

Evaluación analítica de un tratamiento químico biológico a cortes de perforación contaminados con diésel



Analytical evaluation of a chemical biological treatment of diesel contaminated drill cuttings

<https://cu-id.com/2144/v16e13>

✉Roberto Romero Silva^{1*}, ✉Miguel Díaz Díaz², ✉Silvia Lilibet Acosta Díaz², ✉José María Ameneiros Martínez³

RESUMEN: El uso de fluidos de perforación con lodos base diésel en la perforación petrolera cubana es una de las causas principales que impulsa investigaciones continuas para el tratamiento final de los desechos impregnados con dichos lodos. La combinación de un proceso químico - biológico permitió la disminución del contenido de grasas y aceites (G y A) e hidrocarburos totales (HCT) parámetros indicadores de la contaminación petrolífera. En la tecnología aplicada se realiza un seguimiento analítico de parámetros físico-químicos; químicos y microbiológicos, en cumplimiento de la normativa regulatoria. El objetivo del presente trabajo fue realizar ensayos químicos y microbiológicos, complementados mediante técnicas de alta resolución, para un mejor entendimiento de la disminución y/o eliminación del contaminante lograda por el proceso. El ensayo microbiológico permitió de los cultivos microbianos aislados del proceso, obtener diez (10) cepas de bacterias puras. Cinco (5) cepas mostraron crecimiento en compuestos de hidrocarburos (hexadecano, naftaleno y fluoreno) y dos de ellas en diésel. Se constata la degradación de diésel por una cepa, de la experimentación y cuantificación realizada por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). Se observa una disminución en la intensidad de los máximos valores asociados a las n-parafinas con incremento de la mezcla de compuestos no resueltos (UCM) del ensayo químico realizado, a partir de la reducción de las cadenas parafínicas C₁₇ y C₁₈ respecto a compuestos isoprenoides pristano y fitano respectivamente. La disminución acontecida de los compuestos dimetil-fenantrenos con respecto a los trimetil-fenantrenos y la no presencia de mono-fenantrenos en la muestra analizada correspondiente al final del proceso, corroboran la eficiencia de degradación alcanzada en el tratamiento aplicado.

Palabras clave: remoción, disposición final, análisis instrumental.

ABSTRACT: The use of drilling fluids with diesel-based muds in Cuban oil drilling is one of the main causes that drives continuous research for the final treatment of waste impregnated with said muds. The combination of a chemical-biological process allowed the reduction of the content of fats and oils (G and A) and total hydrocarbons (HCT), indicator parameters of oil pollution. In the applied technology, analytical monitoring of physical-chemical parameters is carried out; chemical and microbiological, in compliance with regulatory standards. The objective of this work was to carry out chemical and microbiological tests, complemented by high resolution techniques, for a better understanding of the reduction and/or elimination of the contaminant achieved by the process. The microbiological assay allowed ten (10) strains of pure bacteria to be obtained from the microbial cultures isolated from the process. Five (5) strains showed growth in hydrocarbon compounds (hexadecane, naphthalene and fluorene) and two of them in diesel. The degradation of diesel by a strain is confirmed through experimentation and quantification carried out by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). A decrease in the intensity of the maximum values associated with n-paraffins is observed with an increase in the mixture of unresolved compounds (UCM) of the chemical test carried out, from the reduction of the C17 and C18 paraffinic chains with respect to isoprenoid compounds pristane and phytane respectively. The decrease that occurred in the dimethyl-phenanthrene compounds with respect to the trimethyl-phenanthrenes and the non-presence of mono-phenanthrenes in the analyzed sample corresponding to the end of the process, corroborates the degradation efficiency achieved in the applied treatment.

Keywords: removal, final disposal, instrumental analysis.

Recibido: 03/07/2024

Aprobado en su forma original: 15/12/2024

¹INVERSIONES GAMMA S.A., Calle 14, No. 308, e/ 3era y 5ta, Playa, La Habana, Cuba.

²Centro de Investigación del Petróleo (CUPET-INVESTIGACION), Churrucá No. 481, Cerro, La Habana, Cuba.
E-mail: daryeri711@gmail.com, sacosta@ceinpet.cupet.cu.

³Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría" (CUJAE), Calle 114 s/n e/ Ciclovia y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba. E-mail: amen@quimica.cujae.edu.cu.

*Correo electrónico: robertors@gamma.com.cu

Conflicto de Intereses: Los autores de este trabajo declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores: **Investigación:** Roberto Romero Silva, Miguel Díaz Díaz, Silvia Lilibet Acosta Díaz, José María Ameneiros Martínez. **Metodología:** Roberto Romero Silva, Miguel Díaz Díaz, Silvia Lilibet Acosta Díaz, José María Ameneiros Martínez. **Redacción. Primera redacción:** Roberto Romero Silva. **Revisión y ajustes:** Roberto Romero Silva.

Artículo bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

INTRODUCCIÓN

Los fluidos utilizados durante las labores de perforación de un pozo de petróleo, se denominan fluidos de perforación. Este término está restringido a los fluidos que se circulan a través del hoyo y cumplen con los requisitos mínimos de eficiencia, limpieza y seguridad durante la perforación de un pozo. El "fluido de perforación", incluye gas, aire, petróleo, agua y suspensión coloidal a base de agua y arcilla (Akpan *et al.*, 2019).

La composición o presencia de contaminantes en los cortes que se generan de la perforación dependen del fluido usado. Con una alta eficiencia del equipo de control de sólidos, es posible alcanzar una concentración de los mismos de hasta 96 %, siendo el restante 4 %, fluido de perforación adherido al corte (Chao, 2018).

La perforación de nuevos pozos de petróleo mediante la utilización de lodos base aceite (diésel combustible), para lograr mejores resultados en la extracción del crudo, trajo como consecuencia una serie de impactos ambientales negativos producto de la acumulación progresiva de estos cortes contaminados sin tratamiento definido para una disposición final del mismo.

Mediante una previa evaluación en microcosmos y posterior validación en campo, se demostró la viabilidad de aplicación de una tecnología mediante la combinación de un proceso químico - biológico, lográndose el manejo y disposición segura de estos cortes contaminados (Romero, 2023).

Durante la tecnología aplicada se realizan una serie de análisis físico-químicos; químicos y microbiológicos, que forman parte del seguimiento analítico, que permiten demostrar la disminución de la contaminación durante el tiempo de proceso transcurrido.

La aplicación de técnicas analíticas avanzadas favorece el entendimiento de dichos procesos. El limitado acceso a dichas técnicas, así como en ocasiones la no disponibilidad de material de referencia, patrones, misceláneas, entre otros, impide en muchos casos el completamiento de las investigaciones que se ejecutan.

Mediante esta investigación se pudieron realizar ensayos químicos y microbiológicos, complementados mediante técnicas de alta resolución, para un mejor entendimiento de la disminución y/o eliminación de la contaminación, corroborándose la eficiencia alcanzada por el proceso químico -biológico validado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos microbiológicos

Se obtuvieron cepas puras mediante la siembra en medio R₂A (Condalab) 25°C; 7,2+/-0,2, de veinticinco (25) cepas seleccionadas del aislamiento de bacterias resultantes del conteo de microorganismos degradadores de hidrocarburos a diferentes tiempos

del proceso biológico del tratamiento validado en campo que inicio a los 30 días y hasta los 200 días, coincidiendo con el final del tratamiento (Romero, 2021). La siembra se realizó por el método de estrías en placas.

Para la evaluación del crecimiento microbiano en compuestos de hidrocarburos por las cepas puras obtenidas se realizó la preparación de medio mineral (M.M) minerales base (BM) y minerales trazas (TM) y M.M BM TM+ agar (Grifoll, 2021).

Los compuestos evaluados en M.M fueron el diésel y hexadecano y en M.M agarizado el fluoreno, naftaleno, fenantreno y pireno. Las placas se prepararon y sembraron en cabina de flujo laminar y la adición de los compuestos se realizó en campana de extracción. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días, las que se resguardaron en bolsas de nylon para evitar la inhalación de los gases que desprenden los compuestos evaluados.

Se realizaron experimentos de cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés), marca Agilent 6890N con detector másico 5975 inert, de una cepa seleccionada que mostró crecimiento en M.M y/o M.M+agar en presencia de compuestos de hidrocarburos. A dicha cepa seleccionada se le realizó una siembra en medio R₂A y se verificó que la misma fuera un cultivo puro.

En la identificación de tres cepas que mostraron crecimiento en los compuestos evaluados, se realizó la secuenciación del ARN ribosomal 16s. La extracción de ADN se realizó a cultivos jóvenes de 24 horas a los que se les comprobó la pureza mediante siembra en R₂A. Se empleó como extractor IntageneChelex (BIO-RAD). La amplificación se realizó mediante una prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La calidad de la PCR se comprobó mediante electroforesis. La PCR se reveló en el Image Master empleando el sistema S4BR. Se llevaron a Secuenciador Automático ABI Prism 3700. Se emplearon las bases de datos BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) y se observó en el RPD (Ribosomal Database Project) (Romero, 2021).

Ensayos químicos

A partir de las muestras correspondientes al seguimiento analítico del proceso químico-biológico desde los 0 días y hasta los 200 días de tratamiento, que se extrajeron mediante técnica inicial gravimétrica y posterior extracción por columna de compuestos saturados y aromáticos según el método EPA 3540C, se realizó la cuantificación de diésel atendiendo a la concentración estimada para la fracción de hidrocarburos saturados (F1) y la fracción de hidrocarburos aromáticos (F2).

Las mismas se disolvieron en n-hexano y diclorometano respectivamente y se procedió a la mezcla de ambas. Adicionalmente se realizó la preparación del patrón de diésel con una concentración de partida de 10000 mg/kg. Del mismo se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 5000, 2500, 1250, 625 y 312,5 mg/kg. Para el análisis se empleó un equipo de cromatografía de gases marca SHYMADZU 2025 con detector de inoización de llama (FID por sus siglas en inglés) . Las muestras tambien fueron analizadas por GC-MS en la determinación de hidrocarburos aromáticos policilicos (HPAs, por sus siglas en Inglés) C1-, C2- y C3- fenantrenos (m/z 192+206+220).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran cinco (5) cepas puras seleccionadas de las 10 aisladas y obtenidas en medio R₂A. Se presenta una caracterización cultural de las colonias observadas al estereoscopio, *tabla 1*.

En la *tabla 2*, se muestran los resultados del crecimiento de bacterias en compuestos de hidrocarburos, por parte de las 5 cepas puras.

La cepa 623-3(1) mostró crecimiento en M.M en presencia de diésel y hexadecano y en M.M agarizado en presencia de naftaleno y fluoreno. En el caso de la cepa 623-3(2) mostró crecimiento en M.M agarizado en presencia de naftaleno y fluoreno. La cepa 341-1(1) tuvo igual comportamiento a la cepa 623-1 (1). La cepa 623-5(1) mostro crecimiento en M. M en presencia de diésel y hexadecano. Todas las cepas que mostraron crecimiento se sembraron nuevamente en R₂A comprobando que las mismas eran cultivos puros y que no existió contaminación durante la experimentación desarrollada.

A continuación se relacionan los resultados de la evaluación en la degradación de diésel por parte de la cepa 623-3 (1), mediante el experimento de cuantificación por CG-MS. En las *figuras 1, 2 y 3* se representan los perfiles cualitativos correspondientes a los cromatogramas obtenidos para las tres réplicas evaluadas e igual número de réplicas de un control.

Tabla 1. Aislados puros

Tiempo del proceso bilógico (días)	Cepas	Color	Forma	Elevación
90	623-3(1)	Amarilla	Circular, bordes enteros	Convexa
	623-3(2)	Blanca	Irregular, bordes ondulados	Plana
	623-5 (1)	Crema	Circular, bordes enteros	Convexa
200	341-1 (1)	rosada	Circular, bordes irregulares	Convexa
	341-2 (2)	Amarilla	Circular, bordes enteros	Convexa

Tabla 2. Crecimiento de bacterias en compuestos de hidrocarburos

Cepas	Diésel	Hexadecano	Naftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
623-3(1)	++	++	++	++	--	--
623-3(2)	--	--	++	++	--	--
623-5 (1)	--	++	--	--	--	--
341-1 (1)	++	++	++	++	--	--
341-2 (2)	--	--	++	++	--	--

++Crecimiento ; -- No crecimiento

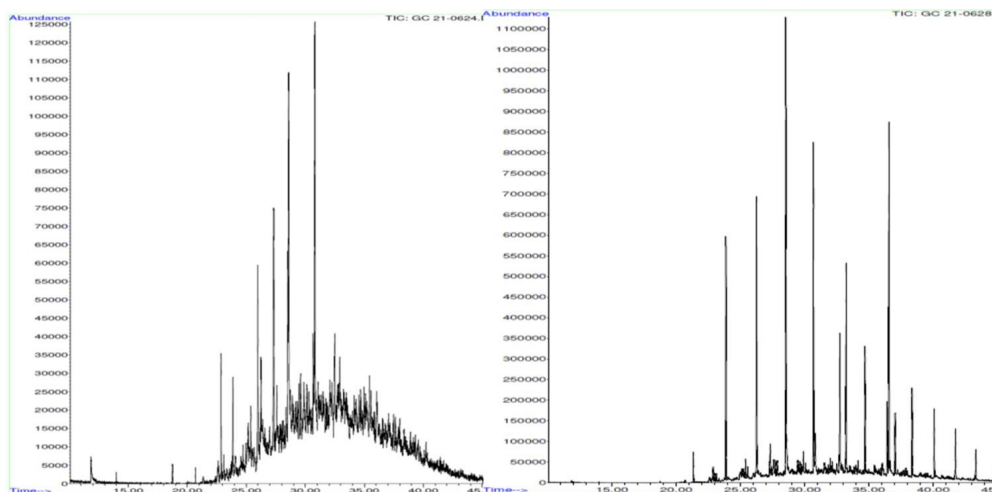


Figura 1. Muestra Réplica 1(a la izquierda) y control 1 (a la derecha).

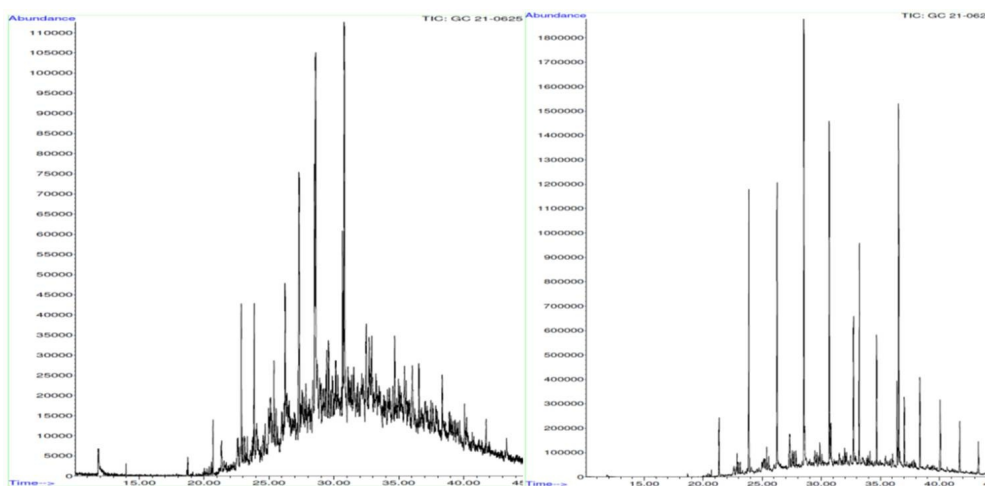


Figura 2. Muestra Réplica 2 (a la izquierda) y control 2 (a la derecha).

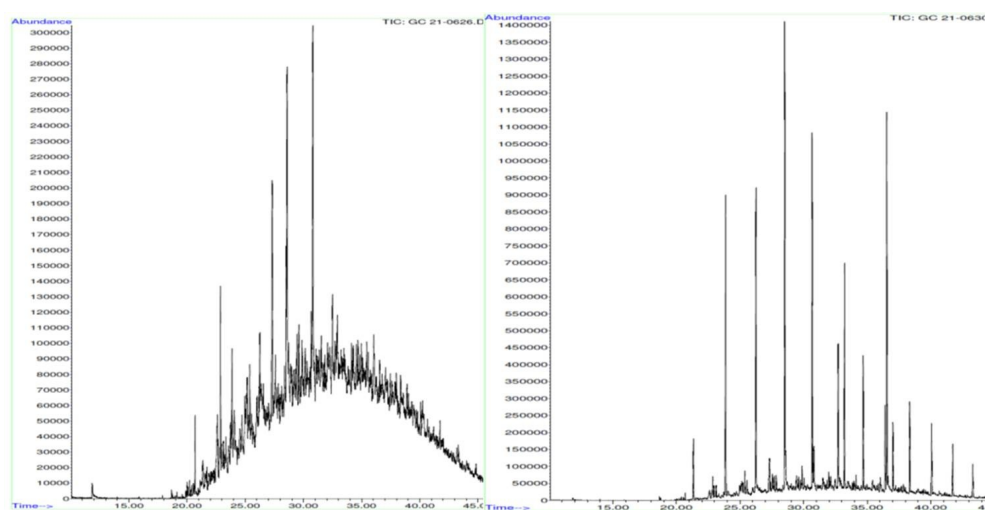


Figura 3. Muestra Réplica 3 (a la izquierda) y control 3 (a la derecha).

Como se puede observar en las figuras 1, 2 y 3, los cromatogramas muestran un incremento de la curva UCM (mezcla de compuestos no resueltos) de las muestras con respecto a los controles, lo que indica que ha existido degradación de diésel por la cepa evaluada. Esta degradación se corresponde con la disminución de hidrocarburos alifáticos de n-alcános de 14 a 29 átomos de carbono (n-C₁₄ a n-C₂₉).

En la tabla 3 se muestra la cuantificación de las relaciones de áreas de n-C₁₇/ Pristano y n-C₁₈/ Fitano, evidenciando una reducción de las cadenas parafínicas C₁₇ y C₁₈ respecto a compuestos

isoprenoides pristano y fitano de las muestras y réplicas correspondiente a la cepa evaluada con respecto a los controles.

Al comparar las relaciones C17/ Pristano y n-C18/ Fitano entre muestras y control, se observa que los valores disminuyen aproximadamente en un 80 y 60 % para cada relación respectivamente. Esta disminución de los isoprenoides indica la efectividad de la biodegradación acontecida.

En el siguiente esquema se presentan los resultados de la secuenciación del ARN ribosomal 16s de las cepas 341-2 (2) (1), 623-3(1)-(2) 341-1 (1)-(3) .

Tabla 3. Relaciones de áreas de n-C17/ Pristano y n-C18/ Fitano

Muestra (M) Control (C)	n-C17/ Pristano	n-C18/ Fitano
M-1	1.84	2.91
C-1	9.58	5.10
M-2	1.43	2.34
C-2	9.76	4.11
M-3	1.72	2.84
C-3	9.44	4.23

Classifier :: Assignment Detail

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set No 18 07/2020
 Query File: Sanger.fas
 Query Submit Date: Wed Apr 21 07:11:11 EDT 2021

Lineage (click to return to particular node):

Root (11)

Assignment Detail (for Root with Confidence threshold: 80%):

download

1 - Root[100%] Bacteria[95%] Actinobacteria[39%] Actinobacteria[39%] Micrococcales[26%] Microbacteriaceae[18%] Rudaibacter[7%]
 2 - Root[100%] Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Alphaproteobacteria[100%] Sphingomonadales[100%] Sphingomonadaceae[100%]
 3 - Root[100%] Archaea[56%] Crenarchaeota[32%] Thermoprotei[32%] Thermoproteales[24%] Thermoproteaceae[24%] Caldívirga[21%]

Los resultados arrojaron que la cepa 341-2 (2) se identifica como *Actinobacterias*, la cepa 623-3(1) como *Shingomona Paucimobilis* y la 341-1(1) es de dominio Archea.

Las *Actinobacterias* o *actinomicetos* pertenecen a la clase de bacterias Gram positivas, estas se encuentran en los suelos e incluyen algunas de las más típicas formas de vidas terrestres, jugando un importante papel en la descomposición de materia orgánica. Estas bacterias presentan una elevada versatilidad metabólica, siendo capaces de utilizar un amplio espectro de HAPs e incluso otros contaminantes, como por ejemplo los alcanos (Izquierdo, 2013).

Las *Shingomonas* son bacterias Gram negativas. Estas presentan características filogenéticas, ecológicas y fisiológicas diversas. Por tal motivo son llamadas por cuatro géneros que se denominan esfingomonas. Las esfingomonas se encuentran distribuidas extensamente en la naturaleza. Debido a sus capacidades biodegradantes y biosintéticas se han utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación de contaminantes ambientales (Bourne *et al.*, 2001). La capacidad catabólica de degradar distintos compuestos xenobióticos por las *Shingomonas* es amplia, y se conoce de la gran variedad de exopolisacáridos que producen, lo cuales podrían ser utilizados para la degradación de distintos compuestos. Algunos miembros de su género se han caracterizado por su gran habilidad para degradar HAPs entre otros (Montoya, 2017).

El dominio *Archea* está compuesto por organismos procariontes unicelulares muy similares y al mismo tiempo muy diferentes a las bacterias. Por tal motivo, se recomienda realizar un posterior análisis de este organismo unicelular, atendiendo a su presencia y los resultados acontecidos para este en el accionar del tratamiento evaluado.

En las figuras 4, 5, 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis por cromatografía gaseosa (CG) con detector FID de los extractos orgánicos de la mezcla de compuestos saturados y aromáticos (F1 y F2), correspondientes a diferentes tiempos de análisis del tratamiento (tabla 4).

Tabla 4. Identificación de los cromatogramas por CG

Muestra	Tiempo (días)
542_F1 y F2 (figura 4)	0
543_F1 y F2 (figura 5)	0+PQ
600_F1 y F2 (figura 6)	30+PB
154_F1 y F2 (figura 7)	200+PB

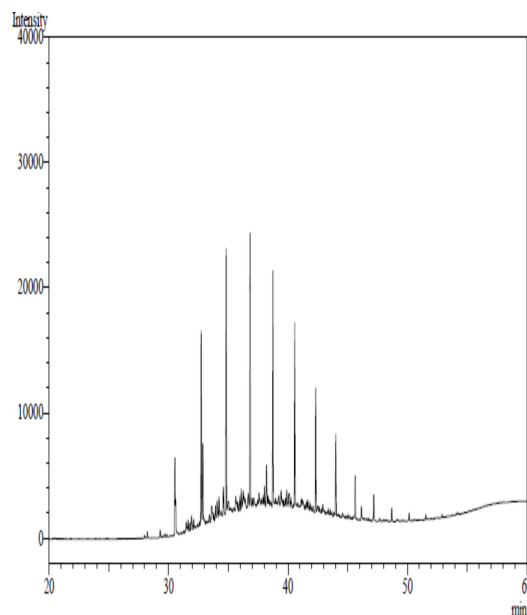


Figura 4. Cromatograma 542 F1 y F2

Como se aprecia en los cromatogramas obtenidos, existe una disminución cualitativa asociada a la intensidad de los mismos al inicio del tratamiento y con el PQ y posteriormente el PB. Al finalizar el tratamiento la intensidad es menor a toda la alcanzada para los diferentes tiempos monitoreados, lo que indica la degradación ocurrida de los compuestos de hidrocarburos saturados y aromáticos.

En la tabla 5 se muestran los valores correspondientes a las áreas asociadas de los cromatogramas obtenidos de las muestras y de un patrón de diésel a las diferentes concentraciones evaluadas. Esta experimentación permitió determinar el contenido de diésel que fue posible disminuir en los cortes contaminados durante el tratamiento.

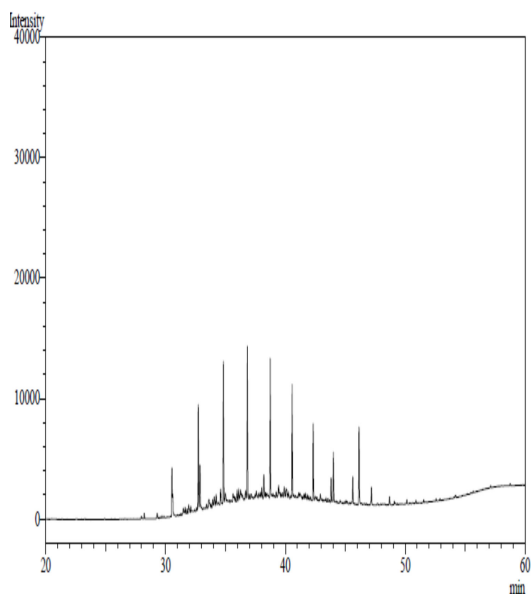


Figura 5. Cromatograma 543 F1 y F2

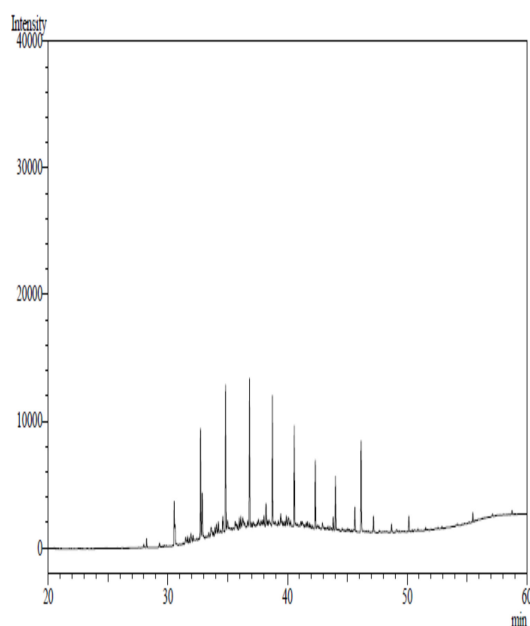


Figura 6. Cromatograma 600 F1 y F2

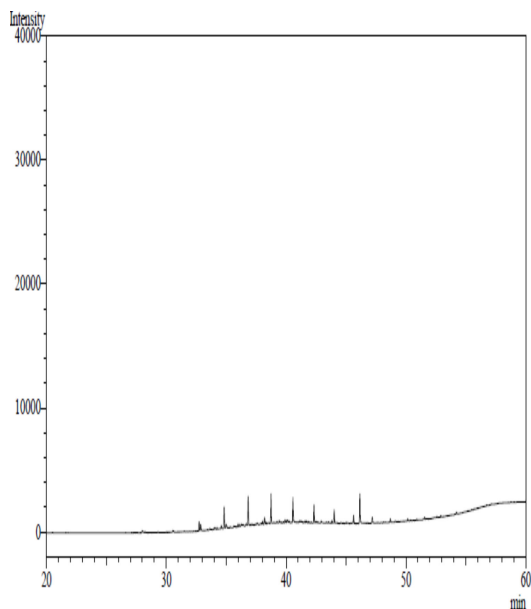


Figura 7. Cromatograma 154 F1 y F2

Tabla 5. Áreas de las muestras y el patrón de diésel

Muestra	Áreas
542 F1 y F2	4095467,2
543 F1 y F2	3276965,1
600 F1 y F2	3220127,6
154 F1 y F2	1803409,1
Patrón a 5000 (mg/kg)	37391695,5
Patrón a 2500 (mg/kg)	16624599,8
Patrón a 1200 (mg/kg)	8847826,6
Patrón a 600 (mg/kg)	5190391,8
Patrón 300 (mg/kg)	4310929,2

Para determinar las concentraciones en que se encuentra el diésel en las muestras analizadas se utilizó un gráfico de concentración del patrón en función del área. De la ecuación de la recta de la curva obtenida (figura 8), se calcula la concentración que tiene cada muestra analizada a los diferentes tiempos del tratamiento ejecutado.

En la siguiente tabla 6 se reflejan las concentraciones calculadas de las muestras analizadas. Se evidencia la disminución de diésel de los cortes tratados durante el seguimiento de ambos procesos y hasta finalizar el tratamiento.

En la tabla 7 se muestran las relaciones n-C17/Prístano y n-C18/Fitano evidenciando de manera general una reducción de las cadenas parafínicas C₁₇ y C₁₈ respecto a compuestos isoprenoides pristano

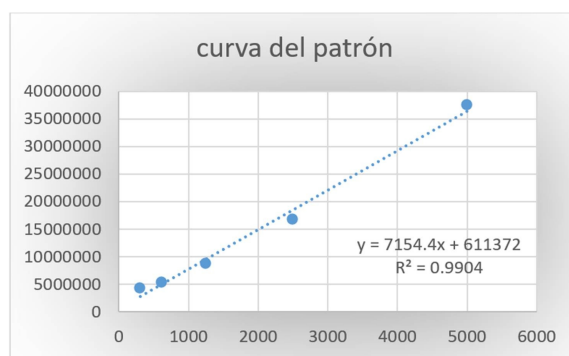


Figura 8. Gráfico área-concentración del patrón

y fitano determinados durante el proceso y en comparación con la culminación de este.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por CG-MS en la determinación de los HPAs C1-P, C2-P y C3-P, fenantrenos (m/z 192+206+220) de la muestra No. 542 correspondiente al inicio del tratamiento (figura 9) y dimetil-fenantrenos (198+212+226) de la muestra 154 al final del tratamiento (figura 10).

Tabla 6. Concentraciones de las muestras

Muestra	Concentración		
	ppm	ug aceite	ug/g Suelo
542_F1 y F2	487,0	4869,9	487,0
543_F1 y F2	372,6	3725,8	372,6
600_F1 y F2	364,6	3646,4	364,6
154_F1 y F2	166,6	1666,2	166,6

Tabla 7. Relaciones n-C17/Pristano y n-C18/Fitano por muestra evaluada

Muestra	n-C ₁₇ /Pristano	n-C ₁₈ /Fitano
542_F1 y F2	1.563	1.459
543_F1 y F2	1.644	1.411
600_F1 y F2	1.514	1.562
154_F1 y F2	1.214	0.859

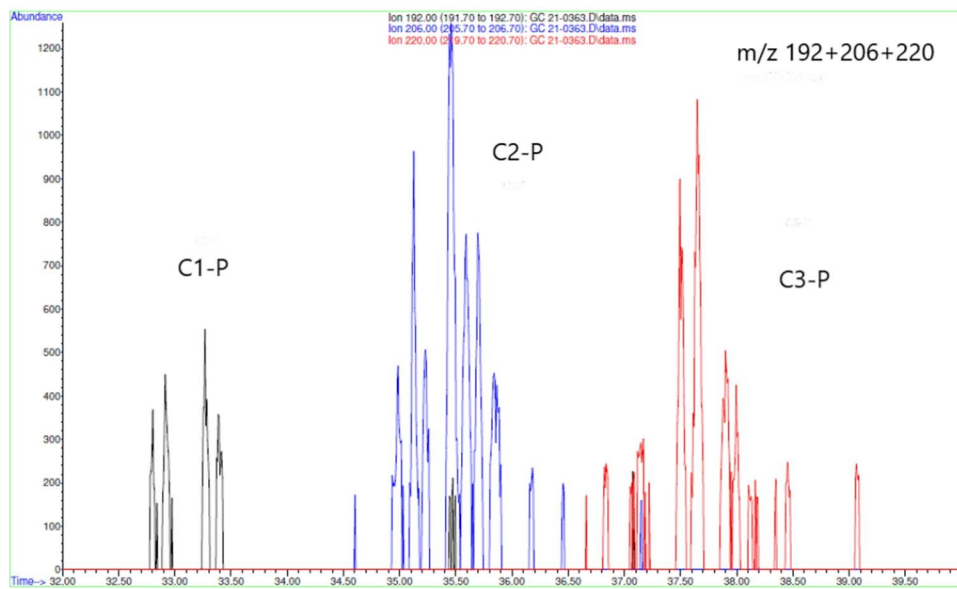


Figura 9. Cromatograma. Muestra No. 542_F1 y F2

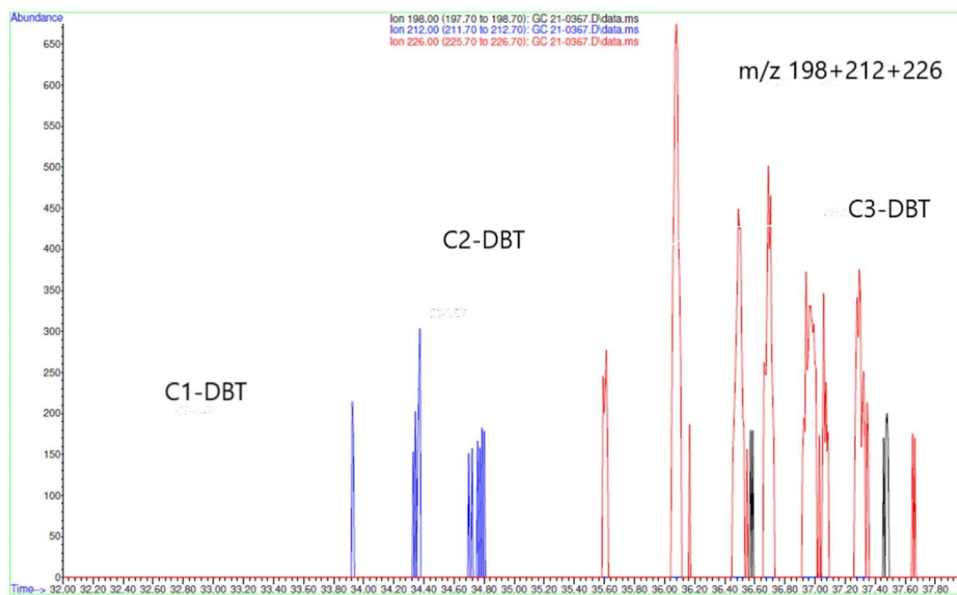


Figura 10. Cromatograma. Muestra No. 154_F1 y F2

Se observa en el cromatograma de la muestra No. 154 correspondiente al final del proceso, una disminución de los dimetil-fenantrenos (C2-DBT), encontrándose estos por debajo de los trimetil-fenantrenos (C3-DBT). Adicionalmente, se aprecia la pérdida de los mono-fenantrenos (C1-DBT) al no existir presencia de estos al final del tratamiento. Estos resultados corroboran la biodegradación ocurrida para estos compuestos por la aplicación del tratamiento y la eficiencia alcanzada por este.

CONCLUSIONES

Cinco cepas puras aisladas mostraron crecimiento en compuestos de hidrocarburos. Se constató la degradación de diésel por parte de la cepa 623-3 (1), identificada como *Shingomona Paucimobilis*, mediante la disminución de hidrocarburos alifáticos de n-alcános de 14 a 29 átomos de carbono. La cepa 341-2(2) se identifica como *Actinobacterias*. Ambas mostraron crecimiento en todos los compuestos de hidrocarburos evaluados, presentando una elevada versatilidad metabólica, siendo capaces de degradar un amplio espectro de compuestos del petróleo, entre ellos los HAPs según la literatura especializada. Los análisis químicos confirman la degradación de diésel de la experimentación y cuantificación realizada desde el inicio del tratamiento ascendente a 487,0 ug/g suelo y de 166 ug/g suelo al finalizar el tratamiento. Esta degradación se constató con la disminución acontecida para los compuestos dimetil-fenantrenos con respecto a los trimetil-fenantrenos y la no presencia de mono-fenantrenos, en comparación con el inicio y final del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Akpan E.U., Enyi, G, Nasr, G. Yahaya, A., Ahmadu, A. A & Saidu B. 2019. "Water-based drilling fluids for high-temperature applications and water-sensitive and dispersible shale formations." *Journal of Petroleum Science and Engineering* Volume 175: 1038.
- Bourne, David G. Riddles, Peter, Jones, Gary J, Smith, Wendy & Blakeley, Robert. L2001. Characterization of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environment Toxicology (en frances)* 16 (6): 523-534. ISSN 1522-7278. Doi 10.1002/tox.10013 . [Consultado: Septiembre 4, 2019].
- Chao C. 2018. Proceso de estabilización química-biológica en el tratamiento de residuos sólidos de lodo base combustible diésel. Tesis presentada en opción al título de Ingeniero, Químico, Cuba: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría".
- Environmental Protection Agency. 1996. DC (EPA), METHOD 3540C SOXHLET EXTRACTION, Washington, revision 3.
- Grifoll, M. 2021. Comunicación personal. Estancia de Investigación SEIGB, Fundación Carolina, Barcelona, España.
- Izquierdo Romero A. R. 2013. Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aerobia de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universitat de Barcelona.
- Montoya Sanchez L A. 2017. Capacidad de degradación xenobiótica por microorganismos de suelos arroceros tratado con el plaguicidas en el tolima. Tesis presentada para optar por el título de biólogo, IBAGUE:Universidad del Tolima.
- Romero Silva, R. 2021. Informe final. Evaluación analítica del tratamiento de estabilización químico-biológica de cortes de perforación contaminados con lodos base diésel. Estancia de Investigación SEIGB, otrogada por la Fundación Carolina, Barcelona, España.
- Romero Silva R. 2023. Tecnología de tratamiento mediante la estabilización químico-biológica de cortes de perforación contaminados con lodos base combustible diésel. Tesis presentada en opción al título de Dr. C. Técnicas, Cuba: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría".