

Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización

**Ismenia Araujo, Nancy Angulo, Carmen Cardenas, María Méndez,
Maucha Morante y Maribel Machado**

Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Ciudad Universitaria. Maracaibo 4005, Venezuela. Telf.: 58 (0261) 7597181 - Fax: 58 (0261) 7597182.

E-mail: ismenia_araujo@hotmail.com

Resumen

En esta investigación, se aislaron cepas bacterianas autóctonas de suelos contaminados con hidrocarburos, y éstas se sometieron a una prueba de eficiencia para la remoción de gasoil (fuente de carbono). Se realizaron contajes bacterianos de heterótrofos mesófilos, las cepas 16, 14, 11, 18 y 1 presentaron los mayores porcentajes de remoción de hidrocarburos totales, 90, 63, 56, 49 y 45% respectivamente; se seleccionaron para su utilización como cultivos mixtos en la prueba piloto. Se realizó una prueba piloto aplicando los tratamientos: cultivo mixto, compostaje y fertilización en unidades experimentales que contenían suelo contaminado. Se analizaron los hidrocarburos totales (HT), saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), y metales totales (Cd, Cr, Ni, Zn). La correlación entre los heterótrofos mesófilos con los hidrocarburos totales, nitrógeno y fósforo, resultó negativa y altamente significativa ($p < 0,001$), lo que establece que el aumento de los heterótrofos mesófilos provoca la disminución de los hidrocarburos totales, del nitrógeno y del fósforo. la prueba de Tukey, estableció que los tratamientos con cultivo mixto+fertilización (CM+N/P), compostaje+fertilización (Comp+N/P), compostaje +cultivo mixto+fertilización (Comp+CM+N/P) y compostaje+cultivo mixto (Comp+CM) no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos y en los cuales se obtuvo una remoción de los hidrocarburos totales del 95, 94, 93 y 86% respectivamente, durante los tres meses del estudio. la aplicación simultánea de la técnica de compostaje, fertilización y consorcio bacteriano demostró ser una buena alternativa para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: Biorremediación, compostaje, consorcio bacteriano, fertilización, hidrocarburos, rípios, suelos.

Bioremediation of soils with bacterial consortium, compost and fertilización

Abstract

In this study, endogenous bacterial strains were isolated from petroleum-contaminated soil and submitted to efficiency assays for the removal of gas oil (source of carbon). Mesophyllic heterotrophs and total hydrocarbons were determined. The bacterial strains 16, 14, 18 y 1, showed the highest gas oil degradation, 90, 63, 49, and 45 % of hydrocarbons, respectively, and were selected to integrate the mixed culture. A pilot test was carried out applying treatments with a bacterial consortia culture, compost and P/N-fertilization in experimental units that contained oily-sludge-contaminated-soil. During this tests, samples were analyzed for total hydrocarbon (HT), saturated, aromatic, resin an asphalten hydrocarbon fractions (SARA), and metal (Cd, Cr, Ni, Zn) determinations. The correlation of mesophyllic heterotrophs with total hydrocarbons, nitrogen and phosphorus was negative and highly significant ($p < 0.001$), confirming that the increase of mesophyllic heterotrophs caused the decrease of total hydrocarbons, nitrogen and phosphorus. The Tukey test established that the treatments with mixed culture + N/P-fertilization (CM+N/P), compost + N/P-fertilization (Comp+N/P), compost + mixed culture + N/P-fertilization (Comp+CM +N/P) and compost + mixed culture (Compost+CM), did not show significant differences ($p < 0.05$). During the three months treatments the total hydrocarbon remotions were 95, 94, 93 and 86%, respectively. Using bacterial consortia, compost and N/P fertilization could be a good choice for recovering oil contaminated soils.

Key words: Bio-remediation, compost, bacterial consortia, fertilization, hydrocarbon, oily-sludge, soils.

Recibido: 23 Marzo 2004 / Aceptado: 30 Noviembre 2004

INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo es la principal fuente de ingreso para Venezuela y constituye una de las empresas más importantes del mundo, desde la iniciación de la perforación para la búsqueda del petróleo en 1913 (Salas 1980). El país cuenta con una producción del orden de 2,75 mil millones de barriles diarios (MMBD) de crudo, más de 15.000 yacimientos y 17.000 pozos activos, con una capacidad de refinación de 1,3 MMBD (Gabaidón 2001).

La extracción, transporte y procesamiento del crudo, generan grandes volúmenes de desechos como ripios, lodos petrolizados, aguas de formación y petróleo crudo, constituidos básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar

de manera natural por la , complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminantes si no se manejan de manera adecuada (Eweis et al. 1999).

La contaminación se produce como consecuencia de accidentes durante la producción y transporte del petróleo; esta situación ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que recuperación de terrenos y aguas contaminadas se ha convertido en una importante industria en todo el mundo, incluyendo a Venezuela (Levin y Gealt 1997, Eweis et al. 1999).

Durante la primera mitad del siglo XX, se desarrollaron métodos sofisticados para el tratamiento de contaminantes, tales como los lechos bacterianos, lodos activados o la fermentación anaerobia (Eweis et al. 1999), y desde 1960, se han seguido incluyendo nuevos métodos de aplicación a los terrenos y procesos para la degradación de determinados tipos de compuestos bajo la categoría de procesos de tratamiento biológico (Ryan et al. 1991).

En los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados se han referido al tratamiento de terrenos contaminados por compuestos derivados del petróleo, utilizando con éxito la biorremediación (Ryan et al. 1991).

Esta técnica utiliza la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su toxicidad, y se ha convertido en una alternativa prometedora para la recuperación de suelos contaminados con crudo (Atlas 1981,1984; Bartha 1986, Ryan et al. 1991). El objetivo de la presente investigación es determinar la biorremediación de suelos contaminados con rípios de perforación, mediante un consorcio bacteriano, y las técnicas de compostaje y fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS ENDÓGENAS

Las muestras se colectaron de un suelo contaminado con rípios de perforación, en el Centro de Manejo de Desechos de Perforación de la empresa Costa Bolívar Construcciones, en Bachaquero, estado Zulia, Venezuela y se trasladaron en bolsas plásticas, selladas y refrigeradas, al Centro de Investigación del Agua de la Universidad del Zulia.

Se prepararon diluciones seriadas de 10^{-8} y se sembraron por exrinción en placas de agar triticasa soya (TSA) con Anfotericina B a una concentración final de 10 y se

sembraron por extinción en placas de agar tripticasa soya (TSA) con Anfotericina B a una concentración final de 10 pg/mL para eliminar la flora de hongos APHA et al. (1998)

Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas, y las colonias aisladas a partir de la muestra de suelo, se transfirieron varias veces en placas de TSA; y se incubaron a 37°C por 24 h hasta verificar su pureza. Se registraron sus características macro y micromorfológicas según Kerr (1981), y se mantuvieron, por duplicado, bajo refrigeración en tubos de TSA.

CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Se aplicó un ensayo de factibilidad, y para ello se prepararon fiolas de 250 mL, conteniendo 93% de medio mínimo mineral (pH 7), modificado por Jobson y Westlake (1972), adicionando 5% del inóculo y 2% de gasoil, como única fuente de carbono, por duplicado. El ensayo se incubó a temperatura ambiente (30-35°C) durante 20 días con agitación constante en una incubadora marca Incubator Shaker, modelo 625, a 120 rpm. Se obtuvo un título bacteriano de cada cepa (contaje de heterótrofos mesófilos) cada cinco días, mediante la técnica de contaje en placa vertida, y se determinó la cantidad de hidrocarburos totales al inicio y al final del ensayo APHA et al. (1998).

PRUEBA PILOTO

Se realizó un ensayo, a escala piloto, mediante un estudio de tratabilidad, y se comparó la eficiencia de un consorcio bacteriano (cultivo mixto de cepas bacterianas endógenas), compostaje y fertilización, en la degradación de ripios de perforación.

El estudio se llevó a cabo utilizando 8 unidades experimentales, representadas por envases plásticos con capacidad de 40 L, en los cuales se agregó la mezcla del suelo contaminado (suelo + ripios de perforación, 1:1) para la aplicación de los tratamientos: cultivo mixto, compostaje y fertilización. En cada tratamiento se agregó una cantidad aproximada de 20 Kg de la mezcla de suelo contaminado + tratamiento, por duplicado (Tabla 1). Se utilizó un inóculo del cultivo mixto de 5%, integrado por las cinco cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados más eficientes en la degradación del gasoil. El compostaje se empleó al 41%, compuesto por una mezcla de agentes esponjantes (aserrín al 35% y estiércol de caballo al 6% del peso total utilizado en la unidad experimental); mientras que la fertilización estuvo representada por la adición de nitrógeno y fósforo, bajo la forma de fosfato diamónico al 1%.

Se agregó agua al ensayo, cada dos o tres días, para mantener el porcentaje de

humedad requerido (40-60%), y mediante la aplicación de un labrado mecánico se mantuvo el contenido de oxígeno en las unidades experimentales.

Se tomaron muestras de suelo, cada 20 días, de cada una de las unidades para la realización de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos en los Laboratorios de Microbiología Industrial y Fisicoquímica Ambiental del Centro de Investigación del Agua de la Universidad del Zulia.

Se utilizó la metodología establecida en APHA et al. (1998), y se determinaron los parámetros: heterótrofos mesófilos, a través de la técnica de contaje en placa vertida (9215-B), hidrocarburos totales, por el método gravimétrico (5520-F), nitrógeno total Kjeldahl, por el método volumétrico (4500-NH₃), fósforo total, por el método del ácido ascórbico (4500-C), los metales cadmio, cromo, níquel, zinc, mediante la técnica de absorción atómica (3500-B), y siguiendo la metodología establecida en la ASTM (1992) se determinaron las fracciones de hidrocarburos (SARA), por el método gravimétrico (D2007-75), mientras que la temperatura, pH y humedad, se midieron con electrodos selectivos APHA et al. (1998).

TABLA 1. Composición de las unidades experimentales.

Unidad Experimental (20Kg)	Suelo contaminado (1:1)	Cultivo mixto (5)	Compostaje (41%)	Fertilización (1)
1	X			
2	X	X		
3	X		X	
4	X			X
5	X		X	X
6	X	X	X	
7	X	X		
8	X	X	X	X

1: Control: Control. 2: CM: Cultivo Mixto. 3: Comp: Compostaje. 4:N/P: Fertilización. 5: Comp+N/P: Compostaje+Fertilización. 6: Comp+CM: Compostaje+Cultivo Mixto+Fertilización. 8: Comp+CM+N/P: Compostaje+Cultivo Mixto+Fertilización.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un análisis de la varianza, el coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de Tukey a los resultados obtenidos en la prueba piloto (Daniel 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS ENDÓGENAS

Se aislaron 20 cepas bacterianas distintas de los suelos contaminados, las cuales presentaron forma de bacilos, cocos y cocobacilos Gram negativos. Frankenberger (1988), aisló cepas bacterianas autóctonas de sitios contaminados con hidrocarburos del norte de Arizona, Estados Unidos, para la realización de un ensayo de factibilidad, siguiendo la metodología descrita.

CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE LAS CEPAS BACTERIANAS

El crecimiento de las cepas bacterianas osciló entre $0,01 \times 10^6$ y 490×10^6 UFC/mL (Tabla 2). Las cepas 14, 12, 4, 10 y 8 presentaron el mayor crecimiento, alcanzando densidades poblacionales de 490×10^6 , 390×10^6 , 300×10^6 , 184×10^6 y 184×10^6 UFC/mL respectivamente.

TABLA 2. Crecimiento de las cepas bacterianas en MMM+gasoil

Cepa bacteriana/ tiempo (días)	Heterótrofos Mesófilos ($\times 10^6$ UFC/mL)				
	0	5	10	15	20
1	2,08	110,00	3,50	1,30	2,00
2	2,66	31,00	67,00	59,00	81,00
3	2,35	9,90	49,00	14,20	37,00
4	2,35	154,00	300,00	109,00	80,00
5	5,60	11,90	2,90	0,90	1,20
6	0,01	0,10	0,10	0,10	0,10
7	102,00	9,30	51,00	49,00	40,00
8	0,72	173,00	184,00	125,00	156,00
9	1,18	67,00	22,40	85,00	44,00
10	2,08	184,00	155,00	81,00	57,00
11	1,59	11,15	8,00	2,20	0,90
12	1,00	51,50	390,00	20,40	38,00
13	1,06	3,50	1,40	2,20	0,40
14	19,65	490,00	169,00	56,00	104,00
15	1,50	1,70	1,60	0,30	0,60
16	3,40	8,90	0,80	2,60	0,60
17	2,50	1,60	0,90	1,00	0,30
18	1,45	74,00	25,20	29,00	105,00
19	0,01	6,80	7,10	2,20	45,00
20	56,00	68,00	13,20	9,40	49,00

MMM: medio mínimo mineral

El porcentaje de remoción de hidrocarburos totales varió entre 15 y 90% (Fig. 1). Las cepas 16, 14, 11, 18 y 1 mostraron los mayores porcentajes de remoción del gasoil presente: 90, 63, 56, 49 y 45% respectivamente; y se seleccionaron para constituir el cultivo mixto a emplearse en el estudio de tratabilidad.

Se demostró que las cepas bacterianas, aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos, son eficientes para la degradación de compuestos derivados como el gasoil y se podrían utilizar en el saneamiento de ambientes contaminados, como lo sugieren Frankenberger (1988), Whyte et al. (1998), Kanaly et al. (2000), Mishra et al. (2001), Margesin y Schinder (2001), Farrel y Quilty (2002), Yerushalmi (2003).

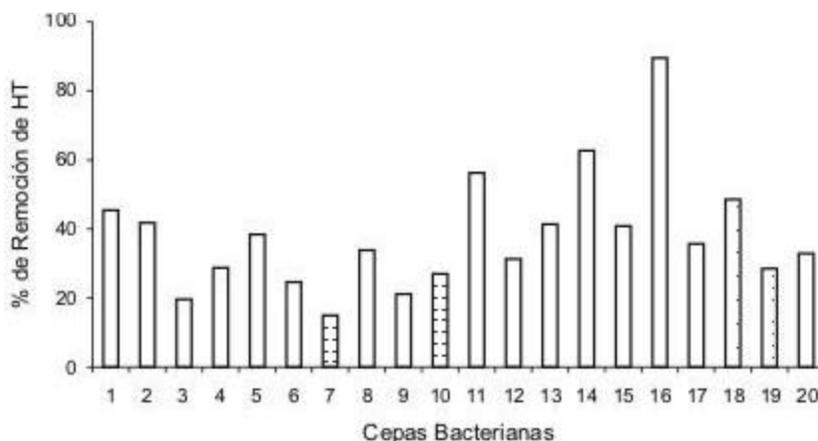


FIGURA 1. Remoción de hidrocarburos totales

PRUEBA PILOTO

El suelo se clasificó como francoarenoso-franco (Fa-F), con 52,5% de arena, 32,5% de limo y 15,0% de arcilla; y mostró un pH cercano a la neutralidad de 7,12. La conductividad fue 0,11 mS/cm, mostrando un valor de 0,58% de carbono orgánico y 46 ppm de fósforo extraíble; mientras que los elementos intercambiables revelaron los siguientes valores: potasio 0,08 meq/100g, calcio 13,0 meq/100g y magnesio 10,6 meq/100g.

En el transcurso de la prueba piloto, la temperatura osciló entre 25 y 34°C de manera similar en los tratamientos, el pH se mantuvo cercano a la neutralidad entre 7 y 8, y el contenido de humedad presentó un rango entre 45 y 60%, garantizando las condiciones requeridas por los cultivos en el ensayo (Levin y Gealt 1997, Eweis et al. 1999).

El crecimiento de los heterótrofos mesófilos se presenta en la Figura 2, alcanzando el valor máximo a los 40 días con títulos de 12500×10^5 UFC/g, aproximadamente, en los tratamientos con Comp+N/P, CM+N/P y Comp+CM+N/P; seguido de una disminución progresiva en el crecimiento a partir de los 60 días. La adición de la fertilización, a estos tratamientos, estimuló el crecimiento de los microorganismos, concordando con los resultados de estudios anteriores (Wrenn 1994, Mishra et al. 2001, Margesin y Schinder 2001). Mientras que en el resto de los tratamientos (CM, Comp, N/P y Control) se observó

un ligero incremento en la densidad poblacional, entre los 40 y 60 días de tratamiento, la cual disminuyó a medida que avanzaba el estudio.

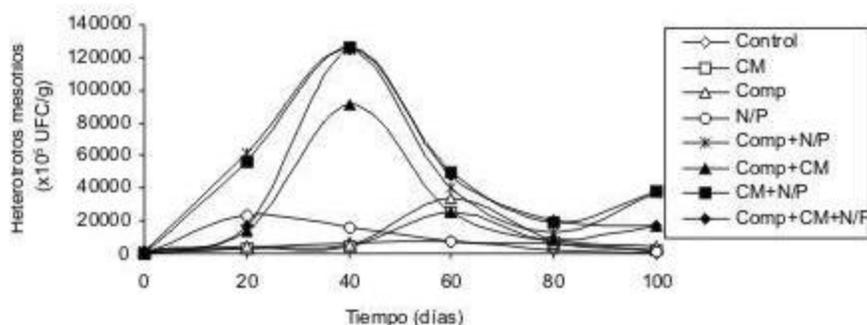


FIGURA 2. Crecimiento de los heterótrofos mesófilos

El incremento en la densidad poblacional se considera una medida indirecta de la actividad metabólica de la población (Atlas 1984, Bartha 1986), debido a que los hidrocarburos constituyen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento microbiano, tal como lo señala Yerushalmi (2003), quién evaluó la capacidad de degradación de hidrocarburos provenientes del petróleo mediante bioestimulación.

La Figura 3 revela una disminución, durante los primeros 60 días, del contenido de hidrocarburos totales; luego la degradación continuó pero de una manera más lenta hasta el final del estudio. La disminución del contenido de los hidrocarburos totales se corresponde con el incremento de la densidad poblacional de los heterótrofos mesófilos en los tratamientos (Atlas 1981). En los tratamientos con CM+N/P, Comp+N/P, Comp+CM+N/P y Comp+CM, se logró una remoción de hidrocarburos del 95, 94, 93 y 86% respectivamente, mientras que en los tratamientos con CM, Comp y N/P, el porcentaje de remoción estuvo entre el 43 y 49%, seguidos del Control que se ubicó en el 30% (Fig. 4).

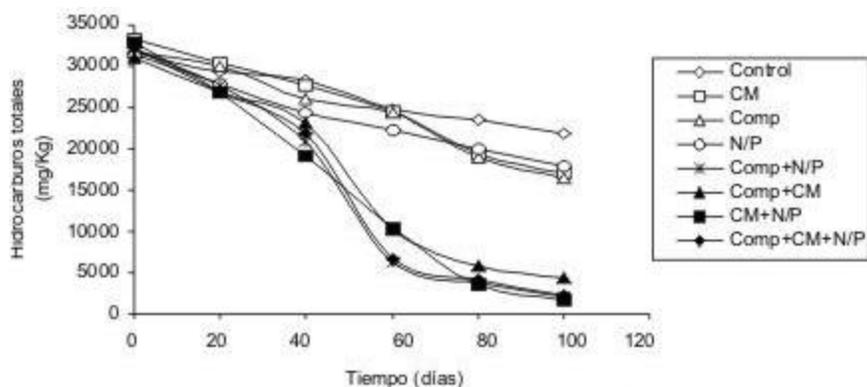


FIGURA 3. Contenido de hidrocarburos totales

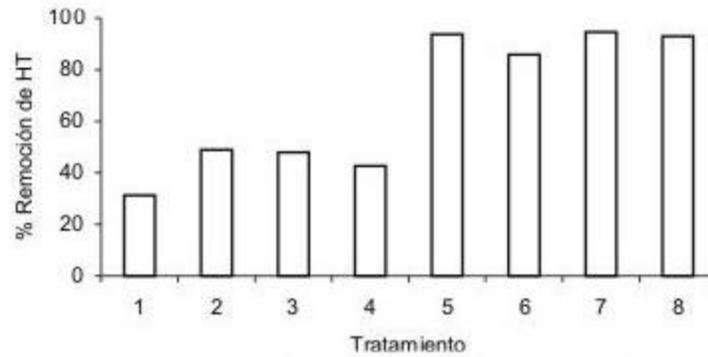


FIGURA 4. Remoción de hidrocarburos totales

Las fracciones de hidrocarburos (Fig. 5) presentaron un comportamiento similar, ocurriendo una mayor remoción en los tratamientos que presentaron un incremento en el crecimiento bacteriano (CM+N/P, Comp+N/P, Comp+CM+N/P y Comp+CM); los cuales removieron entre 84 y 96% de los saturados, 60 y 94% de los aromáticos I y II, 73 y 90% de las resinas y 14 y 24% de los asfaltenos, mientras que en los tratamientos con CM, Comp, N/P y Control, el porcentaje de remoción fue inferior.

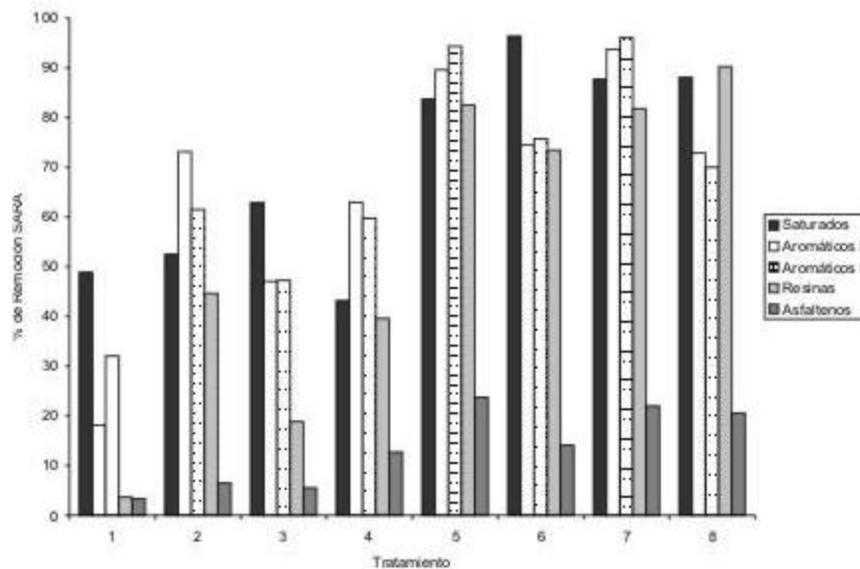


FIGURA 5. Remoción de las fracciones de hidrocarburos

Estos resultados concuerdan con los estudios de Margesin y Schinder (2001), quienes registraron una reducción de aceites diesel en un 50% en suelo no fertilizado y 70% en suelo fertilizado, con los correspondientes a Mishra et al. (2001), quienes obtuvieron altos porcentajes de remoción de hidrocarburos totales mediante la aplicación de un cultivo de *Acinetobacter baumannii* (92% de remoción de hidrocarburos totales, 94% de alcanos, 92% de aromáticos y 85% de asfaltenos) y de nutrientes (90% de hidrocarburos totales y 95, 95 y 64% para cada una de las fracciones, respectivamente).

Los valores iniciales de nitrógeno total Kjeldahl para los tratamientos estuvieron alrededor de 1500 y 4000 mg/kg, esta variación es producto de los elementos constitutivos de cada tratamiento; mientras que el contenido inicial de fósforo total, estuvo alrededor de los 400 mg/kg de suelo en todos los tratamientos. La remoción de nitrógeno y fósforo se observó en todos los tratamientos, destacando los correspondientes a Comp+N/P, Comp+CM+N/P y CM+N/P, los cuales presentaron una remoción de aproximadamente 80% de nitrógeno y 90% de fósforo, seguidos por los tratamientos con Comp+CM, CM y Comp, con remociones entre 40-55% de nitrógeno y 40-70% de fósforo, y los tratamientos con N/P y Control presentaron los menores porcentajes de remoción, 22-25% de remoción de nitrógeno y entre 25-30% de fósforo, respectivamente (Figs. 6 y 7).

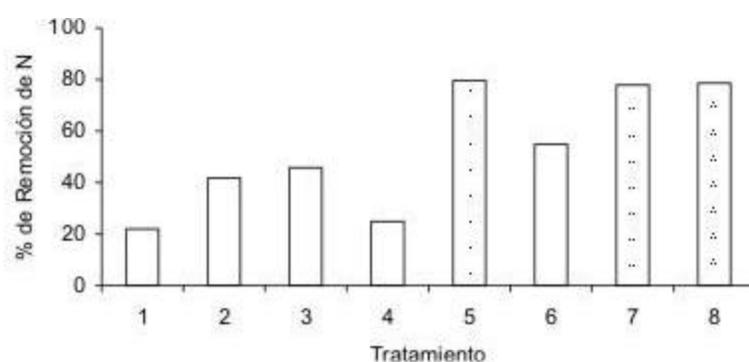


FIGURA 6. Remoción de nitrógeno total Kjeldahl

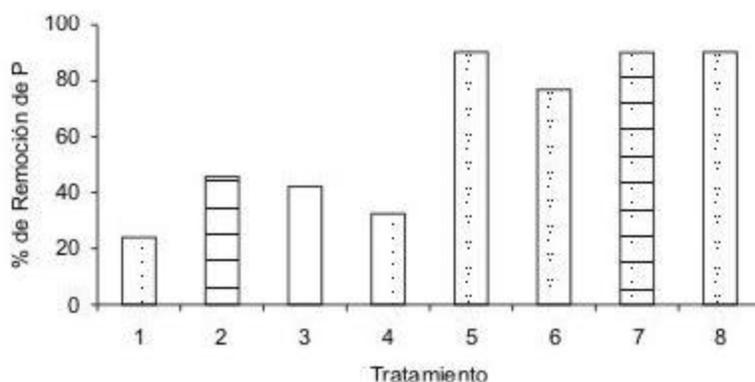


FIGURA 7. Remoción de fósforo total

Estos resultados concuerdan con el estudio de Margesin y Schinder (2001), quienes demostraron que la fertilización en una relación C:N:P 100:10:1, incrementó significativamente la degradación del aceite diesel por parte de los microorganismos autóctonos del suelo, actividad que fue mayor cuando se utilizó la inoculación de los microorganismos. En este estudio la fertilización favoreció tanto el crecimiento de los microorganismos presentes en el suelo como del cultivo mixto presente en algunos de los tratamientos.

Los valores obtenidos para los metales totales (Cd, Cr, Ni, Zn) se encontraron por debajo de los límites máximos permisibles establecidos en el Decreto No. 2635 de la Gaceta Oficial (República de Venezuela 1998). El Artículo 50, del mencionado decreto, describe que en la práctica de esparcimiento en suelos, la mezcla de suelo-desecho debe cumplir con relación al contenido de metales, el Cd sea de 8 mg/kg y el Cr y el Zn de 300 mg/kg. El Artículo 53, describe que en la práctica del biotratamiento el desecho no debe exceder las concentraciones máximas permisibles en lixiviados establecidas en el Anexo D, el cual describe que las concentraciones para Cd deben estar por debajo de 1,0 ml/L y para Cr (hexavalente) y Ni menores de 5,0 mg/L.

Los valores iniciales para el Cd estuvieron alrededor del 0,1 mg/Kg, el Cr osciló entre 0,5 y 0,9 mg/Kg, el Ni entre 1,0 y 2,0 mg/Kg y el Zn, entre 9,0 y 11,0 mg/Kg, para todos los tratamientos, garantizando la actividad de los microorganismos presentes para la degradación de los hidrocarburos, ya que estos pueden afectar negativamente al organismo cuando su nivel supera cierto límite (Doelman et al. 1994).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La correlación de la variable heterótrofos mesófilos con las correspondientes a hidrocarburos totales, nitrógeno y fósforo, reveló la existencia de correlaciones lineales negativas y altamente significativas ($p < 0,001$), lo cual establece que el aumento del número de heterótrofos mesófilos provoca la disminución de los hidrocarburos totales y del nitrógeno y fósforo, es decir, que el aumento del contenido de los microorganismos genera un mayor consumo de estas variables, disminuyendo su contenido en los tratamientos.

La prueba de Tukey, estableció que los tratamientos con Comp+N/P, Comp+CM, CM+N/P y Comp+CM+N/P, no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos, resultando ser los más eficientes en la degradación de los hidrocarburos totales.

El análisis descrito establece que con la aplicación de cualquiera de estos tratamientos se puede obtener una mayor remoción de los hidrocarburos en suelos contaminados.

CONCLUSIONES

El proceso de biorremediación de suelos contaminados con rípios de perforación se optimizó con la adición del cultivo mixto, y las técnicas de compostaje y fertilización, consiguiéndose los mejores resultados con la aplicación simultánea de estas tecnologías (CM+N/P, Comp+N/P, Comp+CM+N/P y Comp+CM). Esta investigación representa una

posible alternativa viable para conseguir la restitución de las condiciones deseadas en los ecosistemas, favoreciendo la conservación de los diferentes recursos naturales del país.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación del Agua (CIA), de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad del Zulia por el apoyo financiero. Al personal adscrito a los Laboratorios de Microbiología Industrial e Ingeniería Ambiental del CIA por la colaboración prestada. A la Empresa Costa Bolívar Construcciones por el aporte del suelo, el fertilizante y los rípios de perforación, y a Ángel Gómez por sus orientaciones en el manejo estadístico de los datos.

LITERATURA CITADA

1. APHA, AWWA y WEF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20va Edition, New York. 1427 p.
2. ATLAS R. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. Microbial Rev. 45 (1): 180-209.
3. ATLAS R. 1984. Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company. New York. 691p.
4. BARTHA R. 1986. Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. Microbiol. Ecol. 12: 155-172.
5. DANIEL W. 1998. Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. Noriega Editores. México. 1ª Edición en español. 645 p.
6. DOELMAN P., E. JANSEN, M. MICHELS y M. VAN TIL. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as show by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. Biol. Fertil Soils 17: 177-184.
7. EWEIS J., S. ERGAS, D. CHAG y E. SCHOROEDER. 1999. Principios de Biorrecuperación. MacGraw-Hill. España. 1ª Edición en Español. 327 p.
8. FARELL A. y B. QUILTY. 2002. The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. Water Research. 36: 2443-2450.
9. FRANKENBERGER W. 1988. Use of urea as a nitrogen fertilizer in bioremediation of

petroleum hydrocarbons. In: Hydrocarbon contaminated soils and Groundwater. Lewis Publishers. Rev. Chelsea. III: 237-293.

10. GABAIDÓN G. 2001. Seminario: Refinación de Pétroleo. Nuevas Tendencias en la Industria. Sociedad de Estudiantes de Ingeniería Química. SoceiQ. UNEFM. 82 p.

11. JOBSON A. y F. WESTLAKE. 1972. Microbial Utilization of Crude Oil. Appl. Microbiol. 23 (6): 1082-1089.

12. KANALY R., R. BARTHA, K. WATANABE y S. HARAYAMA. 2000. Rapid Mineralization of Benzo(a)pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. Applied and Environmental Microbiology 66 (10): 4505-4511.

13. KERR T. 1981. Applications in General Microbiology. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Hunter Publishing Company. 186 p.

14. LEVIN M. y M. GEALT. 1997. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Mc Graw-Hill. España. 1ª Edición en Español. 354 p.

15. MARGESIN R. y F. SCHINDER. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Bioestimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Applied and Environmental Microbiology 67 (7): 3127-3133.

16. MISHRA S., J. JYOT, R. KUHAD y B. LAL. 2001. Evaluation of Inoculum addition to stimulates in situ Biorremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology 67 (4): 2235-2240.

17. REPÚBLICA DE VENEZUELA. 1998. Decreto N° 2635 de 1998, sobre Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos peligrosos. Gaceta Oficial N° 5245. 31 p.

18. RYAN J., R. LOEHR y E. RUCKER. 1991. Biorremediation of Organic Contaminated Soils. Journal of Hazardous Materials 28: 159-169.

19. SALAS G. 1980. Petróleo. Ediciones Petroleras FONINVES. 5ª Edición. 52 p.

20. WHYTE, L J. HAWARI, E. ZHOU, L. BOURBONNIERE, W. INNISS y C. GREER. 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a Psychrotrophic Rhodococcus sp. Applied and Environmental Microbiology. 64 (7): 2578-2584.

21. WRENN B. 1994. Effects of Nitrogen Source on Crude Oil Biodegradation. *Journal of Industrial Microbiology* 13: 279-286.

22. YERUSHALMI L. 2003. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. *Biotechnology Journal* 7(1): 37-51.