

LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS Y SU APLICACIÓN EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS

Anna Maria Solanas

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Diagonal 645, 08028 Barcelona
asolanas@ub.edu

Palabras Clave: biodegradación, hidrocarburos, biorremediación, zona no saturada, ensayos de tratabilidad

RESUMEN. *Se describe el proceso microbiano de biodegradación de hidrocarburos y los factores que lo condicionan como base científica para su aplicación en la tecnología de la biorremediación y se destaca la importancia de llevar a cabo ensayos de tratabilidad previos a la implementación en el campo. Se presentan dos casos de biorremediación de dos suelos contaminados por aceites minerales y por creosota. Se describen los resultados obtenidos en los ensayos de tratabilidad y los obtenidos en su implantación en el campo. En el suelo contaminado por aceites minerales se aplicó la tecnología "in situ" del bioventeo y en el suelo contaminado por creosota se aplicó la tecnología de la biopila dinámica. Finalmente se discuten algunos aspectos críticos que deben tenerse en cuenta durante la investigación.*

ABSTRACT. *The microbial process of biodegradation of hydrocarbons, the factors which determine the scientific bases of the technology of the bioremediation and the importance to carry out the treatability assays before the implementation in the field are described. Two cases of bioremediation on two soils contaminated by mineral oils and by creosote are presented. The results obtained in the treatability assays as well as its application in the field are described. In the soil contaminated by mineral oils the technology of bioventing was applied and in the soil contaminated by creosote the technology was a dynamic biopila. Finally, some critical points needed of research are discussed.*

1. INTRODUCCIÓN

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en productos inocuos como el CO₂ y el H₂O. De entre todos los tipos de contaminantes, los hidrocarburos son los que han mostrado mejores resultados en la aplicación de la tecnología de la biorremediación (Rosenberg et al. 1992). A continuación se describe el proceso microbiano de degradación de hidrocarburos, los factores que lo condicionan y su aplicación en la biorremediación de la zona no saturada del suelo.

Dado que los productos petrolíferos son mezclas complejas de hidrocarburos y derivados, la biodegradación es selectiva ya que los microorganismos no degradan por igual las distintas familias de hidrocarburos (Alexander, 2004). Después de una biorremediación pueden quedar concentraciones residuales de algunos hidrocarburos. Se describen nuevas estrategias para disminuir estas concentraciones y se plantea la necesidad de revisar que la concentración de estos hidrocarburos residuales no sea el único criterio para establecer su descontaminación.

2. LA BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS

Cuando hablamos de biodegradación microbiana de hidrocarburos nos referimos al hecho de que los microorganismos pueden crecer a expensas de la utilización de estos compuestos químicos. Aunque pueda sorprendernos que un organismo sea capaz de alimentarse a expensas de compuestos tan extraños para el ser humano como el benceno, naftaleno o el pireno, las investigaciones llevadas a cabo por geoquímicos y microbiólogos nos ofrecen una explicación. Observando los sucesos que han ocurrido a lo largo de los tiempos geológicos desde la formación de la Tierra hasta nuestros días, vemos que los microorganismos están en la tierra desde hace más de tres mil millones y medio de años, mientras que los organismos superiores desde hace menos de mil millones de años y el hombre desde hace sólo 6 millones de años, un instante a escala de tiempos geológicos.

En la actualidad ya no se discute que el petróleo y, por lo tanto, sus componentes mayoritarios, los hidrocarburos, tienen su origen en los compuestos que forman parte de los organismos, los denominados compuestos biogénicos. Una sucesión de reacciones químicas, ocurridas a altas temperaturas y durante

millones de años, que los geoquímicos engloban con el término de procesos diagenéticos y catagenéticos, ha conducido a la conversión paulatina de estas estructuras biogénicas en hidrocarburos. En lugares donde se han encontrado hidrocarburos, se ha podido demostrar la existencia en etapas geológicas anteriores de organismos que poseían en sus células compuestos biogénicos como el pigmento eritroafina o el alcaloide veratramina. Este fenómeno supone que los microorganismos, capaces de crecer en sus orígenes solamente a expensas de compuestos biogénicos, como los azúcares o las proteínas, han ido conviviendo a lo largo de millones de años con una serie de compuestos orgánicos que finalmente han dado lugar a los componentes de los crudos de petróleo actuales. A lo largo de millones de años, han sido seleccionados enzimas que han aparecido por mutación o intercambio genético en determinados microorganismos capaces de metabolizar los hidrocarburos. Ahora sí podemos entender que los microorganismos hayan desarrollado las capacidades necesarias para metabolizar los hidrocarburos y por el contrario presenten mayores dificultades en degradar pesticidas o explosivos, productos sintetizados por el hombre, y que a escala de los tiempos geológicos sólo haría un instante que están en la tierra. Para algunos de estos compuestos, denominados xenobióticos, los microorganismos, pese a su rápida adaptación a nuevas situaciones, podrían no haber sintetizado todavía los enzimas necesarios.

3. FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Existen tres grupos de factores que condicionan la biodegradación microbiana de hidrocarburos, los relacionados con las características del producto petrolífero, los relacionados con el medio y los relacionados con los microorganismos presentes en el emplazamiento (Alexander, 2004). Si bien los microorganismos pueden degradar una parte importante de un crudo de petróleo, tienen preferencias por algunos hidrocarburos. Recordemos que los crudos de petróleo están formados por cuatro familias de compuestos o fracciones: los hidrocarburos alifáticos, los hidrocarburos aromáticos, las resinas y los asfaltenos. Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque se han llegado a describir biodegradaciones de hidrocarburos de hasta 44 carbonos. Los isoprenoides, y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los substituyentes alquilo, por tanto, su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación (Prince, 2005). Otro aspecto importante relacionado con las características de los productos petrolíferos son su hidrofobicidad y su facilidad para adsorberse en partículas del suelo como las arcillas o absorberse o en la materia orgánica. Estos fenómenos, así como la difusión en microporos dan lugar a una disminución de su biodisponibilidad hacia los microorganismos que deben degradarlos.

El medio donde se encuentra el contaminante debe proporcionar las mejores condiciones a los microorganismos para que su actividad metabólica sea la adecuada para degradar los hidrocarburos. En el caso de los hidrocarburos, aunque existen microorganismos que pueden degradarlos anaeróbicamente, sabemos que el metabolismo más eficaz es el aeróbico por lo que la presencia de oxígeno será un requisito imprescindible. En el caso de la zona no saturada del suelo, una variable muy importante es la humedad que deberá encontrar un valor óptimo entre aquel que requieren los microorganismos para su metabolismo y el que permita una buena aireación.

La transformación ideal de los hidrocarburos por parte de los microorganismos es la mineralización, que supone que el microorganismo utiliza el contaminante como substrato de crecimiento. Pensemos que los hidrocarburos sólo contienen carbono (C) e hidrógeno (H), mientras que una célula microbiana contiene C, nitrógeno (N), fósforo (P), además de otros micronutrientes, en unas proporciones determinadas. Para que el microorganismo pueda crecer a expensas de los hidrocarburos deberá disponer en el medio de las proporciones necesarias de N y de P además del C y H. Es por ello que en medios pobres en N y P se necesitará suplementar con nutrientes o fertilizantes.

Por lo que respecta a los factores relacionados con los microorganismos, se define el período de aclimatación como aquel tiempo que requieren las poblaciones microbianas presentes en un emplazamiento para empezar a degradar los contaminantes. En este sentido, se conocen distintos factores que pueden disminuir o aumentar este tiempo pero en términos generales están relacionados con el historial de contaminación del emplazamiento. Si la contaminación es remota los microorganismos están muy adaptados a la presencia de los contaminantes y pueden dar una respuesta rápida a una bioestimulación sin prácticamente un período de aclimatación. En el caso de contaminaciones accidentales, este período podría alargarse. Sin embargo, cabe señalar que en el caso de la contaminación por hidrocarburos, al tratarse de unos contaminantes prácticamente omnipresentes, pensemos en su presencia en la atmósfera, se ha podido constatar que se encuentran microorganismos degradadores de hidrocarburos en prácticamente cualquier emplazamiento.

4. FASES EN LA APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE LA BIORREMEDIACIÓN

Cuando se nos plantea un caso de suelo contaminado se deben llevar a cabo una serie de etapas. Cada una de ellas deberá llevarse a cabo por distintos profesionales interrelacionados: geólogos, químicos, microbiólogos e ingenieros. A título de resumen deben cumplirse las siguientes etapas. En primer lugar se debe realizar una investigación exhaustiva del emplazamiento en relación con los contaminantes y en relación con el tipo de suelo. En segundo lugar, se deben realizar unos ensayos de tratabilidad a nivel de laboratorio, seguidos si es factible de un ensayo piloto para finalmente implantar la tecnología escogida que irá acompañada de un buen control de seguimiento.

¿Que son los ensayos de tratabilidad o factibilidad? Para llevar a cabo un tratamiento de biorremediación eficaz, se deben cumplir unos requisitos y se deben identificar con anterioridad los factores específicos que condicionan el proceso. Mediante la realización de experimentos a nivel de laboratorio, denominados ensayos de tratabilidad, podremos conocer, para cada emplazamiento, las características microbiológicas, edafológicas y fisicoquímicas, así como la influencia de distintos parámetros (O_2 , nutrientes, etc.) antes de implementar cualquier tecnología de biorremediación. Nuestro grupo ha diseñado un protocolo (Sabaté et al., 2004) que hemos aplicado con éxito a distintos emplazamientos.

En algunos casos puede existir reticencia en llevar a cabo estos análisis, tanto por parte de los propietarios como de las empresas adjudicatarias. En la mayoría de los casos el propietario exige una acción inmediata por cuestiones de tiempo y la adjudicataria de la descontaminación puede pensar erróneamente, que ya ha adquirido suficiente experiencia como para obviar la fase de laboratorio y llevar a cabo una acción determinada teniendo en cuenta escenarios parecidos. Sin embargo, los ensayos de tratabilidad representan una parte muy pequeña de los costes totales de recuperación de cualquier emplazamiento y la información que pueden proporcionar es fundamental. Puede abaratar el coste final y lo que es más importante, aumentar las posibilidades de éxito. Por ello, es necesario no escatimar ni tiempo ni recursos en esta fase del proyecto.

Nuestros ensayos de tratabilidad están estructurados en dos fases y pretenden responder en el mínimo tiempo posible dos cuestiones fundamentales. La primera: ¿es factible llevar a cabo una biorremediación en este emplazamiento? Si la respuesta es afirmativa, los ensayos posteriores pretenden encontrar las condiciones óptimas para que la biorremediación alcance los mejores resultados posibles. En resumen, el objetivo de los ensayos de tratabilidad es evaluar el nivel y la actividad de las poblaciones microbianas presentes, evaluar la biodegradabilidad de los contaminantes presentes por parte de las poblaciones microbianas indígenas y, finalmente, encontrar aquellas condiciones medioambientales que permitan optimizar la actividad metabólica de las poblaciones microbianas responsables de la eliminación de los contaminantes.

5. ESTRATEGIAS Y EJEMPLOS DE BIORREMEDIACIÓN EN LA ZONA NO SATURADA

Los tipos de intervención en la aplicación de la tecnología de la biorremediación pueden ser “in situ”, cuando el tratamiento del suelo se realiza sin excavar, y “ex situ” cuando se lleva a cabo la excavación del suelo. Cuando este suelo excavado se trata en el mismo emplazamiento le llamaríamos “on site” y si se lleva a una planta de tratamiento “off site”.

Las tecnologías existentes se agrupan en dos modalidades: la biorremediación intrínseca o atenuación natural monitorizada y la biorremediación dirigida. La primera modalidad, está basada en los procesos físicos, químicos y biológicos que conducen a la disminución de la concentración de los contaminantes presentes de forma natural sin ninguna intervención exterior. En este caso se llevará a cabo un seguimiento del proceso que permita constatar que se está produciendo una disminución de la contaminación. La biorremediación dirigida consiste en provocar una bioestimulación de las poblaciones microbianas indígenas. ¿Pero a qué nos referimos cuando hablamos de bioestimulación? Aquí debemos recordar lo enunciado anteriormente en relación a los factores que condicionan la biodegradación microbiana de los hidrocarburos. Suministro de oxígeno, mantenimiento de la humedad óptima, garantizar la presencia de las cantidades necesarias de N y P y que los contaminantes estén mayoritariamente biodisponibles, serán las principales acciones que podemos llevar a cabo en función de los resultados obtenidos en los ensayos de tratabilidad.

Sin embargo, en algunos emplazamientos con contaminación reciente las poblaciones presentes en el emplazamiento o no están capacitadas para metabolizar el contaminante o están en una proporción tan baja que no responden a los bioestimulantes. En estos casos, se hace necesario la inoculación o siembra de microorganismos que haremos crecer en el laboratorio. Cuando se utiliza esta estrategia, hablamos de biorrefuerzo. Estos inóculos, pueden estar formados por cepas puras o cultivos mixtos de microorganismos (consorcios) que pueden ser de diseño o naturales. Sin embargo, tal como hemos mencionado anteriormente, en el caso de la contaminación por hidrocarburos, dada la presencia mayoritaria de microorganismos degradadores de hidrocarburos, la inoculación de microorganismos de

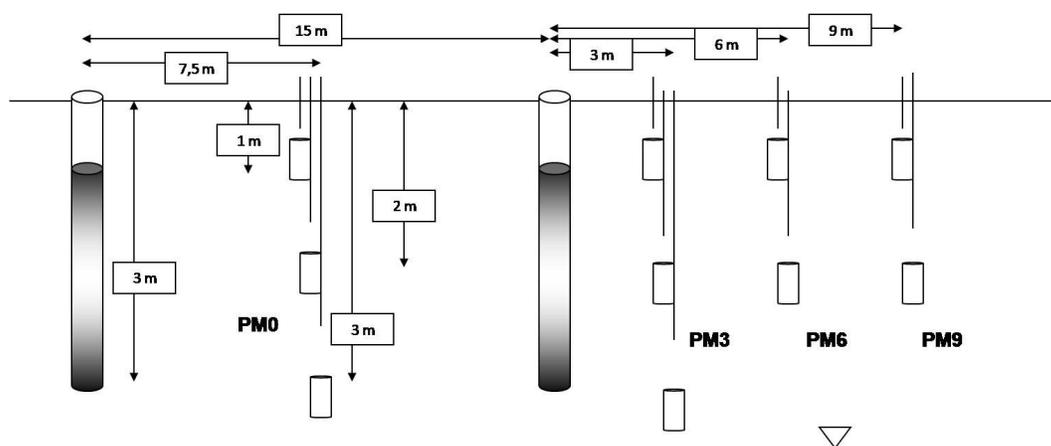


Figura 2. Esquema del perfil de situación de los pozos de inyección (sombreados) y de las sondas de control (PM0, PM3, PM6 y PM9).



Figura 3. Ensayo piloto mediante la tecnología del bioventeo. (a) soplador, (b) sonda en piezómetro, (c) determinación de O_2 y CO_2 .

Los resultados mostraron unas reducciones del orden del 90% después de 7 meses de tratamiento, situando los niveles post-tratamiento por debajo de las 1.000 ppm, a excepción de 3 muestras que presentaban valores de 2.000 ppm. Estas muestras corresponden a los de mayor contaminación inicial (12.000 ppm). Debido a la inyección de aire, parte de la contaminación pudo haber sido eliminada mediante volatilización, principalmente en las zonas colindantes a los pozos de aireación. Para evaluar este efecto se determinaron las concentraciones de volátiles en el subsuelo en distintos puntos y momentos del tratamiento, y se realizó una evaluación teórica de la fracción volatilizada frente a la fracción degradada. Los resultados estiman que la proporción obtenida fue de 1:10 (1 fracción volatilizada por cada 10 degradadas). Así, el proceso dominante en el tratamiento fue la biodegradación.

..En relación al suelo contaminado por creosota, se partió de unas concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) de 8000 ppm, de los cuales el 90% eran HAPs. Las fuentes inorgánicas de nitrógeno estaban en una proporción molar C:N de 1100:1, inferior a la óptima. El pH era neutro-básico, favorable para procesos de biodegradación, con una elevada población microbiana degradadora de HAPs (8×10^5 NMP g⁻¹ suelo) que representaba un 12% de la población heterótrofa total. Una vez comprobado que el suelo contaminado con creosota presentaba una notable población microbiana degradadora de HAPs, metabólicamente muy activa y bioestimulable, y que la matriz contaminante era biodegradable en las condiciones fisicoquímicas del suelo, se procedió a la segunda fase del estudio de tratabilidad. En esta fase se evaluó, en microcosmos, el efecto de diferentes factores fisicoquímicos y biológicos en la biodegradación de la creosota, la dinámica y la estructura de las poblaciones microbianas implicadas y la ecotoxicidad del suelo durante el proceso de biorremediación.

Los HAPs de dos y tres anillos fueron, ampliamente, degradados durante los primeros 45 días, con la misma tasa de degradación en todos los tratamientos. La biodegradación de benzo(a)antraceno y criseno (4 anillos) fue significativamente mayor en el tratamiento sin nutrientes y, finalmente, no se observó una biodegradación significativa de HAPs de 5 o más anillos en ninguno de los tratamientos (Fig. 4).

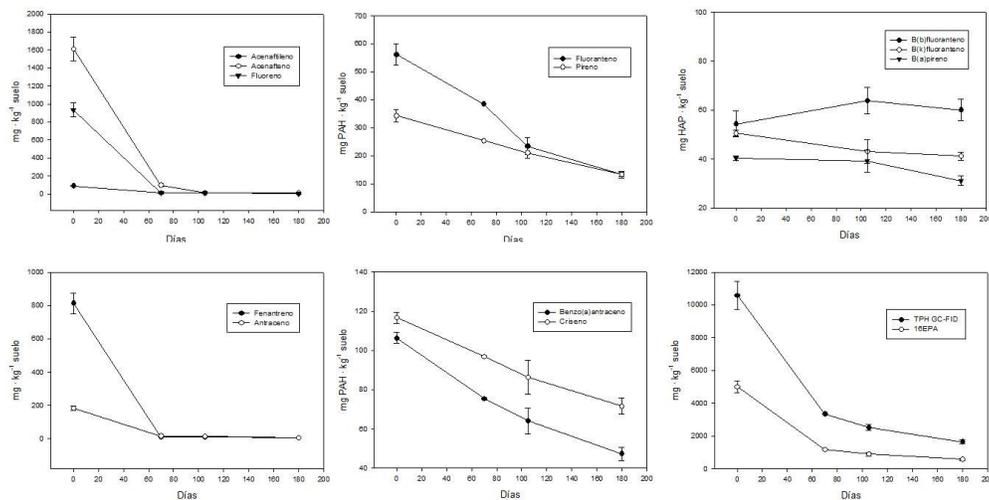


Figura 4. Cinéticas de degradación de los HAPs individuales y de los TPH, así como de los 16 HAPs de la EPA en conjunto.

Para analizar el efecto de los diferentes tratamientos de biorremediación en las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs, se llevó a cabo una enumeración de las poblaciones total heterótrofa y degradadora de HAPs. En los tratamientos de bioestimulación con adición de nutrientes ambas poblaciones aumentaron entre 2 y 3 órdenes de magnitud en los primeros 21 días. Sin embargo, en la bioestimulación sin adición de nutrientes las poblaciones microbianas incrementaron de forma más gradual, con un aumento de 1 a 2 órdenes de magnitud. Pero lo que nos pareció más sorprendente es que en este tratamiento la proporción degradadora de HAPs, con respecto a la heterótrofa total, alcanzó valores superiores al 50% durante el periodo comprendido entre los 90 y los 200 días, con un máximo del 100% en el día 135. Sin embargo, en el tratamiento con nutrientes no cambió la proporción de degradadores respecto a la que presentaba el suelo inicial y el no tratado, durante todo el periodo de incubación (12-24%).

Estos resultados reforzaban los resultados que habíamos obtenido en los descensos de los HAPs diana y ponían de manifiesto que la no adición de nutrientes permitía el crecimiento de una población más lenta pero más especializada en la degradación de HAPs de mayor tamaño molecular. Por el contrario, la adición de nutrientes inicial provocaba un aumento de una flora microbiana de rápido crecimiento pero no tan especializada. Este resultado lo consideramos muy interesante y aporta una información muy novedosa al campo de la biorremediación de hidrocarburos de alto peso molecular. La adición inicial de nutrientes y a las proporciones que frecuentemente se recomiendan (C:N:P 100:10:4) es excesiva y debería hacerse en etapas más tardías del proceso y de manera fraccionada.

A la luz de estos resultados se decidió llevar a cabo una experiencia piloto mediante la tecnología de una biopila dinámica. El suelo escogido fue de la segunda zona de almacenaje, cerca de donde los sondeos habían señalado una mayor contaminación. Se procedió a la extracción del suelo con una pala excavadora (Fig. 5a) que posteriormente era depositado en un camión remolque y trasladado a la zona escogida para la construcción de la biopila cercana a la zona de creosotado. A medida que se iba construyendo la biopila, se fueron colocando una serie de tubos de PVC flexibles para poder determinar la concentración de oxígeno en zonas profundas y así poder determinar la frecuencia de volteo (Fig. 5b). Se determinaron las concentraciones de O₂ y CO₂ de manera superficial (20-25 cm de la superficie) y también en el interior del sistema. También se procedió al riego para llegar a una humedad óptima del 60% y posteriormente se cubrió con una tela (Fig. 5c).



Figura 5. Construcción y control de una biopila dinámica con un suelo contaminado con creosota. (a) excavación del suelo contaminado, (b) biopila con cubierta, (c) determinación de O_2 y CO_2 .

Durante todo el proceso se llevaron a cabo determinaciones de oxígeno, anhídrido carbónico (parámetro de indicación de actividad microbiana) y de humedad para que siguieran siendo óptimos, tanto a nivel de superficie como del interior de la biopila. Se observó que a partir de los 15-20 cm de la superficie, el suelo preservaba una buena humedad. Para mantener estos niveles óptimos se procedió al volteo y riego de la biopila, en intervalos de tiempo no superiores a las tres semanas. En una misma fecha se realizaban dos volteos y dos riegos para conseguir una óptima homogenización del sistema.

El control para mantener los niveles de oxígeno y de humedad en valores próximos a los óptimos permitió que el proceso de biodegradación llegara a valores elevados. Al final del tratamiento, el porcentaje de degradación de los TPH llegó al 85% y por lo que a los 16 HAPs de la EPA se refiere se consiguió un 89% de degradación respecto al día 0. Observando las cinéticas de eliminación de cada uno de los HAPs diana se pudieron prever distintos comportamientos. Los HAPs de tres anillos (fenantreno y antraceno) se degradaron totalmente. Los HAPs de 4 anillos (fluoranteno, pireno, criseno y benzo(a)antraceno) se continuarían degradando hasta que dejaran de estar disponibles. Por último, los HAPs de 5 anillos prácticamente no se degradaron y únicamente el benzo(a)pireno pasados 105 días presentó una ligera disminución.

En relación con los HAPs de 5 anillos cuyas concentraciones al final del proceso suelen presentar valores que superan los niveles genéricos de referencia (NGR) establecidos, se deberían tener en cuenta que estos HAPs de elevado peso molecular tienen una biodisponibilidad muy baja debido a procesos de adsorción a partículas del suelo y de absorción con la materia orgánica y esta baja biodisponibilidad afecta también su toxicidad.

Esta última consideración pudo ser confirmada con los ensayos de toxicidad aguda realizados. Los resultados obtenidos con el test de Microtox (Fig. 6) nos indicaron que mientras inicialmente el suelo presentaba una toxicidad elevada, durante el proceso de bioremediación fue disminuyendo hasta poder ser considerado no tóxico.

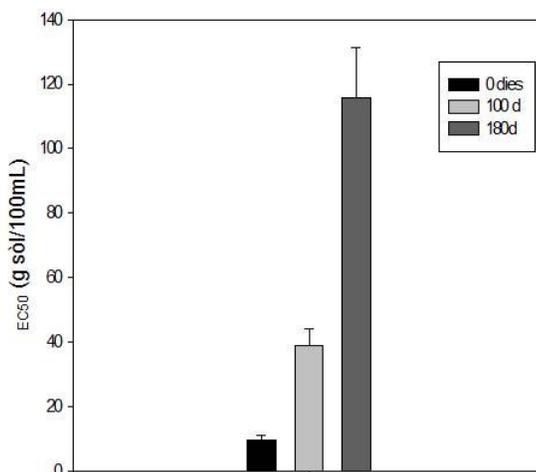


Figura 6. Evolución de la EC_{50} a lo largo del proceso de bioremediación en la biopila dinámica (Microtox de lixiviados del suelo).

A la vista de estos resultados se puede evidenciar que los valores absolutos de las concentraciones de los HAPs, no pueden ser el único criterio para establecer el nivel de contaminación puesto que factores como la biodisponibilidad y la toxicidad pueden ser importantes como parámetros complementarios a los NGR.

6. NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN EN LA BIOREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

Aunque como se ha dicho anteriormente la biorremediación aplicada a emplazamientos contaminados por hidrocarburos suele conducir a resultados muy satisfactorios, todavía quedan algunos aspectos por abordar en la investigación. Aspectos relacionados con la falta de biodisponibilidad y la recalcitrancia de algunos HAPs de elevado peso molecular sugieren nuevas estrategias.

En relación a la falta de biodisponibilidad, mientras se conoce muy bien el comportamiento de los tensoactivos en medio líquido, donde se han obtenido muy buenos resultados (Abalos et al., 2004), su comportamiento en medio sólido está sujeto a interacciones mucho más complejas y los resultados obtenidos hasta la actualidad muestran resultados contradictorios (Volkering et al. 1998).

En relación a la biodegradación de HAPs de elevado peso molecular, existe un grupo de microorganismos que ofrece muchas expectativas. Se trata de los hongos ligninolíticos cuyos exoenzimas peroxidadas y lacasas pueden oxidar estos sustratos. Sin embargo, mientras que se pueden llevar a cabo la eliminación de estos sustratos en medio líquido, la colonización de estos hongos en suelos contaminados ofrece ciertas dificultades. Un mejor conocimiento de los parámetros que condicionan esta colonización debería permitir su aplicación exitosa en la biorremediación de suelos con elevadas concentraciones de estos contaminantes.

Finalmente, otro aspecto necesario de discusión e investigación se refiere a los parámetros que se usan para establecer cuándo un suelo está descontaminado. En primer lugar se debería homogeneizar y controlar las metodologías de análisis de los TPH ya que pueden existir resultados muy dispares entre laboratorios. En segundo lugar, los valores absolutos de la concentración de los hidrocarburos en un suelo no debería ser el único parámetro para establecer que un suelo está descontaminado. El fenómeno de la falta de biodisponibilidad de los hidrocarburos más pesados y recalcitrantes y el seguimiento de la toxicidad deberían ser incluidos en los programas de seguimiento.

7. REFERENCIAS

- Abalos, A., M. Viñas, J. Sabaté, M. A. Manresa, y A. M. Solanas, 2004. Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15:249-260.
- Alexander, M., 2004. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press.
- Prince, R. C., 2005. *Petroleum Microbiology*. p. 317-336. Olivier, B. And Margot, M. Eds. American Society of Microbiology Press, Washington DC.
- Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, y E. Z. Ron, 1992. Petroleum bioremediation- a multiphase problem. *Biodegradation* 3: 337-350.
- Sabaté, J., M. Viñas, y A. M. Solanas, 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54, 19-25.
- Viñas, M., J. Sabaté, M. J. Espuny, y A. M. Solanas, 2005. Bacterial community dynamics and PAHs degradation during bioremediation of a heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 7008-7018.
- Volkering, F., A. M. Breure, y W. H. Rulkens, 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. 8:401-417.