

# **A importância da identificação e caracterização de microorganismos por técnicas moleculares para definição de taxas de degradação de compostos orgânicos em processos de biorremediação de hidrocarbonetos em aquíferos de ambiente tropical**

Alexandre Bernardini Ungar<sup>1,2</sup>; Mateus Lopes.<sup>1</sup>; Bianca Sanchez Martins; Marcelo Alarsa<sup>2</sup>; José Gregório Cabrera Gomez<sup>1</sup>;

1- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas II

Av. Professor Lineu Prestes, ICB II – USP Campus São Paulo

2- Cetrel-Lumina Soluções Ambientais – Email: [abungar@yahoo.com.br](mailto:abungar@yahoo.com.br)

Av. Faria Lima, 1912, São Paulo, SP

## **Resumo:**

As perdas ao meio condicionadas pela intensa utilização de derivados de petróleo, desde o refino até a distribuição, representam um problema de extensão mundial de contaminação de solo e água subterrânea. A necessidade crescente de espaços aptos a ocupação humana em áreas densamente urbanizadas requerem avanços tecnológicos dos processos de remediação à obtenção de resultados efetivos para a minimização dos impactos ambientais. Neste contexto, a realização de projetos eficazes de biorremediação, que privilegiem a identificação e taxas de degradação bacterianas em ambiente tropical potencializam as ações remediadoras, como será demonstrado a seguir. Para esse trabalho foram coletadas amostras de solo e água subterrânea de uma área contaminada com óleo Diesel e BPF, identificadas as linhagens de bactérias por meio de DNA ribossomal 16s e construídos microclimas para medir as taxas de biodegradação desses contaminantes. Como resultado foram identificadas *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas sp.* e *Brevundimonas sp.* e a taxa de degradação dos contaminantes foi de 14,39 mg/dia, mostrando um aumento de 7 vezes em relação à taxa da amostra controle. Tais resultados mostram a fundamental importância do gênero *Pseudomonas* associado a um ambiente geoquímico propício ao metabolismo microbiano para potencialização de projetos de biorremediação e remediação.

## **Abstract:**

Soil and groundwater contaminations by oil products are worldwide problems. The increasing need for human occupation in super-populated countries requires new technological advances in remediation techniques. Studies in bioremediation usually do not privilege taxa identification and bacterial degradation rate in tropical environments. Such studies, carried out in Europe and United States, are of extreme importance for the production of efficient bioremediation projects in the field. In this study, we collected soil and groundwater samples from an area contaminated with diesel oil and BPF, and we identified the bacteria lineages by means of 16s ribosomal DNA. We also measured degradation rate from those substances using the bacteria community previously described. We identified *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas sp.* and *Brevundimonas sp.* And the contaminant degradation rate was 14,39 mg/day which is 7 times superior that the control test. The results reinforce the importance of Pseudomonads for bioremediation projects associated with geochemical optimal microenvironment.

Palavras chave: Biorremediação, Identificação, *Pseudomonas*, Biodegradação

## **1. Introdução:**

A contaminação por derivados de petróleo em água subterrânea constitui hoje um problema de grande escala, que causa impactos ao meio ambiente e à saúde dos seres vivos, especialmente do homem (Rodríguez-Martines et. al, 2006). A necessidade crescente de espaços aptos a ocupação humana em áreas densamente urbanizadas requerem avanços tecnológicos dos processos de remediação à obtenção de resultados efetivos para a minimização dos impactos ambientais. Quando devidamente aplicada, a biorremediação apresenta grande viabilidade em aquíferos de ambientes tropicais.

Em solo e água subterrânea, uma enorme gama de bactérias e fungos (hidrocarbonoclasticas) pode utilizar esses hidrocarbonetos como fonte de carbono para crescimento ou outras funções metabólicas, produzindo gás carbônico e água (Lin, 1996). No meio ambiente esses microorganismos são os agentes primários da degradação desses compostos orgânicos e a manipulação da eficiência desse processo é o princípio básico de projetos eficazes de biorremediação.

Os estudos atuais no campo da microbiologia para biodegradação são carentes de práticas de identificação das comunidades bacterianas típicas de solos e água subterrânea em ambiente tropical, verificando-se nas aplicações de projetos um destaque a obtenção de parâmetros físicos necessários ao dimensionamento das técnicas de remediação (*air-sparging*, *bioventing*, etc) em detrimento dos microbiológicos, o mesmo ocorrendo para a avaliações de eficácia.

Por outro lado, extensas pesquisas são realizadas por grupos americanos e europeus para identificação e melhoramento de comunidades bacterianas em solos temperados, como os experimentos relatados por Sohnger (1916 apud Bushnell & Hass) e aperfeiçoamentos feitos por Bushnell & Hass, 1941, Zobel, 1946, Komagata, 1964, entre outros, até o período contemporâneo.

A determinação específica da composição da comunidade bacteriana é importante, propiciando a identificação das bactérias e o conhecimento dos metabolismos. Outro dado experimental de grande importância ao projeto e execução de sistemas de biorremediação é a taxa de degradação, que é a medida direta ou indireta da transformação de contaminantes a substâncias elementares (gás carbônico e água) por um período de tempo. O método mais conhecido e também o utilizado nesse trabalho é o teste respirométrico de Bartha (Atlas & Bartha, 1992), com diversos microclimas produzidos com solo e água subterrânea do local contaminado.

Neste contexto trabalhos que privilegiem a identificação e taxas de degradação bacterianas, como a apresentado a seguir, permitem as prever prazos às ações remediadoras. Com isso, abre-se a possibilidade de manipulação dos processos de biorremediação, com melhoramento da eficiência de degradação, bioaugmentação e aplicação de biotecnologia em campo, focadas em bactérias e contaminantes previamente conhecidos concatenados às soluções pré-projetadas.

Neste trabalho, as bactérias específicas para degradação de hidrocarbonetos (óleo BPF e diesel), encontradas em solo e água subterrânea de um local contaminado, foram identificadas por meio de técnicas moleculares (DNA ribossomal) e as taxas de degradação *in vitro* foram avaliadas sob diversos microambientes.

## **2. Material e métodos:**

### **2.1. Identificação:**

Amostras de solo e água subterrânea contaminados com hidrocarbonetos de petróleo foram coletadas em uma área retalhista de estocagem e distribuição de óleos combustíveis no Estado de São Paulo e, a partir dessas, foram isolados e avaliados microorganismos capazes de utilizar óleo BPF e Diesel como únicas fontes de carbono, separadamente. Em resumo, 2 alíquotas de 5 g da amostra de

solo foram suspensas em meio mineral contendo ou 10 g/L de BPF ou 10 g/L de Diesel e incubadas (200 rpm, 30 °C) por 14 dias. Após este período a amostra foi diluída (diluição seriada) e plaqueada em meio Luria-Bertani (LB). A função dessa etapa é separar as unidades formadoras de colônia de morfologias diferentes, produto do consumo dos compostos orgânicos de interesse como fonte única de carbono, fazendo uma pré-separação de espécies.

As colônias encontradas na pré-seleção foram então tratadas para seqüenciamento, visando à identificação das bactérias por comparação em banco de dados. O DNA genômico foi extraído de acordo com o método descrito por Ausubel et al. (1992). As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, sendo este ciclo repetido por 35 vezes. Foram utilizados os iniciadores 27F (Lane, 1991) 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' e 1401R (Heuer et al., 1997) 5'CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'.

Os cromatogramas das seqüências de rDNA 16S foram analisados através da ferramenta ABI Chromatogram do programa Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Foi verificada a qualidade das seqüências, analisando-se a definição dos picos correspondentes a cada nucleotídeo, em caso de seqüências de baixa qualidade, a reação de seqüenciamento foi repetida. Após isso as seqüências foram avaliadas, utilizando-se o sistema BLASTN 2.2.14 (Altschul et al. 1997) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

As amostras foram nomeadas:

- Diesel: MS3 e MS5
- BPF:MS1 e MS9

## 2.2. Taxas de Biodegradação:

O processo laboratorial para a análise das taxas de degradação produzidas pelos microambientes produzidos tentou reproduzir o ambiente original. Foi utilizado o método respirométrico (Atlas & Bartha, 1992) para os testes de avaliação de taxas de degradação, que consiste da medição da evolução de CO<sub>2</sub> em sistema aberto por titulação (**Figura 1**). Frascos âmbar com 0,5 L de água subterrânea e 2 Kg de matriz de solo do local de coleta das amostras foram adicionados de um sistema de *air-sparging* monitorado por micro-rotâmetros digitais. Antes de entrar no sistema o ar era completamente isento de CO<sub>2</sub>, pois passava por uma série de frascos contendo hidróxido de sódio. Todo o gás carbônico produzido no sistema provinha de metabolismo bacteriano e era introduzido aos frascos lavadores contendo hidróxido de bário para aprisionamento do CO<sub>2</sub> produzido e posteriormente titulado. Os compostos orgânicos foram avaliados por cromatografia gasosa.

Foram produzidos 10 microambientes sendo 4 controles e 6 testes (**Tabela 1**). A matriz dos microambientes foi formada utilizando solo contaminado, solo estéril e solução de nutrientes. As misturas de solo contaminado e estéril foram feitas visando aproximar a distribuição espacial de concentração de contaminantes na matriz. Quanto maior a porcentagem de solo estéril, menor o teor de compostos, e vice e versa. A solução de nutrientes tem o efeito de verificar se o suporte desses componentes no meio está adequado ou não. Caso a produção de gás carbônico não seja alterada pela adição de solução nutritiva, a matriz do aquífero está apta ao crescimento bacteriano ótimo.

Tabela 1. Microambientes de Biorremediação	
Frasco	Conteúdo
1	25% TC, 75% TE, N
2	TC, N (controle de nutrientes)

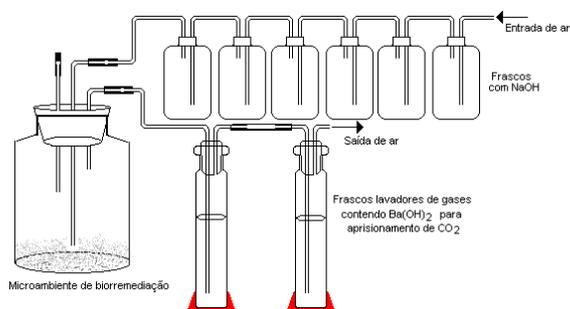
3	75% TC, 25% TE, N
4	TE (amostra controle)
5	50% TC, 50% TE
6	50% TC, 50% TE, N
7	25% TC, 75% TE
8	TC (amostra controle)
9	75% TC, 25% TE
10	TE, N (controle de nutrientes)

Legenda:

TC: porcentagem de solo contaminado da área + água subterrânea

TE: porcentagem de solo estéril (esterilizado por autoclave) + água deionizada

N: solução contendo mistura de Potássio, Nitrogênio e Fósforo.



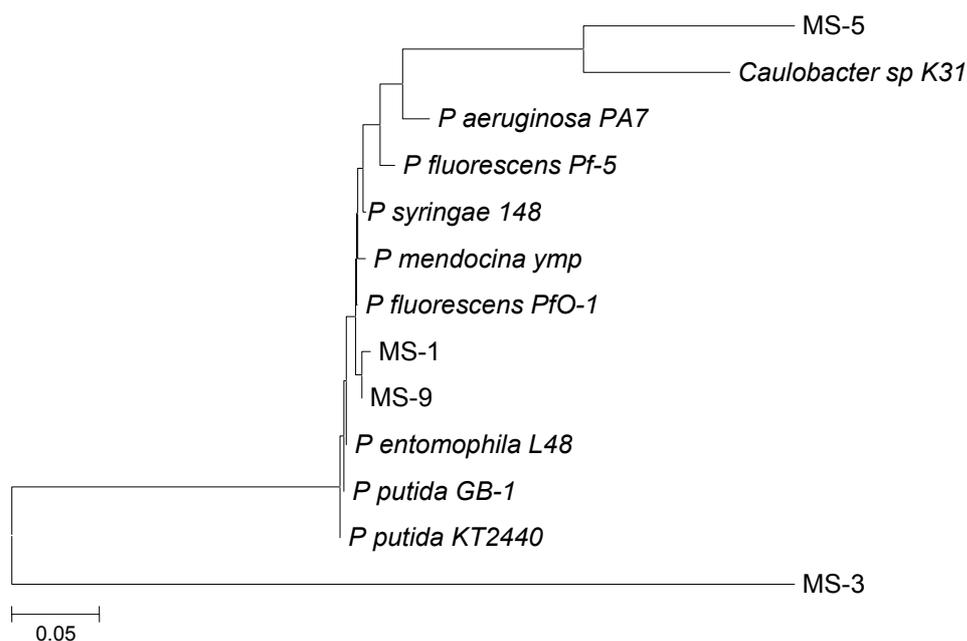
**Figura 1.** Sistema Respirométrico

### 3. Resultados:

#### 3.1. Identificação e alinhamento:

O alinhamento da amostra MS1 em comparação com o banco de dados mundial mostrou que a seqüência apresenta 97% (679/694) de identidade com *Pseudomonas stutzeri*. Para a amostra MS3 não houve identidade estatisticamente significativa, para a amostra MS5 a identidade foi de 89% (607/682) com *Brevundimonas sp.* e à amostra MS9 a identidade foi de 96% (685/711) foi com *Pseudomonas sp.*.

A **Figura 2** apresenta a árvore filogenética, relacionando os microrganismos encontrados.



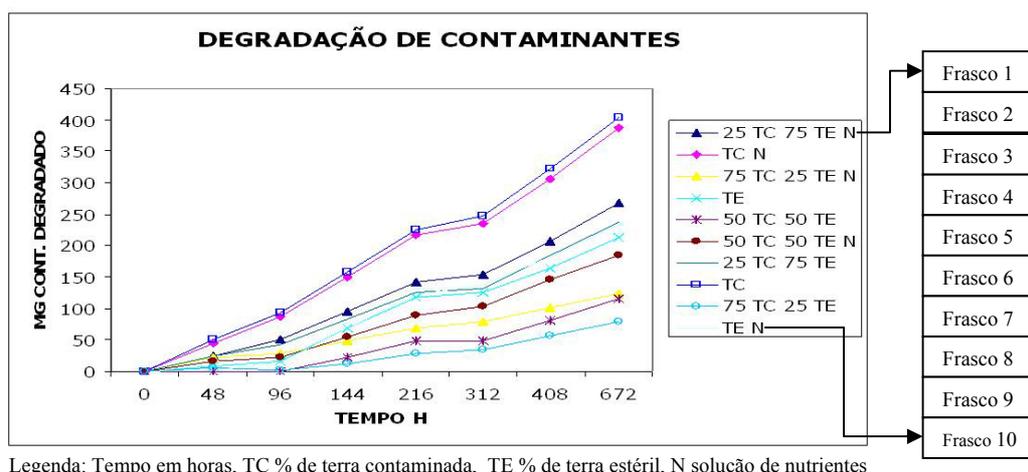
A barra de escala representa o número de mudanças por seqüência de nucleotídeo

**Figura 2.** Filograma não-enraizado obtido por *neighbour-joining* das seqüências de 16S rDNA do *Genbank*.

Os alinhamentos indicaram que o isolado MS5-1 apresenta alta identidade de nucleotídeos com a linhagem *Brevundimonas sp.*. No filograma é possível observar que os isolados MS-1 e MS-9 estão em um mesmo grupo do gênero *Pseudomonas* e a linhagem MS-5 junto com o gênero *Caulobacter*. Além disso, o fato de MS-1 e MS-9 estarem enraizadas em apenas um grupo indica que talvez sejam a mesma linhagem. O isolado MS-3 ficou muito distante filogeneticamente das linhagens de *Pseudomonas*, assim, para classificar essa linhagem, estudos mais profundos seriam requeridos.

### 3.2. Taxa de Degradação:

Os resultados de degradação confirmados pela titulação do gás carbônico aprisionado no sistema e pela cromatografia apresentam no microambiente contendo somente terra contaminada a maior taxa encontrada nesse experimento, da ordem de 14,39 mg por dia (Frasco 8). Todos os outros microambientes apresentaram taxas inferiores a essa dando indícios da capacidade do aquífero e solo do local estarem aptos a autodeputação somente com auxílio de *air-sparging*. (**Figura 3**). A adição de nutrientes não foi eficaz no aumento da taxa de degradação.



Legenda: Tempo em horas, TC % de terra contaminada, TE % de terra estéril, N solução de nutrientes

**Figura 3.** Degradação dos Contaminantes

Os microambientes contendo concentração menor de compostos orgânicos, ou seja, aqueles misturados com terra estéril obtiveram taxas menores de degradação, indicando que mesmo em concentração máxima de compostos orgânicos as bactérias ainda possuíam capacidade degradativa máxima.

A taxa máxima encontrada (Frasco 8) é 7 vezes superior em relação ao microambiente contendo terra estéril e nutrientes (Frasco 10) e 4 vezes superior que o microambiente contendo metade da concentração de compostos orgânicos (Frasco 5).

#### 4. Discussão:

As determinações dos gêneros bacterianos associados aos microambientes criados neste estudo são o alicerce para o conhecimento do metabolismo microbiano e definição das taxas de biodegradação. Isso proporciona um dimensionamento efetivo de projetos de remediação, ajustando-se as condições geoquímicas do meio às taxas ótimas de crescimento bacteriano e catabolização dos compostos orgânicos de interesse.

A descrição das características fisiomorfológicas e bioquímicas dos gêneros encontrados nos mostram o potencial biodegradativo e biotecnológico dos mesmos:

O gênero *Brevundimonas* anteriormente era descrito como *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas vesicularis* (Ryu et. al, 2007). Nesse estudo Ryu e colaboradores descrevem uma nova espécie de bactéria do mesmo gênero, isolada de sistemas de tratamento de efluentes por lodo ativado, capaz de remover fósforo. São bactérias aeróbias, Gran-negativas, que têm seu crescimento ótimo a 30°C entre pH 7,5 e 8,5 e com tamanho variável de 0,3 a 2,0 µm. Nessas condições, os nitratos são reduzidos a nitrito com produção de gás nitrogênio; não existe sistema para utilização de H<sub>2</sub>S e citratos. O metabolismo desse gênero consegue catabolizar compostos com número de carbonos de 4 a 17 em suas cadeias (Ryu et. al, 2007).

A espécie *Pseudomonas stutzeri* é Gran-negativa e tem como principal característica a capacidade de denitrificação. Suas células têm formato de bastão, 3 µm de comprimento por 0,3 µm de largura, e possuem um flagelo. São microrganismos produtores de adesina, formando biofilmes com alta resistência a cisalhamento. A temperatura ótima de crescimento é 35°C. Seu metabolismo preferencial é aeróbio, mas com complexos de nitrato como única fonte energética, o metabolismo pode se tornar facultativo ou mesmo, em sub-espécies, anaeróbio.

A literatura (Lalucat et. al, 2006) reporta que os processos mais importantes de *Pseudomonas stutzeri* relacionados a biorremediação são: ciclagem de metais e degradação de compostos orgânicos xenobióticos (óleos e pesticidas).

Nesse mesmo estudo os autores reportam que esse microorganismo tem alto poder de biosorção e resistência a altas concentrações dos seguintes metais: alumínio, cromo, cobalto, cobre, manganês, níquel, selênio, prata, titânio e zinco. Os mecanismos pelos quais esses metais são submetidos no citoplasma bacteriano encontram-se em estudos. Sabe-se que em ambientes com muita prata, sulfetos de prata inertes são encontrados no citoplasma desses seres.

van Beilen e colaboradores 2004 demonstraram em estudo que uma área contaminada com gasolina, das 297 espécies de bactérias identificadas, as do gênero *Pseudomonas* perfaziam 89% do total. Dessas 264 *Pseudomonas*, *P. stutzeri* era a terceira mais abundante.

Uma linhagem especial, sub-espécie de *Pseudomonas stutzeri* nomeada KC (Tatara, 1993), isolada de aquífero contaminado, consegue mineralizar tetracloreto de carbono a gás carbônico e água em anaerobiose, sem formação de clorofórmio. Estudos preliminares de bioaumentação dessa espécie na biorremediação de aquíferos contaminados com tetracloreto de carbono (Witt et al., 1999) apresentaram resultados ótimos, onde o produto foi degradado até níveis não detectáveis.

Outra linhagem com grande potencial biotecnológico é a JJ, isolada em área contaminada por 1,2-dicloroetano (Djik et al., 2003). Esse organismo em anaerobiose é capaz de degradar esse composto a gás carbônico e água. Os autores ainda indicam um potencial de degradação para outros compostos halogenados de interesse.

Outros tipos de contaminantes são citados por Lalucat e seus colaboradores. Os contaminantes aromáticos como o benzeno e seus derivados (PCB's, PAH's, benzo-a-pireno e benzo-b-fluoranteno) estão na lista TOP 10 de substâncias mais perigosas do mundo (1997). A capacidade das *Pseudomonas* em degradar o benzeno e seus derivados em meio aeróbio é bem descrita na literatura. Já no caso especial da *Pseudomonas stutzeri*, a literatura descreve que essa bactéria consegue catabolizar, formando gás carbônico, água ou intermediários menos poluentes, os seguintes compostos: mono e di-halogenados (Kozlovsky et al, 1993), fluoreno (Stringfellow & Aitken, 1994), naftaleno e metil-naftaleno (Garcia-Valdés et al., 1988), PCB's (Dingle et al., 2001, Fedi et al., 2001), entre outros.

A taxa de degradação encontrada é experimental em condições semi-controladas. O valor máximo encontrado por esse trabalho é de 14,39mg/dia, encontrado no microambiente somente contendo o solo contaminado e água subterrânea. A adição de nutrientes não apresentou resposta efetiva, demonstrando que o ambiente já tem o suprimento de nutrientes necessário para a taxa ótima de biodegradação. Essa taxa é 7 vezes maior que a encontrada no controle do experimento e 3 vezes maior que a encontrada quando o microambiente tinha metade da concentração dos contaminantes, Frasco 5 (50% TC, 50% TE).

As taxas de degradação podem ser aumentadas por diversos sistemas auxiliares. Para microorganismos dois processos são conhecidos a bioestimulação e a bioaumentação. A bioestimulação é o uso de sistemas externos ao meio para aumento da taxa metabólica de organismos autóctones (Atlas, 1997). A bioaumentação é o uso de concentrados bacterianos autóctones ou alóctones, que serão inseridos no meio para que o composto contaminante seja biodegradado. Para que esses dois processos sejam efetivos, o conhecimento das linhagens e de seus metabolismos é de extrema importância, pois somente dessa forma se saberá o que injetar no meio e que tipo de metabolismo bacteriano será utilizado para a degradação de cada composto.

Pelas características do gênero *Pseudomonas*, condições de crescimento e característica de solo e água subterrânea, a bioaumentação específica para esse microorganismo pode ser útil para o aumento dessa taxa de degradação em campo.

## 5. Conclusões:

- A identificação do gênero *Pseudomonas sp.* nas amostras dessa área é de grande relevância a potencialização do projeto de biorremediação, conforme demonstrado pela taxa de degradação obtida em laboratório.
- A taxa máxima de biodegradação obtida a partir dos diversos microambientes experimentais foi de 14,39mg/dia, sendo 7 vezes superior em relação a amostra controle.
- A bioaugmentação do gênero *Pseudomonas sp.* poderá ser a técnica aplicada para a área em questão, que potencializará a biodegradação dos compostos orgânicos de interesse existentes no solo e água subterrânea.

## 6. Bibliografia:

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Atlas, R. M. 1997. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. In: RAINING WORKSHOP OF ICS-UNIDO ON "SOIL ENVIRONMENTAL ASSESMENTAND BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES", 1997. Disponível em: [www.ics.trieste.it/documents/chemistry/remediation/publications/Soil1997/.%5C10\\_Atlas.pdf](http://www.ics.trieste.it/documents/chemistry/remediation/publications/Soil1997/.%5C10_Atlas.pdf)

Atlas, R.M., Bartha, R. 1992. Hydrocarbon Biodegradation and Oil-spill Bioremediation. In: *Advances in Microbiol Ecology*. K.C. Marshall Plenum Press, Pp. 287-338.

Bushnell, L. D., Haas, H. F., 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, v. 41, p. 653-673.

Dijk, J. A., A. J. M. Stams, G. Schraa, H. Ballerstedt, J. A.M. de Bont, and J. Gerritse. 2003. Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain JJ. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:68–74.

Dingle, K. E., F. M. Colles, D. R. A. Wareing, R. Ure, A. J. Fox, F. E. Bolton, H. J. Bootsma, R. J. L. Willems, R. Urwin, and M. C. J. Maiden. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:14–23.

Fedi, S., M. Carnevali, F. Fava, A. Andracchio, S. Zappoli, and D. Zannoni. 2001. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. *Res. Microbiol.* 152:583–592.

Garcia-Valdes, E., E. Cozar, R. Rotger, J. Lalucat, and J. Ursing. 1988. New naphthalene degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2478–2485.

Komagata, K., Nakase, T., Katsuya, N. 1964. Assimilation of hydrocarbons by yeasts – I Preliminary screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.10, p. 313-321.

Kozlovsky, S. A., G. M. Zaitsev, and F. Kunc. 1993. Degradation of 2-chlorobenzoic and 2,5-dichlorobenzoic acids in soil columns by *Pseudomonas stutzeri*. *Folia Microbiol.* 38:376–378.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E. & Palleroni, N. J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 510–547.

Lin, S., 1996. Biosurfactants: Recent Reviews. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66: 109-120.

Rodríguez-Martínez, E., E.X. Pérez, C.W. Schadt, J. Zhou, and A. Massol-Deyá. 2006. Microbial Diversity and Bioremediation of a Hydrocarbon-Contaminated Aquifer in Vega Baja, Puerto Rico. *International J. of Environ. Health.* 3(3):292-300.

Ryu S.H., Park M., Lee J.R., Yun P.Y., Jeon C.O. 2007, *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1561-1565.

Stringfellow, W. T., and M. D. Aitken. 1994. Comparative physiology of phenanthrene degradation by 2 dissimilar pseudomonads isolated from a creosote contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 40:432–438.

Tatara, G. M., M. J. Dybas, and C. S. Criddle. 1993. Effects of medium and trace metals on kinetics of carbon tetrachloride transformation by *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2126–2131.

van Beilen, J. B., and B. Witholt. 2004. Alkane degradation by pseudo-monads, p. 397–423. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. 3. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, N.Y.

Witt, M. E., M. J. Dybas, D. C. Wiggert, and C. S. Criddle. 1999. Use of bioaugmentation for continuous removal of carbon tetrachloride in model aquifer columns. *Environ. Eng. Sci.* 16:475–485.

ZOBELL, C. E. 1946a. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.*, v.10, p.1-49.