

Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui – Amazonas – Perú

Isolation of bacteria with bioremediation potential and analysis of bacterial communities in an area affected by an oil spill in Condorcanqui - Amazonas - Perú

Rosita T. Castillo Rogel^{1*}, Francis J. More Calero², Melitza Cornejo La Torre³, Jaime N. Fernández Ponce¹ & Eric L. Mialhe Matonnier²

¹ Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú.

² Empresa de investigación y capacitación en Biotecnología Molecular, IncaBiotec, Tumbes, Perú.

³ Cooperativa de trabajadores Biotecoop, Lima, Perú.

* Autor para correspondencia: rtc Castillo.envirobiotec@gmail.com

Rosita T. Castillo Rogel: <https://orcid.org/0000-0003-4630-2226>

Francis J. More Calero: <https://orcid.org/0000-0002-6771-9154>

Melitza Cornejo La Torre: <https://orcid.org/0000-0003-0831-5675>

Jaime N. Fernández Ponce: <https://orcid.org/0000-0002-3144-7345>

Eric L. Mialhe Matonnier: <https://orcid.org/0000-0002-7952-6907>

ARTÍCULO ORIGINAL

INFORMACIÓN DE ARTÍCULO

Artículo recibido: 23/01/2020

Artículo aprobado: 29/06/2020

En línea: 30/07/2020

PALABRAS CLAVE:

Agua,
Bacterias,
Hidrocarburos,
Metagenómica,
Suelo.

ORIGINAL ARTICLE

ARTICLE INFORMATION

Article received: 23/01/2019

Article accepted: 29/06/2020

On line: 30/07/2020

KEYWORDS:

Water,
Bacteria,
Hydrocarbons,
Metagenomics,
Soil.

RESUMEN

El uso del petróleo y sus derivados se ha visto intensificado por la alta demanda energética actual; esto ha traído consigo el incremento de accidentes ambientales como los derrames de combustibles que afectan negativamente los ecosistemas. En estos ambientes existen microorganismos capaces de sobrevivir a dichas condiciones y utilizar los hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono y energía; siendo propuestos en la biorremediación con un enfoque ecoamigable y costo-efectivo. En este trabajo se aislaron e identificaron cepas bacterianas con potencial biorremediador en medios de cultivo suplementados con petróleo, a partir de una zona contaminada por derrame de petróleo en la Amazonía peruana; también se realizó la caracterización de la comunidad bacteriana por análisis independiente de cultivo mediante secuenciación de próxima generación dirigido al gen ARNr 16S. Las cepas bacterianas aisladas se identificaron como: *Acinetobacter rudis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus hauseri*, *Proteus terrae*, *Proteus vulgaris* (2), *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas prosekii* y *Serratia marcescens* (2). En el análisis independiente de cultivo detectaron los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* como predominantes en agua y suelo contaminados con hidrocarburos; así mismo, la asignación taxonómica a nivel de familia destacó los grupos *Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Verrucomicrobia* y *Acetobacteraceae* como más abundantes, además de los géneros *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Geobacter* presentes en ambas muestras. De esta manera, se determinaron los principales grupos implicados en la degradación de hidrocarburos haciendo uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo.

ABSTRACT

The use of oil and its derivatives has been intensified by the current high energy demand, but brought with it the increase in environmental accidents such as fuel spills that negatively affect ecosystems. In those environments there are microorganisms capable of surviving such conditions and using petroleum hydrocarbons as a source of carbon and energy; those can be used in bioremediation, with an eco-friendly and cost-effective approach. In this work, bacterial strains with bioremediation potential were isolated and identified in culture media supplemented with oil from an area contaminated from an oil spill in the Peruvian Amazon; also was done out the characterization of the bacterial community by independent analysis of culture by means of next generation sequencing directed to the 16S rRNA gene. The isolated bacterial strains were identified as *Acinetobacter rudis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus hauseri*, *Proteus terrae*, *Proteus vulgaris* (2), *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas prosekii* y *Serratia marcescens* (2). The culture-independent analysis detected the *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phylum as predominant in water and soil contaminated with hydrocarbons; Likewise, the taxonomic allocation at the family level highlighted the groups *Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Verrucomicrobia* and *Acetobacteraceae* as the most abundant, in addition to the genera *Acinetobacter*, *Flavobacterium* and *Geobacter* present in both samples. In this way, the main groups involved in the degradation of petroleum hydrocarbons were determined using culture-dependent and independent techniques.

INTRODUCCIÓN

El petróleo crudo, comúnmente llamado combustible fósil, comprende una mezcla de compuestos hidrocarburoados y no hidrocarburoados. La primera fracción, que corresponde a los hidrocarburoados está formada por componentes alifáticos saturados, aromáticos, asfaltenos, ceras y alquitranes (Moubasher et al., 2015; Varjani & Upasani, 2017); y la segunda fracción que contiene a los no hidrocarburoados, consiste en compuestos de azufre, oxígeno, nitrógeno (Ossai et al., 2020) y metales (Costa et al., 2012).

El uso del petróleo y sus derivados en el mundo contemporáneo se ha intensificado rápidamente, volviéndose imprescindible y ocupando un rol crucial en el desarrollo de la economía mundial con una demanda que va en ascenso; sin embargo, esta situación contribuye con la contaminación ambiental debido a incidentes durante el proceso de extracción, transporte y/o almacenamiento como los derrames accidentales de crudo de petróleo (Behesht et al., 2008; Mahjoubi et al., 2013; Ossai et al., 2020) e incluso con el uso del mismo en la vida cotidiana.

La presencia de hidrocarburos en ambientes tanto de suelo como agua, representan un peligro sustancial para el ser humano y otras formas de vida presentes en los ambientes contaminados (Aguilera et al., 2010; Hentati et al., 2013; Hreniuc et al., 2015; Sammarco et al., 2016). En el agua forman películas superficiales y otras fracciones moleculares superiores que se hunden (Mishra & Kumar, 2015). Posteriormente, la erosión de sedimentos costeros distribuye los hidrocarburos en toda la columna de agua agrediendo a la vida marina. (Al-Majed et al., 2012). En el suelo, los hidrocarburos de bajo peso molecular se volatilizan y el resto penetra verticalmente hasta las aguas subterráneas donde son extendidos lateralmente (Ossai et al., 2020).

Uno de los componentes fundamentales de los ecosistemas son las comunidades microbianas que

desempeñan roles importantes en el metabolismo de la materia orgánica e intervienen en la degradación de una amplia gama de contaminantes (Brennerova et al., 2009) como los hidrocarburos de petróleo, siendo *Proteobacteria* y *Actinobacteria* los filos bacterianos que agrupan especies con genes codificantes de enzimas necesarias para el metabolismo de hidrocarburos (Gibson & Parales, 2000), primordialmente oxigenasas y peroxidasas que inician las vías de degradación (Ossai et al., 2020).

De esta manera, los microorganismos nativos de las zonas contaminadas aportan una alternativa eco-amigable para la descontaminación de hidrocarburos de petróleo: la biorremediación (Mahjoubi et al., 2013), que es una opción factible a nivel mundial (Van Stempvoort & Biggar, 2008) por su facilidad de aplicación, ecosostenibilidad y rentabilidad (Ossai et al., 2020). Algunos de los géneros bacterianos más estudiados para biorremediación son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Serratia* y *Proteus* (Baruah et al., 2017; Chebbi et al., 2017; Nalini & Parthasarathi, 2013; Pacwa-Płociniczak et al., 2016), debido a que cuentan con la capacidad de producir biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos en el suelo o agua para su degradación (Pacwa-Płociniczak et al., 2016).

Para aplicar esta tecnología es importante comprender del todo los mecanismos de interacción entre la comunidad microbiana, el ambiente y el contaminante (Ossai et al., 2020); por ello es que generalmente se emplea el análisis metagenómico, que permite comprender las propiedades genómicas y rasgos funcionales de las comunidades a partir del ADN ambiental extraído (Bao et al., 2017).

El propósito de este trabajo fue aislar e identificar cepas bacterianas con potencial biorremediador a partir de agua y suelo amazónicos contaminados con petróleo y determinar sus comunidades bacterianas por metagenómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras de agua y suelo contaminadas con petróleo crudo fueron colectadas de la capa superficial (0 - 15 cm) a partir del derrame de petróleo de agosto del 2016 a la altura del km 364 +900 de la Quebrada de Uchichiangos en el tramo II del oleoducto norperuano en el distrito de Nieva, provincia de Condorcanqui, departamento de Amazonas. Empleando un muestreo por conveniencia, se recolectó una muestra de 1 Kg de suelo (dividido en 3 submuestras) y una de 1 l de agua (dividido en 3 submuestras) almacenadas en condiciones de esterilidad a 4 °C y cubiertas de la luz hasta su llegada a las instalaciones del laboratorio de la empresa IncaBiotec, ubicado en el departamento de Tumbes para los análisis microbiológicos y genómicos posteriores.

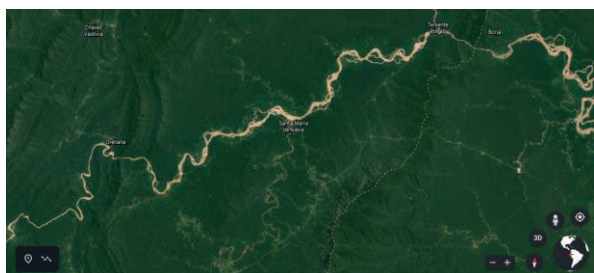


Figura 1. Vista Satelital de Nieva, Condorcanqui. Lugar del derrame.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

El aislamiento de las cepas se realizó siguiendo el protocolo modificado de Tuo et al. (2012) en medios de cultivo microbiológico suplementados con crudo de petróleo y por triplicado. A las muestras de suelo se les realizó un pretratamiento: se suspendieron 10 g de muestra en 100 ml de solución salina fisiológica (SSF) y se mantuvo en agitación constante por un día a 180 revoluciones por minuto (rpm) para extraer el sobrenadante con las baterías resuspendidas.

El pre-enriquecimiento consistió en sembrar 10 ml de agua o sobrenadante (en el caso de muestras de suelo) en 90 ml de caldo Luria Bertani (LB)

suplementado con 1 ml de petróleo crudo estéril de la zona del derrame. Se mantuvo en agitación constante de 180 rpm por 5 días y posteriormente se inoculó el sobrenadante en caldo de Medio Mínimo Salino (MSM) suplementado con crudo de petróleo al 1 % y se mantuvo la agitación constante a 180 rpm por 48 horas. Subsecuentemente, se inocularon por esparcimiento las diluciones 10^{-9} y 10^{-12} de cada cultivo en placas de Petri con agar MSM suplementado con 100 μ l de petróleo crudo para la selección y purificación de cepas bacterianas. Así, se aislaron preferentemente bacterias Gram negativas, debido a que, generalmente, éstas son capaces de degradar diferentes tipos de hidrocarburos (Bisht et al., 2015).

Para la identificación de las cepas aisladas se extrajo el ADN bacteriano empleando el método CTAB 2X; luego, se amplificó parcialmente el gen ARNr 16S por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los iniciadores universales de Lane (1991) 27F Forward AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R Reverse TACGGYTACCTGTTACGACTT, verificando la calidad de los productos amplificados por electroforesis en horizontal, en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Después, los productos amplificados fueron secuenciados por el método de Sanger. A partir de las secuencias *forward* y *reverse* se obtuvieron las secuencias consenso correspondientes en el programa DNA Dragon y, finalmente estas últimas se identificaron por comparación con la base de datos del servidor BLASTN de NCBI.

Extracción de ADN metagenómico

La extracción del ADN metagenómico se realizó con el kit *PowerSoil DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories, EE.UU.) a partir de las muestras de suelo y del sedimento obtenido por centrifugación de las muestras de agua, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue secuenciado mediante la tecnología *Illumina*, dirigido a las regiones V3 y V4 del gen ARNr16S.

Análisis bioinformático

El análisis de datos y asignación taxonómica se llevó a cabo con el software bioinformático Qiime2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology II*) versión 2017.4 (Bolyen et al., 2019). Las secuencias fueron filtradas y se eliminaron quimeras con el plugin q2-dada2 mediante el método denoise-paired y luego se agruparon con el complemento feature-table group. Para el análisis de diversidad se usó el plugin q2-diversity con el pipeline core-metrics-phylogenetic. Las categorías taxonómicas asignadas a las secuencias representativas se realizaron usando el plugin q2- feature-classifier classify-sklearn y un

clasificador Naive Bayes preparado con la base de datos de referencia GreenGenes 13_8 99 %.

RESULTADOS

Identificación de cepas bacterianas

Se aislaron siete cepas bacterianas a partir de las muestras de agua y seis de las muestras de suelo. La identificación por caracterización del gen ARNr 16S mostró que pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus* y *Morganella* (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas.

| Muestra | Código | Descripción | Nº de Accesoión |
|----------------------|--------|--------------------------------|-----------------|
| Agua Contaminada | A1 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | NR_112010.1 |
| | A2 | <i>Enterobacter cloacae</i> | NR_102794.2 |
| | A3 | <i>Pseudomonas koreensis</i> | NR_025228.1 |
| | A4 | <i>Serratia marcescens</i> | NR_036886.1 |
| | A5 | <i>Pseudomonas protekii</i> | NR_132724.1 |
| | A6 | <i>Acinetobacter rudis</i> | NR_115988.1 |
| | A7 | <i>Proteus vulgaris</i> | NR_115878.1 |
| Suelo contaminado | S1 | <i>Pseudomonas moraviensis</i> | NR_043314.1 |
| | S2 | <i>Proteus hauseri</i> | NR_104767.1 |
| | S3 | <i>Proteus vulgaris</i> | NR_115878.1 |
| | S4 | <i>Proteus terrae</i> | NR_146019.1 |
| | S5 | <i>Morganella morganii</i> | NR_113580.1 |
| | S6 | <i>Serratia marcescens</i> | NR_036886.1 |

Análisis metagenómico

La diversidad alfa de las comunidades bacterianas de las muestras estudiadas se muestra en la figura 2. En la figura 2A se presentan las curvas de rarefacción, en las que se observa como éstas tienen una pendiente cercana a cero, asegurando de esta manera que, aunque las muestras lleguen a tener una mayor profundidad de

análisis de secuencias esto no resultaría en la adición de características (número de OTU's observados). Por otro lado, las figuras 2B y 1C muestran los índices de diversidad alfa de Shannon y Faith donde las diferencias en los resultados comparativos de ambas muestras no son significativas; para Shannon 8,30 para agua y 7,87 para suelo mientras que en cuanto a Faith, fueron en el mismo orden 36,17 y 37,11.

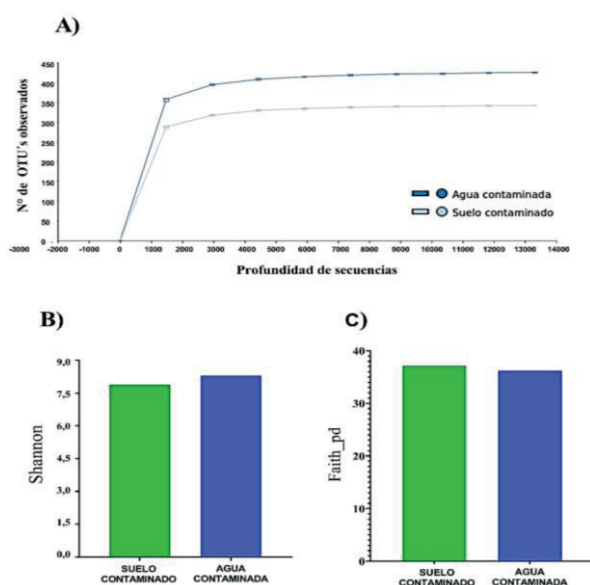


Figura 2. Diversidad alfa 1A) Curvas de rarefacción de OTU's observados. 1B) Índice de Shannon. 1C) Índice de diversidad filogenética de Faith.

La asignación taxonómica a nivel de filos bacterianos (figura 3) a las muestras agrupadas de suelo contaminado (SC) y agua contaminada (AC) mostró la presencia de 10 de ellos superiores al 1,5 % de

abundancia relativa; siendo los más representativos *Proteobacteria* (41,5 % en SC y 41,3 % en AC), *Bacteroidetes* (15,3 % en SC y 25,9 % en AC) y *Acidobacteria* (13,4 % en SC y 7,0 % en AC).

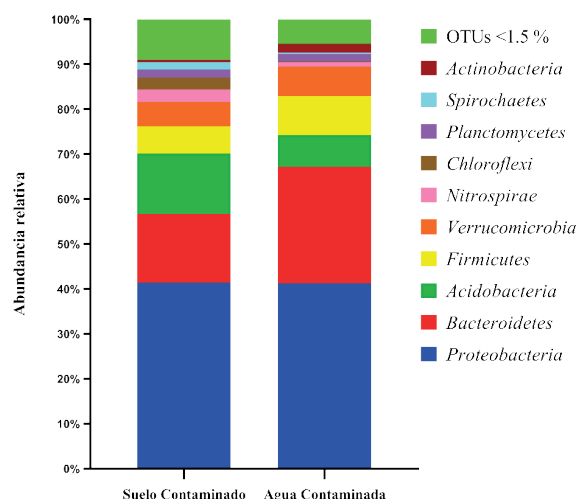


Figura 3. Abundancia relativa a nivel de filos bacterianos mayores a 1,5%.

Con respecto a la asignación taxonómica a nivel de familia, el heat-map de la figura 4 muestra las familias más abundantes (con frecuencia de secuencias mayor a 80), siendo las más representativas en muestras de suelo y agua contaminadas *Flavobacteriaceae* y *Moraxellaceae*; además, se observa que *Verrucomicrobiaceae* y

Acetobacteraceae que fueron más abundantes en agua y *Enterobacteraceae* que abundó más en suelo. Otras familias como *Pseudomonadaceae* y *Micrococcaceae* fueron detectadas sólo en agua contaminada y *Anaerolinaceae* y *Methylococcaceae* sólo en suelo contaminado.

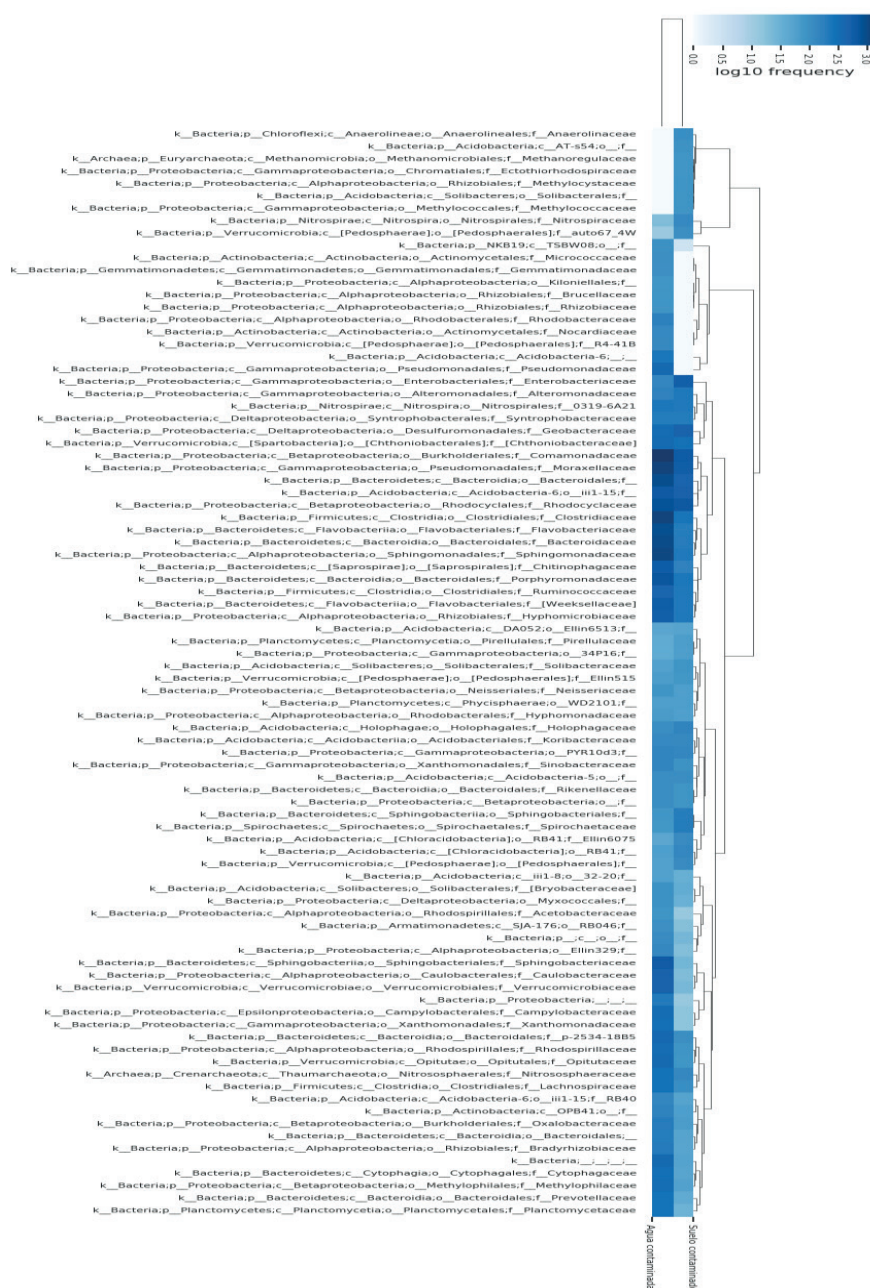


Figura 4. Heat-map de asignación taxonómica a nivel de familia de las muestras de agua y suelo contaminados.

En la figura 5 se muestra el diagrama de Venn-Euler que se realizó con la herramienta de Heberle et al. (2015) y en donde se observa el número de géneros bacterianos compartidos e independientes de cada tipo de muestra. Se destaca entre los 112 géneros

compartidos a *Acinetobacter* y *Flavobacterium* por ser ampliamente reportados como nativos de zonas contaminadas y con propiedades biorremediadoras de hidrocarburos.

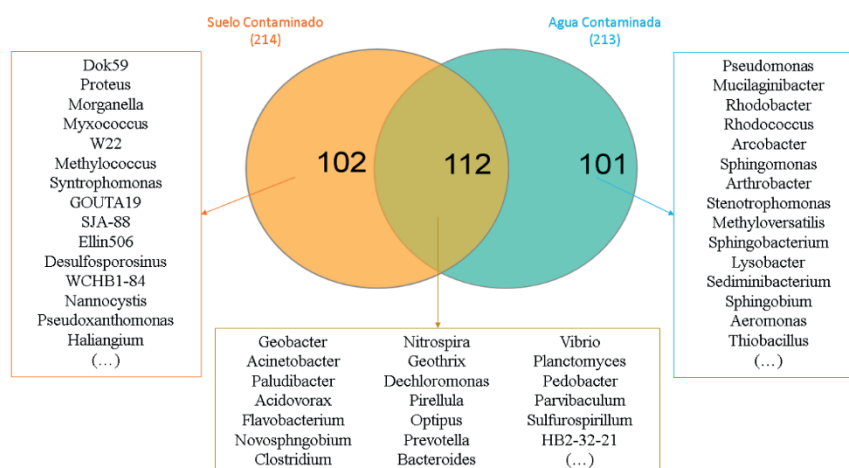


Figura 5. Diagrama de Veen-Euler de las muestras de suelo y agua contaminadas de los géneros bacterianos detectados por secuenciación de próxima generación.

DISCUSIÓN

La biorremediación *in situ* es considerada el método más eficaz para la biodegradación residual de hidrocarburos de petróleo (Al-Dhabaan, 2019), por ello, es razonable buscar en zonas contaminadas con petróleo bacterias que lo utilicen como fuente de carbono y energía y que presenten potencial biodegradador de este combustible (Al-Dhabaan, 2019; Sarkar et al., 2017).

Pseudomonas spp han sido aisladas de zonas contaminadas con hidrocarburos y se estudia su potencial biorremediador (Allamin et al. 2014; Baruah et al. 2017; Chebbi et al. 2017; Al-Dhabaan 2019; Smulek et al. 2020), mientras que también se ha demostrado la producción de biosurfactantes y moléculas degradadoras de compuestos alifáticos y aromáticos, así como la presencia de los genes *alkB* relacionados con la alcano hidrolasa en cultivos de *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Sarkar et al., 2017), géneros bacterianos también aislados en la presente investigación.

En este trabajo también se aislaron cepas del género *Serratia*, reconocido por utilizar los hidrocarburos como fuente de energía y carbono, además de la producción de biosurfactantes (Nalini & Parthasarathi, 2013; Pacwa-Płociniczak

et al., 2016; Smulek et al., 2020); también, *Klebsiella spp*, degradadoras particularmente de alcanos y cicloalcanos, igualmente productora de biosurfactantes y que puede ser empleada incluso como asistente en fitorremediación (Allamin et al., 2014; Liu et al., 2014); Asimismo, se aislaron cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Morganella* y *Proteus*, que cuentan con la capacidad de degradación de hidrocarburos y producción de biosurfactantes o bioemulsificantes tanto en agua como en suelo contaminado con hidrocarburos (Mahjoubi et al., 2013; Pacwa-Płociniczak et al., 2016; Subramanian & Menon, 2015).

El perfil de la comunidad microbiana en ambientes contaminados es uno de los aspectos de mayor importancia para entender la interacción ambiente-contaminante. El índice de Shannon, de diversidad alfa, muestra la riqueza específica por muestra (Swift, M. J., Atlas, R. M., & Bartha, 1982); en este trabajo, la riqueza de especies fue ligeramente más alta en el agua contaminada, quizás porque en el agua la mayor parte de hidrocarburos se quedan en la superficie (Mishra & Kumar, 2015), a diferencia de en los suelos en los que descienden verticalmente (Ossai et al., 2020). El crudo de petróleo contiene una mezcla de hidrocarburos, por lo tanto, tiene varias configuraciones estructurales (Prabhu & Phale, 2003), las cuales mientras más peso molecular

tengan, son más hidrófobos (Alegbeleye et al., 2017) lo que impide que se mezclen con facilidad en el agua. El índice de Faith_{pd} (Faith, 1992) mide la diversidad filogenética de las muestras que existe entre las especies bacterianas y permitió determinar a las muestras de suelo contaminado como las más diversas por una mínima diferencia.

Al igual que en el presente trabajo, otros estudios de análisis metagenómico demuestran la predominancia de los filos bacterianos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* como asociados a la degradación de hidrocarburos de petróleo en ambientes acuáticos (Hidalgo et al., 2020; Lee et al., 2018) y terrestres (Bao et al., 2017; Khan et al., 2018; Kostka et al., 2011; Sutton et al., 2013; Zhu et al., 2020) revelando que estos grupos están involucrados en la degradación aerobia y anaerobia de hidrocarburos de petróleo (Zhu et al., 2020).

Así mismo, las familias bacterianas *Moraxellaceae* (con el género *Acinetobacter*) y *Flavobacteriaceae* (con el género *Flavobacterium*) están relacionados a las funciones de degradación de hidrocarburos (Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., Naidu, 2016; Hidalgo et al., 2020; Kostka et al., 2011) y se determinó que participa en el metabolismo de compuestos hidrocarbonados mediante el análisis metagenómico.

Además géneros bacterianos como *Pseudomonas* (Garrido-Sanz et al., 2019; Kostka et al., 2011) y *Geobacter* (Hidalgo et al., 2020) han proporcionado aplicaciones putativas en biorremediación de hidrocarburos de petróleo mediante el uso de técnicas independientes de cultivo. Estos grupos bacterianos fueron detectados por metagenómica en la presente investigación.

CONCLUSIÓN

Se aislaron 13 cepas bacterianas de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus* y *Morganella*, con potencial degradador de hidrocarburos a partir de zonas

contaminadas con crudo de petróleo, que pueden ser utilizadas para la biorremediación de estos ambientes. Así mismo el análisis metagenómico demostró que el petróleo influye en la composición de la comunidad bacteriana favoreciendo la dominancia de OTU's tolerantes a los hidrocarburos de petróleo y que pueden metabolizarlo, agrupados en los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Acidobacteria* principalmente.

Además, se demostró la importancia de la metagenómica como herramienta para la investigación de ambientes impactados con hidrocarburos de petróleo, permitiendo un mejor conocimiento de los microorganismos para el aislamiento dirigido a aquellos de interés para la biorremediación.

Finalmente, se sugiere el uso de las cepas aisladas en estudios futuros de biorremediación aplicada.

Agradecimiento

A la empresa de investigación y capacitación de biotecnología molecular Inca Biotec SAC y el equipo de Biotecnología ambiental por la asesoría científica para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., Naidu, R. (2016). The Biodiversity Changes in the Microbial Population of Soils Contaminated with Crude Oil. *Current Microbiology*, 72(6), 663-670. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1001-4>
- Aguilera, F., Méndez, J., Pásaroa, E., & Laffona, B. (2010). Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *Journal of Applied Toxicology*, 30(4), 291-301. <https://doi.org/10.1002/jat.1521>
- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247-1255.
- Rev. Investig. Altoandín. 2020; Vol 22 Nro 3 215-225

1252. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>
- Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R., & Hossain, M. E. (2012). A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of Environmental Management*, *113*, 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.034>
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental Management*, *60*(4), 758-783. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>
- Allamin, I., Ijah, U., Ismail, H., & Riskuwa, M. (2014). Occurrence of hydrocarbon degrading bacteria in soil in Kukawa, Borno State. *International Journal of Environment*, *3*(2), 36-47. <https://doi.org/10.3126/ije.v3i2.10503>
- Bao, Y. J., Xu, Z., Li, Y., Yao, Z., Sun, J., & Song, H. (2017). High-throughput metagenomic analysis of petroleum-contaminated soil microbiome reveals the versatility in xenobiotic aromatics metabolism. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *56*, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.022>
- Baruah, R., Mishra, S. K., Kalita, D. J., Silla, Y., Chauhan, P. S., Singh, A. K., & Deka Boruah, H. P. (2017). Assessment of bacterial diversity associated with crude oil-contaminated soil samples from Assam. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *14*(10), 2155-2172. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1294-2>
- Behesht, M., Roostaazad, R., Farhadpour, F., & Pishvaei, M. R. (2008). Model development for MEOR process in conventional non-fractured reservoirs and investigation of physico-chemical parameter effects. *Chemical Engineering and Technology*, *31*(7), 953-963. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800094>
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., & Krishan, D. (2015). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(1), 7-21. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131354>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D. H., & Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology*, *11*(9), 2216-2227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01943.x>
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *122*, 128-140. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.006>
- Costa, A. S., Romão, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski, A., & Alexandre, M. R. (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, *105*, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.096>
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity Daniel. *Analytical Biochemistry*, *61*(1), 1-10. doi:10.1016/0006-3207(92)91201-3
- Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Guirado, M., Jiménez, O. P., Millán, R., Martín, M., & Rivilla, R. (2019). Metagenomic insights into the bacterial functions of a diesel-degrading consortium for the rhizoremediation of diesel-polluted soil. *Genes*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/genes10060456>

- Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 236-243. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00090-2)
- Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Hentati, O., Lachhab, R., Ayadi, M., & Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 2989-2998. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2766-y>
- Hidalgo, K. J., Teramoto, E. H., Soriano, A. U., Valoni, E., Baessa, M. P., Richnow, H. H., Vogt, C., Chang, H. K., & Valéria, M. O. (2020). Taxonomic and functional diversity of the microbiome in a jet fuel contaminated site as revealed by combined application of in situ microcosms with metagenomic analysis. *Science of the Total Environment*, 708(xxxx), 135152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135152>
- Hreniuc, M., Coman, M., & Cioru, B. (2015). *CONSIDERATIONS REGARDING THE SOIL POLLUTION WITH OIL PRODUCTS IN S Ȃ CEL - MARAMURE Ț*.
- Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Mahmud, S. A., Hasan, N. A., Khan, M. A. W., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Microbial diversity changes with rhizosphere and hydrocarbons in contrasting soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156(February), 434-442. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.006>
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardo, J., Norton, N., Hazen, T. C., & Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974. <https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11>
- Lane, D. J. (1991). *16S/23S rRNA sequencing* In: *Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. 115-175.
- Lee, D. W., Lee, H., Lee, A. H., Kwon, B. O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J. J. (2018). Microbial community composition and PAHs removal potential of indigenous bacteria in oil contaminated sediment of Taean coast, Korea. *Environmental Pollution*, 234, 503-512. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.097>
- Liu, W., Hou, J., Wang, Q., Ding, L., & Luo, Y. (2014). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. *Chemosphere*, 117(1), 303-308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.026>
- Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N., & Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites In Tunisia: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*, 30(6), 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.004>
- Mishra, A. K., & Kumar, G. S. (2015). Weathering of Oil Spill: Modeling and Analysis. *Aquatic Procedia*, 4(March), 435-442. <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2015.02.058>
- Moubasher, H. A., Hegazy, A. K. ., Mohamed, N. H. ., Moustafa, Y. M. ., Kabiell, H. F. ., & Hamad, A. A. (2015). Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.019>
- Nalini, S., & Parthasarathi, R. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 147, 619-622. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.041>

- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Zarska, M., Chorazewski, M., Dzida, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management*, 168, 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.058>
- Prabhu, Y., & Phale, P. S. (2003). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: Novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(4), 342-351. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1218-y>
- Sammarco, P. W., Kolian, S. R., Warby, R. A. F., Bouldin, J. L., Subra, W. A., & Porter, S. A. (2016). Concentrations in human blood of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon oil spill, Gulf of Mexico. *Archives of Toxicology*, 90(4), 829-837. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1526-5>
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, 242, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.010>
- Smulek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>
- Subramanian, A., & Menon, S. (2015). Novel Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) degraders from oil contaminated soil samples. *International Journal of Advanced Research*, 3(August), 999-1006.
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A. M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H. H. M., & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 619-630. <https://doi.org/10.1128/AEM.02747-12>
- Swift, M. J., Atlas, R. M., & Bartha, R. (1982). Journal of Ecology. *The Journal of Ecology*, 70(2), 686-687. doi:10.2307/2259932
- Tuo, B. H., Yan, J. B., Fan, B. A., Yang, Z. H., & Liu, J. Z. (2012). Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 107, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.114>
- Van Stempvoort, D., & Biggar, K. (2008). Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review. *Cold Regions Science and Technology*, 53(1), 16-41. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2007.06.009>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120, 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>
- Zhu, F., Doyle, E., Zhu, C., Zhou, D., Gu, C., & Gao, J. (2020). Metagenomic analysis exploring microbial assemblages and functional genes potentially involved in di (2-ethylhexyl) phthalate degradation in soil. *Science of the Total Environment*, 715, 137037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137037>