

Uso de biodiesel en la biorremediación de derrames de petróleo crudo

Recibido: 15 Febrero 2014 – Revisado: 30 Abril 2014

Aceptado: 30 Mayo 2014 – Publicado: 30 Julio 2014



Jorgelina C. Pasqualino

PhD. Docente investigador de Programas Ambientales, Grupo de Investigación Ambiental, Fundación Universitaria Tecnológica Comfenalco, Sede A, Barrio España Cr 44 D N° 30A – 91, Cartagena, Colombia.
jpasqualino@tecnocomfenalco.edu.co

Jorgelina C. Pasqualino

PhD. Director del Área de Bioenergía y Biocombustibles, Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC), Tarragona, España.
PhD. Profesor titular, Departament d'Enginyeria Química (DEQ), Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, España.
jsalvado@irec.cat

Resumen: El biodiesel es un combustible basado en ésteres metílicos de ácidos grasos con numerosas ventajas ambientales. Una de las más importantes es su elevada biodegradabilidad y su habilidad para disolver el petróleo crudo. En este estudio, se prepararon mezclas de petróleo crudo pesado y biodiesel y se midieron las densidades y viscosidades de dichas mezclas con el fin de evaluar la facilidad de recolección de las mismas en una zona afectada por un derrame.

Se encontró que la densidad de todas las muestras estaba por debajo de la densidad del agua de mar, lo que indica que estas flotarán en la superficie. La viscosidad de las mezclas fue inferior varios órdenes de magnitud con respecto a la viscosidad del petróleo crudo pesado; esto indica la posibilidad de bombear fácilmente las mismas.

Adicionalmente, se estudió la biodegradabilidad de las mezclas mediante el método de evolución de CO₂. En todos los casos, la biodegradabilidad se incrementó con la adición del biodiesel y mostró la presencia de efectos sinérgicos debidos a cometabolismo. La mezcla, que contenía 50 % de petróleo crudo, demostró el mayor efecto sinérgico. Finalmente, se plantearon diversas soluciones para el tratamiento de aguas y suelos afectados por un derrame de petróleo crudo pesado.

Palabras clave: Biodegradación, biodiesel, cometabolismo, derrame de petróleo.

Abstract: Fatty acid methyl esters based fuel, known as biodiesel, is a clean renewable fuel with many environmental advantages. One of the most important is its high biodegradability and the ability to dissolve crude oil. In this study, we prepared mixtures of heavy crude oil and biodiesel and measured the density and viscosity in order to evaluate the possibility of collecting them from an affected area. The density of all the mixtures was below the density of sea water and the viscosity was several orders of magnitude lower than the viscosity of the pure crude oil. We also studied the biodegradability of the mixtures using the CO₂ evolution test. In all the cases, the biodegradability was increased by the addition of biodiesel, showing that synergic effects occur by means of cometabolism. The mixture with 50 % fuel oil had the highest synergic effect. Several solutions are proposed for treating soils and water affected by an oil spill.

Key words: Biodegradation, biodiesel, cometabolism, oil spill.

1. INTRODUCCIÓN

El biodiesel es un combustible de origen renovable compuesto de esteres metílicos de ácidos grasos, obtenido a partir de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales, con propiedades similares a las del combustible diesel de origen fósil, al cual puede reemplazar fácilmente (Mittelbach & Remschmidt, 2004).

El biodiesel presenta numerosas ventajas ambientales, dado que reduce considerablemente las emisiones y presenta una elevada biodegradabilidad. Existen numerosos estudios que reflejan la biodegradabilidad del biodiesel en agua dulce y suelos. Bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, se han alcanzado tasas de mineralización de 90-98% en periodos de 21-28 días (Jakeria, Fazal & Haseeb, 2014; Makareviciene & Janulis, 2003; Pasqualino, Montané & Salvadó, 2006; Zhang, Peterson, Reece, Möller & Haws, 1998).

Muestras de biodiesel de diferente origen han demostrado una elevada biodegradabilidad en el medio acuático y sus mezclas con combustible diesel de origen fósil han presentado efectos sinérgicos. Esto demuestra que el biodiesel acelera la biodegradación del diesel por efecto del cometabolismo (Demirbas, 2008; Lisiecki et al., 2014; Mariano, et. al, 2008; Pasqualino et al., 2006; Yassine, Wu, Suidan & Venosa, 2013; Zhang et al., 1998).

En las transformaciones cometabólicas, los microorganismos utilizan un segundo sustrato de elevada biodegradabilidad (en este caso el biodiesel) como fuente de carbono y energía para degradar el primer sustrato (en este caso el diesel) (Alexander, 1994; Mariano et al., 2008; Pasqualino et al., 2006; Zhang et al., 1998). De este modo, el cometabolismo puede ser empleado en la eliminación de sustratos resistentes como el petróleo crudo.

Un derrame de petróleo es uno de los más serios desastres que pueden ocurrir en el ambiente marino, ya que causa un daño ambiental, social y económico considerable, especialmente cuando el petróleo alcanza la costa, donde es más difícil su eliminación (Pereira & Mudge, 2004). Luego de que ocurre un derrame de petróleo en un cuerpo de agua, las fracciones más livianas se evaporan, en tanto que la foto-oxidación y la biodegradación eliminan lentamente las fracciones pesadas (CSIC, 2003a).

Algunos ejemplos de accidentes que causaron derrames considerables de petróleo son: el Exxon Valdez, que derramó 11 millones de galones de petróleo crudo en las costas de Alaska (marzo 1989); el Érika, que derramó 10 millones de galones de petróleo crudo en las costas francesas (diciembre 1999); el Prestige, que derramó cerca de 18 millones de galones de petróleo crudo pesado en el Océano Atlántico, frente a las costas de Galicia, España (noviembre 2002) (CEDRE, 2003a); y más recientemente, el accidente de la plataforma Deepwater Horizon (BP), que derramó cerca de 210 millones de galones de petróleo crudo en el Golfo de México (US Coast Guard, 2011) y se convirtió en el mayor accidente de la historia de la industria petrolera.

El tipo de producto que transportaba el Prestige era un compuesto pesado, residuo de la destilación de petróleo crudo luego de la eliminación de las fracciones livianas, con aplicaciones en procesos de combustión industrial (centrales termoeléctricas y hornos). Contiene 86,8% C, 11% H, 2,28% S y 0,69% N, con una densidad de 990 kg/m³ (a 15°C) y una viscosidad de 615 mPas (a 50°C) y 30.000 mPas (a 15°C) (CEDRE, 2003b). Debido a su baja solubilidad y volatilidad, este tipo de producto es persistente en el ambiente, como lo demuestra el hecho que las muestras recogidas en las playas gallegas dos semanas luego del accidente no presentaban signos de transformación.

La viscosidad del petróleo es uno de los parámetros más importantes cuando se seleccionan las técnicas de recolección en el mar y de limpieza de la costa. Además, este tipo de producto se degrada muy lentamente en el mar (cerca de 12% en un mes); por ello, se hace necesaria su recogida (por lo general de forma manual), antes de que puedan emplearse otros procedimientos de limpieza (CSIC, 2003b).

Aunque los procesos biológicos dependen de numerosos factores y funcionan de forma diferente en cada caso particular, es posible estimar que una zona afectada por un derrame de petróleo se recupera naturalmente en un periodo de entre cinco y diez años. Este plazo puede reducirse a la mitad mediante la aplicación de técnicas de biorremediación, como ocurrió en el caso del accidente del Exxon Valdez.

Algunos estudios sugieren la aplicación de biodiesel como solvente para la limpieza de arena contaminada con petróleo crudo (Bravo-Linares, Ovando-Fuentealba, Mudge & Loyola-Sepulveda, 2013; Miller & Mudge, 1997; Mudge & Pereira, 1999; Pereira & Mudge, 2004), demostrando que la mayor parte del petróleo se elimina luego de la adición de biodiesel en relaciones 1:2 o 1:1.

El rociado de biodiesel es una operación simple y de bajo coste que si demuestra ser ambientalmente favorable, puede tener numerosas aplicaciones en el tratamiento de zonas afectadas con derrames de petróleo. Sin embargo, no existe mucha información sobre la biodegradabilidad y toxicidad de la mezcla que queda en el ambiente (Pereira & Mudge, 2004).

El objetivo de este estudio es evaluar la posibilidad de utilizar biodiesel para degradar por medio del cometabolismo, un petróleo crudo pesado similar al derramado por el Prestige. Adicional a ello, se analizan los perfiles de densidad y viscosidad de las mezclas de ambos combustibles, debido a su importancia en la selección del mejor método de recolección.

2. METODOLOGÍA

2.1 Determinación de propiedades físicas de las mezclas

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro rotatorio modelo Viscotester VT550, con un sensor MV1, indicado para líquidos de viscosidad media-alta. El equipo cuenta con 10 programas y seis niveles de velocidad que se seleccionan en función de la viscosidad del líquido, y cubren el rango 0,5 a 800 rpm. La temperatura del análisis se controló mediante una camisa de recirculación que rodea el sensor. La viscosidad de todas las muestras se determinó utilizando seis niveles de velocidad y tres temperaturas: 4, 20 y 40°C.

Para la determinación de la densidad y debido a la elevada viscosidad de la mayoría de mezclas y del petróleo crudo, el uso de picnómetros convencionales no se recomienda. Se utilizó, por lo tanto, un tubo graduado (50 mL), previamente calibrado para la determinación de densidad por gravimetría; además, se verificó con un picnómetro capilar la precisión del método empleado (solo para las muestras de menor viscosidad). Se determinó la densidad a 3 temperaturas: 15, 20 y 40°C.

2.2 Biodegradabilidad – Ensayo de evolución de CO₂

Se determinó la biodegradabilidad de diferentes mezclas biodiesel-petróleo crudo utilizando el ensayo de evolución de CO₂ (USEPA, 1996). Aunque este método es poco preciso cuando se evalúa la degradación de un sustrato de forma individual, los resultados pueden llevar a conclusiones valideras si se utiliza para comparar la evolución de diferentes sustratos analizados bajo las mismas condiciones (Pagga, 1997). El ensayo se basa en la mineralización del sustrato en condiciones aeróbicas y con el suplemento de nutrientes, de forma que los microorganismos metabolicen el sustrato a CO₂ y agua.

El método considera que el CO₂ es el principal indicador de la eliminación de la materia orgánica. Si el sustrato es la única fuente de carbono, se puede asumir que el CO₂ producido es proporcional al carbono del sustrato consumido por los microorganismos. De este modo, el porcentaje de evolución de CO₂ con respecto al máximo teórico es proporcional al porcentaje de degradación del sustrato (Demirbas, 2008; Mariano, Geraldés, de Angelis & Bonotto, 2007; Mariano et al., 2008; Pagga, 1997; Pasqualino et al., 2006; Zhang et al., 1998).

Aunque existen algunos dispositivos de análisis automático (Calmon, Dusserre-Bresson, Bellon-Maurel, Feuilleley & Silvestre, 2000), el ensayo se realiza generalmente de forma manual (Szaraz & Beczner, 2003). Un parámetro importante que no puede estandarizarse es el inóculo utilizado; aunque por lo general, el uso de lodos activados procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas da buenos resultados, debido a su adaptabilidad al sustrato (Mariano et al., 2008; Pagga, 1997; Pasqualino et al., 2006).

Para el ensayo, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL preparados con 225 mL de medio de cultivo, 25 mL de inóculo y la cantidad de sustrato necesaria para suministrar el equivalente a 10-20 g de carbono. Todos los sustratos se analizaron por triplicado. Se utilizaron tres matraces de control (225 mL de medio de cultivo y 25 mL de inóculo) para determinar la cantidad de CO₂ producido por materia orgánica diferente del sustrato (posiblemente presente en el inóculo).

El medio de cultivo se preparó con 0,5 g K₂HPO₄, 1,0 g NH₄Cl, 2,0 g Na₂SO₄, 2,0 g KNO₃, 0,2 g MgSO₄·7H₂O y trazas de FeSO₄·7H₂O por litro de agua destilada y desionizada. El inóculo utilizado fue una muestra de lodos activados procedentes del reactor de tratamiento aeróbico de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de Tarragona (España).

La aclimatación del inóculo se realizó mediante la adición de medio de cultivo y una pequeña porción de sustrato y la aeración continua durante dos semanas.

La degradación se monitoreó durante un periodo de 28 días mediante la determinación del CO₂ capturado en un recipiente suspendido en los matraces, el cual contenía una solución de NaOH 0,1 M. En periodos predeterminados, se extrajo la solución de NaOH del recipiente y se reemplazó con solución de NaOH fresca. A cada solución extraída se le adicionó BaCl₂ para facilitar la precipitación de los carbonatos formados y se analizó el contenido de NaOH restante mediante titulación potenciométrica con HCl (0,1 N).

Para mejorar la confiabilidad de los resultados, se recomienda que todos los sustratos se analicen de forma paralela y bajo las mismas condiciones. Sin embargo, por limitaciones de espacio y material, se realizaron dos ensayos diferentes. En el primero, los sustratos evaluados fueron: biodiesel, petróleo crudo y mezclas de ambos con 25, 50, y 75 % (p/p) de petróleo. En el segundo ensayo, los sustratos evaluados fueron: biodiesel, petróleo crudo y mezclas de ambos con 12,5, 37,5, 62,5, y 87,5 % (p/p) de petróleo.

Tabla 1. Análisis elemental de los sustratos evaluados.

Elemento	Biodiesel	Petróleo crudo
C	76,8 ± 0,2 ^b	86,3 ± 0,3
H	13,7 ± 0,2	11,7 ± 0,3
N	0,0	0,5
S	0,0	1,9
O ^a	9,5	0,0

^a Ha Calculado por diferencia

^b Intervalo de confianza = 0.01

El biodiesel y el petróleo utilizados en los ensayos fueron proporcionados por la empresa BIONET Europa, la cual produce el biodiesel a partir de aceite vegetal residual. El petróleo analizado era un producto con características similares al derramado por el Prestige.

En la Tabla 1, se presenta el análisis elemental de ambos sustratos; a partir de este, se calculó el contenido en carbono de cada mezcla agregada a los matraces.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Viscosidad y densidad

Con respecto a la densidad, se observó que para todas las temperaturas evaluadas, la totalidad de las muestras presenta una densidad inferior a la del agua de mar; esto indica que todas las mezclas flotarán en el mar. Además, la densidad disminuye al aumentar el porcentaje (%) de biodiesel en la mezcla, desde los 940-980 Kg/m³ correspondientes al petróleo crudo, hasta los 880-890 Kg/m³ correspondientes al biodiesel puro.

La viscosidad de las muestras se presenta en la Tabla 2, donde los valores faltantes corresponden a aquellas muestras cuya viscosidad, a la temperatura del análisis, fue superior a la capacidad del instrumento (10.000 mPas). Sin embargo, se aprecia claramente que la viscosidad disminuye considerablemente a medida que aumenta el porcentaje de biodiesel en la mezcla.

Por ejemplo, a 40°C, se observa un cambio en la viscosidad de varios órdenes de magnitud con solo un 12,5 % de biodiesel. La viscosidad del petróleo crudo pesado a 4°C, que es la temperatura aproximada del agua de mar en la zona del derrame del Prestige (se obtuvo de bibliografía), es aproximadamente de 300.000 mPas. Podemos ver que agregando solo un 25% de biodiesel, se reduce la viscosidad a menos del 2% de la del petróleo.

Tabla 2. Viscosidad de las mezclas Biodiesel-Petróleo crudo.

Sustrato	Viscosidad (mPa)		
	4°C	20°C	40°C
100% biodiesel	8,7 ± 0,2 ^a	4,8 ± 0,5	3,2 ± 0,2
12,5% petróleo crudo	15,5 ± 0,2	10,2 ± 0,2	4,2 ± 0,4
25% petróleo crudo	26 ± 0,5	17,1 ± 0,4	8,6 ± 0,4
37,5 % petróleo crudo	55 ± 0,6	24 ± 0,9	15,8 ± 0,7
50% petróleo crudo	160 ± 3	24 ± 0,6	22 ± 0,8
62,5 % petróleo crudo	650 ± 12	185 ± 7	70 ± 2
75% petróleo crudo	4.900 ± 140	950 ± 25	200 ± 1
87,5% petróleo crudo		4.500 ± 50	260 ± 3
100% petróleo crudo	300.000 ^b		7.200 ± 200

A Intervalo de confianza =0.01

B Tomado de CEDRE, 2003b

3.2 Biodegradabilidad

En las figuras 1 y 2 se presentan las curvas de evolución de CO₂ de ambos experimentos. En los dos casos, se aprecia que la biodegradabilidad del biodiesel puro alcanza valores cercanos al 100% durante el periodo del ensayo (28 días); en tanto que la biodegradabilidad de las mezclas disminuye al aumentar su contenido en petróleo, llega a un valor cercano al 20% para el petróleo puro.

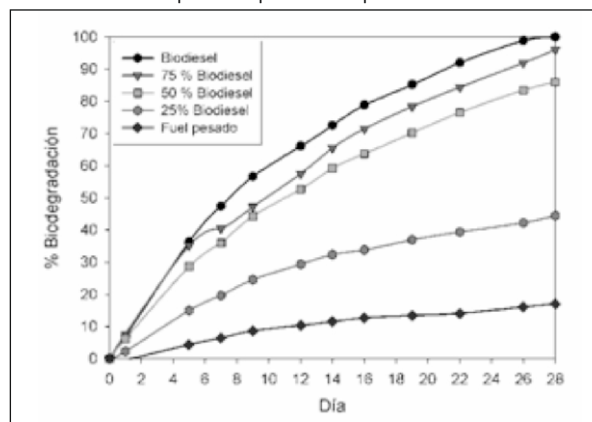


Figura 1. Biodegradabilidad de las mezclas biodiesel-petróleo crudo para el primer experimento.

La cinética de biodegradación se modeló como una reacción de primer orden en todos los casos. En la Tabla 3, se presentan las constantes cinéticas correspondientes.

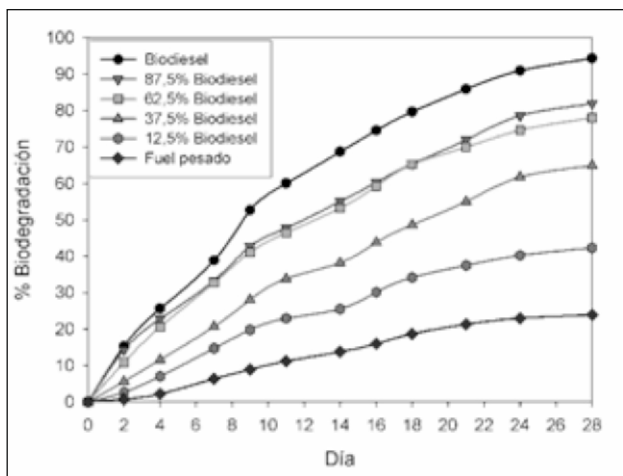


Figura 2. Biodegradabilidad de las mezclas biodiesel-petróleo crudo para el segundo experimento.

Tabla 3. Constantes cinéticas de biodegradación.

Sustrato	Constante cinética de 1er orden
100% biodiesel	0,101 ^a /0,087 ^b
12,5% petróleo crudo	0,061
25% petróleo crudo	0,079
37,5% petróleo crudo	0,056
50% petróleo crudo	0,067
62,5% petróleo crudo	0,038
75% petróleo crudo	0,023
87,5% petróleo crudo	0,022
100% petróleo crudo	0,007 ^a /0,011 ^b

A Correspondiente al primer experimento

B Correspondiente al segundo experimento

El efecto sinérgico del biodiesel sobre la biodegradación del petróleo se evaluó a partir de una combinación lineal de los valores de biodegradabilidad de las muestras puras [4], de acuerdo con la Ecuación 1:

$$BTM = PPC \cdot BPC + PBD \cdot BBD$$

Donde:

BTM: biodegradabilidad teórica de la mezcla.

PPC: % de petróleo crudo en la mezcla.

PBD: % de biodiesel en la mezcla.

BPC: biodegradabilidad del petróleo crudo.

BBD: biodegradabilidad del biodiesel.

Los resultados de la combinación lineal se compararon con los datos experimentales obtenidos para las mezclas durante los 28 días del ensayo.

Los efectos sinérgicos fueron positivos para todas las mezclas, lo que demuestra que el biodiesel mejora la biodegradación del petróleo crudo pesado por medio del cometabolismo. Como ejemplo, en la Figura 3 se presentan los efectos sinérgicos de la mezcla 50 % biodiesel – 50 % petróleo crudo pesado. En ella, se observa que la biodegradabilidad teórica de la mezcla sería de aproximadamente 60 % en tanto que el valor experimental alcanzó el 80 %.

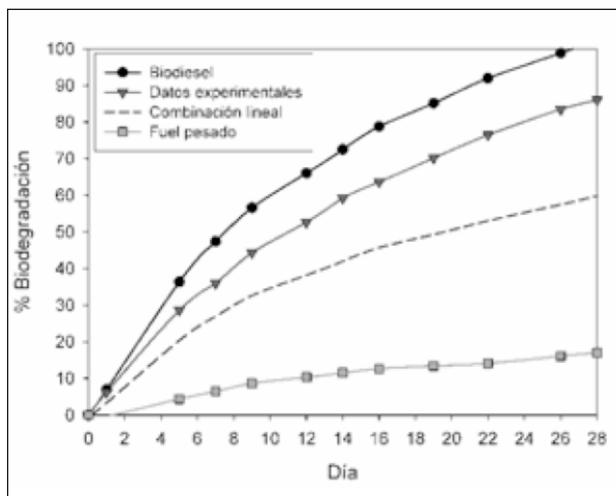


Figura 3. Efectos sinérgicos en la biodegradación de la mezcla 50 % biodiesel – 50 % petróleo crudo.

3.3 Posibles aplicaciones prácticas

Aunque esta tecnología debe aún ser probada en campo, los resultados sugieren que podría tener aplicación en las siguientes situaciones:

- Escenario 1: Derrame de petróleo en el mar. Se propone el rociado del combustible derramado con biodiesel; de este modo, se disminuye la densidad y viscosidad de la mezcla. Su baja densidad la mantendría sobre la superficie del agua, en tanto que la considerable disminución de la viscosidad facilitaría su recuperación mediante bombeo. Los restos de combustible que queden en el mar se degradarían en un tiempo inferior al del combustible puro debido a los efectos sinérgicos observados. La mezcla de petróleo-biodiesel recuperada del mar puede ser quemada como combustible en hornos de combustión, luego de separar por decantación el agua arrastrada en el proceso de bombeo.
- Escenario 2: Derrame de petróleo en las rocas costeras. Se propone el rociado a presión con biodiesel a elevada temperatura (80°C, por ejemplo). De esta forma, el petróleo incrustado en las rocas sería arrastrado al disolverse en el biodiesel. La mezcla de ambos combustibles sería arrastrada al mar; por su baja densidad, permanecería en la superficie y, por su baja viscosidad, sería fácilmente recuperable por bombeo. Los restos de la mezcla en el agua se degradarían por efecto del cometabolismo. La eliminación de los restos que queden en las rocas se puede facilitar mediante el rociado con agua caliente enriquecida con nutrientes y microorganismos (preferentemente especies nativas de las aguas afectadas). La mezcla de combustibles recuperados puede ser quemada en hornos de combustión, luego de separar por decantación el agua arrastrada en el proceso de bombeo.
- Escenario 3: Efecto Lasagna en la arena de las playas. Cuando el petróleo derramado en el mar alcanza las playas, se mezcla con la arena y forma varias capas. La solución propuesta es el dragado de la arena afectada y su rociado con biodiesel. De esta manera, el petróleo sería arrastrado de la arena al disolverse en el biodiesel y se reduciría su viscosidad. La mezcla de combustibles recuperados puede ser quemada en hornos de combustión. La eliminación de los restos que queden en la arena se puede facilitar mediante el rociado con agua caliente enriquecida con nutrientes y microorganismos (preferentemente especies nativas de las aguas afectadas), lo que ayudaría a su biodegradación. Una vez recuperada la arena, puede ser retornada a su lugar de origen.

Otros usos del biodiesel pueden incluir la limpieza de aves y otros animales afectados, dado que el biodiesel tiene propiedades detergentes: disuelve fácilmente el petróleo y no es tóxico. Adicionalmente, antes de que el petróleo alcance la costa, es posible proteger las rocas y la arena con algún material, como el biodiesel, que evite la adherencia del petróleo en las mismas.

4. CONCLUSIONES

El biodiesel disuelve fácilmente el petróleo crudo, inclusive en bajas proporciones (la mínima evaluada fue de 12,5 % biodiesel en la mezcla).

Las propiedades físicas (densidad y viscosidad) de las mezclas de ambos combustibles permiten el planteamiento de aplicaciones de biorremediación, las cuales deben ser aún probadas en campo.

Debido a su densidad, el petróleo crudo pesado flota sobre la superficie del mar en los primeros momentos luego de su derrame. La evaporación de las fracciones ligeras podría resultar en un incremento de la densidad del combustible restante y su posterior decantación en el fondo marino. El agregado del

biodiesel reduce la densidad del petróleo y lo mantiene sobre la superficie hasta su recuperación.

La elevada viscosidad del petróleo crudo, especialmente a las temperaturas habituales del agua de mar, hace que sea muy difícil de recuperar por bombeo. La adición de pequeñas cantidades de biodiesel puede disminuir esta viscosidad en varios órdenes de magnitud, lo que facilitaría la recuperación del crudo.

La biodegradabilidad de los restos de combustible que queden en el mar se verá incrementada por la presencia del biodiesel debido a sus efectos sinérgicos. Los experimentos demostraron que en todas las proporciones de mezcla evaluadas el efecto sinérgico fue positivo; se obtuvo incrementos de hasta un 30% en la biodegradación del petróleo crudo.

Para aplicaciones prácticas, la cantidad de biodiesel empleada en la zona afectada debería ser tan pequeña como sea posible, para minimizar el costo de la operación y el volumen del combustible recuperado. La mezcla con 50 % biodiesel es la que presenta el mayor efecto sinérgico; alcanza una biodegradación del 85 % en 28 días y viscosidades varios órdenes de magnitud inferiores a las del petróleo crudo.

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universitat Rovira i Virgili, el Gobierno Catalán (beca IGSO 2002-2006 y Proyecto 2001 SGR 00323), el personal de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Tarragona y de la empresa Bionet Europa.

REFERENCIAS

Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. California: Academic Press.

Bravo-Linares, C., Ovando-Fuentealba, L., Mudge, S.M. & Loyola-Sepulveda, R. (2013). Application of response surface methodology to oil spill remediation. *Fuel*, 103, 876–883. Doi: 10.1016/j.fuel.2012.09.034

Calmon, A., Dusserre-Bresson, L., Bellon-Maurel, V., Feuilleley, P. & Silvestre, F. (2000). «An automated test for measuring polymer biodegradation». *Chemosphere*, 41(5), 645-651.

Centro de Documentación, de Investigación y de Experimentación sobre la Contaminación Accidental de las aguas (CEDRE, Francia) (2003 a). *Accidentes: Prestige. Las contaminaciones marinas accidentales*, Recuperado de: <http://www.cedre.fr/es/accidentes/prestige/pollutions.php>

_____ (2003b). *Accidentes: Prestige. Determinación de producto – Precauciones a tener en cuenta*. Recuperado de: <http://www.cedre.fr/es/accidentes/prestige/product.php>

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ministerio de Ciencia y Tecnología (España) (2003a). *Informe Técnico CSIC 'Prestige' 01: Caracterización del vertido y evolución preliminar en el medio*. Recuperado de: <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/info01.pdf>

_____ (2003b). *Informe Técnico CSIC 'Prestige': Bio-remediación: aproximaciones biológicas para acelerar la regeneración de las zonas contaminadas por el derrame de crudo del Prestige*

- en las costas de Galicia. Recuperado de: <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/Info09.pdf>
- Demirbas, A. (2008). Biodegradability of Biodiesel and Petrodiesel Fuels. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 31(2), 169-174. Doi: 10.1080/15567030701521809
- Jakeria, M.R., Fazal, M.A. & Haseeb, A.S.M.A. (2014). Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 154-163. Doi: 10.1016/j.rser.2013.09.024
- Lisiecki, P., Chrzanowski, L., Szulc, A., Lawniczak, L., Bialas, W., Dziadas, M., Owsianiak, M., Staniewski, J., Cyplik, P., Marecik, R., Jelen, H. & Heipieper, H.J. (2014). Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel*, 116, 321-327. Doi: 10.1016/j.fuel.2013.08.009
- Makareviciene, V. & Janulis, P. (2003). Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. *Renewable Energy*, 28(15), 2395-2403. Doi: 10.1016/S0960-1481(03)00142-3
- Mariano, A.P., Geraldés, A.P., de Angelis, D.F. & Bonotto, D.M. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 346-353. Doi: 10.1590/S1517-83822007000200030
- Mariano, A.P., Tomasella, R.C., Marcondes, L., Contiero, J. & de Angelis, D. (2008). Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1323-1328. Doi: 10.5897/AJB07.895
- Miller, N.J. & Mudge, S.M. (1997). The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. *Spill Science and Technology Bulletin*, 4(1), 17-33. Doi: 10.1016/S1353-2561(97)00030-3.
- Mittelbach, M. & Remschmidt, C. (2004). Biodiesel, the Comprehensive Handbook. Graz: Martin Mittelbach Ed.
- Mudge, S.M. & Pereira, G. (1999). Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel, preliminary results. *Spill Science and Technology Bulletin*, 5(5/6), 353-355. Doi: 10.1016/S1353-2561(99)00075-4
- Pagga, U. (1997). Testing biodegradability with standardised methods. *Chemosphere*, 35(12), 2953-2972. Doi: 10.1016/S0045-6535(97)00262-2.
- Pasqualino, J.C., Montané, D. & Salvadó, J. (2006). Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass & Bioenergy*, 30(10), 874-879. Doi: 10.1016/j.biombioe.2006.03.002
- Pereira, G. & Mudge, S.M. (2004). Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. *Chemosphere*, 54(3), 297-304. Doi: 10.1016/S0045-6535(03)00665-9.
- Szaraz, L. & Beczner, J. (2003). Optimisation processes of a CO₂ measurement set-up for assessing biodegradability of polymers. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(2) 93-95. Doi: 10.1016/S0964-8305(02)00178-6.
- United States Coast Guard (2011). On Scene Coordinator report, Deepwater Horizon oil spill, submitted to the National Response Team, Washington, DC: U.S. Dept. of Homeland Security.
- Recuperado de: <http://noaa.ntis.gov/view.php?pid=NOAA:ocn760102831>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1996). Fate, Transport and Transformation guidelines: Aerobic Aquatic Biodegradation (EPA 712-C-96-075), Washington DC: USEPA.

Yassine, M.H., Wu, S., Suidan, M. & Venosa, A. (2013). Aerobic Biodegradation Kinetics and Mineralization of Six Petrodiesel/Soybean-Biodiesel Blends. *Environmental Science and Technology*, 47(9), 4619–4627. Doi: 10.1021/es400360v

Zhang, X., Peterson, C., Reece, D., Möller, . & Haws, R. (1998). Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of the ASAE*, 41, 1423-1430. Doi: 10.13031/2013.17277