UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO”

Trabajo de titulación para optar al

Título de Técnico Universitario en

CONTROL DEL MEDIO AMBIENTE

Alumna:

Javiera Fernanda Díaz Díaz

Profesor Guía:

Bernardo Luis Prado Alderete

Profesor Correferente:

María Elisa Escobar Peña

2019

RESUMEN

KEYWORDS: HIDROCARBURO, BACTERIA, BIORREMEDIACIÓN

El petróleo es un recurso que se ha encontrado en la historia de la humanidad desde las antiguas civilizaciones, este recurso era destinado a diversas y extendidas aplicaciones, por ejemplo: los persas lo utilizaban para hacer arder las puntas de sus flechas, mientras que en Egipto era empleado como maquillaje y en los rituales de embalsamamiento. Los romanos lubricaban las ruedas de sus carros. Y en China era utilizado para iluminar y como calefacción (Valls, 2011). La primera extracción desde un pozo petrolero ocurrió en el año 1859, siglo XIX, cuando Edwin L. Drake (1819-1880) con el uso de una bomba logró sacar petróleo ubicado a unos 23 metros de profundidad, y con ello dio inicio a la "fiebre del oro negro" y la fundación de la industria petrolera a gran escala. A partir de ese momento el petróleo se hizo parte de la economía y sociedad mundial estando presente en nuestras vidas a través de diferentes productos.

A pesar de los grandes beneficios que este recurso nos pueda brindar, también resulta ser altamente perjudicial en agua, suelo y aire, afectando la diversidad del medio ambiente con el que entra en contacto. Varios han sido los desastres ambientales que el petróleo ha protagonizado y es por ello que la legislación establece regulaciones y estándares con respecto al manejo de sustancias peligrosas. A medida que la legislación va mejorando, también lo hace la ciencia y la tecnología que se orienta en el cuidado, preservación y limpieza del medio ambiente, logrando importantes avances. Estos avances han permitido que se cuenten con diversidad de métodos de limpieza y saneamiento de sitios contaminados. Los sitios contaminados por petróleo pueden ser restaurados mediante tratamientos físico-químicos, térmicos y biológicos. Aunque se ha comprobado que los métodos físico-químicos y térmicos son ineficaces y hasta pueden agravar aún más la condición de contaminación. En cuanto a los métodos biológicos como lo son la tecnología de la biorremediación y la fitorremediación, se postulan como las técnicas más prometedoras y amigables con el medio ambiente. Este seminario de revisión bibliográfica se centrará en la técnica de limpieza biológica de biorremediación.

ÍNDICE

RESUMEN

SIGLAS

SIMBOLOGÍA

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVO GENERAL 2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2

MATERIALES Y METODOLOGÍA 2

BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA 2

CRITERIOS DE SELECCIÓN 2

RECUPERACIÓN DE INFORMACIÓN 3

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO 5

1. PETRÓLEO 6

1.1. ORIGEN 6

1.2. COMPOSICIÓN 7

1.2.1. Composición General 7

1.2.2. Composición por familia 7

1.2.2.1. Hidrocarburos alifáticos 7

1.2.2.2. Hidrocarburos aromáticos 8

1.2.3. Otros componentes 9

1.2.3.1. Compuestos sulfurados 9

1.2.3.2. Compuestos nitrogenados 9

1.3. HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO (TPH) 10

1.4. SUELO 10

1.4.1. Definición 10

1.4.2. Composición 11

1.5. MICROBIOLOGÍA DEL SUELO 13

1.6. CONTAMINACIÓN DE SUELOS 14

1.7. CONTAMINACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO 15

1.8. BASES PARA LA DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO 16

1.8.1. Bases Bioquímicas 16
1.8.2. Metabolismo aerobio de hidrocarburos 17
1.8.2.1. Oxidación de hidrocarburos alifáticos 18
1.8.2.2. Oxidación de hidrocarburos aromáticos 19
1.8.3. Metabolismo anaerobio de hidrocarburos 20
1.8.3.1. Reducción de hidrocarburos alifáticos 20
1.8.3.2. Reducción de hidrocarburos aromáticos 21
CAPÍTULO 2: BIORREMEDIACIÓN 23
2. BIORREMEDIACIÓN 24
2.1. DEFINICIÓN 24
2.2. DEGRADACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN 24
2.2.1. Parámetros que afectan la biodegradación 25
2.2.1.1. Temperatura 25
2.2.1.2. Nitrógeno y Fósforo 27
2.2.1.3. Oxígeno 30
2.2.1.4. pH 32
2.2.1.5. Humedad 33
2.2.1.6. Tipo de suelo 34
2.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS 36
2.4. MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA 38
2.5. MICROOGANISMOS EN BIORREMEDIACIÓN 43
2.5.1. Bacterias 43
CAPÍTULO 3: TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDICIÓN 45
3. TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN 49
3.1. BIORREMEDIACIÓN IN SITU 49
3.1.1. Biorremediación intrínseca 50
3.1.2. Biorremediación mejorada 51
3.2. TÉCNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN IN SITU 55
3.2.1. Bioventing 55
3.3. BIORREMEDIACIÓN EX-SITU 56
3.4. TECNOLOGÍAS BIORREMEDIACION EX-SITU 57

3.4.1. Landfarming 57
3.4.2. Biopiles 59
3.4.3. Composting 61
3.4.4. Bio-Reactores (Slurry Bioreactors) 64
CAPÍTULO 4: BIOSURFACTANTES 63
4. BIOSURFACTANTES 69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 75
BIBLIOGRAFÍA 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Proceso de formación de queroseno, petróleo y gas natural. 6
Figura 1-2: Clasificación de hidrocarburos. 8
Figura 1-3: Horizontes O, A, B y C de un suelo. 11
Figura 1-4: Componentes del suelo en volumen (%) 12
Figura 1-5: Partícula de suelo con microcolonias. 13
Figura 1-6: Etapa de oxidación para hidrocarburo alifático. 19
Figura 1-7: Oxidación de un compuesto aromático mediado por oxigenasas. 20
Figura 1-8: Catabolismo anaerobio del hexano 21
Figura 1-9: Catabolismo anaerobio del tolueno. 22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Fracciones del petróleo y bacterias degradadoras. 41
Tabla 4-1: Hidrocarburos y bacterias productoras de biosurfactantes. 73

SIGLAS

BTEX	:	Benceno – Tolueno – Etilbenceno – Xileno
COVs	:	Compuestos Orgánicos Volátiles
GEI	:	Gas de Efecto Invernadero
HAP / PAH	:	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos / Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
MEOR	:	Recuperación Microbiana del Petróleo / Microbial Enhanced Oil Recovery
MTBE	:	Metil –terbutil - éter
SBR	:	Reactor por Lotes de Secuenciación / Sequencing Batch Reactor
HTP / TPH	:	Hidrocarburos Totales del Petróleo / Total Petroleum Hydrocarbons

SIMBOLOGÍA

C	:	Carbono
CH_4	:	Metano
CO_2	:	Dióxido de carbono
H	:	Hidrógeno
Fe^{3+}	:	Hierro (III)
Fe^{2+}	:	Hierro (II)
Mn^{4+}	:	Manganeso (IV)
Mn^{2+}	:	Manganeso (II)
N	:	Nitrógeno
Ni	:	Niquel
NO_3	:	Nitrato
S	:	Azufre
SO_4^{-2}	:	Sulfato
V	:	Vanadio

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del petróleo significó un gran desarrollo en la forma de vida de la humanidad. Sus variados usos han significado importantes utilidades para la sociedad. Sin embargo la explotación y posteriores procesos en los que se ve involucrado el petróleo, con lleva, la mayoría de las veces a derrames o vertimientos de este, permitiéndole llegar al ecosistema, donde causa una serie de perjuicios medio ambientales. Ante la búsqueda de una solución "verde" para hacerse cargo de la limpieza de sitios contaminados con esta sustancia xenobiótica, es que la biorremediación surgue como un método de limpieza biológico atractivo. Este método se caracteriza por ser una técnica altamente versátil en cuanto a la diversidad de su aplicación en medios; funcionando tanto en medios sólidos, líquidos y mezclas de líquido-sólido, que involucran tanto a los tratamientos in situ como a los ex situ (USEPA, 2006). Además, se puede aplicar en variedad de climas, siendo efectiva tanto en hábitats tropicales, como manglares (Scherrer & Mille 1989). Hasta en climas extremos y de bajas temperaturas, tales como el Ártico o la Antártica (Whyte et al., 2001; Aislabie et al., 2006). Otra ventaja es la gran cantidad de microorganismos disponibles naturalmente que pueden biodegradar este tipo de contaminante (Dogra et al., 2018). Por esta razón, este procedimiento de restauración biológica tiene un amplio alcance de los compuestos del petróleo que se adaptan al proceso, llendo de cadenas lineales simples, como los alifáticos, a composiciones moleculares complejas, como los aromáticos (Chatterjee et al., 2008). Gracias a esto, la biorremediación se constituye como una opción de depuración segura, de bajo impacto para su uso en ecosistemas sensibles donde otras técnicas, como: las fisicoquímicas, resultan ser costosas, desaconsejables o inapropiadas (Megharaj et al., 2014). En estos entornos tan sensibles, las actividades de limpieza intrusivas pueden causar un impacto perjudicial general mayor que la ganancia (Houghton et al., 1993).

El éxito de los procedimientos biológicos de limpieza dependen de tener un conocimiento prolijo de las características propias del contaminante, la existencia y distribución relativa de las especies microbianas capaces de realizar la biodegradación y de la naturaleza misma del suelo, junto con otros factores abióticos, que se encuentren condicionando el sitio contaminado (Boonchan et al., 2000; Siciliano et al., 2001). Puesto que la práctica es altamente "sitio dependiente", por lo que no existe un protocolo de trabajo universal aplicable a todos los sitios con necesidad de remediación (Dias, 2011).

Sin duda, la biorremediación tiene una larga historia de desarrollo (Hoff, 1993) y continuará desarrollándose, conforme la ciencia y las investigaciones multidiciplinares en el ámbito avancen en su entendimiento y mejoramiento (McCarty, 1991).

OBJETIVO GENERAL

- Realizar una revisión bibliográfica con respecto a biorremediación bacteriológica de suelos contaminados por petróleo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar naturaleza y composición del petróleo.
- Investigar naturaleza y composición del suelo.
- Investigar biorremediación, técnicas y tecnologías aplicadas.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una revisión sistemática de documentación con respecto a biorremediación, con enfoque específico, a la contaminación de suelos por medio de petróleo. Para ello, se buscó en organizaciones científicas dedicadas a la entrega de información en el campo de las ciencias, específicamente: ciencias generales, biotecnología, biología, microbiología, química y medio ambiente. Además, también se buscó literatura en biblioteca universitaria USM-JMC.

Se realizó una revisión a las bibliografías o “references” de los materiales encontrados, sobre todo en los casos de artículos o estudios, con el objetivo de rescatar información que pudiera ser incluida en la revisión.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Primero, se realizó una búsqueda de literatura científica, artículos, papers y estudios teórico-prácticos en: Descubridor de la Biblioteca Electrónica de Información Científica (D-BEIC), ScienceDirect (servicio electrónico de revistas, libros y artículos científicos), Research gate (red social para científicos e investigadores), Scielo (biblioteca científica electrónica en línea), Redalyc (Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal), Dialnet (Sistema abierto de información de revistas), StudyLib (Biblioteca en línea). Posteriormente se procedió a utilizar y llevar a cabo una

búsqueda de documentación, tesis (de grado, postgrado), guías, manuales y otros, en el buscador especializado en contenidos y literatura científico-académica; Google Scholar (o Google Académico).

Esta documentación ha sido puesta a disposición públicamente por diferentes asociaciones o entidades especializadas en el área de las ciencias de alrededor del mundo. Toda esta búsqueda se enfocó, a las temáticas de interés para esta revisión.

Para la sección de marco teórico que se incluye en este trabajo se utilizó preferentemente, Google Scholar.

Con el objetivo de maximizar el espectro de recopilación de información, todas las búsquedas realizadas se hicieron tanto en idioma español, como en inglés. Además, no se estableció ninguna clase de límites para los años de publicación, con la intención de mantener el mencionado objetivo.

RECUPERACIÓN DE INFORMACIÓN

Criterios de inclusión y exclusión

En la búsqueda de la denominada "documentación gris" no se aplicó ningún filtro, a modo de incluir todo tipo de material que aportara la plataforma on-line utilizada. Para los casos de búsqueda de revisiones, artículos o estudios, se le dio preferencia a todos aquellos que incluyeran los términos de "biorremediación en suelos", "biorremediación bacteriológica" y finalmente, una combinación entre ambas.

El criterio de exclusión, fue descartar toda aquella documentación que no contuviera información, con respecto al tratamiento biológico de biorremediación en suelos.

Para la sección de marco teórico, el criterio de inclusión aplicado, llevó a la selección de material de tipo descriptivo para ambos tópicos, tanto de petróleo, como de suelo. Se excluyó toda información que resultara ser demasiado especializada y específica. Solo se incluyó información de carácter especializado para abarcar los puntos de: contaminación de suelos y contaminación de suelos con petróleo.

Extracción de datos

Para determinar que la información contenida en los artículos y reviews encontrados, cumpliera con los requerimientos, se procedió a leer las secciones de "abstrac", introducción y conclusiones, para realizar nuevamente una selección.

El mismo criterio fue utilizado para los documentos de tesis utilizados.

Análisis de información

La información analizada se separó de acuerdo a tópico, primero para el tema central, se estructuró en “biorremediación” y “biorremediación de suelos contaminados con petróleo”.

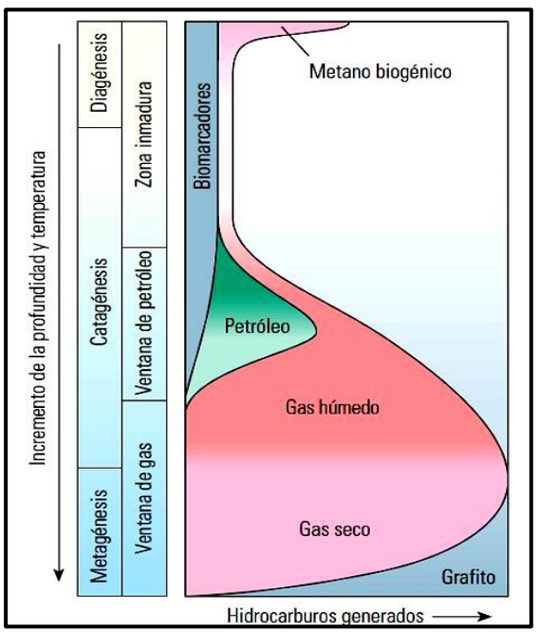
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1. PETRÓLEO

1.1. ORIGEN

El petróleo es un fluido natural, mezcla de hidrocarburos y otros componentes, que por la descomposición de organismos marinos y algunos de origen terrestre que han sido arrastrados por el mar se van acumulando bajo la superficie terrestre. Estos restos terminan mezclándose con limos y arenas finas, las cuales se van depositando en cuencas marinas. A estos depósitos se van sumando otros nuevos, los cuales van ejerciendo creciente presión sobre los depósitos ubicados en los niveles inferiores, la temperatura circundante tiende al aumento provocando la litificación de cienos y arenas y se transforman a areniscas y esquistos. Los carbonatos precipitados y restos de caparazones pasan a formar caliza, mientras que los tejidos blandos provenientes de los organismos muertos se convierten en petróleo y gas natural. Dependiendo del factor temperatura, se dan tres etapas diferentes: diagénesis, catagénesis y metanogénesis. La diagénesis es precursora de la formación de kerógeno y metano biogénico a temperaturas <50 °C. Catagénesis (60 – 225 °C) y metanogénesis (225 – 315 °C), forman petróleo y gas natural, respectivamente. Ver figura 1-1.

Cuando se forma petróleo y al ser más ligero que las arenas y rocas presentes en el medio circundante, fluye ascendentemente a través de la superficie terrestre. Es así como el petróleo va formando depósitos, ya que a medida que fluye va quedando atrapado entre capas impermeables flotando sobre agua o en una atmósfera de gas (Castillo et al., 2005).



Fuente: Extraído desde Schlumberger Limited

Figura 1-1: Proceso de formación de queroseno, petróleo y gas natural.

1.2. COMPOSICIÓN

1.2.1. Composición General

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos (Scragg, 2001). Al poseer una estructura bastante compleja, es fácil encontrar en él miles de compuestos, básica y mayoritariamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). Alrededor del 50% al 98% de la totalidad de la composición petróleo se encuentra representada por la familia de los hidrocarburos **(**Casellas et al., 1995). A la fecha se conocen 200 hidrocarburos que forman parte del petróleo (Avandeeva et al., 2014).

De forma genérica un crudo se encuentra elementalmente compuesto por: 83-87% de Carbono (C); 10-14% de Hidrógeno (H); 0,05-6% de Azufre (S) y 0,05-1,5% de Oxígeno (O); 0,1-2%Nitrógeno (N) y cantidades despreciables de ciertos metales, como el níquel (Ni) y el vanadio (Va) <1000 ppm (Speight, 2014).

Cualquiera sea el origen y la localización del crudo, estas proporciones se mantienen dentro de los rangos anteriormente nombrados.

1.2.2. Composición por familia

En cuanto a la composición molecular del petróleo, se pueden dividir en 2 clases o familias, tal como se muestra en la figura 1-2. Esta división se realiza de modo que se logre un mejor entendimiento de la naturaleza química de estos compuestos. Así, se tienen:

1.2.2.1. Hidrocarburos alifáticos

Estructuras lineales, ramificadas y cíclicas, con enlace simple, doble y triple. Además, pueden ser saturados o insaturados (Madigan, 2015).

- Alcanos (o parafinas): la estructura se forma mediante enlaces simples, por ello se le conoce como hidrocarburos saturados. Se distinguen alcanos de cadena lineal (ej.: n-octano) y los de cadena ramificada o isoprenoides volátiles (ej.: isobutano) y no volátiles (ej.: pristano). Aproximadamente representa un 30% de los hidrocarburos de un crudo.

- Cicloalcanos: también conocidos como naftenos. Son compuesto alicíclicos de cadena cerrada que forma un ciclo (ej.: ciclopropano), Los ciclos más abundantes en esta categoría son los ciclopentanos, sobretodo metilados.

- Alquenos: también conocidos como olefinas

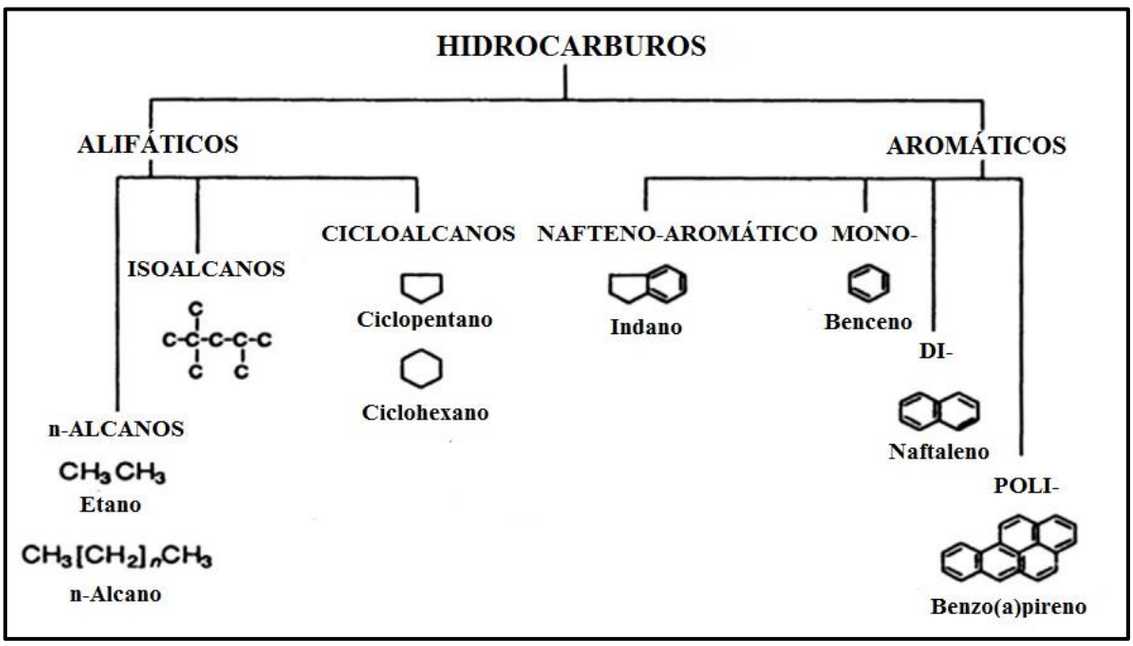
- Alquinos: también conocidos como acetilenos

1.2.2.2. Hidrocarburos aromáticos

Compuestos cíclicos con dobles enlaces conjugados. Se reconocen dos clases: los monocíclicos, de un solo anillo que pueden o no estar sustituidos con cadenas laterales; y los policíclicos o naftenoaromáticos con dos o más anillos aromáticos condensados.

- Monoaromáticos: constituidos por benceno, tolueno, etilbenceno y xileno. A este grupo de le conoce, como BTEX (Scragg, 2001).

- Poliaromáticos: grupo constituido por naftaleno, antraceno y fenantreno. A este grupo se le conoce, como PAHs (Scragg, 2001).



Fuente: Extraído y adaptado de Microbial Enhanced Oil Recovery, Chapter 1 (Speight & El-Gendy, 2018a)

Figura 1-2: Clasificación de hidrocarburos.

1.2.3. Otros componentes

A pesar de la predominancia de los hidrocarburos en la composición de esta mezcla, el petróleo contiene otros elementos, como lo son los compuestos heterocíclicos. Estos pueden ser de azufre (S), de nitrógeno (N); metales como: cobre (Cu), níquel (Ni) y vanadio (V); ácidos nafténicos, fenoles, tioles y metaloporfirinas (Atlas et al., 2002), estos conforman la fracción pesada del petróleo. Desde el punto de vista comercial los componentes de azufre y los nitrogenados ejercen una gran influencia en el valor del petróleo. Como se explica a continuación:

1.2.3.1. Compuestos sulfurados

El tipo de azufre que se puede encontrar en el petróleo es de tipo orgánico e inorgánico. La extracción mediante técnicas física-químicas del azufre orgánico resulta ser muy dificultosa, mientras que las mismas técnicas aplicadas al inorgánico, resultan bastante bien. La presencia de azufre en petróleo es perjudicial, puesto que al hacer combustión produce lluvia ácida.

1.2.3.2. Compuestos nitrogenados

El tipo de nitrógeno que se encuentra en el petróleo es orgánico y se le encuentra en compuestos aromáticos, como la piridina y los heterociclos aromáticos como el indol. Al igual que el azufre, la presencia de nitrógeno en petróleo resulta ser perjudicial, ya que la combustión del nitrógeno lleva a la formación de óxido de nitrógeno y junto con el azufre provocan lluvia ácida

1.3. HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO (TPH)

Para efectos económicos y medioambientales, cuando se refiere a petróleo lo que realmente resulta de importancia es el contenido total de hidrocarburos del petróleo (TPH) (Castillo et al., 2005). El término TPH se utiliza para describir a las sustancias químicas que forman parte del petróleo crudo, que como se ha mencionado anteriormente, es una mezcla altamente compleja compuesta de una amplia gama de hidrocarburos (Cooney et al., 1985), que varían en peso molecular (Scragg, 2001).

En términos técnicos el TPH es la medida de la concentración total de hidrocarburos extraídos y medidos por un método analítico en particular. Al ser una mezcla compleja de compuestos de hidrocarburo, se han dividido en grupos de compuestos similares, estos grupos se conocen como fracciones del petróleo.

El TPH además, arroja pistas con respecto a la calidad del petróleo, es decir mientras mayor sea el contendido de TPH mejor será la calidad del mismo (Castillo et al., 2005). Además puede ser tomado como parámetro para predecir la biodegradabilidad de la sustancia.

Los TPH constituyen unos de los grupos de contaminantes orgánicos con mayor persistencia en el medio ambiente, resultando ser tóxicos para muchos organismos (Dong Huang et al., 2005).

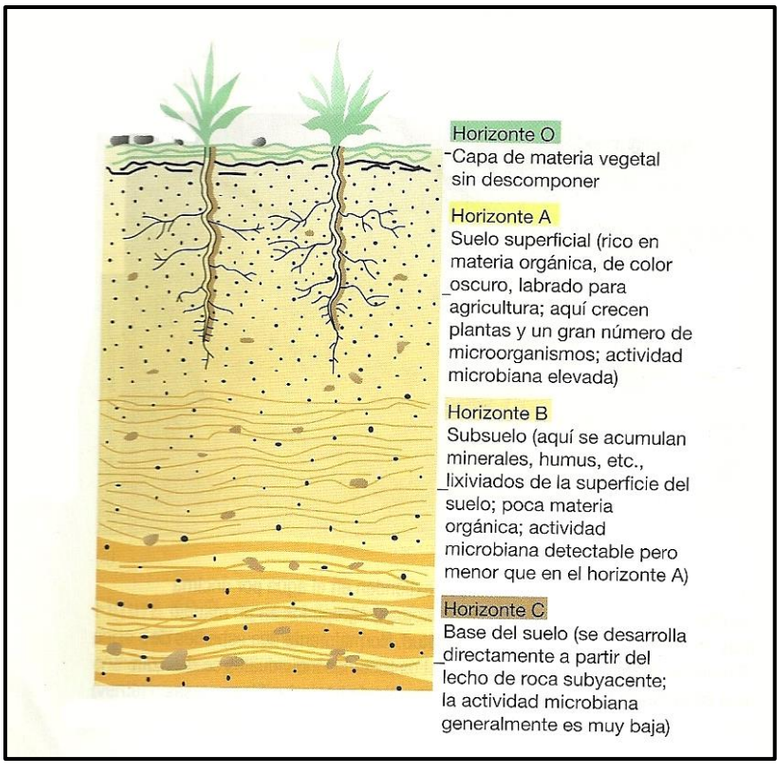
1.4. SUELO

1.4.1. Definición

Capa superficial que cubre la corteza terrestre, se caracteriza por tener un grosor variable y escaso, generalmente de unos cuantos centímetros a pocos metros. Cumple la función de ser la interfase entre litosfera, hidrosfera, atmósfera y biosfera, manteniendo intercambios energéticos y materiales entre ellas. Además, se caracteriza por ser una capa dinámica, puesto que se mantiene en constante cambio y formación (edafogénesis).

A parte del factor meteorización y tiempo, el proceso de formación de suelo se ve moldeado por factores como el clima (precipitación y temperatura), la topografía, la biosfera (organismos, vegetación y hombre).

A medida que va ocurriendo la edafogénesis se van desarrollando ciertas diferencias verticales, a las cuales se les denomina capas, estratos u horizontes. Describiendo el perfil de un suelo se pueden diferenciar 4 horizontes edáficos (Figura 1-3), cada uno con sus respectivas características, color y textura (Madigan et al., 2015; Jordán, 2005; Ortiz et al. 2007)



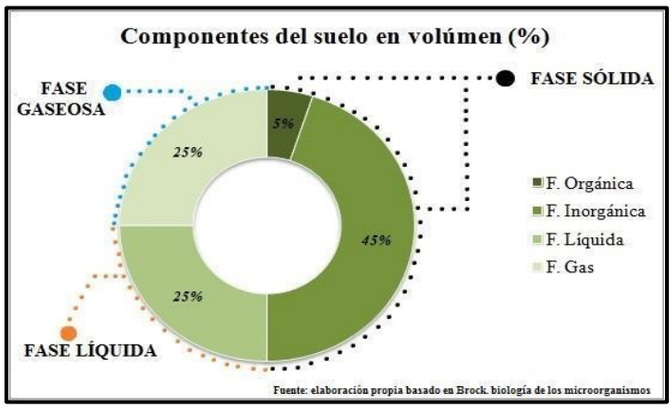
Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-3: Horizontes O, A, B y C de un suelo.

1.4.2. Composición

El suelo es una compleja formación que se crea a partir de la roca madre a través de largos periodos producto de complejas interacciones (Madigan et al., 2015) entre diferentes materiales, como: minerales (rocas, arenas, depósitos de glaciares y eólicos, depósitos actuales: aluviones; coluviones) y restos orgánicos (humus, biomasa viva y muerta) (Cepeda, 1991). Es así como la roca se va fragmentando hasta formar regolitos y posteriormente; suelo (Atlas et al., 2002), que corresponde al material suelto que se ve en la superficie de la Tierra.

De forma general todos los suelos o la gran mayoría de ellos se encuentran compuestos en volumen por al menos cuatro componentes (Madigan et al., 2015) (Figura 1-4) materia mineral o inorgánica (45%), correspondiente a rocas y minerales meteorizados (gravas y arenas <2 mm >; limos <0,02 – 0,002 mm >; arcillas <0,0002 mm), y 2) material orgánico (5%): humus; biomasa viva y muerta, de animales o vegetales parcial o completamente descompuestos. Ambas fracciones componen la fase sólida del suelo, correspondiente a un 50% del volumen del suelo. Por otro lado se encuentra la fracción no sólida del suelo conformada por: 3) agua y 4) aire, correspondiente a 25% de fase líquida y 25 % de fase gaseosa del volumen del suelo, respectivamente.

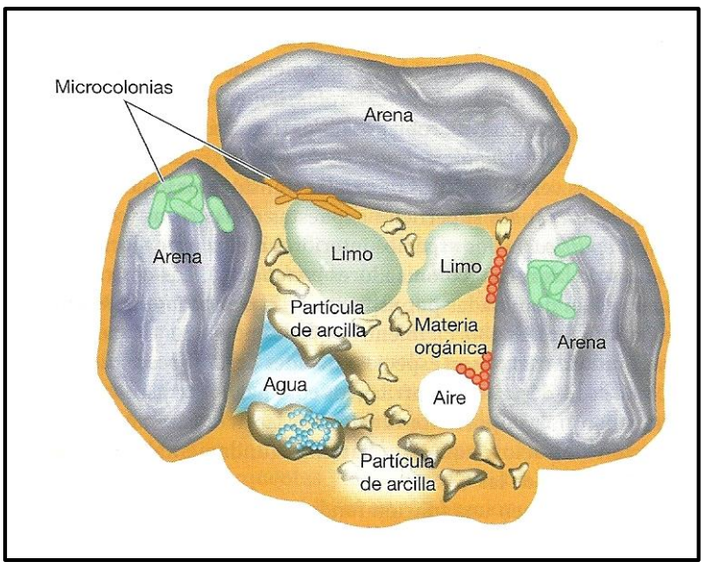


Fuente: Elaboración propia basado en Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-4: Componentes del suelo en volumen (%)

1.5. MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

El suelo se encuentra muy lejos de ser un medio conocido como inerte y estéril. De hecho es en este tipo de hábitat en donde la presencia microbiana resulta ser mucho más abundante en comparación con otros medios, como por ejemplo: los medios acuáticos, tanto marinos como dulces. Al ser un hábitat heterogéneo el suelo resulta ser un medio bastante favorable para el desarrollo y proliferación de densas poblaciones de microorganismos y con ello, dar paso a la formación de microcolonias que se desarrollan entre las partículas del suelo, tal como se muestra en la Figura 1-5.



Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-5: Partícula de suelo con microcolonias.

En términos microbiológicos el nivel superior del suelo es decir, los primeros 15 cm de éste aproximadamente corresponden a la porción de suelo con mayor actividad microbiana, esto se debe principalmente a las altas concentraciones de materia orgánica, minerales y nutrientes disponibles. A medida que la profundidad va aumentando, la presencia de los microorganismos comienza a disminuir gradualmente, debido a las condiciones menos favorables que se van dando en los niveles profundos, en donde la disponibilidad de materia orgánica disminuye considerablemente, evitando el crecimiento de microorganismos.

La diversidad microbiana existente en el suelo habla principalmente de la gran variedad genética, la cantidad y distribución de especies en este hábitat. Es así como en un

gramo de suelo seco resulta fácil encontrar alrededor de 4000 a 10000 especies microbianas distintas. Los microorganismos que generalmente se encontrarán en un gramo de suelo seco son: bacterias (de 10^6 a 10^8), actinomicetos (de 10^6 a 10^7), hongos (de 10^4 a 10^5), algas (de 10^3 a 10^6), protozoos (de 10^3 a 10^5) y nematodos (de 10^1 a 10^2). La fracción de mayor importancia corresponde a la conformada por las bacterias, al ser estas las más abundantes, aunque representan menos de la mitad del total de la biomasa microbiana. Por otro lado la fracción comprendida por los hongos resulta ser de importancia, debido a su mayor masa, representando alrededor del 70 % de la biomasa microbiana.

Las bacterias al tener un tamaño pequeño tienen la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales cambiantes rápidamente.

Se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios, pero para efectos de esta revisión se clasificarán en: aerobias y anaerobias. Ambos procesos metabólicos serán descritos en el ítem 1.8.2 y 1.8.3, respectivamente.

Los géneros de bacterias que frecuentemente se encuentran en el suelo corresponden a: *Actinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthobacter, Bacillus, Brevibacterium, Caulobacter, Cellulomonas, Clostridium, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Staphylococus, Streptococcus* y *Xanthomonas*. Estas son las que comúnmente se utilizan en la degradación de contaminantes. (Madigan, 2002: Martin, 1980: Coyne, 2000)

1.6. CONTAMINACIÓN DE SUELOS

La contaminación de suelos corresponde a la degradación química de este complejo sistema. En esta degradación por exposición a sustancias exógenas tóxicas que sobrepasen los niveles de poder de amortiguación del suelo o a sustancias propias del medio que se encuentren en un nivel anormal que resulte nocivo para este, el suelo pierde parte o la totalidad de su capacidad productiva. Además provoca la destrucción del poder de contención o amortiguador (acción auto depuradora con la cual el suelo se protege de la acción de agentes contaminantes), disminuye cuantitativa y cualitativamente el crecimiento y proliferación de microorganismos presentes, conlleva a la inminente distribución de la contaminación sobre cuerpos de aguas tanto superficiales como subterráneos y con ello generando problemas sanitarios para la población.

Cuando ocurre un suceso de contaminación de suelo no solo se debe tomar en consideración la identificación del agente o agentes contaminantes, sino que también se

debe tener en cuenta el tipo de suelo que está siendo afectado, puesto que distintos tipos de suelos van a reaccionar de forma completamente diferente a una misma sustancia tóxica cuya concentración sobrepase los niveles soportables por éste. Esta diferenciación ocurre principalmente por el grado de vulnerabilidad que cada suelo posee. Este factor se relaciona directamente con la capacidad amortiguadora del suelo. Ante un suceso de contaminación el grado de vulnerabilidad del suelo se pondrá a prueba mediante la intensidad con la que ocurre la contaminación y la velocidad con la que ésta incide en el medio causando efectos adversos en las características y propiedades físicas, químicas y biológicas de este complejo sistema.

Estos sucesos de contaminación ocurren principalmente como consecuencia de la actividad antropogénica que se lleva a cabo en este medio. Actividades del tipo industrial, mineras, agrícolas y ganaderas, son las principales precursoras de episodios de desastres medioambientales, puesto que manejan y desarrollan sus actividades mediante el empleo de variados agentes contaminantes (Ortiz, 2007; Capitulo II: La contaminación del suelo (s.f)).

1.7. CONTAMINACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO

Alrededor de 4.000 millones de toneladas de crudo son las que se extraen al año (Sáez, 2013) y aproximadamente 1.500 millones de toneladas son transportadas anualmente en buques de carga (Castillo et al., 2005). Teniendo en consideración el manejo de estos grandes volúmenes la contención de ocurrencia de sucesos contaminantes resulta ser una tarea difícil. Existen casos emblemáticos de desastres ambientales por derramamiento de petróleo en el medio ambiente, como lo es el Exxon Valdéz (24-03-89), hundimiento del Prestige (19-11-02) o el hundimiento de una plataforma petrolífera en el Golfo de México (20-04-10). Afortunadamente estos casos ocurren con poca frecuencia, sin embargo logran captar la atención de una gran cantidad de público por sus magnitudes. Sin embargo, es en operaciones de carga, descarga, transporte, almacenamiento y refinamiento donde resulta casi imposible evitar pérdidas y derrames de petróleo o de algunos de sus derivados (Speight, 2006), siendo estos los casos más recurrentes, ya sea por accidente o medianamente intencionados.

El vertido de hidrocarburos en el suelo genera un cambio en el equilibrio existente de éste, específicamente en la relación C:N y C:P, resultando desfavorable para el

desarrollo y crecimiento de los microorganismos (Coyne, 2000) debido al exceso de carbono (C) al que se exponen el suelo y los microbios en él.

1.8. BASES PARA LA DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO

Al igual que la industria, que necesita de combustible para llevar a cabo sus procesos productivos, lo mismo ocurre con los microorganismos del suelo, los cuales necesitan de fuentes energéticas para llevar a cabo procesos metabólicos e interacciones varias, entre ellos y con el medio que los rodea. Aquí es donde el carbono, proveniente de los hidrocarburos del petróleo se presenta como una buena y potente fuente energética.

Científicos académicos e industriales han determinado que algunos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, pueden utilizar los hidrocarburos del petróleo como alimento y fuente de energía (Adams et al., 1999)

Las tasas de transformación del petróleo y de otros hidrocarburos en el ambiente implican complejos mecanismos, que dependerán de la naturaleza y la cantidad de petróleo o hidrocarburo presentes en el suelo.

Los hidrocarburos provenientes del crudo de petróleo se diferencian entre sí, de acuerdo a la propia susceptibilidad que poseen para ser biodegradados. Para tener una referencia, los hidrocarburos más fáciles de metabolizar por los microorganismos, son: N-Alcanos>Alcanos ramificados>Compuestos aromáticos>Alcanos cíclicos (Coyne, 2000)

En el proceso de degradación son importantes las condiciones ambientales predominantes, la concentración de petróleo y la composición de la comunidad de microorganismos autóctonos del suelo. La tasa de descomposición será mayor en presencia de cultivos mixtos (Lozano, 2005).

A continuación se describirán las rutas degradadoras que las bacterias llevan a cabo para la transformación del petróleo.

1.8.1. Bases Bioquímicas

La biodegradación de los hidrocarburos mayoritariamente ocurre por vías aeróbicas. Esta forma de descomposición es la más estudiada por la comunidad científica. Hasta se creía que era la única vía utilizada por los microorganismos. No fue hasta el siglo XX que los científicos se dieron cuenta de otro tipo de degradación: la anaeróbica. Desde

ese entonces, se comenzaron a describir los procesos con respecto a ella, utilizando como oxidantes el nitrato (NO_3), sulfato (SO_3^{-2}) y Hierro (III) (Fe^{+3}). La degradación anaeróbica no es de resultados despreciables, sin embargo es poco frecuente en comparación con la aeróbica.

Cualquiera sea la vía degradadora que las bacterias utilicen, estas necesitarán de un catalizador o comburente con el cual se podrá llevar a cabo la oxidación de los hidrocarburos (Castillo et al., 2000).

1.8.2. Metabolismo aerobio de hidrocarburos

Muchos organismos son capaces de degradar los hidrocarburos utilizando el oxígeno molecular (O_2) como receptor de electrones y los hidrocarburos como carbono (C) y fuentes de energía. En presencia de condiciones aeróbicas y nutrientes apropiados, los microorganismos pueden convertir muchos contaminantes orgánicos en dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y masa celular microbiana. La biorremediación aeróbica utiliza oxígeno como aceptor de electrones.

El metabolismo aeróbico se explota más comúnmente, puesto que resulta ser efectivo para tratar hidrocarburos del petróleo y algunos compuestos oxigenados del combustible, como por ejemplo: metil-terbutil-éter [MTBE]. Además resulta ser una vía mucho más rápida.

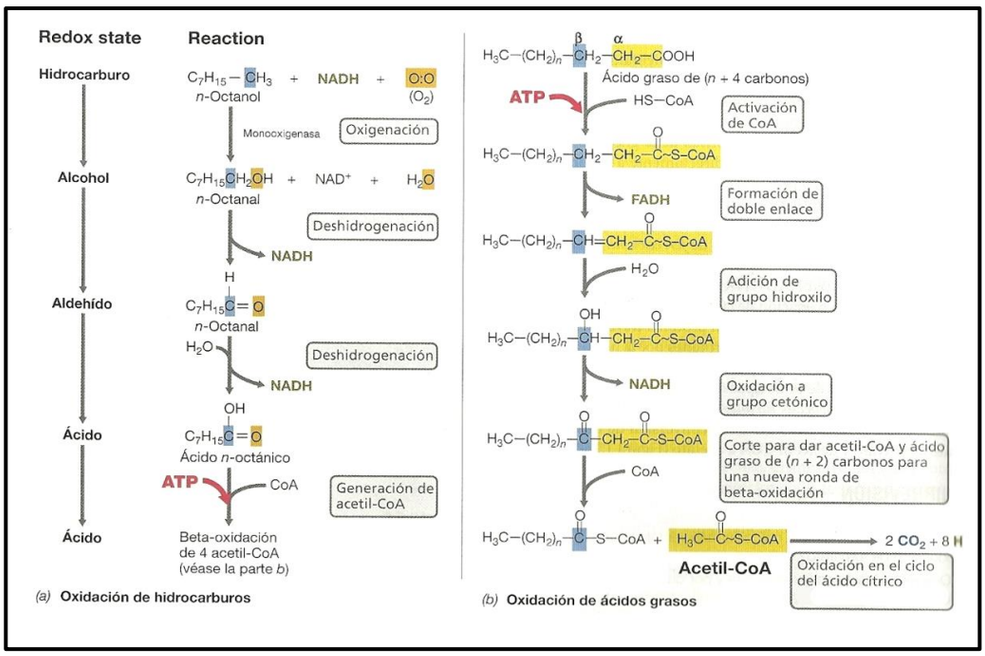
La biorremediación aeróbica se usa con mayor frecuencia en sitios contaminados con productos petroleros de peso medio, por ejemplo: el combustible diesel. Esto debido a que los productos más livianos, como la gasolina, tienden a volatilizarse fácilmente y pueden ser removidos más rápidamente usando otras tecnologías (sparging de aire o extracción de vapor de suelo). Para los productos petrolíferos más pesados, como: aceites lubricantes, que por lo general tardan más tiempo en biodegradarse que los productos más ligeros, las tecnologías mejoradas de biorremediación aeróbica pueden seguir siendo eficaces, aunque es probable que otras técnicas sean más idóneas para estos casos, es por esto que se debe realizar un análisis del suelo y del contaminante, de este modo tratar el área afectada. Generalmente no es práctico utilizar tecnologías mejoradas de biorremediación aeróbica para tratar la contaminación por petróleo en suelos de baja permeabilidad, como lo son los suelos arcillosos. Para estos casos de baja permeabilidad la fracturación ambiental puede mejorar las aplicaciones de biorremediación (Clu-in, (s.f.)a).

1.8.2.1. Oxidación de hidrocarburos alifáticos

Las etapas de oxidación de los compuestos alifáticos están determinadas por la acción de enzimas catalizadoras: las oxigenasas. Existen dos tipos de éstas: dioxigenasas y monooxigenasas. Las primeras catalizan la incorporación del oxígeno molecular (O_2) completo, es decir, sus dos átomos de oxígeno entran en la molécula. Mientras que las monooxigenasas se encargan de catalizar la incorporación de un solo átomo de los dos que posee el oxigeno molecular y el átomo restante de oxígeno lo reduce a agua (H_2O) (Madigan et al., 2015).

En estos casos los donadores de electrones corresponderán a NADH o NADPH. NADH corresponde a la forma reducida de NAD. Esta coenzima actúa como donadora de electrones en el metabolismo. Mientras que, NADPH, la forma reducida de $NADP^+$, es una coenzima que contiene dos grupos de fosfato unidos a una molécula de oxígeno (Beck, 2018).

La ruta degradadora consiste en la oxidación de un átomo de carbono terminal, como por ejemplo: un grupo metilo. A este se le incorpora un átomo de oxígeno por acción de la monooxigenasa. La secuencia de reacciones lleva al hidrocarburo inicial a pasar por alcohol y aldehído. Posteriormente, el producto de la oxidación lleva a un carboxilo que posee la misma longitud que el hidrocarburo original. Este ácido graso hidrofóbico continúa su asimilación por medio de β-Oxidación. Acá se dan paso a una serie de oxidaciones secuenciales, que separan dos carbonos en cada paso. Es durante la β-Oxidación que se forma el NADH, el cual se encarga de entregar energía al proceso, por medio de su oxidación. Un ciclo de β-Oxidación liberará acetil-CoA junto con un ácido graso, el cual tendrá dos átomos de carbono menos que el ácido original. Para el otro carbono ocurre el mismo ciclo y se libera otra molécula de acetil-CoA. Finalmente, el acetil-CoA se oxida a través del ciclo del ácido cítrico (Figura 1-6).



Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-6: Etapa de oxidación para hidrocarburo alifático: a) catalización por medio de oxigenasa y b) oxidación de ácido graso por "β" -oxidación.

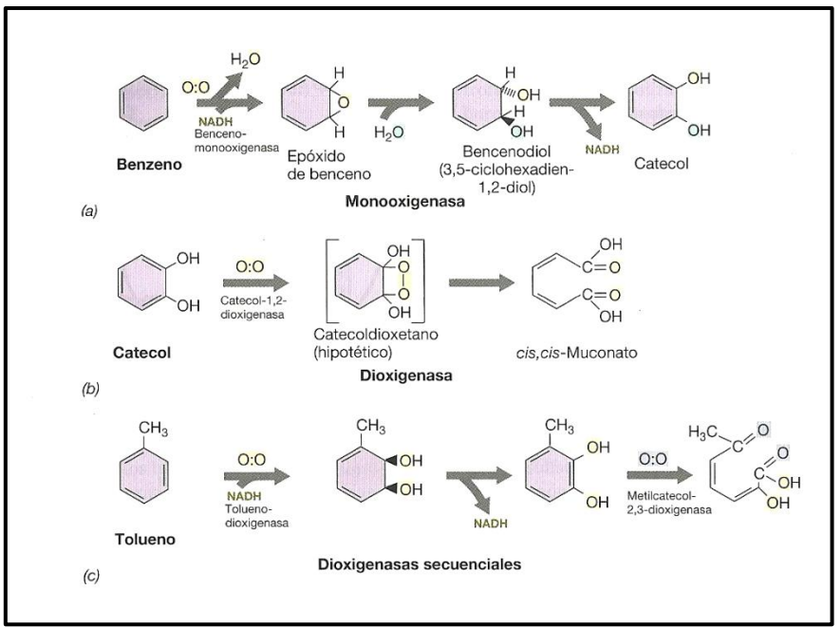
Los microorganismos capaces de llevar a cabo este tipo de degradación principalmente, son: *Pseudomonas*, *Nocardia* y *Mycobacterium* (Madigan et al., 2015: Castillo et al., 2000)

1.8.2.2. <u>Oxidación de hidrocarburos aromáticos</u>

Los compuestos aromáticos se caracterizan por ser muy estables, es por esta razón que resultan ser altamente persistentes en el medio ambiente. Para que la biodegradación aeróbica ocurra, se necesita de la previa activación del compuesto con oxígeno molecular (O_2), esto llevará a la formación de catecol (derivado dihidroxilado) (Castillo et al., 2005), con lo cual se hará mucho más fácil la rotura del/os anillo/s aromático/s. Una vez que se forma el catecol, éste es catalizado por las enzimas mooxigenasa y dioxigenasa. La oxidación lleva a la formación de compuestos como: el succinato, acetil-CoA y el piruvato (Madigan et al., 2015).

Como se muestra en la figura 1-7, hay varias etapas en la oxidación de un compuesto aromático que deben ser mediadas por oxigenasas. En la primera reacción se puede ver la acción catalizadora de la monooxigenasa (a), provocando la hidroxilación de benceno a catecol. En otra de estas reacciones, la dioxigenasa rompe el anillo intradiol del aromático, provocando un corte del catecol a cis,cis-muconato (b). Mientras que en el

último caso en la degradación de tolueno, la dioxigenasa hidroxila el anillo y luego corta el anillo extradiol.



Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-7: Oxidación de un compuesto aromático mediado por oxigenasas.

Una vez que los compuestos aromáticos son degradados, los nuevos compuestos resultantes quedan disponibles para entrar en la ruta del ciclo cítrico, como el acetil-CoA, ácido succianato y piruvato.

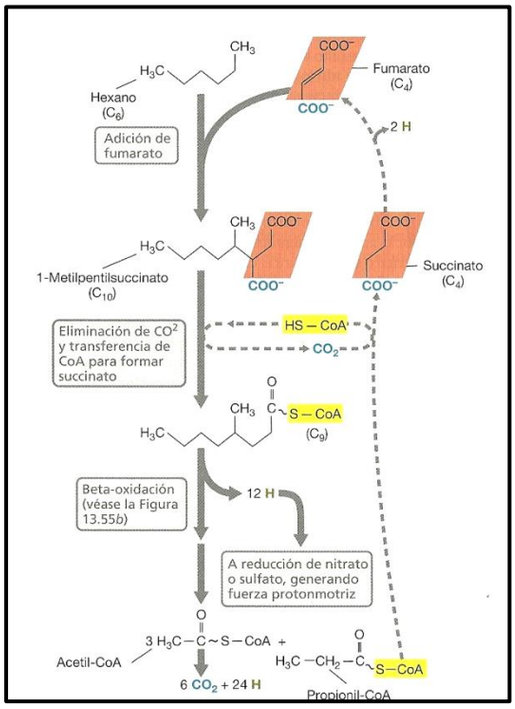
1.8.3. Metabolismo anaerobio de hidrocarburos

La degradación anaeróbica de hidrocarburos se asocia a la reducción de nitrato,sulfato o hierro férrico. Estos son los encargados de actuar como los aceptores de electrones en el proceso degradativo.

1.8.3.1. Reducción de hidrocarburos alifáticos

El metabolismo más estudiado en este caso es el del hexano, que realizan las bacterias desnitrificantes, estas son las que utilizan el nitrato como aceptor de electrones. El metabolismo anóxico del hexano ocurre con la adición de fumarato, este se une en el

átomo de carbono 2 y adiciona el oxígeno necesario para que se forme un ácido graso, el cual será oxidado mediante la β-oxidación, de la misma forma como se describe en la Figura 1-8. se terminará originando acetil-CoA el cual podrá ser oxidado por medio del ciclo del ácido cítrico.



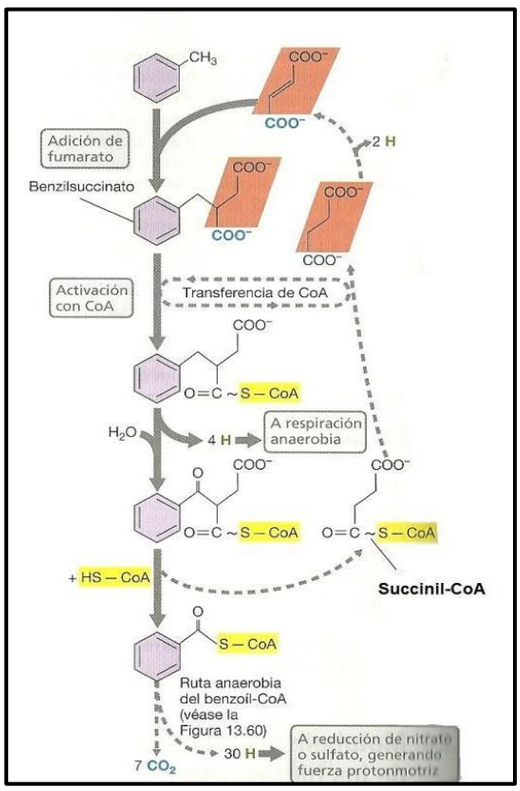
Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-8: Catabolismo anaerobio del hexano

1.8.3.2. Reducción de hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos se degradan por acción de ciertas bacterias reductoras, ya sea de nitrato, hierro férrico o sulfato. Sin embargo, existen otras bacterias; fotótrofas o fermentadoras que son capaces de realizar metabolismo anóxico a ciertos hidrocarburos aromáticos. A diferencia del metabolismo aerobio que comienza a ocurrir por la oxidación del anillo aromático, en el metabolismo anóxico comienza con la reducción del anillo. Por ejemplo: para el catabolismo del tolueno, se añade fumarato, el cual adicionará el oxígeno necesario para iniciar el proceso. Posteriormente se formará benzilsuccinato y se darán paso a una serie de reacciones, que llevaran a la formación de benzoíl-CoA, el cual se terminará degradando por la reducción total del anillo, como se muestra en la figura 1-9.

Para aquellos hidrocarburos con varios anillos, como: naftaleno, la oxigenación ocurre con la adición de dióxido de carbono (no de fumarato), con esto un átomo de oxígeno pasa a formar parte del hidrocarburo, se forma ácido carboxílico y facilita el comienzo del metabolismo degradador por medio de bacterias reductoras desnitrificantes o sulfato.



Fuente: Extraído de Brock, biología de los microorganismos (Madigan et al., 2015)

Figura 1-9: Catabolismo anaerobio del tolueno.

CAPÍTULO 2: BIORREMEDIACIÓN

2. BIORREMEDIACIÓN

2.1. DEFINICIÓN

Según la USEPA, la biorremediación corresponde a la práctica que acelera la biodegradación natural en variedad de medios (suelo, agua (dulce y salada, tanto superficial, como subterránea)), mediante el empleo de microorganismos vivos, sean estos naturales o genéticamente modificados, y hace aprovechamiento de sus capacidades catalizadoras, para la eliminación o neutralización de sustancias xenobióticas contaminantes, mientras estas son utilizados como sustrato energético y con ello, se generan productos metabólicos inocuos, para el medio ambiente y la salud humana. (US EPA CLU-IN, (s.f.)b).

2.2. DEGRADACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN

La asimilación de hidrocarburos por parte de microorganismos, como sustrato para su beneficio ha dejado variedad de publicaciones a través de los años (Stone et al., 1941; ZoBell, 1950; Foster et al., 1962: Takeda et al., 1965; Dibble & Bartha, 1979a; Bossert et al., 1984; Wang et al., 2008; Brooijmans et al., 2009; Obi et al., 2016; Kumar et al., 2018).

Como ventaja a este hecho se tiene que, los microorganismos metabolizadores de hidrocarburos están natural y ampliamente distribuidos en el medio ambiente (Brooijmans et al., 2009: Ghazali et al., 2004). En este punto, es que los microorganismo alóctonos toman una relevancia significativa, ya que resultan ser la clave para dar solución a la mayoría de los casos en que se requiere biodegradación y biorremediación de sustancias contaminantes (Tempest et al., 1978: Verma et al., 2015). Estos organismos pueden ser bacterias, hongos (Elshafie et al., 2007: Bovio et al., 2017: Winquist et al., 2014: Kadri et al., 2017), plantas (fitorremediación) (Crisaldi et al., 2017: Petrová et al., 2017: Feng et al., 2017: Xiao et al., 2015), y nematodos (vermirremediación o vermicompostaje) (Lin et al., 2018: Lin et al., 2016: Martinkosky et al., 2017: Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, el grupo que más sobresale y por lo tanto, el más estudiado y aplicado por los científicos, es el de las bacterias. Es así, como la ciencia ha sabido sacar ventaja de la diversidad genética y versatilidad metabólica (aerobia y anaerobia) (Fabelo, 2017): características propias de estos microorganismos (Garbisu et al., 2002).

Es importante mencionar que, el empleo de estos microorganismos bien pueden realizarse por sí solos (cultivo puro) o en conjunto (cultivo mixto), siendo ambas alternativas completamente viables (Jeyachandran, 1996; Kuiper et al., 2004; Fernández et al.,2009).

En un ambiente los hidrocarburos de petróleo pueden persistir indefinidamente, mientras que en otras condiciones los mismos hidrocarburos pueden biodegradarse completamente en un plazo relativamente breve.

La biodegradación del petróleo en los ecosistemas naturales es un proceso complejo. El destino del petróleo en el ecosistema y las tasas de biodegradación de los hidrocarburos se caracterizan por ser bastante variables. Esta variabilidad responde a la influencia que ejercen una gama de factores abióticos propios del ecosistema, los cuales afectan el crecimiento y actividad enzimática de los microbios. Estas variables abióticas, corresponden a una serie de parámetros ambientales como: temperatura, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes; en especial Nitrógeno (N) y Fósforo (P), sustrato (fuente de carbono) (C), pH y el tipo de suelo (Gunkel et.al, 1980; Atlas, 1981). Por último, pero no menos importantes, otras variables mediadoras que ejerce su influencia son la composición química del mismo petróleo, lo que determinará la evolución de éste en el suelo y la naturaleza de la comunidad microbiana, que se ve enfrentada a la presencia de un componente desconocido, que podrá o no metabolizar.

La influencia de estos parámetros en la eficiencia biorremediadora se han observado y estudiado a lo largo de los años (Dibble & Bartha, 1979a; 1979b; Cooney et al., 1985; Gómez et al., 2008; Al-Hawash et al., 2018) debido a que se correlacionan considerablemente con las actividades enzimáticas de los microorganismos. Por lo tanto, una exhaustiva comprensión de estos factores, es fundamental para un proceso de biorremediación exitoso (Yuniati, 2018).

2.2.1. Parámetros que afectan la biodegradación

2.2.1.1. Temperatura

La temperatura constituye un factor altamente influyente en los procesos biodegradativos. Segun Atlas (1981) la temperatura tiene la capacidad de provocar cambios físicoquímicos en los hidrocarburos del petróleo, determinando así, qué fracciones se

metabolizan o no, puesto que la temperatura los vuelve más o menos susceptibles a la degradación bacteriana (Atlas, 1975).

Jobson et al. (1972) evidencio que ciertas fracciones de una mezcla de petróleo se utilizan bajo ciertas temperaturas. Se encontró que las bacterias psicrofílicas utilizaban preferentemente componentes de n-alcanos de longitud de cadena de hasta C_{31} , mientras que bacterias mesofílicas usaban en primera instancia componentes de hasta C_{25} , para luego seguir con la metabolización del resto de la fracción. Este sugiere que uno o más factores distintos de la solubilidad determinan la utilización de n-alcanos por parte de los microorganismos.

Zhou et al. (1995) también mostró que para un mismo suelo el orden de las tasas de eliminación de los diferentes compuestos a distintas temperaturas no era el mismo. Así, para una temperatura de 11 °C, las tasas de degradación ocurrió preferentemente para los compuestos de mayor peso molecular a los de menor peso: etilbenceno > benceno > tolueno > o-xileno > hexano > metiletilpentano. A 25 °C, el comportamiento primeramente fue para los de mayor peso (etilbenceno-hexano), para luego seguir con los menor peso molecular (metiletilpentano), a excepción del tolueno y o-xileno, el orden que se observó fue: etilbenceno > hexano > metiletilpentano > benceno > tolueno > o-xileno. Y por último a 37 °C la degradación ocurrió desde los compuestos más livianos hasta los más pesados: metiletilpentano > hexano > etilbenceno > benceno > tolueno > o-xileno.

Estos resultados dejan en evidencia que los hidrocarburos alifáticos ligeros como el hexano y el metiletilpentano desaparecen más lentamente que los hidrocarburos aromáticos a bajas temperaturas, pero más rápido a temperaturas más altas. Esto podría deberse a que a medida que la temperatura disminuye, la viscosidad del petróleo aumenta, su volatilización disminuye y la solubilidad aumenta en la solución acuosa del suelo. Esto provoca el retraso de una potencial biodegración. Además esta mayor persistencia en el medio significa que el grado de toxicidad para los microorganismos degradadores aumenta (Heipieper & Martinez, 2010), resultando en una disminución en las tasas de biodegradación microbiana, tal como lo ha documentado Atlas (1991) y Leahy & Colwell (1990). Por otro lado, Zhou et al. (1995) agrega que, otra variable podría ser la energía de activación necesaria para las reacciones metabolizadoras de compuestos, siendo estas más altas para los compuestos alifáticos, que para los aromáticos.

Además, se ha observado que conforme la temperatura baja, también lo hace la velocidad de degradación, esto debido a que la actividad enzimática de las bacterias disminuye. Según Mulkins & Stewart (1974) el descenso de temperaturas también provoca la disminución de la proliferación de bacterias degradantes.

En ecosistemas con climas fríos (árticos y subárticos) las bajas temperaturas por sí solas no se consideran la razón para explicar la limitación en las tasas de biodegradación de los hidrocarburos (Atlas, 1985; Rike et al., 2003). Tampoco se deben a una falta de microbiota indígena, ya que prácticamente todos los ecosistemas del Ártico contienen un número adecuado de microorganismos (Gilichinsky et al., 1992; Whyte et al., 1996; Whyte et al., 1999) perfectamente adaptados a las condiciones de dichos ecosistemas (Russell et al., 1990; Rike et al., 2001) y que son capaces de degradar hidrocarburos. Rivkina et al. (2000) observó actividad metabólica microbiana a temperaturas entre 5 °C y -20 °C, la cual fue cuantificada en muestras de permafrost. Sin embargo lo que sí ocurre es que, el proceso biodegradativo se extiende por más tiempo (Atlas, 1985; Margesin, 2007).

Las limitaciones en la biodegradación se pueden deber más bien, a insuficiencias nutricionales de nitrógeno (N), fósforo (P) y oxígeno (O).

2.2.1.2. Nitrógeno y Fósforo

La presencia de nitrógeno (N) y fósforo (P) juegan un papel clave en el proceso de biodegradación en el suelo. Luego de un episodio de contaminación por hidrocarburos de petróleo, el suelo presenta un gran desequilibrio: los niveles de nutrientes inorgánicos disponibles son bajos, y por otro lado los niveles de carbono (C) son muy altos. Por lo tanto las proporciones de C:N y C:P quedan excesivamente altas. Este es un factor a tener en cuenta en los procesos de biorremediación, ya que cada relación C:N y C:P son únicas para cada suelo y deben estar en proporciones óptimas para no afectar la microbiota o inhibir de alguna manera el proceso biodegradativo (Zhou et al., 1995).

Los resultados en estudios confirman la importancia de la presencia de dichos nutrientes, puesto que son necesarios para biosintetizar metabolitos primarios, proteínas y otros elementos básicos para la biomasa celular. Además estimulan el crecimiento microbiano y la actividad bacteriana y con ello, se promueve un buen proceso de biodegradación (Zhou et al., 1995; Semboung et al., 2016).

Variados son los estudios que se pueden encontrar que respaldan contundentemente que la aplicación de fertilizantes con nitrógeno y fósforo estimula de buena manera la degradación de hidrocarburos en suelos, incluso en climas extremos, como suelos subárticos y árticos. (Jobson et al., 1974; Raymond et al., 1976; Westlake et al., 1978; Chaîneau et al., 2005). Por ejemplo Jobson et al. (1974) por medio de la aplicación de un fertilizante de urea-fosfato, evidenció un rápido aumento de las poblaciones bacterianas degradadoras, además de la utilización preferencial de n-saturados, mientras

que componentes nafténicos (fitano-pristano) se mantuvieron después del proceso. Lo mismo ocurrió con la fracción aromática, la cual mostró nulo o leve degradación, debido a su mayor resistencia a la influencia bacteriana.

Chaîneau et al. (2005) comparó la degradación de un petróleo crudo, con una composición de 48% fracción saturada (lineales (C_8-C_{37}); ramificados y cíclicos), 26% fracción aromática, 26% de compuestos polares incluidas las resinas (7%) y el 19% de un hexano insoluble (HIF), incluidos los asfaltenos y compuestos orgánicos. El estudio se llevó a cabo en suelos contaminados no fertilizados y fertilizados. En el suelo contaminado sin fertilizar, la concentración inicial de hidrocarburos disminuyó con el tiempo, logrando una degradación por atenuación natural de 47%. La adición de una cantidad controlada de nutrientes minerales incrementó significativamente el proceso de degradación, teniendo una eficiencia de 62% pasados 150 días. Por el contrario, las excesivas concentraciones de nutrientes redujeron el grado de biodegradación de hidrocarburos (49%), tal como se ha documentado en otros estudios (Westlake et al., 1978; Choi et al., 2002).

En Westlake et al. (1978) se examinó un proceso de degradación de un petróleo in situ en un suelo de la región boreal de los territorios del noroeste de Canadá. En el estudio se aplicó un fertilizante que contenía nitrógeno (N) y fósforo (P). Este produjo un rápido aumento en el número de bacterias degradadoras, seguido de una rápida desaparición de hidrocarburos parafínicos, específicamente la fracción saturada (n-alcanos e isoprenoides).

Sin embargo, existen ocasiones en que la adición de nutrientes resulta poco significativa y contraproducente en los procesos biodegradativos. En su estudio Johnson et al. (1999), examinó la influencia de la adición de nutrientes de nitrógeno (N) y fósforo (P) en la mineralización de fenantreno en cuatro suelos. Como resultado se obtuvo que los suelos no se vieron afectados positivamente y hasta se mostraron ligeramente deprimidos en su actividad metabolizadora por la adición de estos nutrientes. El análisis de estos resultados sugieren que, los nutrientes añadidos no surtieron el efecto esperado debido a que, naturalmente los niveles de nitrógeno (N) y fósforo (P) eran relativamente altos en los suelos estudiados. Silva et al. (2016), también concuerda con estos resultados, evidenciando que los suelos con menor materia orgánica, tienen un mayor grado de respuesta a la adición de nutrientes..

Por esta razón Bossert & Bartha (1984) propusieron que mientras los suelos dispongan de forma natural con reservas óptimas de nutrientes inorgánicos, la adición de estos solo se debe considerar cuando dichas reservas se agoten., de modo que el proceso biorremediativo no se vea afectado por la toxicidad que estos nutrientes puedan ejercer sobre el sistema estando en proporciones muy elevadas.

Además de la toxicidad que pueda significar los altos niveles de estos macronutrientes sobre la microbiota, la inhibición de la actividad microbiana puede estar asociada con el aumento de la salinidad en el suelo causado por la adición de nutrientes. Además, el tiempo de adaptación microbiana puede aumentar debido a los altos niveles de salinidad del suelo causada por el alto nivel de NH_4^+ y NO_3^+ (Oudot et al., 1998; Chaîneau et al., 2005).

Otro experimento que se llevó a cabo por Zhou et al. (1995) con adición de nutrientes, mostró una secuencia en las tasas de eliminación de componentes del petróleo prioritaria para hidrocarburos monoaromáticos (BTEX), para luego terminar con hidrocaburos alifáticos. El estudio se realizó añadiendo nitrogeno (N) en forma de vapor de amoniaco NH_3 y exponiendo al suelo (S2 y S3) a temperaturas de 11 °C (S3) y 25 °C (S2-S3). Y manteniendo una relación C:N de 50:1. La secuencia de degradación fue para S3 a 11 °C y 25 °C de: etilbenceno > benceno > tolueno > o-xileno > hexano > metiletilpentano y; etilbenceno > tolueno > benceno > hexano > o-xileno > metiletilpentano, respectivamente. Mientras que para S2 a 25 °C la secuencia resultó ser: etilbenceno > tolueno > benceno > o-xileno > hexano > metiletilpentano. Estos resultados, según el autor evidencian que gracias a la adición de vapor de amoníaco y la temperatura controlada, la susceptibilidad de los diferentes compuestos fue menos evidente ante el ataque bacteriano , debido al aumento de biomasa y la biodegradación de hidrocarburos aromáticos se vio beneficiada, presuntamente por una mejor biodisponibilidad de estos compuestos bajo dichas condiciones y por lo tanto, se dió una mayor actividad por parte de la población bacteriana. Tal como se ve en S3 a 11 °C, donde la degradación de la fracción de BTEX fue prioritaria, seguida por los compuestos alifáticos y a 25 °C lo mismo, con excepción de o-xileno, el cual tuvo una degradación minoritaria. S2 a 25 °C mostró un patrón degradativo muy parecido a S3 bajo la misma temperatura.

En cuanto a la adicción de soluciones de fósforo, Morgan & Watkinson (1992) encontraron que, con el uso de tripolifosfato, la migración de fosfato en el medio estaba limitada por la precipitación de sales insolubles, reduciendo la permeabilidad del suelo, a causa de la obstrucción de los poros de este.

En climas fríos también se ha observado la aplicación de diferentes ratios entre C:N y C:P en suelo, encontrando que la más baja concentración de nutrientes, resultó ser la más óptima para el metabolismo bacteriano. Mientras que los alto niveles de nitrógeno (N) limitaban significativamente el sistema (Braddock et al., 1997; Walworth et al., 2003)

Estos estudios indicaron que la adición controlada de nutrientes a un sistema biorremediativo mejora de buena manera los procesos de biodegradación en suelos. Además agregan que, es importante identificar las relaciones C:N y C:P para cada caso,

debido a que estas relaciones resultan ser muy variables, no existiendo una proporción universal que funcione en todos los casos en que se necesite biorremediación.

Todo dependerá del tipo de petróleo con el que se esté tratando, conocer bien las características del suelo y establecer relaciones adecuadas, para evitar condiciones poco óptimas para la biodegradación, por ejemplo: insuficiencia de nutrientes, lo que llevaría a un escaso desarrollo de la población bacteriana. O exceso de ellos, lo que provocaría efectos negativos sobre la microbiota por la toxicidad.

2.2.1.3. Oxígeno

La mayor parte de la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo ocurre en condiciones aeróbicas, ya que los procesos de oxidación de estos sustratos generalmente requieren de oxigenasas. La disponibilidad de oxígeno y su posterior eficiencia en los suelos dependerá del tipo de suelo y, las condiciones en las que este se encuentre, de las tasas del consumo microbiano y la presencia de sustratos utilizables lo que puede llevar al agotamiento del oxígeno (Bossert & Bartha, 1984; Goi et al., 2006). Contar con la disponibilidad de oxígeno es determinante en las tasas de biodegradación, ya que se considera una variable limitante, al igual que los nutrientes inorgánicos (von Wedel et al., 1988).

Es así como la bioestimulación por medio del suministro de oxígeno resulta ser un enfoque atractivo para mejorar la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Zhou et al. (1995) por medio de estudios cinéticos realizados en su investigación demostraron que, la adición de oxígeno resulta beneficiosa para las comunidades microbianas del medio, puesto que el enriquecimiento selectivo las ayuda a adaptarse de mejor manera al sitio contaminado y degradar a una velocidad relativamente más alta.

Zawierucha & Malina (2011) realizaron estudios de respirometría para determinar los efectos de la bioestimulación, mediante diversas formas de suministro de oxígeno. Ellos mostraron la eficiencia del oxígeno adicionado por medio de agua aireada, soluciones acuosas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y permanganato potásico ($KMnO_4$).

Los resultados mostraron que las tasas de biodegradación más altas se alcanzaron con el uso de una solución acuosa de $KMnO_4$, con esta solución el rendimiento de la degradación subió entre 415-585% en comparación con el control. En cuanto al agua aireada esta resultó en un aumento de las tasas de biodegradación de alrededor de 114 - 229%, en comparación con el control. Además, añadieron que el uso de agua aireada es la forma más óptima de suministrar oxígeno a un sistema, puesto que su uso no causa

perjuicios en el ecosistema intervenido. El rendimiento de la solución acuosa H_2O_2 causó una mejora significativa de alrededor del 260% en comparación con un control. Joshi & Lee (1996), también demostraron que por medio de una enmienda de H_2O_2 se logran altas eficiencias de remoción para todos los HAPs (Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(a)pireno).

El alto rendimiento que demuestra el $KMnO_4$ puede que, se deba a que es capaz de oxidar con facilidad los dobles enlaces entre carbonos (Wolfe et al., 1981). Brown, G. S. et al (2003), observó la efectividad del tratamiento biodegradativo por medio de $KMnO_4$ en hidrocarburos aromáticos, que incluían antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fluoranteno, fenantreno y pireno. Para el caso de benzo(a)pireno, pireno, fenantreno y antraceno, las tasas fueron de 72,1%; 64,2%; 56,2% y 53.8%, respectivamente. Mientras que fluoranteno y criseno tuvieron reducciones mínimas de 13.4% y 7.8%, respectivamente.

Los resultados sugirieron que las soluciones de permanganato se pueden aplicar con éxito en la tecnología de remediación de suelos contaminados con petróleo hidrocarburos.

Zawierucha & Malina (2011) además, evidenció que aquellos hidrocarburos que no lograron una completa mineralización por la oxidación de permanganato, su estructura se vió alterada por los grupos funcionales polares, lo que significa grandes mejoras en el sistema acuoso del suelo, la solubilidad y disponibilidad de estos productos intermedios para una potencial nueva biodegradación. Jobson (1974) en su estudio mostró una situación parecida, en que la adición de un fertilizante de O_2 provocó un aumento en las fracciones insolubles, debido a una transformación en la polaridad de los componentes de asfaltenos del petróleo mientras ocurría la degradación de compuestos n-alcanos.

Se debe tener en cuenta que la contaminación por petróleo en altas concentraciones puede agotar de manera rápida los niveles de oxígeno, tanto en el suelo superior, como en las profundidades, obstruyendo el flujo adecuado de este. Por esta razón, es importante mantener niveles suficientes de oxígeno en el suelo, puesto que asegurar la metabolización de hidrocarburos por la vía aeróbica (Fritsche & Hofrichter, 2000), es la estrategia con mayor efectividad para la biorremediación. En el caso de que esto no suceda, la degradación podría ocurrir bajo condiciones anaeróbicas en el suelo, puesto la contaminación asfixia a las partículas del suelo y bloquea la difusión del aire en los poros del suelo. Estas condiciones ejercen efectos posteriores en las comunidades microbianas del suelo y con ello, en la degradación de sustratos del petróleo (Holliger & Zehnder, 1996; Townsend et al. 2003; Sutton et al. 2012).

2.2.1.4. pH

Esta es una variable que se debe tener en cuenta cuando se desean emplear tratamientos biológicos eficientes, puesto que el pH ambiental afecta a procesos como: el transporte de sustancias a través de la membrana celular, el equilibrio de las reacciones catalíticas y las actividades enzimáticas de los microorganismos (Bonomo et al., 2001).

En cuanto al pH óptimo que debe tener el medio para la utilización de hidrocarburos, se puede decir que este puede variar ampliamente, según el evento de contaminación y las características del entorno (Ellis et al., 1961). Aunque se debe tener en cuenta que la mayoría de las bacterias heterótrofas trabajan mejor en ambientes con pH neutro. Debido a la complejidad de la química y biología del suelo, este puede tener grandes variaciones, desde pH 2.5 a 11.0. Bossert & Bartha (1984), Dibble & Bartha (1979a; 1979b), Atlas & Bartha (1992) y Pawar (2015) proponen un pH óptimo que oscila entre el rango de 5.0 a 7.8, para la mineralización de hidrocarburos en el suelo. Ellos han demostrado que los pH neutros propician las tasas máximas en procesos degradativos. Además se relacionan con un desarrollo más alto de poblaciones bacterianas. A pesar de que un pH casi neutro o cercano a este valor, parece ser el más adecuado, otros estudios postulan que un pH entre 5 y 9 no se consideran críticos para la ocurrencia de metabolización (Bushnell & Haas, 1941; Hutton & ZoBell, 1949; Joshi & Lee, 1996).

Variados estudios coinciden en que el pH 7 propician las tasas de degradación más altas (Joshi & Lee, 1996). Dibble & Bartha (1979a), dice que pH 7,8 (en un rango de 7,0 - 7,8) fue aquel en el que las tasas de biodegradación fueron máximas. Morgan & Watkinson (1989) establecieron que los valores de pH entre 6.5 – 8.8, eran los mejores para la mineralización de hidrocarburos en suelo. Horel & Schiewer (2009), observaron que el pH óptimo para la degradación de los hidrocarburos se situaba entre 7.07 y 7.25.

Para los casos en que se necesite ajustar pH en suelo, se puede adicionar cal o azufre, para la corrección alcalina o ácida, respectivamente (Dibble & Bartha, 1979a; Leahy & Colwell, 1990).

Otro dato importante acerca del pH en el suelo, es que presumiblemente este tiene mucho que ver con la persistencia de hidrocarburos aromáticos después de un proceso de biorremediación, puesto que las bacterias degradadoras de estos compuestos poseen una mayor sensibilidad al nivel de pH existente, viéndose favorecidas por un pH alcalino. (Margesin & Schinner, 2001).

Otros estudios respaldan la biodegradación por parte de organismos acidófilos, por ejemplo en el estudio de Stapleton et al. (1998) se reportó la ocurrencia de biodegradación

de hidrocarburos aromáticos en ambientes extremadamente ácidos (pH 2). Aunque se debe considerar que la biodegradación en este caso estuvo mediada en primera instancia por la acción de hongos y luego, los productos intermedios fueron metabolizados por bacterias acidófilas.

2.2.1.5. Humedad

El contenido de humedad del suelo es un factor ambiental de gran importancia, puesto que impulsa la productividad y el ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres. Además, juega un papel esencial asegurando que los microorganismos mantengan su crecimiento y actividad metabólica (Leahy & Colwell, 1990). Junto a la temperatura, es uno de los principales determinantes de la velocidad a la que los hidrocarburos son mineralizados por la microbiota del suelo. Se sabe que la contaminación por hidrocarburos provoca cambios adversos en las propiedades físicas del suelo e induce la repelencia del agua, ya que aumenta significativamente la hidrofobicidad de este (Roy et al., 1999; Roy & McGill, 2000; Abosede, 2013; Marín-García et al., 2016; Edyta Hewelke et al, 2018). Esto quiere decir que el medio pierde su capacidad de absorber y retener agua (H_2O), desplazando el aire de los poros del suelo, lo que limita en gran medida el régimen de agua y aire. Todo esto conlleva a un aumento de la escorrentía superficial, erosión y reducción de la humedad del suelo (Adams et al, 2008; Marín-García et al., 2016).

Mantener un contenido de humedad en el suelo en un valor óptimo es de importancia crítica para un proceso de biorremediación exitoso, ya que según Davis et al. (2003) esta puede tener una influencia importante en las tasas de degradación. La pérdida de agua puede compensarse mediante la adición intermitente de agua al suelo durante la biorremediación (Bahmanil et al., 2018). Otra alternativa, consta de mezclar suelos hidrófobos con porciones de suelo hidrófilo, y así disminuir la repelencia al agua por parte del medio (Quyum et al., 2002). La humedad tiene que ver con el flujo de salida de CO_2 del suelo por medio de la respiración heterótrofa (Moyano et al., 2012; 2013). Se conoce que, las tasas de flujo de salida de CO_2 disminuyen a medida que la repelencia en el suelo aumenta (Goebel et al., 2005). Lamparter et al. (2009) también demostró este hecho y además agregó que parámetros abióticos básicos como el pH y la relación C:N, se encuentran estrechamente relacionados con la humectabilidad.

También se observado la relación entre humedad y flujo de salida de CO_2 de suelos contaminados en regiones frías. Aquí los resultados indican que la respiración heterótrofa (salida de CO_2) de los microorganismos no se relacionan mayormente con las concentraciones de humedad en los suelos. Esto puede deberse a que la microbiota de

dichos lugares se encuentra adaptada a estos suelos con poca capacidad de retención de agua (Ferguson et al., 2003). Horel & Schiewer (2009), del mismo modo que Ferguson et al (2003), concluyó que el contenido de humedad elegido (2%, 4%, 8% y 12%) en la arena resultó ser sólo un factor menor en la biodegradación.

Generalmente, en los suelos las condiciones extremas de humedad son desfavorables para la proliferación de microorganismos y para el normal desarrollo de su metabolismo.

Algunos autores como Dibble & Bartha (1979a) demostraron que la biodegradación fue óptima con 30 a 90% de saturación de agua en suelos. Mientras que Mohammed et al. (1996) indicaron que el contenido óptimo de humedad es del 50-70%. Por otro lado Morgan y Watkinson (1989) observaron que los contenidos de agua de entre el 20% y el 70% son recomendables como adecuados para la el desarrollo de la actividad microbiana en suelos. Otro estudio realizado más recientemente, en el que se observó la respuesta de la población microbiana autóctona, en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con asistencia de bioestimulación bajo diferentes humedades del suelo. El estudio mostró que el rendimiento fue más eficiente con 15 y 25% de humedad para los n-alcanos y compuestos ramificados que permitieron la eliminación entre 78% y 100%. La degradación de hidrocarburos ramificados y aromáticos fue mejor a 30% de humedad con una tasa de remoción de 64% y 74% del contaminante (Silva et al., 2016).

2.2.1.6. Tipo de suelo

El suelo y su permeabilidad, constituyen un factor de alta importancia en los procesos biorremediativos, puesto que influyen en la biodisponibilidad y biodegradación de los compuestos de hidrocarburos. Esto, porque la porosidad del suelo permite el transporte de oxígeno, nutrientes inorgánicos e inóculos microbianos a través del agua (Gerber et al., 1991; Morgan & Watkinson, 1989), por lo tanto que en el suelo exista el grado adecuado de permeabilidad es primordial, para asegurar una exitosa biorremediación (Mohammed et al., 1996), sin olvidar el factor humedad. Para ello la estructura de poros más ventajosa es aquella en la que se retiene agua, pero una fracción considerable de los poros permanece con aire disponible (oxígeno) (Speight & El-Gendy, 2018).

Se sabe que los suelos arcillosos poseen altos porcentajes de absorción de petróleo crudo en comparación con otros tipos de suelos; arenosos; de arena fina, media y gruesa (Kavitha et al., 2015). Según Aislabie et al. (2006) los suelos de textura gruesa son conocidos por tener una baja capacidad de retención de agua. Mientras que los suelos

arenosos tiene bajos nutrientes y microflora, por lo tanto, se caracterizan por su baja biodiversidad (Rahman et al., 2003).

Las concentraciones de hidrocarburos son altamente acumulables en granos de suelo de tamaño fino, en comparación con los granos de suelo grueso, ya que la superficie de los granos finos son más amplias que la de los granos más gruesos (El-Gendy et al., 2009). En este mismo estudio realizado por El-Gendy et al. (2009) se llevó a cabo un proceso de biorremediación de tres muestras de suelos arenosos diferentes y contaminadas con petróleo. A saber la composición de los suelos era: S1 de 92% de arena, 8% de limo, y se caracteriza principalmente por arena muy gruesa a media; el S2 se componía de 96% arena, 4% limo, la arena era de media a fina y una parte muy gruesa. Mientras que S3 era de 89% arena, 11% limo, y se caracteriza por arena media a fina. El análisis reveló que el contenido de hidrocarburos era en la siguiente secuencia: S3>S2>S1, lo que concuerda con los porcentajes de arena fina presentes en los suelos (S3>S2>S1). En este estudio además, se puede ver que los granos bien redondeados están menos contaminados con aceite que aquellos granos irregulares o subredondeados, puesto que estos últimos se contaminan a través de fisuras y puntos profundos de su superficie.

Otro estudio realizado por Haghollahi et al. (2016) también puso en comparación diferentes tipos de suelos. Se escogieron cuatro tipos de suelos. El suelo tipo I: suelo arenoso que contiene 100% arena. Suelo tipo II: suelo arcilloso con más del 95% de arcilla. Suelo tipo III: suelo de grano grueso con un 68% de grava y un 32% de arena. Y, suelo tipo IV: de grano grueso con un alto contenido en arcilla con un 40% grava, 20% arena y 40% arcilla.

Los resultados mostraron que la eficiencia de la biorremediación se vio afectada significativamente por el tipo de suelo. El porcentaje de eliminación más alto (70%) fue para el suelo arenoso (tipo I) con un contenido inicial de TPH de 69.62 g / kg, y el más bajo (23.5%) para el suelo arcilloso (tipo II) con un contenido inicial de TPH de 69.70 g / kg. Mientras que el suelo tipo III y tipo IV tuvieron una degradación de 63.2% y 67.5%, respectivamente. El efecto del contenido de humedad (10%) en la biorremediación no fue estadísticamente significativo para los niveles investigados. El porcentaje de remoción en el suelo arcilloso (tipo II) se mejoró a 57% (en un mes) en un experimento separado al mezclar más frecuentemente el suelo, lo que indica que una baja disponibilidad de oxígeno resulta ser la razón para la baja degradación de los hidrocarburos en el suelo arcilloso. Además, el mejor resultado en este caso fue el contenido de humedad de 10%. El mayor contenido de humedad (20%) afectó negativamente la eliminación de TPH en las muestras.

Horel & Schiewer (2009), estudiaron en clima frío y también se comprobó que la metabolización de hidrocarburos (producción de CO_2) fue mayor para suelos de arena que

para grava. Durante el período de tiempo investigado, la arena contaminada mostró una producción acumulada de CO_2 dos veces mayor, en comparación con la grava contaminada. El estudio concluyó que en suelo arena el proceso de adsorción retarda el movimiento del contaminante verticalmente, resultando en una distribución más uniforme del contaminante en el suelo. Adicionalmente, la arena tiene una mayor porosidad, lo que puede influir en un mejor flujo del oxígeno por el medio. La mayor superficie de arena también, aumenta la disponibilidad del contaminante a los cultivos microbianos y consecuentemente resulta en un mayor velocidad de remoción de hidrocarburos, en comparación con la grava. Además, en contraste con la arena, la grava tiene poca superficie específica de partículas, limitando su capacidad de retener contaminantes.

Por otro lado, Labud & Hernández (2007) proponen que, se debe considerar que suelos con una mayor materia orgánica y arcilla, pueden verse menos afectados por este tipo de contaminación. Puesto que a mayor contenido de materia orgánica, los microorganismos se ven protegidos contra el efecto tóxico de los hidrocarburos, disminuyendo las concentraciones del contaminante en las fases acuosas y gaseosas del suelo. Junto con esto, también disminuye su transporte y biodisponibilidad. Esto puede ser una ventaja a tener en cuenta, puesto que los suelos arenosos al tener bajos niveles de materia orgánica, adhieren el contaminante a sus partículas, lo que ejercería un efecto más tóxico sobre los microorganismos del suelo, determinando con ello, el tamaño de la población microbiana.

2.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS

Otro aspecto de importancia que no se debe dejar al azar en el proceso biorremediativo es el aislamiento microbiano. El aislamiento permite la caracterización y enumeración de las comunidades microbianas, tanto de aquellas que viven en suelos sanos, como de aquellas que logran proliferar en sitios contaminados con petróleo. Que se realicen estudios integradores, para identificar y caracterizar cepas bacterianas, puede ayudar a tener una idea de la vitalidad, tanto del suelo (que soporta el crecimiento), como de las especies microbianas que allí crecen, de los rendimientos de éstas y por lo tanto, prevé como serán las tasas de descontaminación, mejorando así, la eficiencia de la biorremediación (Kästner et al., 1994; Kao et al., 2001; Ekpo et al., 2008; Stenuit et al. 2008: Zhang et al., 2010; Geetha et al., 2013).

Estos datos pueden ayudar a conocer la concentración y antigüedad del contaminante en un sitio en específico. Se sabe que los derrames recientes y/o altamente contaminantes a menudo inhiben o matan un gran sector de la microbiota existente en el suelo. Mientras que los suelos con contaminación antigua, tienden a mostrar una mayor cantidad y calidad de microorganismos (Walker & Colwell, 1976; Bossert & Barha, 1984; Dean-Ross, 1989; Saadoun, 2002).

A pesar de las ventajas que puedan significar las prácticas de aislamiento microbiano, éstas no resultan ser una vía confiable y directa de que la degradación ocurrirá eficientemente. Sin embargo, la forma más directa de asegurarse de que la actividad en los suelos se está produciendo como debe, es monitorear la tasa de desaparición de los hidrocarburos presentes en un crudo (Margesin et al., 2001). Esto se puede conseguir midiendo la acumulación de concentraciones de CO_2 en el suelo. Esta medición constituye un excelente indicador cualitativo de la actividad heterótrofa en el suelo, y por lo tanto un reflejo de la mineralización de compuestos, llevada a cabo por los microorganismos (Bossert et al., 1984; Sharabi & Bartha, 1993; Kao et al., 2001; Sabaté, et al., 2004; Schoefs et al., 2004; Corona, et al., 2005; Baptista et al., 2005; Farahat, et al., 2007; Soliman et al., 2013; Noel et al., 2016; Hewelke et al., 2018).

Otra forma de medir la actividad de los microorganismos en el suelo es mediante las actividades enzimáticas del suelo (Karigar & Rao, 2011). Estas se consideran un buen parámetro que permite evaluar biológicamente las funciones del suelo y con ello, monitorear la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. A continuación, se citan una serie de estudios que consideran a los parámetros bioquímicos del suelo, como herramienta útiles para evaluar el efecto de contaminación por hidrocarburos en los microorganismos (Margesin et al. 2000; Baran et al., 2004; Marin et al., 2005; Riffaldi et al., 2006; Dawson et al., 2007; Labud & Hernández, 2007; Margesin et al., 2007; Serrano et al., 2009; Turgay et al., 2010; Alrumman et al., 2015; Dindar et al., 2015; Mnif et al., 2015; Borowik et al., 2017)

En apoyo a las prácticas que buscan identificar a las especies bacterianas más eficientes para la biorremediación, mediante caracterización y conociendo su comportamiento se han encontrado varios métodos para evaluar la capacidad de biodegradación de las bacterias degradadoras de hidrocarburos, entre las cuales figuran: la cromatografía de gases (GC), como una de las más utilizada (Walker et al., 1975; Oudot, 1984; Venosa et al., 1997; Saadoun, 2002; Nikolopouloua et al., 2007; Owsianiak et al., 2009, Zawierucha et al., 2011; Martins et al., 2014; Ghoreishi et al., 2017;). Y la respirometría de masas (Walker et al., 1975; Oudot, 1984; Sauudoun et al., 1999; Plaza et al., 2010; Zawierucha et al., 2011; Trejos, 2017)

2.4. MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA

En el suelo, las interacciones de los microorganismos son de alta complejidad y cumplen un importante papel en la descomposición de componentes ajenos a este.

Como se ha dicho anteriormente, la población microbiana indígena de un suelo es capaz de degradar contaminantes, tal como lo son los hidrocarburos del petróleo. Aunque lo hace a una velocidad degradativa muy lenta, el proceso resulta ser efectivo en el largo plazo (Soliman et al., 2014).

La degradación microbiana del petróleo ocurre en primera instancia para los hidrocarburos de peso molecular ligero del tipo, es decir las fracciones aromáticas ligeras. Mientras que las fracciones de hidrocarburos aromáticas de mayor peso molecular, como las resinas y los asfaltenos, presentan mayor resistencia a la biodegradación, incluso se les considera recalcitrantes (Lal et al., 1996: Leahy, 1990).

H. C. Saturados > H. C .Aromáticos$_{ligeros}$ > H. C. Aromáticos$_{pesados}$ > Resinas-Asfaltenos

Los mecanismos que ocupan las bacterias en el proceso de biodegradación de contaminantes del petróleo, puede ser aerobio y anaerobio. Durante la biodegradación aerobia, las bacterias oxidan el petróleo, convirtiéndolo en dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y energía en el caso de que la degradación ocurra por vía aerobia. Mientras que en la biodegradación anaerobia, las bacterias reducen el contaminante y necesitan aceptores de electrones, como: nitrato (NO^{3-}), hierro (III) (Fe^{3+}), manganeso (Mn^{4+}), sulfato (SO_4^-) o dióxido de carbono (CO_2). Y los productos de estas reacciones suelen ser: CH_4 , CO_2 , N_2 , S^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}.

En el proceso de biodegradación (aerobio o anaerobio), los microorganismos obtienen energía o asimilan los hidrocarburos del petróleo en biomasa celular (Peixoto et al., 2011; Varjani, 2017). Según Sharabí & Bartha (1993), aproximadamente 50 % del carbono del petróleo es usado para biomasa bacteriana.

La degradación aerobia se considera la más rápida y completa en la metabolización de hidrocarburos. El rendimiento energético de las bacterias que metabolizan por la vía anaeróbia, es menor que el que se produce si se utiliza oxígeno como aceptor de electrones (Braddock et al., 1997). Este menor rendimiento energético de las bacterias anaeróbicas resulta en un menor índice de degradación y por lo tanto, se requiere un período más largo para la remediación debido a la lentitud del proceso (Leahy & Colwell, 1990; Reineke, 2001; Thapa et al., 2012).

A pesar de que la reducción anaerobia puede ser lenta, resulta prospera en el tiempo (Salminen et al., 2004; Tierney & Young, 2010), incluso metabolizando compuestos complejos como lo son los HAPs (Chang et al., 2002). Sin embargo, el conocimiento sigue siendo incompleto sobre la degradación anaeróbica de los hidrocarburos aromáticos alifáticos y policíclicos (Holliger & Zehnder, 1996).

Algunos autores, como Safiyanu et al. (2015) informaron que la eficiencia de la biotransformación de los hidrocarburos por parte de bacterias presentes en suelos oscila entre el 0,13% y el 50%. Aunque, como se verá más adelante estas tasas degradativas pueden variar e incluso ser superiores a lo señalado por el estudio citado.

Todas las fracciones que componen un crudo de petróleo, tendrán una distinta tasa (%) de biodegradación, lo que se relaciona directamente con su estructura química (Jobson, 1972; Walker et al., 1976). Es así como las fracciones que contienen alcanos de cadena recta son por lo general los hidrocarburos más fáciles de degradar. Sin embargo las fracciones saturadas que contienen alcanos ramificados son menos vulnerables al ataque microbiano (Toledo et al., 2006). Esto se puede evidenciar en ciertos estudios, por ejemplo Cerqueira et al. (2011) mostró que los aislamientos bacterianos utilizados lograron la degradación eficiente de los compuestos alifáticos (n-C_{11} a n-C_{28}) presentes en la muestra petroquímica. Sin embargo, hacia los últimos días del proceso biodegradativo la muestra continuaba presentando cantidades significativas de alcanos ramificados (alcanos isoprenoides) de Pristano ($C_{19}H_{40}$) y Fitano ($C_{20}H_{42}$). Según Paudyn et al. (2008), la naturaleza ramificada de los isoprenoides los hace relativamente resistentes a la acción de las bacterias y se degradan más lentamente en comparación con los alcanos lineales. Lo mismo ocurre con los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos son componentes preocupantes debido a su toxicidad, propiedades mutagénicas y/o carcinogénicas, además de su baja volatilidad. Se caracterizan por una alta resistencia a la degradación microbiana, y por lo general sus tasas de biodegradación son más bajas en comparación con otras fracciones del petróleo (Atlas, 1981; Abdel-Shafy y Mansour, 2016; Varjani & Upasani, 2016). A pesar de su alta complejidad estructural, existen un buen número de microorganismos capaces de metabolizar este tipo de hidrocarburo (Fernández et al., 2011). Según Haritash et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomons fluoresens*, *Mycobacterium spp*., *Haemophilus spp*., *Rhodococcus spp*., *Paenibacillus spp*. son algunas de las bacterias más estudiadas y aplicadas en la remoción de estos recalcitrantes compuestos.

Otras bacterias, como *Streptomyces*, también han demostrado su eficiencia. Balachandran et al. (2012) mostró que el aislado de *Streptomyces sp* logró eliminar 98,25% de aceite diesel; 99,14% de naftaleno y 17,5% de fenantreno en 7 días. Además, la fracción alifática fue completamente biodegradada. Un resultado igual obtuvo Ferradji et al. (2014)

para la fracción alifática, mientras que para el naftaleno las tres cepas de *Streptomyces spp*. (AB1), (AH4) y (AM2) lograron degradar naftaleno a 82,36%; 85,23% y 81,03%, respectivamente, después de 12 días de incubación. Previamente Chaudhary et al (2011) reportó que *Streptomyces rochei* es una especie buena en la degradación de HAPs, esto puede ser atribuido a su producción de biosurfactantes y a su habilidad de emulsificación. El uso de a microorganismos productores de biosurfactantes puede resolver eficazmente la indisponibilidad de los hidrocarburos al ataque de las bacterias, que generalmente se ve obstaculizada por la falta de solubilidad del contaminante (Varjani & Upasani, 2017b).

En la tabla 2-1 se entregan una serie de estudios que hacen referencia a la degradación de las distintas fracciones del petróleo por variedad de bacterias biodegradadoras.

Tabla 2-1: Fracciones del petróleo y bacterias degradadoras.

FRACCIÓN HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO	BACTERIA DEGRADADORA	REFERENCIA
ALIFÁTICOS	*Acinetobacter sp*	Mittal & Singh (2009)
	Azoarcus sp.	Widdel & Rabus (2001)
	Basillus sp	Ghazali et al. (2004); Das & Mukherjee (2007)
	Bacillus subtilis	Tao et al. (2017)
	Brevibacterium	Leahy & Colwell (1990)
	Micrococcus sp.	Ghazali et al. (2004)
	Mycobacterium austroafricanum	Bogan et al. (2003)
	Ochrobactrum sp.	Varjani et al. (2015)
	Paraburkholderia aromaticivorans	Lee et al. (2019)
	Pseudomonas sp.	Hasanuzzaman et al. (2007); Mittal & Singh (2009); Rocha et al. (2011); Zhang et al. (2011); Sajna et al (2015); Varjani et al. (2015); Varjani & Upasani (2016)
	Rhodococcus sp.	Song et al. (2011)
	Stenotrophomonas sp.	Varjani et al. (2015)
MONOAROMÁTICOS	*Acinetobacter sp*	Batista et al. (2006)
	Archaeoglobus fulgidus	Wilkes et al. (2016)
	Aromatoleum aromaticum	Wilkes et al. (2016)
	Bacillus sp.	Janbandhu & Fulekar (2011)
	Dechloromonas	Coates et al. (2001)
	Halomonas sp	Widdel & Rabus (2001)
	Paraburkholderia aromaticivorans	Lee et al. (2019)
	Pseudomonas sp.	Mittal & Singh (2009);
	Rhodococcus sp.	Leahy & Colwell (1990); Kim et al. (2002); Song et al. (2011)
	Sphingobacterium sp.	Janbandhu & Fulekar (2011)

Tabla 2-1: Fracciones del petróleo y bacterias degradadoras. (Continuación)

POLICÍCLICOS	*Achromobacter sp.*	Hou et al. (2018)
	Achromobacter insolitus	Janbandhu & Fulekar (2011)
	Bacillus sp.	Mittal & Singh (2009)
	Burkholderia	Guo et al. (2017)
	Cronobacter sakazakii	Umar et al. (2017)
	Enterobacter sp.	Umar et al. (2018)
	Microbacterium esteraromaticum	Kumari et al. (2018)
	Mycobacterium aromativorans	Seo et al. (2012)
	Mycobacterium austroafricanum	Bogan et al. (2003)
	Mycobacterium sp.	Boldrin et al. (1993)
	Paraburkholderia aromaticivorans	Lee et al. (2019)
	Pseudomona aerugiosa	Zhang et al. (2011); Kumari et al. (2018)
	Pseudomonas fluorescens	McNally et al. (1998)
	Pseudomona mendocina	Gao et al. (2013); Kumari et al. (2018)
	Pseudomonas plecoglossicida	Nwinyi et al. (2016)
	Pseudomona putida	McNally et al. (1998); McNally et al. (1999)
	Pseudomona sp.	Widdel & Rabus (2001); Nwinyi et al. (2016); Mnif et al. (2017)
	Pseudomonas stutzeri	MacNally et al. (1998); McNally et al. (1999)
	Staphylococcus sp.	Mnif et al. (2017)
	Stenotrophomonas maltophilia	Kumari et al. (2018)
	Streptomyces sp.	Kumari et al. (2018)
	Vibrio sp.	Widdel & Rabus (2001)

(Fuente: Extraído y adaptado de Microbial degradation of Petroleum Hidrocarbons) (Varjani, Sunita, 2017)

Además de que las tasas de degradación varían en la degradación de hidrocarburos del petróleo, se ha documentado que existe un tiempo de retardo después de ocurrido el derrame de petróleo antes de que los microbios autóctonos comiencen a descomponer el contaminante (Fusey & Oudot, 1984). Este retardo se relaciona con la toxicidad inicial de las fracciones volátiles del petróleo, las cuales se evaporan durante los primeros días del derrame. Luego de ocurrido esto, las poblaciones microbianas se abren paso y comienzan a usar la nueva fuente de carbono; el petróleo (Lee & Levy ,1989).

2.5. MICROOGANISMOS EN BIORREMEDIACIÓN

2.5.1. Bacterias

Como se nombro anteriormente, muchos son los estudios de biorremediación que emplean bacterias. Los géneros más utilizados son: *Pseudomonas, Acinetobacter, Sphingomonas, Stenotrophmonas, Bordetella, Brucella, Bacillus, Achromobacter, Ochrobactrum, Advenella, Mycobacterium, Mesorhizobium, Klebsiella, Pusillimonas, Raoultella, Rhodococcus, Nocardi, Azoarcus, Brevibacteruium, Arthrobacter, Cellulomonas, Corynebacterium, Flavobacterium, Marinobacter, Micrococcus*.

A pesar de esta gran variedad, Leahy et al. (1990) y Milić et al. (2009) indican que los microorganismos bacterianos degradadores de hidrocarburos más importantes, tanto en suelos como en agua son: *Pseudomonas sp, Acinetobacter, Flavobacterium, Nocardia, Achromobacter, Arthrobacter, Alcaligenes, Flavobacterium, Micrococcus, Rhodococcus Mycobacterium, Corynebacterium y Bacillus*

Las *Pseudomonas* conforman el grupo más estudiado y por lo tanto, resulta ser el género más utilizado en tratamientos de biorremediación. Según Pérez et al. (2008) estas bacterias son capaces de utilizar como fuente de energía una gran cantidad de compuestos orgánicos del petróleo, de esta forma logran proliferar, colonizar nichos y ambientes inhóspitos. El género *Pseudomonas* es ampliamente conocido por poseer variedad de especies que demuestran una alta eficiencia para degradar una gran cantidad de sustratos, tales como compuestos alifáticos, aromáticos y poliaromáticos (Fan et al., 2003: Molina et al., 2009). Además, según indican Mulligan (2005) y Zhang et al. (2012), este género es capaz de producir biosurfactantes (ramnolípidos), los cuales poseen la capacidad de mejorar la solubilidad de compuestos orgánicos poco solubles, lo que significa una ventaja para los casos de remediación.

Especies de *Pseudomona,* como la *Pseudomona Fluorescens* se le conoce por su poder degradativo sobre naftaleno y asfaltenos (Rockne et al., 2000). Además, resultan tener altas tasa degradativas, tal como documentan Obi et al. (2016) y Bracho et al. (2004) con valores de hasta alrededor del 79% de hidrocarburos degradados. Pérez et al. (2008) reporta un 57% de degradación por parte de *Pseudomona aeruginosa*.

Bacterias como, *Acinetobacter* y *Alcaligenes odorans*, demostraron su capacidad degradativa para dos tipos de petróleo. *Acinetobacter* mostró tasas degradativas de 29% a 50% (dependiendo del tipo de crudo examinado). Esta bacteria mayormente cataboliza las fracciones de alcanos y en menor medida las fracciones de aromáticos. Mientras que

Alcaligenes odorans, muestra tasas de degradación entre 37% a 45%. Además logró degradar por igual fracciones de alcanos y aromáticos (Lal et al., 1996).

Considerando que el proceso de degradación se vuelve limitado, debido a la poca biodiversidad de microorganismos nativos existente en el suelo con especificidad para degradar hidrocarburos (Ron et al., 2014), se han desarrollado numerosos estudios que han documentado consistentemente la superioridad degradativa de los cultivos de bacterias mixtos, también conocidos como: consorcios microbianos. Algunos estudios (Sugiura et al., 1997; Ghazali et al., 2004; Cerqueira et al., 2011; Varjani et al., 2013) respaldan esta alternativa, como una vía de mayor eficiencia en el trabajo biodegradativo. Por ejemplo para el primer estudio se utilizaron consorcios microbianos compuestos principalmente por cepas bacterianas de *Bacillus* y *Pseudomonas,* las cuales resultaron ser altamente efectivas en la degradación de compuestos de alcanos de cadena media y larga. En el estudio de Ghazali et al. (2004) se utilizaron consorcios de *Acinetobacter* y *Sphingomonas*. Este estudio concluyó que el género *Sphingomonas* presente en uno de los consorcios microbianos utilizados, es muy efectiva en la degradación de compuestos de hidrocarburos de alto peso molecular y baja solubilidad, como lo son los aromáticos. En el estudio realizado por Cerqueira et al. (2011) se trabajó con sustrato obtenido desde una industria petroquímica. La caracterización inicial de la muestra, determinó cantidades de 90% de hidrocarburos alifáticos y 10% de hidrocarburos aromáticos. Se aislaron Tres bacterias de un lodo oleoso petroquímico, identificadas como *Stenotrophomonas acidaminiphila* , *Bacillus megaterium* y *Bacillus cibi* , y dos bacterias aisladas de un suelo contaminado por desechos petroquímicos, identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Por si solas las bacterias aisladas del lodo oleoso tuvieron un rendimiento de degradación entre 87% - 92% (*Pseudomnona aeruginosa* - *Stenotrophomonas acidaminiphila*) y 33% - 64% (*Stenotrophomonas* - *Bacillus cibis*), fracción saturada y aromática respectivamente.

Mientras que el cultivo mixto (*Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus. megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus cereus)* demostró una superior y notable capacidad de degradación del lodo aceitoso, reduciendo el 91% de la fracción alifática y el 52% de la fracción aromática. El análisis se realizó en 40 días.

Mientras que en el cuarto estudio (Varjani et al., 2013), los consorcios microbianos variaron sus tasas de degradabilidad de acuerdo al tipo de composición del crudo, pero demostraron una gran eficiencia y tasas de degradación más altas en el tratamiento de contaminantes recalcitrantes, en comparación con el uso de una sola cepa bacteriana.

El estudio de Lal et al. (1996), citado anteriormente, además realizó pruebas con una combinación entre las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus* y *Alcaligenes odorans* para tratar las muestras de petróleo. Los resultados degradativos registrados del consorcio mostraron que se logró incrementar las tasas degradativas de petróleo a valores de 40% y 58%, para los respectivos petróleos analizados. Estos resultados son mayores, en comparación con la acción de las bacterias por sí solas.

Se han reportado tasas de biotransformación para compuestos n-alcanos y petróleo crudo por un consorcio bacteriano, compuesto por los géneros: *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Éstas fueron aisladas desde el suelo contaminado con petróleo crudo, por su habilidad para degradarlo y la capacidad de formar biosurfactante (rhamnolipids), respectivamente. La eficiencia de biotransformación de alcanos aumentó de 89,35%; que logró el cultivo puro (*Acinetobacter)* a un 97,41%; que logró el cultivo mixto (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*). Mientras que para el petróleo crudo inicialmente se logró una degradación de 74,32%, por parte del cultivo puro (*Acinetobacter)*, ésta tasa aumentó a 87,29%, por acción del consorcio bacteriano (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*). Los autores atribuyen el aumento en la tasa degradativa a la sinergia que se dio entre ambas cepas bacterianas, donde el cultivo mixto, *Acinetobacter* creció rápidamente utilizando la fracción de alcanos del petróleo crudo y generando productos intermedios que fueron posteriormente utilizados por *Pseudomonas* para su propio crecimiento y luego con la formación de biosurfactante (rhamnolipid) por parte de esta bacteria, con ello se logró una consecuente mejora en la tasa de biotransformación del petróleo crudo, lo que al final se tradujo en un mayor poder degradador (Chen et al. 2014).

Otro consorcio utilizado por Varjani et al. (2015), compuesto por seis cepas bacterianas: *Ochrobactrum sp.* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (2) y *Pseudomona aeruginosa* (3), las cuales se aislaron desde un sitio contaminado con petróleo (Gujarat, India), lograron degradar significativamente 83,7% del crudo, utilizando rápidamente la fracción de parafina que conformaba a éste.

Aboelwafa et al. (2009), también reportó un comportamiento similar a los antes citados. Mediante su estudio experimental demostraron la eficacia de un consorcio bacteriano conformado por los géneros de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Acinetobacterlwoffi* en el tratamiento de un crudo de origen egipcio. El cultivo mixto logró una degradación de 88,5%. Mientras que por separado las bacterias evidenciaron una menor capacidad biodegradativa, pero con porcentajes igualmente destacables de degradación, a saber: *Pseudomonas aeruginosa* 77,8%; *Bacillus subtilis* 76,7% y *Acinetobacterlwoffi* 74,3%. Las fracciones degradadas fueron las de parafinas y de algunas fracciones pesadas, que se degradaron completamente, debido a que el porcentaje que constituían dentro de la composición del crudo era minoritaria.

Rahman et al. (2002) utilizó un consorcio bacteriano mixto conformados por 5 bacterias: *Micrococcus sp*., *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp*., *Flavobacterium sp*. y *Pseudomonas sp*. Éste cultivo mixto llevó a cabo una degradación a un máximo de 78 % para el petróleo crudo, después de 20 días de incubación.

Kumari et al. (2018) demostró que 4 géneros (5 especies) de bacterias (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Microbacterium steraromaticum*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas aeruginosa*) degradaron ampliamente múltiples hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) presentes en un petróleo crudo. Los HAP en la muestra de petróleo crudo obtenida de la refinería de petróleo Digboi, India, se estimaron en: naftaleno (10,0 mg L^{-1}), fluoreno (1.9 mg L^{-1}), fenantreno (3.5 mg L^{-1}) y benzo (b) fluoranteno (6.5 mg L^{-1}). La exposición de bacterias individuales al petróleo crudo mostró una alta tasa de biodegradación de HAP específicos por parte de *M. esteraromaticum*, 81,4% de naftaleno; *P. aeruginosa* 67,1% de fenantreno y 61% de benzo (b) fluoranteno; *S. maltophilia* 47,9% de fluoreno en 45 días. Sin embargo, al utilizar el consorcio de estas bacterias se obtuvo una mejor biodegradación: 89,1% de naftaleno; 63,8% de fluoreno; 81% de fenantreno y 72,8% de benzo (b) fluoranteno en el aceite crudo.

Así como los citados autores anteriormente, otros estudios más, como: Chatre et al. (1996) y Vasudevan et al. (2001) han descrito y observado la degradación por parte de consorcios bacterianos de fracciones saturadas y aromáticas presentes en petróleo crudo, entre 28% - 51% y 0% - 18%, respectivamente. Y una biotransformación mayor al 60% del crudo en sí.

Las ventajas de utilizar consorcios se pueden atribuir a los efectos producidos por las interacciones sinérgicas entre los miembros de la asociación microbiana (Jaques et al., 2008; Boopathy, 2000). Los mecanismos a través de los cuales las bacterias se benefician de las interacciones sinérgicas son complejos de describir, puesto que es posible que una especie elimine metabolitos tóxicos, los mismos que de algún modo podrían dificultar la actividad microbiana de especies que le precedieron a la especie degradadora. También es posible que una especie sea capaz de degradar compuestos que sus antecesoras no fueron capaces o que degradaron parcialmente (Alexander, 1999).

Todos estos resultados concuerdan con lo que proponen algunos autores, como Chayabutra, et al. (2000), Ghazali et al. (2004), Milić et al. (2009); la clave radica en que, mientras más variado en microorganismos sea el consorcio, mejores serán los resultados biodegradativos. Puesto que los cultivos bacterianos mixtos proporcionan un porcentaje de degradación mayor en comparación con la actividad degradativa que pueda realizar una cepa por sí sola. Esto se debe a que no existe de forma natural una sola cepa bacteriana con

la capacidad de metabolizar todos los componentes que se encuentren en un petróleo crudo (Venosa et al. 2001).

CAPÍTULO 3: TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDICIÓN

3. TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN

Las tecnologías enfocadas a la remediación de suelos se han desarrollado para dos tipos. Es así como esta técnica se puede llevar a cabo In-Situ, es decir, tratando el suelo en el sitio afectado por la contaminación. Mientras que el tratamiento Ex-Situ, requiere de la realización de excavación del suelo desde el lugar contaminado, para posteriormente darle tratamiento en un área externa a la zona afectada. El método que se aplique, responderá a las particularidades de cada sitio contaminado, además de considerar variables como el tipo y concentración de contaminante/s, características y extensión del área afectada y el costo económico (US EPA, 2006). Se debe destacar que este último, no debe ser un factor principal para determinar qué tipo de técnica de biorremediación que se aplicará en un sitio contaminado, puesto que se puede correr el riesgo de escoger una técnica que resulte ineficiente para el proceso de biorestauración (Azubuike et al., 2016). Para evitar estas situaciónes algunos estudios recomiendan que se deben realizar estudios preliminares para identificar las limitaciones y predecir como será el proceso de biorremediación. Y con ello, descartar aquellas tecnologías que resulten ser inapropiadas para la biorestauración de suelos contaminados (Aichberger et al., 2005).

Las tecnologías de remediación biológicas Ex-Situ requieren de menor tiempo que los tratamiento de biorremediación In Situ (FRTR, 2003).

Es importante mencionar que el tipo de proceso biorremediativo que se aplique será variable para cada situación y de cómo se presente el contaminante en el sitio (Moliterni, 2015).

3.1. BIORREMEDIACIÓN IN SITU

Según la USEPA (2006) existen dos tipos principales de biorremediación In-Situ: la intrínseca y mejorada. Tanto la remediación intrínseca, como la mejorada dependen de las degradaciones que ocurren naturalmente en el ecosistema.

Para asegurar la eficiencia de la biorremediación In-Situ es clave la realización de una evaluación de las condiciones del sitio, la biodisponibilidad de los contaminantes y la

evaluación de los factores abióticos limitantes, en caso de que sea necesaria alguna modificación durante el tratamiento (Menéndez et al., 2007).

Cuando se selecciona la biorremediación In-Situ como tratamiento, se debe tener en cuenta que se deben desarrollar actividades de vigilancia del sistema biorremediativo, para ir corroborando que por medio de la actividad biológica natural se están eliminando el/los contaminantes (US EPA, 2006).

Además, se debe tener en cuenta que la aplicación de este tipo de remediación generalmente requiere períodos de tiempo más largos. Sumando que hay menor certeza acerca de la uniformidad del tratamiento debido a la variabilidad en las características del suelo y también, la eficacia del proceso es más difícil de verificar (FRTR, 2003).

En regiones gobernadas por climas fríos los tratamientos In Situ se caracterizan por ser menos costosos económicamente, en comparación con otras opciones de remediación, pero los proceso de descontaminación llevan mayor tiempo (Raymond, T. et al., 2017).

Acá los componentes de alto peso molecular de los hidrocarburos, como los HAP, generalmente quedan en el sitio, debido a la recalcitrancia que estos poseen para los microorganismos alóctonos (FRTR, 2003).

3.1.1. Biorremediación intrínseca

El proceso se basa en la degradación de contaminantes de forma natural, sin la adición de enmiendas (nutrientes) o inóculos (microorganismos), que puedan cambiar las condiciones naturales del sitio afectado (US EPA, 2006). Así, bajo las condiciones favorables, la atenuación natural (AN) ocurrirá por sí sola, cuando los microorganismos nativos se vean expuestos a la presencia de una sustancia externa, proceso que ocurrirá de acuerdo a las interacciones físico-químicas y biológicas del suelo.

La biodegradación intrínseca, se puede dar de forma aeróbica y anaeróbica, ya que los microorganismos del suelo agotan el suministro disponible, según cada caso (Brown, L. D. et al., 2017). Los procesos naturales típicos que se dan durante la AN a parte de la biodegradación, incluyen: dilución, dispersión, absorción, volatilización, reacciones químicas (óxido-reducción), reacciones biológicas y estabilización (US EPA, 2006).

Además de la AN, se puede aplicar la atenuación natural monitoreada. Esta, requiere que se mantenga un seguimiento activo del proceso biodegradativo (US EPA, 2006). Esta agencia además agrega, que esta medida de seguimiento debería incluirse en

el plan de diseño de remediación de un sitio, puesto que en algunos casos, el control puede hacer más costoso el tratamiento.

La atenuación natural del contaminante por parte los microorganismos, depende según Forsyth et al. (1995) del tamaño de la población autóctona degradadora. Agnello et al. (2016) mostró 37% de degradación para petróleo, mediante el proceso de atenuación natural. Otros estudios, muestran tasas degradativas de 48% pasados 154 días de tratamiento. Esto demuestra que la población microbiana nativa es capaz de degradar hidrocarburos del petróleo en suelo, en un proceso que es muy lento, pero puede ser viable en el largo plazo (Farahat, et al. 2007), incluso en climas fríos (Margesin & Schinner, 2001). Otro estudio monitoreo por 4 años el proceso de AN de un sitio contamiando con hidrocarburos del petróleo, el proceso mostró una disminución casi del 60%. Además agrega que los principales mecanismos, por lo cuales ocurrió la degradación se identificaron como reducción de sulfato y metanogénesis (Lv et al., 2018).

3.1.2. Biorremediación mejorada

Con la finalidad de mejorar las tasas biodegradativas del proceso de atenuación natural, se aplican aditivos como el oxígeno u otros aceptores de electrones, además de nutrientes inorgánicos (bioestimulación) (BS), agentes de carga y/o agua (humedad) y cepas microbianas (bioaumentación) (BA), para mejorar la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas (FRTR, 2003). Todos estos factores están destinados a mejorar las condiciones existentes en el suelo para mejorar los resultados de la biorremediación (Brown, L. D., 2017).

La bioestimulación y la bioaumentación son distintas estrategias utilizadas para tratar los ambientes impactados. Sin embargo, ambos son consideradas como formas de biorremediación. Estas demuestran su efectividad en la remediación mediante atenuación natural mejorada (Okparanma et al., 2017).

Como se dijo anteriormente, la bioestimulación implica adición de nutrientes, como el nitrógeno, el fósforo y/o oxígeno (ver ítem n° 2.2.1.2. y 2.2.1.3) para estimular el crecimiento de la comunidad microbiana indígena y mejorar la proceso de biodegradación. Cuando el contaminante es poco soluble en agua, emulsionantes o agentes tensioactivos se añaden a menudo para mejorar la solubilidad y, por lo tanto, la degradación (Helmy et al., 2015; El-Mahdi et al., 2016).

Los microbios son los principales agentes de degradación de los contaminantes orgánicos del suelo. Por lo tanto, el aumento de la densidad y actividad, mediante la

bioestimulación de estos, puede acelerar la degradación de los contaminantes (Namkoong et al, 2002).

El proceso de bioestimulación puede ser exitoso con una exposición previa y prolongada de los microorganismos indígenas nativos al contaminante, lo que lleva a la selección de aquellos organismos degradadores que logran predominar y/o toleran en el contaminante (Trindade et al., 2005). Por lo tanto, la fase de retardo que se produce previo a la eliminación de contaminantes y el crecimiento microbiano se reducirían o eliminarían (El-Gendy y Farah, 2011; Soliman et al., 2014).

Estudios, como el de Sarkar et al. (2005) demuestra la bioestimulación, mediante la utilización de fertilizantes inorgánicos de liberación rápida ricos en N y P, y biosólidos esterilizados de liberación lenta, lo que agregó al sistema C, además de N y P. La experimentación mostró que después de 8 semanas de incubación, ambos métodos de bioestimulación degradaron aproximadamente el 96% de TPH. Otros demuestran que la bioestimulación mediante sustratos orgánicos, también resulta ser una opción efectiva entregando una buena cantidad de nutrientes al sistema biodegradativo, mejorando las tasas de remoción, además de ser económicamente viable (Ros et al., 2010; Agamuthu et al., 2013; Al-Kindi & Abed, 2016; Wang et al., 2016a; Wang et al., 2016b)

Sin embargo, en otras ocasiones la BS no resulta eficiente en la remoción de contaminantes como se espera. En este contexto Xu & Lu (2010) evidenció el rendimiento más bajo para BS (26%), en comparación con otros tratamientos. Los autores explican que posiblemente la nutrición o la aireación, fue el factor limitante de la degradación continua de los hidrocarburos de petróleo. En climas fríos, como en la Antártica la fertilización de suelos es la mejor opción para la remediación de derrames de petróleo, sin embargo las enmiendas de nutrientes deben realizarse en pequeñas dosis (Raymond, T. et al., 2017).

En ciertos casos, los microorganismos nativos pueden no estar biodisponibles en el suelo para degradar contaminantes (Speight & El-Gendy, 2018). Para superar esta barrera, el potencial de degradación de contaminantes puede ser incrementado a través de la bioaumentación.

La bioaumentación consiste en la adición de cultivos microbianos pre-cultivados para mejorar las poblaciones microbianas en un sitio para mejorar la limpieza de contaminantes y reducir el tiempo y el costo de la limpieza. Los microbios indígenas o nativos suelen estar presentes en cantidades muy pequeñas y es posible que no puedan evitar la propagación del contaminante. En algunos casos, los microbios nativos no tienen la capacidad de degradar un contaminante en particular. Por lo tanto, la bioaumentación ofrece una manera de proporcionar microbios específicos en cantidades suficientes para completar la biodegradación (Speight, 2017).

Que se realice una selección de los microorganismos apropiados para la inoculación, es un factor clave (Thompson et al., 2005), lo cual requiere el monitoreo de varias variables que pueden afectar el éxito del proceso de biorremediación, incluida la capacidad de degradación de contaminantes, competencia con microorganismos autóctonos, depredación por protozoos, pérdida de viabilidad microbiana, después de la inoculación (Mrozik & Seget, 2010; Tyagi et al., 2010). La exposición y aclimatación previa de los microbios a los contaminantes en los suelos mejoraría sus sistemas de enzimáticos, que son responsables de la biotransformación. Según Mrozik & Seget (2010) la eliminación más efectiva de contaminantes por medio de la BA se puede lograr mediante el uso de inoculantes microbianos aislados de ambientes donde se haya producido contaminación. Otros autores también concluyen lo mismo (Das & Mukherjee, 2007; Farahat & El-Gendy, 2007; Ali et al., 2012; El-Mahdi et al., 2016; Sarkar et al., 2017). Además para mejorar las tasas de biodegradación y accesibilidad de los contaminantes se deben preferir la inoculación de cepas de microorganismos productores de biosurfactantes (Gentry et al, 2004). Este tema se tratará en el ítem n° 4.

Otros estudios, como el de Agnello et al. (2016) han reportado 59% de degradación por parte de *Pseudomonas aeruginosa*, mediante solo BA. Mientras que la AN, degradó hasta un 37% de los hidrocarburos. Farahat et al. (2007), además realizó una degradación de petróleo para el tratamiento de suelos contaminados, mediante BA con un consorcio bacteriano de *Pseudomona aeruginosa* y *Brevibacterium casei*, con el cual, se obtuvo un potencial degradativo de 76%.

Poi et al (2017) realizó un estudio a escala de laboratorio, para luego hacer una prueba de campo. Los resultados de laboratorio indicaron la eficacia de un consorcio adaptado en términos de degradación de hidrocarburos de petróleo. Este cultivo mixto logró una degradación completa de los contaminantes después de 21 días. Luego en el estudio de campo, se experimentó con concentraciones de hidrocarburos de petróleo procesado de: 26.240; 622.657; y 978.399 mg Kg^{-1} en 250 toneladas de suelo. La concentración final fue de < 1000 mg Kg^{-1} , después del tratamiento de bioaumentación. Es interesante mencionar que, mediante un ensayo de fitotoxicidad, se observó una tasa de germinación del 100% de Brassica rapa en el campo para todos los lotes de suelo tratado, excepto en aquellos suelos más contaminados. Adicionalmente, se realizó un análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), 3 años después del primer tratamiento. Este nuevo análisis confirmó que el sitio mantuvo concentraciones bajas de TPH (7 – 35 mg Kg^{-1}) en todo el sitio.

Mishra et al. (2001) realizó un estudio a escala de campo en 4000 [m^2]. El sitio se encontraba contaminado con un lodo aceitoso. El tratamiento se llevó a cabo mediante el uso de un consorcio bacteriano degradador de hidrocarburos (BA) y con nutrientes (BS). En conjunto se degradó el 90.2% del TPH en 120 días, mientras que en el bloque de parcela

usado como control solo se degradó un 16.8% del TPH. Este estudio valida el uso a gran escala de un consorcio bacteriano y nutrientes para el tratamiento de tierras contaminadas con hidrocarburos. Suja et al., (2014) en su estudio también, evidenció las reducciones más significativas en las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos con la asociación entre BS y BA, mientras que la AN se mantuvo con rendimientos muy por debajo de los anteriores tratamientos. Varjani & Upasani (2019), también concluyó que mediante BS + BA las tasas degradativas son más altas y el proceso ocurre más rápido. Xu & Lu (2010) demostró que la BA junto con la aplicación de un agente de carga (polvo de cáscara de cacahuate) mejoran el rendimiento de la degradación (61%), en comparación con aplicación de la BA por sí sola (27%). Los autores atribuyen esta diferencia a la influencia que ejerció el agente de carga en el sistema, puesto que estas sustancias orgánicas pueden nutrir continuamente a los microorganismos del suelo durante la descomposición de la cáscara del maní, además de reducir la densidad del suelo contaminado, aumentar la porosidad, la difusión de oxígeno y nutrientes por la matriz suelo, para que luego ocurra la biorremediación.

A pesar de que se ha comprobado ampliamente la efectividad de la bioaumentación como una forma de degradar hidrocarburos, se han publicado estudios con resultados contradictorios en cuanto a la eficacia del método (Thomassin-Lacroix et al., 2002 ; Kauppi et al., 2011; Pacwa et al., 2016). Las razones de esto, según autores como Tyagi et al. (2011) y Gentry et al. (2004) radican en la incapacidad de los organismos inoculados a adaptarse a los cambios en las condiciones del nuevo medio, la competencia por nutrientes con los organismos autóctonos y depredación por parte de otros microorganismos, como: protozoos, tal como afirman estudios anteriormente citados.

Ciertos estudios proponen que una combinación entre técnicas biocorrectivas es una mejor alternativa para lograr un mayor porcentaje de degradación (Jiang et al., 2016; Safdari et al., 2018). Siguiendo con este punto de vista, otros estudios proponen que la aplicación de distintos procesos biológicos de restauración, también son una buena opción, por ejemplo, Agnello et al. (2016) logró una mayor degradación de petróleo combinando bioaumentación, utilizando la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, con asistencia de fitorremediación, por medio de *Medicago sativa* (alfalfa). Con esta técnica combinada se logró un 68% de degradación. Pizarro et al (2014) también apoya esta opción de tratamiento, mostrando en su estudio que mejores tasas de degradación se consiguen con la combinación de técnicas. Previamente, Segura & Ramos (2013), también concluyó lo mismo.

3.2. TÉCNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN IN SITU

Tecnologías como: Bioventing (US EPA, 1994c), ayudan a mejorar el proceso de biorremediación In Situ, haciendo que los tratamientos de bioestimulación y/o bioaumentación lleguen a la zona insaturada (vadosa) y saturada del suelo, para una biodegradación de contaminantes situados en dichas zonas (US EPA, 2006). Según Williams (s.f.) estas tecnologías sólo son viables de aplicar cuando el suelo tratado es homogéneo. En el caso de un suelo no homogéneo, lo mejor es considerar otro tipo de técnicas.

3.2.1. Bioventing

El bioventing o bioventilación es una técnica que implica la incorporación controlada de un flujo de aire, mediante inyección de oxígeno a la zona insaturada (vadosa) del suelo (US EPA, 1995), con el objetivo de aumentar la biodegradación microbiana aeróbica (US EPA, 2006), reduciendo la volatilización en el proceso (EPA US, 1995). La introducción de oxígeno se hace mediante el uso de pozos de inyección, por los cuales se empuja el aire, forzando el flujo de oxígeno a través del subsuelo (US EPA, 2006). Las tasas de flujo de aire utilizado son controladas y de esta forma se proporciona la cantidad de oxígeno necesaria para la ocurrencia de la biodegradación. Así mismo, se evita la emisión de gases contaminantes a la atmósfera a través de volatilización (FRTR, 2003). Este hecho fue confirmado por Sui & Li (2011), en cuyo estudio se simularon dos flujos diferentes de oxígeno. Con los cuales se concluyó que las tasas de inyección de aire se deben gestionar y optimizar de buena manera, puesto que se observaron tasas de volatilización mas bajas con una menor inyección de aire. Agregando que el aumento de la tasa de flujo de aire no puede aumentar la tasa de biodegradación ni hacer más efectiva la biotransformación de un contaminante. Según la US EPA (2006) otro factor a tener en cuenta, es el porcentaje de humedad de un suelo antes de proponer el bioventing como tecnología para asistir un proceso biorremediativo, puesto que un alto porcentaje de humedad supone una menor permeabilidad en el suelo, lo que dificulta la circulación apropiada del aire a través de él. Por otro lado, un contenido extremadamente bajo de humedad limita el proceso de biodegradación, afectando la funcionalidad y eficacia de esta tecnología (FRTR, 2003). La FRTR (2003) agrega que, la extensión de la contaminación también influye en cómo se aplica esta tecnología, este factor junto con el de permeabilidad, determinan la cantidad de pozos de inyección a utilizar en la descontaminación. Rayner et al. (2007) observó que

mediante la aplicación de una microbioventilación (uso de varias pequeñas varillas para la inyección de aire) se logra un resultado mucho más uniforme en la distribución del oxígeno, lo que significa un incremento significativo de la biodegradación.

El bioventing es una tecnología de medio a largo plazo, esto quiere decir que el proceso de biorestauración varía de unos pocos meses a varios años (FRTR, 2003). A pesar de ello, esta ha ganado popularidad en el tratamiento de suelos contaminados con petróleo (Höhener & Ponsin, 2014). Es así como se ha aplicado en la biodegradación de diferentes contaminantes, includo en aquellos considerados altamente persistentes, como los HAPs (Frutos et al., 2010). En este estudio a escala de laboratorio se llevó a cabo una remediación de suelos contaminados artificialmente con fenantreno, como representante de los HAPs. La mineralización del contaminante se llevó a cabo bajo una humedad del 60 % y con una relación C:N:P de 100:20:1. Bajo estas condiciones se logró la reducción de 93% del contaminante (concentración de 1026 mg/Kg de suelo a 74 mg/Kg de suelo) en un periodo de 7 meses.

Al utilizar el bioventing como tecnología en la asistencia de procesos biorremediativos, se debe tener en cuenta que el uso de tasa de flujo menos intensas y en intervalos de tiempo más extendidos, pueden resultar ser prácticas más beneficiosas, tanto para el proceso en sí, como para la viabilidad económica de su aplicación (Thomé et al., 2014).

3.3. BIORREMEDIACIÓN EX-SITU

Esta tecnología requiere que se excave la parte que se encuentra afectada por contaminantes, para que luego se traslade a una planta de tratamiento y proceder con la biorestauración. La biorremediación Ex-Situ, permite configurar y mantener un mayor control sobre los parámetros abióticos, que influencian la biodegradación y con ello, optimizar las tasas de descontaminación (Aislabie et al. 2006). Sin embargo factores climatológicos como la temperatura ambiente, lluvia, nieve y viento, no pueden ser manejados a gusto (US EPA, 1994a).

Para llevar a cabo un buen procedimiento, previamente se debe construir un sistema de revestimiento en la planta de tratamiento, con el objetivo de evitar un nuevo episodio de contaminación, por el movimiento del contaminante hacia el subsuelo. Además se deben incluir sistemas de control de escorrentía de aguas superficiales (US EPA, 1993).

Otros requisitos que se deben cubrir y como ya se mencionó en el párrafo anterior: mantener las condiciones ambientales adecuadas (Brown, D. M. et al., 2017), incluyendo la aplicación de humedad y nutrientes o aireación a través de sistemas de soplado o agitación mecánica, son parte de este procedimiento para asegurar su éxito. Todas estas consideraciones, no olvidando la remoción de los suelos contaminados del sitio afectado, vuelven más costosa este tipo de tecnología, en comparación con la In Situ (Pavel & Gavrilescu, 2008; Cristorean et al., 2016; Brown, L. D. et al. 2017). Aunque se debe considerar que con el tratamiento Ex Situ se obtiene remediaciones en menor tiempo que con los tratamientos in situ (Raymond, T. et al., 2017).

Este método se utiliza en función de: profundidad del contaminante, el grado de contaminación del área afectada, ubicación geográfica, las características del lugar y el costo económico.

Las tecnologías de tratamiento biológico Ex Situ incluyen: landfarming, biopiles, composting y bio-reactores (fase sólida-líquida) (US EPA, 2006). Algunas de estas tecnologías muestran grandes distinciones entre ellas a niveles tecnológicos, puesto que unas van desde la simple excavación y colocación de pilotes de suelos contaminados. A sistemas altamente controlados, tales como los bio-reactores industriales (Cristorean et al., 2016).

3.4. TECNOLOGÍAS BIORREMEDIACION EX-SITU

3.4.1. Landfarming

El cultivo en tierra (landfarming), tambíen conocido como tratamiento de tierra o aplicación de tierra, corresponde a la tecnología biorremediadora que implica la extensión de suelos contaminados sobre una capa fina de suelo no contaminado. Aquí el suelo contaminado es dispuesto a una altura aproximada de 0,3-0,45 m. Para luego estimular la actividad microbiana aeróbica dentro de los suelos a través de la aireación y/o la adición de nutrientes, además de mantener los niveles de humedad y pH apropiados para el proceso (US EPA, 2006). Todo el proceso se encuentra provisto de sistemas de revestimiento contra fugas y de monitoreos de irrigación y drenaje para posibles lixiviados (US EPA, 1993). El éxito de la aplicación de esta tecnología según dice Maila & Cloete (2004), dependerá de la

capacidad de controlar y configurar de buena manera las variables que condicionen la biodegradabilidad de los contaminantes.

En el landfarming, los hidrocarburos de petróleo más ligeros son eliminados principalmente de los suelos por medio de la volatilización y, en menor medida, por degradación microbiana (Hejazi, 2002; Hejazi et al., 2003). En cambio, los hidrocarburos más pesados son mayormente metabolizados por acción de los microorganismos degradadores (Khan et al., 2004). Como se puede ver, el rendimiento del tratamiento del suelo variará según los contaminantes a tratar. Según la US EPA (2006) aún se necesitan más estudios para contaminantes que son difíciles de metabolizar, tales como los HAPs, pesticidas o compuestos orgánicos clorados. Este tipo de contaminantes son temas de investigación y requieren pruebas de tratabilidad específicas, para verificar que el tratamiento puede alcanzar los resultados deseados. Sin embargo, se ha demostrado una buena eficiencia de degradación de HAP con landfarming (Silva-Castro et al., 2012; Brown, D. M. et al., 2017). Guerin (2000) mostró la eliminación de diferentes compuestos de HAP mediante landfarming con asistencia de compostaje. La eliminación de estos compuestos de alto peso molecular fue de al menos el 50% durante el período de tratamiento de 7 meses.

Como se puede ver, la eliminación de hidrocarburos del petróleo por medio de landfarming se ha aplicado en variadas ocasiones, con buenos índices de éxito (Al-Awadhi et al., 1996; Balba et al., 1998; Guarino et al., 2016). En Al-Awadhi et al. (1996) se estudió continuamente por 18 meses, en condiciones de suelo árido, como cambiaba la concentración de hidrocarburos (HAP). El resultado obtenido mostró que el tratamiento de landfarming resultó en una reducción de más del 80% de la contaminación por hidrocarburos en 15 meses. El tratamiento también resultó en una reducción sustancial de las concentraciones de HAP. Mientras que Guarino et al. (2016) contrastó el rendimiento de tres técnicas (NA-Landfarmig-Landframing c/bioaumentación), siendo el landfarming con asistencia de bioaumentación, la que resultó ser más eficiente, con 86% de degradación. Balba et al. (1998) también observó el rendimiento de diferentes tecnologías, comparando landfarming, compostaje en pilas y bioventing de pilas estáticas. Siendo el Landfarming, la técnica con mayor rendimiento en degradación de alcanos (90,5%) y de HTP (82%), durante 12 meses de experimentación.

Incluso se ha observado su aplicación en climas fríos y que, debido a los mínimos requerimiento de equipo resulta ser, por mucho, la opción de menor costo (Paudyn et al., 2008). Por tres años durante la época de verano, Paudyn et al. (2008) observó la eficiencia de la biorremediación mediante landfarming. Se establecieron cuatro parcelas: la primera parcela era el control y no tuvo otra acción que el muestreo. Dos parcelas fueron tratadas mediante el labrado de tierra, para proveer de aire (oxígeno) al sistema. La segunda parcela

se labró todos los días, mientras que la tercera recibió tratamiento de labrado cada cuatro días. La cuarta y última parcela, fue fertilizada con productos agrícolas, con nutrientes de nitrógeno (N) (urea) y fósforo (P) (fosfato diamónico) (DAP). Y además, se mantuvo un régimen de aireación cada cuatro días. En cuanto a las características del suelo (todas las parcelas), este se conformaba principalmente de arena y grava, con sólo un 10% de partículas más finas que 75 μM, pH de 5,8 y 1,1% de materia orgánica. La parcela que mostró los mejores resultados fue la cuarta (fertilizante + aireado cada 4 días), en esta, el nivel de $ppm_{inicial}$ era de 2800 y descendió a 200 ppm_{final}. Representando una disminución en los niveles de TPH de más del 90%. En cuanto a las otras parcelas, la que fue aireada diariamente y la aireada cada 4 días mostraron pérdidas superiores al 80% en la concentración de ppm (2800 $ppm_{inicial}$)

El estudio concluye que en este caso, la adición de nutrientes dio lugar a una biorremediación activa y a que las reacciones metabolizadoras ocurrieran a mayor velocidad, mejorando las tasas en la eliminación del contaminante. Resultado que fue apoyado por el régimen de labrado.

Si bien el landfarming es considerado la mayor parte del tiempo como una tecnología ex situ, existen ocasiones en que se aplica in situ, todo dependerá de la profundidad a la que se encuentre el contaminante. La US EPA (1994a) dice que cuando el contaminante se encuentra a menos de 1 m de profundidad del suelo, la biorremediación por landfarming puede realizarse sin excavación, es decir In Situ. Mientras que si el contaminante se encuentra a más de 1.5 de profundidad del suelo, entonces se debe excavar y ser trasladado a una planta de tratamiento para una biorremediación eficiente.

Existen a disposición documentos que apoyan, en la evaluación de la posible aplicación de esta tecnología de remediación en suelos, incluyendo ventajas y desventajas para este método (US EPA, 1993; Huesemann, 1994; US EPA, 1994a; FSCAP, 2006).

3.4.2. Biopiles

Los biopilotes (Biopiles) de suelo, también conocidos como biocélulas, es una técnica de biodegradación utilizada para la remediación de suelo. Ésta implica la mezcla de suelos contaminados (excavados) con enmiendas de suelo. El material a tratar se va colocando en múltiples montones, en forma de “pila”. Para así poder estimular la actividad microbiana aeróbica dentro de los suelos a través de la aireación y/o adición de nutrientes y humedad, apropiados. En el área de tratamiento se incluye un revestimiento impermeable, para evitar la filtración de los lixiviados y del mismo contaminante, además, un sistema de

aireación (US EPA, 2006). Este sistema de aireación, corresponde a tuberías; los biopilotes, los cuales suelen tener una longitud de 2 a 3 metros. Con ellos se realiza la aireación una vez que el suelo ya esté ordenado en biopilas estáticas. Este conjunto de tuberías ranuradas o perforadas van dispuestas a lo largo y por debajo o dentro de la pila o "biopila". La aireación al sistema ocurre por medio de la inyección o extracción que fuerza la circulación de aire por el sistema (US EPA, 1994b). Según, Baldan et al. (2015), mantener un buen sistema en términos de aireación y/o adición de minerales, nutrientes y humedad, estimula eficazmente la actividad aeróbica de las poblaciones microbianas, mejorando la biodegradación de compuestos del petróleo. En el estudio de Chemlal et al. (2013) es coincidente con el anteriormente citado. De hecho, Chemlal et al (2013) observó un 85% de degradación después de 76 días, al principio para compuestos simples de las fracciones alifáticas y aromáticas, para luego ver degradación en compuestos más complejos de ambas fracciones.

Además el suelo se suele mezclar con un agente de carga (bulking agent) o de "amontonamiento", como lo es la paja, aserrín, desechos vegetales y hasta estiércol (US EPA, 1994b), que resulta en un mejoramiento del rendimiento de las biopilas (Ma et al., 2016), puesto se mejora aún más el flujo de airea a través del suelo y, por lo tanto, se favorece el crecimiento de la población microbiana degradadora (Pavel & Gavrilescu, 2008).

Según la US EPA (1994b) las biopilas, al igual que el landfarming, son eficaces para reducir concentraciones de casi todos los componentes de los productos petrolíferos. Siendo las fracciones volátiles, las de más fácil eliminación. Mientras que las fracciones más pesadas, se metabolizan mediante biodegradación y con mayor tiempo de tratamiento. Whelan et al. (2015) a reportado un comportamiento similar.

También se ha observado la exitosa eficiencia de las biopilas en climas fríos (Kim et al., 2018). En donde éstas, además de utilizarse en combinación con bioaumentación y bioestimulación como: adición de nutrientes, aireación (Martínez et al., 2017), se les ha aplicado calor en forma activa (Filler et al, 2001) y pasiva (Coulon et al., 2010), mediante el uso de cubiertas de plástico para cubrir las biocélulas.

Según Filler et al. (2001) el suministro de calentamiento al tratamiento bioremediativo, mediante un sistema de aislamiento térmico (thermal insulation system) (TIS) incorporado en el diseño de la biopila aumenta la bioactividad y la disponibilidad de contaminantes (incluso con temperaturas de invierno), por consiguiente se mejoran las tasas de mineralización de hidrocarburos. Sanscartier et al. (2009) también informó de la efectividad de la aplicación de calor activo en biopilas. Este mismo estudio además examinó el efecto de la humidificación del aire en la degradación de hidrocarburos. El

sistema de humidificado mantuvo el contenido óptimo de humedad del suelo y produjo un TPH final significativamente más bajo que los otros dos tratamientos desarrollados en el estudio. Los hallazgos sugieren que la humidificación del aire mejora la biodegradación, pero minimiza la eliminación de fracciones volátiles, por medio de la volatilización. Es por esto que la biodegradación fue dominante en la fracción de peso molecular más alto.

Algunos estudios, como el de Chemlal et al. (2012) sugieren que mejores resultados pueden ser obtenidos mediante el cometabolismo, en donde la sinergia mostrada por diferentes microorganismos, pueden mejorar significativamente la eliminación de contaminantes.

Una serie de documentos apoyan la evaluación y la construcción de este tipo de tratamiento, proporcionando una visión general de la tecnología de las biocélulas y detallando todos aquellos factores que pueden influenciar el tratamiento (US EPA, 1994b; Battelle Environmental Restoration Department, 1996)

3.4.3. Composting

El compostaje (composting) es un proceso biológico controlado que trata contaminantes orgánicos utilizando microorganismos para su biodegradación (US EPA, 2006). El suelo contaminado se excava y se mezcla con agentes de carga, como: astillas de madera, paja, heno. Y enmiendas orgánicas como: estiércol y desechos vegetativos. Es así como el compost impacta positivamente en la mejora del suelo, puesto que es capaz de cambiar el pH, el contenido de humedad, es una buena fuente de nutrientes, configura la estructura del suelo, mejorando así la ambiente general en el suelo contaminado, para que luego se produzca la actividad degradante, por parte de microorganismos alóctonos o introducidos (Semple et al., 2001).

La selección adecuada de las enmiendas garantiza una porosidad adecuada en el suelo y proporciona un equilibrio de carbono y nitrógeno para promover la actividad termofílica y microbiana (FRTR, 2003). La actividad y comunidad microbiana aumentan significativamente, debido a una mayor actividad de ciertas enzimas que participan en el proceso de metabolización de hidrocarburos (Scelza et al., 2007), incluso en contaminantes complejos, como los HAPs (Kästner et al., 1995; Kästner & Mahros, 1996; Antizar-Ladislao et al., 2005; Scelza et al., 2007; Wu et al., 2013).

Las enmiendas se deben aplicar en óptimas cantidades, puesto que un exceso de ellas, puede afectar la degradación de HTP, tal como documenta Wang et al. (2011). Estudio en que se utilizaron diferentes biopilas, en las cuales se aplicó paja de maíz y

astillas de madera de pino, como agentes de carga. Con los cuales se suministró recursos de carbono fácilmente disponibles para sostener el crecimiento de microorganismos degradantes, pero se observó una reducción de la tasa de degradación de la HPT. Previamente Jørgensen et al. (2000) también mostró altas tasas de degradación por medio de la aplicación de astillas de corteza, como medio de carga.

Liu et al. (2018), también comprobó que la adición de enmiendas (residuos viejos de vertederos) resulta ser un agente de bioestimulación y un agente microbiano, que logra optimizar la degradación de HTP. En este caso, la enmienda a los residuos envejecidos aumentó la tasa de eliminación de HTP de 22,40% a 89,83%.

En cuanto a fracciones alifáticas, también se ha mostrado contundentemente la eficiencia del composting en el tratamiento de este tipo de compuestos (Namkoong et al., 2002; Wang et al., 2011). Estos estudios concuerdan en que estas fracciones resultan ser las de más fácil biodegradación.

La materia orgánica del compostaje ofrece el beneficio de mejorar la calidad y fertilidad del suelo (Pedra et al., 2007). Además la degradación de los agentes de carga generan calor dentro del sistema remediativo, creando condiciones termófilas, que resultan ser favorables para la biorremediación (US EPA, 2006). Una relación aconsejable entre tierra y compost es de 75% de suelo contaminado y 25% de compost. Pero, como todas las relaciones que se han mencionado anteriormente, ésta también es variable y corresponderá según el tipo de suelo, concentración de contaminantes y otras características (Pavel & Gavrilescu, 2008; Namkoong et al., 2002; Antizar-Ladislao et al., 2005).

Este tratamiento puede ocurrir, tanto en condiciones aerobias, como anaerobias (FRTR, 2003)

Segun la US EPA (2006), existen tres diseños comúnmente aplicados para el compostaje:

1. Pilotes estáticos aireados (Aerated static piles) - El compost se forma en pilotes y se airea con sopladores o bombas de vacío. Puede necesitar medidas alternas para la emisión de COVs. En cuanto a requerimientos económicos se encuentra en un rango medio.

2. Compostaje en contenedor con agitación mecánica (Mechanically agitated in-vessel composting) - Compostaje se coloca en un contenedor o reactor. Lugar donde se mezcla y airea. Este tipo de tratamiento logra controlar la emisión de COVs, pero resulta ser una opción más cara.

3. Compostaje en hileras (Windrow composting)- El compost se coloca en hileras largas, pilas bajas y estrechas (por ejemplo, hileras) y periódicamente mezclado con maquinaria pesada. El giro periódico del suelo contaminado, mejora las tasas de biodegradación. Este tipo de composting es el más rentable

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento mediante windrow produce emisiones de metano (CH_4) (US EPA, 2006). Según explica Hobson et al. (2005), debido a la naturaleza de este tratamiento, en donde el suelo se tiende a compactar en las profundidades y con ello se reduce el flujo de aire, se desarrollan zonas anaerobias dentro del suelo apilado. Por consiguiente, la producción de metano (CH_4) producto de la mineralización de compuestos de hidrocarburos, es inevitable. Este dato toma relevancia cuando existen normativas medio ambientales que, regulan las emisiones de COVs y GEIs en un territorio determinado.

Coulon et al. (2010) en su estudio puso en contraste la eficiencia de las biopilas y el windrow (hileras), en la eliminación de hidrocarburos. En general, los tratamientos de windrow superaron a los tratamientos de biopilas. La degradación de las fracciones alifáticas y aromáticas en las hileras fue de 6 y 4 veces mayor, respectivamente, que en el tratamiento de biopilas después de 6 semanas de tratamiento, para las mismas fracciones de hidrocarburos. Por otro lado, la adición de nutrientes y la inoculación en el tratamiento de windrow, resultó en un aumento de 2 veces mayor en la tasa de degradación de la fracción alifática. Mientras que en la fracción aromática no se observaron cambios significativos por la asistencia de estos tratamientos (bioestimulación-bioaumentación). Además el estudio concluyó que el windrow era más eficiente en la remoción de contaminantes en suelos más texturizados (friables), mientras que para suelos de textura más gruesa; las biopilas figuraban como el tratamiento más idóneo.

Al-Daher et al. (1998) evaluaron el uso de windrow (hilera) giradas a una escala piloto en el desierto de Kuwait. Se observó que el promedio de degradación para los HTP fue del 60%. Mientras que la fracción de HAP mostró una degradación de 55%.

Este mismo estudio, además identificó que, el contenido de humedad influenció significativamente la actividad microbiana en el proceso de remediación. Esto se observó durante los meses de verano (3 meses), en donde se optó por cubrir con plástico una de las hileras estudiadas y mientras que la otra, se dejó sin protección. Como consecuencia se vió un aumento del 19,3% en la degradación de HTP, en la hilera cubierta, en comparación con la hilera no cubierta, puesto que el contenido de humedad aumento de un 3% a 12% en la primera.

Además Al-Daher et al. (1998), mostró que la inoculación de un cultivo mixto (no identificado) a los tres meses de iniciado el proceso biorremediativo, no tuvo efecto en la

actividad degradadora de los hidrocarburos. Según el estudio, esto puede deberse a que ya existían microorganismos indígenas adecuados en el suelo para la degradación de hidrocarburos, como ya se ha mencionado por otros autores citados en esta revisión.

Se dice que el compostaje o la adición de compost hoy en día, es uno de los métodos más rentables a la hora de remediar suelos, debido a que mediante esta práctica se mejora simultáneamente, el contenido de materia orgánica presente en el suelo y, su fertilidad. Viéndose beneficiado el proceso de biorremediación (Chen et al., 2015). Incluso se ha demostrado su eficiencia en la degradación de hidrocarburos con presencia de metales pesados (Adams et al., 2017). Su implementación en conjunto con otras técnicas, también han mostrado resultados satisfactorios en la limpieza de suelos (Gómez & Sartaj, 2014)

Alguno estudios sugieren que las interacciones del composting con otro tipo de tratamientos, como por ejemplo planta (fitorremediación)-microbio, pueden proveer resultados más eficientes a la hora de restaurar un medio contaminado con complejos contaminantes (Wang et al., 20011; Hussainet al., 2018). Wang et al., (2011) agrega que, especies vegetales de fuerte sistema radicular y de comunidad microbiana activa, son las mejores opciones al momento de asistir un previo tratamiento de biodegradación.

3.4.4. Bio-Reactores (Slurry Bioreactors)

Los biorreactores se utilizan para suelos, sedimentos y lodos, y otros residuos sólidos o semisólidos. El material a tratar se examina primeramente, para asegurar que no hayan escombros o piedras de gran tamaño (US EPA, 2006; FRTR, 2003). Es importante mencionar que tanto desde un punto de vista medioambiental y económico, las fracciones finas del suelo, por ejemplo < 2 mm, como limos y arcillas finas, son las mejores candidatas para ser remediadas mediante bio-reactores. Puesto que, los compuestos orgánicos hidrófobos, como lo son los compuestos del petróleo, se concentran mayormente en las partículas finas del suelo, en donde tienen poca movilidad. Y por otro lado, las partículas más grandes y pesadas, resultan ser difíciles de mantener en suspensión, pudiendo volver más costoso el proceso (Pino et al., 2017).

Posteriormente, el tratamiento continúa con la mezcla del suelo y agua , luego se espera a que los sólidos queden suspendidos en la fase líquida. La concentración estará predeterminada por la concentración de los contaminantes, la velocidad de biodegradación y la naturaleza física de los suelos. Los sólidos se mantienen en suspensión dentro del reactor y allí, se van mezclando con nutrientes y oxígeno. También se pueden agregar agentes para la regulación de parámetros, como el pH, realizar bioaumentación en caso de

que no exista una población microbiana idónea para la degradación (US EPA, 2006; FRTR, 2003). El material dentro del reactor se mezcla por medio de acción mecánica y neumática, preferentemente. Esto intensifica la turbulencia y así se aumentan las tasas de transferencia de masa, además de homogeneizar los lodos y con ello, aumentando la aireación del sistema. Estas operaciones principalmente funcionan en lotes o semi-continuo (SBR). Puesto que tiene buenas tasas de eficiencia, ofreciendo al mismo tiempo una alta flexibilidad al momento de adaptar el proceso a las características de los compuestos que se van a tratar (Chiavola et al., 2010). Además este tipo de operabilidad lleva a ahorros significativos en los gastos de energía, aunque la intensidad de la mezcla es menor (Robles et al., 2008). Sin embargo, la operación en modo continuo también es posible, aunque poco común. Esto podría deberse a una menor eficiencia de eliminación de contaminantes demostrada en algunos casos, en comparación con el funcionamiento por lotes (Cassidy et al., 2000).

Cuando se completa la biodegradación mediante bio-reactores, la suspensión del suelo se deshidrata. Los dispositivos de deshidratación que se pueden usar incluyen clarificadores, filtros de presión, filtros de vacío, lechos de secado con arena o centrifugadoras (US EPA, 2006; FRTR, 2003).

Esta tecnología se puede aplicar tanto en condiciones aerobias (Zappi et al., 1996; Jee et al., 1998; Mozo et al., 2012), como en anaerobias (Mohan et al., 2009). Aunque esta vía se evita la mayoría de las veces, debido a la emanación de GEIs a la atmósfera. Sin embargo puede darse la situación en que, se tome con una ventaja realizar la remediación por vías anaerobias, asociándolo a un ahorro de la aireación, tanto la inversión como los costos operativos de esta (Boopathy, 2003). A pesar de esto, la vía aerobia es la predominante en los tratamientos biorremediativos.

Al igual como ocurre en otro tipo de tratamientos biológicos, la emanación de COVs del proceso por medio de bio-reactores se busca eliminar, por los perjuicios que este tipo de gases puedan significar en ecosistemas y calidad de salud humana. Mozo et al. (2012) afirma que, la optimización del caudal de aire debe realizarse, para así lograr satisfacer la demanda de oxígeno en el sistema degradativo y con ello, minimizar la volatilización dentro del reactor (en este caso un SBR) eliminación de COVs. Finalmente, se encontró que la estrategia de alimentación de oxígeno era el parámetro operativo más influyente, y que este debe ajustarse para mejorar la biodegradación de COV y limitar su volatilización en el tratamiento con bioreactores.

Este tipo de tecnología se usa bastante en la degradación de compuestos complejos del petróleo, tal como los HAPs. Mediante este tratamiento se logran mejores y más rápidas tasas de eliminación, tal como reportan Chiavola et al (2010), que durante su estudio

apreció que, los compuestos de tres anillos, como el fluoreno, se caracterizaron por tasas de remoción más altas, con valores muy por encima de 90%. Por otro lado, se obtuvo un rendimiento ligeramente inferior a los anteriores en los HAPs pertenecientes a la clase de 4 anillos, con mayor eficiencia de remoción para el pireno que para el criseno, este último sólo se biodegradó parcialmente. En el estudio se concluye, que el número de anillos de los HAPs se correlaciona con el nivel de biodegradabilidad. Este mismo comportamiento ya había sido observado por Giordano et al. (2005), en cuyo estudio la eficiencia en remoción de compuestos de HAPs también estuvo en función de la cantidad de anillos de estas estructuras químicas. A saber, se observó una eficiencia de remoción del 70% para HAPs de dos y tres anillos. Mientras que, para los HAPs de cuatro anillos se observó un resultado muy cercano al anterior, de 64%. Por último, los HAP con 5-6 anillos, que eran la fracción principal, mostraron la más baja remoción; cerca del 43%. Zappi et al (1996), también muestra resultados similares a estos estudios.

En el estudio de Jee et al. (1998) se observó la biorremediación de sedimentos contaminados con fenantreno. Se investigó la influencia de diferentes cargas de sólido/sedimentos y condiciones de mezcla en el transcurso del tiempo del proceso. En condiciones bien mezcladas, el fenantreno se eliminó en un 25% a 40% durante los primeros días de tratamiento, mostrando una notable disminución en la actividad degradadora del 3° al 5º día. En sistemas sin mezclar, el grado de mineralización fue notablemente menor en comparación con el primer caso, variando de 5% a 20%. Dean-Ross (2005) también observó la eficiencia sobre HAPs (fenantreno, antraceno, pireno y fluoranteno) en sedimento prístino. La descontaminación ocurrió de 6 a 8 días de tratamiento. Además, se asistió el proceso con bioaumentación con la especie *Rhodococcus sp*., lo cual dió lugar a mayor rendimiento en la biorremediación.

Como se puede ver, el tratamiento biológico en fase de lodo ofrece varias ventajas con respecto a otras tecnologías de biorremediación convencionales. Mediante el tratamiento biológico en fase de suspensión se pueden lograr mayores tasas de degradación, mayores eficiencias en el tratamiento, se tiene mayor control sobre las condiciones ambientales y de operación. Sin dejar de mencionar que los requisitos de área para realizar el tratamiento son más pequeños. En cuanto a los costos, estos son comparables a otras tecnologías de remediación (Woodhull et al., 1994; Robles et al., 2008).

En todas las tecnologías y técnicas de biorestauración tratadas; la recalcitrancia que muestran los componentes policíclicos del petróleo, debido a su hidrofobicidad, ve reducida considerablemente su biodisponibilidad en suelos contaminados, lo que limita su biorremediación. Esta situación puede cambiarse a conveniencia, mediante el uso de

sustancias que facilitan el uso de contaminantes como fuente de energía por parte de los microorganismos. Agentes naturales, como los biosurfactantes, logran mejorar significativamente la biorremediación de sustancias altamente complejas (Fava et al., 2004). Das & Kumar (2017) demostró que el tratamiento en bio-reactor utilizando residuos agroindustriales (cáscara de papa en polvo) (agente de carga) y biosurfactante producido por una bacteria (*Bacillus licheniformis* J1) con la capacidad de utilizar el petróleo como fuente de carbono puede ser de manera efectiva y comercial para la restauración de sitios contaminados con petróleo.

El tema de biosurfactantes, su influencia y aplicación en procedimientos de biorremediación de suelos contaminados, se discutirá en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 4: BIOSURFACTANTES

4. BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes son pequeñas moléculas, con un extremo hidrofílico (aminoácidos, péptidos, mono-/disacáridos, y/o polisacáridos) y el otro hidrófobo (ácidos grasos saturados y/o insaturados), es decir son anfifílicos (Lang, 2002). Estas moléculas anfifílicas ayudan a (1) reducir la tensión superficial interfacial, puesto que se acumulan en medio de dos fluidos con características polares diferentes y con ello, permitiendo la interacción y combinación de las sustancias hidrofóbicas con los microorganismos, por el (2) enriquecimiento de las interfaces y (3) formación de micelas (Neu, 1996; Volkering et al., 1997; Vijayakumar & Saravanan, 2015; Effendi et al., 2018).

La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo puede verse limitada por la biodisponibilidad de los contaminantes a la acción de los microorganismos del suelo (Bustamante et al., 2012; Fernández et al., 2011). Esta biodisponibilidad se encuentra relacionada con la hidrofobicidad y por la capacidad de desorción o solubilización del contaminante (Semple et al., 2003). La adición de biosurfactantes puede cambiar esto, mejorando significativamente la eficiencia de la biodegradación en la remediación biológica de suelos (Effendi et al, 2018), tanto en condiciones aerobias, como en anaerobias (Nzila, 2018). Es importante mencionar que, para propósitos biorremediativos, sólo se deben usar surfactantes que sean completamente biodegradables (Martienssen & Schirmer, 2007).

Los biosurfactantes de bajo y alto peso molecular (Ron & Rosenberg, 2001) son de gran interés debido a sus variadas propiedades fisicoquímicas y biológicas, ya que estas pueden explotarse en diferentes industrias (petróleo, alimentos, cosmética y farmacéutica) (Lang, 2002). El uso industrial de estos agentes tensioactivos (o emulsionantes), significa una opción atractiva debido a su versatilidad, biodegradabilidad, seguridad ecológica y aceptación ambiental. Sin embargo, su alto costo de producción limita su uso en los procesos de biorremediación a gran escala (Bustamante et al., 2012). Variados son los estudios que han revisado el empleo de estos agentes anfipáticos a nivel industrial, además entregando información de propiedades y características bioquímicas y físicas de estos. Y con ello, proponiendo surfactantes de base biológica para el mejoramiento de tratamientos biológicos, en la restauración de ecosistemas (Desai & Banat, 1997; Mulligan et al., 2009; Bustamante et al., 2012; Silva et al., 2014; Souza et al, 2014; Karlapudi et al., 2018; Akbari et al., 2018).

Dhote et al. (2009) y Verma et al. (2006) son algunos de los estudios que han informado de reducciones en la tensión superficial gracias a la presencia de biosurfactante.

Dhote et al (2009) observó una disminución de 42 a 30 mN m^{-1} y de 51 a 34 mN m^{-1}, así como índices de emulsión de 46% y 57% para dos bacterias aisladas de lodos oleosos petroquímicos. Las bacterias que se utilizaron fueron identificadas como *Bacillus sp.* (Chry2) y *Pseudomonas sp*. (Chry3). Estas bacterias crecieron en presencia de criseno como única fuente de carbono. Mientras que Verma et al. (2006) informó que las bacterias identificadas como *Bacillus sp*. SV9, *Pseudomonas sp*. SV17 y *Acinetobacter sp*. SV4, las cuales fueron aisladas de un suelo contaminado con lodo aceitoso, fueron capaces de reducir la tensión superficial en 59%, 51% y 32%, respectivamente, después de 5 días. Estos valores coincidieron con la máxima producción de biosurfactante. Las bacterias crecieron en un medio de cultivo mineral que contenía 1% de lodo aceitoso como única fuente de carbono. *Bacillus sp*. SV9 fue la bacteria con mayor rendimiento en la degradación de hidrocarburos, coincidiendo con el momento en que se registró la mayor producción de biosurfactante.

Según Ron & Rosenberg (2001) los biosurfactantes de bajo peso molecular; los glicolípidos, tales como: rhamnolipid, trehalolípido, sophorolipid o lipopéptidos, son los que poseen las características para disminuir la tensión superficial en fase de sólidos o sólido-líquido. Puesto que los biosurfactantes con mayor peso molecular son altamente eficientes para la estabilización de emulsiones de aceite en condiciones acuáticas.

Effendi et al. (2018) agrega que, el biosurfactante tipo glicolípido corresponde al más común. Los glicolípidos son una combinación de carbohidratos que tienen una cadena larga de ácidos alifáticos o ácido hidroxi alifático. De este tipo de biosurfactante, los ramnolípidos son considerados como la clase de biosurfactantes más prometedora en términos de producción industrial, debido a sus características físico-químicas, alta productividad y el amplio conocimiento con respecto a ellos y su producción (Lang & Wullbrandt, 1999; Müller et al. 2012; Paulino et al., 2016).

La diversidad de organismos biológicos productores de biosurfactantes es variada. Se considera que las especies de *Pseudomonas* son las principales fuentes de ramnolípidos, y se considera que *P. aeruginosa* es la principal especie productora. Algunos estudios referente a este género se citan a continuación, Maier & Soberón (2000), Abdel-Mawgoud et al. (2008), Pornsunthorntawee et al. (2008), Guo et al. (2009), Li et al (2011).

Otras especies de *Pseudomonas* que producen ramnolípidos: *Pseudomonas chlororaphis* (Gunther et al., 2005; Gunther et al., 2006), *Pseudomona putida* y Pseudomona *luteola* (Onbasli & Aslim, 2009).

Sin embargo, se han realizado muchos aislamientos de otras especies bacterianas de diferentes clasificación taxonómica y que son productores de ramnolípidos. El género *Bacillus* también posee cepas productoras de estos agentes: *Bacillus methylotrophicus*

(Chandankere et al., 2014), *Bacillus subtilis* (Bezza & Chirwa, 2015), *Bacillus brevis* (Mouafi, 2016), *Bacillus licheniformis* (El-Sheshtawy et al., 2016).

Otros: *Rhodococcus sp.* (Pi et al., 2017), *Burkholderia sp*. (Mohammed et al., 2018), *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia thailandensis* (Toribio et al., 2010) *Acinetobacter calcoaceticus, Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Pantoea stewartii* (Rooney et al., 2009), *Gordonia* (Franzetti et al., 2008) *Pseudoxanthomonas* sp. (Nayak et al., 2009), *Pantoea sp.* (Vasileva y Gesheva, 2007), *Ochrobactrum anthropi* y *Citrobacter freundii* (Ibrahim, 2018), *Serratia marcescens* (Budsabun, 2015).

El efecto de mejora de la adición de biosurfactante en el sistema biodegradativo, se ha comprobado ya por variados estudios. Por ejemplo Morán et al. (2000) observó que la biodegradación de hidrocarburos alifáticos aumentó de 20,9% a 35,5% y en el caso de hidrocarburos aromáticos de 0% a 41%, en comparación con un cultivo sin biosurfactante. En el caso de Rahman et al. (2003), La mejora de la biodegradación se logró a través de la bioaumentación (consorcio bacteriano) y la bioestimulación (solución de NPK). Además se agregó un biosurfactante de ramnolípidos (RL). La máxima degradación se logró después del día 56 para componentes de n-alcanos en el rango de nC_8- nC_{11} , los cuales fueron degradados al 100%. Mientras que el resto de los componentes n-alcanos se degradaron: nC_{12}- nC_{21} (83–98%), nC_{22}- nC_{31} (80–85%) y nC_{32}- nC_{40} (57–73%). Ferradji et al. (2014), observó la degradación de n-alcanos de C_{11} a C_{30} presente en un petróleo crudo mediante el uso de tres cepas de *Streptomyces ssp.* (AB1, AH4 y AM2). La fracción alifática presente en el crudo se degradó completamente (AB1). Mientras que la cepa AH4 degradó el 92,34% de C_{28}. La cepa AM2 tuvo un menor rendimiento, degradando sólo el 40,4% de C_{16}. Todas estas tasas degradativas se obtuvieron después de 30 días. Para la naftalina, se obtuvieron resultados de 82,36%; 85,23% y 81,03% para AB1, AH4 y AM2 respectivamente, después de 12 días de incubación. Liu et al. (2016) utilizó la cepa cepa de *bacillus licheniformis* Y-1, la cual produjo un emplasto que intensificó el efecto emulsionante, mostrando una tasa de degradación del petróleo crudo (compuestos alcanos de cadena corta y cadena larga) de 60,2% en solo 5 días. Esta cepa también mostró una fuerte tolerancia a la alta salinidad, alcalinidad y temperatura.

El estudio de Kumari et al. (2018) anteriormente mencionado (ítem n° 2.5.1.), las 5 especies de bacterias utilizadas (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Microbacterium steraromaticum*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas aeruginosa*), mejoraron sus tasas de biodegradación hasta en un 10% más, con la adición de 40 μmL^{-1} de biosurfactante ramnolípido JBR-425.

Debido a que la aplicación de estos agentes anfipáticos se ha estudiado contundentemente, en la tabla 4-1 se muestran y se da referencia a una serie de estudios realizados por varios científicos con respecto a los biosurfactantes, sus microorganismos de origen y los hidrocarburos del petróleo en los que se han puesto a prueba, durante el proceso de degradación biológica de contaminantes.

Tabla 4-1: Hidrocarburos y bacterias productoras de biosurfactantes.

CONTAMINANTES	AGENTE MICROBIANO DEGRADADOR	BIOSURFACTANTE	REFERENCIA
Hidrocarburo del petróleo			
Petróleo	*Lactobacillus delbrueckii*	Glicolipido	Thavasi et al. (2011)
	Cultivo mixto	Ramnolipido	Abalos et al. (2004)
	Pseudomonas aeruginosa	Ramnolipido	Benincasa (2007)
Petróleo, Naftaleno, Hexadecano y Pristano	Microflora indígena del suelo	Soporolipido	Kang et al (2010)
Lodos	*Pseudomonas aeruginosa* y *Rhodococcus sp .*	Ramnolipido	Cameotra & Singh (2008)
Biodiesel y gasóleo	*Burkholderia sp .*	Ramnolipido	Mohammed et al. (2018)
	Cultivo mixto	Ramnolipido	Owsianiak et al. (2009)
Gasóleo	Microflora indígena del suelo	Surfactina	Whang et al. (2008)
BTEX (Benceno-Tolueno-Xileno)	*Ralstonia picketti* (BP-20) y *Alcaligenes piechaudii* (CZOR L-1B)	3-Hidroxi ácido graso	Płaza et al. (2007)
HAPs	Microflora de lodos	Ramnolipido	Sponza & Gok (2011)
	Cultivo mixto + Alfalfa	Ramnolipido	Zhang et al. (2010)
Fenantreno	*Bacillus subtilis* BS1	Lipopéptido	Xiao et al. (2012)
	Sphingomonas GF2B	Ramnolipido	Pei et al. (2010)
	Brevibacillus sp.	Glicolipido	Reddy et al. (2010)
Fenantreno, Benzo(a)pireno	*Bacillus subtilis* B-UM	Biosurfactante de *Acinetobacter calcoaceticus* BU03	Wong et al. (2010)
Pireno	*Pseudomonas fluorescens* 29L	Ramnolipido	Husain (2008)
Naftaleno	*Bacillus cereus* 28BN.	Ramnolipido	Tuleva et al. (2005)
	Bacillus pumilus	Ramnolipido	Calvo et al. (2004)
Antraceno	*Sphingomonas sp .* 12A y *Pseudomonas sp .* 12B	Ramnolipido	Cui et al. (2008)
	Pseudomonas sp.	Ramnolipido	Santos et al. (2008)
Fluoranteno	*Pseudomonas alcaligenes* PA-10	Ramnolipido	Hickey et al. (2007)

(Fuente: Extraído y adaptado de Biosurfactant Enhanced Petroleum Oil Bioremediation) (Effendi et al., 2018)

A pesar de que el uso de biosurfactantes sea una excelente opción ecológica para procesos de remediación biológica en la recuperación mejorada del petróleo (MEOR) y descontaminación de hidrocarburos (Banat et al., 2000). Su alto costo de producción, puede volver inviable y/o limitar su uso en los procesos de biorremediación. En comparación con los tensioactivos sintéticos con un coste medio de alrededor de $1 a $3 por kg, los ramnolípidos cuestan entre 20 y 25 dólares por kg (Chong y Li 2017). Estos costos se relacionan principalmente con la costosa fuente de carbono (hidrofóbica e hidrofílica en el medio de cultivo) que se requiere para la producción de biosurfactantes y también a los procesos de extracción y purificación (Chong y Li 2017). En este contexto, los futuros desafíos se deben direccionar en evaluar las condiciones de cultivo que optimizan su producción, como por ejemplo: el uso de caldos de fermentación crudos, especialmente si la aplicación es en un contexto ambiental, ya que los biosurfactantes en tales casos no necesitan ser puros y se pueden sintetizar utilizando una mezcla de fuentes de carbono económicas (Santos et al., 2016). Con respecto a estas materias primas; evaluar el uso económico de nuevos sustratos, como los derivados de desechos industriales (sustratos renovables) (Makkar et al., 2011), y evaluar las técnicas de aislamiento y purificación para que la producción sea económica y ambientalmente viable para los procesos de biorremediación (Mulligan, 2009; Smyth et al., 2010; Bustamante et al., 2012; Varjani & Upasani, 2017a; Lopes et al., 2018; Speight & El-Gendy, 2018). Tal como dijo Martienssen & Schirmer (2007), se deben preferir el uso de surfactantes de origen biológico, puesto que los compuestos comerciales pueden poseer una biocompatibilidad inadecuada con los microorganismos, causando efectos tóxicos sobre el ecosistema. Algunos estudios, como el de Li & Chen (2009) proponen que en el futuro se deben realizar esfuerzos para desarrollar surfactantes sintéticos que sean biológicamente compatibles con las células. Agregando que se requieren más estudios in situ de su aplicabilidad y comportamiento, puesto que la mayoría de la información descrita al respecto del uso de estos agentes tensioactivos es en condiciones de laboratorio (Pacwa et al., 2011; De et al., 2015).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A lo largo de esta revisión se citó una cantidad importante de estudios, en los cuales se puede encontrar y comprobar la efectividad del empleo de microorganismos, en este caso, de bacterias en la recuperación y restauración de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Si bien existe un gran volumen de información que demuestra de buena manera la efectividad de este método, se debe tener en cuenta que la mayoría de estas corresponden a experiencias de laboratorio. Esto deja en evidencia el gran vacío que existe entre llevar a cabo la biorremediación en condiciones totalmente controladas de laboratorio, a aplicarla en la intemperie del sitio afectado, sorteando todas las variables que se encuentran condicionando el proceso de biodegradación.

Sin embargo, no se puede negar que los estudios realizados a escala de laboratorio, son de gran importancia, puesto que con ellos como referencia, se pueden minimizar problemas asociados a su aplicación In Situ y así, ir mejorando la rentabilidad del método (Varjani & Upasani, 2017b).

El hecho de que el comportamiento de los diferentes hidrocarburos del petróleo sea único de sitio en sitio, hace necesaria la realización de exhaustivas evaluaciones, para determinar el tipo de técnica con el que se abordará la contaminación (Lim et al., 2016). Sin embargo, debido a la comprensión intrincada de los factores abióticos que influyen directamente en las variaciones de la matriz suelo, la descripción de un conjunto de parámetros es una tarea compleja, que impide crear un sistema de conocimiento global integrado con respecto a los factores que controlan la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los hidrocarburos en el suelo (Yu et al., 2018).

También se debe tener en cuenta que cada tecnología de remediación tiene sus propias características y que ningún método de limpieza, será establecido como único método universal de remediación de suelos contaminados (Lim et al., 2016). En este contexto, diseñar consorcios mixtos (Brenner et al., 2008), que permitan la integración de dos o más tecnologías de recuperación de suelos en el futuro podrían dar resultados más eficientes en la restauración de estos (Kirkwood et al., 2006; Subashchandrabose et al., 2011; Gouma et al., 2014; Maddela et al., 2016; Sharma et al., 2016; Zafra et al., 2017; Ghorbannezhad et al., 2018; Ojewumi et al., 2018; Yuan et al., 2018).

La nanoremediación es otro de los nuevos enfoques en desarrollo, que parecen ser prometedores en el mejoramiento de la biorremediación (Bhandari, 2018), integrando diferentes materiales de desecho alimentario, agroindustrial y arbóreo; fuentes importantes de polifenoles en el eliminación satisfactoria de los contaminantes ambientales (Kuppusamy et al., 2015).

Por otro lado, la ingeniería genética, propone la utilización de organismos genéticamente modificados (OGMs) (Speight & El-Gendry, 2018b), aunque su aplicación es de cierta forma controversial y poco aceptada, puesto que se desconoce el real impacto ecológico que estos organismos podrían tener sobre el ecosistema. En este sentido los futuros retos de los investigadores es lograr expandir los conocimientos con respecto a las poblaciones microbianas nativas degradadoras de contaminantes, entendiendo de manera profunda sus vías metabolizadoras y las relaciones simbióticas que estas establecen en el complejo sistema suelo. El entendimiento de esto, permitirá extrapolar los conocimientos obtenidos a escala piloto, a sistemas de campo complejos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABALOS, A., VIÑAS, M., SABATÉ, J., MANRESA, M. A. & SOLANAS, A. M. Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by Pseudomonas Aeruginosa AT10. Biodegradation. 2004, 15 (4), pp. 249–260. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000042915.28757.fb>. ISSN 1572-9729

2. ABDEL-MAWGOUD, A. M., ABOULWAFA, M. M. & HASSOUNA, N. A.-H. Characterization of Rhamnolipid Produced by Pseudomonas aeruginosa Isolate Bs20. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2008, 157 (2), pp. 329–345. [consulta 11 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>. ISSN 1559-0291

3. ABDEL-SHAFY, Hussein I. & MANSOUR, Mona S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Journal of Petroleum. 2016, 25 (1), pp. 107-123. [consulta 25 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>. ISSN 1110-0621

4. ABOELWAFA, A. M. & ALWASIFY, R. S. Biodegradation of crude oil using local isolates. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2009, 3(4), pp. 4742–4751. [consulta 15 de Junio 2018]. < http://ajbasweb.com/old/ajbas/2009/4742-4751.pdf>. ISNN 1991-8178

5. ABOSEDE, Ewetola E. Effect of Crude Oil Pollution on some Soil Physical Properties. Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS). 2013, 6 (3). pp. 14–17. [consulta 24 de Junio de 2018]. <http://iosrjournals.org/iosr-javs/papers/vol6-issue3/D0631417.pdf?id=7269>. ISSN 2319-2380

6. ADAMS Schroeder, Raymond, DOMINGUEZ Rodríguez, Verónica & GARCÍA Hernández, Leonardo. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. [en línea]. Terra Latinoamericana, 1999, 17 (2), 159-174 [7 de Junio de 2018]. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57317209>

7. ADAMS, F. V., NIYOMUGABO, A. & SYLVESTER, O. P. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil Using Agricultural Wastes. Procedia Manufacturing. 2017, 7, pp. 459–464. [consulta 15 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2016.12.037>. ISSN 2351-9789

8. ADAMS, R. H., GUZMÁN Osorio, F. J. & ZAVALA Cruz, J. Water repellency in oil contaminated sandy and clayey soils. International Journal of Environmental Science and Technology. 2008, 5 (4), pp. 445–454. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF03326040>. ISSN 1735-2630

9. AGAMUTHU, P., TAN, Y. S. & FAUZIAH, S. H. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil Using Selected Organic Wastes. Procedia Environmental Sciences. 2013, 18, pp. 694–702. [consulta 19 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.094>. ISSN 1878-0296

10. AGNELLO, A.C., BAGARD, M., VAN HULLEBUSCH, E.D., ESPOSITO, G. & HUGUENOT, D. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. Science of The Total Environment, 2016, 563–564, pp. 693–703. [consulta 12 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>. ISSN 0048-9697

11. AICHBERGER, H., HASINGER, Marion, BRAUN, Rudolf & LOIBNER, Andreas P. Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. Biodegradation. 2005, 16 (2). Pp. 115–125. [consulta 17 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-4871-2>. ISSN 1572-9729

12. AISLABIE, Jackie M., BALKS, Megan R., FOGHT, Julia M. & WATERHOUSE, Emma J.. Hydrocarbon Spills on Antarctic Soils: Effects and Management. Environmental Science & Technology. 2004, 38 (5), pp.1265–1274. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1021/es0305149>. ISSN 1520-5851

13. AISLABIE, Jackie, SAUL, David J. & FOGHT, Julia M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles. 2006, 10 (3), pp. 171–179. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0498-4>. ISSN 1433-4909

14. AKBARI, Sweeta, ABDURAHMAN, Nour Hamid, YUNUS, Rosli Mohd, FAYAZ, Fahim & ALARA, Oluwaseun Ruth. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. Biotechnology Research and Innovation. 2018, 2 (1), pp. 81–90. [consulta 3 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>. ISSN 2452-0721

15. AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R., El-NAWAWY, A & BALBA, M. T. Bioremediation of oil contaminated soil in Kuwait. I. Landfarming to remediate oil contaminated soil. Journal of Soil Contamination. 1996, 5 (3), pp. 243–260. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/15320389609383528>. ISSN 1549-7887

16. AL-DAHER, R., AL-AWADHI, N., & EL-NAWAWY, A. Bioremediation of damaged desert environment using the windrow soil pile system in Kuwait. Environment International. 1998, 24 (1-2), pp. 175–180. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00133-5>. ISSN 0160-4120

17. ALEXANDER, Martin, Biodegradation and Bioremediation. 2nd ed. San Diego: ACADEMIC PRESS. 1999. 453 p. ISBN 9780120498611.

18. AL-HAWASH, Adnan B., MAYTHAM A, Dragh, LI, Shue, ALHUJAILY, Ahmad,ABBOOD, Hayder A. ZHANG, Xiaoyu & MA, Fuying. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2018, 44 (2), pp. 71–76. [consulta 24 de Mayo 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>. ISSN 1687-4285

19. ALI, H. R., EL-GENDY, N. Sh., MOUSTAFA, Y. M., MOHAMED, I., ROUSHDY, M. I. & HASHEM, A. I. Degradation of asphaltenic fraction by locally isolated halotolerant bacterial strains. International Scholarly Research Network Soil Science. 2012. [consulta 18 de Mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/435485>. Article ID 435485

20. AL-KINDI, Sumaiya & ABED, Raeid M. M. Effect of Biostimulation Using Sewage Sludge, Soybean Meal, and Wheat Straw on Oil Degradation and Bacterial Community Composition in a Contaminated Desert Soil. Frontiers of Microbiology. 2016, 7 (240). pp. 1–14. [consulta 19 de Mayo de 2019] <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00240>. ISSN 1663-4365

21. ALRUMMAN, Sulaiman A., STANDING, Dominic B. & PATON, Graeme I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. Journal of King Saud University - Science. 2015, 27 (1), pp. 31–41. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>. ISSN 1018-3647

22. ANTIZAR-LADISLAO, Blanca, LOPEZ-REAL, Joseph & BECK, Angus J. Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting. Waste Management. 2005, 25 (3), pp. 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.01.009>. ISSN 0956-053X

23. ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiology Reviews. 1981, 45 (1), pp. 180–209. [consulta 4 de Mayo de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281502/?page=1>. ISSN 0146-0749

24. ATLAS, Ronald M. Effects of Hydrocarbons on Microorganisms and Petroleum Biodegradation in Arctic Ecosystems. 1985. [consulta 23 de Junio de 2018] <https://www.boem.gov/ESPIS/0/962.pdf>

25. ATLAS, Ronald M. Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation. Applied Microbiology. 1975, 30 (3), pp. 396–403. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187194/?page=1 >. ISSN 1098-5336

26. ATLAS, Ronald M. y BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4ª ed. Madrid: PEARSON EDUCATION. S.A., 2002. 696 p. ISBN 978-84-7829-039-0.

27. ATLAS, Ronald. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 1991, 52 (2), pp. 149–156. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1002/jctb.280520202>. ISSN 1097-4660

28. AVANDEEVA, O. P., BARENBOIM, G. M., BORISOV, V. M., SAVEKA, A. Yu., STEPANOVSKAYA, I. A. & KHRISTOFOROV, O. B. A toxicity estimation system for individual hydrocarbons in the monitoring loop of emergency oil spills on water bodies. Automation and Remote Control. 2014, 75 (11), pp. 2023-2033. [consulta 20 de Abril de 2018]. <https://doi.org/10.1134/S0005117914110101>. ISSN 1608-3032

29. AZUBUIKE, Christopher Chibueze, CHIKERE, Chioma Blaise & OKPOKWASILI, Gideon Chijioke. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016, 32 (11), pp. 1–18 (180). [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>. ISSN 1573-0972

30. BAHMANIL, Fatemeh, AHMAD Ataei, Seyed & ALI Mikaili, Mohammad. The effect of moisture content variation on the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils: modeling and experimental investigation. Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2018, 5 (2), pp. 1–6. [consulta 24 de Junio de 2018]. <10.4172/2380-2391.1000236>. ISSN 2380-2391

31. BALACHANDRAN, C., DURAIPANDIYAN, V., BALAKRISHNA, K. & IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces sp*. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. Bioresource Technology. 2012, 112, pp. 83-90. [consulta 8 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.059>. ISSN 0960-8524

32. BALBA, M. T., AL-DAHER, R., AL-AWADHI, N., CHINO, H. & TSUJI, H. Bioremediation of oil-contaminated desert soil: The Kuwaiti experience. Environment International. 1998, 24 (1–2), pp. 163–173. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00132-3>. ISSN 0160-4120

33. BALDAN, Enrico, BASAGLIA, Marina, FONTANA, Federico, SHAPLEIGH, James P. & CASELLA, Sergio. Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. International Biodeterioration & Biodegradation. 2015, 98, pp. 66–72. [consulta 17 de Diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.002>. ISSN 0964-8305

34. BANAT, Ibrahim M., MAKKAR, Randhir S. & CAMEOTRA, Swaranjit S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 2000, 53 (5), pp 495–508. [consulta 8 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>. ISSN 1432-0614

35. BAPTISTA, Sandro José, CAMMAROTA, Magali Christe, FREIRE & DIAS DE CARVALHO, Denize. Production of CO_2 in crude oil bioremediation in clay soil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2005, 48 (spe), pp. 249–255. [consulta 16 de Junio de 2018]. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000400031>. ISSN 1678-4324

36. BARAN, Stanisław, BIELIŃSKA, Jolanta E. & OLESZCZUK, Patryk. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. Geoderma. 2004, 118 (3–4), pp. 221–232. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0016-7061(03)00205-2>. ISSN 0016-7061

37. BATISTA, S. B., MOUNTEER, A. H., AMORIM, F. R. & TÓTOLA, M.R.. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource Technology. 2006, 97 (6), pp. 868–875. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>. ISSN 0960-8524

38. BECK, Kevin. Sciencing. [en línea]. 23 de mayo de 2018. <http://sciencing.com/difference-between-nadh-nadph-7151973.html >[consulta 7 de Junio de 2018]

39. BENAVIDES López de Mesa, Joaquín, QUINTERO, Gladis, GUEVARA Vizcaíno, Andrea Liliana, JAIMES Cáceres Diana Carolina, GUTIÉRREZ Riaño Sandra Milena y MIRANDA García, Johanna. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas, 2006, 4 (5), pp. 82–90. [Consulta 10 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>. ISSN 2462-9448

40. BENINCASA, Maria. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes Enhances Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. Current Microbiology. 2007, 54 (6), pp 445–449. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0610-8>. ISSN 1432-0991

41. BEZZA, Fisseha Andualem & CHIRWA, Evans M. Nkhalambayausi. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. Biochemical Engineering Journal. 2015, 101, pp. 168–178. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>. ISSN 1369-703X

42. BHANDARI, Geeta. Environmental Nanotechnology: Applications of Nanoparticles for Bioremediation. In: Prasad R., Aranda E. (eds) Approaches in Bioremediation. Nanotechnology in the Life Sciences. Springer, Cham. 2018, Pages 301–315. [consulta 20 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02369-0_13>. ISSN 978-3-030-02369-0

43. BOGAN, B. W., LAHNER, L. M., SULLIVAN, W. R. & PATEREK, J. R. Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. Journal of

Applied Microbiology. 2003, 94 (2), pp. 230–239. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01824.x>. ISSN 1365-2672

44. BOLDRIN, B., TIEHM, A & FRITZSCHE, C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium sp.* Applied And Environmental Microbiology. 1993, 59 (6). pp. 1927–1930. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://aem.asm.org/content/59/6/1927.long>. ISSN 1098-5336

45. BONOMO, R.P., CENNAMO, G., PURRELLO, R., SANTORO, A. M. & ZAPPALÀ, R. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus:*correlation between conformation changes and catalytic activity. Journal of Inorganic Biochemistry. 2001, 83 (1), pp. 67–75. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00130-6>. ISSN 0162-0134

46. BOONCHAN, Sudarat, BRITZ, Margaret L. & STANLEY, Grant A. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66 (3), pp. 1007–1019. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/66/3/1007.long>. ISSN 1098-5336

47. BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology. 2000, 74 (1), pp. 63–67. [consulta 20 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3>. ISSN 0960-8524

48. BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 2003, 52 (3), pp. 161–166. [consulta 28 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00054-4>. ISSN 0964-8305

49. BOROWIK, Agata, WYSZKOWSKA, Jadwiga & WYSZKOWSKI, Mirosław. Resistance of aerobic microorganisms and soil enzyme response to soil contamination with Ekodiesel Ultra fuel. Environmental Science and Pollution Research. 017, 24 (31), pp 24346–24363. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0076-1>. ISSN 1614-7499

50. BOSSERT, Ingeborg, KACHEL, Wayne M. & BARTHA, Richard. Fate of Hydrocarbons During Oily Sludge Disposal in Soil. Applied And Environmental Microbiology. 1984, 47 (4), pp. 763–767. [consulta 20 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/47/4/763>. ISSN 1098-5336

51. BOSSERT, Ingelborg & BARTHA, Ronald (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas RM (Ed) Petroleum Microbiology (pp. 435–474). Macmillan Publishing Company, New York. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8605572>

52. BOVIO, Elena, GNAVI, Giorgio, PRIGIONE, Valeria, SPINA, Federica, DENARO, Renata, YAKIMOV, Michail, CALOGERO, Rosario, CRISAFI, Francesca & VARESE, Giovanna Cristina. The culturable mycobiota of a

Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. Science of The Total Environment, 2017, 576, pp. 310–318. [consulta 1 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.064>. ISSN 0048-9697

53. BRADDOCK, Joan F., RUTH, Marian L., CATTERALL, Peter H., WALWORTH, James L. & McCARTHY, Kathleen A. Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils: Implications for Nutrient-Amended Bioremediation. Environmental Science and Technology. 1997, 31 (7), pp. 2078–2084. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1021/es960904d>. ISSN 1520-5851

54. BRAGG, J. R., PRINCE, R. C., HARNER E. J & ATLAS R. M. Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez oil spill. Nature International Journal of Science. 1994, 368, pp. 413–418. [consulta 19 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1038/368413a0>. ISSN 1476-4687

55. BRENNER, Katie, YOU, Lingchong & ARNOLD, Frances H. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends in Biotechnology. 2008, 26 (9), pp. 483–489. [consulta 13 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>. ISSN 0167-7799

56. BROOIJMANS, Rob J.W., PASTINK, Margreet I. & SIEZEN, Roland J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Microbial biotechnology, 2009, 2 (6), pp. 587–594. [consulta 12 de junio de 2018]. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x>

57. BROWN, David M., OKORO, Samson, van GILS, Juami, van SPANNING, Rob, BONTE, Matthijs, HUTCHINGS, Tony, LINDEN, Olof, EGBUCHE, Uzoamaka, BRUUN, Kim Bye & SMITH, Jonathan W. N. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. Science of The Total Environment. 2017, 596–597, pp. 284–292. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.072>. ISSN 0048-9697

58. BROWN, G. S., BARTON, L.L. & THOMSON, B.M. Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons. Waste Management. 2003, 23 (8), pp. 737–740. [consulta 16 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00119-8>. ISSN 0956-053X

59. BROWN, L. D., COLOGGI, D. L., GEE, K. F. & Ulrich, A. C. Bioremediation of Oil Spills on Land - Chapter 12. In: Oil Spill Science and Technology (2nd Edition), . 2017. pp. 699–729. [consulta 12 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809413-6.00012-6> ISBN 978-0-12-809413-6.

60. BUDSABUN, Tanakwan.Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Petroleum Contaminated Terrestrial Samples that Collected in Bangkok, Thailand. Procedia - Social and Behavioral Sciences. 2015, 197, pp. 1363–1366. [consulta

10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2015.07.391>. ISSN 1877-0428

61. BUSHNELL, L. D. & HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. Journal of Bacteriology. 1941, 41 (5), pp. 653–673. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374727/>. ISSN 1098-5530

62. BUSTAMANTE, M., DURÁN, N. & DIEZ, M. C. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2012, 12 (4). pp. 667–687. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012005000024>. ISSN 0718-9516

63. CALVO, C., TOLEDO, F. & GONZÁLEZ-López, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. Journal of Biotechnology. 2004, 109 (3), pp. 255–262. [consulta 5 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.009>. ISSN 0168-1656

64. CAMEOTRA , Swaranjit Singh & SINGH, Pooja. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. International Biodeterioration & Biodegradation. 2008, 62 (3). pp. 274–280. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.11.009>. ISSN 0964-8305

65. Capítulo II: La contaminación del suelo [en línea] (s.f). <http://www.glossary.oilfield.slb.com/es/Terms/c/catagenesis.aspx>

66. CASELLAS, M., FERNÁNDEZ, P., BAYONA, J. M. & SOLANAST, A. M. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airbone particulate matter from Barcelona (Spain). Chemosphere, 1995, 30 (4). pp. 725–740. [consulta 20 de Abril 2018]. <https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)00438-Z>. ISSN 0045-6535

67. CASSIDY, Daniel P., EFENDIEV, Samir & WHITE, Daniel M. A comparison of CSTR and SBR bioslurry reactor performance. Water Research. 2000, 34 (18), pp. 4333–4342. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00211-6>. ISSN 0043-1354

68. CASTILLO, Francisco, et al. Biotecnología ambiental. x°ed. Madrid: Tébar, 2005. 616 p, ISBN 978-7360-211-2

69. CEPEDA, Juan Manuel. Química de suelos. 2ª ed. México: Trillas, 2007. 167 p. ISBN 968-24-4032-7

70. CERQUEIRA, Vanessa S, HOLLENBACH, Emanuel B., MABONI, Franciele, VAINSTEIN, Marilene H., CAMARGO, Flávio A. O., PERALBA, Maria do Carmo R. & BENTO, Fátima M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. Bioresource Technology. 2011, 102 (23), pp.

11003–11010. [consulta 13 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.074>. ISSN 0960-8524

71. CERQUEIRA, Vanessa S., PERALBA, Maria do Carmo R., CAMARGO, Flávio A.O. & BENTO, Fátima M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 95 (Part B), pp. 338–345. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.015>. ISSN 0964-8305

72. CHAÎNEAU, C.H., ROUGEUX, G., YÉPRÉMIAN, C. & OUDOT, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. Soil Biology & Biochemistry. 2005, 37 (8), pp. 1490–1497. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.012> ISSN 0038-0717

73. CHANDANKERE, Radhika, YAO, Jun, CAI, Minmin, MASAKORALA, Kanaji, JAIN, A.K. & CHOI, Martin M.F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. Fuel. 2014, 122, pp. 140–148. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.023>. ISSN 0016-2361

74. CHANG, B.V., SHIUNG, L.C. & YUAN, S.Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Chemosphere. 2002, 48 (7), pp. 717–724. [consulta 24 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00151-0>. ISSN 0045-6535

75. CHATRE, Suneel, PUROHIT, Hemant, SHANKER, Rishi, KHANNA, Purushottam. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. Water Science and Technology, 1996, 34 (10), pp. 187–193. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00713-5>. ISSN 0273-1223

76. CHATTERJEE, Sandipan, CHATTOPADHYAY, Pritam, ROY, Subhasita & SEN, Sukanta K. Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. Journal of Applied Biosciences. 2008, 11, pp. 594–601. [consulta 4 diciembre 2018]. <http://www.m.elewa.org/JABS/2008/11/Abstract6-Chatterjee.html>. ISSN 1997 – 5902

77. CHAUDHARY, Priyanka, SHARMA, Richa, SINGH, Shashi Bala & NAIN, Lata. Bioremediation of PAH by *Streptomyces sp*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2011, 86 (3), pp. 268–271. [consulta 8 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0211-5>. ISSN 1432-0800

78. CHAYABUTRA, Chawala, & JU, Lu-Kwang. Degradation of n-Hexadecane and Its Metabolites by Pseudomonas aeruginosa under Microaerobic and Anaerobic Denitrifying Conditions. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2), pp. 493–498. [consulta 13 de Junio de 2018].

<http://aem.asm.org/content/66/2/493.full?sid=47c78ed1-102c-4ce7-b6ee-a9058305e0b2 > ISNN1098-5336.

79. CHEMLAL, R., ABDI, N., LOUNICI, H., DROUICHE, N., PAUSS , A. & MAMERI, N. Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in sandy soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 2013, 78, pp. 43–48. [consulta 17 de Diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.014>. ISSN 0964-8305

80. CHEMLAL, R., TASSIST, A., DROUICHE, M., LOUNICI, H., DROUICHE , N. & MAMERI, N. Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique. International Biodeterioration & Biodegradation. 2012, 75, pp. 201–206. [consulta 17 de Diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.09.011>. ISSN 0964-8305

81. CHEN, Yu, CHEN, Li, ZHOU, Zhengxi, WEN, Jianping, YOU, Xueyi, MAO, Youzhi, LU, Chunzhe, HUO, Guangxin & JIA, Xiaoqing. Enhanced Biodegradation of Alkane Hydrocarbons and Crude Oil by Mixed Strains and Bacterial Community Analysis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014, 172 (7), pp. 3433–3447. [consulta 10 de Junio de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532465>. ISSN 1559-0291

82. CHEN, Ming, XU, Piao, ZENG, Guangming, YANG, Chunping, HUANG, Danlian & ZHANG, Jiachao. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnology Advances. 2015, 33 (6) - Part 1, pp. 745–755. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>. ISSN 0734-9750

83. CHIAVOLA, Agostina, BACIOCCHI, Renato, & GAVASCI, Renato. Biological treatment of PAH-contaminated sediments in a Sequencing Batch Reactor. Journal of Hazardous Materials. 2010, 184 (1-3), pp. 97–104. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.010>. ISSN 0304-3894

84. CHOI, Sung Chan, KWON, Kae Kyoung, SOHN, Jae Hak & KIM, Sang Jin. Evaluation of Fertilizer Additions to Stimulate Oil Biodegradation in Sand Seashore Mesocosms. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2002, 12 (3), pp. 431–436. [consulta 11 de Junio de 2018]. <http://www.jmb.or.kr/journal/main.html?mod=vol&tops=&year=2002>. ISSN 1738-8872

85. CHONG, Huiqing & LI, Qingxin. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. Microbial Cell Factories. 2017, 16 (1): 137, pp. 1–12. [consulta 9 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>. ISSN 1475-2859

86. COATES, J.D., CHAKRABORTY, R., LACK, J. G., O'CONNOR, S. M., COLE, K. A., BENDER, K. S. & ACHENBACH, L. A. Anaerobic benzene oxidation

coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. Nature. 2001, 411 (6841), pp. 1039–1043. [consulta 5 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1038/35082545>. ISSN 1476-4687

87. COONEY, J., SILVER, S y BECK ,E. Factors influencing hydrocarbons degration inn three freshwater lakes [en línea]. Microbial Ecology. 1985, 11 (2), pp. 127–237. [consulta 21 de Abril de 2018] <https://doi.org/10.1007/BF02010485>. ISSN 1432-184X

88. CORONA, Ramirez, L. ITURBE, Argüelles, R. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. Ingeniería Investigación y Tecnología. 2005, 6(2), pp. 119–126. [consulta 17 de Junio de 2018]. <http://www.revistaingenieria.unam.mx/numeros/v06n2-03.php>. ISSN 2594-0732.

89. COULON, Frédéric, AL AWADI, Mohammed, COWIE, William, MARDLIN, David, POLLARD, Simon, CUNNINGHAM, Colin, RISDON, Graeme, ARTHUR, Paul, SEMPLE, Kirk T. & PATON, Graeme I. When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. Environmental Pollution 2010;158 (10), pp. 3032–3040. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.001>. ISSN 0269-7491

90. COYNE, Mark. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid: Paraninfo, 2000. 416p. ISBN 978-84-283-2648-7

91. CRISTALDI, Antonio, OLIVERI C.,Gea, JHO, Eun Hea, ZUCCARELLO, Pietro, GRASSO, Alfina, COPAT, Chiara, FERRANTE, Margherita. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. Environmental Technology & Innovation, 2017, 8, pp. 309–326. [consulta 1 de Junio de 2018]. < https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.08.002>. ISSN 2352-1864

92. CRISTOREAN, Carmen, MICLE, Valer & SUR, Ioana M. A critical analysis of ex-situ bioremediation technologies of hydrocarbon polluted soils. Ecoterra. 2016, 13 (1), pp. 17–29. [consulta 25 de Junio de 2018]. <http://www.ecoterra-online.ro/ro/numarul13(1)-2016/> ISSN 1584-7071

93. CUI, Chang-Zheng, ZENG, Chi, WAN, Xia, CHEN, Dong, ZHANG, Jia-Yao & SHEN, Ping. Effect of Rhamnolipids on Degradation of Anthracene by Two Newly Isolated Strains, Sphingomonas sp. 12A and Pseudomonas sp. 12B. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008, 18 (1), pp. 63–66. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200832642389131.page>. ISSN 1738-8872

94. DAS, Amar Jyoti & KUMAR, Rajesh. Bioslurry phase remediation of petroleum-contaminated soil using potato peels powder through biosurfactant producing *Bacillus licheniformis* J1. International Journal of Environmental Science and Technology. 2017, 15 (3), pp 525–532. [consulta 12 de Junio 2019]. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1410-3>. ISSN 1735-2630

95. DAS, Kishore & MUKHERJEE, Ashis K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. 2007, 98 (7), pp. 1339–1345. [consulta 19 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>. ISSN 0960-8524

96. DAVIS, Cynthia, CORT, Todd, DAI, Dongping, ILLANGASEKARE, Tissa H. & MUNKATA-Marr, Junko. Effect of heterogeneity and experimental scale on biodegradation of diesel. Biodegradation. 2003, 14 (6), pp. 373–384. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1023/A:1027376318530>. ISSN 1572-9729

97. DAWSON, J. J. C., GODSIFFE, E. J., THOMPSON, I. P., RALEBITSO-Senior, T. K., KILLHAM, K. S. & PATON, G. I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. Soil Biology and Biochemistry. 2007, 39 (1), pp. 164–177. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.06.020>. ISSN 0038-0717

98. DE, Sourav, MALIK, Susanta, GHOSH, Aniruddha, SAHA, Rumpa & SAHA, Bidyut. A review on natural surfactants. RCS Advances. 2015, 5 (81), pp. 65757–65767. <https://doi.org/10.1039/C5RA11101C>. ISSN 2046-2069

99. DEAN-ROSS, D. Biodegradation of Selected PAH from Sediment in Bioslurry Reactors. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2005, 74 (1), pp. 32–39. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0544-4>. ISSN 1432-0800

100. DEAN-ROSS, Deborah. Bacterial abundance and activity in hazardous waste-contaminated soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1989, 43 (4), pp. 511–5117. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF01701928>. ISSN 1432-0800

101. DESAI, Jitendra D. & BANAT, Ibrahim M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1997, 61 (1), pp. 47–64. [consulta 3 de Mayo de 2019]. <https://mmbr.asm.org/content/61/1/47/article-info>. ISSN 1098-5557

102. DHOTE, Monika, JUWARKAR, Asha, KUMAR, Anil, KANADE, G. S. & CHAKRABARTI, Tapan. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010, 26 (2), pp 329–335. [consulta 7 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0180-6>. ISSN 1573-0972

103. DIAS, Romina Laura. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales - CINDEFI, 2011, 245 p. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18082>

104. DIBBLE, J. T. & BARTHA, R. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. Applied and Environmental Microbiology. 1979a, 37 (4), pp. 729–739. [consulta 5 de Mayo de 2018]. <https://aem.asm.org/content/37/4/729>. ISSN 1098-5336

105. DIBBLE, J. T., & BARTHA, R. Rehabilitation of oil-inundated agricultural land. Soil Science. Soil Science. 1979b, 128 (1), pp. 56–60. [consulta de 5 de Mayo de 2018]. <10.1097/00010694-197907000-00009>. ISSN 1538-9243

106. DINDAR, E., TOPAÇ Şağban, F. O. & BAŞKAYA, H. S. Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 2015, 105, pp. 268–275. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.011>. ISSN 0964-8305

107. DOGRA, Varsha, KUMAR, Rajeev, KUMAR, Sandeep & KAUR, Gurpreet. The Role of Microbes Toward Biodegradation of Hydrocarbons – Chapter 25. In: Kumar V., Kumar M., Prasad R. (eds) Microbial Action on Hydrocarbons. Springer, Singapore. 2018. pp. 597–613 [consulta 5 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_25>. ISBN 978-981-13-1840-5

108. EFFENDI, Agus Jatnika, KARDENA, Edwan & HELMY, Qomarudin. Biosurfactant Enhanced Petroleum Oil Bioremediation - Chapter 7. In: Kumar V., Kumar M., Prasad R. (eds) Microbial Action on Hydrocarbons. Springer, Singapore. 2018. pp. 143–179. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_7>. ISBN 978-981-13-1840-5

109. EKPERUSI , O. A. & AIGBODION, F. I. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus*. 3 Biotech. 2015, 5 (6), pp. 957–965. [consulta 12 Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0298-1>. ISSN 2190-5738

110. EKPO, M. A. & UDOFIA, U. S. Rate of biodegradation of crude oil by microorganisms isolated from oil sludge environment. African Journal of Biotechnology. 2008, 7 (24), pp. 4495–4499. [consulta 22 de Junio de 2018]. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59628/47917>. ISSN 1684-5315

111. EL-GENDY, Nour Sh., MOUSTAFA, Yasser M., BARAKAT, Mohamed A.K. & DERIASE, Samiha F. Evaluation of a bioslurry remediation of petroleum hydrocarbons contaminated sediments using chemical, mathematical and microscopic analysis. International Journal of Environmental Studies. 2009, 66 (5), pp. 563–579. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/00207230902883994>. ISSN 10290400

112. ELLIS Jr., Roscoe, & ADAMS Jr., Russell S. Contamination of Soils By Petroleum Hydrocarbons. Advances in Agronomy. 1961, 13, pp. 197–216.

[consulta 22 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60959-1>. ISSN 0065-2113

113. EL-MAHDI, A. M., AZIZ, H. A., ABU Amr, S. S., EL-GENDY, N. S. & NASSAR, H. N. Isolation and characterization of *Pseudomonas sp*. NAF1 and its application in biodegradation of crude oil. Environmental Earth Sciences. 2016, 75 (5): 380. 11 pp. [consulta 18 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5296-z>. ISSN 1866-6299

114. ELSHAFIE, Abdulkadir, ALKINDI , Abdulaziz Yahya, AL-BUSAIDI , Sultan, BAKHEIT, Charles & ALBAHRY, S.N.. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. Marine Pollution Bulletin, 2007, 54(11), pp. 1692–1696. [consulta 1 de junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.06.006>. ISSN 0025-326X

115. EL-SHESHTAWY, H.S., AIAD, I., OSMAN, M.E., ABO-ELNASR, A.A. & KOBISY, A.S.. Production of biosurfactants by Bacillus licheniformis and Candida albicans for application in microbial enhanced oil recovery. Egyptian Journal of Petroleum. 2016, 25 (3), pp. 293–298. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.07.018>. ISSN 1110-0621

116. FABELO Falcón, José Antonio. Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados. 2017. Centro Azúcar, 44 (1), pp. 53–60. [consulta 12 de Junio de 2018]. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000100006&lng=es&tlng=es>

117. FAN, Chen, QING, Xia y LU-KWANG, Ju. Aerobic Denitrification of Pseudomona aeruginosa monitored by online NAD(P)H Fluorescence. Applied And Environmental Microbiology, 2003, 69 (11), pp. 6715–6722. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262322/>. ISSN 10985336

118. FARAHAT, Laila A. & EL-GENDY, Nour SH. Comparative kinetic study of different bioremediation processes for soil contaminated with petroleum hydrocarbons. Material Science Research India, 2007, 4 (2), pp. 269–278. [consulta 14 de Junio de 2018]. <http://www.materialsciencejournal.org/?p=1402>. ISNN 2394-0565

119. FAVA, Fabio, BERSELLI, Sara, PELLEGRINO, Conte, PICCOLO, Alessandro & MARCHETTI, Leonardo. Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88 (2), pp. 214–223. [consulta 28 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1002/bit.20225> ISSN 1097-0290

120. Federal Contaminated Sites Action Plan (FCSAP). Federal Guidelines for Landfarming Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils. 2006.

<http://publications.gc.ca/site/eng/444562/publication.html> ISBN 978-1-100-22284-4. 27 p.

121. Federal Remediation Technologies Roundtable (FRTR). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, Version 4.0. 2003. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://frtr.gov/matrix2/section1/toc.html>

122. FENG, Nai-Xian, YU, Jiao, ZHAO, Hai-Ming, CHENG, Yu-Ting, MO, Ce-Hui, CAI, Quan-Ying, LI, Yan-Wen, LI, Hui & WONG, Ming-Hung. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships. Science of The Total Environment, 2017, 583, pp. 352–368. [consulta 1 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.075>. ISSN 0048-9697

123. FERGUSON, Susan H., FRANZMANN, Peter D., REVILL, Andrew T., SNAPE, Ian & RAYNER, John L. The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. Cold Regions Science and Technology. 2003, 37 (2), pp. 197–212. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0165-232X(03)00041-7>. ISSN 0165-232X

124. FERNÁNDEZ Luqueño, F., VALENZUELA Encinas, C., MARSCH, R., MARTÍNEZ Suárez, C., VÁZQUEZ Núñez, E. & DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. Environmental Science and Pollution Research. 2011, 18 (1), pp. 12–30. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0371-6>. ISSN 1614-7499

125. FERNÁNDEZ, Celeste, LLOBREGAT, María J, BASTIDAS, Henry, & SIEN, Bonnie. Influencia de la Eisenia foetida y de Sustratos Orgánicos como Agentes Bioestimulantes en la Biodegradación de un Suelo Contaminado con Petróleo Pesado. Información Tecnológica. 2009, 20(5), pp. 19–30. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642009000500004> ISSN 0718-0764

126. FERRADJI, Fatma Zohra, MNIF, Sami, BADIS, Abdelmalek, REBBANI, Soumia, FODIL, Djamila, EDDOUAOUDA, Kamel & SAYADI, Sami. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces spp.* isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 86, pp. 300–308. [consulta 6 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.003>. ISSN 0964-8305

127. FILLER, Dennis M., LINDSTROM, Jon E., BRADDOCK, Joan F., JOHNSON, Ronald A. & NICKALASKI, Royce. Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. Cold Regions Science and Technology. 2001, 32 (2–3), pp. 143–156. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0165-232X(01)00020-9>. ISSN 0165-232X

128. FORSYTH, J.V., TSAO Y.M. & BLEAM R.D. 1995. Biorremediation: when is augmentation needed?. In Hinchee R.E., Fredrickson J. & Alleman B.C. (Eds.), Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus, pp. 1–14.

129. FOSTER, J. W. (1962). Hydrocarbons as substrates for microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek. 1962, 28(1), pp. 241–274. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF02538739>. ISSN 1572-9699

130. FRANZETTI, Andrea, BESTETTI, Giuseppina, CAREDDA, Paolo, LA COLLA, Paolo & TAMBURINI, Elena. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. FEMS Microbiology Ecology banner. 2008, 63 (2), pp. 238–248. [consulta 11 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00406.x>. ISSN 1574-6941

131. FRITSCHE, Wolfgang & HOFRICHTER, Martin. Aerobic Degradation by Microorganisms – Chapter 6. Biotechnology: Environmental Processes II, Volume 11, Second Edition. Weinheim, Germany. 2000. pp. 144–167. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1002/9783527620951.ch6>. ISBN 9783527620951

132. FRUTOS, F. Javier G., ESCOLANO, Olga, GARCÍA, Susana, BABÍN, Mar & DOLORES Fernández, M. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials. 2010, 183 (1–3). pp. 806–813. [consulta 18 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.098>. ISSN 0304-3894

133. FUHS, G. Wolfgang. The microbial degradation of hydrocarbons (Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen). Archives of Microbiology (Archiv für Mikrobiologie). 1961, 39 (4), pp. 374–422. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF00411776>. ISSN 1432-072X

134. FUSEY, P. & OUDOT, J. Relative influence of physical removal and biodegradation in the depuration of petroleum-contaminated seashore sediments. Marine Pollution Bulletin. 1984, 15 (4), pp. 136–141. [consulta 24 de Junio 2018]. <https://doi.org/10.1016/0025-326X(84)90234-0>. ISSN 0025-326X

135. GAO, Shumei, SEO, Jong-Su, WANG, Jun, KEUM, Young-Soo, LI, Jianqiang & LI, Qing X. Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6. International Biodeterioration & Biodegradation. 2013, 79, pp. 98–104. [consulta 3 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.012>. ISSN 0964-8305

136. GARBISU, C., AMÉZAGA, I. & Alkorta, I. Biorremediación y ecología [en línea]. Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente, 2002, 3. [consulta 12 de junio de 2018]

<https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9090/1/ECO_11(3)_11.pdf >. ISSN 1697-2473

137. GEETHA, S. J., JOSHI, Sanket J. & KATHROTIYA, Shailesh. Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacterial Isolate from Oil Contaminated Sites. APCBEE Procedia. 2013, 5, pp. 237–241. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2013.05.041>. ISSN 2212-6708

138. GENTRY, Terry, RENSING, Christopher & PEPPER, Ian. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. Critical Reviews in Enviromental Science and Technology. 2004, 34 (5), pp. 447–494. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/10643380490452362>. ISSN 1547-6537

139. GERBER, M.A., FREEMAN, H. D., BAKER, E. G. & RIEMATH, W. F. Soil Washing: A Preliminary Assessment of Its Applicability to Hanford. U.S. Department of Energy by Battelle Pacific Northwest Laboratory. Richland, Washington. Report No. PNL–7787; UC 902. 1991. [consulta 2 de Julio de 2018]. <https://www.osti.gov/servlets/purl/5230655>

140. GHAZALI, F.M., RAHMAN, R.N.Z.A., SALLEH, A.B. & BASRI, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation. 2004, 54(1), pp. 61–67. [consulta 12 de Junio 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>. ISSN 0964-8305

141. GHORBANNEZHAD, Hassan, MOGHIMI, Hamid & DASTGHEIB, Seyed Mohammad Mehdi. Evaluation of heavy petroleum degradation using bacterial-fungal mixed cultures. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018, 164, pp. 434–439. [consulta 10 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.046>. ISSN 0147-6513

142. GHOREISHI, Golafarin, ALEMZADEH, Abbas, MOJARRAD, Mohammad, DJAVAHERI, Mohammad. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. Sustainable Environment Research. 2017, 27 (4), pp. 195–202. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.002>. ISSN 2468-2039

143. GILICHINSKY, D. A., VOROBYOVA, E. A., EROKHINA, L. G., FYORDOROV-Dayvdov, D.G. & CHAIKOVSKAYA, N. R. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. Advances in Space Research. 1992, 12 (4), pp. 255–263. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0273-1177(92)90180-6>. ISSN 0273-1177

144. GIORDANO, Andrea, STANTE, Loredana, PIROZZI, Francesco, CESARO, Raffaele & BORTONE, Giuseppe. Sequencing batch reactor performance treating PAH contaminated lagoon sediments. Journal of Hazardous Materials. 2005, 119 (1–3), pp. 159–166. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.12.002>. ISSN 0304-3894

145. GOEBEL, Marc O., BACHMANN, Joerg, Woche, Susanne K. & FISCHER, Walter R. Soil wettability, aggregate stability, and the decomposition of soil organic matter. Geoderma. 2005, 128 (1–2), pp. 80–93. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.12.016>. ISSN 0016-7061

146. GOI, Anna, KULIK, Niina, TRAPIDO, Marina. Combined chemical and biological treatment of oil contaminated soil. Chemosphere. 2006, 63 (10), pp. 1754–1763. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.023>. ISSN 0045-6535

147. GÓMEZ Romero, Sara Esmeralda, GUTIÉRREZ Bustos, Diana Carolina, HERNÁNDEZ Marín, Ana María, HERNÁNDEZ Rodríguez, Cindy Zulay, LOSADA Casallas, Maríana & MANTILLA Vargas, Paula Cecilia. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por Pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2008, 6 (9), pp. 76–84. [consulta 17 de Diciembre de 2018] <https://doi.org/10.22490/24629448.398>. ISSN 1794-2470

148. GÓMEZ, Francisco & SARTAJ, Majid. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 89, pp. 103–109. [consulta 17 de diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.010>. ISSN 0964-8305

149. GORDON, Gabrielle, STAVI, Ilan, SHAVIT, Uri & ROSENZWEIG, Ravid. Oil spill effects on soil hydrophobicity and related properties in a hyper-arid region. Geoderma. 2018, 312, pp. 114–120. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.008>. ISSN 0016-7061

150. GOUMA, S., FRAGOEIRO, S., BASTOS, A. C. & Magan, N. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies – Chapter 13. In: DAS, Surajit. Microbial Biodegradation and Bioremediation. (Elsevier Insights). 2014. pp. 301–323. [consulta 11 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>. ISBN 978-0-12-800021-2

151. GUARINO C. , SPADA V. & SCIARRILLO R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioagumentation - Assistited Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. Chemosphere. 2017, 170, pp. 10–16. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.165>. ISSN 0045-6535

152. GUERIN, Turlough F. The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation. Environmental Science and Pollution Research. 2000, 7 (1), pp. 19–26. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1065/espr199910.004>. ISSN 1614-7499

153. GUNKEL, W. & GASSMAN, G. Oil, oil dispersants and related substances in the marine environment. Helgoländer Meeresunters. 1980, 33, pp. 164–181. [consulta 4 de Mayo de 2018]. <https://hmr.biomedcentral.com/track/pdf/10.1007/BF02414744> ISSN 0017-9957

154. GUNTHER, Nereus W., NUÑEZ, Alberto, FETT, William, SOLAIMAN, Daniel K. Y. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. Applied and Environmental Microbiology. 2005, 71 (5), pp. 2288–2293. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://aem.asm.org/content/71/5/2288.long>. ISSN 1098-5336

155. GUNTHER, Nereus W., NUÑEZ, Alberto, FORTIS, Laurie & SOLAIMAN, Daniel K. Y. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2006, 33 (11), pp 914–920. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0169-1>. ISSN 1476-5535

156. GUO, Guang, TIAN, Fang, DING, Keqiang, WANG, Lihong, LIU, Tingfeng & YANG, Feng. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils. International Biodeterioration & Biodegradation. 2017, 123, pp. 56–62. [consulta 5 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.022>. ISSN 0964-8305

157. GUO, Yan-Ping, HU, Yong-You, GU, Roy R. & LIN, Hui. Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. Journal of Colloid and Interface Science. 2009, 331 (2), pp. 356–363. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.039>. ISSN 0021-9797

158. HAGHOLLAHI, Ali, FAZAELIPOOR, Mohammad Hassan & SCHAFFIE, Mahin. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. Journal of Environmental Management. 2016, 180, pp. 197–201. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.038>. ISSN 0301-4797

159. HARITASH, A. K. & KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 2009, 169 (1–3), pp. 1-15. [consulta 8 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>. ISSN 0304-3894

160. HASANUZZAMAN, Mohammad, UENO, Akio, ITO, Hitoshi, ITO, Yukiya, YAMAMOTO, Yusuke, YUMOTO, Isao & OKUYAM, Hidetoshi. Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. International Biodeterioration & Biodegradation. 2007, 59 (1), pp. 40–43. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.010>. ISSN 0964-8305

161. HEIPIEPER, H. J. & MARTÍNEZ, P. M. Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms. In: Timmis K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010, Capítulo: Vol. 2, Parte 9, pp. 1563–1573. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_108>. ISBN 978-3-540-77587-4

162. HEJAZI, Ramzi Fouad (2002) Oily sludge degradation study under arid conditions using a combination of landfarm and bioreactor technologies. Tesis (Doctoral). Faculty of Engineering and Applied Science, Memorial University of Newfoundland - St. John's. Sewfoundland - Canada. <http://research.library.mun.ca/id/eprint/8550>. 257 paginas [consulta 26 de Junio de 2018]

163. HEJAZI, Ramzi Fouad, HUSAIN, Tahir & KHAN, Faisal I. Landfarming operation of oily sludge in arid region–human health risk assessment. Journal of Hazardous Materials. 2003, 99 (3), pp. 287–302. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00062-1>. ISSN 0304-3894

164. HELLSTRÖM, T. The Exxon Valdez disaster: environmental safety implementation in an incrementalist mode. Social Science Information. 1998, 37(2), pp. 361–380. [consulta 19 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1177/053901898037002007>. ISSN 1461-7412

165. HELMY, Qomarudin, LAKSMONO, Rudy & KARDENA, Edwan. Bioremediation of Aged Petroleum Oil Contaminated Soil: From Laboratory Scale to Full Scale Application. Procedia Chemistry. 2015, 14, pp. 326–333. [consulta 16 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.045>. ISSN 1876-6196

166. HESNAWI, Rafik M. & ADBEIB, Mohamed M. Effect of Nutrient Source on Indigenous Biodegradation of Diesel Fuel Contaminated Soil. APCBEE Procedia. 2013, 5, pp. 557–556. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2013.05.093>. ISSN 2212-6708

167. HEWELKE, Edyta, SZATYŁOWICZ, Jan, HEWELKE, Piotr & GNATOWSKI, Tomasz & AGHALAROV, Rufat. The Impact of Diesel Oil Pollution on the Hydrophobicity and CO2 Efflux of Forest Soils. Water, Air and Soil Pollution. 2018, 229 (2): 51, pp. 1–11. [consulta 28 de Junio de 2018].<https://doi.org/10.1007/s11270-018-3720-6>. ISSN 1573-2932

168. HICKEY, Anne Marie, GORDON, Linda, DOBSON, Alan D. W., KELLY , Catherine T. & DOYLE, Evelyn M. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007, 74 (4), pp 851–856. [consulta 5 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0719-5>. ISSN 1432-0614

169. HOBSON, A. M., FREDERICKSON, J. & DISE, N. B. CH_4 and N_2O from mechanically turned windrow and vermicomposting systems following in-vessel pre-treatment. Waste Management. 2005, 25 (4), pp. 345–352. [consulta

26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.015>. ISSN 0956-053X

170. HOFF, Rebecca Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. Marine pollution Bulletin. 1993, 26 (9), pp. 476–481. [consulta 4 de Mayo de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90463-T >. ISSN 0025-326X

171. HÖHENER, Patrick & PONSIN, Violaine. In situ vadose zone bioremediation. Current Opinion in Biotechnology. 2014, 27. pp.1-7. [consulta 16 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.018>. ISSN 0958-1669

172. HOLLIGER, Christof & ZEHNDER, Alexander JB. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology. 1996, 7 (3), pp. 326–330. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80039-5>. ISSN 0958-1669

173. HOREL, A., & SCHIEWER, S. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. Cold Regions Science and Technology. 2009, 58 (3), pp. 113–119. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2009.04.004>. ISSN 0165-232X

174. HOU, Ning, ZHANG, Nannan, JIA, Tingting, SUN, Yang, DAI, Yanfei, WANG, Qiquan, LI, Dapeng, LUO, Zhengkai & LI, Chunyan. Biodegradation of phenanthrene by biodemulsifier-producing strain *Achromobacter sp.* LH-1 and the study on its metabolisms and fermentation kinetics. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018, 163, pp. 205-214. [consulta 28 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.064>. ISSN 0147-6513

175. HUANG, Xiao Dong, EL-ALAWI, Yousef, GURSKA, Jolanta, GLICK, Bernard R. & GREENBERG, Bruce M. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. Microchemical Journal. 2005, 81 (1), pp. 139–147. [consulta 22 de abril de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2005.01.009>. ISSN 0026-265X

176. HUESEMANN, Michael H. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. Journal of Soil Contamination. 1994, 3 (3), pp. 299–318. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/15320389409383471> ISSN 1549-7887

177. HUSAIN, Saleha. Effect of surfactants on pyrene degradation by Pseudomonas fluorescens 29L. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008, 24 (11), pp. 2411–2419. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9756-9>. ISSN 1573-0972

178. HUSSAIN, Fida, HUSSAIN, Imran, KHAN, Aquib Hassan Ali, MUHAMMAD, Yousaf Shad, IQBAL, Mazhar, SOJA, Gerhard,

REICHENAUER, Thomas Gerhard, ZESHAN & YOUSAF, Sohail. Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. Environmental and Experimental Botany. 2018, 153, pp. 80–88. [consulta 14 de Diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.012>. ISSN 0098-8472

179. HUTTON, William E. & ZOBELL, Claude E. The Occurrence And Characteristics of Methane-Oxidizing Bacteria in Marine Sediments. Journal of Bacteriology. 1949, 58 (4), pp. 463–473. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://jb.asm.org/content/58/4/463>. ISSN 1098-5530

180. IBRAHIM, Haytham M.M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. Egyptian Journal of Petroleum. 2018, 27 (1), pp. 21–29. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005>. ISSN 1110-0621

181. JACQUES, Rodrigo JS, OKEKE, Benedict C., BENTO, Fatima M., TEIXEIRA, Aline S., PERALBA, Maria CR & CAMARGO, Flavio AO. Microbial consortium: bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technology. 2008, 99 (7), pp. 2637–2643. [consulta 19 de Junio 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.047>. ISSN 0960-8524

182. JANBANDHU, Anjali & FULEKAR, Madhusudan H.. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. Journal of Hazardous Materials. 2011, 187 (1–3), pp. 333-340. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.034>. ISSN 0304-3894

183. JEE, V., BECKLES, D. M., WARD, C. H. & HUGHES, J. B. Aerobic slurry reactor treatment of phenanthrene contaminated sediment. Water Research. 1998, 32 (4), pp. 1231–1239. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00333-3>. ISSN 0043-1354

184. JIANG, Ying, BRASSINGTON, Kirsty J., PRPICH, George, PATON, Graeme I., SEMPLE, Kirk T., POLLARD, Simon J. T., & COULON, Frédéric. Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. Chemosphere. 2016, 161, pp. 300–307. [consulta 20 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.032>. ISSN 0045-6535

185. JOBSON, A., COOK, F. D. & WESTLAKED. W. S. Microbial Utilization of Crude Oil. Applied Microbiology. 1972, 23 (6), pp. 1082–1089. [consulta de 2018]. <https://aem.asm.org/content/23/6/1082>. ISSN 1098-5336

186. JOBSON, A., McLAUGHLIN, M., COOK, F. D. & WESTLAKE, D. W. S. Effect of Amendments on the Microbial Utilization of Oil Applied to Soil. Applied Microbiology. 1974, 27 (1), pp. 166–171. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC379987/>. ISSN 1098-5336

187. JOHNSON, Carol R. & SCOW, Kate M. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. Biodegradation. 1999, 10 (1), pp 43–50. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1023/A:1008359606545>. ISSN 1572-9729

188. JORDÁN, Antonio: Manual de edafología [diapositivas PDF]. España, Sevilla: Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, Universidad de Sevilla. 2005. 143 diapositivas, col.

189. JØRGENSEN, K.S., PUUSTINEN, J. & SUORTTI, A.-M.. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. Environmental Pollution. 2000, 107 (2), pp. 245–254. [consulta 20 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00144-X>. ISSN 0269-7491

190. JOSHI, M. M. & LEE, S. Effect of Oxygen Amendments and Soil pH on Bioremediation of Industrially Contaminated Soils. Energy Sources, 1996, 18 (3), pp. 233–242. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/00908319608908763>. ISSN 00908312

191. KADRI, Tayssir, ROUISSI, Tarek, KAUR B., Satinder, CLEDON, Maximiliano, SARMA, Saurabhjyoti, VERMA, Mausam. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. Journal of Environmental Sciences, 2017, 51, pp. 52–74. [consulta 4 de Junio de 2018]. < https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>. ISSN 1001-0742

192. KANG, Seok-Whan, KIM, Young-Bum, SHIN, Jae-Dong & KIM, Eun-Ki. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sophorolipid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010, 160 (3), pp 780–790. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8580-5>. ISSN 1559-0291

193. KAO,C. M., CHEN, S. C., LIU, J. K., WANG, Y. S. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. Water Research. 2001, 35 (8), pp. 1951–1960. [consulta 22 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00482-6>. ISSN: 0043-1354

194. KARIGAR, Chandrakant S. & RAO, Shwetha S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. 2011, 2011, 11 pp. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187 >. ISSN 2090-0414

195. KARLAPUDI, Abraham Peele, VENKATESWARULU, T.C., TAMMINEEDI, Jahnavi, KANUMURI, Lohit, RAVURU, Bharath Kumar, DIRISALA , Vijaya ramu & KODALI, Vidya Prabhakar. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. Petroleum. 2018, 4 (3), pp. 241–249. [consulta 3 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>. ISSN 2405-6561

196. KÄSTNER, M. & MAHRO, B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Applied Microbiology and Biotechnology. 1996, 44 (5), pp 668–675. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF00172501>. ISSN 1432-0614

197. KÄSTNER, M., LOTTER, S., HEERENKLAGE, J., BREUER-JAMMALI, M., STEGMANN, R. & MAHRO, B. Fate of 14C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 1995, 43 (6), pp. 1128–1135. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF00166937>. ISSN 1432-0614

198. KÄSTNER, M., BREUER-Jammali, M., & MAHRO, B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Applied Microbiology and Biotechnology. 1994, 41 (2), pp. 267–273. [consulta 20 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF00186971>. ISSN 1432-0614

199. KAUPPI, Sari, SINKKONEN, Aki, ROMANTSCHUK, Martin. Enhancing bioremediation of diesel fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimalation and bioaugmenation. International Biodeterioration & Biodegradation. 2011, 65 (2), pp. 359–368. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.10.011>. ISSN 0964-8305

200. KAVITHA, Varadharajan, MANDAL, Asit Baran & GNANAMANI, Arumagam. Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: An approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 94, pp. 24–30. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.028>. ISSN 0964-8305

201. KHAN, Faisal I., HUSAIN, Tahir & HEJAZI, Ramzi. An overview and analysis of site remediation technologies. Journal of Environmental Management. 2004, 71 (2), pp. 95–122. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>. ISSN 0301-4797

202. KIM, Dockyu, KIM, Young-Soo, KIM, Seong-Ki, KIM, Si Wouk, ZYLSTRA, Gerben J., KIM, Young Min & KIM, Eungbin. Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus sp*. Strain DK17. Applied and Environmental Microbiology, 68 (7), pp. 3270–3278. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://aem.asm.org/content/68/7/3270.short>. ISSN 1098-5336

203. KIM, J., LEE, A. H., & CHANG, W. Enhanced bioremediation of nutrient-amended, petroleum hydrocarbon-contaminated soils over a cold-climate winter: The rate and extent of hydrocarbon biodegradation and microbial response in a pilot-scale biopile subjected to natural seasonal freeze-thaw temperatures. Science of The Total Environment. 2018, 612, pp. 903–913. [consulta 1 de Abril 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.227>. ISSN 0048-9697

204. KIRKWOOD, A. E., NALEWAJKO , C. & FULTHORPE, R. R. The Effects of Cyanobacterial Exudates on Bacterial Growth and Biodegradation of Organic Contaminants. Microbial Ecology. 2006, 51 (1), pp. 4–12. [consulta 14 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0058-y>. ISSN 1432-184X

205. KUIPER, Irene, LAGENDIJK, Ellen L., BLOEMBERG, Guido V., & LUGTENBERG, Ben J. J. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. The American Phytopathological Society. 2004, 17 (1), pp. 6–15. [consulta 28 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6> ISSN 1943-7706

206. KUMAR, Vivek, KUMAR, Manoj & PRASAD, Ram (editors). Microbial Action on Hydrocarbons. 2018 [consulta 18 de Marzo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5>. ISBN 978-981-13-1840-5.

207. KUMARI, Smita, REGAR, Raj Kumar & MANICKAM, Natesan. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. Bioresource Technology. 2018, 254, pp. 174–179. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>. ISSN 0960-8524

208. KUPPUSAMY, S., THAVAMANI, P., MEGHARAJ, M. & NAIDU, R. Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: A review of current research and recommendations for future directions. Environmental Technology & Innovation. 2015, 4, pp. 17–28. [consulta 14 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.04.001>. ISSN 2352-1864

209. LABUD, V., GARCIA, C., & HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere. 2007, 66 (10), pp. 1863–1871. [consulta 15 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>. ISSN 0045-6535

210. LAL, B. & KHANNA S. Degradation of crude oil by Acinetobacter calcoaceticus and Alcaligenes odorans. Journal of Applied Bacteriology, 1996, 81(4), pp. 355–362. [consulta 14 de Junio de 2018] <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03519.x>. ISSN 1365-2672

211. LAMPARTER, A., BACHMANN, J., GOEBEL, M.-O & WOCHE, S.K. Carbon mineralization in soil: Impact of wetting–drying, aggregation and water repellency. Geoderma. 2009, 150 (3–4), pp. 324–333. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.02.014>. ISSN 0016-7061

212. LANG, S. & WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 1999, 51 (1), pp 22–32. [consulta 9 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s002530051358>. ISSN 1432-0614

213. LANG, Siegmund. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2002, 7 (1-2), pp. 12–20. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00007-9>. ISSN 1359-0294

214. LEAHY, Joseph G. & COLWELL, Rita R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 1990, 54 (3), pp. 305–315. [consulta 12 de junio de 2018]. <https://mmbr.asm.org/content/54/3/305>. ISSN 10922172

215. LEE, Yunho, LEE, Yunhee & JEON, Che Ok. Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. 2019, 9: 860. pp. 1–13. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36165-x>. ISSN 2045-2322

216. LI, An-hua, XU, Mei-ying, SUN, Wei & SUN, Guo-ping. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas Aeruginosa* GIM 32 Using Different Substrates Including Molasses Distillery Wastewater. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011. 163 (5), pp 600–611. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9066-1>. ISSN 1559-0291

217. LI, Jing-Liang & CHEN, Bing-Hung. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Materials. 2009, 2 (1), pp. 76–94. [Consulta 7 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.3390/ma2010076>. ISSN 1996-1944

218. LIM, Mee Wei, LAU , Ee Von & POH, Phaik Eong. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. Marine Pollution Bulletin. 2016, 109 (1), pp. 14–45. [consulta 12 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>. ISSN 0025-326X

219. LIN, Zhong, ZHEN, Zhen, WU, Zhihao, YANG, Jiewen, ZHONG, Laiyuan, HU, Hangiao, LUO, Chunling, BAI, Jing, LI, Yongtao & ZHANG, Dayi. The impact on the soil microbial community and enzyme activity of two earthworm species during the bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 2016, 301, pp. 35–45. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.034> ISSN 0304-3894

220. LIN, Zhong, ZHEN, Zhen, REN, Lei, YANG, Jiewen, LUO, Chunling, ZHONG, Laiyuan., HU, Hanqiao, ZHANG, Yueqin, LI, Yongtao & ZHANG, Dayi. Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation

performance and bacterial community structure in red soil. Chemosphere, 2018, 196, pp. 467–475. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.177>. ISSN 0045-6535

221. LINDSTROM, Jon E., PRINCE, Roger C., CLARK, James C., GROSSMAN, Matthew J., YEAGER, Thomas R., BRADDOCK, Joan F. & BROWN, Edward J. Microbial Populations and Hydrocarbon Biodegradation Potentials in Fertilized Shoreline Sediments Affected by the T/V Exxon Valdez Oil Spill. Applied and Environmental Microbiology. 1991, 57 (9), pp. 2514–2522. [consulta PONER FECHA]. <https://aem.asm.org/content/57/9/2514>. ISSN 1098-5336

222. LIU, Boqun, JU, Meiting, LIU, Jinpeng, WU, Wentao & LI, Xiaojing. Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. Marine Pollution Bulletin. 2016, 106 (1–2), pp. 301–307. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>. ISSN 0025-326X

223. LIU, Qingmei, WANG, Qibin Li Ning, LIU, Dan, ZAN, Li, CHANG, Le, GOU , Xuemei & WANG, Peijin. Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills. Waste Management. 2018, 77, pp. 576–585. [consulta 8 de Enero de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.010>. ISSN 0956-053X

224. LOPES, Paulo Renato Matos, MONTAGNOLLI, Renato Nallin, CRUZ, Jaqueline Matos, CLARO, Elis Marina Turini & BIDOIA, Ederio Dino. Biosurfactants in Improving Bioremediation Effectiveness in Environmental Contamination by Hydrocarbons. In: KUMAR, V., KUMAR, M. & PRASAD, R. (eds) Microbial Action on Hydrocarbons. Springer, Singapore. 2018. [consulta 8 de Mayo de 2019] <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_2>. ISBN 978-981-13-1840-5.

225. LOZANO, Nelly. Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo. [en línea]. Tecnogestión una mirada al ambiente, 2005, 2 (1). < https://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/tecges/article/view/4326/6317>. ISNN 2346-2531

226. LV, Hang, SU, Xiaosi, WANG, Yan, DAI, Zhenxue & LIU, Mingyao. Effectiveness and mechanism of natural attenuation at a petroleum-hydrocarbon contaminated site. Chemosphere. 2018, 206, pp. 293–301. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.171>. ISSN 0045-6535

227. MA, Jie, YANG, Yongqi, DAI, Xiaoli, CHEN, Yetong, DENG, ZHOU, Hanmei Huijun, GUO, Shaohui & YAN, Guangxu. Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. Chemosphere. 2016, 150, pp. 17–23. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.123>. ISSN 0045-6535

228. MADDELA, Naga R., BURGOS, Ricardo, KADIYALA, Venkateswarlu, CARRION, Andrea R. & BANGEPPAGARI, Manjunatha. Removal of petroleum hydrocarbons from crude oil in solid and slurry phase by mixed soil microorganisms isolated from Ecuadorian oil fields. International Biodeterioration & Biodegradation. 2016, 108, pp. 85–90. [consulta 8 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.015>. ISSN 0964-8305

229. MADIGAN, Michael T., et al. Brock Biología de los microorganismos. 14ª ed. Madrid. Pearson Education, 2015. 1136 p. ISBN 978-84-9035-279-3

230. MAHMOUD , Ghada Abd-Elmonsef & BAGY, Magdy Mohmed Khalil. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. In: Kumar V., Kumar M., Prasad R. (eds) Microbial Action on Hydrocarbons. Springer, Singapore. 2018. pp. 299–320. [consulta 24 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_12>. ISBN 978-981-13-1840-5

231. MAIER, R. M. & SOBERÓN-Chávez, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2000, 54 (5). pp 625–633. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>. ISSN 1432-0614

232. MAILA, Mphekgo P. & CLOETE, Thomas E. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2004, 3 (4), pp. 349–360. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-6653-z>. ISSN 1572-9826

233. MAKI, Alan W. The Exxon Valdez oil spill: initial environmental impact assessment. Part 2. Environmental Science and Technology. 1991, 25 (1), pp 24–29. [consulta 19 de junio de 2018]. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00013a001>. ISSN 1520-5851

234. MAKKAR, Randhir S, CAMEOTRA, Swaranjit S. & BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express. 2011, 1 (5), pp. 1–19. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>. ISSN 2191-0855

235. MARGESIN, R, ZIMMERBAUER, A. & SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere. 2000, 40 (4), p. 339–346. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0>. ISSN 0045-6535

236. MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Applied and Environmental Microbiology. 2001, 67(7), pp. 3127–3133. [consulta 15 de Junio de 2018]. <http://aem.asm.org/content/67/7/3127>. ISSN 1098-5336

237. MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001, 56 (5-6), pp. 650–663. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>. ISSN 1432-0614

238. MARGESIN, Rosa, HÄMMERLE, Marion & TSCHERKO, Dagmar. Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time. Microbial Ecology. 2007, 53 (2), pp. 259–269. [consulta 12 de mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9136-7>. ISSN 1432-184X

239. MARGESIN, Rosa. Alpine Microorganisms: Useful Tools for Low-Temperature Bioremediation. The Journal of Microbiology. 2007, 45 (4). pp. 281–285. [consulta 23 de Junio de 2018]. <http://www.msk.or.kr/inc/download_FIDX.asp?FTYPE=5&FIDX=2572.>. ISSN 1976-3794

240. MARIN, J.A., HERNANDEZ, T. & GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. Environmental Research. 2005, 98 (2), pp. 185–195. [consulta 13 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.06.005>. ISSN 0013-9351

241. MARÍN-García, D. C., ADAMS, R. H. & HERNÁNDEZ-Barajas, R. Effect of crude petroleum on water repellency in a clayey alluvial soil. International Journal of Environmental Science and Technology. 2016, 13 (1), pp. 55–64. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0838-6>. ISSN 1735-2630

242. MARTIENSSEN , M. & SCHIRMER, M. Use of Surfactants to Improve the Biological Degradation of Petroleum Hydrocarbons in a Field Site Study. Environmental Technology. 2007, 28 (5), pp. 573–582. [consulta 6 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1080/09593332808618816>. ISSN 1479-487X

243. MARTIENSSEN, M. & SCHIRMER, M.. Use of Surfactants to Improve the Biological Degradation of Petroleum Hydrocarbons in a Field Site Study. Environmental Technology. 2007, 28 (5), pp. 573–582. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1080/09593332808618816>. ISSN 1479-487X

244. MARTIN, Alexander. Introducción a la microbiología del suelo.AGT Editor S.A., 1980. 491p. ISBN 9684620020

245. MARTÍNEZ Álvarez L. M., RUBERTO, L., LO BALBO, A. & MAC CORMACK, W. P. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. Science of The Total Environment. 2017, 590–591, pp. 194-203. [consulta 17 de Diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.204>. ISSN 0048-9697

246. MARTINKOSKY, Luke, BARKLEY, Jaimie, SABADELL, Gabriel, GOUGH, Heidi & DAVIDSON, Seana. Earthworms (*Eisenia fetida*) demonstrate potential for use in soil bioremediation by increasing the degradation rates of heavy crude oil hydrocarbons. Science of The Total Environment, 2017, 580. pp. 734–743. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.020>. ISSN 0048-9697

247. MARTINS Dellagnezze, Bruna, VASCONCELOS DE SOUSA, Gabriel, LOPES Martins, Laercio, FERREIRA Domingos, Daniela, LIMACHE, Elmer E.G., PANTAROTO DE VASCONCELLOS, Suzan, FEITOSA Da Cruz, Georgiana & MAIA De Oliveira,Valéria. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. Marine Pollution Bulletin. 2014, 89 (1-2), pp. 191–200. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>. ISSN 0025-326X

248. MCCARTY, P. L. Engineering concepts for in situ bioremediation. Journal of Hazardous Materials. 1991, 28 (1-2), pp. 1–11. [consulta 1 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0304-3894(91)87002-J>. ISSN 0304-3894

249. MCNALLY, Dan L., MIHELCIC, James R. & LUEKING, Donald R. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. Chemosphere. 1999, 38 (6), pp. 1313-1321. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00532-3>. ISSN 0045-6535

250. MCNALLY, Dan L., MIHELCIC, James R. & Lueking, Donald R. Biodegradation of Three- and Four-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Aerobic and Denitrifying Conditions. Environmental Science & Technology. 1998, 32 (17), pp. 2633–2639. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1021/es980006c>. ISSN 1520-5851

251. MEGHARAJ, M., VENKATESWARLU, K. & NAIDU, R. Bioremediation. Reference Module in Biomedical Sciences. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). 2014, Pages 485-489. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01001-0>. ISBN 978-0-12-386455-0

252. MENÉNDEZ Vega, Demelza, GALLEGO, José Luis R., PELAEZ, Ana Isabel, FERNÁNDEZ de Córdoba, Gonzalo, MORENO, Javier, MUÑOZ, Daniel & SÁNCHEZ, Jesús. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. European Journal of Soil Biology. 2007, 43 (5–6), pp. 310–321. [Consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.03.005>. ISSN 1164-5563

253. MILIĆ, Jelena S., BEŠKOSKI, Vladimir P., ILIĆ, Mila V., ALI, Samira A. L. GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, Gordana Đ. & VRVIĆ, Miroslav M. Bioremediation of soils heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. Journal of the Serbian Chemical Society, 2009, 74 (4), pp. 455–460. [consulta 13 de Junio de 2018]. <https://www.shd.org.rs/JSCS/Vol74/No4/10_4131_3846.pdf>. ISSN 1820-7421

254. MISHRA, Sanjeet, JYOT, Jeevan, KUHAD, Ramesh Chander & LAL, Banwari. In Situ Bioremediation Potential of an Oily Sludge-Degrading Bacterial Consortium. Current Microbiology, 2001, 43 (5), pp 328–335. <https://doi.org/10.1007/s002840010311>. ISSN 1432-0991

255. MITTAL, A. & SINGH, P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. Indian Journal of Experimental Biology. 2009, 47 (9), pp. 760–765. [consulta 26 de Mayo de 2019]. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5981>. ISSN 0975-1009

256. MNIF, Inès, MNIF, Sami, SAHNOUN, Rihab, MAKTOUF, MAKTOUF, Sameh, YOUNES, Ayedi, ELLOUZE-Chaabouni , Semia & GHRIBI, Dhouha. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. Environmental Science and Pollution Research. 2015, 22 (19), pp 14852–14861. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4488-5>. ISSN 1614-7499

257. MNIF, Sami, CHEBBI, Alif, MHIRI, Najla, SAYADI, Sami & CHAMKHA , Mohamed.Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. Process Safety and Environmental Protection. 2017, 107, 2017, pp. 44–53. [consulta 3 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.01.023>. ISSN 0957-5820

258. MOHAMMED, A. B. Abeer, TAYEL, Ahmed A. & ELGUINDY, Nihal M. Production of new rhamnolipids Rha C16-C16 by *Burkholderia sp*. through biodegradation of diesel and biodiesel. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2018, 7 (4), pp. 492–498. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.05.003>. ISSN 2314-8535

259. MOHAMMED, A.B. Abeer, TAYEL, Ahmed A. & ELGUINDY, Nihal M. Production of new rhamnolipids Rha C16-C16 by Burkholderia sp. through biodegradation of diesel and biodiesel. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2018, 7 (4), pp. 492–498. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.05.003>. ISSN 2314-8535

260. MOHAMMED, N., ALLAYLA, R. I., NAKHLA, G. F., FAROOQ, S., & HUSAIN, T. State-of-the-art review of bioremediation studies. Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology. 1996, 31 (7), pp. 1547–1574. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/10934529609376442>. ISSN 15324117

261. MOHAN, S. Venkata, PURUSHOTHAM Reddy, B. & SARMA, P.N. Ex situ slurry phase bioremediation of chrysene contaminated soil with the function of metabolic function: Process evaluation by data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental methodology (DOE). Bioresource Technology. 2009, 100 (1), pp. 164–172. [consulta 5 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.020>. ISSN 0960-8524

262. MOLINA, M. Carmen, GONZÁLEZ, Natalia, BAUTISTA, L. Fernando, SANZ, Raquel, SIMARRO, Raquel, SÁNCHEZ, Irene, SANZ, José L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. Biodegradation. 2009, 20 (6), pp. 789–800. [consulta 19 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9267-x>. ISSN 1572-9729

263. MOLITERNI Merlo, Elena. Biorremediación acelerada de suelos contaminados con hidrocarburos tipo diesel. Memoria (Tesis Doctoral), Cuidad Real, España: Universidad de Castilla – La Mancha - Departamento de Ingeniería Química – Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, 2015, 262p. <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/8877>

264. MORÁN, Ana C., OLIVERA, Nelda, COMMENDATORE, Marta, ESTEVES. José L. & SIÑERIZ, Faustino. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from Bacillus subtilis O9. Biodegradation. 2000, 11 (1), pp 65–71. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1023/A:1026513312169>. ISSN 1572-9729

265. MORGAN, Philip & WATKINSON, Robert James. Hydrocarbon Degradation in Soils and Methods for Soil Biotreatment. Journal Critical Reviews in Biotechnology. 1989, 8 (4), pp. 305–333. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.3109/07388558909148196>. ISSN 1549-7801

266. MORGAN, Philip, & WATKINSON, Robert J. Factors Limiting the Supply and Efficiency of Nutrient and Oxygen Supplements for the In Situ Biotreatment of Contaminated Soil and Groundwater. Water Research. 1992, 26 (1), pp. 73–78. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90113-I>. ISSN 0043-1354

267. MOUAFI, Foukia E., ELSOUD, Mostafa M.Abo & MOHARAM, Maysa E.. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. Biotechnology Reports. 2016, 9, pp. 31–37. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003>. ISSN 2215-017X

268. MOYANO, F. E., VASILYEVA, N., BOUCKAERT, L., COOK, F., CRAINE, J., CURIEL Yuste, J., DON, A., EPRON, D., FORMANEK, P., FRANZLUEBBERS, A., ILSTEDT, U., KÄTTERER, T., ORCHARD, V., REICHSTEIN, M., REY, A., RUAMPS, L., SUBKE, J. A., THOMSEN, I. K. & CHENU, C. The moisture response of soil heterotrophic respiration: interaction with soil properties. Biogeosciences. 2012, 9 (3), pp. 1173–1182. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.5194/bg-9-1173-2012>. ISSN 1726-4189

269. MOYANO, Fernando E., MANZONI, Stefano & CHENUD, Claire. Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models. Soil Biology and Biochemistry. 2013, 59, pp. 72–85. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002>. ISSN 0038-0717

270. MOZO, I., LESAGE, G., YIN, J., BESSIERE, Y., BARNA, L. & SPERANDIO, M. Dynamic modeling of biodegradation and volatilization of hazardous aromatic substances in aerobic bioreactor. Water Research. 2012, 46 (16), pp. 5327–5342. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.014>. ISSN 0043-1354

271. MROZIK, Agnieszka & PIOTROWSKA-Seget, Zofia. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiological Research. 2010, 165 (5), pp. 363–375. [consulta 16 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001>. ISSN 0944-5013

272. MULKINS-Phillips, G. J. & STEWART, James E.. Effect of Environmental Parameters on Bacterial Degradation of Bunker C Oil, Crude Oils, and Hydrocarbons. Applied Microbiology. 1974, 28 (6), pp. 915–922. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/28/6/915>. ISSN 1098-5336

273. MÜLLER, Markus Michael, KÜGLER, Johannes H., HENKEL, Marius, GERLITZKI, Melanie, HÖRMANN, Barbara, PÖHNLEIN, Martin, SYLDATK, Christoph & HAUSMANN, Rudolf. Rhamnolipids—Next generation surfactants?. Journal of Biotechnology. 2012, 162 (4), pp. 366–380. [consulta 9 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>. ISSN 0168-1656

274. MULLIGAN, Catherine N. & YONG, Raymond N.. Natural attenuation of contaminated soils. Environment International, 2004, 30 (4), pp. 587–601. [consulta 8 de junio de 2018].< https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.11.001. >. ISSN 0160-4120

275. MULLIGAN, Catherine N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2009, 14 (5), pp. 372–378. [consulta 6 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.005>. ISSN 1359-0294

276. NAMKOONG, Wan, HWANG, Eui-Young, PARK , Joon-Seok & CHOI, Jung-Young. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environmental Pollution. 2002, 119 (1), pp. 23–31. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00328-1>. ISSN 0269-7491

277. NAVAL Facilities Engineering Service Center. Biopile Design and Construction Manual. BATTELLE Environmental Restoration Department, Columbus, Ohio. 1996. <https://clu-in.org/download/techfocus/bio/Biopile-design-and-construction-1996-tm-2189.pdf>. [consulta 26 de Junio de 2018]. 132 paginas [PDF]

278. NAYAK, Anand S., VIJAYKUMAR, M.H. & KAREGOUDAR, T.B. Characterization of biosurfactant produced by Pseudoxanthomonas sp. PNK-04 and its application in bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation.

2009, 63 (1), pp. 73–79. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.07.003>. ISSN 0964-8305

279. NEU, Thomas R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiological Reviews. 1996, 60 (1), pp. 151–166. [consulta 7 de Mayo de 2019]. <https://mmbr.asm.org/content/60/1/151>. ISSN 1098-5557

280. NIKOLOPOULOU, M., PASADAKISB, N. & KALOGERAKIS, N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. Desalination. 2007, 211 (1–3), pp. 286–295. [consulta 28 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.02.095>. ISSN 0011-9164

281. NIKOLOPOULOU, M., PASADAKISN., NORF, H. & KALOGERAKIS, N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. Marine Pollution Bulletin. 2013, 77 (1–2), pp. 37–44. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.038>. ISSN 0025-326X

282. NITSCHKE, Marcia & PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Química Nova. 2002, 25 (5), pp. 772–776. [consulta 6 de Mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>. ISSN 1678-7064

283. NOEL, Cécile, GOURRY, Jean-Christophe, DEPARIS, Jacques, BLESSING, Michaela, IGNATIADIS, Ioannis, & GUIMBAUD, Christophe. Combining Geoelectrical Measurements and CO2 Analyses to Monitor the Enhanced Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soils: A Field Implementation. Applied and Environmental Soil Science. 2016. pp. 1–15. [consulta 23 de Junio de 2018]. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1480976>. ISSN 1687-7675

284. NWINYI, Obinna C., AJAYI, Oluseyi O. & AMUND, Olukayode O. Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. Brazilian Journal of Microbiology. 2016, 47 (3), pp. 551-562. [consulta 30 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>. ISSN 1517-8382

285. NZILA, A. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. Environmental Pollution. 2018, 239, pp. 788–802. [consulta 24 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074>. ISSN 0269-7491

286. OBI, linda U., ATAGANA, Harrison I. & ADELEK, Rasheed A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. Springer Plus, 2016, 5 (1) [consulta 12 de junio de 2018] <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3617-z>. ISSN 2193-1801

287. OJEWUMI, Modupe Elizabeth, ANENIH, Ejemen Valentina, TAIWO, Olugbenga Samson, ADEKEYE, Bosede Temitope, AWOLU , Olugbenga Olufemi & OJEWUMI, Emmanuel Omotayo. A Bioremediation Study of Raw and Treated Crude Petroleum Oil Polluted Soil with *Aspergillus niger* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Ecological Engineering. 2018, 19 (2), pp. 226–235. [consulta 14 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.12911/22998993/83564>. ISSN 2299-8993

288. OKPARANMA, Reuben N., AZUAZU, Ikeabiama & AYOTAMUNO, Josiah M. Assessment of the effectiveness of on site ex situ remediation by enhanced natural attenuation in the Niger Delta region, Nigeria. Journal of Environmental Management. 2017, 204, Part 1, pp. 291–299. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.005>. ISSN 0301-4797

289. ONBASLI, Dilsad & ASLIM, Belma. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas spp*. Journal of Environmental Biology. 2009, 30 (1), pp. 161–163. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <http://www.jeb.co.in/index.php?page=issue_toc&issue=200901_jan09_spl> ISSN 0254-8704

290. ORTIZ, Irene et al.: Técnicas de recuperación de suelos contaminados [diapositivas PDF]. España, Madrid: Círculo de innovación en tecnologías medioambientales y energías (CITME), Universidad de Alcalá. 2007. 109 p, col.

291. OUDOT, J. Rates of microbial degradation of petroleum components as determined by computerized capillary gas chromatography and computerized mass spectrometry. Marine Environmental Research. 1984, 13 (4), pp.277–302. [consulta 13 de Mayo de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90034-5>. ISSN 0141-1136

292. OUDOT, J., MERLIN, F. X. & PINVIDIC, P. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. Marine Environmental Research. 1998, 45 (2), pp. 113–125. [consulta 11 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00024-X>. ISSN 0141-1136

293. OWSIANIAK, Mikołaj, CHRZANOWSKI, Łukasz, SZULC, Alicja, STANIEWSKI, Jacek, OLSZANOWSKI, Andrzej, OLEJNIK-SCHMIDT, Agnieszka K. & HEIPIEPER, Hermann J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. Bioresource Technology. 2009, 100 (3), pp. 1497–1500. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.028>. ISSN 0960-8524

294. OWSIANIAK, Mikołaj, CHRZANOWSKI, Łukasz, SZULC, Alicja, STANIEWSKI, Jacek, OLSZANOWSKI, Andrzej, OLEJNIK-SCHMIDT, Agnieszka K. & HEIPIEPER, Hermann J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. Bioresource Technology. 2009, 100 (3), pp. 1497–1500. [consulta 15 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.028>. ISSN 0960-8524

295. PACWA-Płocinicza, Magdalena, PŁAZA, Grażyna A., PIOTROWSKA-Seget, Zofia & CAMEOTRA, Swaranjit Singh. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. International Journal of Molecular Science. 2011, 12 (1), pp. 633–654. [consulta 8 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>. ISSN 1422-0067

296. PACWA-Płociniczak, Magdalena, PŁAZA, Grażyna Anna & PIOTROWSKA-Seget, Zofia. Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. Applied Soil Ecology. 2016, 105, pp. 76–85. [consulta 13 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.005>. ISSN 0929-1393

297. PAUDYN, Krysta., RUTTER, Allison, ROWE, Kerry R. & POLAND, John S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. Cold Region Science Technology. 2008, 53 (1), pp. 102–114. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2007.07.006>. ISSN 0165-232X

298. PAULINO, Bruno Nicolau, PESSÔA, Marina Gabriel, RODRIGUES Mano, Mario Cezar, MOLINA, Gustavo, NERI-Numa, Iramaia Angélica & PASTORE, Glaucia Maria. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016, 100 (24), pp 10265–10293. [consulta 9 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>. ISSN 1432-0614

299. PAVEL, Lucian Vasile & GAVRILESCU, Maria. Overview of ex situ decontamination techniques for soil cleanup. Environmental Engineering and Management Journal. 2008, 7 (6), pp. 815–834. [consulta 26 de Junio de 2018]. <http://www.eemj.icpm.tuiasi.ro/issues/vol7/vol7no6.htm>. ISSN 1843-3707

300. PAWAR, Rakesh M. The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). Journal of Bioremediation and Biodegradation. 2015, 6 (3), pp. 1–14. [consulta 22 de Junio de 2018]. <10.4172/2155-6199.1000291>. ISSN 2155-6199

301. PEDRA, Filipe, POLO, Alfredo, RIBEIRO, Alexandra & DOMINGUES, Herminia. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry. 2007, 39 (6), pp. 1375–1382. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.12.014>. ISSN 0038-0717

302. PEI, Xiao-Hong, ZHAN, Xin-Hua, WANG, Shi-Mei, LIN , Yu-Suo & ZHOU, Li-Xiang. Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a Sphingomonas Strain. Pedosphere. 2010, 20 (6), pp. 771–779. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60067-7>. ISSN 1002-0160

303. PEIXOTO, R. S., VERMELHO, A. B. & ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. Enzyme Research. 2011, 2011, 7 pp. [consulta 25 de Mayo de 2019]. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/475193>. Article ID 475193

304. PÉREZ Silva, Rosa María, CAMACHO Pozo, Miladis I., GÓMEZ Montes de Oca, José Manuel, ÁBALOS Rodríguez, Arelis, VIÑAS, M. & CANTERO Moreno, Domingo. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Revista CENIC, Ciencias biológicas, 2008, 39 (1), pp. 44–51. [consulta 12 de Junio de 2018]. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181214889004> ISSN 0253-5688

305. PETROVÁ, Šárka, REZEK, Jan, SOUDEK, Petr & VANĚK, Tomáš. Preliminary study of phytoremediation of brownfield soil contaminated by PAHs. Science of The Total Environment, 2017, 599–600, pp. 572–580. [consulta 1 de Junio 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.163>. ISSN 0048-9697

306. PI, Yongrui, CHEN, Bing, BAO, Mutai, FAN, Fuqiang, CAI, Qinhong, ZE, Lv & ZHANG, Baiyu. Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus sp.* Bioresource Technology. 2017, 232, pp. 263–269. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007>. ISSN 0960-8524

307. PINO-Herrera, Douglas O., PÉCHAUD, Yoan, HUGONOTE, David, ESPOSITO, Giovanni, van HULLEBUSCH, Eric D. & OTURAN, Mehmet A. Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview. Journal of Hazardous Materials. 2017, 339, pp. 427–449. [consulta 27 de Junio de 2018] <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.013>. ISSN 0304-3894

308. PIZARRO-Tobías, P., NIQUI, J. L., ROCA, A., SOLANO, J., FERNÁNDEZ, M., BASTIDA, F. & RAMOS, J. L. Field trial on removal of petroleum-hydrocarbon pollutants using a microbial consortium for bioremediation and rhizoremediation. Environmental Microbiology Reports, 2014, 7 (1), 85–94. [consulta 15 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12174>. ISSN 1758-2229

309. PLAZA, G., ULFIG, K., WORSZTYNOWICZ, A., MALINA, G., KRZEMINSKA, B. & BRIGMON, R. L. Respirometry for Assessing the Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons. Environmental Technology. 2005, 26 (2), pp. 161–170. [consulta 15 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1080/09593332608618569>. ISSN 1479-487X

310. PŁAZA, Grażyna A., WYPYCH, Jacek, BERRY, Christopher & BRIGMON, Robin L. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007, 23 (4), pp 533–542. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9256-8>. ISSN 1573-0972

311. POI, Gregory, ABURTO-Medina, Arturo, MOK, Puah Chum, BALL, Andrew S. & SHAHSAVARI, Esmaeil. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium.Ecological Engineering. 2017, 102, pp. 64–71. [consulta 13 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.048>. ISSN 0925-8574

312. PORNSUNTHORNTAWEE, Orathai, WONGPANIT, Panya, CHAVADEJ, Sumaeth, ABE, Masahiko & RUJIRAVANIT, Ratana. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. Bioresource Technology. 2008, 99 (6), pp. 1589–1595. [consulta 10 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.020>. ISSN 0960-8524

313. QUYUM, A., ACHARI, G. & GOODMAN, R. Effect of wetting and drying and dilution on moisture migration through oil contaminated hydrophobic soils. Science of the Total Environment. 2002, 296 (1-3), pp. 77–87. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00046-3>. ISSN 0048-9697

314. RAHMAN, K. S. M., RAHMAN, Thahira J., KOURKOUTAS, Y., PETSAS, I., MARCHANT, R. & BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technology. 2003, 90 (2), pp. 159–168. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00114-7>. ISSN 0960-8524

315. RAHMAN, K.S.M, RAHMAN, Thahira J, LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. & BANAT, I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology, 2002, 85 (3), pp. 257–261. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00119-0>. ISSN 0960-8524

316. RAYMOND, R. L., HUDSON, J. 0. & JAMISON, V. W. Oil Degradation in Soil. Applied And Environmental Microbiology. 1976, 31 (4), pp. 522–535. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/31/4/522>. ISSN 1098-5336

317. RAYMOND, T., KING, C. K., RAYMOND, B., STARK, J. S. & SNAPE, I. Chapter 14 - Oil Pollution in Antarctica. Oil Spill Science and Technology (2nd Edition). 2017, pp. 759–803. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809413-6.00014-X>. ISBN 978-0-12-809413-6. [consulta 25 de Junio de 2018]

318. REDDY, M. Srikanth, NARESH, B., LEELA, T., PRASHANTHI, M., MADHUSUDHAN, N.Ch., DHANASRI, G. & DEVI, Prathibha. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of Brevibacillus sp. Bioresource Technology. 2010, 101 (20), pp. 7980–7983. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.054>. ISSN 0960-8524

319. REINEKE, Walter. Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials of Microorganisms. In: Beek B. (eds) Biodegradation and Persistence. The Handbook of Environmental Chemistry (Vol. 2 Series: Reactions and Processes), vol 2 / 2K. Springer, Berlin, Heidelberg. 2001, pp. 1–161. [consulta 23 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/10508767_1>. ISBN 978-3-540-68096-3

320. RIFFALDI, R., LEVI-Minzi, R., CARDELLI, R., PALUMBO, S. & SAVIOZZI, A. Soil Biological Activities in Monitoring the Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Soil. Water, Air, and Soil Pollution. 2006, 170 (1–4), pp 3–15. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-6328-1>. ISSN 1573-2932

321. RIKE, A. G., BØRRESEN, M. & INSTANES, A. Response of cold-adapted microbial populations in a permafrost profile to hydrocarbon contaminants. Polar Record. 2001, 37 (202), pp. 239–248. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1017/S0032247400027261>. ISSN 1475-3057

322. RIKE, Anne Gunn, HAUGEN, Kjetil Braathen, BØRRESEN, Marion, ENGENE, Bjarne & KOLSTAD, Per. (2003). In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. Cold Regions Science and Technology. 2003, 37 (2), pp. 97–120. [consulta 25 Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0165-232X(03)00005-3>. ISSN 0165-232X

323. RIVKINA, E. M., FRIEDMANN, E. I., McKAY, C. P. & GILICHINSKY, D. A. Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66 (8), pp. 3230–3233. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/66/8/3230.full>. ISSN 1098-5336

324. ROBLES-González, Ireri V., FAVA, Fabio & POGGI-VARALDO, Héctor M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. Microbial Cell Factories. 2008, 7 (5), 16 pp. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-5>. ISSN 1475-2859

325. ROCHA, Carlos A, PEDREGOSA, Ana M & LABORDA, Fernando. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. AMB Express. 2011, 1 (9), 10 pp. [consulta 26 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-9>. ISSN 2191-0855

326. ROCKNE, Karl J., CHEE-SANFORD, Joanne C., SANFORD, Robert A., HEDLUND, Brian P., STALEY, James T. & STRAND, Stuard E. Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4), pp. 1595–1601. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/66/4/1595>. ISSN 10985336

327. RODRIGUEZ C., Jacobo, DENDOOVEN, Luc, ALVAREZ B., Dioselina & CONTRERAS R., Silvia M. Potential of earthworms to accelerate removal of

organic contaminants from soil: A review. Applied Soil Ecology, 2014, 79, pp. 10–25. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.010>. ISSN 0929-1393

328. RON, Eliora Z. & ROSENBERG, Eugene. Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology. 2001, 3 (4), pp. 229–236. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>. ISSN 1462-2920

329. RON, Eliora Z. & ROSENBERG, Eugene. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. Current Opinion in Biotechnology. 2014, 27, pp. 191–194. [consulta 15 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.004>. ISSN 0958-1669

330. ROONEY, Alejandro P., PRICE, Neil P.J., RAY, Karen J. & KUO, Tsung-Min. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. FEMS Microbiology Letters banner. 2009, 295 (1), pp. 82–87. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01581.x>. ISSN 1574-6968

331. ROS, M., RODRÍGUEZ, I., GARCÍA, C. & HERNÁNDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. Bioresource Technology. 2010, 101 (18), pp. 6916–6923. [consulta 19 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.126>. ISSN 0960-8524

332. ROSINI, Frederick. Hydrocarbons in petroleum. Journal of chemical Education. 1960, 37 (11), pp. 554–561. [consulta 20 de Abril de 2018]. <https://doi.org/10.1021/ed037p554>

333. ROY, J. L. & McGILL, W. B. Investigation into mechanisms leading to the development, spread and persistence of soil water repellency following contamination by crude oil. Canadian Journal of Soil Science. 2000, 80 (4), pp. 595–606. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.4141/S99-091>. ISSN 1918-1841

334. ROY, Julie L., MCGILL, William B. & RAWLUK, Marvin D. Petroleum residues as water-repellent substances in weathered nonwettable oil-contaminated soils. Canadian Journal of Soil Science. 1999, 79 (2), pp. 367–380. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.4141/S97-040> ISSN 00084271

335. RUSSELL, N. J., HARRISSON, P., JOHNSTON, I. A., JAENICKE, R., ZUBER, M., FRANKS, F. & WYNN-Williams, D. Cold Adaptation of Microorganisms [and Discussion]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 1990, 326 (1237), pp. 595–611. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://www.jstor.org/stable/2398707>. ISSN 1471-2970

336. SAADOUN, Ismail. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. Journal of Basic Microbiology. 2002, 42 (6), pp. 420–428. [consulta 3 de mayo de 2018]. <https://doi.org/10.1002/1521-4028(200212)42:6<420::AID-JOBM420>3.0.CO;2-W> . ISSN 1521-4028

337. SABATÉ, J. VIÑAS, M. SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. International Biodeterioration & Biodegradation. 2004, 54(1), pp. 19–25. [consulta 16 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2003.12.002>. ISSN 0964-8305

338. SÁEZ, César. Control de derrames de hidrocarburos en suelos y cursos de agua. HSEC [en línea]. 2013. <http://www.emb.cl/hsec/articulo.mvc?xid=128>

339. SAFDARI, M.-S., KARIMINIA, H.-R., RAHMATI, M., FAZLOLLAHI, F., POLASKO, A., MAHENDRA, S., WILDING, W. V. & FLETCHER, T. H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. Journal of Hazardous Materials. 2018, 342, pp. 270–278. [consulta 22 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.044>. ISSN 0304-3894

340. SAFIYANU, I., ABDULWAHID I., A., ABUBAKAR, US & SINGH M., Rita. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. Review on comparative study on bioremediation for oil spills using microbes, 2015, 6, pp. 783–790. [consulta 10 de Junio de 2018]. <https://www.researchgate.net/publication/298170128_Review_on_comparative_study_on_bioremediation_for_oil_spills_using_microbes>. ISSN 0975-8585

341. SAJNA, K. V., SUKUMARAN, R. K., GOTTUMUKKALA, L. D. & Pandey, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma sp*. NII 08165 or its culture broth. Bioresource Technology. 2015, 191, pp. 133–139. [consulta 26 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.126>. ISSN 0960-8524

342. SALMINEN, Jani M., TUOMI, Pirjo M., SUORTTI, Anna-Mari & JØRGENSEN, Kirsten S. Potential for Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Boreal Subsurface. Biodegradation. 2004, 15 (1), pp. 29–39. [consulta 24 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000009954.21526.e8>. ISSN 1572-9729

343. SANSCARTIER, D., ZEEB, B., KOCH, I. & REIMER, K. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. Cold Regions Science and Technology. 2009, 55 (1), pp. 167–173. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2008.07.004>. ISSN 0165-232X

344. SANTOS, Danyelle Khadydja F., RUFINO, Raquel D., LUNA, Juliana M., SANTOS, Valdemir A. & SARUBBO, Leonie A. Biosurfactants: Multifunctional

Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences. 2016, 17 (3): 401, 31 pp. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>. ISSN 1422-0067

345. SANTOS, Eder C., JACQUES, Rodrigo J.S., BENTO, Fátima M., PERALBA, Maria do Carmo R., SELBACH, Pedro A., SÁ, Enilson L.S. & CAMARGO, Flávio A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated Pseudomonas sp. Bioresource Technology. 2008, 99 (7), pp. 2644–2649. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.050>. ISSN 0960-8524

346. SARKAR, Dibyendu, FERGUSON, Michael, DATTA, Rupali & BIRNBAUM, Stuart. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution. 2005, 136 (1), pp. 187–195. [consulta 14 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.09.025>. ISSN 0269-7491

347. SCELZA, Rosalia, RAO, Maria Antonietta & GIANFREDA, Liliana. Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. Soil Biology and Biochemistry. 2007, 39 (6), pp. 1303–1317. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.12.006>. ISSN 0038-0717

348. SCHERRER, P. & MILLE, G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. Marine pollution bulletin. 1989, 20(9), pp. 430–432. [consulta 31 de Mayo de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0025-326X(89)90061-1>. ISSN 0025-326X

349. SCHOEFS, O., PERRIER, M. & SAMSON, R. Estimation of contaminany depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. Applied Microbiology and Biotechnology. 2004, 64 (1), pp. 53 – 61. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1423-3>. ISSN 1432-0614

350. SCRAGG, Alan. Biotecnología ambiental. x edición (ed.). Acribia S.A., 2001. 320 p, ISBN 8420009547

351. SEGURA, Ana & RAMOS, Juan Luis. Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants. Current Opinion in Biotechnology. 2013, 24 (3), pp. 467–473. [consulta 15 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.011>. ISSN 0958-1669

352. SEMBOUNG Lang, F, TARAYRE, C., DESTAIN, J., DELVIGNE, F., DRUART, P., ONGENA, M. & THONART, P. The Effect of Nutrients on the Degradation of Hydrocarbons in Mangrove Ecosystems by Microorganisms. International Journal of Environmental Research. 2016, 10 (4), pp. 583–592.

[consulta 23 de Junio de 2018]. <https://ijer.ut.ac.ir/article_59903.html>. ISSN 2008-2304

353. SEMPLE, K. T., MORRISS, A. W. J. & PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. European Journal of Soil Science. 2003, 54 (4). pp. 809–818. [consulta 12 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x>. ISSN 1365-2389

354. SEMPLE, K. T., REID, B. J. & FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution. 2001, 112 (2), pp. 269–283. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00099-3>. ISSN 0269-7491

355. SEO, Jong-Su, KEUM, Young-Soo & LI, Qing X. *Mycobacterium aromativorans* JS19b1T degrades phenanthrene through C-1,2, C-3,4 and C-9,10 dioxygenation pathways. 2012, International Biodeterioration & Biodegradation. 2012, 70, pp. 96–103. [consulta 30 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.02.005>. ISSN 0964-8305

356. SERRANO, A., TEJADA, M., GALLEGO, M. & GONZALEZ, J. L. Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. Science of The Total Environment. 2009, 407 (13), pp. 4056–4061. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.017>. ISSN 0048-9697

357. SHARABI, N.E.-D. & BARTHA,R. Testing some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59 (4), pp.1201–1205. [consulta 9 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/59/4/1201/article-info>. ISSN 1098-5336

358. SHARMA, Anamika, SINGH, Shashi Bala, SHARMA, Richa, CHAUDHARY, Priyanka, PANDEY, Alok Kumar, ANSARI, Raunaq, VASUDEVAN, Venugopal, ARORA, Anju, SINGH, Surender, SAHA, Supradip & NAIN, Lata. Enhanced biodegradation of PAHs by microbial consortium with different amendment and their fate in in-situ condition. Journal of Environmental Management. 2016, 181, pp. 72–7361. [consulta 11 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.024>. ISSN 0301-4797

359. SICILIANO, Steven D., FORTIN, Nathalie, MIHOC, Anca, WISSE, Gesine, LABELLE, Suzanne, BEAUMIER, Danielle, OUELLETTE, Danielle, ROY, Real, WHYTE, Lyle G., BANKS, M. Kathy, SCHWAB, Paul, LEE, Ken & GREER, Charles W. Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. Applied and Environmental Microbiology. 2001, 67 (6), pp. 2469–2475. [consulta 23 de junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/67/6/2469.long#sec-9>. ISSN 1098-5336

360. SILVA, Rita De Cássia F. S., ALMEIDA, Darne G., RUFINO, Raquel D., LUNA, Juliana M., SANTOS, Valdemir A. & SARUBBO, Leonie Asfora. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil

Spills. International Journal of Molecular Science. 2014, 15(7), pp. 12523–12542. [consulta 3 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>. ISSN 1422-0067

361. SILVA-Castro, G. A., RODRIGUEZ-Calvo, A., LAGUNA, J., GONZÁLEZ-López, J. & CALVO, C. Autochthonous microbial responses and hydrocarbons degradation in polluted soil during biostimulating treatments under different soil moisture. Assay in pilot plant. International Biodeterioration & Biodegradation. 2016, 108, pp. 91–98. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.009>. ISSN 0964-8305

362. SILVA-Castro, G. A., UAD, I., GÓNZALEZ-López, J., FANDIÑO, C. G., TOLEDO, F. L. & CALVO, Concepción. Application of selected microbial consortia combined with inorganic and oleophilic fertilizers to recuperate oil-polluted soil using land farming technology. Clean Technologies and Environmental Policy. 2012, 14 (4), pp 719–726. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s10098-011-0439-0>. ISSN 1618-9558

363. SMYTH, T. J. P., PERFUMO, A., MARCHANT , R. & BANAT, I. M. Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. In: Timmis K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. [consulta 8 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_291>. ISBN 978-3-540-77587-4

364. SOLIMAN, R. M., EL-GENDY, N. S., DERIASE, S. F., FARAHAT, L. A., & MOHAMED, A. S. The Evaluation of Different Bioremediation Processes for Egyptian Oily Sludge Polluted Soil on a Microcosm Level. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects. 2013, 36 (3), pp. 231–241. [consulta 20 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1080/15567036.2012.711799>. ISSN 1556-7230

365. SONG, X., XU, Y., LI, G., ZHANG, Y., HUANG, T. & HU, Z. Isolation, characterization of *Rhodococcus sp.* P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. 2011, 62 (10), pp. 2122–2128. [consulta 26 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.07.013>. ISSN0025-326X

366. SOUZA, Ellen Cristina, VESSONI-PENNA, Thereza Christina & DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 89, pp. 88–94. [consulta 3 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>. ISSN 0964-8305

367. SPEIGHT, James G. The chemistry and technology of petroleum. 5th Ed. Florida, US: CRC Press. 2014, 953 p. [consulta 21 de Abril de 2018]. <https://doi.org/10.1201/b16559>. ISBN 9781439873892

368. SPEIGHT, James G. Removal of Organic Compounds From the Environment Chapter 9. In: Environmental Organic Chemistry for Engineers.

2017, Pages 387–432. [consulta 17 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804492-6.00009-5>. ISBN 978-0-12-804492-6

369. SPEIGHT, James G. & EL-GENDY, Nour Shafik. Petroleum Composition and Properties– Chapter 1. Introduction to Petroleum Biotechnology. 2018a, pp. 103–130. [consulta 15 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805151-1.00004-7>. ISBN 978-0-12-805151-1

370. SPEIGHT, James G. & EL-GENDY, Nour Shafik. Bioremediation of Contaminated Soil - Chapter 10. Introduction to Petroleum Biotechnology. 2018b, pp. 361–417. [consulta 4 de Julio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805151-1.00010-2>. ISBN 978-0-12-805151-1

371. SPONZA, Delia Teresa & GOK, Oguzhan. Effects of sludge retention time (SRT) and biosurfactant on the removal of polyaromatic compounds and toxicity. Journal of Hazardous Materials. 2011, 197, pp. 404–416. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.101>. ISSN 0304-3894

372. STAPLETON, Raymond D., SAVAGE, Dwayne C., SAYLER, Gary S. & STACEY, Gary. Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. Applied and Environmental Microbiology. 1998, 64 (11), pp. 4180–4184. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/64/11/4180>. ISSN 1098-5336

373. STONE, R. W., FENSKE, M. R. & WHITE, A. G. C. Bacteria attacking petroleum and oil fractions. Journal of bacteriology. 1941, 44 (2), pp. 169–178. [consulta 6 de Mayo de 2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373661/?page=1>. ISSN 1098-5530

374. SUBASHCHANDRABOSE, Suresh R., RAMAKRISHNAN, Balasubramanian, MEGHARAJ, Mallavarapu, VENKATESWARLU, Kadiyala & NAIDU, Ravi. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. Biotechnology Advances. 2011, 29 (6), pp. 896-907. [consulta 14 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>. ISSN 0734-9750

375. SUGIURA, K., ISHIHARA, M., SHIMAUCHI, T. & HARAYAMA, S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environmental Science & Technology, 1996, 31 (1), pp. 45–51. [consulta 12 de Junio de 2018]. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es950961r>

376. SUI, Hong & LI, Xingang. Modeling for Volatilization and Bioremediation of Toluene-contaminated Soil by Bioventing. Chinese Journal ofChemical Engineering. 2011, 19 (2), pp. 340–348. [consulta 18 de Junio de 2019]. https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60174-2. ISSN 1004-9541

377. SUJA, F., RAHIM, F., TAHA, M. R., HAMBALI, N., RIZAL Razali, M., KHALID, A. & HAMZAH, A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 90, pp. 115–122. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>. ISSN 0964-8305

378. SUTTON, Nora B., MAPHOSA, Farai, MORILLO, Jose A., AL-SOUD, Waleed Abu, LANGENHOFF, Alette A. M., GROTENHUIS, Tim, RIJNAARTS, Huub H. M. & SMIDT, Hauke. Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. Applied and Environmental Microbiology. 2012, 79 (2), pp. 619–630. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1128/AEM.02747-12>. ISSN 1098-5336

379. TAKEDA, Isao, IGUCHI, Takashi, KAWAMURA, Takeshi, HORIGUCHI, Sadayuki, HAYAKAWA, Shiro & SENOH, Saburo. Production of Microbial Cells from Hydrocarbons. Agricultural and Biological Chemistry. 29 (9), pp. 796–803. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858479>. ISSN 1881-1280

380. TAO, K., LIU, X., CHEN, X., HU, X., CAO, L. & YUAN, X. Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. Bioresource Technology. 2017, 224, pp. 327–332. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.073>. ISSN 0960-8524

381. TEMPEST, D. W. The biochemical significance of microbial growth yields: A reassessment. Trends in biochemical Sciences, 1978, 3 (3), pp. 180–184. [consulta 2 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0968-0004(78)91127-1>. ISSN 0968-0904

382. THAPA, B., KC, A., & Ghimire, A.A Review On Bioremediation Of Petroleum Hydrocarbon Contaminants In Soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. 2012, 8 (1), pp. 164–170. [consulta 23 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.3126/kuset.v8i1.6056>. ISSN 1816-8752

383. THAVASI, Rengathavasi, JAYALAKSHMI, Singaram & BANAT, Ibrahim M.. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by Lactobacillus delbrueckii in biodegradation of crude oil. Bioresource Technology. 2011, 102 (3), pp. 3366–3372. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.071>. ISSN 0960-8524

384. THOMASSIN-LACROIX, E. J. M., ERIKSSON, M., REIMER, MOHN,W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 2002, 59(4-5), pp. 551–556. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1038-0>. ISSN 1432-0614

385. THOMÉ, Antônio, REGINATTO, Cleomar, CECCHIN, Iziquiel & COLLA, Luciane Maria. Bioventing in a Residual Clayey Soil Contaminated with a Blend of Biodiesel and Diesel OilJournal of Envirenmental Engineering. 20014, 140 (11). pp. [consulta 18 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000863>. ISSN 1943-7870

386. THOMPSON, Ian P., VAN DER GAST, Christopher J., CIRIC, Lena & SINGER, Andrew C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. Environmental Microbiology. 2005, 7 (7), pp. 909–915. [consulta 22 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x>. ISSN 1462-2920

387. TIERNEY, M. & YOUNG, L. Y. Anaerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. Anaerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: Timmis K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010, pp. 25–934. [consulta 24 de Mayo de 2019]<https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_65>. ISBN 978-3-540-77587-4

388. TOLEDO, F. L., CALVO, C., RODELAS, B., GONZÁLEZ-LOPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Systematic and Applied Microbiology. 2006, 29 (3), pp. 244–252. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.003>. ISSN 0723-2020

389. TORIBIO, Jeiry, ESCALANTE, Ana E. & SOBERÓN - Chávez, Gloria. Rhamnolipids: Production in bacteria other than Pseudomonas aeruginosa. European Journal of Lipid Science and Technology. 2010, 112 (10), pp. 1082–1087. [consulta 11 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900256>. ISSN 1438-9312

390. TOWNSEND, G. Todd, PRINCE, Roger C. & SUFLITA, Joseph M. Anaerobic Oxidation of Crude Oil Hydrocarbons by the Resident Microorganisms of a Contaminated Anoxic Aquifer. Environmental Science & Technology. 2003, 37 (22), pp.5213–5218. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1021/es0264495>. ISSN 1520-5851

391. TREJOS Delgado, María Catalina. Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo. Tesis (Magister) Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Minas – Departamento de Geociencias y Medio Ambiente, 2017, 107 p. <http://bdigital.unal.edu.co/59356/1/1124314851.2017.pdf>

392. TRINDADE, P. V. O., SOBRAL, L. G., RIZZO, A. C. L., LEITE, S. G. F., & SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. Chemosphere. 2005, 58 (4), pp. 515–522. [consulta 18 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.021>. ISSN 0045-6535

393. TULEVA, Borjana, CHRISTOVA, Nelly, JORDANOV, Bojidar, NIKOLOVA-Damyanova, Boryana & PETROV, Petar. Naphthalene Degradation and Biosurfactant Activity by *Bacillus cereus* 28BN. Zeitschrift für Naturforschung C (A Journal of Biosciences). 2005, 60 (7-8). [consulta 6 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-7-811>. ISSN 1865-7125

394. TURGAY, Oguz Can, ERDOGAN, Esin Eraydın & KARACA, Ayten. Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. Environmental Monitoring and Assessment. 2010, 170 (1–4), pp 45–58. [consulta 12 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1213-1>. ISSN 1573-2959

395. TYAGI, M., DA FONSECA, M. M. R. & DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation. 2011, 22(2), pp. 231–241. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4> ISSN 1572-9729

396. UMAR, Z. D., AZIZ, N. A. A., ZULKIFLI, S. Z. & MUSTAFA, M. Biodegradación rápida de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) utilizando *Cronobacter sakazakii* MM045 (KT933253). MethodsX. 2017, 4, pp. 104–117. [consulta 28 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.02.003>. ISSN 2215-0161

397. UMAR, Z. D., NOR AZWADY, A. A., ZULKIFLI, S. Z. & MUSKHAZLI, M. Effective phenanthrene and pyrene biodegradation using *Enterobacter sp.* MM087 (KT933254) isolated from used engine oil contaminated soil. Egyptian Journal of Petroleum. 2018, 27 (3), pp. 349–359. [consulta 30 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2017.06.001>. ISSN 1110-0621

398. US EPA. Office of Research and Development. Bioremediation Using the Land Treatment Concept. EPA/600/R-93/164. 1993. 28 pp. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=30002Y6E.txt>

399. US EPA. Land And Emergency Management. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites – A Guide For Corrective Action Plan Reviewers – Chapter V – Landfarming. 1994a. 31 pp. (PDF). [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://www.epa.gov/ust/how-evaluate-alternative-cleanup-technologies-underground-storage-tank-sites-guide-corrective>

400. US EPA. Land And Emergency Management. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites – A Guide For Corrective Action Plan Reviewers – Chapter IV – Biopiles. 1994b. pp. 1–31. (PDF). [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://www.epa.gov/ust/how-evaluate-alternative-cleanup-technologies-underground-storage-tank-sites-guide-corrective>

401. US EPA. Land and Emergency Management. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites – A Guide For Corrective Action Plan Reviewers – Chapter III – Bioventing. 1994c, 47 pp. (PDF) [consulta 14 de Mayo de 2019]. <https://www.epa.gov/ust/how-evaluate-alternative-cleanup-technologies-underground-storage-tank-sites-guide-corrective>

402. US EPA. Principles and Practices of Bioventing, Volume I: Bioventing Principles. 1995. [consulta 12 de Junio de 2019]. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=100027H4.txt>.

403. US EPA. A Citizen's Guide to Bioremediation. 1996. [en línea]. [consulta 16 de junio de 2018] <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=10002SZG.txt >.

404. US EPA. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action and Underground Storage Tank Sites. 1999. [en línea]. [consulta: 16 de Junio de 2018]. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100GIAB.txt>.

405. US EPA - Engineering Issue. In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites. 2006. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=600003SE.txt>

406. US EPA. The Contaminated Site Clean-Up Information (CLU-IN). [en línea]. (s.f.)a. [consulta 7 de junio de 2018]. <https://cluin.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Aerobic_Bioremediation_(Direct)/#pagetop>

407. US EPA. Contaminated Site Clean up Information. Bioremediation (CLU-IN). [en línea]. (s.f.)b. [consulta 25 de Junio de 2018]. <https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Overview/>

408. VALLS Torner, Xavier. Los años locos del petróleo. Wordpress. 2011. [en línea]. [consulta: 10 de abril de 2018] < https://xaviervalls.wordpress.com/2011/03/17/los-anos-locos-del-petroleo/>

409. VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology. 2017, 223, pp. 277–286. [consulta 25 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>. ISSN 0960-8524

410. VARJANI, Sunita J. & UPASANI, Vivek N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514. Bioresource Technology. 2016, 222, pp. 195-201. [consulta 25 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>. ISSN 0960-8524

411. VARJANI, Sunita J. & UPASANI, Vivek N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a

model biosurfactant. Bioresource Technology. 2017a, 232, pp. 389–397. [consulta 11 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>. ISSN 0960-8524

412. VARJANI, Sunita J. & UPASANI, Vivek N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. International Biodeterioration & Biodegradation. 2017b, 120, pp. 71-83. [consulta 11 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>. ISSN 0964-83

413. VARJANI, Sunita J. & UPASANI, Vivek N.. Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. Journal of Environmental Management. 2019, 245, pp. 358–366. [consulta 13 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.070>. ISSN 0301-4797

414. VARJANI, Sunita J., RANA, Dolly P., JAIN, Ajay K., BATEJA, Surendra & UPASANI, Vivek N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. International Biodeterioration and Biodegradation, 2015, 103, pp. 116–124. [consulta 13 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.030> ISSN 0964-8305

415. VARJANI, Sunita J., RANA, Dolly P., BATEJA S. & UPASANI,Vivek N. Isolation and Screening for Hydrocarbon Utilizing Bacteria (HUB) from Petroleum Samples. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS), 2013, 2 (4), pp. 48–60. [consulta 12 de Junio de 2018]. <https://www.ijcmas.com/Archives-5.php>. ISSN 2319-7706

416. VASILEVA-Tonkova, E. & GESHEVA, Victoria. Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe Pantoea sp. During Growth on Hydrocarbons. Current Microbiology. 2007, 54 (2), pp 136–141. [consulta 10 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0345-6>. ISSN 1432-0991

417. VASUDEVAN, N, RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. Environment International, 2001, 26 (5–6), pp. 409–411. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00020-4>. ISSN 0160-4120

418. VENOSA, A. D., SUIDAN, M. T., KING, D. & WRENN, B. A. Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 1997, 18 (2–3), pp. 131–139. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900304>. ISSN 1476-5535

419. VENOSA, A. D., ZHU, X., SUIDAN, M. T. & LEE K. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. U.S. Environmental Protection Agency, National Risk Management Research Laboratory Cincinnati, OH 45268, Land Remediation and Pollution Control Division. 2001. [consulta 16 de Junio de

2018].<https://www.epa.gov/sites/production/files/201307/documents/guidelines_for_the_bioremediation_of_marine_shorelines_and_freshwater_wetlands.pdf>

420. VERMA, Shuchi, BHARGAVA, Renu & PRUTHI, Vikas. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. International Biodeterioration & Biodegradation. 2006, 57 (4), pp. 207–213. [consulta 7 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.02.004>. ISSN 0964-8305

421. VERMA, Jay P. & JAISWAL, Durgesh K. A book review on Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste. Varanasi: CRC Press of Taylor and Francis Group, 2015. 479 p. [consulta 30 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01555 >. ISBN-10: 1498700543

422. VIJAYAKUMAR, S & SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. Research Journal of Microbiology. 2015, 10 (5). pp. 181–192. [consulta 2 de Mayo de 2019] <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>. ISSN 1816-4935

423. VOLKERING, F., BREURE, A. M. & RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation. 1997, 8 (6), pp. 401–417. [consulta 2 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1023/A:1008291130109>. ISSN 1572-9729

424. VON WEDEL, R. J., MOSQUERA, J. F., GOLDSMITH, C. D. ; HATER, G. R., WONG, A., FOX, T. A., HUNT, W. T., PAULES, M. S., QUIROS, J. M. & WIEGAND, J. W. Bacterial Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Groundwater: In situ Augmented Bioreclamation with Enrichment Isolates in California. Water Science and Technology. 1988, 20 (11-12), pp. 501–503. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.2166/wst.1988.0335>. ISSN 0273-1223

425. WALKER, J. D. & COLWELL, R. R. Enumeration of Petroleum-Degrading Microorganisms. Applied And Environmental Microbiology. 1976, 31 (2), pp. 198–207. [consulta 18 de Junio de 2018]. <https://aem.asm.org/content/31/2/198/article-info>. ISSN 1098-5336

426. WALKER, J. D., COLWELL, R. R. & PETRAKIS, L. Microbial petroleum degradation: application of computerized mass spectrometry. Canadian Journal of Microbiology. 1975, 21 (11), pp. 1760–1767. [consulta de 2018]. <https://doi.org/10.1139/m75-257>. ISSN 1480-3275

427. WALKER, J. D., COLWELL, R. R. & PETRAKIS, L. Biodegradation rates of components of petroleum. Canadian Journal of Microbiology. 1976, 22 (8), pp. 1209–1213. [consulta de 2018]. <https://doi.org/10.1139/m76-179>. ISSN 1480-3275

428. WALWORTH, J.L, WOOLARD, C.R & HARRIS, K.C. Nutrient amendments for contaminated peri-glacial soils: use of cod bone meal as a controlled release nutrient source. Cold Regions Science and Technology. 2003, 37 (2), pp. 81–88. [consulta 2 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0165-232X(03)00029-6>. ISSN 0165-232X

429. WANG Zhen-Yu, GAO Dong-Mei, LI Feng-Min, ZHAO Jian, XIN Yuan-Zheng, S. SIMKINS & XING, Bao-Shan. Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta. Pedosphere. 2008, 18 (6), pp. 707–716. [consulta 8 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60066-1>. ISSN 1002-0160

430. WANG, Shijie, WANG, Xiang, ZHANG, Chao, LI, Fasheng & GUO, Guanlin. Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks. International Biodeterioration & Biodegradation. 2016b, 106, pp. 150-156. [consulta 6 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.014>. ISSN 0964-8305

431. WANG, Shi-Yu, KUO, Yu-Chia., HONG, Andy, CHANG, Yu-Min. & KAO, Chih.-Ming. Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. Chemosphere. 2016a, 164, pp. 558–567. [consulta 7 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.128>. ISSN 0045-6535

432. WANG, Zhenyu, XU, Ying, ZHAO, Jian, LI, Fengmin, GAO, Dongmei & XING, Baoshan. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. Journal of Hazardous Materials. 2011, 190 (1–3), pp. 677–685. [consulta 13 de diciembre de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.103>. ISSN 0304-3894

433. WESTLAKE, D. W. S., JOBSON, A. M. & COOK, F. D. In situ degradation of oil in a soil of the boreal region of the Northwest Territories. Canadian Journal of Microbiology. 1978, 24 (3), pp. 254–260. [consulta 23 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1139/m78-044>. ISSN 1480-3275

434. WHANG, Liang-Ming, LIU, Pao-Wen G., MA, Chih-Chung & CHENG, Sheng-Shung. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials. 2008, 151 (1), pp. 155–163. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>. ISSN 0304-3894

435. WHELAN, M. J., COULON, F., HINCE, G., RAYNER, J., McWATTERS, R., SPEDDING, T. & SNAPE, I. Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. Chemosphere. 2015, 131, pp. 232–240. [consulta 26 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.088>. ISSN 0045-6535

436. WHYTE, L. G., BOURBONNIÈRE, Luc, BELLEROSE, Claude & GREER, C. W. Bioremediation Assessment of Hydrocarbon-Contaminated Soils

from the High Arctic. Bioremediation Journal. 1999, 3 (1), pp. 69–80. [consulta 5 de Diciembre de 2019]. <https://doi.org/10.1080/10889869991219217>. ISSN 1547-6529

437. WHYTE, L. G., GOALEN, B., HAWARI, J., LABBÉ, D., GREER, C. W. & NAHIR, M. Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka, Nunavut. Cold Regions Science and Technology. 2001, 32 (2-3), pp. 121–132. [consulta 14 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/S0165-232X(00)00025-2>. ISSN 0165-232X

438. WHYTE, L. G., GREER, C. W. & INNISS, W. E. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Canadian Journal of Microbiology. 1996, 42 (2), pp. 99–106. [consulta 5 de Diciembre de 2019]. <https://doi.org/10.1139/m96-016>. ISSN 14803275

439. WIDDEL, Friedrich & RABUS, Ralf. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology. 2001, 12 (3), pp. 259–276. [consulta 26 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3>. ISSN 0958-1669

440. WILKES, H, BUCKEL W, GOLDING B.T. & RABUS R. Metabolism of Hydrocarbons in n-Alkane-Utilizing Anaerobic Bacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2016, 26 (1–3), pp. 138–151. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1159/000442160>. ISSN 1660-2412

441. WILLIAMS, Jera. Bioremediation of Contaminated Soils: A Comparison of In Situ and Ex Situ Techniques. (PDF), 12 pp. [consulta 15 de Mayo de 2019]. (s. f.) <https://tge.public.iastate.edu/courses/ce521/jera.pdf>

442. WINQUIST, Erika, BJÖRKLÖF, Katarina, SCHULTZ, Eija, RÄSÄNEN, Markus, SALONEN, Kalle, ANASONYE, Festus, CAJTHAML, STEFFEN, Tomáš, Kari T., JØRGENSEN, Kirsten S., TUOMELA, Marja. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – From laboratory to field scale. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 86 (C), pp. 238–247. [consulta 1 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.012>. ISSN 0964-8305

443. WOLFE, Saul, INGOLD, Christopher F. & LEMIEUX, Raymond U. Oxidation of olefins by potassium permanganate. Mechanism of .alpha.-ketol formation. Journal of the American Chemical Society. 1981, 103 (4), pp. 938–939. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1021/ja00394a037>. ISSN 0002-7863

444. WONG, Jonathan Woon-Chung, ZHAO, Zhenyong & ZHENG, Guanyu. Chapter 4 - Biosurfactants from Acinetobacter calcoaceticus BU03 Enhance the Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Proceedings of the annual international conference on soils, sediments, water and energy. 2010, 15, Article 5, pp. 35–51. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://scholarworks.umass.edu/soilsproceedings/vol15/iss1/5>

445. WOODHULL, Patrick M. & JERGER, Douglas E. Bioremediation using a commercial slurry-phase biological treatment system: Site-specific applications and costs. Remediation - The Journal of Environmental Cleanup Costs, Technologies and, Techniques. 1994, 4 (3), pp. 353–362. [consulta 28 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1002/rem.3440040308> ISSN 1520-6831

446. WU, Guozhong, KECHAVARZI, Cedric, LI, Xingang, SUI, Hong, POLLARD, Simon JT & COULON, Frédéric. Influence of mature compost amendment on total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. Chemosphere. 2013, 90 (8), pp. 2240–2246. [consulta 27 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.003>. ISSN 0045-6535

447. XIAO, Nan, LIU Rui, JIN, Caixia, DAI, Yuanyuan. Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecological Engineering, 2015, 75, pp. 384–391.[consulta 1 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.12.008>. ISSN 0925-8574

448. XIAO, Xiang, CHEN, Hao, SI , Chuncan & WU, Lijun. Influence of biosurfactant-producing strain Bacillus subtilis BS1 on the mycoremediation of soils contaminated with phenanthrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 2012, 75, pp. 36–42. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.09.002>. ISSN 0964-8305

449. XU, Yaohui & LU, Mang. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. Journal of Hazardous Materials. 2010, 183 (1-3), pp. 395–401. [consulta 17 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038>. ISSN 0304-3894

450. YOUSSEF, N., SIMPSON, D. R., DUNCAN, K. E., McINERNEY, M. J., FOLMSBEE, M., FINCHER, T. & KNAPP, R. M. In Situ Biosurfactant Production by Bacillus Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. Applied and Environmental Microbiology. 2006, 73 (4), pp. 1239–1247. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264-06>. ISSN 1098-5336

451. YU, L., DUAN, L., NAIDU, R. & SEMPLE, K. T. Abiotic factors controlling bioavailability and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: Putting together a bigger picture. Science of The Total Environment. 2018, 613-614, pp. 1140–1153. [consulta 11 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.025>. ISSN 0048-9697

452. YUAN, Xiaoyu, ZHANG, Xinying, CHEN, Xueping, KONG, Dewen, LIU , Xiaoyan & SHEN, Siyuan. Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii*. Bioresource Technology. 2018, 264, pp. 190–197. [consulta 10 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.072>. ISSN 0960-8524

453. YUNIATI, M. D.. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2018, 118, conference 1. [consulta 22 de Junio de 2019]. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/118/1/012063>

454. ZAFRA, German, ABSALÓN, Ángel E., ANDUCHO-Reyes, Miguel Ángel, FERNANDEZ, Francisco J. & CORTÉS-Espinosa, Diana V. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. Chemosphere. 2017, 172, pp. 120–126. [consulta 12 de Junio de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.038>. ISSN 0045-6535

455. ZAPPI, Mark E., ROGERS, Brad A., TEETER, Cynthia L., GUNNISON, Douglas & BAJPAI, Rakesh. Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons. Journal of Hazardous Materials. 1996, 46 (1), pp. 1–12. [consulta 27 de JUnio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00091-7>. ISSN 0304-3894

456. ZAWIERUCHA, I. & MALINA, G. Effects of oxygen supply on the biodegradation rate in oil hydrocarbons contaminated soil. Journal of Physics: Conference Series. 2011, 289 (1), pp. 1–8. [consulta 15 de Junio de 2018]. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/289/1/012035/meta>. ISSN 1742-6596

457. ZHANG, Jing, YIN, Rui, LIN, Xiangui, LIU, Weiwei, CHEN, Ruirui & LI, Xuanzhen. Interactive Effect of Biosurfactant and Microorganism to Enhance Phytoremediation for Removal of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Soils. Journal of Health Science. 2010, 56 (3), pp. 257–266. [consulta 4 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1248/jhs.56.257>. ISSN 1344-9702

458. ZHANG, Xiangsheng, XU, Dejun, ZHU, Chunyan, LUNDAA, Tserennyam & SCHERR, Kerstin E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. Chemical Engineering Journal. 2012, 209, pp. 138–146. [consulta 8 de junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>. ISSN 1385-8947

459. ZHANG, Z., HOU, Z., YANG, C., MA, C., TAO, F. & XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology. 2011, 102 (5), pp. 4111–4116. [consulta 27 de Mayo de 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.064>. ISSN 0960-8524

460. ZHANG, Zhengzhi, GAI, Lixue, HOU, Zhaowei, YANG, Chunyu, MA, Cuiquing, WANG, Zhongguo, SUN, Baiping, HE, Xiaofei, TANG, Hongzhi & XU, Ping. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. Bioresource Technology. 2010, 101 (21), pp. 8452–8456. [consulta 20 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.060>. ISSN 0960-8524

461. ZHOU, Enning & CRAWFORD, Ronald L. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. Biodegradation. 1995, 6 (2), pp 127–140. [consulta 24 de Junio de 2018]. <https://doi.org/10.1007/BF00695343>. ISSN 1572-9729

462. ZOBELL, Claude E. Action of Microorganisms on Hydrocarbons. Bacteriology reviews. 1946, 10 (1-2), pp. 1–49. [consulta 4 de Mayo de 2018]. < https://mmbr.asm.org/content/10/1-2/1>

463. ZOBELL, Claude E. Assimilation of Hydrocarbons by Microorganisms. In: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 10, 1950. pp. 443-486. [consulta 19 de Junio de 2018]. <https://b-ok.cc/book/2149415/b9662f>. ISBN 13:9780470122556