

Aislamiento de microorganismos a partir de áreas crónicamente contraminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación

Franco Liporace

Universidad Tecnológica Nacional – Argentina
fliporace@frd.utn.edu.ar

Debora Conde Molina

Universidad Tecnológica Nacional – Argentina
dconde@frd.utn.edu.ar

Carla Quevedo

Universidad Tecnológica Nacional – Argentina
quevedo.carla@gmail.com

Norberto S Odobez

Universidad Tecnológica Nacional – Argentina
odobezn@frd.utn.edu.ar

ABSTRACTS

*Petroleum is a complex mixture of different hydrocarbon and nonhydrocarbon compounds. The problem caused due to the widespread usage of petroleum-based products, is their discharge and accidental spillage in environment proving to be hazardous to the surroundings as well as life forms. Bioremediation is a non-invasive and cost-effective technique that relies on natural decontamination using microbes or biosurfactants produced by isolates strains from contaminates areas for the clean-up of these petroleum hydrocarbons. The Zárate- Campana industrial center, located in Buenos Aires, represents one of the most important petrochemical areas in Argentina with several companies carrying out petrochemical activities. In this study we have investigated the ability of microorganisms to degrade these hydrocarbons. Samples were collected in the surroundings of Campana area and screened for hydrocarbon degrading bacteria and potential biosurfactant producers. 13 strains were isolated from contaminated sites and cultivated in minimum media with a mixture of three commercial hydrocarbons (HC; kerosene, diesel and gasoline RON 95) a sole carbon and energy source. 2 efficient isolates high degrader and biosurfactant production respectively belong to the genus *Pseudomonas* were identified phylogenetically. The quantitative analysis of biodegradation was carried out by gas chromatography analysis and a degradation rate as high as 46.5% after 10 days was recorded by *Pseudomonas* sp MTHC1A3 isolate. Respect to biosurfactant production by direct measurement of the surface tension, one of the strains, Ag HC identified as *Pseudomonas koreeensis* reduce surface tension value in more than 46% when was cultured with minimum media and glycerol as alternative economic industrial co-products.*

Keywords: *bioremediation, contaminated soils, biosurfactants, hydrocarbons*

1. INTRODUCCIÓN

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en el endurecimiento de legislaciones ambientales y cambios de política fiscal que buscan reducir el impacto ambiental de las actividades desarrolladas por el hombre. En este contexto, la Argentina enfrenta las consecuencias de la explotación de recursos no renovables (petróleo, minerales), de la actividad agropecuaria (uso de agroquímicos), de la actividad industrial (industrias químicas, petroquímica, curtiembres, celulosa, entre otras) que muchas veces no contemplan las prácticas de conservación del medio ambiente e impactan en diversos ecosistemas, incluyendo suelos, aguas superficiales y subterráneas. Entre las clases más importantes de contaminantes orgánicos en el medio ambiente son los hidrocarburos del petróleo y productos halogenados derivados de los petroquímicos. Los hidrocarburos representan uno de los grupos contaminantes más importantes tanto por su volumen como por las consecuencias que producen a corto y largo plazo sobre el medio ambiente (IARC 1983). En nuestro país amplias zonas se ven afectadas por este tipo de contaminación, como la Patagonia que es una de las regiones del país más rica en yacimientos petrolíferos. Por otro lado, la industria petroquímica, en lo relacionado a refinería, distribución y comercialización presenta polos importantes en La Plata, Bahía Blanca, Campana-Zarate, San Lorenzo, Río III, Lujan de Cuyo y Plaza Huincul. Tradicionalmente, la eliminación de los contaminantes orgánicos se ha encarado mediante tecnologías probadamente efectivas que involucran tratamientos físicos y/o químicos, (Arauna, 2004). En la actualidad, a causa de su elevado costo y la perturbación que generan sobre las zonas afectadas, solo se aplican en ciertos casos y como primera acción de emergencia a fin de remover grandes masas de contaminantes. Las tecnologías tradicionales de remediación de ambientes contaminados se destacan por las dificultades de aplicación en grandes áreas o volúmenes y la generación de lodos tóxicos altamente reactivos que a menudo son difíciles de tratar. El petróleo es la principal fuente de energía para las actividades humanas en la actualidad. Su utilización como tal y como materia prima para la producción de diversos compuestos genera uno de los mayores problemas ambientales que debe enfrentar el mundo actual. La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, pero esta degradación es relativamente lenta. En este sentido un objetivo ecológico prioritario es el desarrollo de nuevas metodologías compatibles con el medio ambiente para la remediación de ambientes contaminados (Juwarkar et. al., 2010). Las capacidades de los microorganismos aeróbicos son de particularmente relevantes para la biodegradación de dichos compuestos. La degradación completa de la mayoría de los hidrocarburos se produce en condiciones aeróbicas (Wolfgang and Hofritcher 2005). En los últimos años, muchos estudios han probado la eficacia y la factibilidad del aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos (bacterias y hongos) en procesos de biodegradación de diferentes grupos de compuestos (Navacharoen, 2011; Ruberto 2006). Además de la utilización exclusiva de estos en procesos de biorremediación, se suma el empleo de vegetales (fitorremediación) (Moreira, 2011) y sus microorganismos asociados (rizorremediación) (Abhilash, 2011). El fracaso de la biorremediación se puede atribuir a las condiciones ambientales desfavorables, ausencia de vías catabólicas apropiadas o biodisponibilidad del compuesto químico a degradar. Es por eso que se han desarrollados diferentes estrategias, como la aplicación de nutrientes y aireación (bioestimulación) (Nikolopoulou et. al, 2009) y el agregado de degradadores apropiados (bioaugmentación) (Mrozik et. al, 2010). El grado de biodisponibilidad es, en su mayoría, el que condiciona la eliminación de contaminantes del medio, es por eso que el uso de surfactantes aumentaría la disponibilidad de los hidrocarburos. Los biosurfactantes son compuestos producidos por

diferentes géneros de bacteria y hongos, el uso de los mismos acelera los procesos de biorremediación de medio ambientes contaminados por hidrocarburos (Rodrigues, 2006). Son moléculas orgánicas tensioactivas producidas sobre superficies de células microbianas, excretados al medio que facilita la eliminación de las partículas adheridas al contaminante y que dan lugar a un descenso significativo de la tensión superficial y/o interfacial. Diferentes estudios muestran los potenciales uso de los biosurfactantes en las industrias alimenticias y en agricultura, farmacéuticas (Nitschke, 2007) petroquímicas, en cosmética (Williams, 2009) y en remediación de ambientes contaminados (Mulligan, 2009). En términos de estructura química los biosurfactantes se pueden dividir en diferentes grupos: glicolípidos, lipopéptidos, lipopolisacáridos, fosfolípidos y ácidos grasos o lípidos polares. Son moléculas anfipáticas, que contienen un dominio liposoluble y otro hidrosoluble. Esta solubilidad parcial permite al surfactante ocupar la interface. Se ha visto que tanto la producción como las cantidades de los biosurfactantes obtenidos está directamente ligada a las condiciones de crecimiento, incluyendo: fuente de carbono, nutrientes (nitrógeno, fosfatos, hierro), pH, temperatura y aireación). Han sido objeto de estudio para técnicas de remediación algunos tipos de biosurfactantes, entre ellos se encuentran los ramnolípidos producidos por cepas de *Pseudomonas spp*, el surfactin a partir de cepas de *Bacillus*, y de naturaleza lipídica a partir de *Rhodococcus*. (Miller and Zhang, 1997). Se han obtenido biosurfactantes que han sido utilizados en procesos de biorremediación o distintos usos incluidos, agentes terapéuticos a partir de residuos agroindustriales como alternativa al uso de sustratos no renovables. Los sustratos disponibles en la actualidad son una variedad de residuos orgánicos procedentes de la agricultura y las industrias relacionadas. Entre ellos se destaca el glicerol como fuente de carbono alternativa importante, porque la cantidad de este co producto ha ido en aumento año tras año ligado a la producción de biodiesel principalmente (Deleu et. al, 2004). Además de la importancia económica que ello supone para la producción de productos de mayor valor agregado (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de co-productos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales (Aburto et. al, 2008). La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables (fuentes de C o N) constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. A pesar de las ventajas y la potencial aplicabilidad de estos compuestos biológicos, el éxito de la producción de los biosurfactantes depende de la economía del proceso usado y el uso de materias primas de bajo costo (10-30% de los costes globales). También se plantea la necesidad de atender de una manera ambientalmente responsable, la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados, tomando como base el marco regulatorio vigente, para evitar que se conviertan en contaminantes de suelos y aguas incluidas las subterráneas (Chundawat et. al, 2012). En este contexto, nuestro grupo de trabajo aborda el estudio del desarrollo y optimización de un bioproceso para la obtención de biosurfactantes, destinados al tratamiento biológico de suelos contaminados con hidrocarburos con el fin diseñar procesos viables en costos, rendimientos y eficiencia, evaluándose la transferencia tecnológica del mismo. Así mismo con aquellas cepas seleccionadas capaces de crecer a altas velocidad y producir altos rendimientos de biomasa, pero que no mostraron ser productoras de biosurfactantes, se estudió el porcentaje de degradación de hidrocarburos para abordar la biorremediación de suelos contaminados mediante el empleo de técnicas de bioaumentación y bioestimulación. Para el cumplimiento de este objetivo, se realizaron trabajos de diseño de medio de cultivos a partir del uso de hidrocarburos y co-productos agroindustriales.

2. METODOLOGÍA

2.1 Aislamiento de los microorganismos

Las muestras de suelo y agua fueron obtenidas en la zona de Campana (-34.167872, -58.939692), ubicada a 75km al noroeste de la Ciudad de Buenos Aires sobre la *la* Ruta Nacional N°9, Argentina. Se utilizó 1 gr de suelo para el cultivo de enriquecimiento, un medio mínimo salino (MSM): 4g/l de NaNO₃; 1,5g/l de KH₂PO₄; 0,5g/l de Na₂HPO₄; 0,0011g/l de FeSO₄·7H₂O; 0,2g/l de MgSO₄·7H₂O; 0,0132g/l de CaCl₂·2H₂O (Shen et. al, 1998) con una mezcla en partes iguales de tres hidrocarburos comerciales (HC): nafta super (RON95), diésel (<2000ppm de azufre) y kerosene como fuente de carbono. Los cultivos fueron incubados en shaker rotario a 100 rpm durante 72 horas a 25 °C. Este procedimiento fue realizado 8 veces, utilizando 1 ml del inóculo anterior en cada nuevo cultivo. Para aislamiento de las colonias a partir de los cultivos de enriquecimiento, fueron inoculados 10 ml en placas de Petri conteniendo 10ml de MSM suplementado con 20g/l de agar y la fuente de carbono ya mencionada. Los cultivos fueron incubados a 25°C en estufa por 72 horas. Las distintas colonias de microorganismos fueron transferidas a placas con medio fresco al cabo de 6 días, operación que se repitió 3 veces.

2.2 Relevamientos y elección de co-productos

De acuerdo a la velocidad de crecimiento y la capacidad de poder producir biosurfactantes de las cepas aisladas, se procedió a evaluar el empleo de co-productos agroindustriales provenientes de empresas de la Región de la Pampa Húmeda como sustratos alternativos de bajo costo. Se ensayaron las siguientes fuentes de carbono, derivadas de la industria aceitera (JLa Argentina, Villa General Cabrera, Provincia de Córdoba): aceite de girasol refinado alto oleico, aceite de maní crudo y de la industria del biodiesel se utilizó el glicerol.

2.3 Selección y mantenimientos de las cepas aisladas.

A las cepas aisladas se les evaluó la capacidad de producción de biosurfactantes a partir del análisis de la disminución de la tensión superficial con un tensiómetro *Attesion Sigam Force 702* por el método del anillo de Du Nouy (Walter et. al, 2010) cuando fueron cultivadas en medio mínimo e hidrocarburos como fuente de carbono, a 100rpm y 25°C por 10 días. Se estableció como criterio elegir aquellos cultivos que disminuían la tensión en el sobrenadante libre de células en más de un 30%. Aquellas cepas que no disminuyeron las tensiones superficiales, pero presentaban altas concentraciones de biomasa cuando fueron crecidas con hidrocarburos como única fuente carbono, se les estudió la capacidad de crecer en diferentes fuentes de carbono que van desde la mezcla de combustibles hasta co-productos agroindustriales de bajo costo. Las células fueron criopreservadas a -80° hasta su uso.

2.4 Identificación molecular de los microorganismos

La identificación se realizó a partir de la extracción del material genético del microorganismo con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®). Este se utilizó como templado para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 16s. Se utilizaron los primers 27F y 1492R (2µl de solución 10 µM, cada uno), 5µl de una solución buffer 15mM de MgCl₂, 5µl de solución 1mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 0,5µl de solución 30mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,3µl de polimerasa Taq (5U/µl) y agua deionizada. El ciclo de PCR que se realizó fue: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos, 72°C por 10

minutos y 10°C en el paso final. Luego, se purificó el material obtenido a partir del kit comercial AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Bioscience). Finalmente, se envió el material genético amplificado a la Unidad de Genómica del Servicio de Secuenciación del INTA Castelar.

2.5 Técnicas analíticas empleadas

Estimación de biomasa: se realizó usando los métodos gravimétricos clásicos: La concentración de biomasa expresada en peso seco a partir de la calibración previa DO600 vs PS. Separación y la estimación del biosurfactante se realizará de acuerdo a lo descrito por Smyth et al. 2010 y Satpute, 2010. Para el porcentaje de degradación y cuantificación de hidrocarburos en el suelo: por cromatografía de gases, en un equipo GC-2010 Plus (Shimadzu) equipado con un detector FID, una columna Petrocol DH 100 Sepulco de 100 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y película de empaque de 0,5 µm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

De las muestras obtenidas de las diferentes áreas del predio de la Refinería de RHASA (Campana) ver **Figura 1**, se aislaron trece colonias de microorganismos que fueron capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono. De ellas, seis presentaron capacidad tensioactiva y alta velocidad de crecimiento. Por lo que se procedió a la identificación de las mismas ver **Tabla 1**.

Figura 1: Areas en donde fueron tomadas las muestras con historial de contaminación crónica de petróleo en la zona norte de la Provincia de Buenos Aires. (a) Tanques de almacenamientos (b) Montículo de tierra (c) Lago (d) Costa del lago

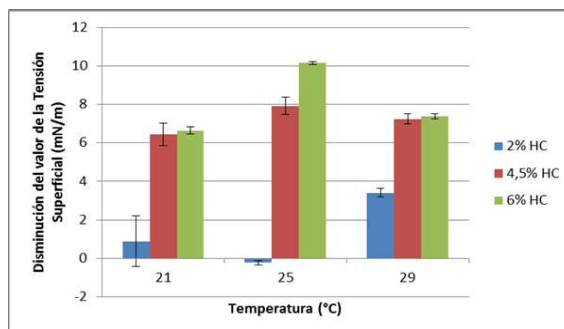


Tabla 1: Resultados obtenidos a partir del análisis del ARNr16s de las cepas aisladas

| Muestra | Resultado | Grupo al que pertenecería según Mulet y col. ¹⁴⁴ |
|-----------------|--|--|
| Laguna HC | 99,3% identidad respecto de <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (T) (AF468452) | <i>P. fluorescens</i> |
| Tierra HC | 99,6% de identidad respecto de <i>Pseudomonas kummingensis</i> (HL22-2(T)) (JQ246444) (EZBioCloud) | <i>P. oleovorans</i> , <i>P. stutzeri</i> o <i>P. aeruginosa</i> |
| Lecho-Laguna HC | 99,86% de identidad respecto de <i>Pseudomonas veronii</i> (CIP 104663 (T)) (AF0644660) | <i>P. fluorescens</i> |
| Tanque 1 HC CG | 100% de identidad respecto de <i>Pseudomonas panipatensis</i> (Esp-1(T)) (EF424401) | <i>P. aeruginosa</i> |
| Tanque 2 HC | 99,7% de identidad respecto de <i>Cellulosimicrobium funkei</i> (ATCC BAA-886 (T)) (AY501364). | No corresponde |

Se seleccionó a *Pseudomonas koreensis* por su potencial como cepa productora de biosurfactantes y su aplicación en tecnologías de remediación ambiental. Dicha cepa fue capaz de usar como única fuente de carbono una mezcla de tres HC diferentes (nafta super -RON95, diésel <2000ppm de azufre y kerosene), observándose la mejor producción de biomasa microbiana y la mayor actividad tensioactiva cuando se cultivó en Erlenmeyer a 25°C y 6%v/v de mezcla de HC ver **Gráfico 1**.

Gráfico 1: Disminución de ST en función de la temperatura y concentración de HC



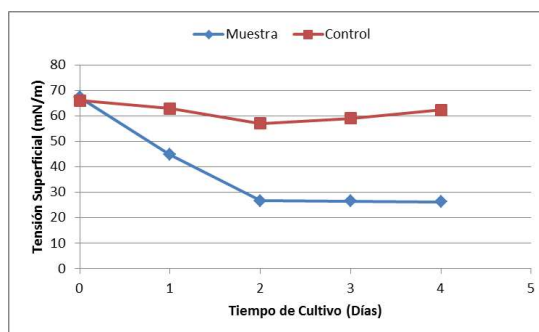
También se evaluaron glucosa y glicerol como sustratos de fácil asimilación observándose una disminución de la capacidad tensioactiva en el medio de cultivo del 60% de la actividad superficial. En base a lo mencionado y a una decisión basada en minimización de costos, se seleccionó glicerol (co-producto de la producción de biodiesel) como fuente de carbono para evaluar la capacidad de producción de biosurfactantes por parte del agente biológico seleccionado y su posterior purificación.

La velocidad específica de crecimiento del microorganismo cuando fue incubado en medio con glicerol como única fuente de carbono fue de:

$$\mu = 0,017h^{-1}$$

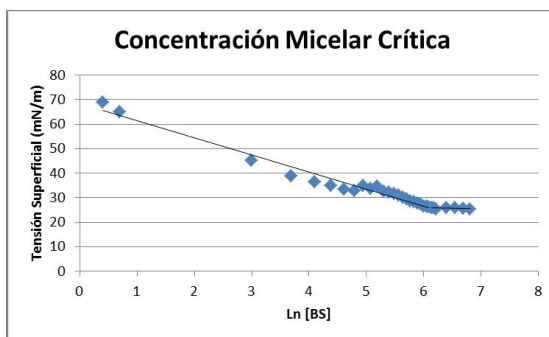
Los valores de tensión superficial disminuyeron desde 67,33mN/m \pm 0,13mN/m al comienzo, hasta 26,23mN/m \pm 0,01mN/m al final del proceso. Resulta importante destacar que la mayor disminución en este valor se observa entre el inicio y las 48h de cultivo, por lo que se podría decir que entre las 24h y 48h de cultivo se estaría alcanzando la concentración micelar crítica del biosurfactante. El perfil de tensión superficial en función del tiempo respecto del control se observa en el **Gráfico 2**, mostrando un valor alcanzado de una disminución del 57,89% al cuarto día de incubación.

Gráfico 2: Perfil de tensión superficial en función del tiempo



A partir de una estrategia de doble precipitación ácida con una solución de HCl, se logró obtener la purificación del agente tensioactivo en una concentración máxima de 0,11g/l y un rendimiento de producto en función de la biomasa (Y_{PX}) de $0,09\text{g/l} \pm 0,02\text{g/l}$. Al precipitado obtenido se lo sometió a un proceso de diluciones seriadas en agua destilada con el objetivo de evaluar la concentración micelar crítica del mismo. A cada una de estas diluciones se le determinó el valor de la tensión superficial, información que se observa en el **Gráfico 3** en donde se obtuvo un valor del compuesto producido por la cepa de 452,21mg/l. Cuando esto sucede, la tensión superficial del medio toma un valor de $26,05\text{mN/m} \pm 0,05\text{mN/m}$. Este valor es comparable al obtenido por (Hultberg et al. 2010) para el biosurfactante producido por *P. koreensis*.

Gráfico 3: Perfil de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante para la obtención del valor de concentración micelar crítica del microorganismo.



Paralelamente, observamos que algunas de las cepas aisladas no fueron capaces de producir de biosurfactantes, pero sí pudieron crecer a alta velocidad y producir altos rendimientos de biomasa a partir del uso de diferentes fuentes de carbono, sin perder la capacidad de degradar hidrocarburos. Las fuentes carbono utilizadas van desde una mezcla de combustibles hasta co-productos agroindustriales de bajo costo provenientes de la industria aceitera (JLa Argentina, Villa General Cabrera, Provincia de Córdoba). Una de las cepas en que hemos enfocado nuestra investigación es *Pseudomonas sp.* MT HC 1A3, la cual fue previamente aislada e identificada en su característica genética, siendo la misma perteneciente al Grupo de *Pseudomonas stutzeri* según (Mulet et al. 2010). Sabiendo que esta cepa ha sido aislada y seleccionada en condiciones de un medio de cultivo donde la única fuente de carbono fueron hidrocarburos, se evaluó la potencialidad de crecimiento para aplicar en futuras estrategias de bioaumentación. Para ello se realizaron ensayos en Erlenmeyers que contenían un medio salino mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono con la mezcla de HC, glucosa, y también se seleccionaron y probaron varios co-productos agroindustriales de bajo costo ver **Tabla 2**. Todos los cultivos fueron incubados durante 5 días, a 135 rpm, 25 °C

Tabla 2: Crecimiento celular de *Pseudomonas MT1A3* en distintas fuentes de carbono.

| Fuente de Carbono | Biomasa (gr/l) |
|------------------------------------|----------------|
| HC (4,5%) | 1,74 |
| Glucosa (2%) | 4,01 |
| Glicerol (2%) | 2,69 |
| Suero de leche vacuno (2%) | 2,21 |
| Suero de leche ovino (2%) | 1,94 |
| Aceite de girasol refinado (2%) | 3,98 |
| Aceite de girasol alto oleico (2%) | 2,78 |
| Aceite de maní crudo (2%) | 9,29 |
| Aceite de maní frito (2%) | 2,08 |
| Aceite de camelina (2%) | 1,23 |
| Maní prensado (2%) | 4,42 |

Pseudomonas MT1A3 fue capaz de crecer en todas las fuentes de carbono utilizadas, en donde el medio de cultivo que contenía aceite de maní crudo resultó ser el de mayor producción de biomasa. Por lo tanto, resulta un sustrato interesante para optimizar la biomasa y ser aplicado en técnicas de bioaumentación. Por otro lado, se estudió su perfil de degradación de hidrocarburos luego de haber sido crecida la cepa en aceite de maní como única fuente de carbono. Esto se llevó en cultivos líquidos con la mezcla de hidrocarburos previamente mencionada, como única fuente de carbono, se evaluó el porcentaje de degradación de hidrocarburos mediante técnica de cromatografía gaseosa, en el transcurso de 5 y 10 días de incubación ver **Gráfico 4 y 5**. Se pudo observar que la concentración de HC tuvo una disminución significativa a los 10 días, con un porcentaje de reducción total de 46.5 %, mientras que el control abiótico (cultivo sin inocular) alcanzó una disminución del 24.4 % respecto a la concentración inicial. Dado que el tratamiento control presentó cierta tasa de degradación, esto indicaría que algunos compuestos se han evaporado durante los días de incubación.

Gráfico 4: Porcentaje de degradación de HC por efecto de MT1A3, a los 5 y 10 días de incubación.

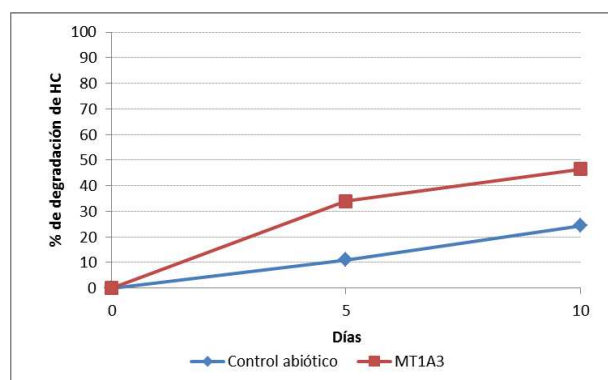
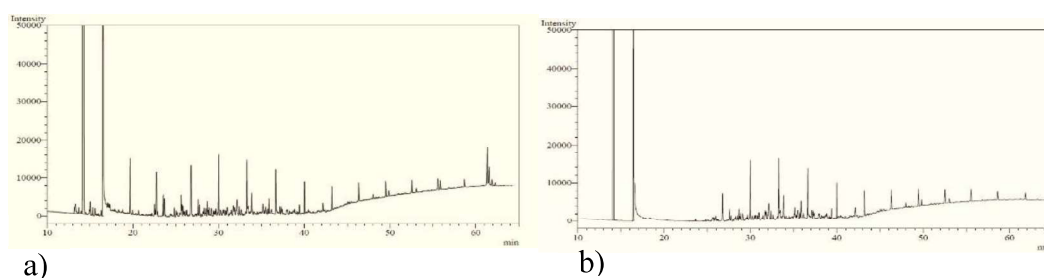


Gráfico 5: Cromatografía gaseosa: a) Control en día 0; b) MT1A3 en día 10.



4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos fue posible el aislamiento de cepas de microorganismos autóctonos de los predios de la empresa RHASA, en la ciudad de Campana, Provincia de Buenos Aires, demostrando tener la capacidad para degradar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. En cuanto a la cepa de *Pseudomonas koreensis*, se pudo obtener la biosíntesis de biosurfactantes a partir del uso de sustratos de bajo costo como el glicerol, alcanzando valores de 54,7% de tensión superficial, comparado con el control. Posteriormente se pudo purificar el tensioactivo a partir de una precipitación ácida con HCl y determinar la concentración micelar crítica en los cultivos, cuyo valor fue de 452,21mg/l. Paralelamente, a partir del estudio del perfil de degradación de hidrocarburos a partir del uso de diferentes sustratos de bajo costos como fuente de energía por parte de la cepa de *Pseudomonas MT1A3*, se pudo observar el alto potencial que posee la cepa para ser utilizada en técnicas de biorremediación. A partir de la aplicación de biosurfactantes, ayudando en la biodisponibilidad del contaminante en las áreas afectadas y con esto en su biodegradación y del empleo de procedimientos de bioaumentación y bioestimulación, ambas cepas en estudio representan una excelente herramienta para ser utilizadas en estrategias de saneamiento para la recuperación de ambientes crónicamente contaminados con hidrocarburos.

AGRADECIMENTOS

Los autores agradecen el apoyo del CYTED - Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo a través de la Red URBENERE.

REFERENCIAS

ABHILASH P.C, SRIVASTAVA S, SRIVASTAVA P, SINGH B, JAFRI A, SINGH N. Influence of rhizospheric microbial inoculation and tolerant plant species on the rhizoremediation of lindane. *Environmental and Experimental Botany Journal*, 2011. 74: 127-130.

ABURTO, J, MARTÍNEZ T, MURRIETA F. Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnología, Ciencia, Educación (IMIQ)* 2008, 23(1): 23-30.

ARARUNA J.T, PORTES V.L.O, SOARES A.P.L, SILVA M.G, SHEL M.S, SCHRAMM D. U, TIBANA S, VARGAS H. Oil spills debris clean up by thermal desorption. *Journal of Hazardous Materials*, 2004 Vol. 110, Issues 1-3: 161-171.

BANAT I, SATPUTE S, CAMEOTRA S, PATIL R, NYAYANIT N. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Frontiers in Microbiology*, 2014. Vol 5: 697.

CHUNDAWAT S, BECKHAM G, HIMMEL M, DALE B. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical Biomolecular Engineering* 2012, 2:121-145.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to Microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 2004 7(6-7): 641-646.

JUWARKAR AA, SINGHSK, MUDHOO A. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Technology*, 2010. 9: 215-288.

MILLER R AND ZHANG Y. Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. *Bioremediation Protocols*.1997, Vol 2, 59-66.



MOREIRA ITA, OLIVEIRA O.M.C, TRIGUIS J.A, DO SANTOS A.M.P, QUEIROZ A.F.S, MARTINS C.M.S, SILVA C.S, JESUS R.S. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons TPH's. *Microchemical Journal*, 2011. 99: 376-382.

MROZIK A AND PIOTROWSKA-SEGET Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 2010. 165(5): 363-375.

MULET M, LALUCAT J, GARCÍA-VALDÉS E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas species*. *Environmental Microbiology*, 2010. 12 (6): 1513-1530.

MULLIGAN C. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009. 14: 372-378.

NAVACHAROEN A, VANGNAIAS. Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent-tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2011. 65: 818-826.

NIKOLOPOULOU M, KALOGERAKIS N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009. 84(6): 802-807.

NITSCHKE M, COSTA SGVAO. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2007. 18: 252-259.

RODRIGUES L, BANAT I.M, TEXEIRA J, OLIVEIRA R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. doi:10.1093/jac/dkl024.

RUBERTO LAM, VAZQUEZ S. C, CURTOSI A, MESTRE M.C, PELLETIER E, MAC CORMACK W. Phenanthrene Biodegradation in Soils Using an Antarctic Bacterial Consortium. *Bioremediation Journal* 2006, 10 (4): 191-201.

SATPUTE S, BANPURKAR A.G, DHAKEPHALKAR P.K, BANAT I.M, CHOPADE B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 2010, 1-18.

SHEN Y, STEHMEIER L.G, VOORDOUW G. Identification of hydrocarbons-degrading bacteria in soil by reverse simple genome probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. Vol: 64-2: 637-645.

SMYTH T.J.P, PERFUMO A, MCCLEAN S, MARCHANT R, BANAT I. M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Chapter 27, 2010.

WALTER V., SYLDATK C., HAUSMAN R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganism. Chapter 1, *Biosurfactants*, 2010. Landes Biosciences and Springer Science + Business Media.

WILLIAMS K. Biosurfactants for cosmetic applications: Overcoming production challenges. *MMG 445 Basic Biotechnology*, 2009. 5: 78-83.