

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ESTACIONES DE SERVICIO Y LAVADEROS INDUSTRIALES POR LA CEPA *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp

Biodegradation Waste of the Stations Service by *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp

OSCAR HÉCTOR PUCCI¹, Ph. D.; ADRIÁN ACUÑA^{1,2}, Ph. D.; GRACIELA NATALIA PUCCI^{1,3}, Ph. D.

¹ Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA). Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia, Argentina. ceima@unpata.edu.ar

² ajcuna@unpata.edu.ar

³ granapu@unpata.edu.ar

Autor de correspondencia: Graciela Natalia Pucci, granapu@unpata.edu.ar.

Presentado el 27 de febrero de 2013, aceptado el 8 de marzo de 2013, fecha de reenvío el 22 de abril de 2013.

RESUMEN

La cepa *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp fue aislada de un suelo contaminado con aceite de turbinas de la zona norte de la provincia de San Cruz, Argentina. Dado su potencial en la bioremediación, el objetivo del trabajo fue conocer las habilidades para la degradación de compuestos puros y mezclas de hidrocarburos, como también degradación en presencia y ausencia de nitrógeno de gasoil medido por cromatografía gaseosa. La cepa posee la capacidad de utilización de los siguientes hidrocarburos: gasoil, kerosene, aceite lubricante, pristano, hexano, heptano, octano, pentadecano y hexadecano. La cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp presenta un excelente potencial de biorremediación de hidrocarburos conflictivos como son los aceites lubricantes, su posible empleo en la eliminación de barros provenientes de lavados de motores o de estaciones de servicio sería su aplicación más importante. La velocidad de degradación, en condiciones óptimas de cultivo, le confiere una ventaja adicional. Además, posee una degradación baja en ausencia de nitrógeno, factor limitante y frecuente en los suelos patagónicos.

Palabras clave: biodegradación, petróleo, *Rhodococcus erythropolis*.

ABSTRACT

The strain *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp was isolated from turbine oil contaminated soil from northern San Cruz province, Argentina. Because of its potential in bioremediation, the aim was to know the abilities for degradation of pure compounds and mixtures of hydrocarbons, as well as degradation in the presence and absence of diesel nitrogen measured by gas chromatography. The strain possesses the ability to use diesel, kerosene, lubricating oil, pristane, hexane, heptane, octane, pentadecane and hexadecane. *R. erythropolis* ohp-al-gp has excellent potential for bioremediation of hydrocarbons, which are conflictives as lubricating oils, their potential use in removing mud from washing engines or gas stations would be its most important application. The degradation rate in optimal culture conditions, gives it an additional advantage. It also has a low degradation in the absence of nitrogen, a frequent limiting factor in Patagonian soils.

Keywords: oil, biodegradation, *Rhodococcus erythropolis*.

INTRODUCCIÓN

Los lavaderos industriales de equipos petroleros y las estaciones de servicio, en sus lavaderos, producen una gran cantidad de barros con concentraciones y calidades muy variables de hidrocarburos. El volumen de barros producidos hace que su eliminación

por incineración sea altamente costosa y poco práctica. Los métodos biológicos son de relativo bajo costo, muy amigables para el medio ambiente, y a diferencia de la incineración, no destruye el suelo. Esto es relevante, porque después de eliminados los hidrocarburos biodegradables del suelo, este puede ser rescatado por medio de la reforestación. En la ciudad de Comodoro Rivadavia, se han extremado esos controles, debido a que en esas instalaciones, o en los llamados lavaderos industriales, se acondicionan y lavan equipos de la industria petrolera. El grado de contaminación que producen es muy variable, así como la composición, en la que entran naftas, gasoil, kerosene, aceites lubricantes y grasas, cada uno de ellos con una composición muy compleja (Speight, 1991). Entre las fracciones de los destilados del petróleo que se encuentran en los barros de los lavaderos industriales, la fracción correspondiente al aceite lubricante es una de las que presentaría mayor dificultad para su biodegradación debido a su composición.

En trabajos anteriores se han discutido las posibilidades de los métodos de biorremediación en suelos semiáridos de la Patagonia (Pucci *et al.*, 1998; Pucci *et al.*, 2000; Riss *et al.*, 2002; Pucci *et al.*, 2011), llegándose a la conclusión de que es posible una buena biodegradación aún en climas y suelos con características extremas como los de la Patagonia central.

Por otro lado, las cepas de *R. erythropolis* han sido descritas como buenas degradadoras de hidrocarburos y alcoholes, utilizando la producción de biosurfactantes para la disolución de los hidrocarburos (Carvalho y Fonseca, 2002; Chang *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011); y también presentan buena tolerancia a ambientes salinos (Langdahl y Ingoorsen, 1996; Heald *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009), haciéndolas buenas candidatas para biorremediación de suelos contaminados.

En este trabajo se realizó una experiencia con barros contaminados provenientes de un lavadero industrial y se ensayó la utilización de la cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp, de buena capacidad de biodegradación y adaptación a suelos patagónicos, en el saneamiento de barros contaminados con petróleo provenientes de estaciones de servicio, previo a su disposición final. Para ello se realizó un perfil de utilización de hidrocarburos puros y destilado del petróleo, su capacidad de degradar gasoil en deficiencia de nitrógeno y la inoculación en un suelo contaminado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de la cepa

La cepa bacteriana fue aislada de un suelo contaminado con aceite de turbinas de la zona norte de la provincia de San Cruz, Argentina. El suelo contenía 0,1 % de hidrocarburos totales de petróleo formado por las siguientes fracciones, 86,2 % de hidrocarburos alifáticos, 2,1 % de hidrocarburos aromáticos y 11,7 % de hidrocarburos polares. La identificación de la cepa bacteriana se realizó por su perfil de ácidos grasos de membrana (FAMES) utilizando el sistema Sherlock de MIDI (versión 6.0). La cepa fue identificada como *R. erythropolis* ohp-al-gp.

Biodegradación de hidrocarburos

La habilidad para la utilización aeróbica de hidrocarburos fue realizada en frascos de 30 ml conteniendo 10 ml de medio base mineral (Pucci y Pucci, 2003) adicionando 0,5 % de los siguientes hidrocarburos: hexano, heptano, n-octano, pristano, pentadecano y hexadecano; y de las mezclas complejas kerosene, gasoil, nafta y aceite de turbina como fuente de carbono y energía. Los frascos se inocularon con 100 μ l de una suspensión del microorganismo en solución fisiológica (0,85 % NaCl) con una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. La producción de biomasa fue determinada por seguimiento de la densidad óptica de los sistemas a 600 nm (Hosokawa *et al.*, 2010). Todos los hidrocarburos se probaron por triplicado y se incubaron durante 30 días a 28 °C en agitador orbital a 120 r.p.m.

Inoculación de la cepa bacteriana al suelo

Para la realización de la experiencia se confeccionaron dos microcosmos, por triplicado, con 100 g de suelo contaminado con hidrocarburos. El mencionado suelo contenía 2,2 % de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), distribuidos en 75,2 %, 18,6 % y 6,2 % de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares respectivamente. Ambos microcosmos se fertilizaron con nitrógeno y fósforo para lograr una relación C:N:P de 100:5:1 y se les incorporó agua destilada estéril para lograr una humedad igual al 50 % de la capacidad de retención de agua del suelo. Finalmente, uno de los sistemas se inoculó con 2 ml de una suspensión de la cepa bacteriana en estudio de densidad óptica de 0,5 a 600 nm y el otro microcosmo se utilizó como control. La cinética de degradación se efectuó monitoreando el dióxido de carbono producido en los biorreactores, previa captura en una solución de hidróxido de sodio de concentración conocida (Bartha, 1979).

Degradación de gasoil con y sin fuente de nitrógeno

La cepa bacteriana se cultivó en dos tipos de medios de cultivo líquido, uno con nitrógeno denominado MM1 ((NaCl 5 g, K₂PO₄H 0,5 g, NH₄PO₄H₂ 0,5 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, MgSO₄ 0,2 g, KNO₃ 3 g, FeSO₄ 0,05 g, SL 10 B (HCl (25 %)) 7,7 mL, FeSO₄ · 7H₂O 1,5 g, ZnCl₂ 0,07 g, MnCl₂ · 4H₂O 0,1 g, H₃BO₃ 0,3 g, CoCl₂ · 6H₂O 0,19 g, CuCl₂ · 2H₂O 0,002 g, NiCl₂ · 6H₂O 0,024 g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0,036 g, agua destilada 1000 ml) 10 ml, agua destilada 1000 ml) y el segundo denominado MM2 con deficiencia de nitrógeno (NaCl 5 g, K₂PO₄H 0,5 g, NaPO₄H₂ 0,5 g, NaSO₄ 1 g, MgSO₄ 0,2 g, FeSO₄ 0,05 g, SL 10 B 10 ml, extracto de levadura 0,025 g, agua destilada 1000 ml). Se diseñaron seis tipos de microcosmos, tres con 100 ml de medio MM1 y tres con 100 ml de MM2 a los que se les adicionaron, por separado, 0,1 % de hexadecano, 0,05 % de naftaleno y 0,1 % de gasoil. Todos los sistemas fueron inoculados con 10 ml de una suspensión del microorganismo en estudio con una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Los sistemas se incubaron a 28 °C en agitación constante a 80 rpm durante 30 días.

Luego de transcurrido este tiempo, los hidrocarburos remanentes se extrajeron por agitación durante una hora con 10 ml hexano, se redujo el volumen a 1 ml y la cuantificación se realizó inyectando 2 μ l en un cromatógrafo Varian CP-3800 equipado con una columna capilar (VF5ms) de sílicagel fundida de 30 m por 0,25 mm por 0,25 μ m y un programa de temperatura de 45 °C iniciales por tres minutos, seguido de una rampa de 45 °C a 275 °C a 12 °C.min⁻¹, finalizando con 12 min a 275 °C, con una temperatura del inyector y el detector de 200 °C y 300 °C respectivamente, y un detector por ionización de llama. Para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos se utilizaron los testigos propuestos por la *Environmental Protection Agency* en su norma 8015D (2003).

Análisis de datos

Los valores obtenidos fueron estudiados utilizando análisis de la varianza (ANOVA) con tres réplicas por nivel, mediante el programa BIOM (*Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage, Setauket, NY 11711 USA*) con un nivel de significancia de 5 %. Los resultados mostrados en gráficos y tablas se expresa el valor medio de los triplicados.

RESULTADOS

La cinética de crecimiento de la cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp, hace de esta una buena candidata por su rápido crecimiento y su gran capacidad de biodegradación de hidrocarburos alifáticos de peso molecular elevado como los que están presentes en aceite lubricante. La formación de biomasa a partir de destilados de petróleo (Fig. 1.a) fue mayor para aceite lubricante, seguido de gasoil y kerosene, no observándose esta capacidad con nafta. Entre los hidrocarburos puros la cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp utilizó n-heptano, n-octano, n-pentadecano, n-hexadecano y pristano (Fig. 1.b). Sin embargo, *R.*

erythropolis ohp-al-gp, no utilizó como única fuente de carbono y energía a ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xileno, antraceno, fenantreno, benzoato, m-tolueno y asfaltenos. En las pruebas, la biodegradación de gasoil, naftaleno y hexadecano en deficiencia de nitrógeno fue inferior. La degradación del gasoil fue un 20 % menor en carencia de nitrógeno, aunque presentó valores de 61 % en estas condiciones. Con el aumento de número de carbono disminuye su degradación en ausencia de nitrógeno, el C12 disminuye su degradación en un 9,8 % menos, pero el carbono C20, lo hace en un 74 % menos que cuando hay nitrógeno en el medio de cultivo (Tabla 1). Los hidrocarburos poliaromáticos se utilizan en el mismo porcentaje con excepción del naftaleno con un 17,68 % menos en ausencia de nitrógeno, sin embargo, el 2-Metilnaftaleno se degradó un 11 % más en ausencia de nitrógeno. El índice de degradación pristano /C17 se encuentra afectado debido a que la cepa estudiada puede utilizar el pristano como fuente de carbono y energía, por lo que también se modifica su valor y el índice no se puede calcular.

La utilización de la cepa como inoculante para la estimulación de la degradación mostró un efecto positivo en la misma aumentando en 100 % la acumulación de dióxido de carbono, en la utilización del hidrocarburo presente en la muestra. En la Fig. 2, se presentan las dos curvas de los promedios de las cinéticas que corresponden a los microcosmos con y sin inoculación de cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp. El seguimiento durante 60 días indica que, para el barro tratado, la opción más rápida corresponde al tratamiento con inoculación, es de hacer notar que la cantidad del inóculo fue importante, siendo la óptima 2 ml de una densidad óptica de 0,5 unidades de absorbancia. El valor final de la mineralización a los 60 días duplica al valor del sistema sin la inoculación de la cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp.

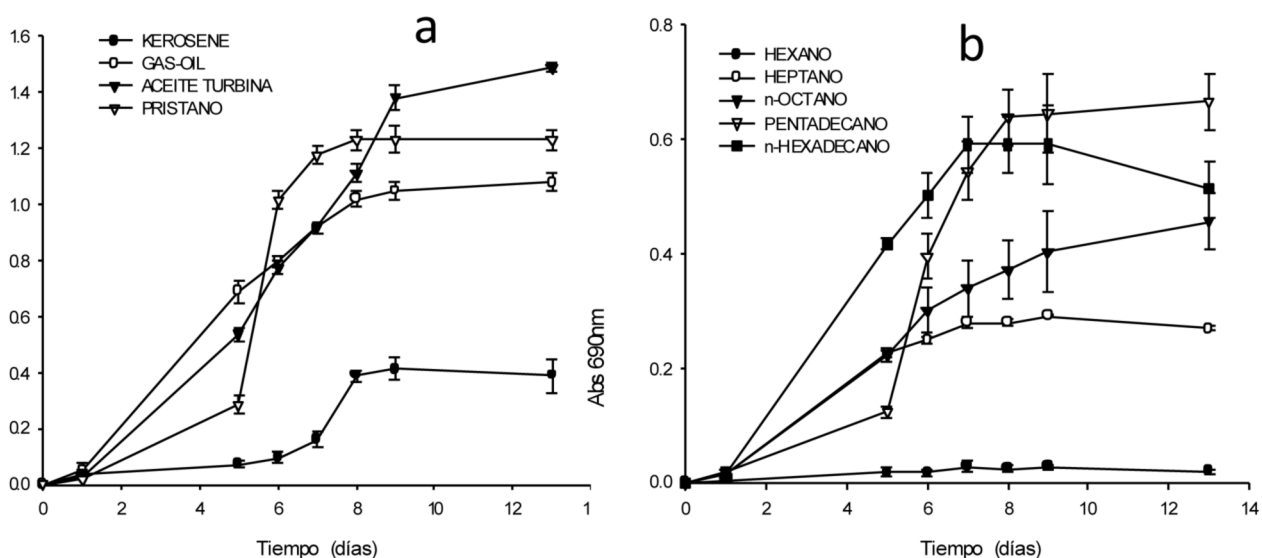


Figura 1a. y 1b. Producción de biomasa en función de la utilización de hidrocarburos puros. En ambas se grafica unidades de absorbancia (eje y) días de la experiencia (eje x).

Tabla 1. Composición del gasoil en los medios de cultivo con y sin nitrógeno.

Compuesto	Blanco (ppm)	MM (ppm)	MM2 (ppm)
C9	3,77	0,00	0,00
C10	21,48	6,05	3,67
C11	26,84	0,00	0,76
C12	44,72	0,00	4,38
C13	53,30	0,00	5,03
C14	77,02	0,00	11,29
C15	94,59	0,00	16,75
C16	104,90	1,88	24,14
C17	95,29	19,82	47,28
Pristano	0,58	1,05	0,00
C18	56,45	4,87	31,03
Fitano	17,51	19,91	14,92
C19	40,12	2,35	26,80
C20	25,57	1,93	17,95
C21	13,04	2,03	9,08
C22	6,09	0,00	4,53
C23	2,67	0,00	0,00
C24	2,26	0,00	0,00
Naftaleno	5,75	2,80	3,81
2-Metilnaftaleno	14,73	1,73	0,00
1-Metilnaftaleno	5,82	0,00	0,00
Acenaftileno	2,19	0,00	0,00
Acenaftaleno	1,60	0,00	0,00
Fluoreno	2,19	0,00	0,00
Antraceno	1,39	0,00	0,00
Prist/C17	0,0	0,1	0,0
Fitano/C18	0,3	4,1	0,5

Fuente: Mengle (2008).

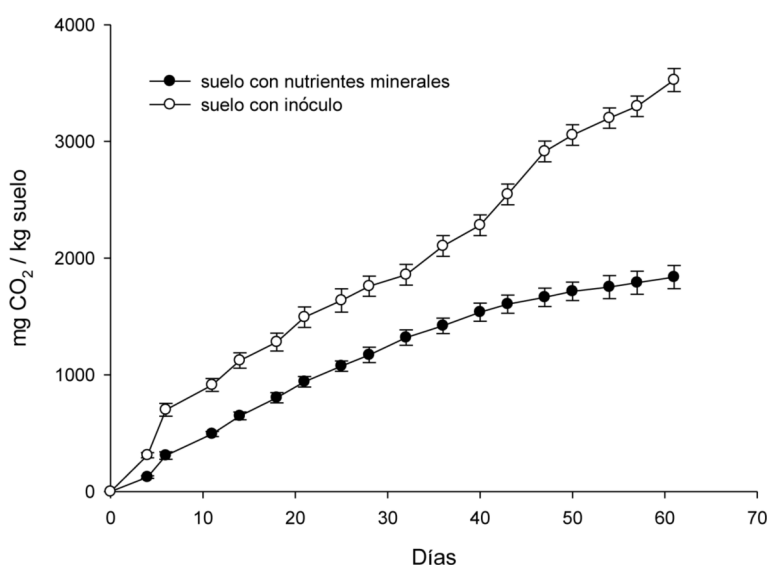


Figura 2. Cinéticas de biodegradación de hidrocarburos totales contenidos en la muestra de lavadero industrial estudiada durante 77 días. La biodegradación con nutrientes e inóculo (*Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp) tiene una excelente acción y un modelo que sigue una ecuación lineal. A todas las cinéticas se les restó la biodegradación intrínseca.

DISCUSIÓN

La cepa fue aislada de un suelo contaminado con aceite, en donde el mayor porcentaje de hidrocarburos es alifáticos de cadena larga, y el suelo en donde se inoculó es proveniente de una estación de servicio que posee contaminaciones con hidrocarburos livianos y pesados, provenientes de los combustibles y aceites lubricantes usados, 75 % hidrocarburos alifáticos, 18,6 % hidrocarburos aromáticos y 6,2 % hidrocarburos polares. La degradación de hidrocarburos depende, entre otros parámetros, de la composición química del residuo, los hidrocarburos aromáticos son los que poseen mayor dificultad de degradación, pero se pueden eliminar de una forma más lenta (Pucci y Pucci, 2003; Acuña *et al.*, 2012), y los hidrocarburos polares poseen una velocidad de degradación muy baja, debido a su baja solubilidad y gran tamaño molecular siendo similares al humus, esta conformación molecular es la que induce su alta persistencia. Los microorganismos presentes en el suelo después de un tiempo variable para cada caso, se adaptan y lo comienzan a utilizar como fuente de carbono y energía, como es el caso de esta cepa bacteriana y de otras cepas bacterianas (Hosokawa *et al.*, 2010).

El género *Rhodococcus* posee enzimas monooxigenasas que oxidan el producto y pueden metabolizarlo por β -oxidación (Martínková *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). El cual podría ser un mecanismo para la producción de ácidos grasos que serán utilizados para la síntesis de una variedad de lípidos que le posibilita sobrevivir en condiciones adversas (Carvalho y Fonseca, 2005; Lee *et al.*, 2010).

Los géneros *Rhodococcus* y *Athrobacter* son conocidos por su habilidad de degradar un amplio rango de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Ganesh y Lin, 2009; Greer *et al.*, 2010), algunos pueden producir surfactantes (Ganesh y Lin, 2009). La degradación de los alcanos está fuertemente asociada a la solubilidad del hidrocarburo. Los de cadenas cortas (C5 a C9) pueden ser tóxicas para los microorganismos debido a la solubilidad de las mismas en agua (Rojo, 2009), esta es una posible causa de los resultados negativos del ensayo en medio líquido con nafta cuya composición es de carbonos menores a C12, mientras que los hidrocarburos con cadenas superiores a 22 átomos de carbono son poco solubles y generan residuos cuya degradación es dificultosa dada su baja biodisponibilidad para las bacterias. Concordando con lo comentado por Margenise *et al.* (2012), los mejores resultados se obtienen para la utilización de los hidrocarburos que van de C12 a C18, en nuestro caso C16 y C15 que son hidrocarburos menos tóxicos para las membranas bacterias que el hexano y heptano. Los hidrocarburos ciclohexano y ciclohexanona, no se utilizaron coincidiendo con Solano *et al.* (2000) en que se pueden utilizar en medios sólidos, pero no permiten el desarrollo en medio líquido, la degradación del ciclohexano se puede dar como un cometabolismo pudiendo degradarse por una comunidad bacteriana (Solano *et al.*, 2000), sin embargo Carvalho y Fonseca (2002) comunicaron de una cepa de *Rhodococcus* que podía utilizarlo. En nuestro caso, la cepa *R. erythropolis*

ohp-al-gp no pudo utilizarlos al igual que a los aromáticos benceno, tolueno, xileno, tal vez debido a que estos aumentan la fluidez de la membrana causando la muerte del microorganismo en las concentraciones utilizadas. Los hidrocarburos obtenidos de la destilación del petróleo kerosene, gasoil y aceite lubricante se utilizaron obteniéndose los mayores valores que los hidrocarburos puros. Al ser mezclas de diferentes alifáticos, los aromáticos que poseen en menor proporción, no generaron toxicidad, estas mezclas son contaminaciones más frecuentes.

La inoculación de bacterias es cuestionada por muchos debido a que la cantidad bacteriana disminuye 1 log por día (van Elsas *et al.*, 2002). Por otro lado, la adición de bacterias a un suelo y la depredación de la misma puede favorecerse por el agregado de nutrientes (Acuña *et al.*, 2008). El agregado de los mismos nutrientes en los suelos patagónicos, genera siempre un resultado positivo, solo si se les adiciona en la cantidad necesaria (debido que en concentraciones mayores se produce una inhibición del desarrollo bacteriano). De un trabajo anterior se concluyó que para optimizar la degradación, la concentración óptima era de C:N:P 100:5:1, y no valores de 100:1:0.1, ya que producían una menor mineralización (Acuña *et al.*, 2007). La sobrevivencia de esta cepa, está asociada a que es una cepa patagónica extraída de un suelo con características similares y expuestas a un mayor grado de estrés debido a la latitud en que se encuentra el suelo de donde se extrajo. Algunos autores proponen encapsular la cepa inoculada con el objetivo de aumentar su supervivencia (Briglia *et al.*, 1990; Wier *et al.*, 1996). El inóculo mejoró sustancialmente la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo, el mismo realizó una simbiosis con los organismos presentes para una mejor degradación de la mezcla completa, al ser un residuo de una estación de servicio contenía aceites lubricantes usados, y el lavado de los tanques de combustibles, los hidrocarburos livianos como la nafta tienen a eliminarse por evaporación en el sitio, pero los más pesados no. *R. erythropolis* ohp-al-gp mostró degradación casi paralela del aceite lubricante y la mezcla de gasoil que se siguió con cromatógrafo gaseosa. La ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo produjo una menor degradación de los hidrocarburos (comparado con el medio con nitrógeno), pero igualmente hubo una degradación, tal vez por la probable presencia de enzimas del tipo nitrogenasas que pueden estar presentes en los *Rhodococcus* (Banerjee *et al.*, 2002). La mayoría de los poliaromáticos se degradaron quedando el naftaleno y el 2-metilnaftaleno en el medio de cultivo con nitrógeno, y en cambio en el medio de cultivo sin nitrógeno solo quedó el naftaleno concordando con Acuña *et al.*, (2012), quienes encontraron que los sistemas con ausencia de nitrógeno poseen una mejor degradación de poliaromáticos.

CONCLUSIONES

La cepa *R. erythropolis* ohp-al-gp presenta un excelente potencial de biorremediación de hidrocarburos conflictivos como

son los aceites lubricantes, su posible empleo en la eliminación de barros provenientes de lavados de motores o de estaciones de servicio sería su aplicación más importante. La velocidad de degradación, en condiciones óptimas de cultivo, le confiere una ventaja adicional. Además, posee una degradación baja en ausencia de nitrógeno, factor limitante y frecuente en los suelos patagónicos.

AGRADECIMIENTOS

Esta publicación ha sido posible gracias al financiamiento del Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA).

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña AJ, Pérez Krenek JF, Pucci OH, Pucci GN. Biodegradación de Hidrocarburos. Influencia de la Fertilización en el Proceso de Biorremediación. *Ingen Sanit Amb.* 2007;84(2):82-86.
- Acuña AJ, Pucci OH, Pucci GN. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistema.* 2008;17(2):85-93.
- Acuña AJ, Pucci OH, Pucci GN. Effect of nitrogen deficiency in the biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons in patagonian contaminated soil. *Int J Res Rev Appl Sci.* 2012;11(3):479-485.
- Banerjee A, Sharma U, Banerjee C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotech.* 2002;60(5):33-44.
- Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(4):729-239.
- Briglia M, Mumiaho Lassia EL, Vallini G, Salkinoja Salomen M. The survival of the pentachlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Flovobacterium* sp. *Nat soil.* 1990;1(3):273-281.
- Carvalho CCCR, Fonseca MR. Maintenance of cell viability in the transformation of (-) carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *J Mol Catal.* 2002;19:289-398.
- Carvalho CCCR, Fonseca MR. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL 14. *Microbial Ecol.* 2005;51(3):389-399.
- Chang WN, Chih-Wen L, Hwai-Shen L. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem.* 2009;44(9):955-962.
- EPA 8015D. 2003. Disponible en URL: www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/8015d
- Ganesh A, Lin J. Diesel degradation and biosurfactant production by gram- positive isolates. *African J Biotech.* 2009;8(21):5847-5854.
- Heald SC, Brandao PFB, Hardicre R. Bull physiology biochemistry and toxonomy of deep sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains Antonie Leeuwenhoek. 2001;80(2):169-183.
- Hosokawa R, Sakaguchi N, Okuyama H. Establishment and characterization of turbine oil-degrading bacterial consortia. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2010;64(6):519-524.
- Kim D, Yoo M, Choi, Kang BS, Kim S, Hong SG, *et al.* Differential degradation of bicyclics with aromatic and alicyclic rings by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(23):8280-8287.
- Langdahl BR, Ingoorsen K. Nitrile hydrolysis by *Rhodococcus erythropolis* BL1 an acetonitrile-tolerant strain isolated from a marine sediment. *Microbiol.* 1996;142(1):145-154.
- Lee EH, Kim J, Cho KS, Ahn YG, Hwang GS. Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate *Rhodococcus* sp. EH831. *Environm Sc Poll Res.* 2010;17(1):64-77.
- Liu CW, Chang WN, Liu HS. Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline conditions and sea water. *Biochem Eng J.* 2009;45(1):69-75.
- Margesin R, Moertelmaier C, Mair J. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *Int Biodeterior Biodegradation.* En prensa 2012. (Disponible *online* 4 de junio de 2012).
- Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nešvera J, Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Intern.* 2009;35(3):162-177.
- Pucci GN, Acuña AJ, Pucci OH. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. *Ingen Sanit Amb.* 2011;115(3):36-41.
- Pucci OH, Pucci GN. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburo previamente sometidas a landfarming. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35(2):62-68.
- Pucci OH, Bak MA, Peressutti SR, Klein I, Hârtig C, Alvarez HM, *et al.* Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). *Acta biotechnol.* 2000;2(2):129-146.
- Pucci OH, Bak MA, Peressutti SR, Klein I, Hârtig C, Wünsche L. In situ-sanierung eines hochgradig mit kohlenwasserstoffen kontaminierten areals in cerro dragón, patagonien, argentinien. *UFZ Leipzig-Halle GmbH, Leipzig.* 1998;18(1):5-13.
- Riis V, Babel W, Pucci OH. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosph.* 2002;49(6):559-568.
- Rojó F. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol.* 2009;11(10):2477-2490.
- Solano F, Marchal R, Lebealt JM, Vandecasteele JP. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of cultureheadspace composition. *Lett Appl Microbiol.* 2000;30(1):19-22.
- Song X, Yan X, Gangmin L, Ying Z, Tongwang H, Zhong H. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic

- hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Mar Pollut Bull. 2011;62(10):2122-2128.
- SPEIGHT J. The chemistry and technology of petroleum. Ed: Marcel Dekker. Second Edition. NY. 1991. Cap. 20. p. 701-705.
- Van Elsas JD, Garbeva P, Salles J. Effect of agronomical measures on the microbial diversity of soil as related to the suppression of soil borne plant pathogen. Biodegradation. 2002;13(2):2229-2240.
- Wier SC, Lee H, Trevors JT. Survival of free and alginate-encapsulated *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr in soil treated with disinfectants. J Appl Microbiol. 1996;80(1):19-25.

