

DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ACEITE LUBRICANTE RETENIDOS EN BENTONITA USANDO EL CONSORCIO BACTERIANO OIL EATING MICROBES (*RODHOCOCUS, PSEUDOMONAS Y BACILLUS*)*

JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES**

Universidad Nacional de Ingeniería,
Facultad de Petróleo, Petroquímica y Gas Natural, Lima, Perú
<https://orcid.org/0000-0003-3104-3938>

OSIRIS FELICIANO MUÑOZ

Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Facultad de Ingeniería,
Lima, Perú
<https://orcid.org/0000-0002-8883-6907>

ROBERTO ROBLES CALDERÓN

Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Facultad de Química e Ingeniería Química, Lima, Perú
<https://orcid.org/0000-0002-7077-5085>

Recibido: 16 de junio del 2022 / Aceptado: 4 de julio del 2022

doi: <https://doi.org/10.26439/ing.ind2022.n43.6111>

RESUMEN: Los aceites que se utilizan como lubricantes en maquinaria, vehículos o equipos industriales se deterioran con el uso, es decir, pierden sus propiedades por efecto de las condiciones medioambientales, lo que da lugar a la formación de ácidos y compuestos de oxidación que pueden ser corrosivos y son considerados residuos peligrosos. Esta investigación busca determinar el rendimiento de la biodegradación del aceite lubricante automotriz usado utilizando el consorcio bacteriano oil eating microbes (*Rhodococcus, Pseudomonas y Bacillus*). Este se cuantificó por medio de la reducción de la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) presentes en la

* Todos autores han contribuido con la misma intensidad en el diseño, obtención de datos, análisis, revisión crítica de su contenido y aprobación final de la versión publicada.

** Correos electrónicos en orden de aparición: jchirre@fip.uni.edu.pe; ofelicianom@unmsm.edu.pe; rroblesc1@unmsm.edu.pe

bentonita en cuatro pruebas experimentales. Se obtuvo como resultado la disminución de HTP en un 57 %, en las siguientes condiciones de operación del proceso: T = 35 °C, pH = 7,0, agitación mecánica = 120 rpm, dilución de la arcilla contaminada en agua en una relación de 1 (arcilla) : 3 (agua).

PALABRAS CLAVE: biodegradación / aceites usados / dilución / bentonita

DETERMINATION OF THE PERFORMANCE OF BIODEGRADATION OF LUBRICANT OIL RESIDUES RETAINED IN BENTONITE USING THE OIL EATING MICROBES (*RODHOCOCUS*, *PSEUDOMONAS*, AND *BACILLUS*) BACTERIAL CONSORTIUM

ABSTRACT: Oils used as lubricants in machinery, vehicles, or industrial equipment deteriorate with use; that is, they lose their properties due to the effect of environmental conditions; and acids and oxidation compounds, that can be corrosive and are considered hazardous waste, are formed. This research seeks to determine the biodegradation performance of used automotive lubricating oil by the Oil Eating Microbes (*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*) bacterial consortium quantifying the total petroleum hydrocarbons (TPH) retained in bentonite in four experimental tests. A 57 % TPH decrease was obtained in the following conditions: T = 35 °C, pH = 7,0, mechanical agitation = 120 rpm, and dilution of the contaminated clay in water in a ratio of 1 (clay) : 3 (water).

KEYWORDS: biodegradation / waste oils / dilution / bentonite

1. INTRODUCCIÓN

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes que afectan el medio ambiente mediante reacciones biológicas que permiten obtener productos inocuos como biomasa, dióxido de carbono y agua (Rahman et al., 2001).

De entre todos los tipos de contaminantes, los hidrocarburos son los que han mostrado mejores resultados en la aplicación de la tecnología de la biorremediación (Rosenberg et al., 1992).

Los isoprenoides y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados en mayor tiempo que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo —por tanto, su peso molecular—, aumenta su resistencia a la biodegradación (Prince, 2005). La actividad metabólica del consorcio bacteriano es afectada por la limitación de oxígeno (Eriksson y Weisner, 1999).

Las bentonitas, consideradas como suelos arcillosos montmorilloníticos, son altamente plásticas y expansivas (Duque y Escobar, 2002, pp. 1-8); se utilizan como medio filtrante para decolorar el aceite lubricante de origen mineral usado, proceso del que se obtiene como residuo la arcilla bentonita contaminada, cuyo residuo contaminante puede ser removido mediante la biodegradación de hidrocarburos con microorganismos. En este proceso los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad), así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. (Mac Naughton et al., 1999; Haritash y Kaushik, 2009).

Vallejo et al. (2005) estudiaron la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en suelos contaminados con petróleo y evaluaron el efecto de la adición de nutrientes como nitrógeno, fósforo y fertilizantes para la biodegradación de HTP. Este estudio se realizó durante 125 días con cinco eventos de muestreo, se evaluaron pH, porcentaje de humedad y nutrientes y se hizo un recuento en placas de microorganismos heterótrofos; de ello se obtuvo una tasa de degradación de 39 % a 41 % por el método D-5831 y por el método de *mechanical agitation and gravimetric determination*.

Buendía (2013), en su tesis sobre la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol, señala que obtuvo como resultados de la dosificación del suelo por hidrocarburos, estiércol y aserrín una disminución en promedio de 22,5 % del contenido de hidrocarburos en el suelo; empleando solo estiércol, este disminuyó 16,5 % y usando solamente aserrines, disminuyó 9,6 %.

Juhasz y Ravendra (2000) publicaron un artículo sobre la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH por sus siglas en inglés) que ha dado lugar al aislamiento de numerosos géneros de bacterias, hongos y algas capaces de

degradar los PAH de bajo peso molecular (compuestos que contienen tres o menos anillos de benceno fusionados).

Gouda et al. (2008) publicaron un artículo que se basa en la biorremediación del querosene II en la arcilla. Más del 90 % del querosene fue biodegradado en los procesos de bioaumentación y bioestimulación. Se utilizó urea al 46 % y superfosfato al 15,5 % como fuentes de nitrógeno y fósforo, debido a su bajo costo y su disponibilidad local. En este estudio se utilizaron cepas bacterianas de *Pseudomonas* sp. AP y *Pseudomonas* sp. CK. La otra cepa se identificó como *Gordonia* sp. DM 16S ARNr.

Gutiérrez et al. (2022) llevaron a cabo un estudio sobre la degradación por sustrato residual de *Agaricus bisporus* a nivel microcosmos que se desarrolló en México, en suelos contaminados por hidrocarburos. Dicha investigación tuvo como objetivo determinar la biodegradación de diésel en un suelo agrícola utilizando sustratos residuales (SR) de *Agaricus bisporus*. Se utilizó suelo contaminado con 7039 ppm de diésel con diferentes dosis de SR, incubados por 28 días a 37 °C. Se cuantificó la producción de CO₂, biodegradación de diésel, población inicial y final de hongos, así como actividad enzimática específica de lacasas inicial y final. El tratamiento presentó el mayor porcentaje conseguido hasta ahora de biodegradación de diésel (68,747 %) y una producción acumulativa final de $6,144 \times 10^{-4}$ mmol CO₂/m³.

Díaz-Borrego et al. (2017) estudiaron el tratamiento de aguas contaminadas con diésel del puerto de Isla de Toas (Venezuela) y evaluaron la utilización de un consorcio microbiano autóctono (*Chlorella* spp.) en dos tratamientos (T1: bioestimulado y T2: bioaumentado) y un control por 70 días, a escala de 20 L y condiciones ambientales controladas. Durante los ensayos monitorearon la temperatura, el pH, la demanda química de oxígeno (DQO), nitrito, nitrato, nitrógeno total Kjeldahl, nitrógeno total (N-total), ortofosfato, fósforo total (P-total), hidrocarburos totales del petróleo (HTP), fracciones de hidrocarburos (SARA), densidad microalgal y bacteriana, y pigmentos fotosintéticos, de acuerdo con los métodos estandarizados. Los valores medios para la remoción de materia orgánica (DQO), N-total y P-total, fueron: 23,3±2,3; 35,2±4,5 y 64,6±4,8 %, de 27,6±1,64; 79,8±2,05 y 87,7±1,95 %, y de <0,1; 16,1±0,38 y 44,7±1,18 %, para el control, T1 y T2, respectivamente. Las concentraciones finales de HTP estuvieron por encima del límite permisible de la normativa venezolana para descarga a cuerpos de aguas naturales, no obstante, se obtuvieron altas tasas de remoción de hidrocarburos saturados y aromáticos (>70 %), particularmente en el tratamiento bioaumentado (T2).

Pucci et al. (2015) estudiaron

la biodegradación del hidrocarburo remanente que queda en el sedimento después del lavado con agua y detergente del fondo de tanque. Se realizaron bioreactores a los cuales se los siguió con el sistema OxiTop, consumo de oxígeno, se realizaron recuentos bacterianos y determinación de hidrocarburos por infrarrojo (IR)

y por cromatografía gaseosa (GC). El sedimento proveniente del lavado de fondo de tanque contenía cantidad suficiente de bacterias degradadoras y aerobias totales, con un predominio de los géneros *Pseudomonas* sp y *Rhodococcus* sp que junto a las condiciones de 20 % humedad, oxigenación y nutrientes en una proporción de 100:3:03 redujeron los hidrocarburos de 2,9 a 0,4 %. La degradación se produjo mayoritariamente entre los hidrocarburos alifáticos de cadena entre 13 a 26 átomos de carbono, la fracción aromática presentó baja degradación. (p. 97)

Pojmaevich et al. (2020) realizaron un estudio para "evaluar la capacidad biodegradadora de los microorganismos autóctonos presentes en un suelo de tipo árido contaminado con hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de la zona de Catriel Oeste (cuenca neuquina), mediante una técnica de bioestimulación en microcosmos" (párr. 1).

Se utilizaron sistemas microcosmos conteniendo 200 g de suelo, los cuales fueron bioestimulados (BIO) ajustando la proporción de nutrientes (C:N:P 100:10:1). Por otra parte, se realizaron controles comunidad (CC) en microcosmos sin bioestimar. Ambos sistemas se incubaron a 25 °C manteniendo la humedad al 15 % y se mezclaron periódicamente, cada 3 días, con el objeto de airear el suelo. Se tomaron muestras al inicio, a los 28 y a los 42 días, y se determinaron la concentración de HTP, actividad microbiana total (AMT), recuento de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y bacterias degradadoras totales (BDT).

Ambos sistemas evaluados (CC y BIO) mostraron una reducción significativa del contenido de HTP (88 %), la cual estaría relacionada con los incrementos observados en la AMT (4,3 y 3,7 veces para los sistemas CC y BIO, respectivamente), y con el aumento del número de BHAT y BDT (2 órdenes de magnitud en ambos sistemas) (párr. 1-3).

Acuña et al. (2019) estudiaron

la biorremediación de dos residuos de estaciones de servicio de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina por medio de biodegradación. Se realizó la caracterización de la fase oleosa obtenida de efluentes de dos estaciones de servicio y se realizó una biorremediación con microcosmos de los mismos. El seguimiento se realizó con análisis de GC/MS para hidrocarburos y perfiles de ácidos grasos microbianos, como también se realizó un seguimiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos. Los dos residuos mostraron diferente perfil cromatográfico; esto impactó sobre la degradación de los mismos que fue para el residuo 1 de 79,68 % y para el residuo 2 de 29,23 %. (p. 299)

El objetivo del presente estudio es lograr la biodegradación del aceite lubricante usado presente en la arcilla bentonita, la misma que, en su aspecto experimental se realizará tomando como base el modelo matemático de Medina et al. (2009), basado en "la biodegradación en biorreactores de lodos de hidrocarburos totales de petróleo intemperizados en suelos y sedimentos" (p. 245). Este modelo se ha validado con los fenómenos de difusión, sorción y biodegradación en un reactor de lodos de hidrocarburos en arcillas usadas con aceite lubricante usado.

2. METODOLOGÍA

Se ha utilizado un reactor biológico de 5 L proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Figura 4), construido en acero inoxidable A-304 y acoplado a los siguientes accesorios: agitador mecánico, lector de velocidad del impulsor, sistema de mamparas y distribuidor de aire, compresor metálico con un filtro microbiológico de 0,45 micras para inyectar aire al reactor. El motor para la agitación del impulsor es de ¼ HP de potencia nominal.

El reactor consta de un fondo y sección transversal de vidrio para poder visualizar el producto. Además, el equipo cuenta con entradas de sensores para medir el CO₂, entre otros parámetros, y con un calentador de 1500 W, el cual es controlado con la termocupla conectada al tablero de control (Autonics TC4 Series) del sistema para mantener la temperatura constante.

La medición de los hidrocarburos totales de petróleo se realizó mediante el equipo de Soxhlet de acuerdo a la técnica 3540 (extracción con hexano-acetona mediante Soxhlet) de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés).

Las cuatro pruebas experimentales se realizaron en el biorreactor durante 13, 58, 60 y 20 días para cada experimento, respectivamente. Se decidió detener la primera y cuarta pruebas experimentales por observar una mínima biodegradación. Sin embargo, en la segunda y tercera pruebas experimentales, con la dilución arcilla:agua (1:3), se obtuvieron mejores resultados de biodegradación. En la segunda y tercera pruebas experimentales, por tener mayor dilución en agua, se observó una completa homogenización de la mezcla, provocada por la distribución de las burbujas del aire y el efecto del agitador. Al cultivar microorganismos aerobios, el suministro de oxígeno al medio de cultivo es esencial.

Caracterización del aceite lubricante usado

El aceite lubricante usado es todo aceite que ha sido utilizado y se encuentra contaminado con impurezas físicas o químicas y no reúne las condiciones óptimas para el fin para el cual fue producido inicialmente (NTP 900.050).

Tabla 1

Compuestos presentes en el aceite lubricante usado

Método SARA		
Asfaltenos, % masa	ASTM D4124-09	0,7970
Parafinas, % masa	ASTM D4124-09	25,6292
Aromáticos, % masa	ASTM D4124-09	30,4810
Maltenos, % masa	ASTM D4124-09	2,4189

Caracterización de la arcilla bentonita

La arcilla bentonita que se utilizó en el presente estudio es del tipo cálcica, de origen peruano y presenta las siguientes características:

Tabla 2

Características de la arcilla bentonita

Características	Especificación	Resultados
Acidez residual	-0,80	0,64 %
Humedad	-18	15,6 %
Malla +230	-50	26 %
pH al 10 %	3-4	3
Densidad aparente (g/cc)	400-500	492

Identificación de los componentes del consorcio

Las cepas a utilizar son: *Rodhococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Características del consorcio liofilizado

Rhodococcus pyridinivorans

Figura 1

Bacteria Rhodococcus pyridinivorans



Las colonias presentaron un diámetro de 0,4 cm pasadas las 24 horas.

Pseudomonas montielli

Figura 2

Bacteria Pseudomonas montielli



Las colonias de *Pseudomonas montielli* son circulares de 0,25 cm de diámetro pasadas las 24 horas.

Bacillus licheniformis

Figura 3

Bacteria Bacillus licheniformis Licheniformis



Las colonias de esta bacteria son irregulares y miden 0,6 cm de diámetro pasadas las 24 horas.

Evaluación de la actividad degradativa del consorcio en la arcilla bentonita contaminada con aceite lubricante usado

- Primero se instaló el reactor con 2 Kg. de arcilla bentonita usada, luego se agregó 2 L de agua con solución de soda cáustica a pH de 7 y medio de cultivo de microorganismos, en el cual la solución presentó pH neutro.
- Todos los días se retiró una muestra para medir el crecimiento microbiano y los hidrocarburos totales de petróleo, este tratamiento se realizó durante 58 días.

Figura 4

Reactor biológico de 5 L en acero inoxidable



3. RESULTADOS

Todo el proceso se realizó a pH neutro, con una temperatura aproximada de 35 °C, una oscilación de 120 rpm y con sistema de aireación continua. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 3

Lectura del porcentaje de degradación máximo de HTP (%)

Relación de dilución arcilla:agua	Concentración inicial del consorcio bacteriano	Porcentaje de degradación máxima de HTP (%)
1:1 (primera corrida)	10 %	1,80
1:3 (segunda corrida)	10 %	49,79
1:3 (tercera corrida)	20 %	57,69
1:1 (cuarta corrida)	20 %	8,81

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- Se ha comprobado que el consorcio oil eating microbes (OEM) está conformado por tres bacterias efectivas que trabajan conjuntamente en el proceso de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo, las cuales son las siguientes: *Pseudomonas monteilii*, *Rhodococcus pyridinivorans* y *Bacillus licheniformis*.
- Se concluye que la dilución en relación arcilla:agua (1:3) influye en el proceso de biodegradación de aceite lubricante usado en arcilla bentonita.
- El rendimiento de biodegradación del aceite lubricante usado presente en la arcilla bentonita es de 57 % de biodegradación de HTP en 60 días calendarios, con la concentración inicial del consorcio bacteriano de 20 %.
- La concentración inicial de bacterias no influye en gran medida en el rendimiento de biodegradación del aceite lubricante usado presente en la arcilla bentonita.
- Se recomienda continuar con la investigación para otras relaciones de diluciones en el proceso de biodegradación del aceite residual de petróleo en la arcilla bentonita para mejorar la eficiencia del proceso de biorremediación y recuperación de un recurso no renovable como la arcilla bentonita.
- Se recomienda realizar las pruebas experimentales en equipos automatizados para obtener una medición continua y más precisa de las variables evaluadas durante el proceso de biodegradación.

REFERENCIAS

- Acuña, A., Cambarieri, L., & Pucci, G. (2019). Biodegradación de dos residuos de gasolineras en Río Gallegos – Argentina. *Acta Biológica Colombiana*, 25(3), 299-309. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n3.77690>.
- Buendía, H. (2013). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante aserrín y estiércol* [Tesis de maestría]. Cybertesis-Repositorio de Tesis Digitales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos <https://hdl.handle.net/20.500.12672/2290>.
- Carrasquero, S. J., Montiel Flores, S., Faría Perche, E. D., Parra Ferrer, P. M., Marin Leal, J. C., & Díaz Montiel, A. R. (2017). Eficacia de los coagulantes obtenidos a partir de residuos de patata (*Sonchum tuberosum*) y plátano (*Musa paradisiaca*) en la clarificación del agua. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 13(2), 90-99. <https://doi.org/10.18359/rfcb.1941>.
- Díaz-Borrego, L. C., Marín Leal, J. C., Alburgue Díaz, D. A., Carrasquero Ferrer, S. J., & Morales Avendaño, E. D. (2017). Consorcio microbiano autóctono para el tratamiento de aguas contaminadas con gasoil del puerto de Isla de Toas (Venezuela). *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 28(2), 5-28. <https://doi.org/10.18359/rcin.2792>
- Duque, E., & Escobar, C. (2002). *Mecánica de los suelos*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3375>
- Eriksson, P. & Weisner, S. (1999). An experimental study on effects of submersed macrophytes on nitrification and denitrification in ammonium-rich aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 44(8), 1993-1999. <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lo.1999.44.8.1993>
- Gouda, M., Omar, S., Nour, H., & Chekroud, Z. (2008). Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (Laboratory and field: scale microcosms). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1451-1460. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9634-x>
- Gutiérrez, M., Jiménez, T., Tapia, A. and Romero, O. (2022). Degradación de diésel por sustrato residual de *Agaricus bisporus* a nivel microcosmos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 223-234. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2656>.
- Haritash, A. & Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Juhasz, A. L. & Ravendra, N. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]

- pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), 57-88. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)
- Mac Naughton, S., Stephen, J., Venosa, A., Gregory, D., Chang, Y., & White D. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3566-3574. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3566-3574.1999>
- Medina, S., Huerta, S., Lucho, C., Aguilera, L., Jiménez, A., & Gutiérrez, M. (2009). Modelado de la biodegradación en biorreactores de lodos de hidrocarburos totales del petróleo intemperizados en suelos y sedimentos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(3):245-258.
- Norma Técnica Peruana 900.050 Gestión ambiental, aceites usados, generalidades. Protección del medio ambiente en general. 2008. Indecopi.
- Pojmaevich, A., Busto, V., & Camacho, A. G. (2020). Evaluación de un proceso de bioestimulación aplicado a suelos áridos contaminados con hidrocarburos del petróleo. *AJEA*, (5). <https://doi.org/10.33414/ajea.5.730.2020>
- Prince, R. C. (2005). The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation. En B. Ollivier & M. Magot (Eds.) *Petroleum microbiology* (p. 317-336). American Society for Microbiology Press.
- Pucci, G., Acuña, A., and Pucci, O. (2015). Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. *Revista Peruana de Biología*, 22(1), 97-101. <https://doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11126>.
- Rahman, K., Banat, I., Thahira, J., Thayumanavan, T., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 81(1), 25-32. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00105-5)
- Ríos Rodríguez, R. (2007). Diseño de un sistema de reciclaje de aceite lubricante usado [Tesis de licenciatura]. Universidad Austral de Chile. https://www.academia.edu/28625079/DISE%C3%91O_DE_UN_SISTEMA_DE_RECICLAJE_DE_ACEITE_LUBRICANTE_USADO
- Rittman, B. (1994). *In situ bioremediation* (2ª ed.). Noyes Publication.
- Rivera, L. (2015). *Microbiología: interiorización del conocimiento de forma significativa y comprensiva*. Universidad Técnica de Machala.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., & Ron, E. Z. (1992). Petroleum bioremediation– a multiphase problem. *Biodegradation*, 3, 337-350.
- Souza, P. (1975). *Tecnología de argilas*. Ed. Universidad de Sao Paulo.

Tuesta, E., Vivas, M., Sun, R. & Gutarra, A. (2005). *Chemical modification of clays and its application in the retention of dyes*. Chemical Society of Peru.

Vallejo V., Salgado L., & Roldan F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, II(2), 67-78.

