

Evaluación de estrategias de bioestimulación para la remoción de hidrocarburos del petróleo de un suelo árido de la Cuenca Neuquina (Arg)

Avaliação de estratégias de bioestimulação para a remoção de hidrocarbonetos de petróleo de um solo árido na Bacia de Neuquina (Arg)

DOI:10.34117/bjdv9n8-102

Recebimento dos originais: 21/07/2023

Aceitação para publicação: 21/08/2023

Andrea Bibiana Pojmaevich

Master en Gestión Integrado, Prevención, Calidad y Medio Ambiente
Institución: Facultad Regional del Neuquén, Universidad Tecnológica Nacional
Dirección: P. P. Rotter SR, Plaza Huincul, Neuquén - Argentina
Correo electrónico: abpojmaevich@gmail.com

Alberto Camacho

Doctor en Química Física
Institución: Facultad Regional del Neuquén, Universidad Tecnológica Nacional
Dirección: P. P. Rotter SR, Plaza Huincul, Neuquén - Argentina
Correo electrónico: albertocamacho@yahoo.com

Lucas Adolfo Mauro Ruberto

Doctor en Biotecnología
Institución: Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Universidad de Buenos Aires (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Dirección: Junín 956, Buenos Aires - Argentina
Correo electrónico: lruberto@ffyb.uba.ar

Víctor Daniel Busto

Doctor en Biotecnología
Institución: Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Universidad de Buenos Aires (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Dirección: Junín 956, Buenos Aires - Argentina
Correo electrónico: vbusto@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP) representan una importante problemática ambiental. La biorremediación ha demostrado ser una técnica eficaz para la recuperación de estos suelos. Es sabido que el mejoramiento de las condiciones ambientales y nutricionales de la microflora autóctona de los suelos puede incrementar los procesos de biodegradación. Esto puede lograrse modificando la humedad y la disponibilidad de nutrientes en suelos pobres, es decir, aplicando lo que se conoce como un proceso de bioestimulación. El objetivo de este trabajo fue evaluar un proceso de bioestimulación de los microorganismos autóctonos presentes en un suelo árido contaminado con HTP de la Cuenca Neuquina. Además, se analizó el efecto del agregado de virutas de madera con el objeto de mejorar las condiciones de aireación del

suelo. Se diseñaron ocho microcosmos conteniendo 200 g de suelo contaminado cada uno. Cuatro microcosmos fueron bioestimulados (BIO) adicionando una solución de NH_4Cl y Na_2HPO_4 , ajustando así la relación C:N:P a 100:10:1 en base al contenido inicial de HTP. El resto de los microcosmos fueron considerados controles (CC) y se les ajustó la humedad inicial al 15% (CC). A dos de los CC y a dos BIO, se les adicionó 10% de viruta de madera de pino estéril, denominándolos CC-V y BIO-V, respectivamente. Todos los microcosmos se incubaron a 25°C y se mezclaron con el objeto proveer aireación al suelo. Se determinaron los HTP, actividad biológica total (ABT), recuento de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y bacterias degradadoras totales (BDT). A los 42 días todos los sistemas evaluados mostraron una marcada reducción en el contenido de HTP, siendo en promedio un 88% para CC y BIO, y un 79% para CC-V y BIO-V con respecto al valor inicial. Estas reducciones estarían relacionadas con los incrementos observados para el mismo período tanto en la ABT como en los recuentos bacterianos. La ABT se incrementó más de dos veces en todos los sistemas evaluados. Los incrementos de los recuentos de BHAT y BDT fueron similares (dos órdenes de magnitud para CC y BIO, y un orden para CC-V y BIO-V en relación a los recuentos iniciales). La ausencia de diferencias significativas en los porcentajes de remoción de los HTP entre los sistemas CC y BIO (con y sin viruta), indicaría que la aplicación de una técnica de bioestimulación en este suelo no mejora la remoción en comparación con los sistemas donde solo se ajustó el contenido de humedad y además se incorporó aire a través del mezclado. Por otra parte, el agregado de viruta tampoco contribuyó a una mejora en el proceso de degradación de los HTP como se esperaba. Por lo tanto, se puede concluir que una estrategia de bioestimulación y el agregado de viruta no resultarían efectivos para este tipo de suelos, con el nivel de contaminación y el aparente grado de adaptación de la microflora autóctona, siendo el mezclado, aireación y ajuste de humedad un proceso simple y de bajo costo que favorecería la degradación de los HTP.

Palabras-clave: biorremediación, bioestimulación, suelos contaminados, hidrocarburos del petróleo.

RESUMO

Os solos de hidrocarbonetos petrolíferos (PTA) representam um problema ambiental importante. A melhoria demonstrou ser uma técnica eficaz para a recuperação desses solos. Sabe-se que melhorar as condições ambientais e nutricionais da microflora indígena dos solos pode aumentar os processos de biodegradação. Isto pode ser conseguido alterando a humidade e a disponibilidade de nutrientes em solos pobres, ou seja, aplicando o que é conhecido como processo de bioestimulação. O objetivo desse estudo foi avaliar um processo de bioestimulação dos microrganismos indígenas presentes em um solo árido contaminado com PTT da Bacia do Neuquin. Além disso, o efeito da agregação das aparas de madeira foi analisado a fim de melhorar as condições de arejamento do solo. Foram projetados oito microcosmos, cada um contendo 200 g de solo contaminado. Quatro microcosmos foram bioestimulados (BIO) adicionando uma solução de NH_4Cl e Na_2HPO_4 , ajustando assim a relação C:N:P a 100:10:1 com base no conteúdo inicial de HTP. O resto do microcosmo foi considerado controle (CC) e a umidade inicial foi ajustada para 15% (CC). Dois dos CC e dois BIOS foram adicionados a 10% de pinheiros estéreis, respectivamente chamados CC-V e BIO-V. Todos os microcosmos foram incubados a 25°C e misturados com o objetivo de fornecer arejamento ao solo. Foram determinados o PHTP, a atividade biológica total (TOP), as bactérias heterotróficas aeróbias totais (BHAT) e as bactérias degradantes totais (BDT). Ao fim de 42 dias, todos os sistemas avaliados apresentaram uma redução marcada no

conteúdo de HTP, sendo em média 88% para CC e BIO, e 79% para CC-V e BIO-V a partir do início do estudo. Estas reduções estariam relacionadas com aumentos observados durante o mesmo período, tanto na ABT como na contagem de bactérias. O ABT aumentou mais de duas vezes em todos os sistemas testados. Os aumentos nas contagens de BHAT e BDT foram semelhantes (duas ordens de magnitude para CC e BIO, e uma ordem para CC-V e BIO-V em relação às contagens iniciais). A ausência de diferenças significativas nas percentagens de remoção do PHTP entre os sistemas CC e BIO (com e sem virulência) indicaria que a aplicação de uma técnica de bioestimulação neste solo não melhora a remoção em comparação com sistemas em que apenas o teor de humidade foi ajustado e o ar foi também incorporado através da mistura. Além disso, a adição de vinha não contribuiu para melhorar o processo de degradação dos PTA, como se esperava. Portanto, pode-se concluir que uma estratégia de bioestimulação e a adição de videiras não seriam eficazes para esse tipo de solo, com o nível de poluição e o aparente grau de adaptação da microflora indígena, com a mistura, o arejamento e o ajuste da umidade sendo um processo simples e de baixo custo que favoreceria a degradação do PHTP.

Palavras-chave: biorremediação, bioestimulação, solos contaminados, hidrocarbonetos petrolíferos.

1 INTRODUCCIÓN

La producción hidrocarburífera en la Cuenca Neuquina (Sur de Argentina) se ha ido incrementando paulatinamente con el paso de los años alcanzando en este último tiempo valores record en su historia productiva, según lo informa el Gobierno Provincial del Neuquén en su página oficial del Ministerio de Energía y Recursos Naturales (Ministerio de energía y recursos naturales, 2022). De esta forma la actividad hidrocarburífera es uno de los pilares fundamentales de la economía regional, la cual está relacionada con el cobro de regalías, la generación de empleo, y las actividades comerciales referidas a las etapas del proceso de exploración y explotación de los hidrocarburos (Landriscini *et al.*, 2017). De la mano del incremento en la producción, se registró un aumento significativo en la generación de pasivos ambientales producidos por este tipo de industrias, provocando la contaminación de suelos, napas y cursos de agua superficial (Liporace *et al.* 2019). Este problema sigue vigente, ya sea por falta de mantenimiento, descuidos, inclemencias climáticas o simplemente negligencia.

Para remediar este daño existen diferentes alternativas. Los sistemas de eliminación basados en principios físicos o químicos como la desorción térmica, la oxidación, el lavado o la incineración entre otros, son de costo relativo alto y destruyen las características del suelo a tratar o simplemente transfieren el contaminante de una matriz (suelo) a otra (agua o aire) (Ortíz Brito *et al.*, 2003; Peña Murillo *et al.*, 2019;

Singh y Cameotra, 2013; Coria, 2007). Hace ya algunos años se han sumado los procesos basados en sistemas biológicos, también denominados biotecnológicos, que sustituyen o complementan los sistemas fisicoquímicos (Araruna *et al.*, 2004). Los procesos biotecnológicos utilizados generalmente implican el retiro del material de la zona de origen para tratarlos en repositorios donde muchas veces son mezclados con suelos contaminados de otros sectores y otros materiales contaminados. El tratamiento del suelo utilizando herramientas biológicas puede hacerse disponiendo el suelo en sistemas de *landfarming* o en biopilas (Benavides López de Mesa *et al.*, 2006)

Dentro de estos tratamientos de gestión de los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, la biorremediación ha demostrado ser una de las técnicas más eficientes, la cual puede ser definida como la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos ambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos (González Rojas, 2014).

Los factores que gobiernan la biorremediación están relacionados con las características de los hidrocarburos, como su composición química, el estado físico y la concentración; con factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, la humedad, la salinidad, los nutrientes y el pH; y con factores microbianos como la cantidad de microorganismos, dotación enzimática, asociación por co-oxidación, la dinámica de las poblaciones y la velocidad de biodegradación (Luis *et al.*, 2020; Chiriví Salomón, 2020). Claro que naturalmente el ambiente tiene cierta capacidad de amortiguar o subsanar los efectos de los contaminantes, dependiendo claro de qué tipo sean, de su concentración y de la frecuencia de ocurrencia, este puede llevar mucho tiempo antes de conseguir las condiciones originales del ambiente en cuestión, tal como sucede con los hidrocarburos del petróleo. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es sabido que el mejoramiento de las condiciones de crecimiento de la microflora autóctona de los suelos puede incrementar significativamente los procesos de remediación. Esto puede lograrse modificando la humedad y la disponibilidad de nutrientes en suelos pobres, es decir, aplicando lo que se conoce como un proceso de bioestimulación (Martínez Álvarez *et al.*, 2017). Además, el mejoramiento de las condiciones de aireación del suelo, ya sea por aireación forzada o por el agregado de algún material estructurante, como por ejemplo celulosa y lignina, como así también pajas, rastrojos, cachaza de caña, aserrín y residuos de aserradero, aumentan la porosidad de los suelos contaminados y favorecen la distribución y movimiento del agua y aire, por lo que pueden favorecer los procesos de remediación (Brutti *et al.*, 1977; Delgadillo *et al.*, 2016; González Rojas, 2014)

Tomando en consideración estos factores es factible pensar que los experimentos de laboratorio que se realizan en condiciones controladas permitan identificar aquellos que sean más influyentes y que afectan el proceso de biorremediación. De esta forma es posible obtener información que permita diseñar un sistema de tratamiento en campo para la recuperación de grandes cantidades de suelo. Pero, dado que las condiciones de laboratorio permiten un nivel de control que no es posible en los tratamientos a campo, es posible que no se reflejen estos factores con la misma certeza (Kao *et al.*, 2001), por lo cual es conveniente realizar experimentos de biorremediación a diferentes escalas utilizando sistemas de “microcosmos” (Ruberto *et al.*, 2013).

En ese sentido, los sistemas de microcosmos deberían: i) ser representativos de un sistema más grande; ii) tener límites; iii) ser replicables; iv) presentar propiedades a nivel del sistema; v) imitar situaciones de campo; vi) ser piezas de un ecosistema mínimamente perturbado traídas al laboratorio en su estado natural (Ruberto *et al.*, 2013).

Por otra parte, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo procedentes de la localidad de Catriel (Cuenca Neuquina) poseen una microflora con capacidad catabólica para degradar los contaminantes presentes, lo que los hacen susceptibles de ser tratados mediante una adecuada estrategia de biorremediación (Pojmaevich *et al.*, 2019). Asimismo, se demostró que estos suelos carecen de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo, ya que ambos arrojaron valores inferiores al límite de detección de las técnicas analíticas implementadas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad para remover hidrocarburos de los microorganismos autóctonos presentes en un suelo contaminado con petróleo de la Cuenca Neuquina mediante una estrategia de bioestimulación en microcosmos. Además, se analizó el efecto del agregado de un material estructurante (virutas de madera) con el objeto de mejorar las condiciones de aireación del suelo.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 TOMA DE MUESTRAS Y ACONDICIONAMIENTO

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo provenientes de la localidad de Catriel (Cuenca Neuquina), gentilmente provisto por la empresa Aconcagua Energía S.A., quien está a cargo de la operación de la base Catriel Oeste, concesionada a la Empresa de Desarrollo

Hidrocarburífero Provincial de Río Negro (EDHIPSA). El material utilizado fue extraído a partir de una pila de suelo contaminado (Figura 1), el cual había sufrido un derrame de petróleo crudo seis meses antes. El material fue obtenido aplicando un muestreo tomando en consideración la guía para muestreo de suelos que sigue los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo (MINAM, 2014).

Figura 1. Pila de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo en la localidad de Catriel (Cuenca Neuquina).



Fuente: Fotografía tomada por los autores

Las muestras de suelo fueron acondicionadas realizando una limpieza manual para retirar piedras y porciones de mayor tamaño, y posteriormente fueron tamizadas mediante una malla galvanizada con una abertura nominal de 1 mm (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Acondicionamiento del suelo mediante malla galvanizada de 1 mm de abertura.



Fuente: Fotografía tomada por los autores

Figura 3. Suelo tamizado y acondicionado.



Fuente: Fotografía tomada por los autores

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Inicialmente se realizó la caracterización de las muestras de suelo determinando el contenido de nutrientes, utilizando el método de Kjeldahl para el nitrógeno y el método de Bray (desarrollado por Bray y Kurtz, 1945) para el fósforo según se detalla en el manual de técnicas de suelos contaminados (Fernandez Linares *et al.*, 2006). Para las mediciones de pH se añadieron 10 mL de agua destilada a 1 g de suelo, se sometió a agitación vorticial durante 1 minuto y se dejó reposar por 10 minutos. Luego el pH de la suspensión resultante se midió utilizando un pHmetro marca Hanna modelo HI-8424. El contenido de humedad se obtuvo utilizando el método gravimétrico descrito por Fernandez Linares *et al.*, (2006). Brevemente, se pesó 1 g de suelo, se dejó secar en estufa a 80°C durante 24 h, luego se mantuvo por otras 24 h en un desecador y luego por diferencia de pesada se obtuvo el valor porcentual de la humedad. Además, se realizó la determinación del contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de acuerdo a lo descrito por Fernandez Linares *et al.*, (2006).

2.3 DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES

Para la determinación del contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se utilizó el procedimiento de agitación-extracción de acuerdo a lo descrito por Fernandez Linares *et al.*, (2006). Se tomaron 2 g de muestra de suelo contaminado por triplicado al que se les añadió una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro, se homogeneizaron utilizando un agitador vortex y se colocaron durante 4 h en estufa a 120°C con el objeto de eliminar toda la fracción acuosa que pudiera quedar en la fase orgánica. Luego, se agregaron 0,5 g de sílica gel 60 y se agitaron nuevamente para

eliminar los compuestos polares que pudieran existir en la fase orgánica. Posteriormente, se agregaron 5 mL de percloroetileno, se agitaron por 45 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos. Finalmente, la mezcla se filtró, se separó el sobrenadante y se reservó hasta lograr el total del volumen requerido. Estos pasos de extracción, agitación y centrifugación se repitieron 3 veces hasta obtener 15 mL de sobrenadante. Los HTP se midieron sobre este sobrenadante utilizando un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) quedando expresados en mg HTP/Kg de suelo seco (SS) de acuerdo a la norma US EPA 418.1 (1978) (Villacreses, 2011)

2.4 RECUEENTOS BACTERIANOS

El número de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y bacterias degradadoras totales (BDT) se determinaron mediante la técnica de dilución y diseminación en placa de Petri. Para ello, se tomó 1 g de suelo contaminado al que se le agregó 10 mL de solución fisiológica (SF) y 0,1% de Tween 20, ambos en condición de esterilidad. Esta mezcla se agitó en agitador vortex durante 5 minutos y luego se diluyó de manera seriada desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} utilizando SF como diluyente. Posteriormente, cada dilución se sembró en placas de Petri por triplicado utilizando diferentes medios de cultivo agarizados.

Para el recuento de BHAT, considerando que se trata de un suelo árido que se caracteriza por su bajo nivel de nutrientes, se utilizó como medio de cultivo Agar R2A (Britania) (extracto de levadura 0,5 g; peptona proteasa 0,5 g; casaminoácido 0,5 g; glucosa 0,5 g; almidón 0,5 g; piruvato de sodio 0,3 g; K_2HPO_4 0,3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g; agar 15 g; agua destilada 1000 mL), que está formulado con un bajo contenido nutricional. Por otra parte, para el recuento de las BDT, se utilizó un medio salino basal (MSB) (NH_4NO_3 4 g L^{-1} ; KH_2PO_4 1,8 g L^{-1} ; Na_2HPO_4 7,9 g L^{-1} ; solución de microelementos 0,08 g L^{-1}) al que se le agregó 1,6% de agar bacteriológico y, luego de esterilizar, se le agregó entre 1% y 2% de gasoil como única fuente de carbono. Eventualmente, para evitar un crecimiento fúngico, se utilizó cicloheximida estéril a razón de 10 mL/L a partir de una solución stock de 0,5 g L^{-1} .

2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA TOTAL

La actividad biológica total (ABT) se determinó por triplicado según el método de Adam y Duncan (2001) modificado. Se tomaron 0,9 g de suelo contaminado a los que se le agregaron 6,75 mL de buffer fosfato de pH 7,2 y 90 μL de una solución de 1000

$\mu\text{g/mL}$ de diacetato de fluoresceína (FDA) en un tubo tipo Falcon de 15 mL. Paralelamente se elaboró un tubo blanco de reacción en ausencia de FDA, el cual contenía 0,9 g de suelo contaminado y 6,75 mL de buffer fosfato de pH 7,2. Tanto las muestras como el blanco se agitaron a 100 rpm durante 20 minutos a 30°C. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo con 6,75 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), se agitó manualmente y se centrifugó durante 3 minutos a 3000 rpm. Por último, la fase acuosa fue separada, filtrada y se midió su absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm. Para cuantificar el producto de la reacción (fluoresceína) se realizó una curva de calibración que relaciona los valores de absorbancia medidos a 490 nm con concentraciones conocidas de fluoresceína en un rango de 0 a 5 $\mu\text{g/mL}$. Los valores finales de la ABT se expresaron como μg de fluoresceína por g de suelo seco (μg fluoresceína/g SS).

2.6 ENSAYO DE BIOESTIMULACIÓN EN MICROCOSMOS

Se diseñaron ocho sistemas microcosmos utilizando frascos (FM) de boca ancha (10 cm de alto y 5 cm de diámetro) conteniendo 200 g de suelo contaminado cada uno (Figura 4), de acuerdo a lo descrito por Ruberto *et al.* (2013) y Conde Molina *et al.* (2019). Cuatro microcosmos fueron bioestimulados (BIO) adicionando una solución de sales que contiene 1,62 g de NH_4Cl y 0,19 g de Na_2HPO_4 , con el objeto de ajustar la proporción de nutrientes (C:N:P) a una relación de 100:10:1, según sugiere Martínez Álvarez *et al.* (2015). Para estimar las cantidades de sales de nitrógeno y fósforo a adicionar se tuvo en cuenta la concentración inicial de los HTP del suelo contaminado, el cual resultó de 26451,65 mg HTP/Kg SS. Los demás sistemas microcosmos fueron utilizados como control comunidad (CC) a los cuales se les corrigió solamente la humedad inicial al 15% con agua destilada estéril. Luego se tomaron dos sistemas CC y dos sistemas BIO, y se les adicionó 10% de viruta de madera de pino estéril como mejorador de la estructura y capacidad de aireación del suelo (Figura 5), denominándolos CC-V y BIO-V, respectivamente (Brutti *et al.*, 1977; González Rojas, 2014). Todos los sistemas microcosmos se incubaron a 25°C ajustando periódicamente la humedad al 15% y mezclándolos cada 3 días con el objeto de airear el suelo. En la Tabla 1 se muestra un listado de los sistemas microcosmos con su correspondiente denominación y referencia dentro del ensayo.

Figura 4. Sistemas microcosmos diseñados en frascos (FM) con suelo contaminado.



Fuente: Fotografía tomada por los autores

La evolución de los procesos de bioestimulación y biorremediación se siguió tomando muestras de suelo al inicio, a los 28 y a los 42 días, tiempos a los que se les determinaron la concentración de HTP, el número de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y bacterias degradadoras totales (BDT), y la actividad biológica total (ABT).

Figura 5. Detalle de sistemas microcosmos con el agregado de viruta de madera estéril.



Fuente: Fotografía tomada por los autores

Tabla 1. Sistemas microcosmos con su denominación y referencia dentro del ensayo.

| Referencia | Denominación |
|-------------|----------------------------------|
| FM 2 y FM 3 | CC: Control comunidad |
| FM 4 y FM 5 | CC-V: Control comunidad + viruta |
| FM 6 y FM 7 | BIO: Bioestimulado |
| FM 8 y FM 9 | BIO-V: Bioestimulado + viruta |

Fuente: Elaborado por los autores

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre los valores iniciales y finales de la actividad bacteriana total (ABT),

la concentración de HTP y los recuentos bacterianos (BHAT y BDT). Para ello se utilizaron los programas informáticos Microsoft Excel 2019 y GraphPad.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se realizó la caracterización de las muestras de suelo contaminado (SC), determinando la concentración de nutrientes (como nitrógeno y fósforo), la humedad del suelo, el valor de pH del mismo y la concentración de HTP presentes. Los resultados de esta caracterización se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización inicial del suelo en términos de humedad, pH, contenido de nutrientes e HTP.

| Parámetro | Resultado |
|-----------------|-----------|
| pH | 6,7 |
| Humedad (%) | 16,530 |
| Nitrógeno (%)* | < 0,032 |
| Fósforo (ppm)** | < 1 |
| HTP (mg/Kg SS) | 26451,65 |

Fuente: Elaborado por los autores

* Se obtuvieron valores no detectables por la técnica utilizada siendo el valor indicado el más bajo admisible. ** Se obtuvieron valores no detectables por la técnica utilizada siendo el valor indicado el más bajo admisible.

Los resultados obtenidos respecto al contenido de nutrientes de las muestras de suelo contaminado mostraron valores despreciables tanto para el contenido de nitrógeno como para el contenido de fósforo. Estos valores están en concordancia con lo esperado considerando que la Cuenca Neuquina se caracteriza por su clima árido, se encuentra sometida a procesos de explotación hidrocarburífera y se caracteriza además por su deficiencia nutricional tanto en nitrógeno como en fósforo (Acuña *et al.*, 2008; Acuña *et al.*, 2010).

Posteriormente, se procedió a diseñar y montar un ensayo de bioestimulación en sistemas microcosmos, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. El proceso de bioestimulación fue evaluado en términos de concentración de HTP, número de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y bacterias degradadoras totales (BDT), y actividad biológica total (ABT).

La evolución del contenido de los HTP en función del tiempo en todos los sistemas microcosmos evaluados, y sus correspondientes porcentajes de remoción se muestran en la Figura 6. Allí se observó una marcada disminución del contenido de los HTP partiendo

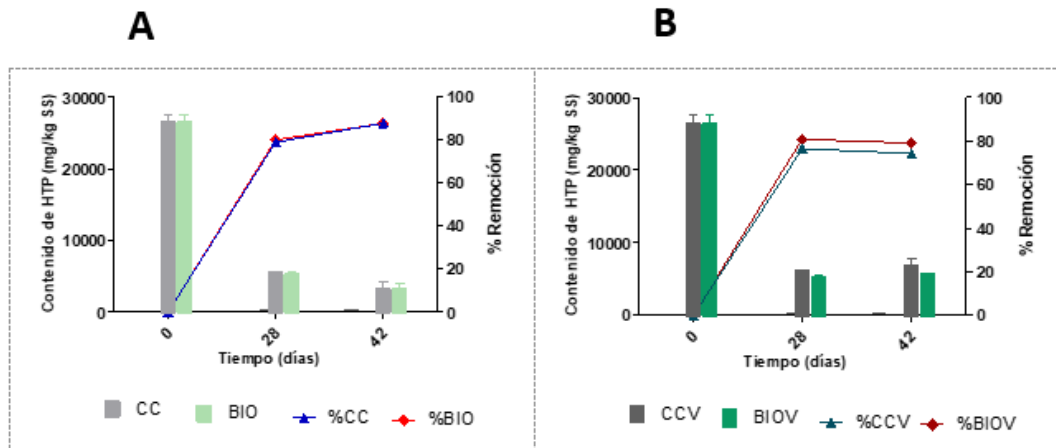
de un valor inicial de 26451,65 mg HTP/Kg SS y alcanzando un valor de 5538 mg HTP/Kg SS para los sistemas CC y de 5285 mg HTP/Kg SS para los sistemas BIO al cabo de los 28 días (Figura 6A). Asimismo, al cabo del mismo tiempo se alcanzaron valores de 6223 mg HTP/Kg SS para los sistemas CC-V y 6812 mg HTP/Kg SS para los sistemas BIO-V (Figura 6B). Estas reducciones en el contenido de los HTP indicarían un porcentaje de remoción del 79% en promedio para los sistemas sin viruta y del 75% para los sistemas con viruta. Sin embargo, este porcentaje de remoción se incrementó aún más alcanzando un valor de 88% en promedio al cabo de los 42 días para los sistemas sin viruta y de 79% para los sistemas con viruta.

Otros autores han realizado diferentes estudios sobre la biorremediación de suelos Patagónicos contaminados con hidrocarburos del petróleo considerando las diferentes texturas del suelo y su tendencia a la aridez. En estos estudios, se han analizado distintas técnicas aplicadas *in situ*, *ex situ* y a escala laboratorio (Brutti *et al.*, 2018). En general, se ha observado que los niveles de degradación alcanzados varían entre el 60% y el 90% (Acuña *et al.*, 2009; Pucci *et al.*, 2011), lo cual estaría en línea con los porcentajes de remoción observados en nuestro trabajo.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas CC y BIO, y CC-V y BIO-V. Estos resultados podrían indicar que la microflora presente en este suelo estaría adaptada a la presencia de los hidrocarburos, producto de la contaminación original y a las condiciones de aridez del suelo, ya que la incorporación de los nutrientes en los sistemas BIO no incrementaron el porcentaje de remoción en relación con los sistemas CC. Hay autores que proponen que en ambientes deficientes de nitrógeno es posible llevar a cabo procesos de biorremediación (Piehler *et al.*, 1999), ya que se han descrito microorganismos con capacidad de utilizar los hidrocarburos bajo esas condiciones. Este tipo de microorganismos resultaría importante en suelos deficientes de nitrógeno ya que cumplirían un rol fundamental en los procesos de atenuación natural (Acuña *et al.*, 2008).

Por otro lado, se puede observar en los sistemas CC y BIO, lograron una mayor reducción de este parámetro que aquellos con adición de viruta (CC-V y BIO-V). Por lo tanto, la remoción aquí observada podría deberse fundamentalmente al mantenimiento de los porcentajes de humedad del suelo y a la incorporación de aire en el proceso de mezclado. Es importante considerar que una fracción de los hidrocarburos puede haber sido eliminada debido a la evaporación, incrementada por el mezclado periódico del suelo.

Figura 6. Concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y porcentaje de remoción de los mismos en función del tiempo en los sistemas control comunidad y bioestimulados (CC y BIO) (A) y control comunidad y bioestimulados con viruta (CC-V y BIO-V) (B).

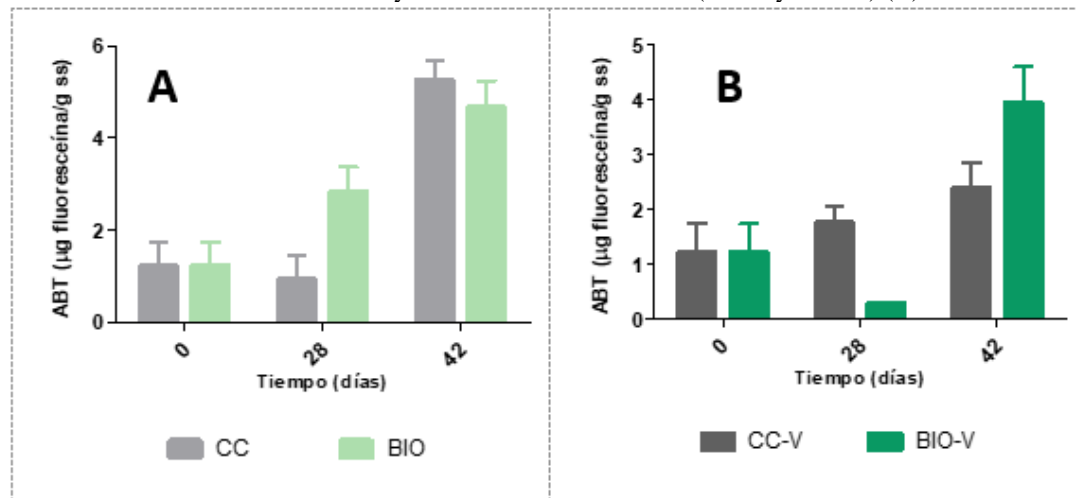


Fuente: Elaborado por los autores

En cuanto a la actividad biológica total (ABT) mostrada en la Figura 7, se observó un aumento gradual de la misma desde un valor inicial de 1,22 μg fluoresceína/g SS hasta un valor de 5,24 μg fluoresceína/g SS para los sistemas CC y 4,65 μg fluoresceína/g SS para los sistemas BIO al cabo de los 42 días (Figura 7A). Esta ABT también se incrementó hasta 2,4 μg fluoresceína/g SS y 3,94 μg fluoresceína/g SS para los sistemas CC-V y BIO-V, respectivamente, al cabo del mismo tiempo (Figura 7B). Estos resultados indicarían un incremento de la ABT de 4,3 y 3,8 veces para los sistemas CC y BIO, y de 1,95 y 3,24 veces para los sistemas CC-V y BIO-V, respectivamente. De manera similar, otros autores han observado aumentos de la actividad bacteriana en sistemas con y sin agregado de nitrógeno (Acuña *et al.*, 2008, Piehler *et al.*, 1999).

Al igual que en el contenido de los HTP, los valores de la ABT obtenidos al cabo de los 42 días no mostraron diferencias significativas, por lo que se podría inferir que la adición de nutrientes no conduciría a un incremento importante de la misma en los sistemas BIO respecto de los sistemas CC. De la misma manera vemos que la adición de un mejorador de la estructura del suelo, como la viruta de madera, no conduciría a un aumento de la ABT en relación a los sistemas sin viruta.

Figura 7. Actividad biológica total del suelo (ABT) evaluada como μg de fluoresceína liberada/g suelo seco en función del tiempo en los sistemas control comunidad y bioestimulados (CC y BIO) (A), y control comunidad y bioestimulados con viruta (CC-V y BIO-V) (B).



Fuente: Elaborado por los autores

En relación al recuento de bacterias presentes en los sistemas evaluados, las aerobias totales (BHAT) fueron cultivadas en medio de cultivo R2A y las degradadoras totales de hidrocarburos (BDT) en agar gasoil. Ambos tipos de bacterias mostraron un aumento de las UFC/g SS en función del tiempo. Para el caso de las BHAT se registró un valor inicial de $2,23 \times 10^4$ UFC/g SS el cual, al cabo de los 42 días, se incrementó hasta $1,93 \times 10^6$ UFC/g SS en los sistemas CC y $6,6 \times 10^6$ UFC/g SS en los sistemas BIO (Figura 8A). Las diferencias registradas en UFC/g SS al cabo de ese tiempo del proceso resultaron significativas entre ambos sistemas sin viruta. Del mismo modo, estas BHAT se incrementaron hasta $1,16 \times 10^5$ UFC/g SS en los sistemas CC-V y $4,1 \times 10^5$ UFC/g SS en los sistemas BIO-V (Figura 8B). Los incrementos observados resultarían de dos órdenes de magnitud para los sistemas en ausencia de viruta y de solo un orden de magnitud para los sistemas con viruta. Cabe mencionar que un recuento inicial de microorganismos heterótrofos en un orden de magnitud de 10^3 indicaría que el sistema suelo-contaminante-microorganismos podría ser eficaz en la remoción de los hidrocarburos, ya que un recuento de microorganismos inferior a ese valor podría indicar la presencia de concentraciones tóxicas de materia orgánica o inorgánica (Pozzo Ardizzi, 2018).

Por otra parte, en la Figura 9 se observó un comportamiento similar mostrando un incremento de las BDT el cual resultó de dos órdenes de magnitud para los sistemas sin viruta y de solo un orden de magnitud para los sistemas con viruta al cabo de los 42 días. Estos incrementos se generaron a partir de un valor inicial de $6,48 \times 10^2$ UFC/g SS,

alcanzando un valor final de $1,4 \times 10^4$ UFC/g SS para los sistemas CC y $1,9 \times 10^4$ UFC/g SS para los sistemas BIO (Figura 9A). De igual manera las BDT se incrementaron hasta $1,15 \times 10^3$ UFC/g SS en los sistemas CC-V y hasta $10,5 \times 10^3$ UFC/g SS en los sistemas BIO-V (Figura 9B).

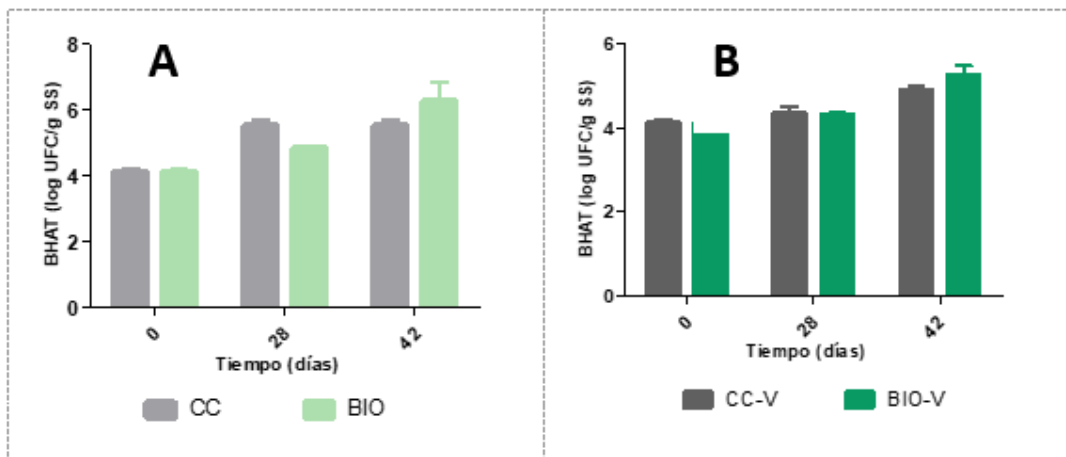
Con excepción de los recuentos de las BHAT en los sistemas sin viruta, los recuentos de las BDT (con y sin viruta) y de las BHAT en presencia de viruta no mostraron diferencias significativas entre los sistemas CC y BIO al cabo de los 42 días. Asimismo, los incrementos registrados en UFC/g SS fueron similares (dos órdenes de magnitud para los sistemas sin viruta y un orden de magnitud para los sistemas con viruta). Incrementos, tanto en los recuentos de las BHAT como en los de las BDT, han sido observados en sistemas microcosmos conteniendo suelos deficientes en nitrógeno por atenuación natural y bioestimulados con y sin nitrógeno (Acuña *et al.*, 2008). En sistemas bioestimulados el nitrógeno actuaría como estimulante de la utilización de los hidrocarburos (Dibble y Bartha, 1979). No obstante, en los casos en donde no se lo encuentra biodisponible, habría una parte de la comunidad bacteriana del suelo que es capaz de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía.

Estos aumentos observados en el número de bacterias (BHAT y BDT), estarían en directa relación con los aumentos de la ABT, lo que explicaría los elevados porcentajes de remoción de los HTP (entre un 79% y un 88%) observados en los sistemas microcosmos con y sin viruta. Por otro lado, la ausencia de diferencias destacables observadas entre los sistemas CC y BIO, manifestaría en mayor medida la importancia de la incorporación de aire en los procesos de remoción de los HTP, similar a lo que ocurriría con la aplicación de una técnica de atenuación natural (Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles, 2005; Muskus Morales, A. M. *et al.* 2013), en relación a la bioestimulación de la microflora autóctona por incorporación de nutrientes en este tipo de suelos.

Los procesos de biorremediación más utilizados en campo son los de *landfarming* y las biopilas. Ambos son procesos que se basan en el aprovechamiento de la microflora autóctona mejorando sus condiciones con el agregado de nutrientes, la incorporación de aire o incluso el bioaumento. Además, se utilizan otros elementos como son el agregado de material orgánico entre capas para las biopilas y sobre la capa de base en el caso del *landfarming* que, además de cumplir una función estructurante, cumple una función de co-sustrato, lo que permite mejorar las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Pozzo Ardizzi, 2018). Este material orgánico suele estar compuesto por compost, estiércol o virutas de madera. Particularmente, en el presente trabajo se pretendió mejorar

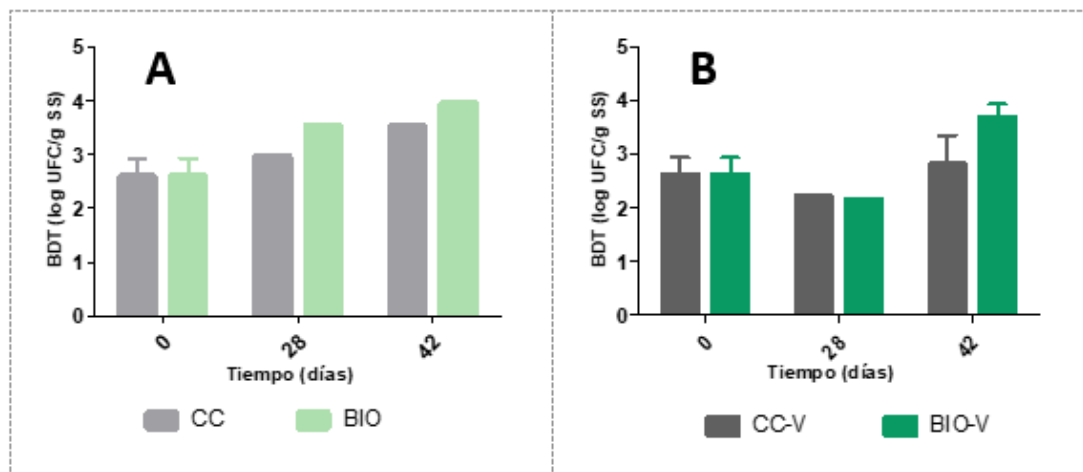
las condiciones de la estructura del suelo sin el aporte significativo de otros nutrientes, motivo por el cual se utilizó viruta de madera. Además, cabe mencionar que la estructura de los sistemas microcosmos sería similar a la estructura de una biopila (Pozzo Ardizzi, 2018), dado que primeramente se elaboraron en capas que posteriormente fueron mezcladas.

Figura 8. Recuento de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) expresado en escala logarítmica de UFC/g SS en función del tiempo en los sistemas control comunidad y bioestimulados (CC y BIO) (A) y control comunidad y bioestimulados con viruta (CC-V y BIO-V) (B)



Fuente: Elaborado por los autores

Figura 9. Recuento de bacterias degradadoras totales (BDT) expresado en escala logarítmica de UFC/g SS en función del tiempo en los sistemas control comunidad y bioestimulados (CC y BIO) (A) y control comunidad y bioestimulados con viruta (CC-V y BIO-V) (B)



Fuente: Elaborado por los autores

En este sentido, se pueden mencionar estudios del uso de *landfarming* realizados con suelos contaminados con incorporación de material de poda (similar a la viruta de madera) en donde se incrementaron los porcentajes de remoción de hidrocarburos en un

11,06% en relación a los sistemas sin el agregado de material orgánico en un período de 51 días (Ariza y Mejía Carrillo, 2017). Estudios realizados con biopilas reportaron porcentajes de remoción de un 68,7% para hidrocarburos de C-10 a C-40 en un período de 370 días (Kriipsalu y Nammari, 2010), y de entre un 83 y 96% de las fracciones alifáticas, aromáticas y asfalteno, y más del 55% para los compuestos isoprenoides, pristano y fitano presentes en petróleo crudo en un período de 150 días (Beskoski *et al.*, 2011). En relación a la aplicación de estas técnicas de biorremediación, los porcentajes de remoción de los hidrocarburos obtenidos en el presente trabajo se encuentran entre los esperados para los sistemas de biopilas, aunque empleando tiempos de proceso menores, similares a los utilizados en sistemas de *landfarming*.

En referencia a la aplicación de una técnica de atenuación natural con incorporación de agua y aire, se pueden mencionar niveles de degradación de hidrocarburos del 90% en períodos de tiempo de aproximadamente 60 días, lo que depende principalmente de las condiciones y características naturales del suelo y de las condiciones climáticas (Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles, 2005). De manera análoga, estos niveles de degradación de hidrocarburos serían similares al máximo porcentaje de remoción registrado en el presente trabajo (aproximadamente 88%) en los sistemas microcosmos utilizados como control comunidad (CC), a los cuales solamente se los mezcló cada 3 días y se les corrigió la humedad al 15% con agua destilada estéril.

4 CONCLUSIONES

Las propiedades intrínsecas del suelo y el historial de contaminación que presenta son factores fundamentales a la hora de plantear un proceso de remediación. En nuestro caso, por tratarse de una contaminación por hidrocarburos, se consideró la aplicación de un proceso de biorremediación.

Luego de la revisión de los resultados obtenidos pudimos observar que, en los sistemas evaluados se alcanzó una reducción significativa del contenido de los HTP, siendo del 88% para los sistemas sin agregado de viruta (CC y BIO) y del 79% para los sistemas con agregado de viruta (CC-V y BIO-V), con un valor cercano al 10% de incremento para los resultados obtenidos en el primer caso. El análisis de los demás parámetros corroboraría estos resultados ya que los mismos se mostraron acompañados por incrementos en la ABT y en el número de las BHAT y BDT en todos los casos.

Además, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas CC y BIO, y CC-V y BIO-V, indicando que los microorganismos presentes en este suelo estarían

adaptados a la presencia de los hidrocarburos, producto de la contaminación original, y que la aireación por mezclado combinado con la disponibilidad de agua, proveen condiciones suficientes para activar a la comunidad microbiana e incrementar la tasa de remoción de hidrocarburos. Además, sorprendentemente, el agregado de N y P no significó una ventaja para la población microbiana. Por lo tanto, se podría concluir que la aplicación de una técnica de bioestimulación no aportaría una ventaja en este tipo de suelos con el nivel de contaminación y el aparente grado de adaptación de la microflora autóctona.

Por otra parte, el agregado de la viruta de madera como mejorador de la estructura del suelo, de igual manera no aportaría una mejora destacable en el proceso de degradación de los HTP respecto de la incorporación de aire mediante un proceso de mezclado.

Estos resultados permitirían pensar en el posible desarrollo de un proceso que mejore las condiciones de aireación en este tipo de suelos, y en la aplicación de un proceso de bioaumento de la microflora autóctona con el objeto de favorecer en mayor medida la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con los siguientes subsidios: PID-UTN (2015) código: MSIFIBA0002419TC, PID-UTN (2019) código: MSUTNDN0005232 y SPU en su convocatoria de Universidad Agregando Valor (2018) código: VT42-UTN12060.

Los autores agradecemos a la UTN-FRN por permitirnos el uso del Laboratorio de Bioprocesos para el desarrollo de las actividades experimentales.

REFERENCIAS

1. Acuña, A.J., Pucci, O.H. y Pucci, G.N. (2008) *Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina*. Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas 17 (2): 85-93. www.registaecosistemas.net/articulo.asp?Id=548.
2. Acuña, A. J., Pucci, G. N., Herrera, G., y Pucci, O. H. (2009). *Efecto de la textura de los suelos de la Patagonia sobre el proceso de biodegradación de hidrocarburos*. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 104, 73-77.
3. Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J. y Pucci, O. (2010). *Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina*. Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología. 30: 29-36.
4. Adam, G y Duncan, H (2001). *Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils*. Soil biology and biochemistry, 33(7-8), 943-951
5. Araruna, J. T., Portes, V. L. O., Soares, A. P. L., Silva, M. G., Stel, M. S., Schramm, D. U., Tibana, S. y Vargas, H. (2004). *Oil spills debris clean up by thermal desorption*. Journal of Hazardous Materials, 110(1-3), 161-171.
6. Ariza, C. P y Mejia Carrillo, S. A. (2017) *Optimización del proceso de landfarming para mejorar la funcionalidad del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la adición de materia orgánica*. Scientific International Journal. Vol 14. N°3.
7. Benavides López de Mesa, J.; Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M. y García, J. M. (2006). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. Nova, 4(5), 82.
8. Beskoski V.P., Gojgic-Cvijovic G., Milic J., Ilic M., Miletic S., Solevic T. y Vrvic M.M. (2011). *Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) a field experiment*. Chemosphere 83(1): 34-40
9. Brutti, L., Beltrán, M. y García de Salamone, I. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales*. Ediciones INTA.
10. Chiriví Salomón J. S. (2020). *Biorremediación de hidrocarburos saturados y aromáticos policíclicos Chiriví*. En libros universidad nacional abierta y a distancia. Recuperado de: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/book/article/view/3991>
11. Conde Molina, D, Liporace, F y Quevedo C (2019). *Desarrollo de estrategias de biorremediación basadas en la mejora de la producción de biomasa a partir de cepas aisladas en suelos contaminados con hidrocarburos y su aplicación en tecnologías de biorremediación*. Brazilian Journal of Development. v.5, n.7, p. 10708-10727, jul. 2019 ISSN 2525-8761.

12. Coria, I. (2007). *Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Centro de Altos Estudios Globales, <http://www.sustentabilidad.uai.edu.ar/pdf/ing/UAIS-IGA-600-001>.
13. Corona-Ramírez, L., e Iturbe-Argüelles, R. (2005). *Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos*. Ingeniería, investigación y tecnología, 6(2), 119-126.
14. Delgadillo-Martínez, J., Ferrera-Cerrato, R. y Hernández-Ortega, H. A. (2016). *Composting in bio-piles for the clean-up of soils contaminated with petroleum hydrocarbons*. Agroproductividad, 9(8), 24-30.
15. Dibble, J. y Batha, R. (1979). *Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge*. Appl. Environ. Microbiol. 37: 729-739.
16. Fernandez Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Castillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., Reyes Ávila, R. J., Flores Hernández, D. y Arce Ortega, J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Mexicano del Petróleo.
17. González Rojas, E. H. (2014). *Concepto y estrategias de biorremediación. Inge@uan - tendencias en la ingeniería*. Recuperado a partir de <https://revistas.uan.edu.co/index.php/ingean/article/view/208>
18. Kao, C. M., Kota, S., Ress, B., Barlaz, M. A. y Borden, R. C. (2001). *Effects of subsurface heterogeneity on natural bioremediation at a gasoline spill site*. Water science and technology, 43(5), 341-348.
19. Kriipsalu M. y Nammari D. (2010). *Monitoring of biopile composting of oily sludge*. Waste Management and Research 28(5): 395-403.
20. Landriscini, G. S., Preiss, O. y Avellá, B. (2017). *El desarrollo reciente de los hidrocarburos en la cuenca neuquina: Cambios funcionales en el sistema urbano regional y localización industrial*. Facultad de Economía y Administración. UNCOMA 48, 1–16. Recuperado de: <Http://mundourbano.unq.edu.ar/index.php/ultimo-numero/276-el-desarrollo-reciente-de-los-hidrocarburos-en-la-cuenca-neuquina-cambios-funcionales-en-el-sistema-urbano-regional-y-localizacion-industrial>
21. Liporace, F; Conde Molina, D, Odobez, N. S y Quevedo C. (2019). *Aislamiento de microorganismos a partir de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación*. Brazilian Journal of Development. v.5, n.6, p. 4660-4674, jun. 2019 ISSN 2525-8761
22. Luis, R. J., Cruz, I., Luis, J., Guadalupe, M. P., Manuel, S. J., y Artículo, D. (2020). *Recuperación de un suelo contaminado por una mezcla de hidrocarburos Recovering of soil polluted by hydrocarbons mixing Resumen*. July.
23. Martínez Alvarez, L. M., Balbo, A. L., Mac Cormack, W. P., y Ruberto, L. A. M. (2015). *Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM)* Cold Regions Science and Technology, 119, 61-67.

24. Martínez Álvarez, L. M., Ruberto, L. A. M., Lo Balbo A, y Mac Cormack, W. P. (2017). *Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in antarctica*. Science of the total environment, 590–591, 194–203.
25. MINAM (2014). *Guía para muestreo de suelos*. Ministerio del ambiente. Recuperado de: https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/guia-muestreo-suelo_minam1.pdf
26. Ministerio de energía y recursos naturales. (04 de 11 de 2022). Ministerio de energía y recursos naturales. Obtenido de *Neuquén apunta a producir 700 mil barriles de petróleo por día*: <https://www.neuqueninforma.gob.ar/neuquen-apunta-a-producir-700-mil-barriles-de-petroleo-por-dia>.
27. Muskus Morales, A. M., Santoyo Muñoz, C. y Plata Quintero, L. S. (2013). *Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación- bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna*. Gestión y Ambiente, 16(2), 83–94. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/39565>
28. Ortínez Brito, O., Ize, I., y Gavilán, A. (2003). *La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México*. Gaceta Ecológica, (69), 83-92.
29. Peña Murillo, S. E., Zambrano Nevárez, E., Baquerizo Figueroa, J., Antón Loor, Á., y Soórzano Aldaz, K. (2019). *Nuevos sistemas de tratamientos de suelo contaminado por hidrocarburos*. Revista Ibérica de Sistemas e Tecnologías de Informação, (E21), 226-236.
30. Piehler, M., Swistak, J., Pinckney, J. y Paerl, H. 1999. *Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia*. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 69-78.
31. Pojmaevich, A., Demaría, I., Cruz, M., Pincheira, J., Camacho, A., Ruberto, LAM, y Busto, V. (2019). *Estudio de biodegradabilidad in vitro de hidrocarburos del petróleo en suelos contaminados de Catriel oeste (Cuenca Neuquina)*. Editorial Facultad de Agronomía.
32. Pozzo Ardizzi, M. G. (2018) *La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Capítulo 8. Biorremediación de los Recursos Naturales. INTA Ediciones. Colección Recursos.
33. Pucci, G. N., Acuña, A. J., y Pucci, O. H. (2011). *Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta*. Ingeniería Sanitaria y Ambiental 115(3), 36-41
34. Ruberto L.A.M., Mac Cormack, W.P., Giulietti. A.M. y Merini L. J. (2013). *Microcosms: A key tool for the scaling up of soil bio/phytoremediation processes*. En Advances in environmental research. Nova

35. Singh, AK y Cameotra, SS (2013). *Eficiencia de los biosurfactantes lipopeptídicos en la eliminación de hidrocarburos de petróleo y metales pesados del suelo contaminado*. Environ Sci Pollut Res 20 , 7367–7376. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1752-4>
36. US EPA 418.1. (1978). Method 418.1: petroleum hydrocarbons (spectrophotometric, infrared). Issued, 3.
37. Villacreses, L. (2011). *Evaluación de factores que afectan la medición de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante espectroscopia IR en suelos contaminados con petróleo intemperizado*. Conference: VI Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE-2011.