

CLEANING POLLUTED SOILS WITH BIOREMEDIATION

Jabbarova N.,*Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor***Ibrahimova T.***Master**Department of Chemistry and Technology of Inorganic Substances,**Faculty of Chemical Technology,**Azerbaijan State Oil and Industry University, Baku.*

ОЧИЩЕНИЕ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЧВ С ПОМОЩЬЮ БИОРЕМЕДИАЦИИ

Джаббарова Н.Э.*Кандидат химических наук, доцент***Ибрагимова Т.Х.***Магистр**Кафедра химии и технологии неорганических веществ**Химико-технологический факультет**Азербайджанский Государственный Университет Нефти**и Промышленности, Баку*<https://doi.org/10.5281/zenodo.15298373>**Abstract**

With the growth of the world population, the level of land pollution increases. Nowadays, waste management resulting from the rapid growth of industries such as food, health care and automobile is of great importance. The accumulation of pollutants in soils has serious impacts not only on soil fertility and ecosystem functions, but also on human and animal health through the food chain. Bioremediation, a method based on the use of microorganisms to prevent toxicity and breakdown of environmental pollutants, is becoming an important biotechnological approach for the elimination and prevention of environmental pollution. This paper presents a review on the cleanup of contaminated soils with the bioremediation method, which is more cost-effective than other methods. However, the long cleaning time and the inability to achieve effective results at high pollutant concentrations limit the applicability of this method.

Аннотация

С ростом населения в мире возрастает уровень загрязнения земель. В настоящее время управление отходами, возникающими в результате быстрого роста таких отраслей, как пищевая, здравоохранительная и автомобильная, имеет важное значение. Накопление загрязняющих веществ в почвах оказывает серьезное воздействие не только на плодородие почвы и функции экосистемы, но и на здоровье человека и животных через пищевую цепочку. Метод биоремедиация, основанный на использовании микроорганизмов для предотвращения токсичности и разрушения экологических загрязнителей, становится важным биотехнологическим подходом для ликвидации и предотвращения загрязнения окружающей среды. В данной работе представлен обзор об очищении загрязненных почв методом биоремедиации, который является более экономически выгодным по сравнению с другими методами. Однако длительное время очистки и невозможность достижения эффективных результатов при высоких концентрациях загрязнителей ограничивают применимость этого метода.

Keywords: bioremediation, soil pollution, remediation methods.**Ключевые слова:** биоремедиация, загрязнение почвы, методы восстановления.

Процессы биоремедиации, которые используют микроорганизмы для разрушения опасных веществ и превращения их в безвредные или менее вредные вещества, являются долгосрочными очистными процессами [1,2]. Биоремедиация — это естественный процесс, при котором микроорганизмы стабилизируют или превращают экологические загрязнители в конечные продукты.

Для того чтобы биоремедиация была эффективной, микроорганизмы должны атаковать загрязнители с помощью ферментативных реакций и превращать их в безвредные вещества. Этот метод может быть эффективен только в тех случаях, когда

экологические условия позволяют микроорганизмам расти и развиваться. Микроорганизмы, разлагающие загрязнители, должны находиться в непосредственной близости от них и в правильных местах. Если популяция микроорганизмов отсутствует, необходимо разработать инженерные механизмы, которые обеспечат контакт микроорганизмов с загрязнителями [3]. Экологические условия должны быть контролируемы, либо условия должны быть изменены для оптимизации метаболической активности и роста микроорганизмов. Для оптимизации окружающей среды для биоремедиации следует регулировать такие экологические факторы, как температура, питательные вещества

(в первую очередь азот и фосфор), электронные акцепторы (кислород, нитрат, сульфат) и pH [4].

С точки зрения здоровья и экологии, широко распространённые нефтепродукты, бензин, ПАУ, хлористые алканы (РСЕ), тетрахлорэтилен (ТСЕ) и хлористые ароматические углеводороды легко поддаются детоксикации с помощью микроорганизмов. Хотя металлы не могут быть биологически разложены, их можно преобразовать в менее вредные формы с помощью микроорганизмов, поэтому они также рассматриваются в контексте биоремедиации [5].

Техники биоремедиации, как правило, более экономичны по сравнению с другими традиционными методами, такими как сжигание. Согласно программе Агентства по охране окружающей среды США (EPA), использование биоремедиации в загрязнённых районах с опасными веществами оказывается в 10 раз дешевле, чем традиционные методы. Поскольку этот метод, основанный на естественных процессах сокращения загрязнений, он воспринимается обществом как более приемлемый по сравнению с другими технологиями. Существует два основных метода биоремедиации, основанных на транспортировке или удалении отходов. Это биоремедиация на месте (in-situ) и биоремедиация вне места (ex-situ). Однако время, необходимое для завершения восстановления, будет зависеть от того, проводится ли процесс на месте или извлечённый почвенный материал транспортируется с помощью специальных средств. Технологии экс-ситу, которые не проводятся в естественной почвенной среде, обычно более быстрые и эффективные по сравнению с методами, проводимыми на месте [4]. В данной работе приведен обзор результатов изучения процессов биоремедиации, которые считаются экономической альтернативой в устранении загрязнения почвы, а также рассмотрены существующие технологии с их преимуществами и недостатками.

Факторы, влияющие на биоремедиацию.

Разнообразие почв зависит от свойств почвенного материала, топографических характеристик района, климатических факторов, растительности и состояния организмов в почве. Успешная стратегия биоремедиации должна учитывать переменные факторы почвенных характеристик. Свойства почвы значительно влияют на поведение загрязняющих веществ в почве. Поэтому подходящий метод ремедиации должен учитывать специфические свойства почвы и условия области, требующей очистки [6]. Система биоремедиации не работает с одинаковой эффективностью при всех условиях. [7].

Влияние физической среды почвы

Физические характеристики и структура почвы могут изменяться в зависимости от химической и биологической активности. Успешная биоремедиация зависит от множества факторов, однако критическим фактором является содержание воды в почве. Содержание воды в почве контролируется её структурой и пористостью. Влажные почвы обычно бедны кислородом, что ограничи-

вает аэробную биоремедиацию. Для аэробной биоремедиации в почве необходимы достаточные количества кислорода и воды [4].

Наиболее значительным изменением в почве является снижение содержания органического вещества с глубиной почвы. Органическое вещество играет важную роль в почве. Оно является важным источником питательных веществ для микроорганизмов, и уменьшение его содержания с глубиной приводит к снижению плотности микробиальной популяции, а следовательно, к уменьшению разлагаемости токсичных химических веществ [8]. Поэтому нижние слои почвы имеют более низкую плотность микробиальной популяции и менее активные микробиальные процессы по сравнению с верхним слоем почвы.

Влияние гидравлической проводимости почвы и проницаемости на применимость биоремедиации

Для активации микробной активности необходимы источники питательных веществ и кислорода. Если почва и водоносный слой непроницаемы, микроорганизмы сталкиваются с трудностью обеспечения достаточного количества кислорода и питательных веществ для роста и дыхания. Если гидравлическая проводимость больше 10^{-4} см/с, обычно обеспечивается достаточное движение питательных веществ и кислорода. Почвы с высокой проницаемостью, однако, не подходят для биоремедиации из-за низкой микробной популяции. Тонкозернистые почвы и осадки с низкой проницаемостью также затрудняют поступление питательных веществ и кислорода для микроорганизмов [9].

Влияние температуры и влажности почвы

Эти параметры влияют на кинетику реакций в почве. Потому что микробная активность включает температурозависимые ферментативные и биохимические процессы. Оптимальная температура для биологического разложения составляет от 20°C до 30°C. Температура контролируется сезонными климатическими условиями, состоянием поверхности почвы, содержанием влаги в почве и её глубиной. Годовая температура воздуха является показателем годовой температуры почвы на глубине 1-5 м. Влажные почвы обладают высокой теплоёмкостью, и их температура меняется медленнее, чем у сухих почв. Температура почвы может быть контролируема через орошение, дренаж, растительные остатки на поверхности, искусственные покрытия или растительность.

Химическая среда почвы

Естественные характеристики почвы, концентрация загрязнителя и степень загрязнения имеют важное значение для определения вероятности успешной биоремедиации. Участки, сильно загрязнённые и устойчивые к биологическому разложению, не подходят для очистки с помощью биоремедиации. Состояние загрязнителя, его сорбция на других веществах, транспортировка и биологическое разложение влияют на биологическую активность почвы. Эти воздействия могут изменять pH почвы, её ионно-обменную способность, содержание питательных веществ, солей, тяжёлых металлов, минералов и органических веществ. Одним из

факторов, влияющих на химические характеристики почвы, являются глинистые минералы. Глиняные частицы имеют большую поверхность для взаимодействий. Глиняные минералы состоят из кристаллических частиц, аморфных материалов, солей и металлических оксидов. Кроме того, они влияют на сорбцию аполярных химикатов, обеспечивая большую реактивную поверхность. Из-за того, что их поверхности заряжены электрически, они также влияют на сорбцию полярных химикатов через ионно-обменную способность. Глиняные минералы могут задерживать химическое загрязнение, делая его недоступным для микробиального разложения. Помимо глиняных минералов, органическое вещество почвы также обладает высокой катионно-обменной способностью и оказывает существенное влияние на сорбцию тяжелых металлов и органических химикатов [6].

Почва как источник питательных веществ для растений и микроорганизмов

Почва является источником питательных веществ для растений и микроорганизмов. Она содержит макроэлементы, такие как углерод (C), азот (N) и фосфор (P), а также все микроэлементы. Необходимость в макроэлементах для микробного разложения оценивается на основе загрязненной почвы (с помощью электролитического респирометра), и измеряется биологическая потребность в кислороде (БПК). Общая БПК увеличивается с количеством азота (N) и фосфора (P), необходимым для повышения микробного питания. Обычно БПК, соотношение $\text{NH}_3\text{-N}$ и ортофосфата принимается как 100:10:1 [10].

Микроорганизмы также нуждаются в малых количествах некоторых микроэлементов для питания. Во многих областях ремедиации для обеспечения достаточного микробного питания эти микроэлементы добавляются в определенных количествах. Влияние микроэлементов на микробное питание имеет важное значение в биоремедиации [11].

Биологическая среда почвы

Почвы отличаются от других геологических материалов благодаря наличию важных биологических процессов. Интенсивная биологическая активность почвы обычно находится в верхнем горизонте. Растения, животные и микроорганизмы вносят вклад в биологическую активность почвы. Физические и химические характеристики почвы влияют на биологическую активность. Условия почвы, которые способствуют активности аэробных микроорганизмов, включают хорошую вентиляцию, достаточное количество питательных веществ и источников энергии, подходящий уровень влажности и температуру. Когда почва насыщается водой, диффузия кислорода в почечную матрицу ограничивается, и почва становится анаэробной. В этих условиях активность аэробных микроорганизмов ограничена, в то время как анаэробные микроорганизмы начинают расти и использовать органическое вещество в качестве источника энергии. Таким образом, физическая структура почвы, химические реакции, климатические условия и ис-

пользование органического вещества как источника энергии и питательных веществ влияют на биологические условия почвы [6].

Технологии биоремедиации

Биоремедиация основывается на способности микроорганизмов поглощать загрязнители и использовать их для роста и метаболической активности. Основная цель разработки биоремедиации — создание оптимальных условий для микробного роста и активности. В зависимости от уровня аэрации и насыщения зоны, могут быть использованы различные технологии.

Биоремедиация применяется двумя способами:

➤ **Метод с добавлением питательных веществ (нутриентов):** добавление питательных веществ в загрязненную область, что активирует бактерии, уже присутствующие в почве, в зависимости от бактериального состава почвы (технологии удаления на месте - *in-situ*). Этот метод используется при низких концентрациях загрязнителей.

➤ **Метод с удалением почвы:** почва выкапывается, загрязняющие вещества разлагаются с помощью новых бактерий. Условия контролируются или изменяются для оптимизации метаболической активности и роста микроорганизмов. В процессе биоремедиации для оптимизации условий окружающей среды регулируются такие факторы, как температура, неорганические питательные вещества (преимущественно азот и фосфор), акцепторы электронов (кислород, нитраты, сульфаты) и pH (технологии удаления не на месте - *ex-situ*).

Техники биоремедиации на месте (*in-situ*)

Это высококачественный метод очистки загрязненных участков с использованием природных микроорганизмов для разложения химических веществ с низкими затратами. Эта технология привлекательна из-за низкой стоимости и возможности очистки без необходимости выемки и транспортировки загрязненной почвы [12]. Однако биоремедиация на месте имеет некоторые недостатки. В сравнении с другими методами, она может занять больше времени. Микробная активность может снижаться из-за воздействия изменений экологических условий, которые невозможно контролировать, что может привести к сезонным колебаниям. Микроорганизмы могут потребовать больше энергии и питательных веществ для роста клеток. Поэтому может потребоваться добавление питательных веществ в существующие отходы [13]. Когда условия не являются оптимальными, способность к разложению может снизиться. В таких случаях, хотя предпочтение отдается природным микроорганизмам, возможно потребуются использование генетически модифицированных микроорганизмов [14]. Кроме того, биоремедиация на месте ограничена глубиной почвы, что влияет на эффективность очистки.

Техники биоремедиации на месте (*in-situ*)

С помощью техник биоремедиации на месте загрязнители разлагаются природными микроорганизмами, которые используют их как источник энергии и живут и развиваются в данной области. Биологическое разложение на месте — это процесс,

при котором с помощью циркулирующих водных растворов в почву вводятся кислород и питательные вещества, чтобы активировать бактерии, живущие в этом окружающем среде, для разложения органических загрязнителей [15].

Техники биоремедиации на месте в целом используются для удаления галогенсодержащих полуволатильных органических загрязнителей, таких как дизельное топливо и масла. Контролировать биоремедиацию на месте сложнее, чем на выемке (ex-situ), поскольку экспериментальные контролируемые меры обычно невозможны в загрязненной почве.

Аэробные микроорганизмы обладают способностью разлагать нефтяные продукты, такие как бензол, толуол, этилбензол и ксилол (ВТЕХ). Активность изолированных сообществ микроорганизмов была проверена в полевых условиях. Изолированные 4 микробных сообщества были применены на загрязненную территорию. В результате биоремедиации на месте, спустя 7 месяцев, был достигнут уровень удаления загрязнителей: 95% для бензола и толуола, 81% для этилбензола и 80% для ксилола [16].

Brito и др. [17] в своем исследовании показали, что с помощью природного бактериального консорциума (НВС) можно восстановить почву, загрязненную нефтью, в экосистеме мангровых деревьев (растение, растущее в тропических экосистемах).

Также было доказано, что почву, загрязненную полиароматическими углеводородами (РАН), которые накапливаются в природе в результате антропогенных действий, таких как сжигание ископаемых видов топлива, можно восстанавливать с помощью грибов и бактерий как в аэробных, так и в анаэробных условиях с использованием техник ин-ситу [18]. Авторы [19] в своем исследовании отметили, что загрязненная почва, содержащая взрывчатые вещества, была очищена за 12 месяцев с использованием техник ин-ситу. Несмотря на длительное время, этот метод имеет преимущество за счет низкой стоимости.

Для создания подходящих условий жизни микроорганизмов в биоремедиации на месте используются две основные техники.

Биовентиляция (Очистка загрязненной почвы с помощью инъекции воздуха в насыщенную почву)

В этом методе атмосферный воздух подается через специальные трубы в почву выше уровня водоносного слоя в насыщенной почве, чтобы обеспечить микроорганизмам необходимый кислород. В этом процессе биологическое разложение осуществляется микроорганизмами, присутствующими в почве. Введенный в почву воздух или кислород не только помогает биологическому разложению, но и выполняет функцию транспортировки летучих органических веществ и CO_2 на поверхность с потоком воздуха. Этот метод успешно применяется для очистки загрязненных почв, содержащих углеводороды нефти, хлорированные растворители, некоторые пестициды, средства защиты растений и другие органические химикаты. Однако

этот метод, как правило, не рекомендуется для очистки от неорганических загрязнителей [20].

Инъекция перекиси водорода

В этом методе кислород подается в почву в жидкой форме через инъекцию перекиси водорода. В этом методе, основанном на химическом окислении, перекись водорода используется как окислитель для преобразования углеводородов в углекислый газ и воду. Изменение типа и характеристик органических и неорганических компонентов в почве происходит благодаря окислительным процессам, инициированным радикалом $\text{OH}\cdot$ [21]. Растворенный кислород обычно ограничен в биологическом превращении органических загрязнителей. В процессе аэробного метаболизма возникает значительная потребность в биологическом кислороде. Добавление перекиси водорода увеличивает окислительную способность в загрязненной области [22]. При определении необходимой дозы перекиси водорода обязательно следует учитывать скорость утраты окислителя. Органическое вещество почвы и органические загрязнители конкурируют за перекись водорода. Поэтому органическое вещество почвы является важным фактором при определении дозы окислителя. В своем исследовании авторы [23] изучили взаимосвязь между перекисью водорода и почвой при нейтральном pH и 20°C. Они обнаружили, что в почвах с высоким содержанием органического вещества скорость разложения перекиси водорода увеличивается.

Этот метод обычно применяется для очистки ранее загрязненных подземных вод и территорий с ограниченным загрязнением.

Техники биоремедиации, не проводимые на месте (ex-situ)

Этот метод требует выемки почвы из естественного окружения. Его целью является облегчение микробного разложения. Методы экс-ситу биоремедиации, проводимые вдали от загрязненного участка, быстрее, чем методы ин-ситу. Они могут быть применены для загрязнителей, распространенных на большой площади, но являются более дорогими [4]. В исследовании [16], проведенном в лабораторных условиях с использованием аэробных культур, было установлено, что разложение нефтяных производных, таких как бензол (84%), толуол (86%), этилбензол (80%) и ксилол (82%) составило значительные проценты. В исследовании сообщается, что методы экс-ситу достигли 90% удаления хлоробензолов из почвы за 2-3 недели. Кроме того, экс-ситу техники успешно применяются для удаления углеводородов из почвы [24].

В зависимости от того, проводится ли восстановление в специальных резервуарах или на подготовленных грунтах, экс-ситу биоремедиация включает две технологии:

Процесс в водной фазе (Биореакторы)

Биореакторы являются важнейшим видом экс-ситу техники. Наилучший вариант для биоремедиации почвы, загрязненной устойчивыми и токсичными загрязнителями, с контролем условий окружающей среды — это метод биореакторов [25,26]. Уровень удаления загрязнителей зависит от способности активных микроорганизмов в системе к

разложению загрязняющих веществ [27,28]. Эти реакторы классифицируются как дискретные, полусовременные и постоянные. В общем, предпочтение отдается дискретным реакторам. Также существуют системы, использующие различные электронные акцепторы: аэробные (молекулярный кислород), анаэробные (нитраты и некоторые металлические катионы), анаэробные (сульфаты, метаногенные, ферментационные) и смешанные электронные акцепторы [29].

Биореакторная очистка с водной фазой является более быстрым методом по сравнению с другими методами очистки. Почва с загрязнителями извлекается с участка с помощью специализированного оборудования, затем перемешивается с водой в специальных резервуарах, где уже находятся микроорганизмы, которые естественным образом присутствуют в почве. После этого добавляются кислород и питательные вещества. Для поддержания биологической активности микроорганизмов и обеспечения оптимальных условий контролируются температура, концентрация питательных веществ и кислорода. Этот метод имеет такие преимущества, как повышение скорости переноса массы и соотношения микроорганизмов/загрязнителей/питательных веществ, возможность использования различных электронных акцепторов, увеличение разложения загрязнителей с использованием сурфактантов и растворителей, оптимизация и контроль экологических условий [30,4].

В исследовании [31] было отмечено, что биореакторы могут быть эффективным экс-ситу методом для очистки почвы, загрязненной токсичными и устойчивыми к разложению веществами, такими как углеводороды и некоторые органохлорные соединения. В исследовании [32] было показано, что возможно очищение почвы, загрязненной пиреном, в дискретных биореакторах при анаэробных-анаэробных-анаэробных условиях. В этом исследовании время ожидания было выбрано 120 часов, нагрузка — 20 кг/м³.сутки, температура — 28±2°C, и 6 различных реакторов работали с различными концентрациями субстрата. Некоторые реакторы были инокулированы бытовыми осадками для усиления биологического разложения. Результаты показали, что в реакторах с добавлением бытовых осадков разложение было более эффективным по сравнению с реакторами без добавления осадков.

Другим важным загрязнителем являются полиароматические углеводороды (ПАУ), которые могут быть удалены как в аэробных, так и в анаэробных биореакторах, как показано в исследованиях. Метаболические функции (аэробные, анаэробные, анаэробные), условия одиночного или смешанного микросреды, естественная смешанная микрофлора и условия инокуляции могут быть использованы и контролироваться в биореакторах для разложения ПАУ. Токсичность и гидрофобность ПАУ, состав почвы и гетерогенные микробиологические условия могут усложнять биоремедиацию [32]. В исследовании [33] было показано, что биореакторы, использующие экс-ситу биоремедиацию, мо-

гут быть использованы для удаления ПАУ из очистных шламов. Для ускорения биологического разложения был использован *Proteiniphilum acetatigenes*, что привело к разложению на 80% при биотических и абиотических условиях.

Каталитическая обработка твердой фазы

В этом методе загрязненная почва подвергается обработке на подготовленных площадках. Этот метод более дешев, чем методы с использованием водной фазы, но менее эффективен и требует более длительного времени. Известно, что этот метод, также называемый образованием биокуч, используется для уменьшения концентрации нефтяных дериватов, ПАУ (полиароматических углеводородов), взрывчатых веществ, пестицидов и других хлорорганических загрязнителей в почве, которая была вынута из места загрязнения [34,30,31]. Эта технология заключается в том, что загрязненная почва укладывается в кучки, в которые добавляются кислород, минералы, питательные вещества и влага для активизации микробной активности в почве.

Для реализации этого метода очистки используются две основные техники. Они следующие:

Земельное улучшение (Land Farming)

Земельное улучшение или земельное применение — это технология, которая уменьшает концентрацию загрязняющих веществ в почве путем биологического разложения [35]. Эта технология обычно включает распределение загрязненной почвы, выкопанной с загрязненного участка, на другой участок в тонкий слой, с добавлением кислорода и/или минералов, питательных веществ и влаги для стимуляции аэробной микробной активности в почве. Увеличение микробной активности вызывает разложение загрязняющих веществ, адсорбированных в почве, в результате микробного дыхания. Почва, извлеченная из естественного окружения, расстилается на специально подготовленной поверхности. Здесь для ускорения биологической активности и облегчения аэрации почва регулярно перемешивается и переворачивается.

Микроорганизмы требуют таких неорганических питательных веществ, как азот и фосфор, для поддержания биологического разложения и стимулирования их клеточного роста. Поэтому при необходимости добавляются питательные вещества. Недостаток питательных веществ и кислорода замедляет биологическое разложение [36]. Если загрязнение почвы не слишком глубоко (на глубине менее 90 см от поверхности), можно эффективно стимулировать микробную активность, не выкапывая почву. Функционирование микроорганизмов зависит от характеристик почвы, летучести загрязняющих веществ и климатических условий, которые являются определяющими факторами при применении этой технологии [37]. Эти условия должны учитываться при проектировании земельного применения и регулярно контролироваться. Для этого необходимо создать контрольный план. Этот метод обычно применяется для углеводородного загрязнения, распространившегося на глубину от 0,3 до 1 м. В течение процесса углеводороды удаляются из

окружающей среды путем испарения или комбинированного процесса биологического разложения.

Техника земельного улучшения

Техника земельного улучшения успешно применяется в жарком южном климате [38]. Например, в Австралии в ходе 12-месячного операционного исследования уровень общего нефтяного углеводорода (ТНУ) был снижен с 4644 ppm до 100 ppm [39].

Однако в холодных климатах, таких как Антарктика и Арктика, результаты применения техники земельного улучшения были различными [40,39]. Исследования показали, что микроорганизмы, находящиеся в загрязненных углеводородами территориях, могут адаптироваться к холодным условиям [41].

Авторы [42] провели исследование, взяв образцы загрязненной дизелем почвы с бывшей военной базы и создав условия для земельных экспериментов при среднем температурном режиме +3°C в летний период. В ходе исследования было спроектировано четыре пилотных участка с различными режимами аэрации: с ежедневной аэрацией, с аэрацией раз в четыре дня, с добавлением питательных веществ и с аэрацией раз в четыре дня, а также контрольный участок.

Результаты показали, что на участке с добавлением питательных веществ уровень ТНУ снизился более чем на 90%. На участках с ежедневной аэрацией и с аэрацией раз в четыре дня уровень удаления загрязнений составил 80% [42]. Эти данные подтверждаются результатами успешных исследований по технике улучшения земель, проведенными [43,44].

Список литературы:

1. Scragg, A. (1999). *Environmental Biotechnology*. Longman. England.
2. Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., Johri, A.K., (2002). *Biotechnology and Bioremediation: Successes and Limitations*. Appl. Microbiol. 63:329-331.
3. Singh A., Ward, O.P. (2004). *Soil Biology, Volume 2, Biodegradation And Bioremediation* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Baker, K.H., Herson, D.S. (1994). *Bioremediation*. McGraw – Hill, New York.
5. Vidali, M., (2001). *Bioremediation: an overview*. Pure Applied Chemistry 73, 1163–1172.
6. Cheng, H.H., Mulla, D.J. (1999). *The Soil Environment*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, USA. *Bioremediation of Contaminated Soils*
7. Balba M., Al Awadhi N., Al Daher R. (1998). *Bioremediation of oil contaminated soil: Microbiological Methods to feasibility assessment and field evaluation*. Journal of Microbiological Methods, Vol. 32, 155- 164.
8. Mallawatantri, A.P., B.G. McConkey, D.J. Mulla. (1996). *Characterization of Pesticide Sorption and Degradation in Macropore Linings and Soil Horizons of Thatuna Silt Loam*. J. Environ. Quality 25: 227-235.
9. Thomas, J.M., Ward, C.H. (1993). *Introduced Organisms for Subsurface Bioremediation*. P. 227-244.

In: R.D. Norris Et Al. (Ed) *Handbook of Bioremediation*. Lewis Publ. Boca Raton, FL.

10. Jerger, D.E., Woodhill, P.M., Flathman, P.E., Exner, J. H. (1993). *Solid-Phase Remediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Laboratory Treatability Study Through Site Closure*. P. 177-193. In: P.E. Flathmann et al. (ed.) *Bioremediation-field Experience*. Lewis publ., Boca Raton, FL.
11. King, R.B., Long, G. M., Sheldon, J.K. (1992). *Practical Environmental Bioremediation*. Lewis Publication, Boca Raton, FL.
12. Boopathy, R. (2000). *Factors limiting bioremediation technologies*. Biores. Technol., 74, 63–67.
13. Cookson, J.T. (1995). *Bioremediation engineering: Design and Applications*. Mc Graw Hill, New York
14. Hoepfel, R.E., Hinchey, R.E., Arthur, M.F. (1991). *Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons*. Journal of Industrial Microbiology, 8, 141-146.
15. Doelman, P., Breedveld, G. (1999). *In situ versus on site practices*. In: D.C. Adriano, J.-M. Bollag, W.T. Frankenberger, Jr., and R.C. Sims, Eds. *Bioremediation of Contaminated Soils*, 539–558. Agronomy Monograph 372. Soil Science Society of America, Madison, WI.
16. Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski A., Bielecka, A. (2009). *Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products* Bioresource Technology 100, 3221–3227.
17. Brito, E.M.S., Duran, R., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., García de Oteyza, T., Crapez, M.A.C., Aleluia, I., Wasserman, J.C.A. (2009). *A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil)*. Marine Pollution Bulletin 58, 418–423.
18. Bamforth, S., Singleton, I. (2005). *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. J. Chem. Biotechnol. 80: 723–736.
19. Boopathy, R. (2000). *Bioremediation of explosives contaminated soil*. International Biodeterioration & Biodegradation 46, 29-36.
20. EPA, 1994, *Engineering Bulletin: In-Situ Biodegradation Treatment*, EPA/540/S-94, 1502.
21. Petigara, B.R., Blough N.V., Mignerey, A.C. (2002). *Mechanisms of hydrogen peroxide decomposition in soils*, Environ. Sci. Technol. 36, 39–645.
22. Pardieck, D.L., Bouwer, E. J., Stone, A.T. (1992). *Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review*. Journal of Contaminant Hydrology Volume 9, Issue 3, 221-242.
23. Romero, A., Santos, A., Vicente, F., Rodriguez S., Lafuente, A.L. (2009). *In situ oxidation remediation technologies: Kinetic of hydrogen peroxide decomposition on soil organic matter*. Journal of Hazardous Materials 170, 627–632.
24. Diplock, E.E., Mardlin D.P., Killham K.S.,

- Paton G.I. (2009). Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution* 157, 1831–1840.
25. Christodoulatos, C., Koutsospyros, A. (1998). Bioslurry reactors. In *Biological treatment of hazardous wastes* Edited by: Lewandowsky GA, DeFilippi LJ. New York: John Wiley & Sons, Inc; 69–103.
26. Mohan S.V., Shailaja S., Krishna M.R., Reddy K.B., Sarma P.N. (2006). Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process Biochem.* 41(3): 644–652.
27. Evans B.S., Dudley C.A., Klasson K.T. (1996). Sequential anaerobic-aerobic biodegradation of PCBs in soil slurry microcosms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57–58:885–894.
28. Cookson, J. (1995). *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw Hill Publishers, New York.
29. Robles-González, I., Ríos-Leal, E., Ferrera-Cerrato, R., Esparza-García, F., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H.M. (2006). Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Process Biochem.* 41(9): 1951–1960.
30. Fuller, M.E., Manning, J.F. (2004). Microbiological changes during bioremediation of explosives- contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresour. Technol.* 91(2): 123–133.
31. Robles-González, I., Ríos-Leal, E., Sastre-Conde, I., Ferrera-Cerrato, R., Caffarel-Méndez, S., Poggi-Varaldo, H.M. (2003). Effect of supplementary organic carbon source and electron acceptors on the removal of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in slurry bioreactors. In *Proceedings 2nd International Conference on Remediation of Contaminated Sediments*, Venice, September 30 2003; Venice, Italy Edited by: Pellei M, Porta A, Hinchee E. Battelle Press, Columbus, OH; Paper G-08, ISBN. 1-57477-143-4.
32. Mohan, S.V., Prasanna, D., Purushotam Reddy, B., Sarma, P.N., (2008). Ex-situ bioremediation of pyrene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode: influence of bioaugmentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, doi:10.1016/j.ibiod. 2008.01.006.
33. Larsen, S.B., Karakasheva, D., Angelidaki, I., Schmidta, J.E. (2009). Ex-situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials* 164, 1568–1572.
34. Janikowski, T., Velicogna, D., Punt, M., Daugulis, A. (2002). Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2–3): 368–376.
35. Clark, B., Boopathy, R. (2007). Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials* 143, 643–648.
36. Widrig, D.L., Boopathy, R., Manning, J.F. (1997). Bioremediation of TNT contaminated soil: A laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1141–1148.
37. Pope, D.F., Matthews, J.E., (1993). Bioremediation using the land treatment concept. USEPA/600/R-93/164. Robert S. Kerr, Environmental Research Laboratory. US Environmental Protection Agency, Ada, OK.
38. Mc Carthy, K., Walker, L., Vigoren, L., Bartel, J. (2004). Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an Arctic site. *Cold Regions Science and Technology* 40, 31–39.
39. Line, M.A., Garland, C.D., Crowley, M., (1996). Evaluation of landfarm remediation of hydrocarbon- contaminated soil at the Inveresk Railyard, Launceston, Australia. *Waste Management* 16, 567–570.
40. Aisablie, J., Balks, J.M., Foght, J.M., Waterhouse, E.J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soil: effects and management. *Environmental Science & Technology* 38, 1265–1274.
41. Mohn, W., Stewart, G.R. (2000). Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1161–1172.
42. Paudyn, K., Rutter, A., Rowe R.K., Poland, J.S. (2008). Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Regions Science and Technology* 53, 102–114.
43. Chatham, J.R. (2003). Landfarming on the Alaskan North slope historical development and recent applications. 10th Annual International Petroleum Environmental Conference, Houston, TX November 11– 14, 2003. <http://ipec.utulsa.edu/Conf2003/Papers/chatham, 35.pdf>.
44. Reynolds, C.M., Brayel, A.W., Travis, M.D., Perry, L.B., Iskandar, I.K. (1998). United States Army Corps of Engineers, Special Report, 97–120.