

Manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes industriales: un estudio de caso

ADRIANA ABRIL ✉

Microbiología Agrícola, Departamento Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

RESUMEN. Se evaluó la eficiencia de prácticas de manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes en una industria metalúrgica de Córdoba, Argentina. Para optimizar la actividad de organismos del agua, el suelo y la rizosfera de las plantas, se manejaron tres hábitats: acuático, de humedales y agrícola. Las prácticas fueron: introducción de vegetación palustre y terrestre, aireación del agua, laboreos, remoción de sedimentos e inoculación con bacterias seleccionadas. Se evaluaron los siguientes parámetros: pH y contenido de bacterias en el agua, y contenido de aceites, Cr y Zn en los sedimentos, suelo y napa freática. El pH registrado fue siempre muy elevado (entre 8.4 y 10.9), mientras que la cantidad de bacterias descomponedoras aumentó hasta valores que fluctuaron entre log 3.6 y 8.9/ml. No se observó aumento en la población microbiana después de la inoculación. Los sedimentos presentaron elevado pH, Zn y Cr y escaso contenido de aceites. No se detectaron estos contaminantes ni en el suelo ni en la napa. Mediante el manejo de hábitat se logró una eficiente degradación de los aceites del efluente y una ausencia total de lixiviados, barros y agua remanente.

[Palabras clave: cromo, zinc, aceites minerales, bioremediación, fitoremediación]

ABSTRACT. Managing habitat and microorganisms for degrading industrial effluents: a study case: The efficiency of a treatment for industrial effluents based on a combination of habitat and microbial population management was tested in a metallurgic plant in Córdoba, Argentina. Effluents (between 30 - 40 m³ day) were originated from a) zinc process (20%), b) engine washing (70%), and c) sewage (10%). The treatment process included a combination of three managed habitats: aquatic (pond), wetland (flooding plots), and agricultural land (flooding and crop plots). The three habitats were managed to optimize the degrading activity of water, soil, and phyllosphere microorganisms. Management practices included introduction of terrestrial and aquatic vegetation, water aeration, sediment removal, and inoculation of selected native microorganisms. Efficiency was assessed through five years using the following parameters: a) monthly: water pH and abundance of degrading and coliform bacteria in the pond b) yearly: Zn, Cr and mineral oil content in the underground water (9 m deep), sediments in the ponds and organic matter in the subsoil (1 and 2 m deep). Water pH was permanently high (8.4 -10.9), whereas abundance of degrading microorganisms was very low at the beginning (log 1.2/ ml) increasing through the following years and with fluctuations of between log 3.6 and 8.9/ ml. No increase in bacterial abundance was detected after inoculation. Coliform bacteria were scarcely observed. High concentration of Zn (6.48 - 7.08 mg/kg) and Cr (0.19 - 0.50 mg/kg) and low mineral oil content (0.23 - 1.01 mg/kg) were detected in the pond's sediments. None of these components were detected in underground water and subsoil. Habitat management allowed an efficient degradation of sewage and mineral oils. The system does not produce waste material such as sludge, water, nor underground water pollution.

[Keywords: chromium, zinc, mineral oils, bioremediation, phytoremediation]

✉ Microbiología Agrícola, Depto. Recursos Naturales, Fac. de Cs. Agropecuarias. Univ. Nacional de Córdoba c.c. 509, 5000 - Córdoba, Argentina. aabril@agro.uncor.edu

Recibido: 11 de septiembre de 2003; Fin de arbitraje: 3 de marzo de 2004; Revisión recibida: 13 de abril de 2004; Aceptado: 14 de abril de 2004

INTRODUCCIÓN

El manejo de hábitat es una práctica ecológica muy difundida que se utiliza para favorecer el crecimiento diferencial de poblaciones de organismos (Wood 1983). Las metodologías de manejo de hábitat son variadas e incluyen implantación de vegetación, cortes de pastizales, laboreos de suelo, quemas, inundaciones, etc. Estas prácticas se aplican con el objeto de modificar las condiciones ambientales y de esa manera favorecer el asentamiento, recuperación y/o reproducción de determinadas especies (Beeby 1995). Por ejemplo, el manejo de hábitat es muy utilizado para obtener alta densidad de aves, generalmente con fines cinegéticos (Madden et al. 2000). Son escasas las referencias que mencionan prácticas de manejo de hábitat con la finalidad de optimizar poblaciones microbianas. Contrariamente, el manejo de microorganismos está muy difundido particularmente en la introducción de bacterias seleccionadas o mejoradas genéticamente (Atlas & Sayler 1988; Beeby 1995).

La emisión de efluentes es un problema ambiental de gran importancia en los países industrializados. Las técnicas convencionales de tratamiento de efluentes implican utilizar procesos y productos costosos que generalmente deterioran el ambiente y que en general dejan remanentes que requieren de tratamientos más complejos y/o volcamientos a napas o cursos de agua superficial (Mudrack & Kunst 1986). En los últimos años, se han desarrollado tecnologías alternativas para el tratamiento de efluentes conocidas como bioremediación. Según Beeby (1995), la bioremediación es el uso deliberado de las propiedades catalíticas de organismos vivos para eliminar contaminantes de los ecosistemas. Dentro de las prácticas de bioremediación las más difundidas son la incorporación de bacterias degradadoras y la fitoremediación.

Con la incorporación de bacterias se pretende aumentar la velocidad de degradación de los contaminantes. No obstante, las poblaciones exógenas suelen perder su eficiencia al poco tiempo de ser introducidas debido a problemas de adaptación frente a las condiciones de

campo (Middeldorp & Schraa 1999; Siciliano & Germida 1999). La fitoremediación consiste en la utilización de especies vegetales como filtros depuradores. Esta práctica se fundamenta en la capacidad de las plantas para remover nutrientes, degradar e inmovilizar compuestos recalcitrantes y retener metales pesados en los tejidos (Germida et al. 2002). Sin embargo estos atributos son fuertemente dependientes de la especie vegetal, del nicho ecológico donde se desarrolla y del estado fenológico de la planta.

Si bien los sistemas de bioremediación están siendo utilizados con éxito en países desarrollados (Anderson et al. 1993; Karthikeyan & Kulakow 2003), la aplicación de estas tecnologías en Argentina es incipiente y de carácter experimental (Maine et al. 2001; Pozzo-Ardizzi et al. 2001). Probablemente esto se deba a que el éxito de los tratamientos de bioremediación depende no solo de la introducción de especies (bacterias o plantas) sino también del manejo integrado del ecosistema. Por tal motivo sería de interés desarrollar metodologías que se adapten a las condiciones ecológicas de cada ambiente en particular.

En este trabajo se evaluó la eficiencia de un sistema de biodegradación que combina prácticas de manejo de hábitat y manejo de poblaciones microbianas como una alternativa ambientalmente sustentable para el tratamiento de efluentes industriales.

MÉTODOS

Se trabajó en un proyecto de largo alcance (5 años) en una industria metalúrgica de la localidad de Luque en la Provincia de Córdoba (Argentina), manejando el hábitat de una laguna y el área circundante. El trabajo comenzó en 1996 en un sector aledaño a la planta industrial donde se volcaban los efluentes sin ningún tratamiento desde hacía aproximadamente 4 años. La fábrica produce tres tipos de efluentes líquidos provenientes de: a) el proceso de zincado de piezas metálicas, b) el lavado de motores y c) la red cloacal. El caudal diario del efluente es variable (entre 30 y 40 m³), dependiendo de la producción de la fábrica.

El efluente del proceso de zincado es un líquido viscoso, de color blanquecino, con un pH alrededor de nueve resultado del tratamiento alcalino para recuperación de Zn. El caudal aproximado es de un 20% del total de los efluentes. El efluente de lavado de motores contiene distintos tipos de aceites minerales emulsionados con detergentes (ácidos grasos butilados, dietanolamias, trietanolamina, alcalonamidas, etc.), y constituye la fracción mayor (70%). El efluente cloacal proviene de los pozos negros de la planta y aporta aproximadamente el 10% del total.

Manejo de hábitat

Se trató de optimizar la actividad de los microorganismos descomponedores manejando 3 ambientes diferentes: acuático, de humedales y agrícola, con la finalidad de favorecer: a) la degradación aeróbica de los aceites industriales, b) la eliminación de nutrientes minerales por anaerobiosis, c) la eliminación del agua mediante absorción radicular y d) la retención de nutrientes y metales pesados en la vegetación y la materia orgánica del suelo. Para ello, se realizaron prácticas de manejo para favorecer la actividad de los microorganismos que viven en el agua, el suelo y la rizosfera de las plantas.

Para optimizar los microorganismos del agua se trabajó de la siguiente manera: a) se construyó una laguna de 40 x 40 m y 0.6 m de profundidad directamente sobre el suelo del lugar, b) se mezclaron todos los efluentes incluyendo los cloacales, c) se oxigenó el agua de la laguna mediante un sistema de aireación con una turbina (25 HP) y cinco ejes de distribución de aire con bocas a 10 cm de profundidad que funcionó las 24 h del día (Figura 1) y d) se agitaron periódicamente (una vez por semana) los sedimentos del fondo mediante palas de arrastre.

Para favorecer la actividad de los microorganismos del suelo se realizaron las siguientes prácticas: a) se construyó un sistema de nueve canteros (1 m x 30 m), separados 2 m entre sí y conectados a la laguna mediante cañerías de 5 pulgadas (Figura 1), b) se inundaron periódicamente los canteros con agua y sedimentos de la laguna creando ciclos de inundación-

sequía y c) se laboreó el suelo de los canteros en los períodos de sequía.

Para optimizar la actividad de los microorganismos rizosféricos: a) se implantaron especies palustres en el margen de la laguna: *Thypha* sp. (totora), *Arundo Donax* L. (caña castilla), *Cortaderia Selloana* (Schult.) Asch. et Graebn. (cortadera), y varias especies de liliáceas, b) se implantó vegetación perenne (preferentemente de hojas grandes, rizomatosa y con sistema radicular abundante y superficial) en los camellones entre los canteros de inundación: *Musa* sp. (bananero), *Canna* sp. (achira) y varias especies de aráceas, c) se sembraron especies anuales (estivales e invernales) en los canteros de inundación laboreados, que fueron cortadas en estado vegetativo e incorporadas al suelo de los canteros mediante rolo cultivador (soja, trigo, sorgo, centeno y avena), d) se forestó el área perimetral con especies de alta capacidad de absorción de agua (*Salix* sp.) y tolerantes a pH alcalino (*Casuarina* sp.) y e) se sembró césped en el área circundante que fue cortado periódicamente (Figura 1). Con esta selección de plantas se garantizó que el sistema tuviera vegetación activa en todas las estaciones del año. En todos los casos se trabajó con especies adaptadas a la región y por razones de seguridad, se buscó que por el tipo de planta y/o el estado fenológico no pudieran ser utilizadas para consumo humano ni animal. Para las prácticas de manejo se utilizó maquinaria y herramientas de la fábrica, no requiriendo gastos especiales en equipamientos ni insumos. Se dispuso de mano de obra permanente para el mantenimiento de la vegetación y la regulación del caudal en los canteros.

Manejo de microorganismos

Se seleccionaron en el laboratorio microorganismos degradadores a partir de bacterias extraídas del sedimento de la laguna mediante cultivos de enriquecimiento y adaptación a altos valores de pH. Se utilizaron medios de cultivos líquidos con los aceites industriales utilizados en la fábrica como única fuente de carbono (Bade et al. 1994). Una vez obtenida una densidad de bacterias de 1×10^{12} se realizaron cultivos seriados repicando cada 15 días a medios con un pH 0.5, más alto en cada repique hasta llegar a nueve. Todos los cultivos fueron mantenidos con aireación continua a 25°C.

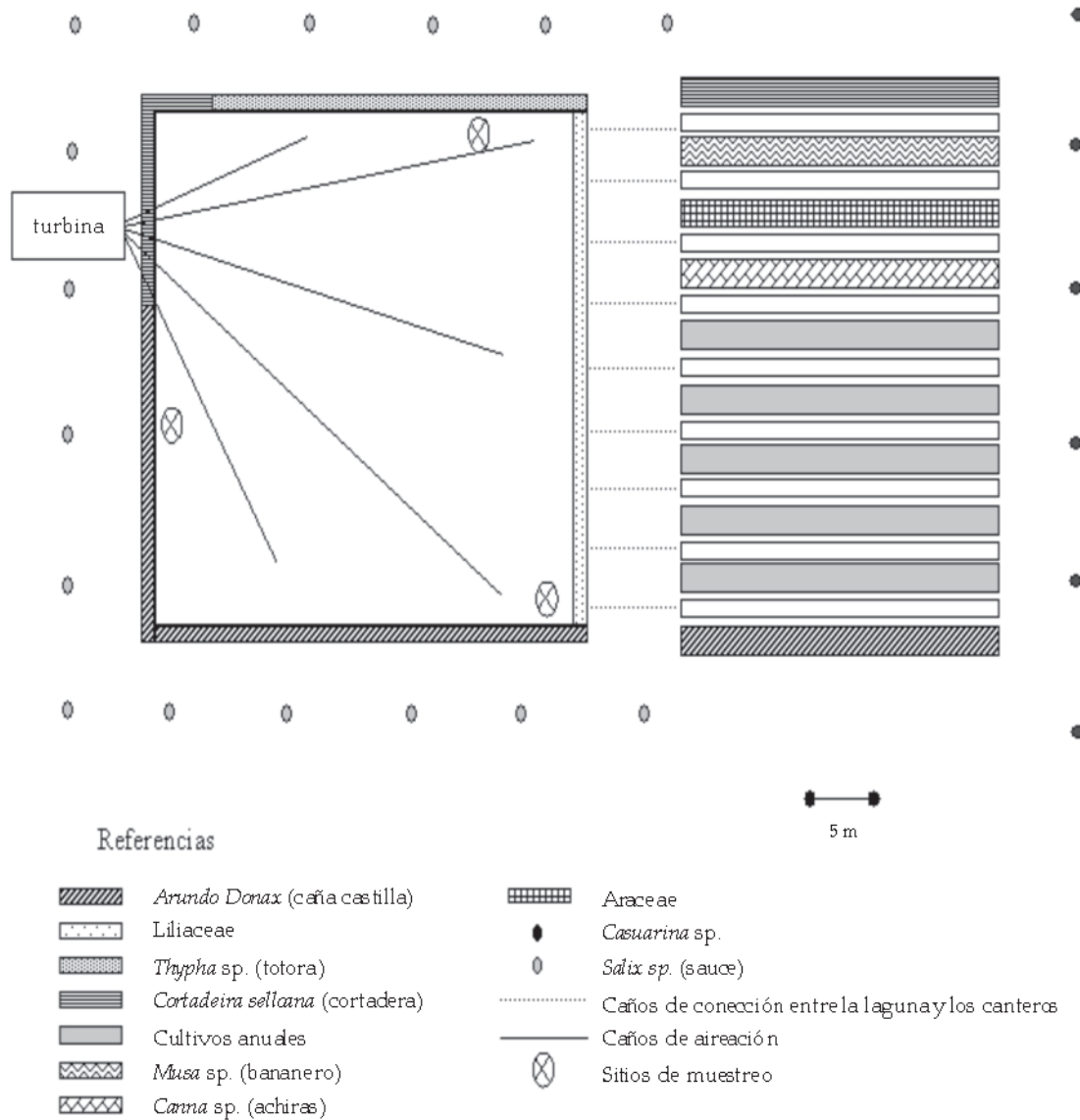


Figura 1. Diagrama del sistema de laguna y canteros: especies vegetales, conexiones y sitios de muestreo.

Figure 1. Diagram of pond and plots systems: plant species, pipes and sampling sites.

Los cultivos adaptados fueron introducidos en la laguna a partir de los 30 días de puesta en funcionamiento el sistema de aireación. La inoculación se realizó mediante la aplicación directa de 3 L de cultivo líquido (con una concentración de $1 \times 10^{12} \text{ ml}^{-1}$) en la zona de vuelque de los efluentes de lavado de motores. Se inoculó cada 3 meses durante el primer año y se realizó una inoculación adicional en agosto de 2001 debido a una elevada mortalidad de bacterias ocasionada por problemas técnicos de la planta.

Mecanismos de control

Los controles se realizaron mediante muestreos mensuales del agua de la laguna en tres sitios: a) en la entrada de los efluentes de lavado de motores y cloacal, b) en la entrada del efluente del zincado y c) en el ángulo más alejado de las entradas de los efluentes. En dichas muestras se midió: pH, número de microorganismos aeróbicos mesófilos totales (RBT) mediante recuento en agar nutritivo y presencia de *Escherichia coli* en medio Levine (Guinea et al. 1979).

A partir del tercer año de la experiencia, se tomaron muestras anuales de: a) sedimento del fondo de la laguna y suelo a 1 m y 2 m de profundidad en los mismos puntos de muestreo del agua de la laguna y b) agua del acuífero en dos niveles (más elevado y más bajo de la napa correspondiente a la laguna), tomando tres muestras en cada sitio separadas 30 minutos entre sí. En todas las muestras se determinó: pH, presencia de aceites minerales, Zn y Cr (Clesceri et al. 1998). Además, en las muestras de suelo se midió el contenido de materia orgánica (Nelson & Sommer 1982).

Para comparar las variaciones de los parámetros analizados entre el sedimento de la laguna y el suelo a distinta profundidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de LSD protegido ($P < 0.05$) para la comparación de medias. Las diferencias en los valores obtenidos en las dos situaciones del agua de la napa fueron analizadas mediante una prueba de t (Steel & Torrie 1985).

RESULTADOS

El pH del agua de la laguna fue siempre elevado, fluctuado entre 8.4 y 10.9 (Figura 2). Los valores menores se presentaron durante la temporada de lluvias, por efecto dilución y los mayores cuando la fábrica presentó picos de alta producción (por ejemplo marzo 1999). La cantidad de bacterias descomponedoras (RBT) fue muy escasa al comienzo de la experiencia y aumentó de manera continua durante el primer año (Figura 2). No se observaron picos de aumento de la población microbiana después de la inoculación con las bacterias seleccionadas. En los años siguientes la cantidad de bacterias totales osciló entre log 3.6 y 8.9/ml, siendo mayores durante la temporada estival. No se estableció correlación significativa entre los valores de pH y la cantidad de bacterias totales ($R^2 = 0.126$), sin embargo los recuentos bacterianos resultaron menores cuando el pH fue mayor de 10.

Los organismos coliformes fueron muy escasos en el agua de la laguna, probablemente a causa de la reducida proporción de efluentes cloacales y el alto pH del agua. Sólo esporádicamente fue posible detectar *Escherichia coli*

(octubre 1997; mayo 1998; noviembre 1998; setiembre 1999; febrero 2000; diciembre 2000 y mayo 2001) lo que tendría relación con la coincidencia temporal entre el momento de muestreo y el volcamiento cloacal.

En todos los muestreos anuales los sedimentos del fondo de la laguna tenían elevado pH, altos contenidos de zinc y cromo, y escaso contenido de aceites y materia orgánica (Tabla 1). El suelo a 1 m de profundidad tenía menor pH y menor contenido de metales pesados y materia orgánica que los sedimentos de la laguna. A 2 m de profundidad los valores fueron similares excepto en el contenido de materia orgánica que fue menor que a 1 m, situación normal en cualquier suelo.

En el agua de la napa (aproximadamente 9 m de profundidad) no se detectó Cr, Zn ni aceites, antes ni después del área de tratamiento en ninguno de los muestreos realizados. Los valores de pH fueron los normales para el agua de la zona (8.03).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que mediante el manejo de hábitat y poblaciones microbianas se puede lograr: a) eficiente degradación de los aceites industriales, b) eliminación de organismos de origen cloacal y c) ausencia total de contaminantes en aguas subterráneas, no quedando barros ni agua residual que requieran ser retratados o volcados en cursos superficiales o subterráneos. Asimismo, el tratamiento contribuyó a mejorar el valor paisajístico del establecimiento fabril, por cuanto la zona presenta una variada y abundante vegetación, no existen malos olores y no hay ningún signo visible de que sea una planta depuradora de efluentes industriales.

El manejo de hábitat resultó ser un mecanismo eficiente para optimizar el desarrollo y actividad de microorganismos degradadores presentes en la laguna. El manejo de las condiciones del ambiente acuático y terrestre de los márgenes de la laguna constituye un aspecto muy novedoso si se tiene en cuenta que generalmente las lagunas de tratamiento se aíslan del suelo adyacente con la finalidad de evitar filtracio-

Tabla 1. Contenido de cromo, zinc, aceites minerales y materia orgánica en los sedimentos y en el suelo (1 y 2 m) debajo de la laguna. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas entre los 3 sitios de muestreo (prueba de LSD, $P < 0.05$).

Table 1. Chromium, zinc, mineral oil and organic matter concentration in sediment and soil (1 and 2 m) above pond. For each parameter different letters indicate significant differences among the 3 sample sites (LSD test, $P < 0.05$).

	Sedimento	Suelo 1 m	Suelo 2 m
Tercer año			
Cr ⁺⁶ (mg/kg)	0.19 a	0.07 b	0.01 c
pH	8.81 a	7.88 b	7.94 b
Zn (mg/kg)	6.48 a	0.10 b	0.16 b
Materia Orgánica (%)	7.10 a	3.92 b	1.08 c
Aceites (mg/kg)	1.01 a	0.0 b	0.0 b
Cuarto año			
Cr ⁺⁶ (mg/kg)	0.30 a	0.06 b	0.001 b
pH	9.21 a	7.99 b	7.84 b
Zn (mg/kg)	8.40 a	0.50 b	0.06 c
Materia orgánica (%)	6.84 a	2.06 b	1.50 c
Aceites (mg/kg)	0.23 a	0.01 b	0.00 b
Quinto año			
Cr ⁺⁶ (mg/kg)	0.50 a	0.02 b	0.02 b
pH	9.14 a	8.41 b	8.10 b
Zn (mg/kg)	7.08 a	1.01 b	0.18 c
Materia orgánica (%)	6.59 a	2.76 b	2.22 b
Aceites (mg/kg)	0.23 a	0.01 b	0.00 b

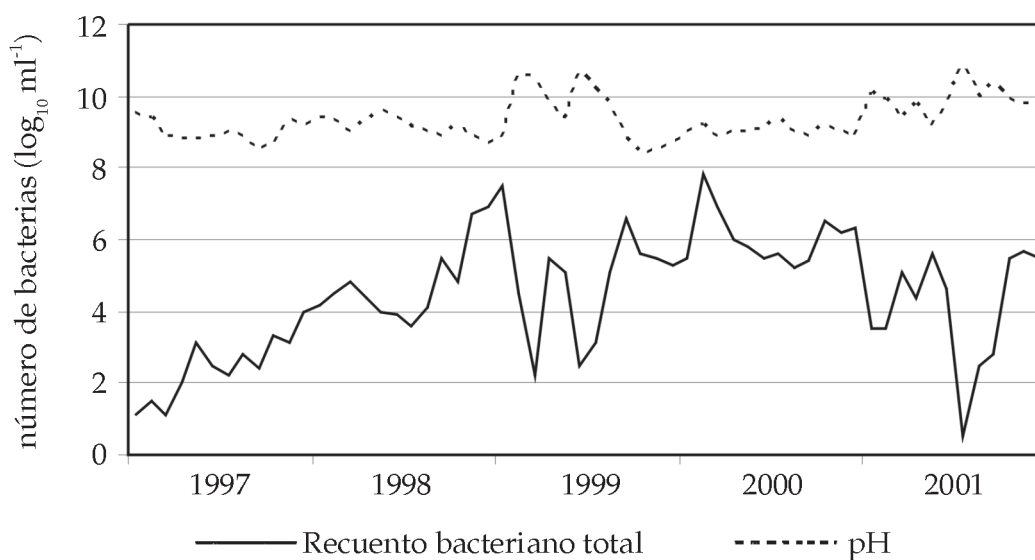


Figura 2. Variaciones mensuales ($n = 3$) en la abundancia de bacterias degradadoras y el pH del agua de la laguna durante los 5 años de la experiencia.

Figure 2. Monthly variations ($n = 3$) on the abundance of degrading bacteria and pH level in pond water, during the 5 year period time.

nes (Maine et al. 2001). De esa manera, se pierde la posibilidad de utilizar la elevada capacidad degradadora de los microorganismos del suelo y de la rizosfera de las plantas palustres (Fenchel et al. 1998; Siciliano & Germida 1999), y de neutralizar xenobióticos en las arcillas y materia orgánica humificada (Hanafi & Salwa 1998).

La inclusión del efluente cloacal pudo haber favorecido los procesos de degradación de los aceites industriales debido al aporte de: a) compuestos carbonados fácilmente degradables que proveen energía inicial para los procesos de degradación de compuestos recalcitrantes (Beeby 1995) y b) nutrientes (P y N) que permiten el crecimiento de las poblaciones degradadoras en medios con alta relación C/N como son los aceites de uso industrial (Middeldorp & Schraa 1999). La aplicación de fertilizantes químicos es una práctica ampliamente difundida en los tratamientos de áreas contaminadas por hidrocarburos con la finalidad de disminuir la relación C/N (Hinchee et al. 1994). En nuestro caso, el uso del efluente cloacal sustituyó la aplicación de fertilizantes químicos.

En el ambiente de humedales es donde se observaron los mejores resultados, ya que en el sector de canchales no se observaron barro ni aceites luego de los ciclos de humedad-sequía. Esto es coincidente con lo ampliamente aceptado de que los pantanos son sitios de elevada capacidad de degradación (Beeby 1995; Stecher & Weaver 2003). En varios lugares del planeta, los pantanos y estuarios son utilizados desde antaño para eliminar desechos debido a que los ciclos de inundación-sequía favorecen la alternancia de procesos de mineralización (aeróbicos) con volatilización de nutrientes (anaeróbicos) cerrando el ciclo de los principales elementos que participan en la composición de la materia orgánica (Fenchel et al. 1998). Además, es bien conocido que la alternancia de humedad-sequía destruye la estructura del suelo y produce elevada mortalidad de bacterias lo que favorece la liberación y mineralización de nutrientes (Fierer et al. 2002).

Las prácticas de manejo agrícola fueron muy adecuadas para eliminar el excedente de agua, degradar los compuestos recalcitrantes y aumentar el contenido de materia orgánica,

favoreciendo la retención de los metales pesados. En la actualidad, las prácticas agrícolas son utilizadas con frecuencia para el tratamiento de suelos empetrolados (Hinchee et al. 1994) ya que el laboreo aéreo, mezcla y tritura acelerando la oxidación de los compuestos resistentes (Abril 2002). En nuestro caso, la combinación de prácticas agrícolas con el manejo de humedales pudo haber contribuido a ampliar las alternativas metabólicas de degradación al favorecer el desarrollo de sucesiones microbianas que terminan eliminando la totalidad del efluente.

La introducción de microorganismos seleccionados no demostró ser una práctica muy recomendable. Si bien se buscó que las poblaciones estuvieran adaptadas a las condiciones de pH y fuentes de carbono de la laguna, no se obtuvo un aumento permanente de las poblaciones después de la inoculación. Este aspecto es coincidente con lo observado por otros autores (Siciliano & Germida 1999) y explica la necesidad de realizar inoculaciones frecuentes cuando se introducen microorganismos degradadores (Beeby 1995).

Los factores que más afectaron la actividad de las bacterias degradadoras nativas fueron a) la cantidad de efluentes, que dependió de la producción de la fábrica, b) el pH, que varió según la corrección realizada en la planta de zincado y c) las condiciones ambientales. Sin embargo, nuestros resultados indicarían que una vez que el sistema llega a un punto óptimo tiene una alta capacidad de amortiguar estos factores, como lo indica la abundancia bacteriana que se mantuvo relativamente estable a lo largo de los años.

Entre las ventajas del sistema de tratamiento aplicado se incluyen: bajo costo operativo, bajos requerimientos energéticos, alta flexibilidad para adaptarse a shocks de carga y la posibilidad de utilizar la vegetación con fines de parquización. Sin embargo, cabe destacar las siguientes limitaciones: se requiere una amplia superficie de terreno, se debe esperar un cierto tiempo para que funcione plenamente, es poco adecuado para tratar grandes volúmenes de efluentes, y no puede ser utilizado en lugares con condiciones climáticas adversas (particularmente bajas temperaturas).

Por tal motivo, este sistema puede constituirse en una alternativa válida para el tratamiento de efluentes de pequeñas y medianas industrias y municipios.

Este estudio de caso es un claro ejemplo de la aplicación de criterios ecosistémicos para la solución de un problema ambiental concreto, pocas veces considerado dentro del campo de la ecología convencional.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio de caso fue posible gracias al apoyo técnico y económico de la empresa Drean-Alladio S.A. de la localidad de Luque en la Provincia de Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRIL, A. 2002. La microbiología del suelo: su relación con la agricultura sustentable. Pp. 129-150 en: SJ Sarandon (ed). *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable* Ediciones Científicas Americanas. La Plata.
- ANDERSON, T; E GUTHRIE & B WALTON. 1993. Bioremediation. *Environ.Sci.Technol.* **27**:2630-2636.
- ATLAS, RM & GS SAYLER. 1988. Tracking microorganisms and genes in the environment. Pp. 31-45 in: GS Omenn (ed). *Environmental biotechnology*. Plenum Press. New York.
- BADE, GM; GI VECCHIOLI; MT DEL PANNO & MT PAINCEIRA. 1994. Conservación de bacterias degradadoras de hidrocarburos. *Rev. Arg. Microbiol.* **26**:116-123.
- BEEBY, A. 1995. *Applying ecology*. Chapman & Hall. London.
- FENCHEL, T; GM KING & TH BLACKBURN. 1998. *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. Academic Press. San Diego.
- CLESCERI, LS; AE GREENBERG & AD EATON (eds.). 1998. *Standard methods for the examination of water and waste water*. American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Environment Federation. 20th edn. Washington D.C.
- FIERER, N; JP SCHIMEL & PA HOLDEN. 2002. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* **45**:63-71.
- GERMIDA, JJ; CM FRICK & RE FARREL. 2002. Phytoremediation of oil-contaminated soils. Pp. 169-186 in: A Violante; PM Huang; JM Bollag & L Gianfreda (eds). *Soil mineral-organic matter-microorganisms interactions and ecosystem health*. Developments in Soil Science 28 B. Elsevier. Amsterdam.
- GUINEA, J; J SANCHO & R PARÉS. 1979. *Análisis microbiológico de aguas*. Omega. Barcelona.
- HANAFI, MM & H. SALWA. 1998. Cadmium and zinc in acid tropical soils: II. Influence of humic acid addition on soil properties and their adsorption. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **29**:1933-1947.
- HINCHEE, RE; BC ALLEMAN; RE HOEPEL & RN MILLER. 1994. *Hydrocarbon bioremediation*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL.
- KARTHIKEYAN, R & KULAKOW PA. 2003. Soil plant microbe interactions in phytoremediation. *Phytoremediation* **78**:51-74
- MADDEN, EM; RK MURPHY; AJ HANSEN & L MURRAY. 2000. Models for guiding management of prairie bird habitat in northwestern North Dakota. *American Midland Naturalist* **144**:377-392.
- MAINE, MA; N SUÑE; MC PANIGATTI; G SÁNCHEZ & H HADAD. 2001. Wetland piloto para tratamiento de un efluente metalúrgico. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* **64**:72-77.
- MIDDELDORP, PJM & G SCHRAA. 1999. Bioremediation of contaminated soils: factors influencing the biological process. Pp. 239-254 in: NS Subba Rao & YR Dommergues (eds). *Microbial interactions in agriculture and forestry*. Oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD. New Delhi.
- MUDRACK, K & S KUNST. 1986. *Biology and sewage treatment and water pollution control*. Ellis Horwood. Chichester, England.
- NELSON, DW & LE SOMMER. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. Pp 570-574 in: AL Page; RH Milles & DR Keeney (eds). *Methods of soil analysis*. ASA & SSSA. Madison.
- POZZO-ARDIZZI, MG; M FERRARI & G CALDERÓN. 2001. Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera, por la metodología de biodegradación con bioaumentación. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* **54**:41-48
- SICILIANO SD & JJ GERMIDA. 1999. Enhanced phytoremediation of chlorobenzoates in rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 299-305.
- STECHEER, MC & RW WEAVER. 2003. Effects of umbrella palms and wastewater depth on wastewater treatment in a subsurface flow constructed wetland. *Environ.Technol.* **24**:471-478.
- STEEL, RG & JH TORRIE. 1985. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill. New York.
- WOOD, JB. 1983. The conservation and management of animal populations. Pp 119-139 in: A Warren & FB Goldsmith (eds.). *Conservation in perspective*. John Wiley. Chichester.