

Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station

***Diana Cristina Nústez Cuartas, Diego Paredes Cuervo,
Janneth Cubillos Vargas***

*Grupo de Investigación en Agua y Saneamiento, Facultad de Ciencias Ambientales,
Universidad Tecnológica de Pereira. La Julita, Pereira, Risaralda, Colombia.
Tel 57-6-3137208. diparede@utp.edu.co*

Abstract

The effect of Bioaugmentation and Biostimulation of sediment contaminated with hydrocarbons (TPH) from Fuel Service Station (EDS) was evaluated; these sediments result from industrial wastewater treatment maintaining, in the grease and sand trap, perimeter channels and vehicle washing. In this research, eight experimental units were made with high density polyethylene baskets in which contaminated sediments were treated. One (1) factor (bioremediation) and four (4) levels (100% sediments; 100% sediments and nutrients; 60% of sediments + 40% of soil with adapted microorganism and, 60% of sediments + 40% of soil with adapted microorganism and nutrients) were assessment and a duplicate of each unit were made for statistical purposes. The evaluation period of the experimental units was twenty-three (23) weeks, where degradation rates were obtained between 90 and 105 mg/kgss*d, with hydrocarbon percentage reductions between 83 and 94%. Both strategies for bioremediation (biostimulation and bioaugmentation) did not show significant statistic differences ($p > 0.05$).

Keywords: hydrocarbons, bioremediation, bioaugmentation, biostimulation, fuel service stations.

Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible

Resumen

En la presente investigación, se evaluó el efecto de la Bioaugmentación y Bioestimulación de los sedimentos contaminados con hidrocarburos (HTP) de una Estación de Servicio de Combustible (EDS), provenientes del mantenimiento de las unidades de tratamiento de aguas residuales industriales, como son: la trampa de grasa, canales perimetrales y desarenador del lavado vehicular. Para el desarrollo del trabajo, se utilizaron ocho mesocosmos, compuestos por canastas de polietileno de alta densidad, en las cuales se trataron los sedimentos contaminados; para ello se evaluó un (1) factor (biorremediación) y cuatro (4) niveles (100% residuos contaminados; 100% residuos contaminados y nutrientes; 60% de sedimentos contaminados + 40% de suelos con microorganismos adaptados y 60% de sedimentos contaminados + 40% de suelos con microorganismos adaptados y nutrientes); a cada mesocosmo se le realizó una réplica con fines estadísticos. El período de monitoreo de los mesocosmos fue de veintitrés (23) semanas, donde se lograron tasas de degradación entre 90 y 105 mg HTP/kgss*d, con porcentajes de reducción del contenido de

hidrocarburo entre 83 y 94%. Las dos estrategias de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación), no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Palabras clave: hidrocarburos, biorremediación, bioaumentación, bioestimulación, estaciones de servicio de combustible.

Introducción

Los hidrocarburos son compuestos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, considerados compuestos básicos de la química orgánica [1]; su empleo se ha constituido en un propulsor importante para el desarrollo de la humanidad pero no obstante, ha dado paso a diferentes eventos catastróficos a nivel ambiental por la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos producto del derrame de estos compuestos de petróleo y sus derivados. En el caso de los suelos, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna, de la biota microbiana y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos [2].

Los derrames de hidrocarburos también causan problemas de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado y por ello, a través de los años se han desarrollado diferentes metodologías fisicoquímicas para remediar estos impactos, pero sin embargo, los costos asociados a estas técnicas las vuelven difíciles de implementar.

En el sector de hidrocarburos, una de las actividades de riesgo es la venta de combustible en las Estaciones de Servicio, debido a que en estas instalaciones regularmente se presentan pequeños derrames en las zonas de distribución; éstos, al igual que los sedimentos generados en el mantenimiento de las unidades de rejillas perimetrales de las zonas de almacenamiento, distribución, trampas de grasas y los desarenadores de lavado de autos [3], son considerados como residuos peligrosos (RESPEL) por su contenido de hidrocarburos [4], por lo tanto, se ve la necesidad de presentar una estrategia viable para disminuir el contenido de estos compuestos, neutralizando el riesgo de contaminaciones mayores.

Así, la biorremediación surge como una alternativa ecotecnológica para reducir o mitigar el daño causado en el suelo y agua por los derra-

mes de estos compuestos. Esta tecnología usa microorganismos, plantas o enzimas de manera estratégica, con el fin de restaurar la calidad ambiental de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema [2].

En la biorremediación se presentan como unas de sus principales estrategias, la bioestimulación y la bioaumentación, siendo la primera definida como la adición de nutrientes, principalmente fuentes de nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano, al igual que la estimulación por medio de adición de agua, oxígeno y otros elementos que mejoren el desarrollo de los microorganismos [2]. La bioaumentación se entiende como la adición de microorganismos endógenos o exógenos a un lugar específico (para este caso, degradadores de hidrocarburos), con el fin de fomentar la degradación y disminuir el tiempo de reducción del contaminante [1, 5-7]. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar a escala de laboratorio el proceso de degradación de hidrocarburos presentes en los sedimentos generados en el mantenimiento en una estación de servicio de combustible, por medio de las estrategias de bioestimulación y bioaumentación.

Desarrollo experimental

El desarrollo del trabajo experimental se efectuó para los sedimentos contaminados provenientes de la trampa de grasas de una estación de servicio de una empresa de transporte masivo del Municipio de Dosquebradas (Risaralda), Colombia, la cual recoge las aguas residuales del área de distribución de combustible y del área de lavado de buses. El actual manejo de estos sedimentos es la deshidratación en lechos de secado y entrega a una empresa inmovilizadora de RESPEL por lo tanto, la evaluación de la efectividad de la biorremediación se vuelve atractiva. Las unidades experimentales fueron implementadas en canastas de polietileno de alta densidad (57cm × 37cm × 15cm), siendo este material escogido por su baja permeabilidad y mínima absorción de HTP [1]. En esta investigación se establecieron 8 meso-

cosmos o unidades experimentales, resultado del siguiente diseño experimental: un factor (Biorremediación), cuatro niveles (2 Bioestimulación y 2 Bioaumentación) y cuatro réplicas para efectos estadísticos (Figura 1).

Microorganismos adaptados

Para fines de incrementar la cantidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos, se realizó una mezcla del sedimento de la estación de servicio con un suelo que sufrió un derrame de ACPM (hidrocarburos) del poliducto Medellín-Cartago, ocurrido en el Km 226+350, predio Chapinero, entrada 14 vía Cerritos-Cartago (Colombia), en un área aproximada de 20 m² (año 2009), ya que autores como Vargas *et al.* [8], resaltan la importancia de aprovechar los microorganismos nativos de suelos contaminados para llevar a cabo procesos de remediación.

Operación

La operación de los mesocosmos se basó en la adición de agua (600-1000 mL) y aire mediante la realización de volteo manual durante tres veces a la semana, con el fin de mantener la humedad necesaria para la movilización de nutrientes e incrementar el contenido de oxígeno en el proceso de degradación. La adición de nutrientes en los sistemas que así lo requerían de acuerdo al diseño experimental, se realizó para llegar a un nivel de nitrógeno óptimo que favoreciera el cre-

cimiento microbiano; según Ríos [9], este rango se encuentra entre 0,13 y 0,22% de Nitrógeno, lo cual compensa la relación de C/N asociada a la contaminación del hidrocarburo, permitiéndole a los microorganismos contar con nutrientes suficientes para llevar a cabo los procesos de biorremediación [1]. La úrea fue utilizada como fuente de nitrógeno [10, 11] y su aplicación se realizó en dilución en agua destilada para facilitar su aprovechamiento por parte de los microorganismos. La adición de este compuesto se efectuó al inicio de la investigación, hasta mantener un porcentaje de nitrógeno entre 0,10 y 0,20% para todos los mesocosmos.

Muestreo y análisis de laboratorio

El monitoreo de las unidades experimentales se llevó a cabo mediante el seguimiento semanal, quincenal y mensual de los parámetros expuestos en la Tabla 1. En cada evento de muestreo, se realizó volteo manual y se tomaron aproximadamente 20g de sedimento en puntos aleatorios dentro de cada unidad experimental, hasta alcanzar un peso de muestra entre 100 a 160g, la cual se sometió a los diferentes análisis de laboratorio.

La fase de evaluación contemplada en la investigación correspondió a 23 semanas, debido a la respuesta de degradación del Hidrocarburo en el tiempo y la obtención de una tasa de degradación estable que no representó incrementos significativos en la reducción de este parámetro después de la semana 17 del monitoreo.

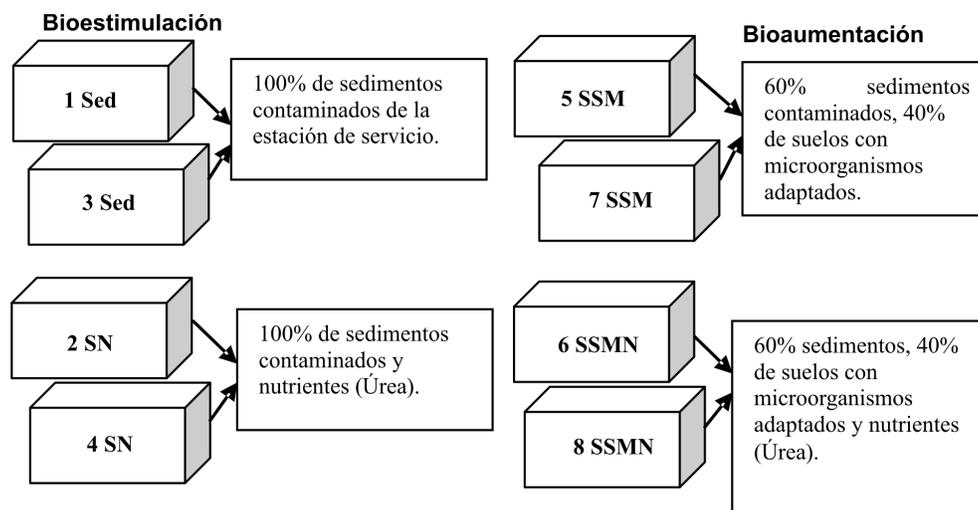


Figura 1. Esquema de los ocho mesocosmos.

Tabla 1
Análisis de laboratorio, método y frecuencia

Análisis	Método	Frecuencia
Temperatura (°C)	Termómetro [12]	
pH	pHmetro [12]	Una vez por semana
% Humedad	Método gravimétrico [12]	
% Nitrógeno	Semimicro-Kjeldahl*	
% Materia Orgánica (COT)	Walkley-Black*	
Fósforo (ppm)	Bray y Kurtz II*	Una vez al mes
Potasio (meq/100g suelo)	Acetato de Amonio* Absorción Atómica	
Bacterias Hidrocarbocíclicas	Recuento en Placa profunda por triplicado [13]	
Hidrocarburos totales	Extracción por Soxhlet Método gravimétrico [14]	Cada 15 días

*Análisis realizados en el laboratorio de Análisis de Suelos de la Facultad de Tecnología, Programa de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Análisis de la información

El principal parámetro de respuesta de esta investigación fue la reducción del contenido de hidrocarburos totales medido como la tasa de degradación (mg/kg suelo seco), el cual fue evaluado para las estrategias de Bioaumentación y Bioestimulación, realizando un análisis de los resultados a través del uso del software estadístico Statistical Package for Social Science-SPSS 17 y la aplicación de pruebas descriptivas, de significancia y de varianza para un nivel de confiabilidad del 95%. Con estos resultados, se definió cuál de las estrategias de biorremediación es la más apropiada para degradar el contenido de hidrocarburos en el tiempo, para los sedimentos generados en estaciones de servicio de combustible.

Resultados y discusión

Los resultados de la investigación se presentan por los cuatro niveles propuestos en el diseño experimental (promediando los datos obtenidos para cada nivel y su réplica), mostrándose en la Tabla 2, las características físicas, químicas y biológicas iniciales promedio de los sedimentos a tratar por medio de las técnicas de biorremediación.

Los sedimentos tratados en cada mesocosmos presentan características apropiadas para la remediación, la temperatura se encuentra dentro del rango óptimo de 18-30° y permite la actividad

enzimática e intercambio celular [16]; el pH se encontró en un intervalo adecuado para el crecimiento de bacterias, ya que las condiciones favorables están entre 6,0 y 8,0 unidades [9]; la humedad se encontró dentro del rango de 20-75% de la capacidad de campo, lo cual es importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula [16]. El resultado de la población inicial de bacterias hidrocarbocíclicas en los mesocosmos, corresponde a poblaciones altas, que se podrían considerar como adaptadas y típicas de suelos con presencia de hidrocarburos. De acuerdo con la literatura, estos niveles pertenecen a suelos con un alto potencial de biodegradación [9]. Según Atlas y Unterman [16] la población de bacterias degradadoras en suelos no contaminados varía de 1×10^3 a 1×10^4 UFC/g y en suelos contaminados de 1×10^6 a 1×10^8 UFC/g.

En cuanto a concentración de nutrientes, aún no se cuenta con información generalizada de rangos óptimos para cada parámetro y que además se relacione con un buen resultado de degradación de hidrocarburos; no obstante, se habla de relaciones de C:P:N entre 100:2:0.4 y 100:10:2, que benefician los procesos de metabolismo microbiano [1, 16]. Para esta investigación, se adicionó nutriente a las unidades de Bioestimulación que si lo requerían, en una relación C:N:P: K de 100:8:0.2:0.3 y a las unidades de Bioaumentación de 100:10:0.4:0.6, el suelo de los mesocosmos contó con las concentraciones recomendables de

Tabla 2
Condiciones iniciales para las unidades experimentales

Promedio Parámetros	Bioestimulación (Sed)	Bioestimulación + Nutriente (SN)	Bioaumentación (SSM)	Bioaumentación + Nutriente (SSMN)
Temperatura (°C)	19	20	20	19
pH (unidades)	7,39	7,46	7,43	7,48
% Humedad	24	24	22	23
Microorganismos hidrocarbocíclicos (UFC/g)	$3,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
HTP mg/kgss		18239		17637
% Nitrógeno	0,06	0,08	0,08	0,07
% Materia orgánica	2,65	3,40	3,65	2,45
Fósforo (ppm)	18	11	24	30
Potasio (meq/100g Suelo)	0,30	0,28	0,40	0,38
Textura	Franco Limoso [15]			

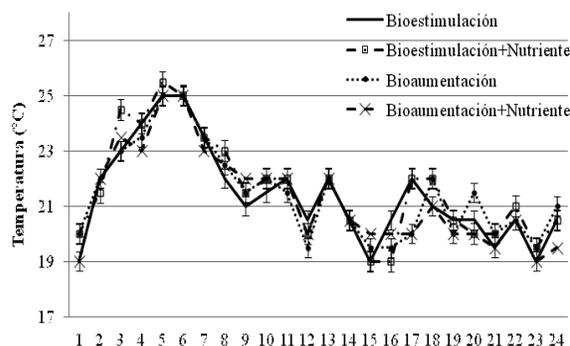
nutrientes para llevar a cabo procesos de degradación.

Paralelamente y con el fin de evaluar el efecto de la atenuación natural sobre la remoción de los hidrocarburos totales en los mesocosmos implementados, se decidió tomar una muestra de los sedimentos objeto de estudio, sin ningún tipo de adición de nutriente o microorganismos durante un período de tres meses (degradación natural del ambiente, sin intervención antrópica), los cuales mostraron una reducción del hidrocarburo de 5484 mg/kg de suelo seco, pasando de una concentración inicial de 21524 a 16040 mg/kgss es decir, se redujo un 25%; este porcentaje de remoción es bajo, ya que con el uso de la biorremediación se puede reducir el 80% para un período de sólo 80 días [17].

Los resultados para los diferentes mesocosmos, hallados durante un período de monitoreo de 24 semanas, se describen a continuación:

Biodegradación de hidrocarburos totales-HTP

La temperatura presentó para todos los casos un aumento entre las primeras cinco semanas (Figura 2), pasando de 19 a 26° C y posteriormente en la semana once, este parámetro descendió, y se estabilizó en valores cercanos a 21° C. La importancia de este parámetro radica en que tanto



*Bioestimulación (Sed), Bioestimulación+Nutriente (SN), Bioaumentación (SSM), Bioaumentación+Nutriente (SSMN).

Figura 2. Comportamiento promedio de la temperatura, 24 datos y barras de error=1DS.

el metabolismo de los microorganismos, la actividad enzimática y celular dependen de éste, siendo además un factor responsable de algunos cambios estructurales y químicos del petróleo [16], ya que a bajas temperaturas, la viscosidad de los hidrocarburos y sus componentes tóxicos de alto peso molecular incrementan, retrasando el proceso de biodegradación [16, 18, 19].

Las tasas de degradación en estudios de similares condiciones han reportado porcentajes de reducción entre 26 y 61% en procesos de 12 a 80 días [20], pero a más de 100 días el porcentaje puede ser de 60 a 70% [21], en esta investigación los porcentajes de degradación (Tabla 3) para el

Tabla 3
Datos Degradación de Hidrocarburos (HTP)

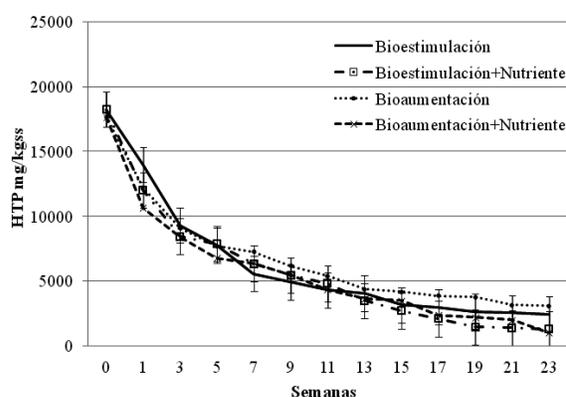
Mesocosmos	Bioestimulación* (Sed)	Bioestimulación + Nutriente* (SN)	Bioaumentación* (SSM)	Bioaumentación + Nutriente* (SSMN)
Concentración inicial (mg/Kgss)	18239		17637	
Concentración final (mg/Kgss)	2418	1277	3071	1000
Reducción en 23 semanas	15821	16962	14566	16637
% de Reducción	87	93	83	94
Tasa degradación (mg/kgss*d)	98	105	90	103

*Bioestimulación (100% Sedimento contaminado; 100% Sedimento más Nutriente). Bioaumentación (60% Sedimento, 40% Suelo con Microorganismos; 60% Sedimento, 40% Suelo con Microorganismos más Nutriente).

proceso de Bioestimulación fueron del 87 al 93% que corresponde a tasas diarias de degradación de 98 y 105 mg/Kgss*d en los mesocosmos empleados para evaluar la bioestimulación, Sed y SN respectivamente; para el proceso de bioaumentación se obtuvieron porcentajes del 83 al 94%, que corresponden a tasas de reducción del hidrocarburo de 90 y 103 mg/Kgss*d en las unidades de Bioaumentación, SSM y SSMN en su orden. Según los anteriores valores, los procesos de Bioestimulación y Bioaumentación demostraron buenos resultados respecto a este parámetro para sedimentos de la estación de servicio de combustible, según otras investigaciones la adición de fuentes de nitrógeno y fósforo origina cambios de la población microbiana y aumento de la degradación del hidrocarburo [20]. Así mismo, favorece el crecimiento de especies dominantes [22, 23].

Se pudieron evidenciar tasas de degradación un poco más altas en los mesocosmos con adición de nutriente (Figura 3), lo que indica que la fertilización y el manejo de las condiciones ambientales del suelo fue exitosa, lo que coincide con [24], que muestra que la biodegradación de hidrocarburos se puede favorecer eficientemente con la adición adecuada de nutrientes y el manejo del contenido de humedad, temperatura, pH, nivel de aireación y otras condiciones de experimentación.

Tanto en la estrategia de Bioestimulación como de Bioaumentación, se presentaron tendencias de degradación similares, una remoción rápida hasta la semana trece y diecisiete, que se relaciona con el período donde la actividad microbiana se encontró más activa, de ahí en adelante se nota una baja reacción en el proceso. Tal y como se ha descrito en otros estudios, la ciné-



*Bioestimulación (Sed), Bioestimulación + Nutriente (SN), Bioaumentación (SSM), Bioaumentación + Nutriente (SSMN).

Figura 3. Comportamiento promedio concentración HTP, 13 datos y barras de error=1DS.

tica de degradación de contaminantes orgánicos en suelos habitualmente muestra una fase inicial de biodegradación rápida seguido de un período con pequeños o inexistentes cambios de las concentraciones residuales. Esta cinética es conocida como el fenómeno del "palo de hockey" [25], que puede estar causada por una disminución de los nutrientes, de la población microbiana, la baja biodisponibilidad de componentes orgánicos, condiciones fisicoquímicas desfavorables y un aumento de la recalcitrancia de los contaminantes residuales [21, 22, 25].

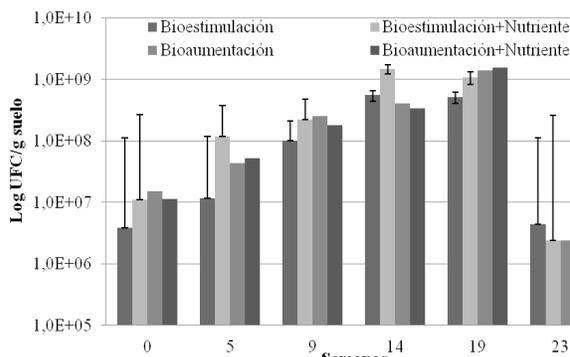
Los resultados de las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov, permiten concluir que no se presentan diferencias significativas y/o estadísticas entre las distribuciones de los datos de reducción de hidrocarburos totales para las dos estrategias, por lo tanto se

esperan resultados similares al usar las técnicas de Biorremediación o Bioaumentación para tratar los sedimentos contaminados con hidrocarburos de la estación de servicio de combustible ($p > 0,05$). Del mismo modo, la prueba ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis para los niveles de esta investigación, con un nivel de significancia de 0,05, demuestra que no hay diferencias entre las medias de los datos a través del tiempo.

Presencia de microorganismos

Las bacterias tienen un crecimiento rápido y una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminados, lo que incrementa la probabilidad de éxito en la biodegradación de compuestos como el hidrocarburo [26]. Los microorganismos hidrocarbocíclicos en los mesocosmos, manifestaron un crecimiento favorable gran parte del tiempo; para las unidades experimentales correspondientes a la estrategia de Bioestimulación, se observó un incremento de la población bacteriana de 2 unidades logarítmicas, cuyas concentraciones promedio para las unidades sin adición de nutrientes (1 Sed-3 Sed) fueron de $3,9 \times 10^6$ UFC/g al inicio y $5,8 \times 10^8$ UFC/g en la semana 14. Del mismo modo sucedió con las unidades con adición de úrea (2 SN-4 SN), donde los dos mesocosmos manejaron promedios de $1,1 \times 10^7$ UFC/g al inicio y $1,8 \times 10^9$ UFC/g en la semana 19, mostrando proyecciones similares en cuanto a las poblaciones de estas bacterias.

La actividad microbiana en los sistemas de Bioaumentación, también presentó concentraciones crecientes (Figura 4), con valores promedio entre las unidades 5 SSM y 7 SSM de $1,8 \times 10^7$ UFC/g al inicio de la investigación y $1,4 \times 10^9$ UFC/g después de la semana 19 de evaluación, así mismo, los mesocosmos correspondientes a aquellos con adición de nutriente (6 SSMN-8 SSMN) mostraron promedios de bacterias de $1,1 \times 10^7$ y $1,6 \times 10^9$ UFC/g en la semana 19 del monitoreo. Estos mesocosmos de Bioaumentación sustentaron comportamientos de bacterias hidrocarbocíclicas muy similares al compararse con las unidades de Bioestimulación, sin embargo, se evidenció que éstos iniciaron con una mayor población de bacterias, indicando que el suelo contenía microorganismos ya adaptados a los hidrocarburos y que no fueron afectados por esta mezcla.



*Bioestimulación (Sed), Bioestimulación + Nutriente (SN), Bioaumentación (SSM), Bioaumentación + Nutriente (SSMN).

Figura 4. Comportamiento promedio recuento de Bacterias hidrocarbocíclicas, 6 datos y barras de error = 1DS.

Las bacterias hidrocarbocíclicas son las responsables de la degradación de los hidrocarburos, lo que permite confirmar que el sedimento por sí sólo cuenta con una población propia adaptada a condiciones de pH, temperatura y alto contenido de hidrocarburos, y que una vez se adiciona aireación frecuente y la adición de agua, esta población se puede mantener y estimular, favoreciendo la degradación de estos compuestos.

Se pueden evidenciar poblaciones bacterianas un poco más altas en los mesocosmos a los cuales se les adicionó nutrientes, lo que puede ser atribuido al buen manejo de la relación C:N:P:K que promovió su desarrollo y crecimiento. Los mesocosmos presentaron mayores poblaciones en la semana 19, de lo que se puede deducir que para las características que se manejaron en la zona de estudio, con los sedimentos resultantes de las actividades de la estación de servicio de combustible, una buena estimulación de la población nativa y sin la técnica de bioaumentación, es suficiente para llevar a cabo un buen proceso de degradación de hidrocarburos [27].

Conclusiones

Para esta investigación se encontró que no existen diferencias significativas entre las estrategias de bioaumentación y bioestimulación para el tratamiento de los sedimentos contaminados con hidrocarburos producidos por la estación de servicio, ambas técnicas lograron efectos positivos en la reducción de hidrocarburos totales de petróleo.

En las primeras siete semanas se observan altas reducciones en las concentraciones de hidrocarburos en los mesocosmos, tiempo en el cual la temperatura fue mayor, debido al aumento en el proceso metabólico de los microorganismos y su actividad enzimática, llegando a beneficiar la degradación del contaminante. Los mesocosmos presentaron al final de la investigación tasas de degradación entre 90 y 105 mg/kgss*d, con porcentajes de reducción de contenido de hidrocarburos entre el 83 y 94%. Las unidades experimentales que presentaron valores un poco más altos en las tasas de degradación fueron aquellos a las cuales se les aplicó úrea como nutriente (bioestimulación), sin embargo no se observaron diferencias significativas, entre éstos.

Con los resultados de esta investigación, se sustenta que la presencia de microorganismos nativos, la adición de agua y aire, para los sedimentos contaminados producto de las actividades de la estación de servicio, tienen efectos positivos en la reducción de las concentraciones de hidrocarburos totales, entonces la adición de nutrientes queda sujeto a los resultados de laboratorio iniciales, donde es importante su adición si el sedimento sustenta deficiencias de estos compuestos.

La adición de microorganismos adaptados al contaminante no representó un incremento significativo en la remoción del HTP por lo tanto, se recomienda tratar los sedimentos con la población nativa de bacterias.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias, la empresa de transporte masivo INTEGRAL y a la Universidad Tecnológica de Pereira, específicamente al Grupo de Investigación en Agua y Saneamiento de la Facultad de Ciencias Ambientales, por el soporte y apoyo para realizar esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. Vallejo, V., Salgado, L., y Roldán, F. "Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de TPHs en Suelos Contaminados con Petróleo". Rev. Col. Biotec. Vol. VII, N° 2 (2005) 67-78.
2. Pardo, J., Perdomo, M., Benavides, J. "Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo". NOVA publicación científica ISSN: 1794-2370. Vol. 2, N° 2 (2004) 1-108.
3. Corporación Autónoma Regional de Risaralda y Universidad Tecnológica de Pereira. "Mejoramiento de la Gestión Ambiental de las Estaciones de Servicio de Risaralda". Editorial CARDER, Pereira: 20 (2007).
4. Corporación Autónoma Regional de Risaralda. "Por la cual se Adopta el Protocolo para la Construcción de Pozos de Monitoreo de Actividades Potencialmente Peligrosas". Resolución N° 377: 2 (2005).
5. Boyer, R. "Conceptos de Bioquímica". International Thomson. Editores México (2000).
6. Arroyo, M., Quesada, E., Quesada R., Geocisa, J. "Aplicación de Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos". Div. Protección Ambiental de Suelos, España.
7. Volke, T., y Velasco, J. "Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados". Instituto Nacional de Ecología. INE-SEMARNAT, México D.F.
8. Vargas, P., Cuéllar, R., y Dussán, J. "Biorremediación de Residuos del Petróleo". Ecopetrol. Hipótesis: Apuntes Científicos Uniandinos N° 4 (2004) 43-49.
9. Ríos, R. "Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros". Proyecto de grado de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al Tiempo, México D.F. (2005).
10. Gan, S., Lau, E., Ng, H. "Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)". Journal of Hazardous Materials, Malaysia. Vol. 172 N° 30 (2009) 532-549.
11. Kauppi, S., Sinkkonen, A., Romantschuk, M. "Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation" International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 65 (2011) 359-368.

12. Zagal, E., y Sadzawka, A. "Protocolo de Métodos de Análisis para Suelos y Lodos". Universidad de Concepción Facultad de Agronomía Chillán. Elaborado con la participación de la Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo por encargo del Servicio Agrícola y Ganadero, Chile (2007).
13. Yanine, H. "Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja". Proyecto de grado de Maestría Ciencias Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. (2010).
14. EPA 3540C. "Soxhlet extraction organics". SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods (1996).
15. Ochoa, E. "Guía de Teoría y de Práctica. Manual Producción de Sustratos Para Viveros". Instituto Universitario de Tecnología Agro Industrial. San Cristóbal (1999).
16. Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., y Mantilla, P. "Factores Bióticos y Abióticos que Condicionan la Biorremediación por *Pseudomonas* en Suelos Contaminados por Hidrocarburos". NOVA Vol. 6 N° 9 (2008) 76-84.
17. Ayotamuno, M., y Okparanma, N. "Bio-Remediation of a Sludge Containing Hydrocarbons". Applied Energy, Nigeria. Vol. 84 N° 9 (2007) 936-946.
18. Atlas, R. "Bioestimulación para la biorrecuperación microbiana. En: Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos". Ed. Mc Graw Hill, España (1996) 15-21.
19. Levin, M. y Gealt, M. "Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos". Tercera Edición. Mc Graw Hill. Madrid, España (1997) 643-651.
20. Xu, Y. y Lu, M. "Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments". Journal of Hazardous Materials, China. Vol. 183 (2010) 395-401.
21. Karamalidis, A., Evangelou, A., Karabika, E., Koukkou, A., Drainas, C., Voudrias, E. "Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet". Bioresource Technology, Greece. Vol. 101 N° 16 (2010) 6545-6552.
22. Taccaria, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., Ciani, M. "Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community". International Biodegradation & Biodegradation, Ancona, Italia. Vol. 66 (2012) 39-46.
23. Ta-Chen, L., Po-Tsen, P., Sheng-Shung, C. "Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil". Journal of Hazardous Materials, Taiwan. Vol. 176 (2010) 27-34.
24. Odukuma, L. y Dickson, A. "Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil". Global J. Environ. Sci. Vol. 2 N° 1 (2003) 2003-2940.
25. Alexander, M. "Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants". Env. Sci. Technol. Vol. 34 (2000) 4259-4265.
26. Velasco, N. "Efecto de Pretratamientos Físico-químicos en la Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en un Suelo Intemperizado, por Composteo". Trabajo de grado Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. (2004).
27. Viñas, M., Grifoll, J., Sabate, A., y Solanas, M. "Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities". J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Vol. 28 N° 5 (2002) 252-260.

Recibido el 6 de Septiembre de 2012

Enforma revisada el 4 de Noviembre de 2013