

BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO TROPICAL CONTAMINADO CON RESIDUOS ACEITOSOS INTEMPERIZADOS

Teresa Cristina FERREIRA DO NASCIMENTO¹, Fernando Jorge SANTOS OLIVEIRA²
y Francisca PESSOA DE FRANÇA^{3*}

¹ Departamento de Engenharia Bioquímica. Alumno de Doctorado en la Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

² Petróleo Brasileiro S.A - PETROBRAS, Brasil

³ Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química, DSc, Tecnología de Procesos Químicos y Bio-químicos, Universidad Federal do Rio de Janeiro

*Autor responsable: fpfranca@eq.ufrj.br

(Recibido agosto 2011, aceptado noviembre 2012)

Palabras clave: biorremediación, biodegradación, residuos aceitosos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, suelo intemperizado

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la biorremediación de un suelo de clima tropical, contaminado con residuos aceitosos intemperizados. Fueron ensayadas tres concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) iniciales: 15.3, 19.0 y 29.2 g/kg de suelo. Los ensayos fueron llevados a cabo en 60 días, monitoreando los siguientes parámetros: humedad, pH, concentración de bacterias heterotróficas totales (BHT), hongos totales (HT), hidrocarburos totales de petróleo (HTP) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): benzo(a)pireno (BaP) y criseno (CHR). La concentración inicial de los HTP influyó inversamente la biodegradación: 84, 72 y 55 %, respectivamente, en 60 días. El aumento de la concentración inicial de HTP también influyó negativamente la degradación del CHR, no siendo observado efecto alguno en la degradación del BaP.

Key words: bioremediation, biodegradation, oily residues, polycyclic aromatic hydrocarbons, intemperized soil

ABSTRACT

This study evaluates the bioremediation of a tropical soil from tropical climate, contaminated with weathered oily residues. Three initial concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH) were tested: 15.3, 19.0 and 29.2 g/kg of soil. The experiments were conducted over 60 days, by monitoring the following parameters: moisture, pH, concentration of total heterotrophic bacteria, total fungi, total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon: benzo(a) pyrene (BaP) and chrysene (CHR). The initial concentration of TPH inversely influenced biodegradation: 84, 72 and 55 % respectively, during 60 days. By increasing the initial concentration of TPH, the degradation of CHR was also influenced; however, no effect on the degradation of BaP was observed.

INTRODUCCIÓN

El sector del petróleo y del gas natural genera varios residuos peligrosos y, entre estos, los residuos empetrolados que pueden presentar compuestos tóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y ser inflamables. Los residuos empetrolados son generados en las operaciones normales de las unidades, en las paradas para mantenimiento y en los casos de emergencia ambiental, incrementando su cantidad. La gestión ambiental de los residuos con miras a minimizar los efectos adversos de los eventos de contaminación ambiental por residuos aceitosos, el desarrollo sostenible y los costos relacionados con las operaciones de almacenamiento, transporte y tratamiento de los residuos son preocupaciones actuales, tanto del sector industrial, como del sector académico.

La incorporación de residuos aceitosos en un suelo constituye una ruta para el tratamiento de estos materiales; sin embargo, cuando es mal conducida genera pasivos ambientales. Los derrames de petróleo crudo y sus derivados y el almacenamiento inadecuado de residuos también aumentan el valor de lo que corresponde a pasivos ambientales del sector del petróleo y del gas natural, impulsando investigaciones para el desarrollo de alternativas efectivas, tanto desde el punto de vista técnico como desde el punto de vista económico.

La biorremediación de suelos contaminados es una técnica de tratamiento que tiene como objetivo utilizar el potencial de la micro biota autóctona o exógena, para degradar los compuestos orgánicos constituyentes de los residuos, con la consecuente disminución de la toxicidad. Esta tecnología está influenciada por factores internos y externos. Entre los factores internos se destaca el genotipo de los microorganismos y entre los externos, la temperatura, la aireación, el tipo y la concentración de los contaminantes, su grado de intemperismo, así como las fuentes y las concentraciones de los macronutrientes (Huang *et al.* 2004, Zahed *et al.* 2010). Esta tecnología es, en general, eficiente y económica cuando se compara con las alternativas físicas y fisicoquímicas convencionales de tratamiento de suelos (Oliveira y de França 2005).

Se ha realizado estudios buscando la biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos como una función de factores externos, como el tipo y la concentración de fuentes de N y de P, el pH y la presencia de surfactantes (Venosa y Zhu 2003, Das *et al.* 2008). Por otra parte, se encuentran pocos estudios sobre el efecto del intemperismo de los residuos

empetrolados en los suelos, en especial suelos de clima tropical, y de la concentración de estos residuos intemperizados sobre la biorremediación (Trindade *et al.* 2005). Esto aún a sabiendas que este es un problema contemporáneo para los países en desarrollo, considerando el número de áreas contaminadas abandonadas y los aspectos de sostenibilidad, salud y ambiente.

Las consideraciones ambientales y económicas dieron impulso a la elaboración de esta investigación, la cual buscó verificar la eficacia de la biorremediación de un suelo tropical contaminado con distintas concentraciones de residuos aceitosos intemperizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

El suelo utilizado en este estudio es proveniente de un área de *landfarming* usada para el tratamiento de residuos aceitosos de la industria de petróleo y gas, y recibió residuos petrolizados hace un poco más de cinco años. Este sitio está cerca de la línea del ecuador. Se registran, en el área, temperatura media de 27 °C, humedad relativa entre 75 y 86 % y precipitación entre 1750 y 2500 mm. De acuerdo con estos datos, el área es típica de un clima tropical.

Para ejecutar el muestreo de suelo el área del *landfarming* fue dividida en tres lotes justificando las tres diferentes concentraciones de HTP observadas. El suelo, fue colectado de siguiendo la normativa brasileña vigente, ABNT NBR (10004). Las muestras de suelo utilizadas para los ensayos de biorremediación fueron acondicionadas en cajas de cloruro de polivinilo (PVC), con capacidad para 20 litros y refrigeradas a 4 ± 1 °C, con el fin de realizar los ensayos de biotratamiento.

Granulometría, humedad, pH y capacidad de retención de agua (CRA)

La distribución granulométrica del suelo fue ejecutada de acuerdo con la Norma Brasileña (ABNT NBR 7180 1984), que corresponde a la homogeneización de la muestra, secado al aire, paso por una serie de tamices y finalmente, sedimentación de los granos en solución de orto-polifosfato de sodio. La humedad fue determinada mediante el uso de crisoles de porcelana y un analizador de humedad por infrarrojo, Gehaka, mod. IV-2000, hasta peso constante. Los valores de pH de los suelos fueron determinados mediante suspensiones en agua destilada. Se utilizó el procedimiento descrito por Embrapa (1979), con potenciómetro Digimed, mod. DM-20. La CRA de

las muestras de suelos fue determinada siguiendo la metodología descrita por Watwood *et al.* (1991). Las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

Hidrocarburos totales de petróleo (HTP) y HAP

Para la determinación de HTP y sus fracciones fue utilizada la metodología USEPA 8015, que determina compuestos orgánicos no halogenados a través de cromatografía gaseosa, acoplada a un detector de ionización de llama. Los extractos orgánicos fueron obtenidos siguiendo el método USEPA 3540C (*Soxhlet extraction*) y la preparación previa a la cromatografía siguió el método USEPA 3630C (*Silica gel cleanup*). Los valores de HTP consideran los resultados de HTP en las fracciones de gasolina, querosén, diesel y aceite combustible, así como la fracción no resuelta en el cromatograma.

Fueron determinados los tenores de criseno (CHR) y de benzo(a)pireno (BaP) por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, de acuerdo con el método USEPA 8270 C.

Los extractos orgánicos fueron obtenidos siguiendo el método USEPA 3540C y la preparación previa a la cromatografía siguió el método USEPA 3630C. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Cuantificaciones microbianas

Las cuantificaciones de los grupos microbianos, bacterias heterotróficas totales y hongos totales en las muestras de suelo fueron llevadas a cabo utilizando la Técnica *Pour Plate*. Se agregaron 10 g de suelo a 90 mL de solución salina (NaCl al 0.9 %) y se promovió la agitación en batidora (Tecnal - TE-420) por 15 minutos a 150 rpm. Alícuotas de 1 mL fueron sometidas al procedimiento de diluciones decimales sucesivas, cultivadas en medio de cultivo específico para cada grupo microbiano. Para la cuantificación de hongos se utilizó el medio agar Sabóraud (Vetec, Río de Janeiro, Brasil), con 2 % de glucosa y suplementado con ampicilina 50 mg/L (Cimed, Pouso Alegre Brasil). Para la cuantificación de bacterias se utilizó el medio agar nutriente (Merck, Darmstadt, Alemania), suplementado con nistatina, 50 mg/L (Teuto, Anápolis, Brasil). Las placas fueron incubadas en estufa bacteriológica a 30 ± 1 °C, por 48 horas para el crecimiento y conteo de bacterias y por 120 horas para el crecimiento y conteo de hongos. Después de ese periodo los resultados fueron expresados en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g de suelo). Todas las determinaciones y experimentos fueron realizados por triplicado.

Biorremediación

Los ensayos de biodegradación fueron realizados en reactores de polietileno con dimensiones de 20 cm \times 20 cm \times 10 cm (largo, ancho, alto). Cada reactor fue alimentado con 2 kg de suelo contaminado y se procuró mantener las mismas condiciones de humedad en todos los reactores, fracción de 70-80 % de la capacidad de retención de agua, correspondiendo a valores de humedad entre 20 a 25 %. Cada uno de los tres ensayos de biorremediación fue realizado por triplicado, totalizando nueve tratamientos.

Para el monitoreo del bioproceso fueron vigilados los siguientes parámetros: humedad, pH, concentración de bacterias heterotróficas totales (BHT), hongos totales (HT), hidrocarburos totales de petróleo (HTP) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): benzo(a)pireno (BaP) y criseno (CHR). Todos los resultados analíticos son presentados como la media de tres ensayos.

Los resultados de las medias de biodegradación de HTP (en un delineamiento completamente casualizado) fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, a 5 % de significancia. En todos los casos, los análisis estadísticos fueron realizados con el auxilio del programa computacional *Statistica*, versión 5.5 (Statsoft Inc).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de algunos parámetros de la caracterización física y química del suelo se presentan en el **cuadro I**. Se trata de un suelo con 28 % de materiales finos. Considerando que las arcillas y limos presentan elevada área superficial, los fenómenos de adsorción de los contaminantes en esos materiales son bastante favorecidos, lo cual dificulta el proceso de solubilidad de esas moléculas y, por consiguiente,

CUADRO I. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO

| Parámetro | Resultado |
|----------------------------|-----------------|
| pH (en H ₂ O) | 6.9 \pm 0.2 |
| Arcilla (%) | 13 \pm 1 |
| Limo (%) | 25 \pm 2 |
| Arena Fina (%) | 18 \pm 1 |
| Arena Media (%) | 28 \pm 2 |
| Arena Gruesa (%) | 12 \pm 1 |
| CRA (%) | 32 \pm 1 |
| P total (mg P/kg de suelo) | 16 \pm 1 |
| N total (mg N/kg de suelo) | 680 \pm 50 |
| HTP (mg/kg de suelo) | 29179 \pm 450 |

la biodegradación. Por otro lado, el suelo presentó un porcentaje importante de materiales arenosos, 58 %, que puede favorecer la biodegradación por una mejor transferencia de masa del oxígeno del aire atmosférico y el suelo, debido a la porosidad (Marin *et al.* 2005, Trindade *et al.* 2005). El pH próximo a la neutralidad se considera adecuado para la actividad de degradación de hidrocarburos por bacterias y hongos (Franco *et al.* 2004). La CRA, aproximadamente del 30 %, es compatible con suelos limosos, así como también el pH levemente ácido que es coincidente con la presencia de minerales de arcillas, concordando con los resultados granulométricos.

En los cromatogramas fueron detectados compuestos orgánicos en la fracción de gasolina (HTP GRO) 5 %, de diesel (HTP DRO) 5 %, y de lubricantes (HTP ORO) 90 %. La poca concentración de compuestos de cadenas menores indica, conjuntamente con la ausencia de compuestos lineares resueltos y a la elevación de la línea de base, el proceso de intemperismo de los residuos, incrementando la resistencia del residuo y la dificultad para el biotratamiento. El intemperismo se refiere al resultado de procesos químicos, biológicos y físicos sobre el residuo, que pueden afectar el tipo de compuestos que permanecen en el suelo. Las muestras presentaron HTP inicial de 15.3, 19.0 y 29.2 g/kg de suelo y estas elevadas concentraciones del contaminante dificultan aún más la biorremediación, conforme lo reportado por Del'Arco y de França (2001).

En todos los ensayos de biorremediación el pH inicial del suelo fue de aproximadamente 6.9 ± 0.1 decayendo a 6.2 ± 0.1 a lo largo de los 60 días del proceso. El metabolismo de las fracciones leves y pesadas de petróleo produce diversos tipos de ácidos orgánicos que pueden reducir el pH del suelo y este hecho da evidencias de una microbiota metabólicamente activa (Watson *et al.* 2002).

Durante los ensayos, la humedad de los suelos fue mantenida entre 70 y 80 % de la capacidad de retención de agua; intervalo considerado ideal para los procesos de biodegradación de acuerdo con Ramírez *et al.* (2009). Estos valores de humedad fueron mantenidos ya que se encuentran en la fracción óptima que favorece el proceso de biodegradación aeróbica de hidrocarburos en suelos ya que la humedad en exceso puede dificultar la dispersión del oxígeno (Marin *et al.* 2005). Las temperaturas de los suelos no fueron controladas para reducir costos de proceso y se mantuvieron en 30 ± 2 °C. De acuerdo con Oliver y Magot (2005), en temperaturas entre 25 °C y 30 °C se desarrolla una gran variedad de

especies de microorganismos capaces de oxidar hidrocarburos. Muchos ensayos de laboratorio han demostrado que la biodegradación de hidrocarburos por microorganismos ha sido llevada a cabo de manera más conforme con temperaturas en el intervalo de 20 a 35 °C (Stempwort y Biggar 2008).

Las pérdidas abióticas fueron estimadas como menores al 10 % y, en las condiciones establecidas en esta investigación, posiblemente son el resultado de la volatilización y fotooxidación, como describe la literatura consultada (Imfeld *et al.* 2009).

La evolución de la biodegradación de los HTP del suelo disminuyó con el aumento de los niveles de contaminación (**fig. 1**). En 30 días de proceso, la degradación en todos los bioreactores conteniendo 15.3 o 19 g/kg alcanzó el mismo nivel, aproximadamente 55 %, indicando que había una tolerancia de los microorganismos autóctonos a estos niveles de contaminación. En este mismo período, la biodegradación de los contaminantes fue 10 % menor en cuanto se operó con el nivel de contaminación de 29 g/kg que alcanzó 45 % de remoción solamente a los 60 días de proceso. Esta menor actividad microbiana está probablemente relacionada con la susceptibilidad de algunas cepas al contaminante. En 60 días, solamente en los ensayos con suelo conteniendo 15.3 y 19.0 g/kg fueron alcanzados HTP residuales por debajo del límite de intervención estipulado por la Legislación Brasileña para suelos en áreas industriales, que es de 5 g/kg de suelo (Brasil 2009).

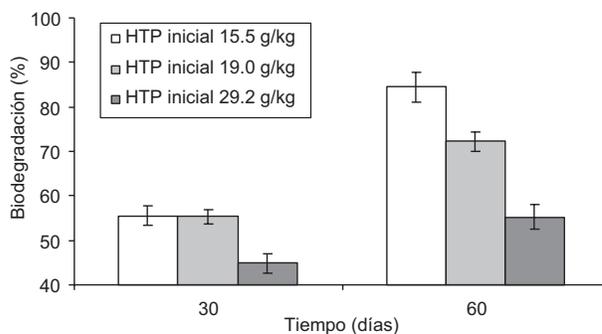


Fig. 1. Porcentaje de biodegradación de HTP, en 30 y 60 días de proceso, en los ensayos de biorremediación con HTP inicial 15.3, 19.0 y 29.2 g/kg de suelo

El análisis del perfil cromatográfico de los estratos de los suelos permite verificar que, en las tres condiciones estudiadas, los compuestos en la fracción de HTP GRO fueron totalmente biodegradados y que la degradación del HTP ORO fue superior a 50 %, a pesar de ser considerado resistente, indicando la adaptación de la microbiota nativa.

Trindade *et al.* (2005) estudiaron la biodegradación de petróleo crudo y petróleo crudo intemperizado en suelo tropical y verificaron que la facilidad con que los hidrocarburos pueden ser removidos de los suelos varía inversamente con el intemperismo del contaminante. Del’Arco y de França (2001) trabajaron en la biorremediación con suelo arenoso contaminado con petróleo árabe liviano, en concentraciones de HTP no superiores a 14 g/kg de suelo, debido a los efectos inhibidores del contaminante. En el presente trabajo, la concentración de hidrocarburos de aproximadamente 29 g/kg de suelo tropical estudiado no fue inhibidora, revelando la importancia de la realización de estudios específicos para cada sistema y el potencial de la microbiota autóctona de los suelos. Dado que fue utilizado suelo de un área de *landfarming* para tratamiento de residuos aceitosos, la microbiota del suelo ya estaba adaptada, contribuyendo a la remoción de los hidrocarburos intemperizados.

El comportamiento de los micro-organismos revela informaciones respecto de la presencia o ausencia de las variables de la biodegradación y, además, la interpretación de los resultados es de un valor considerablemente importante para el entendimiento del

proceso (Pala *et al.* 2006). La concentración inicial de BHT y HT totales fue similar en todos los ensayos (Fig. 2a y 2b). En la mayoría de los ensayos las concentraciones de BHT y de HT alcanzaron valores máximos en siete días de proceso, disminuyendo a lo largo del tiempo y alcanzando las menores concentraciones microbianas en 30 días de proceso, pero en valores comparables a los reportados en la literatura consultada para suelos impactados con petróleo y sus derivados (Oliveira y de França 2005). El análisis de las figuras 2a y 2b, conjuntamente con la figura 1, permite además concluir que el suelo impactado no tenía concentración inhibidora de macronutrientes (N y P), que son elementos importantes para la producción de biomasa y, por lo tanto, biodegradación en condiciones aeróbicas, provocada por la agitación del suelo en los ensayos. Se verifica además que la presencia de mayores concentraciones del contaminante provocó la reducción de la concentración de HT y de BHT a lo largo del proceso; sin embargo, el perfil de las curvas se mantuvo. En los ensayos llevados a cabo con HTP inicial de 29.2 g/kg fueron obtenidas las menores concentraciones de HT, a partir de 30 días de proceso, sin comprometer la biodegradación de los

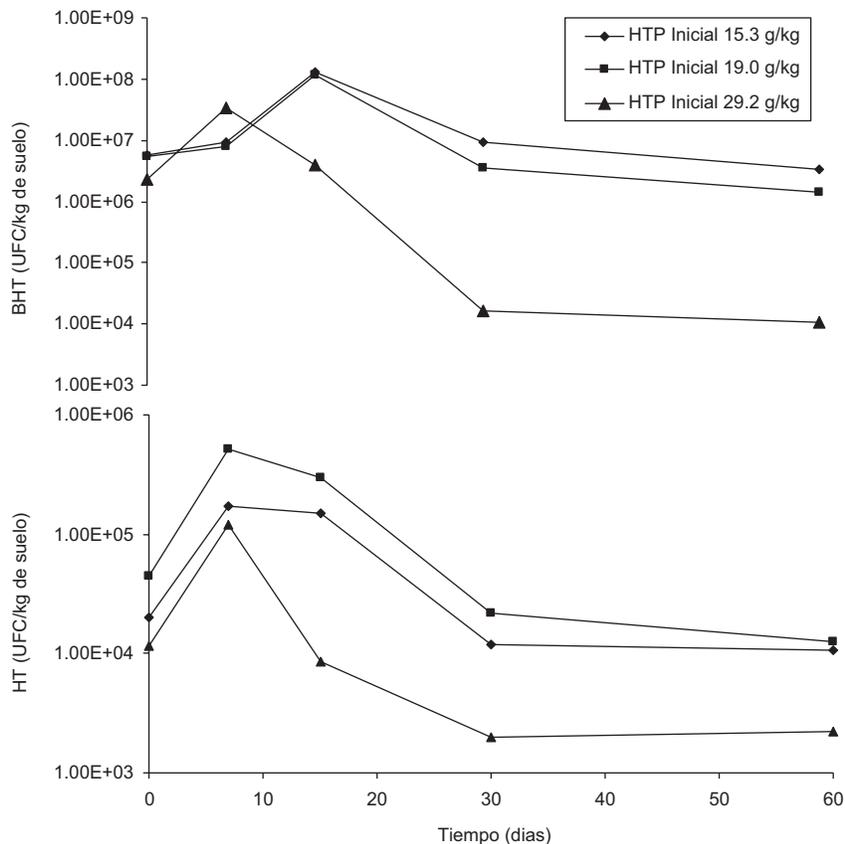


Fig. 2. Evolución del crecimiento microbiano durante la biorremediación (a) BHT; (b) HT

contaminantes. Esto corrobora lo expresado por Pérez-Armendáriz *et al.* (2010) y por Tortella *et al.* (2005) que reportan hongos filamentosos como microorganismos con elevado potencial hidrocarbonoclástico, principalmente en la degradación de las fracciones más pesadas del petróleo, como aquellas predominantes en los residuos aceitosos. La reducción de las concentraciones de los grupos microbianos monitoreados puede también ser atribuida a la reducción o agotamiento de los nutrientes requeridos para la asimilación del carbono (Ballaminut y Matheus 2007).

En el **cuadro II** se encuentran los resultados de las comparaciones múltiples de las medias de biodegradación de HTP en 30 y en 60 días de proceso. En 30 días, el ANOVA indicó que la diferencia mínima significativa para la biodegradación fue 5.34 % con un desvío estándar de 2.13. La prueba Tukey comprobó, con base en las comparaciones múltiples de las medias, para $p < 0.05$, que la biodegradación es diferente sólo entre los dos niveles más altos de concentración de HTP estudiados. Sin embargo, en dicho periodo de tiempo el suelo no pudo ser clasificado como tratado, con base en la legislación brasileña.

CUADRO II. PRUEBA DE TUKEY, DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS

| HTP inicial (g/kg de suelo) | MSB* | |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| | 30 días | 60 días |
| 15.3 | 54.93 a** | 83.83 c** |
| 19.0 | 55.03 a** | 71.97 d** |
| 29.2 | 45.07 b** | 55.28 e** |

Nota: *MSB – media significativa de la biodegradación ($p < 0.05$)
** Letras minúsculas distintas, en cada columna, indican medias significativamente diferentes

El ANOVA, realizado con los datos de biodegradación en 60 días, llevó a un valor de diferencia mínima significativa para la biodegradación de 7.16 %, con un desvío estándar de 2.86 %. Complementariamente, con el conjunto de datos obtenidos con la prueba de Tukey, es posible verificar que en este periodo de tiempo las biodegradaciones porcentuales obtenidas son estadísticamente diferentes, a un nivel de significancia de 5 %. De esta manera, está confirmando que la concentración inicial del contaminante influyó a la biodegradación de los hidrocarburos, tanto a los 30 como a los 60 días de proceso. Nuestros resultados corroboran aquellos reportados por Del'Arco y de França (2001) e indican la importancia del control de la concentración inicial de HTP para el éxito del

tratamiento. Se verifica además, que la biodegradación es inversamente proporcional a la concentración inicial del contaminante, probablemente por la inhibición del metabolismo celular y formación de intermediarios tóxicos (Alexander 1999, Del'Arco y de França 2001).

La biorremediación también fue analizada con relación a la biodegradación de los HAP CHR y BaP (**Cuadro III**). El análisis del cuadro permite verificar que el aumento de la concentración inicial de hidrocarburos en el suelo influyó negativamente en la biodegradación del CHR, no siendo observado efecto en la degradación del BaP. Los HAP son compuestos tóxicos y moléculas de interés ambiental en suelos impactados (Jaques *et al.* 2007). Su biodegradación depende de muchos factores como biodisponibilidad, muy influenciada por la matriz del suelo y el intemperismo del contaminante. El CHR posee cuatro anillos aromáticos en cuanto que el BaP posee cinco anillos condensados y, por lo tanto, mayor peso molecular. Varios estudios comprueban que los HAP de alto peso molecular son menos biodegradables cuando son comparados con los de menor masa molecular (Alexander 1999, Vasconcelos *et al.* 2011). Otro hecho que se debe considerar es el intemperismo del suelo que aumenta la adsorción de contaminantes orgánicos hidrofóbicos, como los HAP en la matriz sólida, disminuyendo la velocidad y la extensión de la biodegradación. Como consecuencia, después de un período inicial de tratamiento, la concentración de algunos HAP puede tender a estabilizarse en un valor residual, como lo observado para el caso del BaP. Una de las hipótesis más aceptadas propone que los fenómenos de transferencia de contaminantes constituyen la etapa limitante del bioproceso (Nocentini *et al.* 2000). En tales situaciones, la concentración residual del contaminante depende mayormente de las partículas finas de los suelos y del intemperismo del contaminante.

CUADRO III. BIODEGRADACIÓN DEL CRISENO Y DEL BENZO(A)PIRENO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE HTP EN EL SUELO

| HTP inicial (g/kg de suelo) | Biodegradación (%) | |
|--------------------------------|--------------------|--------------|
| | CHR | BaP |
| 15.3 | 66 ± 5 (6.9) | 37 ± 4 (3.5) |
| 19.0 | 53 ± 4 (7.3) | 29 ± 2 (4.5) |
| 29.2 | 19 ± 2 (7.8) | 35 ± 3 (8.1) |

Nota: Los números presentados entre paréntesis son de la concentración inicial media del HAP, en mg/kg

CONCLUSIÓN

Los resultados de biodegradación de HTP encontrados son alentadores y revelan el éxito del biotratamiento propuesto para tratamiento de los suelos impactados con altas concentraciones de residuos aceitosos intemperizados. El aumento de la concentración inicial de hidrocarburos totales influyó negativamente. Al final de 60 días de bioproceso, los suelos con las dos concentraciones menores ensayadas de HTP inicial fueron considerados tratados, de acuerdo con la Legislación Brasileña (HTP < 5 g/kg). La concentración inicial de HTP también influyó negativamente en la biodegradación del CHR, no siendo observado efecto en la degradación del BaP, probablemente debido a la biodegradación preferencial de los HAP de menor peso molecular, sumado al intemperismo del suelo estudiado, contribuyendo la adsorción de este compuesto en las partículas finas del suelo, dificultando la biodegradación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) y a PETROBRAS por el apoyo financiero.

REFERENCIAS

- ABNT (1984) *Solo: análise granulométrica*, NBR 7180. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Río de Janeiro, 13 p.
- ABNT (2004) *Resíduos Sólidos: classificação*, NBR 10004. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Río de Janeiro, 77 p.
- Alexander M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, 239 pp.
- Ballaminut N. y Matheus D. R. (2007). Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Braz. J. Microbiol.* 38, 248-252.
- Brasil (2009). *Resolução nº 420 de 28 de dezembro de 2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente*, Brasília DF, 16 p.
- Das P., Mukherjee S. y Sen R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 72, 1229-1234.
- Del'Arco J.P. y de França F.P. (2001). Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environ. Pollut.* 110, 515-519.
- EMBRAPA (1979). *Manual de métodos de análise de solo. SNLCS*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Río de Janeiro, 212 pp.
- Franco I., Contin M., Bragato G. y de Nobili M. (2004). Microbial resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma* 121, 17-30.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R. y Grenberg B.M. (2004). Responses of three grass species to cresote during phytoremediation. *Environ. Pollut.* 130, 453-464.
- Imfeld G., Braeckevelt M., Kusch P. y Richnow H.H. (2009). Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74, 349-362.
- Jacques R.J.S., Bento F.M., Antonioli Z.I. y Camargo, F.A.O. (2007). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural* 37, 1192-1201.
- Marín J. A., Hernandez T. y Garcia C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98, 185-195.
- Nocentini M., Pinelli D. y Fava F. (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, 1115-1123.
- Oliveira F.J.S. y de França F.P. (2005). Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124, 593-603.
- Olivier B. y Magot M. (2005). *Petroleum Microbiology*. ASM Press, Washington D.C., 365 pp.
- Pala D.M., de Carvalho D.D., Pinto J.C. y Sant'anna Jr. G.L. (2006). A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 58, 254-260.
- Pérez-Armendáriz B., Martínez-Carrera D., Calixto-Mosqueda M., Alba J. y Rodríguez-Vázquez R. (2010). Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 26, 193-199.
- Ramírez M.E., Zapién.B., Zegarra H.G., Rojas N.G. y Fernández, L.C. (2009). Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 347-353.
- Stempvoort D.V. y Biggar K. (2008). Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: a review. *Sci. Technol.* 53, 16-41.

- Tortella G.R., Diez M.C. y Durán N. (2005). Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 197-212.
- Trindade P.V.O., Sobral L.G., Rizzo A.C.L., Leite S.G.F. y Soriano A.U. (2005). Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soil from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58, 515-522.
- USEPA (1996). Soxhlet extraction, v. I-B. Method 3540C. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 8 pp.
- USEPA (1996). Silica gel clean-up, I-B. Method 3630C. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 15 pp.
- USEPA (1996). Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography/Flame Ionization Detector. Method 8015B. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 37 pp.
- USEPA. (1996). Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Method 8270C. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 72 pp.
- Vasconcelos U., Oliveira F.J.S. y de França F.P. (2011). Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Quim. Nova* 34, 218-221.
- Venosa A.D. y Zhu X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci. Technol. Bull.* 8, 163-178.
- Watson J. S., Jones D. M., Swannell R.P.J. y Van Duin, A.C.T. (2002). Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes. *Org. Geochem.* 33, 1153-1169.
- Watwood M.E., White C.S. y Dahn C.N. (1991). Methodological modifications for accurate and efficient determination of contaminant biodegradation in unsaturated calcareous soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 717-720.
- Zahed M.A., Aziz H.A., Isa M.H. y Mohajeri L. (2010). Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude oil contaminated seawater. *Int. J. Environ. Res.* 4, 655-664.