

ENSAYOS DE TRATABILIDAD DE SUELOS Y BARROS EMPETROLADOS

El objetivo de estos ensayos es establecer una metodología de definición, selección y ajuste de procesos de tratamiento de suelos contaminados a implementar en escala de laboratorio o microcosmos que permita definir y ajustar el piloto de tratamiento a mayor escala y en campo.

Se ha observado que gran número de los procesos de tratamiento de suelos contaminados no ocurren a la velocidad óptima o no son exitosos, generando grandes gastos en movimientos de suelos y en costosos procesos de tratamiento que no conducen al resultado final esperado. Estos procesos de tratamiento muchas veces no son efectivos debido a la presencia de compuestos que dificultan o interfieren en el desarrollo del proceso de descontaminación y en parte se debe a que han sido poco estudiados e investigados, como consecuencia de no estar incluidos como contaminantes en la legislación de aplicación vigente. Esta última particularidad hace que solo se enfoquen los tratamientos en base a los contaminantes solicitados o exigidos por la legislación. Tampoco en el diseño de los procesos, se tiene en cuenta el efecto de la matriz del suelo sobre la retención o disponibilidad del o los contaminantes y del agua de humectación, así como la oxigenación y homogeneización del material a tratar, la cual puede modificarse u optimizarse mediante una etapa previa al proceso de tratamiento, la que debe ser investigada en el laboratorio y ajustada posteriormente a escala de campo.

Desde el punto de vista práctico, es común que el tratamiento de los suelos contaminados sea fijado a priori por la empresa responsable del suelo afectado y el problema radica en que lo realiza sin tener en cuenta las características de los suelos y los contaminantes, como así también las particularidades regionales como variaciones térmicas, precipitaciones estacionales, vientos y disposición de insumos y recursos, lo que conduce en la mayoría de los casos al uso de procesos que no permiten lograr los objetivos planteados.

Las etapas para tratar un suelo contaminado se pueden resumir de la siguiente forma:

1) Caracterización del sitio contaminado y del material contaminado.

Consiste en definir la profundidad y extensión de la zona afectada, características, concentración y distribución de contaminantes, capacidad y vías de migración con la posible influencia sobre los sitios aledaños, riesgo para la salud y el ambiente.

2) Selección de la técnica de tratamiento

Las técnicas de tratamiento son procesos que se aplican a desechos peligrosos o materiales contaminados para transformar su estado por medios químicos, biológicos o físicos.

Con técnicas de tratamiento se pueden transformar materiales contaminados, destruyéndolos o modificándolos, a fin de que sean menos peligrosos o dejen de ser peligrosos.

Las técnicas para la remediación de suelos contaminados pueden ser aplicadas **in situ** (en el lugar donde se produjo la afectación del suelo), como es el caso de la restauración biológica, técnicas de venteado y/o extractivas y técnicas de estabilización y solidificación. Las técnicas aplicadas **ex-situ** (en repositórios, plantas de tratamiento o en sitios de tratamiento y disposición final), pueden consistir en tratamientos físicos y Químicos (tratamiento térmico, lavado, estabilizado y solidificado, etc.) o tratamientos biológicos (landfarming, biopilas, reactores biológicos, etc.)

3) Pretratamiento del suelo

Las etapas de pretratamiento tienen como objetivo acondicionar el suelo para llevar a cabo más rápida y efectivamente el tratamiento o reducir los volúmenes del suelo o material a tratar.

Los pretratamientos más utilizados son:

- a) Separación física por segregado
- b) Separación física a través de tensioactivos
- c) Separación física por densidad
- d) Separación física centrífuga
- e) Corrección del pH y/o de la Conductividad Eléctrica del suelo, a través de enmiendas o lavados del suelo.
- f) Extracción y separación de metales pesados, compuestos recalcitrantes o no degradables, etc.

4) Ensayos de Tratabilidad

Los ensayos de tratabilidad se realizan con el objetivo obtener información respecto a la efectividad de una técnica de remediación para el contaminante y el medio contaminado específico y para optimizar parámetros de proceso.

Se desarrollan a través de las tres etapas siguientes:

ETAPA I: Selección en laboratorio

La selección en laboratorio es una prueba rápida para establecer si una determinada tecnología tiene la capacidad para tratar un residuo. Una tecnología de tratamiento biológico generalmente se considera como una opción razonable si se obtiene una reducción superior al 20 % de la masa de contaminante, excluyendo las pérdidas abióticas. (M. LaGrega et al., 1996).

Etapa II: Ensayos en serie

Estos ensayos son pruebas medianamente rápidas con el propósito de seleccionar un proceso para su posterior evaluación e identificación de los parámetros y variables que tienen mayor influencia sobre la degradación. Estos ensayos se realizan generalmente en reactores discontinuos, haciendo ajustes en la alimentación, aditivos químicos, parámetros físicos y otras variables para estudiar su impacto en la velocidad de degradación. Los datos proporcionados por los ensayos en serie conducirán a la selección de uno o dos procesos para su posterior ensayo a nivel de escala piloto.

Etapas III: Ensayos a escala piloto

Los ensayos a escala piloto se realizan no solo para verificar los procesos, sino también, para proporcionar datos acerca de la cinética de degradación para el diseño final.

Un ensayo en planta piloto puede necesitar de semanas a meses para completarse.

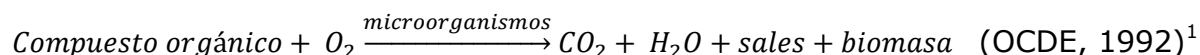
Existen pocos ensayos de Tratabilidad estandarizados, aceptados ampliamente, que soporten la evaluación de las alternativas de los procesos de tratamiento biológico sobre una base comparable. Una completa evaluación de las variables de tratamiento para el caso que se trate de un tratamiento biológico puede ser una labor intensa e involucrar muchos juicios técnicos. (M. LaGrega et al., 1996).

5) Tratamiento del suelo afectado

5.1) Tecnologías de tratamiento de Biorremediación

5.1.a. Biodegradación - Ensayo de biodegradabilidad

La biodegradabilidad es un parámetro determinante en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas y una propiedad deseable de los productos que se liberan en grandes cantidades al medio natural, tales es el caso de los hidrocarburos del petróleo, sus productos refinados y subproductos, entre otras sustancias. Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales. La biodegradación puede ser "primaria" y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina "biodegradación última" o "mineralización"



La biodegradabilidad ha sido definida como la capacidad intrínseca de una sustancia a ser transformada en una estructura química más simple por vía microbiana (Ottenbrite y Ibertsson, 1992). Para su evaluación se han diseñado una serie de pruebas, las cuales buscan cuantificar el grado de persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales o industriales. Algunas de estas pruebas han sido normalizadas para garantizar que sus resultados son confiables y válidos independientemente del laboratorio en el que sean obtenidos.

*En el esquema establecido por el Programa de Evaluación de Productos Químicos de la OCDE, la biodegradabilidad de una sustancia se determina utilizando tres niveles sucesivos de ensayo: las pruebas de **biodegradabilidad inmediata**, de **biodegradabilidad intrínseca** y de **simulación** (OCDE, 1992).*

*Inicialmente se lleva a cabo una prueba de **biodegradabilidad inmediata**, con la finalidad de clasificar las moléculas en la categoría 'fácilmente biodegradable' con medios analíticos simples. Las condiciones experimentales de las pruebas inmediatas restringen al máximo las posibilidades de que la biodegradación suceda,*

¹ Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), Fundada en 1961,

razón por la cual se considera que un resultado positivo indica la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento (Nyholm, 1991).

Si el resultado de la prueba de biodegradabilidad inmediata es negativo, se procede a realizar una prueba intrínseca. Estas pruebas utilizan condiciones experimentales más favorables a la degradación, por lo que un resultado positivo implica que la sustancia es 'intrínsecamente biodegradable' bajo las condiciones empleadas, aunque no necesariamente en el medio natural. Por otra parte, un resultado negativo indica muy probablemente la persistencia ambiental de la sustancia. Finalmente, si la sustancia mostró una biodegradabilidad mediocre en una prueba intrínseca, se llevan a cabo pruebas de simulación. Tales pruebas tienen como objetivo estudiar su comportamiento en sistemas de tratamiento o medios naturales relevantes, para lo cual debe contarse con un cierto conocimiento de la distribución de la sustancia en los diferentes compartimientos ambientales (agua, suelos, etc.). Si el resultado de la prueba de simulación pertinente es a su vez negativo, se presume que la sustancia persiste en el ambiente y que puede considerársele sujeta a restricciones en cuanto a su esquema de producción o comercialización; así mismo, suele exigirse la búsqueda de compuestos sustitutos para un cierto uso (Kaiser, 1998).

a) Tratamiento por biorremediación

Los procesos de biorremediación han sido exitosamente aplicados en limpieza de suelos y en la actualidad se cuenta con diversas tecnologías. La biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos contaminados en contraste a alternativas mucho más costosas y de menor aceptación pública tales como la incineración. Las técnicas de biorremediación correctamente aplicadas son aceptables desde el punto de vista ecológico. La biorremediación implica el uso de microorganismos autóctonos o alóctonos para degradar contaminantes del suelo. Los tratamientos biológicos de degradación en suelo pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas. El proceso de degradación requiere control de variables operacionales tales como nutrientes, humedad y oxígeno.

Numerosos microorganismos distribuidos en la naturaleza poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de energía y carbono ("alimento"), por lo que la utilización microbiana de hidrocarburos podría ser un método válido para la eliminación de los mismos en el ecosistema afectado (biorremediación).

Ciertas especies de bacterias, hongos, actinomicetes y protozoos son los microorganismos que tienen la capacidad degradativa, obteniendo los nutrientes por digestión, y la importancia relativa de cada uno depende de las condiciones del medio.

Estos secretan enzimas digestivas, las cuales degradan moléculas específicas, desdoblándolas en compuestos simples y solubles que entran en las vías metabólicas normales de cada organismo.

La descomposición es completa cuando los compuestos orgánicos son retornados al ambiente en forma inorgánica o mineral, algunos de estos compuestos son degradados a dióxido de carbono (CO₂) y agua, y otros son tomados por otros saprótrofos.

La biodegradación de petróleo en los ecosistemas es compleja. Depende de las características de la mezcla de hidrocarburos, de los factores ambientales que regulan la actividad biológica y del nivel y actividad de las poblaciones microbianas indígenas presentes.

Se ha visto que la tasa de descomposición es mayor para los hidrocarburos saturados, seguido por los aromáticos livianos, mientras que los aromáticos de alto peso molecular exhiben tasas muy bajas de descomposición. No obstante este esquema no es universal.

Los efectos ecotóxicos de un producto del petróleo (combustibles, aceites lubricantes, fluidos hidráulicos, ceras, asfaltos, etc.), pueden ser muy graves por actuar en todos los niveles de organización biológica: desde los componentes subcelulares hasta los niveles superiores del ecosistema.

La descomposición enzimática de algunos productos naturales como lignina, celulosa y diferentes lípidos, es similar a la de ciertos contaminantes naturales o sintéticos. Es en este hecho en que está basada la importancia para la eliminación de los contaminantes.

En ciertos hongos superiores se ha comprobado que el complejo enzimático de las ligninasas es eficiente en la degradación de hidrocarburos aromáticos y otros contaminantes producidos por el hombre.

b) Protocolos de Tratabilidad para Biorremediación (Sabaté 2004)

Este protocolo plantea 2 etapas principales a desarrollar en el menor tiempo posible.

Etapa I - Factibilidad:

¿Es posible llevar a cabo la degradación en el emplazamiento?

Si es factible, los ensayos posteriores pretenden encontrar:

Etapa II – Condiciones óptimas:

a. Evaluar la biodegradabilidad de los hidrocarburos presentes mediante las poblaciones indígenas.

a.1. Química de los hidrocarburos en relación a la biodegradabilidad -Escala de biodegradabilidad. (Calabrese y KostECKI -1993)

Los Alcanos (Saturados) y Aromáticos son las fracciones predominantes en los compuestos del petróleo. Respecto a la biodegradabilidad, en líneas generales los n-alcanos, n-alcaliaromáticos y los aromáticos de C10 a C22 son los más fácilmente degradables. En cambio los que poseen más de 22 átomos de carbono, tienen baja solubilidad en agua y debido a que se presentan en estado sólido a temperatura fisiológica son de muy lenta transformación por los microorganismos.

a.1.1. Hidrocarburos Alifáticos (saturados)

Constituidos por cadenas abiertas de enlaces entre carbonos, saturados e insaturados (alcanos; alquenos y alquinos) y ciclos de uniones de carbono

saturados (cicloalcanos).

Los alcanos son la familia más numerosa en los petróleos crudos y se conocen como Parafinas. Las parafinas de menos de 28 átomos de carbono son más fácilmente degradables y de 28 a 44 átomos de carbono decae su degradabilidad. De estas cadenas, las ramificadas o isoprenoides, son degradadas más lentamente que las lineales.

Los hidrocarburos cíclicos saturados o ciclo alcanos también llamados cicloparafinas o naftenos son componentes minoritarios del petróleo crudo.

a.1.2. Hidrocarburos Aromáticos

Constituidos por anillos insaturados de átomos de carbono e hidrógeno (anillos bencénicos), sustituidos por grupos alquílicos, por otros anillos insaturados o por hetero átomos de O, N o S.

A medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo, aumenta su peso molecular y con ello la resistencia a la biodegradabilidad.

Los hidrocarburos aromáticos pueden ser de 2 tipos: Los hidrocarburos aromáticos volátiles bencénicos y los hidrocarburos poliaromáticos o policíclicos aromáticos (HAPs). Estos últimos pueden presentar varios anillos bencénicos fusionados.

El grupo de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) son los más móviles y mayor toxicidad ambiental.

Los HAPs comprenden del 10 al 25% del petróleo puro y son las fracciones más pesadas. Se consideran compuestos orgánicos persistentes. Las propiedades semivolátiles de los HAPs les otorgan gran movilidad en el ambiente.

Son cancerígenos potentes el benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y el dibenzo(ah)antraceno.

De los cientos de HAPs que existen la EPA ha seleccionado 16 de ellos como agentes contaminantes prioritarios.

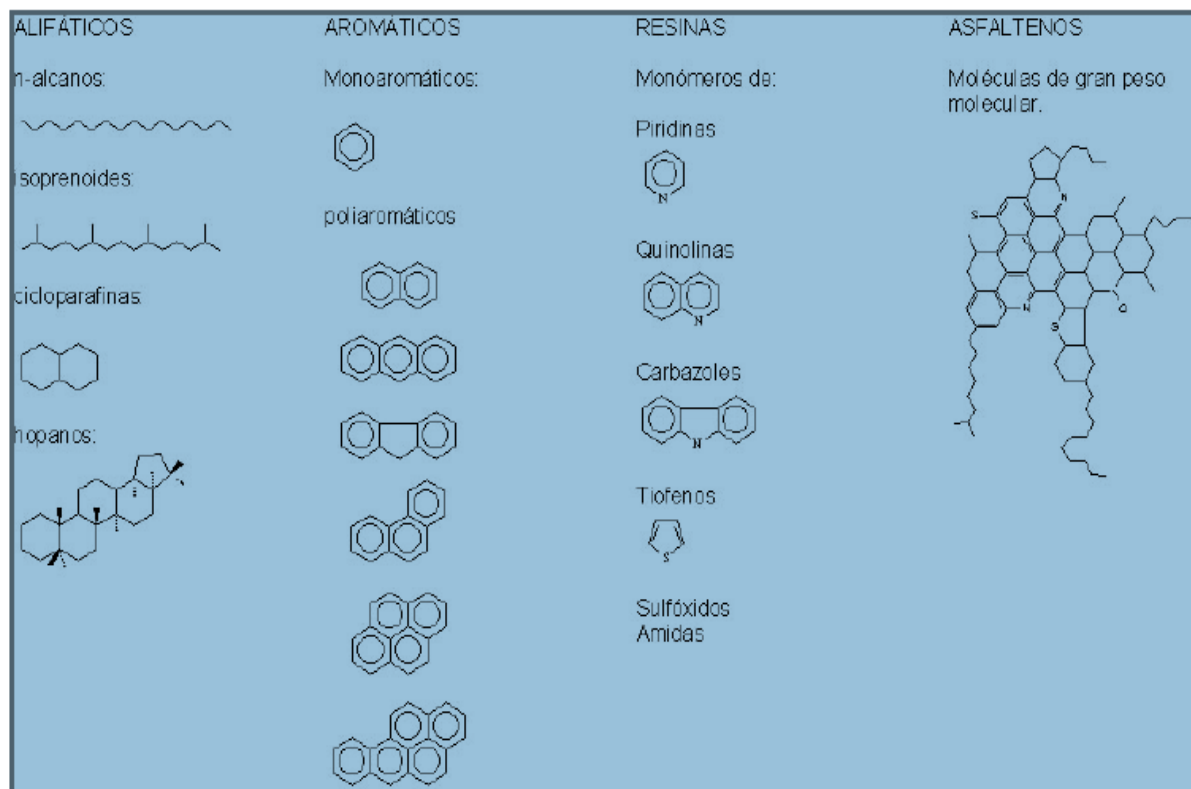
Cuanto más anillos tenga el compuesto, mayor será la resistencia a la actividad degradadora o enzimática. En general los HAPs de 4 y 5 anillos son los más difícilmente removidos, mientras que los más livianos son más biodegradables, más solubles en agua y más volátiles.

a.1.3. Resinas Y Asfaltenos

Las resinas están constituidas por compuestos pirimidínicos, quinolinas, tiofenos, carbazoles, sulfóxidos y aminas.

Los asfaltenos incluyen en sus estructuras los agregados poliaromáticos, fenoles, ácidos grasos, metaloparafinas, etc.

Estos son hidrocarburos recalcitrantes difíciles de degradar, de gran tamaño y de cadenas complejas, son persistentes en el ambiente, degradando la calidad del suelo y el desarrollo normal de plantas y microorganismos es por ello que sus concentraciones deben ser reducidas en el ambiente.



Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.

a. 2. Estudio de comunidades microbianas

La transformación microbiana de los compuestos orgánicos va ligada a dos procesos principales, el crecimiento y el cometabolismo. La utilización de un sustrato para el crecimiento por parte de catabolismo microbiano siempre implica el mismo principio básico: una degradación gradual de la molécula para formar al final uno o más fragmentos capaces de pasar a metabolismo central. Durante el proceso conocido como mineralización, una parte de los elementos que constituyen la materia orgánica son convertidos en productos inorgánicos como CO_2 o H_2O . En algunos casos, sólo una parte del sustrato es degradado, mientras que el resto del compuesto persiste en forma parcialmente oxidada. Por su parte, el cometabolismo se basa en la transformación o metabolización de un compuesto orgánico por un microorganismo que no es capaz de utilizarlo como fuente de carbono y energía. De hecho, la mayoría de transformaciones cometabólicas y las de degradación parcial son producto de la baja especificidad de algunos enzimas presentes en las rutas metabólicas de degradación.

Los n-alcenos son los compuestos alifáticos que se degradan más rápidamente en una mezcla de hidrocarburos (Atlas, 1981). Tanto en hongos como en bacterias, el paso clave para la biodegradación de este tipo de hidrocarburos es una monooxigenación inicial de la cadena hidrocarbonada. En función de la posición en que se produce esta oxidación, se han descrito 3 rutas metabólicas distintas. En la ruta mayoritaria, la oxidación terminal de la molécula, para formar un grupo alcohol, va seguida de una segunda a aldehído y una tercera al ácido graso correspondiente. Estos ácidos grasos pueden incorporarse a metabolismo central

vía β -oxidación, donde se generan otros ácidos grasos de cadena más corta. Los n-alcenos de entre C10-C20 son los más biodegradables, ya que al aumentar su peso molecular disminuye su solubilidad en el agua (Kremer & Anke, 1997; Watkinson & Morgan, 1990). Para un mismo número de carbonos, los alcanos ramificados, como los isoprenoides, presentan una biodegradabilidad inferior (Alexander, 1999). De hecho, la oxidación de isoprenoides puede verse inhibida por la presencia de n-alcenos (Pirnik et al., 1974). También se ha descrito la degradación de cicloalcanos o compuestos que contienen un anillo alifático en su estructura (Trower et al., 1985). Por otro lado, poco se conoce de la degradación de este tipo de hidrocarburos mediante enzimas extracelulares de hongos de podredumbre blanca o ligninolíticos, ampliamente descritos, en cambio, como capaces de romper el anillo aromático de los HAPs. Finalmente, enzimas como el citocromo P450 pueden jugar un papel importante en la degradación de hidrocarburos alifáticos, tanto en microorganismos eucariotas como procariotas (van Beilen & Funhoff, 2005). Un ejemplo, muy bien estudiado, de asimilación de alcanos relacionado con el citocromo P450 se realizó con especies de *Cándida*. El sistema monooxigenasa requerido comprende diferentes enzimas citocromo P450 inducidos por alcanos (Scheller et al., 1996; Seghezzi et al., 1991).

En general, los compuestos aromáticos se degradan con más dificultad, respecto a los hidrocarburos alifáticos, debido a la mayor estabilidad de los enlaces entre átomos de carbonos presentes en su estructura. Como en los alcanos, la degradabilidad disminuye al aumentar el número de carbonos o anillos aromáticos (Prince et al., 2003). A pesar de su elevada estabilidad, la capacidad de degradar compuestos aromáticos se ha descrito en una gran variedad de microorganismos, entre ellos, bacterias y hongos capaces de degradar compuestos de entre 1 y 5 anillos aromáticos (Cerniglia, 1992; Kanaly & Harayama, 2000), debido a que es una de las estructuras químicas más ampliamente distribuidas en la naturaleza, formando parte de compuestos mono y poliaromáticos, así como de compuestos más complejos como la lignina (Dagley, 1981).

Actualmente, numerosos géneros bacterianos han sido descritos como degradadores de HAPs. Una gran diversidad bacteriana es capaz de degradar los HAPs de bajo peso molecular y unos cuantos géneros (i.e. *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* o *Nocardia*, entre otros) han sido catalogados como degradadores de HAPs de elevado peso molecular.

El principal mecanismo, que presentan la mayoría de bacterias, para degradar HAPs de forma aeróbica consiste en la oxidación del anillo bencénico por parte de dioxigenasas para formar cis-dihidrodiol. Estos dihidrodioles son dehidrogenados, formando intermediarios dihidroxilados, que pueden ser metabolizados via catecoles, después de entrar a metabolismo central, hasta CO_2 y agua. Por su parte, algunas bacterias pueden catalizar la degradación de HAPs a transdihrodioles, mediante la acción del enzima citocromo P450 monooxigenasa, como *Mycobacterium* sp. (Kelley et al., 1990).

Durante las dos últimas décadas, se han descrito géneros bacterianos (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* o *Flavobacterium*) capaces incluso de degradar benzo(a)pireno (Aitken et al., 1998; Schneider et al., 1996) y se han propuesto rutas metabólicas donde las dioxigenasas tienen un papel principal (Schneider et al., 1996). Finalmente, se ha descrito también que ciertas cepas bacterianas pueden degradar benzo(a)pireno, de forma cometabólica, cuando crecen a partir de otra fuente de carbono (Ye et al., 1995).

Aunque se ha avanzado mucho durante los últimos veinte años, el conocimiento actual sobre el metabolismo fúngico de HAPs es mucho menor que el referente al metabolismo bacteriano. Sin embargo, los hongos son tan importantes como las bacterias en la biorremediación de HAPs en ambientes acuáticos y en suelos.

Al contrario de las bacterias, los hongos no asimilan los HAPs como fuente de carbono y energía, así que requieren de cometabolismo para detoxificarlos (Casillas et al., 1996). En general, los hongos son más lentos y menos eficientes que las bacterias en la degradación de HAPs. Por el contrario, la mayoría de cepas bacterianas no son capaces de degradar de forma eficiente HAPs de 4 o más anillos bencénicos, mientras que los hongos pueden incluso mineralizar HAPs de más de 4 anillos aromáticos.

La oxidación de HAPs es un preludeo para su asimilación, mientras que en hongos es un primer paso hacia la detoxificación. El papel de los hongos en ecología es muy importante, ya que los metabolitos formados, más polares y más reactivos que los productos parentales, pueden ser mineralizados o detoxificados por la población autóctona bacteriana del suelo.

Se ha demostrado que varias especies fúngicas pueden metabolizar HAPs, como el zigomiceto *Cunninghamella elegans*, ascomicetos *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp., y los basidiomicetos de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus tigrinus*.

En general, los hongos filamentosos y las levaduras forman trans-dihidrodiol, dihidrodiol epóxidos, quinonas y fenoles, a la vez que productos conjugados que se forman a partir del fenol. Estos productos conjugados no son mutagénicos, mientras que los productos oxidados son tóxicos y bioactivos. Las rutas metabólicas de degradación de HAPs por hongos involucran diversos enzimas, como el citocromo intracelular P450 y los extracelulares lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y la casa. La formación de metabolitos hidroxilados es muy importante para la biorremediación, ya que incrementa la mineralización de dichos compuestos.

El conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante procesos de biorremediación, es todavía muy limitado. Debe ser prioritario aumentar el conocimiento en este campo para futuras investigaciones, ya que resulta útil disponer de más información sobre qué microorganismos son capaces de adaptarse a estos hábitats y poder explotar así sus capacidades. Además, es necesario estudiar las comunidades de microorganismos porque el metabolismo de sustratos orgánicos en sistemas naturales suele producirse mediante interacciones metabólicas entre distintos organismos. Por ello, es prioritario aumentar el conocimiento sobre las distintas comunidades microbianas existentes en diferentes sitios contaminados, así como de las interacciones que se establecen entre ellas.

Durante los últimos 20 años han aumentado, de forma significativa, las metodologías para estudiar la diversidad microbiana presente en la biosfera. Pero la realidad es que todavía queda mucho camino por recorrer. De hecho, existe mucha controversia y el orden de magnitud todavía es desconocido, aunque algunos estudios apuntan que en un único gramo de suelo podrían estar presentes entre 10² y 10⁷ especies distintas de microorganismos (Gans et al., 2005; Schloss & Handelsman, 2006). Por otro lado, hay que tener en cuenta que solo entre un

0,001 y un 1% de los microorganismos viables son cultivables (Torsvik et al., 2003). Por este motivo, los estudios clásicos de diversidad microbiana, basados únicamente en el aislamiento de microorganismos, representan una parte minoritaria de la diversidad real existente (Amann et al., 1995), aunque siguen siendo muy útiles para proporcionar cierta información. En cambio, las nuevas técnicas de biología molecular, aplicadas a estudios de biorremediación, nos ofrecen nuevas y atractivas posibilidades para analizar la estructura, composición y cambio poblacional de las comunidades microbianas del suelo, durante procesos de biodegradación.

a.3. Condiciones medioambientales que permitan optimizar la actividad metabólica de las poblaciones degradadoras.

Un buen número de factores que afectan la biodegradación de hidrocarburos derivados del petróleo han sido ampliamente descritos (Bamforth & Singleton, 2005; Das & Chandran, 2011). La estructura de la matriz contaminante puede ser uno de los factores más importantes y por eso debe estar muy bien caracterizada, durante los ensayos de tratabilidad de suelos contaminados. Por otro lado, factores físicos como la temperatura, el pH y la humedad siempre se deben tener en cuenta, ya que afectan directamente a las características químicas de los compuestos contaminantes, como su solubilidad en agua, así como a la fisiología y diversidad de la microbiota autóctona del suelo (Das & Chandran, 2011). Además, la presencia de tanto nutrientes inorgánicos (nitrógeno, fósforo, potasio...) como aceptores de electrones es básica para que las tecnologías implementadas tengan resultados aceptables. En suelos contaminados, donde la presencia de carbono orgánico suele ser alta, debido a la naturaleza del contaminante, los nutrientes disponibles pueden agotarse rápidamente (Breedveld & Sparrevik, 2001). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy variadas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (US-EPA, 1995). Además, La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos del petróleo son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O₂ como aceptor de final de electrones), ya que en ausencia de O₂, y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₂, Mn⁴⁺ y Fe³⁺) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Boopathy, 2002; Grishchenkov et al., 2000; Holliger & Zehnder, 1996; Leutwein & Heider, 1999; Massias et al., 2003).

Finalmente, en suelos industriales, la biodisponibilidad del compuesto contaminante puede ser el factor más importante para limitar el éxito de un proceso de biorremediación (Bamforth & Singleton, 2005). Tanto los hidrocarburos alifáticos de cadena larga como los HAPs, especialmente los de elevado peso molecular, tienen valores bajos de biodisponibilidad y están clasificados como compuestos orgánicos hidrofóbicos, es decir, moléculas con niveles bajos de solubilidad en agua y, por lo tanto, resistentes a la degradación (Semple et al., 2003). Además, los hidrocarburos tienen tendencia a adsorberse rápidamente a superficies minerales, como las arcillas del suelo, y a la materia orgánica, como los ácidos húmicos.

Cuanto más tiempo pase en contacto el hidrocarburo con el suelo, mayor será su adsorción y menor su extractabilidad, ya sea química o biológica. Este proceso es conocido como envejecimiento o "ageing", en inglés, y es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la tecnología de la biorremediación en suelos históricamente contaminados, ya que está íntimamente relacionado con la

persistencia de los contaminantes en el medio ambiente

5.2. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo

El empleo de biomarcadores es útil en el estudio de la evolución de la degradación del petróleo cuando se emplean microorganismos. En función de la resistencia a la degradación, existen biomarcadores que sirven para evaluar mejor la eficacia de la biorremediación en las primeras etapas, como es el caso de los hidrocarburos alifáticos, mientras que otros, como los hidrocarburos aromáticos o los hopanos, permiten determinar la degradación a más largo plazo.

Los biomarcadores presentan una gran utilidad en el estudio de la eficiencia de la biorremediación. Se conoce como biomarcadores a aquellos compuestos que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos y cuya estructura de carbonos base se preserva de tal forma que es reconocible a pesar de la diagénesis y de gran parte de la catagénesis. Muchos biomarcadores tienen inicialmente grupos funcionales que contienen oxígeno (dado que muchos de ellos derivan de los lípidos de los organismos) y se ven sometidos al mismo proceso de pérdida de grupos funcionales que el resto de la materia orgánica. Por lo tanto, los productos diagenéticos son generalmente hidrocarburos, aunque pueden sobrevivir a la diagénesis pequeñas cantidades de compuestos con grupos funcionales, como los ácidos grasos. Al mismo tiempo, los compuestos no saturados (aquellos que contienen doble enlace C=C) tienden a reducirse (mediante hidrogenación), lo que resulta en la formación de hidrocarburos alifáticos (esteranos, hopanos...), o a aromatizarse. Los biomarcadores son muy importantes dado que, en general, pueden proporcionar información acerca de: fuentes biológicas de materia orgánica sedimentaria, medios deposicionales, madurez de la materia orgánica, edad geológica...

Estos compuestos son tan sólo constituyentes traza, pero pueden ser muy útiles, especialmente en el caso de los petróleos: se emplean una gran cantidad de tipos estructurales en la geoquímica del petróleo y, lo que es más importante en el tema que nos ocupa, también se ha demostrado su gran utilidad en la evaluación de la efectividad de la biorremediación de vertidos de petróleo como se expondrá a continuación.

Aplicación de los biomarcadores a la biorremediación

El estudio de biomarcadores permite obtener información sobre el rendimiento de los distintos métodos de degradación de los residuos del petróleo, principalmente los que se refieren al empleo de microorganismos. Asimismo, se puede evaluar la eficacia del uso de diferentes fertilizantes o catalizadores que intervienen en la proliferación de las bacterias y, en consecuencia, en la degradación de los productos del petróleo.

Los biomarcadores son moléculas que retienen el esqueleto básico hidrocarbonado de los compuestos biológicos a través de los procesos de maduración.

La mejor opción para el control van a ser algunos tipos de biomarcadores, en especial aquellos cuya degradación biológica es muy lenta o directamente no va a tener lugar. En concreto, los compuestos que se utilicen deberían ser

referencias que no se originen en el crudo ni en ningún derivado en procesos de envejecimiento o biodegradación. Además, sea cual fuere el tipo de analítica utilizada se debe demostrar que la eficiencia en la extracción del biomarcador es la misma que para el resto de los compuestos (Riser-Roberts, 1998).

Además, en la aplicación de las técnicas de biorremediación es de vital importancia la selección de compuestos que dentro de la mezcla compleja del petróleo no sean biodegradables. Este hecho será aprovechado para conseguir referencias que permitan medir si la degradación que tiene lugar es biológica o no y, si es así, qué microorganismos y de qué manera están degradando los contaminantes y cuáles no. Como criterio general, partiremos de que la proporción entre compuestos biodegradables y no biodegradables en una mezcla de contaminantes disminuye si hay biodegradación.

Entre los hidrocarburos del petróleo es fácil encontrar cantidades relativamente pequeñas de biomarcadores (usualmente por debajo del 1% en peso) de origen lipídico.

Al final de la diagénesis sus precursores son transformados en hidrocarburos que, después de la catagénesis, todavía permiten fijar los precursores específicos.

Cualquier programa de ensayo sobre biorrecuperación que implique la desaparición de residuos de petróleo o de hidrocarburos, presentará dificultades analíticas. Ello es debido a que existen otros procesos que implican la desaparición de residuos de petróleo o de hidrocarburos medidos mediante cromatografía de gases, que pueden afectar o contribuir a la desaparición de los residuos. Para hacer frente a estos problemas, se supone que la desaparición de algunos grupos de hidrocarburos se puede utilizar como indicador definitivo de la biodegradación.

Los indicadores de la biodegradación estarían asociados a cambios sustanciales en la composición de varias fracciones del petróleo, especialmente los hidrocarburos aromáticos. También se supone una correlación entre los cambios en la composición de los hidrocarburos y los cambios de peso residual del petróleo, para poder calcular tasas de desaparición de los pesos residuales como primer indicativo cuantitativo del efecto del fertilizante y, en consecuencia, de la eficacia de la limpieza durante períodos de tiempo más largos.

Existen varios parámetros que se pueden emplear para determinar el grado de biodegradación. En primer lugar, se puede usar la concentración de hidrocarburos alifáticos, aunque presenta algunas desventajas, ya que constituyen la fracción más fácil de degradar, son los menos tóxicos y suponen solamente un pequeño porcentaje en peso del petróleo. También se pueden determinar los cambios producidos por los organismos y fertilizantes en la fracción aromática, que es más resistente a la degradación y más tóxica. Por último, otro método eficaz para estimar la eficacia de la biorremediación se basa en la separación de las distintas fracciones del petróleo: alifática, aromática, heterocíclica, polar y asfáltica, y determinar la disminución del peso de cada una (Jobson et al., 1972). No obstante, todos estos índices se verán afectados en mayor o menor medida por los Ratio de n-alcanos normales respecto a n-alcanos ramificados. Este ratio se determina calculando la relación del peso entre un hidrocarburo de biodegradación fácil, principalmente los n-alcanos de 17 y 18 átomos de carbono (n-C17 y n-C18), y un hidrocarburo que se biodegrada más

lentamente, generalmente hidrocarburos ramificados como el pristano (Pr) y fitano (Ph). Estos dos últimos compuestos son isoprenoides que derivan de la degradación de la clorofila-a (Figura 1), generalmente mediante oxidación y reducción, respectivamente.

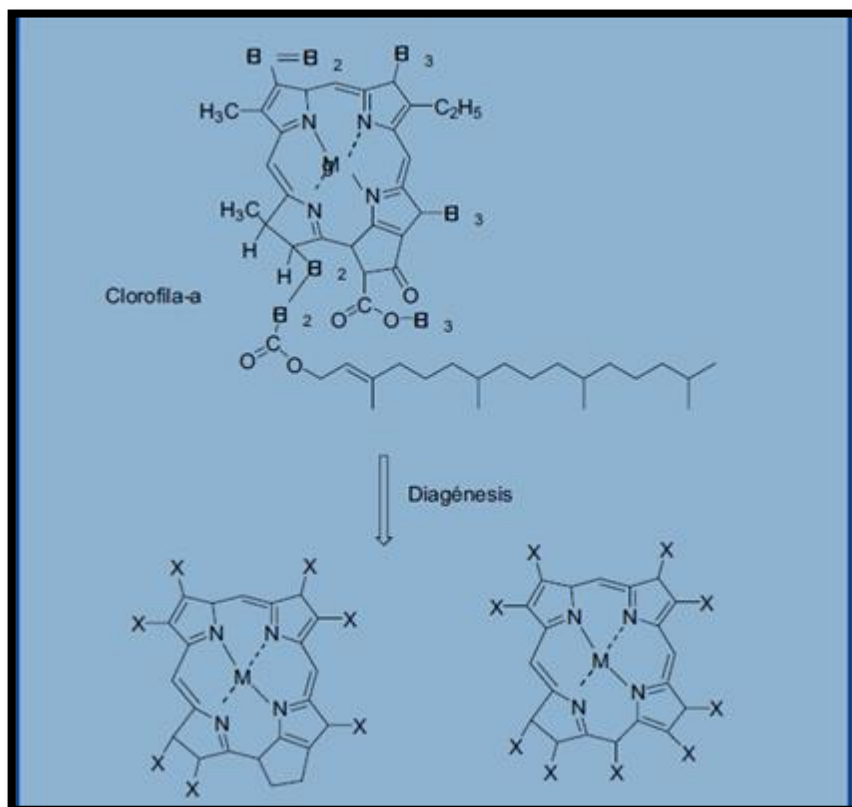


Figura 1. Esquema de la degradación de la clorofila-a, que puede derivar mediante procesos diagenéticos a pristano (izquierda) o fitano (derecha).

Se seleccionan el pristano y el fitano para realizar las comparaciones debido a que son los isoprenoides más abundantes en el petróleo. Se emplean, por tanto, las relaciones n-C17/pristano o n-C18/fitano, aunque es preferible emplear la última (figura 2). La base del estudio se basa en que, por un lado, la mayor parte de los procesos (meteorización física, lixiviación, etc) no producen pérdidas acusadas de hidrocarburos ramificados y alifáticos y, por otro, los alcanos ramificados se biodegradan a distinta velocidad que los alcanos lineales, que en general es más rápida en los primeros (Prinik, et al., 1977; Mueller et al., 1992). Por lo tanto, estudiando la evolución en el tiempo del ratio n-C18/fitano, se puede estimar el grado de biorrecuperación de una zona afectada por un vertido de petróleo (figura 3). Su utilización solamente es válida al comienzo del tratamiento; si se analizan cuando el proceso ha avanzado mucho, pueden subestimar la biodegradación. Concretamente, durante la remediación del vertido del Exxon Valdez, el pristano y el fitano se degradaron rápidamente y sólo pudieron utilizarse como biomarcadores adecuados en las primeras semanas (Bragg et al., 1994).

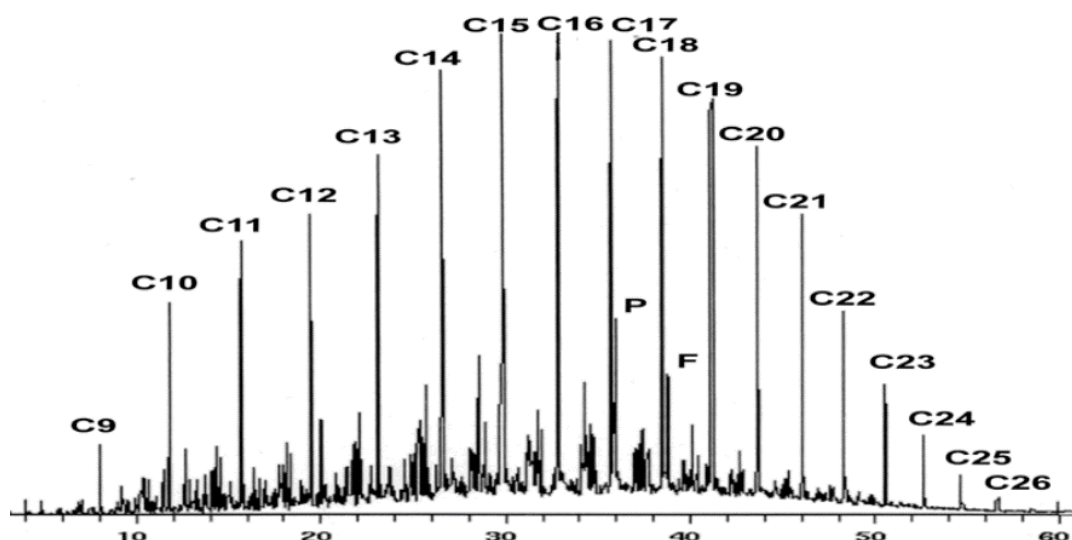


Figura 2 Perfil cromatográfico de GC-MS, de diesel. P, pristano; F, fitano.

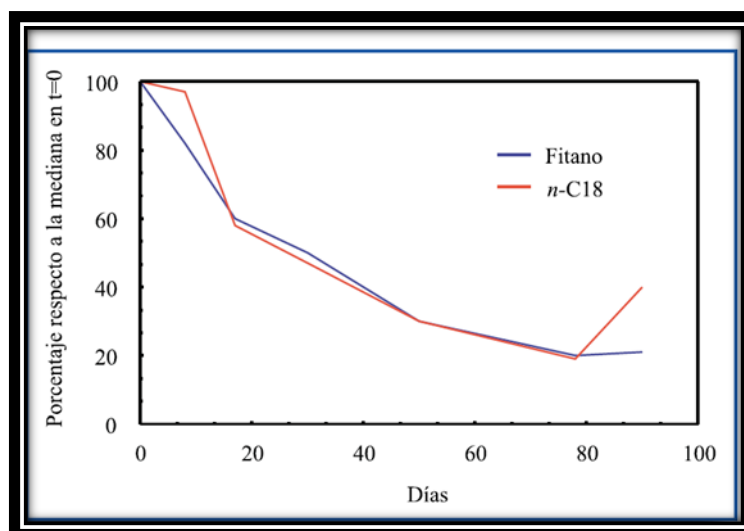


Figura 3. Cambios en las relaciones n-C18/fitano en playas de guijarros de Alaska. Modificado de Pritchard (1997).

5.2.1. Biodegradación del Fitano:

En la utilización de los biomarcadores influyen también las condiciones locales de cada zona. De hecho, en ciertas costas, como en la de Prince William Sound de Alaska, se desarrollan bacterias con gran capacidad de degradar alcanos ramificados como el fitano, por lo que el estudio de la evolución del ratio n-C18/fitano no es útil como indicador de biorremediación. Es más, en el vertido del Exxon Valdez se observó en algunas zonas de Alaska una degradación similar de fitano y de n-C18 (Pritchard, 1997). En estos casos, el contenido total de fitano por sí solo se puede emplear como marcador biológico interno al igual que el del n-C18 (figura 4).

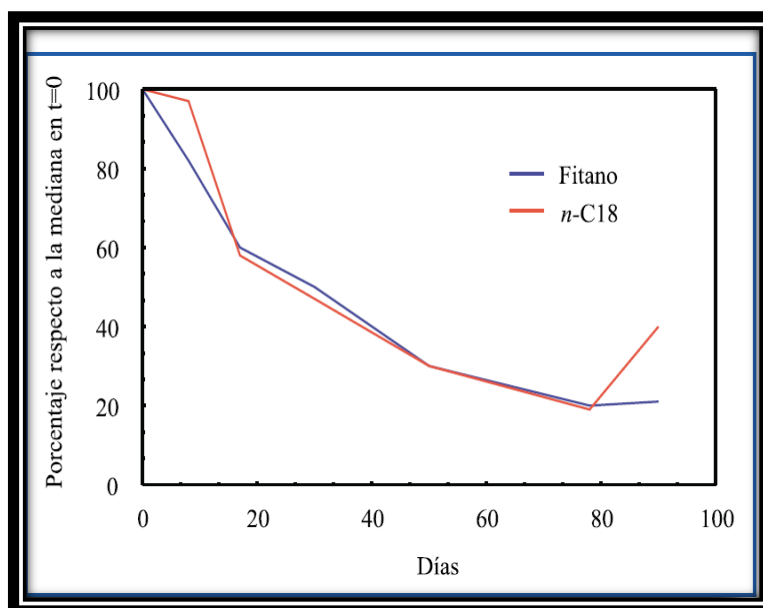


Figura 4. Cambios en la concentración de fitano y n-C18 (expresado como cambio porcentual en relación a la concentración media a $t=0$) en las muestras de petróleo en arena y grava de las playas tratadas en Sung Harbour (Alaska). Modificado de Pritchard (1997).

Si existe algún ejemplo que muestre como debería variar la gráfica en un proceso de biodegradación sería bueno colocarlo dado que solo se ha puesto un ejemplo donde no funciona como debería funcionar la curva.

5.2.2. Cambios en la composición de hidrocarburos aromáticos:

Para poder determinar de forma absoluta la efectividad de la biodegradación, no es suficiente contar únicamente con el estudio de la biodegradación de la fracción alifática. Se debe también estudiar el comportamiento y evolución de la fracción aromática, ya que es la más complicada de degradar (Kennicutt, 1988; Rowland et al., 1986) debido a que presenta una baja solubilidad. Esto es importante no sólo porque permite evaluar la capacidad de recuperación de una zona, sino porque algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son altamente tóxicos y potencialmente cancerígenos bajo ciertas condiciones. Para evaluar la capacidad de degradación, se suelen emplear compuestos de forma individual y familias de PAHs (naftalenos, fenantrenos, crisenos, etc). Asimismo, se puede determinar la eficiencia de los microorganismos en una zona sometida a biodegradación del petróleo, mediante el estudio de la evolución de la abundancia de la suma total de PAHs con el tiempo.

Generalmente, el estudio se realiza comparando la proporción de los diferentes hidrocarburos aromáticos con el contenido del Hopano C30-17a(H), 21b(H), ya que es sumamente resistente al ataque biológico y, por consiguiente, proporciona un estándar constante para normalizar el contenido en hidrocarburos aromáticos. Más adelante se realiza una descripción más detallada de los hopanos y de su empleo en la biorremediación.

5.2.3. Cambio de composición y cambio en el peso residual

En principio se podría pensar que la rápida reducción en la relación n-C18/fitano

no va acompañada de un cambio importante en el peso residual del petróleo. Sin embargo, diversos estudios han confirmado que cuando comienza la degradación de la fracción alifática, se inicia también la descomposición de otras fracciones del petróleo, aunque a velocidades diferentes. Existe, por lo general, una correlación entre las variaciones del ratio n-C18/fitano y del peso residual, con el tiempo de actuación de los organismos.

5.2.4. Hopanos

Derivan del acoplamiento de seis unidades de isopreno. Son abundantes en sedimentos y en el petróleo, si los comparamos con otros biomarcadores.

Proceden de precursores con grupos funcionales (biohopanoides) presentes en las bacterias. Los hopanoides (bacteriohopanotetroles) están presentes en las membranas de numerosos organismos procariontes, tanto aerobios como anaerobios, y su función parece ser la de mejorar la estabilidad de las paredes celulares. En este sentido, no sólo su función, sino su estructura está muy relacionada con la de los esteroides (el más conocido de estos es el colesterol) en organismos eucariotas (Madigan et al., 2000). Los grupos funcionales se pierden durante la diagénesis aunque, en general son resistentes a la degradación.

Además de los hopanos, los productos diagenéticos de los biohopanoides incluyen a los hopanoles, ácidos hopanoicos y hopenos.

Entre todos los hopanos, el C30-17 α (H), 21 β (H)-hopano es un buen biomarcador, porque tiene baja solubilidad y muy baja volatilidad, con lo que no sólo la biodegradación, sino también la disolución o la evaporación son prácticamente descartables.

Para calcular la eficiencia de la biodegradación del petróleo a partir de los hopanos se puede utilizar la siguiente ecuación (Douglas et al., 1994):

$$\% \text{ petróleo degradado} = (1 - H_o/H_s) \times 100$$

Donde:

H_o es la concentración del hopano C30-17 α (H), 21 β (H) en el petróleo originariamente.

H_s es la concentración del hopano C30-17 α (H), 21 β (H) en la muestra después de haber sido sometida a biodegradación.

5.2.5. Otros biomarcadores

Como alternativa a los compuestos ya señalados, se podría elaborar una lista de otros posibles biomarcadores que se podrían utilizar para cuantificar la biodegradación del petróleo:

- Esteranos: Son compuestos con una estructura similar a la de los hopanos (cuatro anillos frente a cinco). El más conocido entre ellos es el colestano cuyo precursor es el colesterol de los organismos eucariotas.
- Esteroides: También con estructura similar a los hopanos, pero con anillos bencénicos en ella. Son, por tanto, hidrocarburos aromáticos.

- **Porfirinas:** Son un grupo extremadamente complejo de compuestos tetrapirrólicos.

Se originan en el mismo proceso diagenético (precursor: clorofila) en el que se formaban pristano y fitano.

- **Metales:** Por diversos motivos (Sasaki et al., 1998) se ha propuesto el vanadio como marcador interno de la biodegradación.

Existen otros biomarcadores, entre los cuales se encuentran:

compuestos con NSO, tales como porfirinas, carbazoles, fenoles, ácidos carboxílicos y compuestos del azufre.

En conclusión, la utilidad de los biomarcadores en el estudio de la evolución de la degradación del petróleo cuando se emplean microorganismos, generalmente considerada en función de la resistencia a la degradación, existen biomarcadores que sirven para evaluar mejor la eficacia de la biorremediación en las primeras etapas, como es el caso de los hidrocarburos alifáticos, mientras que hay otros, como los hidrocarburos aromáticos o los hopanos, que permiten determinar la degradación a más largo plazo y la recuperación de las zonas contaminadas.

5.3. Metodología propuesta por Bioprocesos para remediar suelos empetrolados

5.3.1. Caracterización inicial de los suelos presentes

Para cada una de las corrientes presentes será necesario conocer:

- ⊞ Concentración de hidrocarburos presentes: concentración de HTP mediante EPA 418.1 y TNRCC Texas 1006, concentración de compuestos BTEX, concentración de compuestos SARA y HAP's.
- ⊞ Concentración de metales pesados: se analizarán los metales pesados legislados. Los mismos son: As, Ba, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Ag, Pb, Se, Zn.
- ⊞ Concentración de nutrientes: Nitrógeno asimilable, Nitrógeno Total, Fósforo asimilable, Potasio asimilable, Materia Orgánica.
- ⊞ Concentración de bacterias degradadoras de hidrocarburos y heterótrofos totales.
- ⊞ pH, conductividad eléctrica, % humedad, textura del suelo, capacidad de intercambio catiónico.
- ⊞ Caudal másico de cada corriente, ej: Tn/año

5.3.2. Evaluación de la biodegradabilidad de cada corriente

Generalmente para suelos vírgenes o industriales afectados por derrames de crudo puede definirse la biodegradabilidad de los mismos solo con los datos obtenidos en la caracterización inicial. La aplicación de la técnica de Biorremediación clásica (remoción de suelo, humectación, aplicación de nutrientes tales como Urea y DAP) es generalmente suficiente para remediar este tipo de residuos empetrolados.

En el caso de corrientes donde la caracterización arroja la presencia de compuestos químicos que complican el proceso de la Biorremediación clásica (ej: niveles

elevados de compuestos asfálticos, elevado pH y conductividad eléctrica, o la presencia de otros compuestos tóxicos), será necesario recurrir a la ejecución de ensayos de tratabilidad donde se ajustará el proceso con la aplicación de pretratamientos y la utilización de otros aditivos.

5.3.3. Ensayos de tratabilidad

Se debe realizar una propuesta técnica de ensayos de tratabilidad puntual para aquellas corrientes donde no sea posible la aplicación de la Técnica de Biorremediación clásica.

5.3.4. Implementación en campo del proceso diseñado

La implementación en campo del proceso diseñado para cada corriente será llevada a cabo por la empresa que defina YPF S.A.

Bibliografía

- 1- Standard Guide for Risk-Based Corrective Action Applied at Petroleum Release Sites, ASTM E 1739 -95. 1995
- 2- Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series (TPHCWG). 1998-1999.
- 3- Regulatory proposal that allows more flexible alternatives to the disposition of petroleum exploration and production drill cuttings in Mexico. Rivera, Rafael et al. The 7th International Petroleum Environmental Conference. Albuquerque, NM. November 7 to 10, 2000.
- 4- Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon- Contaminated Soils. Hueseman, M. Journal of Soil Contamination. 3 (3). 1994.
- 5- Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. Dibble, J.T. , R. Bartha, Applied and Environmental Microbiology, p.729-739, Apr. 1979.
- 6- Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. Hueseman, M. Journal of Soil Contamination. 3(3). 1994
- 7- Tratamiento biológico de lodos de refinería. Ercoli, E.; Fuentes, J.; Gilobert, M.; Arreghini, M.; Gálvez, J. "Segundo Simposio de Producción de Hidrocarburos, Instituto Argentino del Petróleo", 1 (1995), 497-506.
- 8- Degradación biológica en suelos contaminados por hidrocarburos. Ercoli, E.; Aranzadi, E.; Gálvez, J. "Segundo Simposio de Producción de Hidrocarburos, Instituto Argentino del Petróleo", 1 (1995), 487-497.
- 9- Tratamiento biológico ex-situ de residuos semisólidos de oleoductos. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Aranzadi, E. "Primer Encuentro Latinoamericano para la Calidad en La Industria Petrolera". Cap 23 (1995), 311-318.
- 10- Evaluación de dos años de experiencia de campo en biorremediación de suelos, Ercoli, E.; Gálvez, J.; Saracino, C.; Videla, O., Anales en Jornadas de preservación del aire, agua y suelo en la industria del petróleo, Comodoro Rivadavia, IAPG 1998. p. 47-60

- 11- Intensive Behandlung vom im Airliftreactor biologist sanierten Boden. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Mueller, R and Stottmaister, U. UFZ-Bericht, Leipzig, Germany, 18, 188, 33-41, 1988
- 12- Biorremediación de suelos altamente contaminados. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, C. Anales en INGEPET99, Lima, Perú. Octubre, 1999.
- 13- Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, Ercoli, E.; Gálvez, J.; Calleja, C.; Videla, S.; Curci, E. Anales en INGEPET99, Lima, Perú. Octubre, 1999.
- 14- Biorestauración de suelos en refinerías- Ercoli, E.; Fernández, L.; Gálvez, J.; Vera, F. Anales IAPG. 2000.
- 15- Análisis y evaluación de parámetros cinéticos críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, C.; Bauzá, J. Anales Congreso Producción 2000, III workshop latinoamericano sobre aplicaciones de la ciencia en la Ingeniería del petróleo, IAPG, 2000.
- 16- Biorremediación de suelos por técnica de Acumulación Aireada. Ercoli, E.; Videla, C.; Calleja, C.; Gálvez, J.; Videla, S.; Cantero, J.; Medaura, C.; Dipaola, M. Anales en IV Jornadas de preservación de agua, suelo y aire en la industria del petróleo y del gas, IAPG, 2000.
- 17- Restauración de áreas contaminadas por métodos biológicos, Ercoli, E.; Vera, F.; Fernandez, L.; Gálvez, J. Anales Congreso Producción 2000, III workshop latinoamericano sobre aplicaciones de la ciencia en la Ingeniería del petróleo, Anales IAPG, 2000.
- 18- Análisis del comportamiento microbiano en procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelo. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, C.; Tettamanti., G. Revista de la Facultad de Ingeniería, Mendoza. N42, p.5-11, 2000.
- 19- Extensive evaluation of aerated heaping technique for soil remediation, Ercoli, E.; Calleja, C.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, C. SPE International- Society of Petroleum Engineering. Latin American and Caribbean Petroleum Engineer Conference, 2001. p. 1-6. Serie SPE 69445
- 20- Resolution of environmental passives in the Luján de Cuyo Refinery. Fernández, L, Vera, F and Ercoli, E. SPE International. Society of Petroleum Engineering, 2001.
- 21- Tratamiento biológico semi-intensivo de suelos contaminados. Ercoli, E.; Gálvez, J.; Di Paola, M.; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, C. Petroquímica, 2001.
- 22- Análisis de aplicabilidad de tratamientos biológicos a suelos contaminados con hidrocarburos asfálticos. Ercoli, E.; Ríos, R.; Gálvez, J.; Cantero, J.; Videla, S. Anales Ingepet 2002. Lima, 2002.
- 23- Restauración de suelos salinizados mediante técnica de intercambio catiónico. López, Cecilia; Videla, Silvina; Calleja, Cecilia; Segura, Oscar y Ercoli, Eduardo. Petrotecnia. Noviembre 2003.

- 24- Biopilas aireadas por remoción mecánica, Ercoli, E.; Gálvez, J.; Cantero, J; Videla, S.; Medaura, Tettamanti, G. Anales de las Jornadas de Investigación Facultad de Ingeniería, UNCu. Aplicaciones en Ingeniería, Noviembre 2004. p 309-315. ISSN/ISBN 9875750050
- 25- Evaluación de técnicas biológicas para remoción de SH₂ en reservorios petroleros, Ercoli, E.; Galvez, J.; Vardaro, S.; Medaura, C..Anales de las Jornadas de Investigación Facultad de Ingeniería, UNCu. Aplicaciones en Ingeniería, Noviembre 2004. p 145-151. ISSN/ISBN 9875750050
- 26- Technology evaluation report for bioremediation in Neuquén, Argentina. Ercoli, E.; Calleja, C.; Videla, S.; Segura, O.; Gálvez, J.; Cantero, J.; López, C.; Medaura, C.; Dipaola, M.; Caso, R. Proceedings in 2nd International Conference of Petroleum Bitechology, 2003, México DF. 2nd Internacional Conference of Petroleum Biotechnology, Instituto Mexicano del Petróleo, 2003. ISSN/ISBN 9684890184
- 27- Determinación de parámetros físicos para la evaluación de suelos contaminados, Lopez, C.; Videla, S.; Ercoli, E. EnIDI 2005
- 28- Límites prácticos de biorremediación de suelos afectados por Petróleo. Cantero, J; Videla, S.; Gálvez, J.; Vardaro, S.; Tettamanti, G. López, A. y Ercoli, E. IAPG, 2005
- 29- Resultados de la Restauración de un Sitio Salinizado Por Actividades Hidrocarburíferas López, C.; Videla, S.; Ercoli, E. IAPG, 2005.
- 30- Compostaje: un nuevo enfoque a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Medaura, M.C. ; Barbeito, M.E.; Clausen, R. ; Videla, S. Y Ercoli, E. IAPG, 2005.
- 31- Problemática Ambiental Generada por el uso de Emulsión Inversa en Perforación Petrolera Vardaro, S.; Videla, S., Calleja, C. y Ercoli, E. IAPG, 2005
- 32- Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. Bosma et al. Mass Environ. Sci. Technol. (1997) 31, 248-252.
- 33- Microbial Degradation in Soil Microcosms of Fuel Oil Hydrocarbons From Drilling Cuttings. Chaineau, C.H., J.L. Morel, J. Oudot, Enviromental Science & Technology: 29 (6), (1995) 1615-1621.
- 34- Hueseman, M. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon- Contaminated Soils. Hueseman, M. Journal of Soil Contamination. 3 (3). 1994.
- 35- Química del suelo. Cap.5. Materia Orgánica. p.155-173. Ed. Limusa México D.F. Primera Edición. ISBN:968-18-4431-9.
- 36- Química del suelo. Bohn, H.L., McNeal, B.L. and O'Connor, G.A. 1993 Cap.7. p.221-224. Ed. Limusa México D.F. Primera Edición. ISBN:968-18-4431-9.
- 37- Composting Crude-Oil Impacted Soil: Performance Comparison with Land Treatment and Soil Productivity Implications. Hoffmann R. and Chaw, D. 1999. The Fifth International In situ and On Site Bioremediation Symposium. Bioreactor and Ex-Siyu Biological Treatment Technologies 5(5) ISBN 1-57477-078-0. p.189-196. Battelle Press.
- 38- USEPA, Solid Waste and Emergency Response, EPA 530-R-98-008. 1998