, J.F. y Annokkee, G. J. *Applied Biotechnology for Decontamination of Polluted Soils: Possibilities and Problems*, Contaminated Soil 88. Kluwer Academic Publishers. 1988.

Dibble, J.T. , R. Bartha, *Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge*. Applied and Environmental Microbiology, p.729-739, Apr. 1979.

Ercoli, E.; Fuentes B.; J.; Gilobert, M.; Arreghini, M. *Tratamiento Biológico de Lodos de Refinería*. 2º Simposio de Producción de Hidrocarburos. IAPG. 497- 506. 1995.

Ercoli, E., Gálvez, J.; Aranzadi, E. *Degradación biológica en suelos contaminados con hidrocarburos*. 2º Simposio de Producción de Hidrocarburos. Instituto Argentino del Petróleo., Tomo 1 pag. 487-496. 1995

Ercoli, E., Gálvez, J.; Aranzadi, E.; Santos, A.; Cantassano, P. *Tratamiento Biológico ex-situ de residuos semisólidos de oleoductos*. 1º Encuentro Latinoamericano para la Calidad en la Industria Petrolera: 311-318. 1995.

Ercoli, E., Galvez, J. Aranzadi, E. Di Paola, M. *Total petroleum hydrocarbon monitoring in biodegradation of weathered crude oily residues* . The Fourteenth International Conference on Solid Waste technology and Management, Philadelphia, P.A. U.S.A. 1998.

Ercoli, E., Saracino. C.; Galvez, J.; Videla. O. *Evaluación de dos años de experiencias de campo en biorremediación de suelos*. 3ras Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, IAPG: Tomo 1, 47-60. 1998.

Ercoli, E., Gálvez, J.; Videla, S.; Curci, E.; Calleja, C. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. INGEPET 99, Lima. Perú. 1999

Ercoli, E; Galvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J. A.; Videla, S.; Medaura, C. *Biorremediación de suelos altamente contaminados*. INGEPET 99, Lima. Perú. 1999

Errampalli D., Trevors J.T., Lee H., Leung K., Cassidy M., Knoke K., Marwood T., Shaw K., Blears M. and Chung E. *Biorremediation: A Perspective*. Journ.of Soil Contamination, 6(3):207-218.1997.

Hart,S., *In Situ Bioremediation: Defining the Limits*. Environmental Science & Technology: 30 (9), 398-401. 1996.

Hueseman, M. *Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils*. Journal of Soil Contamination. 3(3). 1994

Kabrik, R. M. et al: *Biological Treatment of Petroleum Refinery Sludges*. Third International Conference of New Frontiers for Hazardous Waste Management, Pittsburgh, Pennsylvania, pag 10-13, 1989.

LaGrega, M. D.; P. L. Buckingham, J. C. Evans: *Gestión de residuos tóxicos*, Mc. Graw Hill, Madrid, 1996.

Margesin, R. and Schinner, F. *Efficiency of Indigenous and Inoculated Cold - Adapted Soil Microorganisms for Biodegradation of Diesel Oil in Alpine Soils*. Applied and Environmental Microbiology, Vol 63, No.7, p. 2660 - 2664. July 1997.

Neeße, T.H. and Feil A. *The Decontamination Characteristic of Polluted Soils for Assessment of Suitability for Treatment of Former Industrial Sites*. Rev. Aufbereitungs-Technik, 34: 27-35, 1993.

Niemi, G. J. et al, *Structural Features Associated with Degradable and Persistent Compounds*; Environmental Toxicology and Chemistry, vol 6, Pergamon Journal, Ltd, Elmsford, New York, 1987.

- Radwan S.S., Sorkhoh N.A., El-Nemr I.M. and El-Desouky A.F. *A feasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kuwaiti desert*. Journ. of Applied Microbiology 83, 353-358. 1997.
- Rodrigues, E.G.C., Menezes, E.P., Santa Anna, L.m.M., Vital, R.L., Sebastian, G.V.. March. *Oil Degrading microorganisms*. LABS 2. p.144. 1996.
- Salanitro J.P., Dorn P.B., Huesemann H., Moore K.O., Rhodes Y., Rice Jackson L.M., Vipond T.E. Western M.M. and Wisniewski H.L. *Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil ecotoxicity Assesment*. Env. Sci. and Technol. 31, 1769-1776. 1997.
- Smith J.R., J. Lynch, y G.R. Brubaker, *Overview of Selected Bioremediation Technologies*, Hazardous Waste and Hazardous Materials Conference, april 12-14, New Orleans, 1989.
- Sullivan, M. J., *Evaluation of Environmental and Human Risk From Crude-Oil Contamination*. Society of Petroleum Engineers, January 1991.
- TPH Criteria Working Group. *Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media*. TPH Criteria Working Group Series Vol. 1. 1998.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment, *Bioremediation for Marine Oil Spills, Background Paper*, OTA-BP-O-70, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1991.
- U.S. E.P.A.. *Soil Screening Guidance: User's Guide*. EPA/540/R-96/018. 1996.
- U.S. E.P.A *Compendium of ERT Soil Sampling and Surface Geophysics Procedures*. EPA/540/9-91/006. 1991.
- Venkateswaran, K. and Harayama, S., *Biodegradation potentials of Oil - Degrading Microorganisms. Geotechnical Applications. Chapter 9, p. 309 – 334*.
- Venkateswaran, K., Toshihiro, H., Kato, M. and Maruyama, T., *Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil*. Can. J. Microbiol. 41: 418 – 424. 1995
- Verstraete W., Top E., Vanneck P., De Rore H. and Genouw G. *Lessons from the Soil*. Centre for Environmental Studies, University of Ghent, Coupure L 653, 9000 Ghent, Belgium.
- Walter M.V., Nelson E.C., Firmstone G., Clayton M.J. Simpson S. and Spaulding S. 1997. *Surfactant Enhances Biodegradation of Hydrocarbons: Microcosm and Field Study*. Journ. of Soil Contamination, 6(1): 61-77.
- Wright, A. L., Weaver, R. W. and Webb, J. W. *Oil bioremediation in salt marsh mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding, and season*. Water, Air, and Soil Pollution 95: 179 – 191. 1996.