

Artículo original

Ecología bacteriana de agua utilizada en recuperación secundaria de petróleo

Graciela Natalia Pucci*, Adrián Javier Acuña, Oscar Héctor Pucci

Centro de Estudios e Investigaciones en Microbiología Aplicada, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.

Recibido 17 de noviembre de 2014; aceptado 8 de junio de 2015

Resumen: La corrosión microbiológica y el bioensuciamiento afectan a las instalaciones industriales. El objetivo del trabajo fue estudiar las bacterias presentes en el agua de recuperación secundaria (ARS), que utilizan diferentes fuentes de hidrocarburos y aceptores de electrones. Para ello se realizaron recuentos de bacterias en placa: bacterias aerobias totales (BAT) en medio R2A y degradadoras de hidrocarburos en MM-PGO, así como recuentos de bacterias por número más probable (NMP) en: bacterias reductoras de sulfato (BRS), bacterias anaerobias, bacterias que respiran sulfato, nitrato o hierro y en medios líquidos de bacterias que utilizan gasoil o benzoato con diferentes aceptores finales de electrones, nitrato, sulfato, y hierro. Se encontró una población aeróbica que utiliza hidrocarburos como única fuente de carbono y energía y una comunidad anaerobia que puede utilizar los hidrocarburos componentes del gasoil y el benzoato, con aceptores de electrones como el nitrato y el ión férrico. En las muestras del yacimiento estudiado, existe una comunidad bacteriana capaz de utilizar diferentes aceptores de electrones (alternativas al oxígeno) que están presentes en el ARS como son $\text{SO}_4^{=}$ y Fe^{3+} , y en menor medida NO_3^- ; lo que implica que estas comunidades (respiradoras alternativas de O_2) podrían ser las que soportan y dan sustrato al desarrollo de las BSR.

Palabras clave: respiración de nitratos, sulfatos, ión férrico, hidrocarburos, benzoato.

Bacterial ecology of water used in secondary petroleum recovery

Abstract: Microbiological corrosion and biofouling affect industrial facilities. The objective of this work was to study the bacteria in secondary recovery water (SRW), using different sources of hydrocarbons and electron acceptors. The bacterial counts were performed on plate: total aerobic bacteria (TAB) on R2A medium and hydrocarbon degrading in MM-PGO and bacteria counts for most probable number (MPN) in: sulfate reducing bacteria (SRB), anaerobic bacteria, bacteria breathing sulfate, nitrate or iron in liquid media and bacteria that use oil or benzoate as different final electron acceptors such as nitrate, sulfate, and iron. Aerobic population using hydrocarbons as sole carbon and energy source and an anaerobic community can use the hydrocarbon components of diesel and benzoate as electron acceptors such as nitrate and ferric iron was found. In samples of the reservoir evaluated, there is a bacterial community capable of using different electron acceptors (as alternative for oxygen) present in the SRW such as $\text{SO}_4^{=}$, Fe^{3+} , and NO_3^- of minor contribution, implying that these communities (O_2 alternatives respirators) could be the supporting substrate and contribute to the development of sulfate reducing bacteria.

Keywords: nitrate respiration, sulfate, ferric ion, hydrocarbons, benzoate.

* Correspondencia:

E-mail: granapu@unpata.edu.ar

Introducción

La corrosión microbiológica y el bioensuciamiento afectan a las instalaciones industriales originando importantes pérdidas económicas [1,2]. La industria petrolera es, particularmente, una de las más afectadas por el biodeterioro debido a la gran cantidad de acero que es utilizado en sus instalaciones. Ambos problemas microbiológicos producen una disminución en la producción, debido a roturas de instalaciones de superficie y pozos inyectoros. Por otro lado,

ocasionan un importante perjuicio al medio ambiente por derrames en superficie o por contaminación de acuíferos, cuando las roturas se producen en pozos inyectoros [3].

Los principales microorganismos implicados en la corrosión de metales son las bacterias anaerobias reductoras de sulfato (BSR). Estas se han estudiado en yacimientos de la Patagonia mostrando una importante diversidad, en especial cuando se encuentran fijas a las superficies [4,5]. Estos microorganismos son anaerobios estrictos y comparten el hábitat del agua de recuperación secundaria (ARS) de

petróleo con géneros aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos que sólo han sido parcialmente estudiados en la región, las cuales contribuirían en el sistema ecológico incorporando fuentes de carbono para las BSR [6,7].

El hábitat de desarrollo del ARS posee gran variabilidad de la velocidad de flujo y de las condiciones de temperatura, aireación, pH, potencial de óxido-reducción, salinidad y presencia de aceptores alternativos de electrones que se encuentran en la planta y en la formación petrolífera por donde circula el agua. Los hidrocarburos son la mayor fuente de carbono y energía, no siendo suficientes para el desarrollo de la mayoría de las BSR, ya que éstas utilizan un reducido número de compuestos orgánicos, entre los que no se encuentran frecuentemente los hidrocarburos [4]. En la literatura se ha citado la existencia de microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de alcanos y cicloalcanos en condiciones anaeróbicas de desnitrificación [8], con hidrocarburos alicíclicos derivados de la nafta en acuíferos anóxicos [9] y con productos de la degradación del benceno en condiciones anóxicas [10].

El objetivo de ese trabajo fue determinar la presencia de gremios bacterianos anaerobios facultativos, con capacidad de utilizar fuentes de carbono y energía presentes en el ARS en presencia de aceptores de electrones alternativos al oxígeno.

Materiales y métodos

Toma de muestra: Se tomaron muestras en dos puntos de un sistema de tratamiento ARS, comúnmente denominada agua de formación. Las muestras fueron tomadas en la cuenca del Golfo San Jorge cuya producción es de petróleo tipo Escalante. Una de ellas se tomó a la salida del tanque intermedio (TI), donde se produce la primera separación agua-petróleo, y la otra a la salida del skimmer (TS), tanque donde se produce la separación del petróleo remanente en el TI y de los sólidos en suspensión. De cada muestra se tomaron dos litros, en recipiente estéril, previo purgado de cinco minutos, determinándose su temperatura *in-situ* [11].

Determinación de aniones y cationes: La determinación de pH fue realizada mediante un potenciómetro con electrodo de vidrio y las del contenido de carbonato y bicarbonato por titulación con ácido clorhídrico valorado. El calcio y magnesio se investigaron por complejometría con EDTA, a pH 12, para el primero de ellos utilizando murexida como indicador, y a pH 10 con negro de ericromo T como indicador para el segundo. El cloruro fue determinado por el método de Mohr, el sulfato por su precipitación en medio ácido, el ión amonio con azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno. El nitrato se determinó colorimétricamente con brucina en presencia de ácido sulfúrico. La concentración de sodio y potasio se determinó por fotometría de llama y la de hierro por colorimetría en medio ácido y en presencia de tiocianato de potasio. El CO₂ disuelto se determinó por titulación con fenolftaleína como indicador, el sulfuro por el método de azul de metileno y el oxígeno disuelto por el

método de Winkler [11]. La concentración de hidrocarburos se realizó por extracción con tricloroetano y cuantificación en espectrofotómetro a 420 nm [5].

Estudio de gremios y comunidades bacterianas: Se realizaron recuentos de bacterias aerobias por diseminación en superficie en los siguientes medios: agar R2A para bacterias heterótrofas, agar para bacterias heterótrofas aerobias totales (BAT), medio mineral con 15 µL de una mezcla de petróleo-gasol 1:1 (MM-PGO) esparcido en la superficie del agar en la placa de Petri y medio mineral con 15 µL de benzoato (MM-B) como fuentes de carbono y energía [12,13]. La composición de todos los medios de cultivo se muestra en la tabla 1. Las placas para el conteo bacteriano se incubaron a 45 °C, durante un tiempo máximo de 24 días evitando la evaporación. En todos los casos se expresaron los promedios de los triplicados efectuados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Bacterias con capacidad de utilizar diferentes dadores y aceptores de electrones: La presente experiencia se realizó por el conteo de los microorganismos de interés por la técnica de número más probable (NMP). Los medios de cultivo utilizados se fraccionaron en frascos de 10 mL con 9 mL de medio de cultivo utilizando tapón de butilo y precinto de aluminio. A todos los medios se les agregó tioglicolato de sodio para eliminar el oxígeno presente.

Los microorganismos estudiados fueron: bacterias anaerobias fermentadoras en medio Anear-F, bacterias que respiran nitratos en medio H-NO₃, bacterias que respiran ion férrico en medio H-Fe y para bacterias que respiran sulfatos se utilizó el medio H-SO₄. Para estudiar los microorganismos que utilizan el gasoil como dador de electrones se utilizaron los medios GO-SO₄, GO-NO₃ y GO-Fe₃ con sulfato, nitrato e ión férrico como aceptores de electrones, respectivamente. Por otra parte, para estudiar los microorganismos que utilizan el benzoato como dador de electrones se utilizaron los medios B-NO₃, B-SO₄ y B-Fe con nitrato, sulfato e ión férrico como aceptores de electrones, respectivamente. Para estudiar las bacterias reductoras de sulfato se utilizó el medio BSR. La composición de todos los medios de cultivo mencionados se muestra en la tabla 1. Todos los conteos de microorganismos se incubaron a 45 °C, durante un tiempo de 59 días.

La estrategia de la comunidad frente a los donantes y aceptores de electrones se efectuó de acuerdo con lo propuesto por Sarathchandra [14].

Análisis de la capacidad de adaptación de las comunidades a diferentes dadores y aceptores de electrones: Se tomó 1 mL de la primera dilución del medio anaerobio, con aceptores alternativos de electrones, que presentó desarrollo y a partir de éste se inocularon con aguja y jeringa estéril 0,2 mL en cada uno de los restantes medios de cultivo con los diferentes aceptores y donantes de electrones ensayados. Se incubaron a 45 °C hasta 60 días.

Resultados

El ARS se caracterizó por su elevado contenido de cloruros y sales en general (Tabla 2). En ambas muestras los valores obtenidos fueron similares, a excepción del contenido de petróleo, pudiendo estar relacionado con la ubicación de los tanques, que poseen la función de separación y extracción del mismo.

Tabla 2. Análisis fisicoquímico de agua de recuperación secundaria.

Analito	Tanque Intermedio	Tanque Skimmer
pH	7,3	7,2
Temperatura (°C)	54	51
Potencial de óxido reducción (mV)	-290	-310
Turbidez (UNT)	30	45
Oxígeno (mg.L ⁻¹)	ND	ND
CO ₂ (mg.L ⁻¹)	34,6	49,5
Sulfuro (mg.L ⁻¹)	0,05	0,11
Carbonato (mg.L ⁻¹)	ND	ND
Bicarbonato (mg.L ⁻¹)	747	717
Cloruro (mg.L ⁻¹)	8377	7895
Sulfato (mg.L ⁻¹)	3,9	12,4
Fosfato (mg.L ⁻¹)	0,2	0,2
Nitrato (mg.L ⁻¹)	2,0	1,9
Amonio (mg.L ⁻¹)	0,6	0,6
Calcio (mg.L ⁻¹)	160	160
Magnesio (mg.L ⁻¹)	80	97
Sodio (mg.L ⁻¹)	1488	1603
Potasio (mg.L ⁻¹)	983	1030
Hierro total (mg.L ⁻¹)	1,5	5,6
Petróleo en agua (mg.L ⁻¹)	156	35

ND: no detectado.

Los recuentos de las bacterias aerobias se observaron durante 24 días (Tabla 3). En la muestra de TI las colonias tardaron en desarrollarse de 4 a 6 días, con excepción del medio MM-PGO, en donde las colonias comenzaron a visualizarse en las placas de Petri después del octavo día, variando un solo logaritmo hasta el día 14 y manteniéndose el número de UFC/mL hasta el final del período de incubación. En la muestra proveniente del TS, a las 24 h se observó desarrollo en los medios de cultivo sólidos R2A y BAT y a los 4 días en los medios de cultivo sólidos MM-B y MM-PGO.

Los resultados de los recuentos en medios de cultivo líquidos con diferentes aceptores finales de electrones se

Tabla 3. Recuento bacteriano en diferentes medios de cultivo.

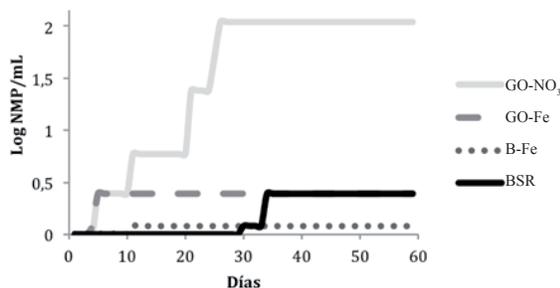
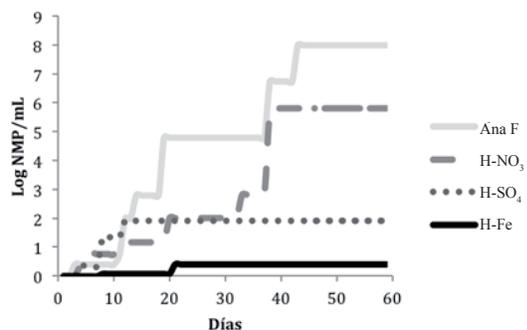
	Intermedio	Skimmer	
BAT (UFC/mL)	1,3 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴	Comunidades aerobias *
R2A (UFC/mL)	1,7 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	
MM-PGO (UFC/mL)	3,5 x 10 ⁵	5,2 x 10 ³	
MM-B (NMP/mL)	8,9 x 10 ³	2,5 x 10 ⁴	
Anaer-F (NMP/mL)	1,2 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁹	Nutrientes comunes **
H-NO ₃ (NMP/mL)	1,0 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁸	
H-SO ₄ (NMP/mL)	1,2 x 10 ²	1,2 x 10 ²	
H-Fe (NMP/mL)	2,0 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹	
GO-NO ₃ (NMP/mL)	1,2 x 10 ²	1,4 x 10 ²	Nutrientes hidrocarburos**
GO-Fe (NMP/mL)	2,7 x 10 ¹	6,1	
B-Fe* (NMP/mL)	1,4	2,6	
BSR* (NMP/mL)	2,9	6,3 x 10 ¹	

* 24 días de incubación, ** 59 días de incubación. Bacterias aerobias totales (BAT); medio mineral (MM); petróleo: gasoil (PGO); benzoato (B); anaerobias fermentadores (Anaer-F); respiran nitratos (H-NO₃); respiran ion férrico (H-Fe); respiran sulfatos (H-SO₄); benzoato-nitrato (B-NO₃); benzoato-ión férrico (B-Fe); benzoato-sulfato (B-SO₄); bacterias sulfato reductoras (BSR).

observan en la tabla 3, en la figura 1 (TI) y en la figura 2 (TS). En la figura 1 se observan desarrollos multiáxicos de los recuentos bacterianos hasta el día 43 para los medios Anaer-F y H-NO₃. Este comportamiento se observó durante 13 días para el medio H-SO₄ y durante 22 días para el medio H-Fe, siendo esto concordante con los resultados encontrados en las bacterias aerobias. En el TS se observaron valores de recuento bacteriano de H-Fe mayores que en el TI, observándose un desarrollo más rápido en los medios de cultivo líquidos utilizados (Figura 2). Los medios de cultivo Anaer-F y H-NO₃ presentaron un desarrollo en paralelo multiáxico mientras que en H-SO₄ el máximo valor de microorganismos se obtuvo en el décimo primer día.

En la búsqueda de bacterias capaces de utilizar el gasoil con diferentes aceptores finales de electrones, se encontró que en el TI (Figura 1) y en el TS (Figura 2) el nitrato produjo los mayores recuentos bacterianos, mientras que con hierro y sulfato no se observó desarrollo. La utilización de benzoato se encontró en bacterias que utilizan el hierro como aceptor final de electrones. La diferencia más notoria entre los dos puntos de muestreo residió en el recuento de las BSR, el cual fue superior en dos logaritmos en el TS. Este resultado pone de manifiesto que el principal aceptor de electrones fue el nitrato, que en el TS presentó un desarrollo más veloz, (estrategia "r"), observándose en los dos primeros días. En el TI, si bien los resultados finales fueron similares, el tiempo en llegar a ellos fue mucho mayor (24 días), lo que indicaría una estrategia "K".

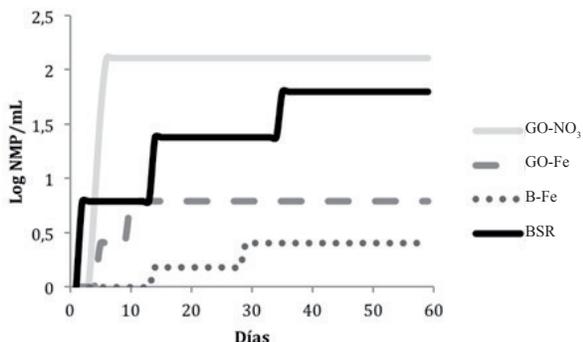
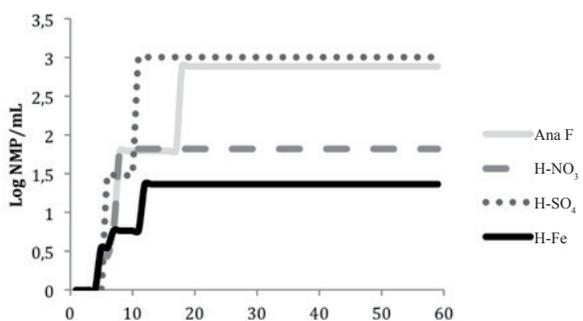
A



B

Figura 1. Tanque intermedio. A) Desarrollo de bacterias en los medios líquidos con nutrientes orgánicos comunes y aceptores de electrones alternativos (Anaer-F, H-NO₃⁻, H-SO₄⁼, H-Fe³⁺). B) Desarrollo de bacterias en los medios líquidos con aceptores alternativos de electrones y utilización de gas oil (GO) y BRS (GO-Fe³⁺, GO-NO₃⁻, BSR), expresado como NMP/mL en el transcurso de los 59 días de incubación.

A



B

Figura 2. Tanque skimmer. A) Desarrollo de bacterias en los medios líquidos con nutrientes orgánicos comunes y aceptores de electrones alternativos (Anaer-F, H-NO₃⁻, H-SO₄⁼, H-Fe³⁺). B) Desarrollo de bacterias en los medios líquidos con aceptores alternativos de electrones y utilización de gas oil (GO) y BRS (GO-Fe³⁺, GO-NO₃⁻, BSR), expresado como NMP/mL en el transcurso de los 59 días de incubación.

Las comunidades bacterianas fueron capaces de desarrollarse con otros aceptores de electrones alternativos al cultivado inicialmente. Los gremios desarrollados en los medios anaerobios fermentativos, nitrato, y sulfato se adaptaron al crecimiento con los distintos aceptores de electrones, pero con escasa adaptación a las fuentes de carbono. Las bacterias con respiración de hierro no presentaron capacidad de utilización del nitrato; los gremios provenientes de los medios con gasoil-hierro, benzoato-hierro y BSR, mostraron escasa capacidad de adaptación al resto de las condiciones ensayadas.

Discusión

Desde los primeros trabajos en bacteriología del ARS en la cuenca del golfo San Jorge (Chubut, Argentina) se sospechaba la existencia de microorganismos que dieran el soporte metabólico necesario para el complejo sistema biótico de la misma, especialmente a las BRS que no son capaces de crecer con hidrocarburos [2-7].

La composición del agua en los dos puntos estudiados se relaciona con la calidad del agua de formación de muchos de los yacimientos del Golfo San Jorge. La temperatura, la ausencia de oxígeno, el potencial redox, la concentración de aniones, cationes y nutrientes hacen de este fluido un hábitat que permite el desarrollo de bacterias con un grado de adaptación elevado, a pesar de ser un hábitat agresivo para muchos microorganismos.

La utilización de hidrocarburos en condiciones aeróbicas está ampliamente documentada [13,15]. La utilización en condiciones anaeróbicas y en laboratorio de compuestos aromáticos, por cepas en cultivo puro, así como también la utilización de alcanos, fue comunicada por varios autores en la década del 90 [16, 21].

En todos los medios heterótrofos de cultivo ensayados se observó desarrollo bacteriano. Las bacterias heterótrofas que utilizaron hidrocarburos tuvieron una estrategia tipo "r" para el crecimiento en sus medios específicos, llegando a valores que se obtienen comúnmente en ARS (10⁴ a 10⁵ UFC/mL). Se observó el máximo recuento de estas bacterias a los seis días de incubación. Una excepción se obtuvo en el medio con gasoil (GO-NO₃), en el que se observó un aumento del recuento bacteriano hasta el día 25 de incubación en la muestra del TI, pudiendo estar esto relacionado a que el gasoil es una mezcla de hidrocarburos. La ausencia de oxígeno y un potencial redox muy bajo, junto con la elevada agresividad, no son impedimento para que estas bacterias mantengan su viabilidad en el ARS. Algunas de ellas acompañan a las BRS que se aíslan de estos medios de cultivo y son causa de perjuicios adicionales como el bioensuciamiento [6]. Los resultados mostraron concordancia entre la principal fuente de carbono y energía presente en este hábitat, el hidrocarburo, y el número de bacterias que utilizan hidrocarburos, igual o superior en el caso del gasoil que para el número de las bacterias heterótrofas.

Las bacterias aerobias heterótrofas fermentadoras que

crecen con nitrato como aceptor de electrones fueron las que se encontraron en mayor número. Este es un hecho que no puede explicarse basándose en la composición del agua en estudio, en la que los nitratos no abundan (1,8 ppm) y los azúcares sólo pueden provenir de la descomposición de otras bacterias que utilicen a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Los dos aceptores de electrones que estuvieron en mayor cantidad en las muestras colectadas fueron el sulfato (soluble) y el ión férrico (insoluble como óxidos e hidróxidos presentes en el agua). El hecho de que el aceptor de electrones sea insoluble implica que las bacterias deban adherirse a él para poder respirarlo. Esto puede explicar el bajo número encontrado de estos grupos bacterianos, donde sólo se detectarían las bacterias adheridas a las finas partículas de hierro que se encuentran en suspensión (observación microscópica no mostrada). Las bacterias heterótrofas que los utilizan fueron las que se encontraron en menor cantidad.

El grupo de bacterias heterótrofas anaerobias se presentó en dos órdenes de magnitud mayor a las aerobias heterótrofas, circunstancia que está de acuerdo con las características del hábitat (Tabla 2).

Teniendo en cuenta el rendimiento energético de los aceptores de electrones alternativos utilizados, el rendimiento observado fue bajo comparado con el del oxígeno. La energía producida por la oxidación, por ejemplo la del tolueno, en presencia de aceptores de electrones diferentes es: desnitrificación $\Delta G^\circ = -3554$ kJ; reducción del Fe^{3+} $\Delta G^\circ = -3398$ kJ; bacterias reductoras del sulfato $\Delta G^\circ = -205$ kJ/mol en todos los casos son energías obtenidas a partir de la respiración anaerobia del tolueno [22]. Estos rendimientos energéticos explican los resultados obtenidos con las comunidades que utilizan hidrocarburos con diferentes aceptores de electrones (Figuras 1 y 2), y el por qué la respiración de nitratos y los procesos fermentativos pueden soportar estrategias “r” en comparación con el resto de las comunidades que utilizan estrategias “K”.

Conclusiones

El sistema de ARS estudiado tiene una población aerobia que utiliza hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Los datos hallados indican que la cadena alimentaria en este sistema de recuperación secundaria de petróleo se inicia con bacterias que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono y energía y que respiran nitratos o ión férrico. Las comunidades que se desarrollaron originalmente en medios de cultivo con aceptores de electrones alternativos al O_2 , no solo se desarrollaron en el medio de cultivo de origen sino además en la mayoría de los otros medios de cultivo. En las muestras de ARS estudiadas existe una comunidad bacteriana capaz de utilizar diferentes aceptores de electrones (alternativas al oxígeno) que están presentes en el ARS como son $\text{SO}_4^{=}$ y Fe^{3+} , y en menor medida NO_3^- , lo que implica que estas comunidades (respiradoras alternativas de O_2) podrían ser las que soportan y dan sustrato al desarrollo de las BRS.

Referencias

1. Costerton, JW, Boivin, J. Biofilms and biocorrosion. In: Flemming H-C, Geesey GG, editors. Biofouling and biocorrosion in industrial watersystems. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p. 195-204.
2. Pucci, OH. Aspectos taxonómicos de cepas patagónicas y cepas tipo del género *Desulfovibrio*. RAM. 1993; 25:185-211.
3. Pucci OH, Gonzalo SA, Dajczgewand E. Desarrollo de bacterias en instalaciones de tratamiento de agua. Revista BIP. 1989; 19:28-38.
4. Pucci OH. Taxonomía numérica del género *Desulfovibrio* por análisis de agrupamiento. RAM. 1992; 24:151-70.
5. Pucci GN, Pucci OH. Poblaciones bacterianas en agua de formación. Revista Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Asociación Ingeniería Sanitaria y Ambiental Argentina. 2015 (en prensa).
6. Pucci, OH. *Alteromonas putrefaciens*, su aislamiento a partir de agua de recuperación secundaria de la industria del petróleo. RAM. 1990; 22:68-72.
7. Pucci OH, Estevao-Belchior SG, Gonzalo SA. Relevamiento de grupos metabólicos (GM) de bacterias sulfato reductoras. Revista BIP. 1991; 27:76-84.
8. Wilkes H, Kühner S, Bolm C, Fischer T, Classen A. Formation of n-alkane- and cycloalkane-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. Org Geochem. 2003; 34:1313-23.
9. Townsend GT, Prince RC, Suffita JM. 2004. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer. FEMS Microbiol Ecol. 2004; 49:129-35.
10. Johnson SJ, Woolhouse KJ, Prommer H, Barry DA, Christofi N. Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. Engineering Geology. 2003; 70:343-9.
11. Standard methods for examination of water and waste water. 18th edition. Maryland: American Public Health, Association, American Water Works, Association, Water Environment Federation; 1992.
12. Reasoner, DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol. 1985; 49:1-7.
13. Pucci GN, Pucci OH. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidos a landfarming. RAM. 2003; 35:62-8.
14. Sarathchandra SU, Burch G, Cox NR. Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. Applied Soil Ecology. 1997; 6:293-9.
15. Pucci OH, Bak MA, Peressutti SR, Klein I, Härtig C. Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina).

- Acta Biotechnol. 2000; 20:129-46.
16. Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W, Fuchs G. Taxonomic position of aromatic degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *T. aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *A. evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of *Proteobacteria*. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45:327-33.
 17. Coates JD, Chakraborty R, McInermey MJ. Anaerobic benzene biodegradation-a new era. Res Microbiol. 2001; 153:621-8.
 18. Dolfing J, Zeyer P, Binder-Eicher P, Schwarzenbach RP. Isolation and characterization of a bacterium that mineralized toluene in the absence of molecular oxygen. Arch Microbiol. 1990; 154:336-41.
 19. Aeckersberg F, Bak F, Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. Arch Microbiol. 1991; 156:5-14.
 20. Aeckersberg, F, Rainey FA, Widdel F. Growth, natural relationships, cell fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria utilizing long-chain alkanes under anoxic conditions. Arch Microbiol. 1998; 170:361-9.
 21. Rueter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey FA. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by denitrifying bacteria. Nature. 1994; 372:455-8.
 22. Heider J, Sportmann AM, Beller HR, Widdel F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiol Rev. 1990; 22:459-73.