

Establecimiento de un consorcio bacteriano nativo degradador de crudo Napo
Establishment of a native Napo-crude-oil-degrading bacterial consortium

Mario D. García^{1*}, Gustavo Rosero², Liliana Cerda-Mejía^{3*} & Alma Koch Kaiser⁴

¹Carrera de Biotecnología, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.

²Instituto de Ingeniería Biomédica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

³Carrera de Alimentos, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.

⁴Carrera de Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador

*Autor de correspondencia: md.garcia@uta.edu.ec o la.cerda@uta.edu.ec

Fecha de recepción: 08 de abril de 2022

Fecha de aceptación: 30 de junio de 2022

Resumen

Las actividades de extracción petrolera son vulnerables a la ocurrencia fortuita de incidentes ambientales que causan un gran deterioro de la flora y fauna nativa por su exposición a hidrocarburos del petróleo. Por lo tanto, surge la necesidad de eliminar los componentes tóxicos del petróleo acumulados en el medio ambiente de forma eficiente y rápida. En el presente estudio se aislaron quince consorcios bacterianos nativos con capacidad de emplear crudo Napo como única fuente de carbono. De estos, seis consorcios fueron capaces de biodegradar el petróleo con una eficiencia (%EB) que varió entre el 20.12 y 27.98 % luego de 22 días de cultivo. Todos los consorcios aislados mostraron una mayor capacidad para biodegradar el petróleo en comparación a la actividad combinada de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* (%EB = 9.37). El consorcio nativo CPF-L5A, establecido a partir de muestras de suelo expuestas por un tiempo prologado a hidrocarburos, mostró la mejor eficiencia de biodegradación del crudo. Virtualmente este consorcio podría remover totalmente la fracción biodegradable del crudo Napo en aproximadamente 2.6 meses. Por consiguiente, el consorcio CPF-L5A es un excelente candidato para ser utilizado en el tratamiento ex situ de suelos contaminados con petróleo mediante la implementación de un sistema de bioaumentación.

Palabras clave: Aislamiento, biodegradación, hidrocarburos totales de petróleo, consorcio microbiano.

Abstract

Oil extraction activities are vulnerable to the occurrence of fortuitous environmental incidents that cause great deterioration of the native flora and fauna due to their exposure to petroleum hydrocarbons. Thus, there is an urgent need to efficiently eliminate the toxic oil components accumulated in the environment. Here, fifteen hydrocarbon-degrading bacterial consortia able to use Napo-crude oil as the only carbon source were isolated from soil samples. Of these, six consortia showed an oil biodegradation efficiency (%BE) that fluctuated between 20.12 to 27.98% after 22 days of incubation. The isolated consortia showed a significantly higher degradation efficiency compared to that of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* mixed culture (%BE = 9.37). The native consortium CPF-L5A, established from soil samples exposed for a long time to hydrocarbons, showed the highest crude biodegradation efficiency amongst the isolated consortia. Virtually, this consortium could totally remove the biodegradable fraction of Napo-crude oil in approximately 2.6 months. Therefore, the CPF-L5A consortium is an excellent candidate to be used in the ex-situ treatment of oil-contaminated soils through the implementation of a bioaugmentation system.

Keywords: Bacterial isolation, biodegradation, total petroleum hydrocarbons, microbial consortium.

1. INTRODUCCIÓN

La explotación de los recursos hidrocarbúricos genera indudablemente un impacto antropológico sobre la naturaleza. Los accidentes ambientales producidos por fallas humanas, mecánicas o causas naturales, y que envuelven la fuga de crudo hacia el entorno, contaminan las zonas aledañas a los sitios de producción o transporte del crudo afectando al suelo, el agua y el aire (Shamoon et al., 2022). El tratamiento del material contaminado con petróleo se puede realizar mediante mecanismos físicos, químicos, y/o biológicos (Masakorala et al., 2014; Shahsavari, Poi, Aburto-Medina, Hallery, & Ball, 2017). Sin embargo, el tratamiento de hidrocarburos mediante métodos físicos o químicos puede generar subproductos que ocasionalmente son más difíciles de tratar que el contaminante original, lo cual incrementa los costos del tratamiento (Córdoba, 2009; Dhaka & Chattopadhyay, 2021). En la actualidad, el sistema más eficiente para el tratamiento de hidrocarburos es la biorremediación (Sharma, 2020). Además, el tratamiento biológico es económico, fácil de mantener, aplicable sobre amplias zonas y, en gran medida, permite la completa degradación del contaminante mediante su mineralización en CO₂ y H₂O (Ali, Dashti, Khanafer, Al-Awadhi, & Radwan, 2020; Rizzo et al., 2008).

Más de 79 géneros de bacterias han demostrado la capacidad para decomponer hidrocarburos del petróleo, tales como *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, entre otras (Xu et al., 2018). Generalmente, estos microorganismos exhiben una actividad degradadora limitada

a hidrocarburos específicos. Por ejemplo, *Dietzia* sp. y *Achromobacter xylosoxidans* son altamente selectivas para ciertos tipos de n-alcanos y compuestos aromáticos, respectivamente (Ma, Lu, Wan, & Luo, 2015; Wang et al., 2011). Son escasos los reportes de especies de bacterias con la capacidad de degradar una amplia gama de hidrocarburos del petróleo. Un ejemplo es *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* W1, que es capaz de degradar benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) (Wongbunmak, Khiawjan, Suphantharika, & Pongtharangkul, 2020). Esto sugiere que la utilización de consorcios bacterianos integrados por individuos que aportan con diferentes metabolismos son una interesante alternativa para maximizar la eficiencia de la biorremediación de material contaminado con petróleo. El aprovechamiento de los microorganismos nativos del sitio donde se desea aplicar el tratamiento biológico tiene grandes ventajas sobre la utilización de inóculos microbianos foráneos. Entre ellas, la más importante es que se evita la adición específica de microorganismos no autóctonos que, aunque suelen poseer excelentes características en la biodegradación de hidrocarburos, podrían alterar el delicado equilibrio del ecosistema o causar problemas de salud pública y/o ambiental (Wongbunmak et al., 2020).

En el presente estudio se aisló y estableció consorcios bacterianos autóctonos de la Amazonía Ecuatoriana, específicamente de las instalaciones de los Bloques 12 (El Edén) y 15 (Limoncocha), con miras a su futura utilización en la biorremediación de suelos contaminados con crudo Napo mediante un sistema de bioaumentación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo

En el proceso de muestreo se colectó un total de quince muestras, tomadas totalmente al azar, de material contaminado con crudo Napo (suelo y fondos de tanque) de los campos CPF (Bloque 15) y EPF (Bloque 12) ubicados en las provincias de Sucumbíos y Orellana, respectivamente. Cada muestra tuvo un peso aproximado de 1 kg, la misma que fue inmediatamente almacenada en una bolsa plástica estéril con cierre hermético (Reynolds® Zipper Bags de 26.8 x 27.9 cm) y transportada al laboratorio en un recipiente refrigerado a 4 °C, similar a lo realizado previamente (Hamamura, Olson, Ward, & Inskeep, 2006; Rizzo et al., 2008).

2.2 Aislamiento y establecimiento de consorcios degradadores de petróleo.

Un gramo de cada muestra de suelo se diluyó en 9 mL de solución tampón de fosfatos estéril (Hamamura et al., 2006), modificada en el presente ensayo (NaH₂PO₄ 2mM, Na₂HPO₄ 2mM y NaCl 24 mM [pH 7.0]). La inoculación se realizó mediante la aplicación de 1 mL de la solución en agar Bushnell-Haas (BH) estéril modificado (K₂HPO₄ 1 g/L, NH₄H₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, KNO₃ 1 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, FeCl₃ 0.05 g/L y bacto agar 12.5 g/L [pH 7.2]). El inóculo se esparció sobre el agar y se lo incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el medio de cultivo se suplementó con crudo Napo a una concentración final del 0.5% (v/v, 4630 mg/L) (Déizel, Paquette, Villemur, Lépine, & Bisailon, 1996; Dibble & Bartha, 1976). Finalmente, los cultivos se incubaron aeróbicamente a 30 °C y en oscuridad por 10 días (Dibble & Bartha, 1979; Rizzo et al., 2008).

2.3 Selección de consorcios

La selección del consorcio con mayor actividad degradadora de hidrocarburos se realizó de forma cualitativa y cuantitativa. Inicialmente, los consorcios bacterianos aislados fueron preseleccionados de acuerdo a la presencia de zonas claras perfectamente marcadas alrededor de las colonias desarrolladas (halos) y a la disminución visual del hidrocarburo presente en el medio de cultivo (Déizel et al., 1996). Posteriormente, cada consorcio fue evaluado cuantitativamente con respecto a su capacidad de biodegradar el crudo Napo en medios líquidos.

2.4 Ensayos de biodegradación de crudo

Para los ensayos de biodegradación; primeramente, se preparó un inóculo inicial para cada uno de los consorcios aislados en medio BH líquido suplementado con crudo Napo al 2%. A continuación, cada consorcio se cultivó en caldo nutriente durante 48 h a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos y se lavaron dos veces con medio BH líquido estéril sin hidrocarburo (pH 7.2) (Atlas, 1975). Finalmente, los inóculos fueron resuspendidos en medio BH estéril sin hidrocarburo, hasta llegar a una densidad óptica final de 0.1 a 540 nm que corresponde a aproximadamente 108 células/mL con base a la escala McFarland (Whyte, Bourbonnière, & Greer, 1997).

Los ensayos de biodegradación fueron llevados a cabo durante 22 días, con agitación constante (100 rpm), a temperatura ambiente (aprox. 25 °C), en matraces de 250 mL que contuvieron 98 mL de medio BH líquido estéril suplementado con 1 mL de crudo Napo (1% v/v; 9260 ppm) y 1 mL de inóculo

inicial (Atlas, 1975; Dibble & Bartha, 1976). La capacidad biodegradadora de hidrocarburos de cada tratamiento se cuantificó mediante la titulación del CO₂ generado por efecto de la mineralización del carbono orgánico metabolizable presente en el crudo Napo (Anderson, 1982; Rizzo et al., 2008). El CO₂ producido fue capturado en una solución de KOH 0.1 N. 2.5 mL de esta solución se dejaron reaccionar con 2.5 mL de Ba(OH)₂ durante 5 min (Anderson, 1982). El BaCO₃ formado se removió por centrifugación a 4000 rpm durante 2 min (Whyte et al., 1997). El sobrenadante se colocó en un matraz de 50 mL y se lo tituló inmediatamente agregando 2 gotas de fenolftaleína y HCl 1N hasta llegar al punto de viraje de color. El agua utilizada en la preparación de todas las soluciones se llevó a punto de ebullición por una hora para eliminar el CO₂ disuelto (Anderson, 1982). En este ensayo se evaluaron los seis consorcios bacterianos que presentaron los halos más grandes producto de biodegradación de crudo en placa, la mezcla de estos (Tratamiento 6C), el cultivo mixto de las cepas puras *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* proporcionadas por Petroamazonas E.P. (Tratamiento P6+B1) (Córdoba, 2009) y un control sin inoculación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La pérdida de agua por evaporación fue despreciable. De acuerdo con Rizzo, et al. (2008), el carbono total biodegradado (CTB) es equivalente al doble de la cantidad de CO₂ producido por la respiración bacteriana. La eficiencia de biodegradación (%EB) se determinó mediante la expresión:

$$\%EB = \frac{g\ CTB}{g\ COB} * 100 \quad \text{ec. 1}$$

donde COB representa el carbono orgánico biodegradable

presente en el crudo Napo.

Para la determinación del COB se cuantificó el contenido de hidrocarburos totales del petróleo (TPHs) en el crudo Napo por cromatografía de gases (método EPA8015) (EPA, 1996) empleando un cromatógrafo Perking Elmer, modelo Autosystem. Se determinó que cada 100 mg de crudo Napo contienen 68.65 mg de TPHs. Se asumió que el COB es igual al 85% de la masa total de TPHs (58.35 mg) (Rizzo et al., 2008).

2.5 Análisis estadístico

Los %EB se analizaron mediante un ANOVA ordinario de una vía y el mejor tratamiento se determinó mediante una prueba de comparación de medias de Tukey. Ambos análisis estadísticos y las ilustraciones se realizaron en Prism V 7.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento y establecimiento de consorcios degradadores de petróleo

Un total de quince consorcios bacterianos con capacidad de utilizar el crudo Napo como única fuente de carbono fueron aislados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Este resultado fue esperado, ya que se conoce que los microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos del petróleo son ubicuos, pero estos no predominan en sus respectivos microecosistemas debido a que los hidrocarburos no constituyen su fuente principal de carbono, sino que más bien son una fuente de energía alternativa (Xu et al., 2018). Esto explica el por qué en el presente estudio se haya podido obtener aislamientos microbianos con alguna actividad degradadora de hidrocarburos en prácticamente todas las muestras colectadas, incluyendo los

sedimentos que se depositan en los tanques de almacenamiento del crudo, conocidos como fondos de tanque. Mediante la inspección visual y verificación de la presencia de halos alrededor de las colonias, se preseleccionaron seis consorcios bacterianos, a los cuales se les asignó los códigos CPF-L5A, CPF-P4Ab, CPF-FT, EPF-P1F, EPF-P2A y EPF-P3A. Estos consorcios fueron evaluados en los ensayos subsecuentes.

3.2 Biodegradación de crudo Napo

La evaluación de la generación de CO₂ producto de la biodegradación del crudo Napo durante un periodo de 22 días reflejó que todos los tratamientos tuvieron un comportamiento bifásico (Figura 1A). Durante los primeros 3 días de cultivo, la producción de CO₂ en cada tratamiento no mostró diferencias con respecto al control sin inoculación. Esto implica la presencia de una fase de latencia o fase lag. Estudios previos han demostrado que durante las etapas tempranas del proceso de biodegradación de hidrocarburos es común la presencia de una primera etapa de adaptación de las bacterias a las condiciones de cultivo, con tasas de crecimiento y respiración muy bajas (Gontikaki, Potts, Anderson, & Witte, 2018). Por otra parte, se conoce que durante este periodo las bacterias atraviesan por una serie de procesos de inducción y síntesis de las enzimas responsables de la descomposición de los hidrocarburos, y síntesis de surfactantes, entre otros compuestos adyuvantes, lo cual ralentiza el inicio del proceso de biodegradación (Shahsavari et al., 2017; Xu et al., 2018). Además, la metabolización de mezclas complejas de hidrocarburos, como el crudo Napo, requieren de un lento proceso de hidrólisis de hidrocarburos de alto peso molecular en moléculas más pequeñas,

las cuales son más fácilmente asimilables (Dai, Lv, Guo, & Wei, 2021).

A partir del cuarto día de cultivo, se observó un marcado incremento en la producción de CO₂ producto de la degradación del crudo por los seis consorcios bacterianos. Todos los consorcios bacterianos aislados presentaron un perfil similar de metabolización del carbono orgánico biodegradable hasta el día 15 de cultivo (Figura 1A). Por otra parte, el tratamiento P6+B1, que corresponde al co-cultivo de *P. aeruginosa* y *B. cereus*, mostro una tendencia diferente a la de los consorcios aislados, lo cual sugiere que la combinación de estas dos especies de bacterias ofrece una menor capacidad de biodegradación del crudo Napo en comparación a los consorcios nativos aislados (Figura 1A). En el octavo día de incubación se observó un repunte en la producción de CO₂ en todos los tratamientos presumiblemente debido a un inusual incremento de la temperatura ambiental a la cual se realizó la incubación (28 °C, tres grados por encima de la temperatura promedio). Este fenómeno ha sido documentado previamente por Atlas (1975), quien atribuye las variaciones en el comportamiento de la producción de CO₂ en el proceso de biodegradación de TPHs a la variación de la temperatura de incubación.

Los consorcios CPF-L5A y EPF-P2A mostraron los mayores índices de producción de CO₂ con valores de 2816 y 2585 ppm, respectivamente, después de 22 días de cultivo. El tratamiento P6+B1 fue el menos eficiente para degradar crudo Napo, con un total de 1001 ppm de CO₂ producido en el mismo periodo de incubación. El análisis de varianza realizado sobre los valores de %EB sugiere que existen diferencias significativas

entre los ocho tratamientos ensayados ($p < 0.0001$, R-cuadrado = 0.964). Por otra parte, el análisis de múltiples comparaciones de Tukey demostró que los consorcios CPF-L5A y EPF-P2A poseen una similar capacidad biodegradadora del crudo Napo, la cual es significativamente diferente a aquella mostrada por los demás tratamientos (Figura 1B). La máxima eficiencia de biodegradación observada fue de 27.98 ± 0.28 % correspondiente al consorcio CPF-L5A. Por su parte, el tratamiento P6+B1 reflejó la menor eficiencia de biodegradación, con un valor de 9.37 ± 0.68 %. Estos resultados sugieren que el consorcio CPF-L5A podría descomponer el 100 % del COB presente en el crudo Napo suplementado al cultivo en aproximadamente 79 d de incubación bajo las condiciones del ensayo, mientras que a la combinación de *P. aeruginosa* y *B. cereus* este proceso les podría tomar unos 235 d. Cabe mencionar que el %EB de TPHs observado para *P. aeruginosa* y *B. cereus* se asemeja a lo reportado previamente en estudios similares (Benavides et al., 2006; Menezes, De Oliveira, Okeke, & Frankenberger, 2003).

En promedio, la eficiencia de biodegradación de los consorcios nativos seleccionados fue igual a 24.1 % (20.12 a 27.98 %) y como se observa en la figura 1B, todos los consorcios bacterianos aislados fueron entre dos y tres veces más eficaces en la biodegradación del petróleo que el cultivo mixto de las cepas puras, *P. aeruginosa* y *B. cereus*. Estos resultados indican que las interacciones entre especies que ocurren en los consorcios nativos aislados favorecen significativamente la biodegradación de los TPHs contenidos en el crudo Napo en comparación al desempeño observado para la

interacción de dos cepas puras empleadas comúnmente para la biodegradación de hidrocarburos del petróleo, en este caso cepas de los géneros *Pseudomonas* o *Bacillus*. Esto se sustenta en el hecho de que los consorcios bacterianos son capaces de aportar con diferentes enzimas responsables de descomponer hidrocarburos alifáticos, aromáticos y resinas presentes en el crudo, favoreciendo así la biodegradación de una mayor cantidad o variedad de hidrocarburos (Rizzo et al., 2008; Xu et al., 2018). Existe suficiente evidencia que sostiene que los consorcios bacterianos poseen un cometabolismo, lo cual les permite degradar una variedad de sustratos derivados del petróleo (Ali et al., 2020). Se conoce que los genes responsables de la hidrólisis de los hidrocarburos se agrupan en rutas catabólicas específicas para grupos o tipos de hidrocarburos, y que algunos de estos genes se encuentran en ADN plasmídico (Dealtry et al., 2018; Park et al., 2003) lo cual hace que la capacidad degradadora de los microorganismos sea variable. Por ejemplo, la ruta alk posee la capacidad de degradar n-alcános con cadenas de 5 a 12 átomos de carbono (C5 a C12) (Whyte et al., 1997), la ruta nah es capaz de degradar hidrocarburos aromáticos naftalénicos (Tomás-Gallardo, Gómez-Álvarez, Santero, & Floriano, 2014; Whyte et al., 1997) y, por último, la ruta xyl es capaz de degradar moléculas de tolueno (Iwaki, Yamamoto, & Hasegawa, 2018). Sin embargo, existen pocos ejemplos en los que se ha descrito la presencia de las rutas para n-alcános e hidrocarburos aromáticos en la misma cepa. Uno de estos raros ejemplos incluye a cepas del género *Pseudomonas*, las cuales expresan las rutas alk y nah (Whyte et al., 1997). En contraste, un amplio estudio que incluyó 200 cepas

aisladas demostró que muchas de ellas tenían la capacidad de degradar moléculas de alcanos o de hidrocarburos aromáticos, pero no ambas (Fogth, Fedorak, & Westlake, 1990). Por esta razón, al usar consorcios microbianos se maximiza la posibilidad de contar con una variedad de metabolismos que colaboran a la biodegradación de todas las fracciones de hidrocarburos del petróleo. Interesantemente, el tratamiento 6C, que corresponde al co-cultivo de los seis consorcios nativos seleccionados, mostró la segunda menor producción de CO₂ y se ubicó solo por encima del tratamiento P6+B1. Esto sugiere que al unir los seis consorcios seleccionados se generaron antagonismos que perjudicaron la habilidad de los consorcios para degradar los hidrocarburos (Aqeel et al., 2021). Además, este resultado permite avizorar las posibles interacciones negativas que podrían darse al realizar un tratamiento (in situ o ex situ) con cepas foráneas. Por otra parte, indirectamente, esto permite inferir que cada consorcio aislado fue distinto en cuanto a su constitución.

La localización geográfica de la muestra inicial aparentemente no fue un factor determinante sobre la eficiencia de biodegradación de los consorcios nativos aislados, ya que estos pertenecen tanto a los campos CPF como EPF. Sin embargo, los resultados indican que el tipo de muestra si tiene una influencia sobre este indicador. Por ejemplo, el consorcio CPF-L5A fue aislado de suelo contaminado y tratado 5 años atrás. Esto sugiere que una prolongada exposición a TPHs podría haber favorecido el establecimiento de comunidades microbianas con una mayor capacidad de descomponer hidrocarburos, especialmente

hidrocarburos recalcitrantes, similar a lo documentado previamente (Smuleka, Sydow, Zabielska-Matejuk, & Kaczoreka, 2020). Por su parte, los consorcios EPF-P2A, CPF-P4Ab, EPF-P1F y EPF-P3A fueron aislados de muestras de suelo recientemente contaminado, previo a su tratamiento ex situ por landfarming. Finalmente, el consorcio CPF-FT fue aislado de fondos de tanque depositados en contenedores previo a su tratamiento biológico. Como se mencionó anteriormente, todos estos consorcios, excepto el consorcio EPF-P2A, mostraron un %EB estadísticamente menor a lo observado para el consorcio CPF-L5A.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron quince consorcios bacterianos nativos del oriente ecuatoriano con capacidad de emplear crudo Napo como única fuente de carbono. De estos, seis consorcios fueron capaces de degradar la fracción biodegradable de los hidrocarburos totales del petróleo con un %EB por sobre el 20% en 22 días de cultivo. El consorcio nativo CPF-L5A, establecido a partir de muestras de suelo expuestas por un tiempo prolongado a hidrocarburos, mostró una excelente eficiencia de biodegradación en comparación al desempeño observado para la combinación de las cepas puras *P. aeruginosa* y *B. cereus*, y virtualmente podría remover la fracción biodegradable del crudo Napo en aproximadamente 2.6 meses. Por consiguiente, el consorcio CPF-L5A es un excelente candidato para ser utilizado en el tratamiento ex situ de suelos contaminados con petróleo mediante la implementación de un sistema de bioaumentación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, N., Dashti, N., Khanafer, M., Al-Awadhi, H., & Radwan, S. (2020). Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- Anderson, J. (1982). Soil respiration. In R. M. a. D. K. A. Page (Ed.), *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties* (pp. 836-841.). Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy.
- Aqeel, A., Hussain, Z., Aqeel, Q.-U.-A., Zafar, J., Ehsan, N., & Tariq, M. (2021). Enrichment and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Various Oil-Contaminated Sites in Pakistan. *Geomicrobiology Journal*, 38(7), 577-587.
- Atlas, R. (1975). Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Appl. Microbiol.*, 30(3), 396-403.
- Benavides, J., Quitero, G., Guevara, A., Jaime, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90.
- Córdoba, D. (2009). Desarrollo de un medio de cultivo óptimo con diferentes fuentes de carbono, para *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, presentes en suelos que contienen hidrocarburos (TPH), provenientes de Petroamazonas E.P., ubicados en la provincia de Sucumbios. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Sangolquí, Ecuador.
- Dai, X., Lv, J., Guo, S., & Wei, W. (2021). Heavy Oil Biodegradation by Mixed Bacterial Consortium of Biosurfactant-Producing and Heavy Oil-Degrading Bacteria. *Pol. J. Environ. Stud.*, 30(1), 71-80.
- Dealtry, S., Michelato Ghizelini, A., Mendonça-Hagler, L. C. S., Chaloub, R. M., Reinert, F., de Campos, T. M. P., . . . Smalla, K. (2018). Petroleum contamination and bioaugmentation communities from *Avicennia schaueriana*. *Braz. J. Microbiol.*, 49(4), 757-769.
- Déizel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., & Bisailon, J. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6), 1908-1912.
- Dhaka, A., & Chattopadhyay, P. (2021). A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*, 288, 112428.
- Dibble, J., & Bartha, R. (1976). Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(4), 544-550.
- Dibble, J., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(4), 729-739.
- EPA, U. S. (1996). Test method for petroleum hydrocarbons EPA 8015: Nonhalogenated organics using GC/FID. Washington, USA.
- Foght, J., Fedorak, P., & Westlake, D. (1990). Mineralization of [14-C]hexadecane and [14-C]phenanthrene in crude oil: specific among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.*, 36, 169-175.
- Gontikaki, E., Potts, L., Anderson, J., & Witte, U. (2018). Hydrocarbon-degrading bacteria in deep-water subarctic sediments (Faroe-Shetland channel). *Journal of applied microbiology*, 125(4), 1040-1053.
- Hamamura, N., Olson, S., Ward, D., & Inskeep, W. (2006). Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9), 6316-6324.
- Iwaki, H., Yamamoto, T., & Hasegawa, Y. (2018). Isolation of marine xylene-utilizing bacteria and characterization of *Haliobacterium aromaticivorans* gen. nov., sp. nov. and its xylene degradation gene cluster. *FEMS*

- Microbiol. Lett., 365(7), fny042.
- Ma, Y. L., Lu, W., Wan, L. L., & Luo, N. (2015). Elucidation of fluoranthene degradative characteristics in a newly isolated *Achromobacter xylosoxidans* DN002. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175, 1294–1305.
- Masakorala, K., Yao, J., Chandankere, R., Liu, H., Liu, W., Cai, M., & Choi, M. M. F. (2014). A combined approach of physicochemical and biological methods for the characterization of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 454–463.
- Menezes, F., De Oliveira, F., Okeke, B., & Frankenberger, W. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.*, 34(1), 65-68.
- Park, W., Jeon, C. O., Hohnstock-Ashe, A. M., Winans, S. C., Zylstra, G. J., & Madsen, E. L. (2003). Identification and Characterization of the Conjugal Transfer Region of the pCg1 plasmid from Naphthalene-Degrading *Pseudomonas putida* Cg1. *Applied Environ. Microbiol.*, 69(6), 3263-3271.
- Rizzo, A., Da Cunha, C., Santos, R. L., Santos, R. M., Magalhães, H., . . . Soriano, A. (2008). Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 19(1), 169-174.
- Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyr, N., & Ball, A. S. (2017). Bioremediation Approaches for Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Environments. In G. S. Anjum N., Tuteja N. (Ed.), *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants* (pp. 21-41): Springer, Cham.
- Shamoon, A., Haleem, A., Bahl, S., Javaid, M., Garg, S. B., Sharma, R. C., & Garg, J. (2022). Environmental impact of energy production and extraction of materials-a review. *Materials Today: Proceedings*.
- Sharma, I. (2020). Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects Trace Metals in the Environment-New Approaches and Recent Advances: IntechOpen.
- Smuleka, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczoreka, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 187, 109843.
- Tomás-Gallardo, L., Gómez-Álvarez, H., Santero, E., & Floriano, B. (2014). Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microb. Biotechnol.*, 7(2), 100–113.
- Wang, X. B., Chi, C. Q., Nie, Y., Tang, Y. Q., Tan, Y., Wu, G., & Wu, X.-L. (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain *Bioresour. Technol.*, 102, 7755–7761.
- Whyte, L., Bourbonnière, L., & Greer, C. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9), 3719-3723.
- Wongbunmak, A., Khiawjan, S., Supphantharika, M., & Pongtharangkul, T. (2020). BTEX biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* W1 and its proposed BTEX biodegradation pathways. *Sci. Rep.*, 10, 17408.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., . . . Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Front. Microbiol.*, 9, 2885.