

Artículo

Evaluación del crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Yessica Mariana Rosales García¹, César Álvarez-Mejía², Varinia López-Ramírez^{1,*}

¹ Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Coordinación de Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km 12.5 Col. El Copal, 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

² Tecnológico Nacional de México/ITS de Abasolo, Coordinación de Ing. Ambiental, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401, Col. Cuitzeo de los Naranjos, 36976, Abasolo, Guanajuato, México.

* Correspondencia: varinia.lr@irapuato.tecnm.mx.

Resumen: El petróleo es una mezcla de hidrocarburos que a menudo contamina agua y suelo a través de fugas o derrames durante su tratamiento o transporte, provocando daño al medio ambiente y a la salud humana. Establecer metodologías para la remediación de sitios contaminados con petróleo y sus derivados resulta estratégico. En este trabajo se evaluó la capacidad de emplear hidrocarburos como fuente de carbono en bacterias aisladas del Río Lerma en Salamanca, Guanajuato. Las bacterias se identificaron molecularmente como *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter ludwigii*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus sp.* y *Achromobacter sp.* Las bacterias seleccionadas se inocularon individualmente en medio Touson en presencia de hexano, ciclohexano y tolueno, y su densidad celular se monitoreó cada 24 horas a 600 nm, a partir de las cinéticas obtenidas se determinó el tiempo de duplicación. Todas las cepas se desarrollaron en presencia de hexano, mientras que las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Providencia sp.* crecieron en ciclohexano, ninguna de las cepas evaluadas fue capaz de crecer en tolueno. La capacidad degradadora de las cepas evaluadas puede ser aprovechada para remover hidrocarburos en sitios contaminados con estos compuestos.

Citar este trabajo: Yessica Mariana Rosales García; César Álvarez-Mejía; Varinia López-Ramírez. Evaluación del crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

REIA 2023, 7, (4), 50-58

Recibido: 24/11/2023

Aceptado: 22/12/2023

Publicado: 31/12/2023

Keywords: Biorremediación; Degradación de hidrocarburos; Bacterias degradadoras.

1. Introducción

Los hidrocarburos totales de petróleo están compuestos por una mezcla compleja de hidrocarburos saturados (principalmente parafinas, 60–80%) e hidrocarburos aromáticos (20–40%) y causan daño al medio ambiente cuando entran en contacto con cuerpos de agua y suelo originados por derrames [1]. Para su remoción se han utilizado diversos métodos, por ejemplo, algunos químicos dispersantes y tratamientos térmicos los cuales, tienen mayor impacto ecológico debido a su toxicidad [1,2]. Un método eficaz y de menor costo es la biorremediación, que emplea microorganismos con capacidad de utilizar los hidrocarburos del petróleo, como compuestos alifáticos, cicloalcanos, aromáticos y resinas; y transformarlos en CO₂, H₂O y etanol. A este proceso anaeróbico se le conoce como degradación metanogénica [3, 4]. La complejidad de la estructura del petróleo dificulta la capacidad degradadora de una sola especie de microorganismo, por lo que, la conformación de consorcios microbianos es necesaria para la biorremediación de dichos componentes [5,6].

Cuando se presentan derrames de petróleo en ambientes salinos como mares o pantanos, la biorremediación de la zona es complicada debido a que la alta concentración salina afecta el metabolismo y fisiología microbiana, ya que puede desgastar la membrana celular, desnaturalizar enzimas, reducir la disponibilidad de oxígeno, entre otros. Por esta razón se deben utilizar microorganismos halófilos, es decir, microorganismos que toleran altas concentraciones de sal [7,8].

El aislamiento de microorganismos en sitios contaminados con petróleo o sus derivados permite seleccionar bacterias con capacidad de emplear hidrocarburos como fuente de carbono y emplear sus capacidades metabólicas para biorremediar las áreas contaminadas. En este trabajo se emplearon bacterias aisladas de diferentes puntos a lo largo del Río Lerma en Salamanca, Guanajuato para determinar las cinéticas de crecimiento en presencia de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos.

2. Materiales y Métodos

Reactivación de cepas

Un total de 27 cepas bacterianas fueron aisladas y preservadas a -80°C por Razo Ventura (2014) [9]. En este trabajo, las 27 cepas fueron sembradas en agar nutritivo por el método de estría por agotamiento para posteriormente cultivarlas en medio mineral suplementado con hidrocarburos. Las placas Petri inoculadas se incubaron a temperatura ambiente ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) por 24 h. Las cepas se identificaron con el siguiente código SA#-#, donde S corresponde a Salamanca; A, a agua; el primer número al sitio de colecta y el segundo número del aislado.

Selección de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se inocularon en 5 mL de caldo nutritivo para su reactivación, se incubaron a temperatura ambiente, 110 rpm durante 24 h. Posteriormente se inocularon en Agar Tousem [Solución A (por cada 800 mL): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$, 1 g; CaSO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g; Solución B (por cada 200 mL): KH_2PO_4 , 1 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; Solución traza (por cada 1 L): H_2BO_3 , 5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 5 g; KI, 0.50 g; NaBr, 0.5 g; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g. La solución A y B se mezclan en relación 4:1 y una vez realizada la mezcla se adiciona 1 mL de solución traza y 15 g/L de agar bacteriológico], en presencia de 1 mL de petróleo clarificado para determinar cuáles aislados eran los que presentaban la capacidad de crecer en presencia de esta mezcla para posteriormente cultivarlas en medio con hidrocarburos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por una semana. Los aislados que no presentaron crecimiento se marcaron como no degradadores y se descartaron. Por otra parte, los aislados que se desarrollaron en presencia de petróleo se inocularon nuevamente en agar Tousem pero ahora con hexano, ciclohexano y tolueno por separado para identificar cuales aislados presentaban la capacidad para crecer en dichos hidrocarburos.

Cinéticas de crecimiento de aislados en presencia de hidrocarburos.

Las cinéticas de crecimiento de los aislados seleccionados como degradadores de hidrocarburos se realizaron en 50 mL de caldo Tousem con 300 μL de cada hidrocarburo y 2 mL de pre-inoculo de las bacterias previamente desarrolladas en caldo nutritivo, los inóculos se incubaron a temperatura ambiente a 110 rpm. Como blanco se empleó caldo Tousem, y como controles tres tratamientos de medio Tousem con hexano, ciclohexano y tolueno por separado libre de bacterias. La densidad óptica se determinó a 600 nm cada 24 h en espectrofotómetro (Cary 60 Agilent®).

Comparación fenotípica de aislados

Para asegurar que no se presentará contaminación cruzada durante la realización de los experimentos, se realizaron siembras en agar nutritivo para evaluar el fenotipo de los aislados. Este proceso consistió en estriar a partir de los matraces correspondientes a

tiempo 0 y a 96 h, con el fin de comparar los fenotipos inicial y final de los aislados. Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h.

3. Resultados

3.1 Crecimiento de aislados en presencia de petróleo

Se inocularon 15 μ L de cada uno de los 27 aislados en agar Touson con petróleo clarificado al 1% (1 mL) para determinar que aislados presentaban la capacidad de emplear el petróleo como fuente de carbono. En la Figura 1, se presenta el crecimiento de las distintas cepas evaluadas en este trabajo, se omitieron las siglas SA. El crecimiento se observó en forma de colonias color blanco. Los aislados que crecieron en presencia de petróleo se muestran en la Tabla 1 en la cual el signo positivo representa el crecimiento y el negativo que no hubo crecimiento; en la última columna se muestra el género que corresponde a cada una de las cepas analizadas.

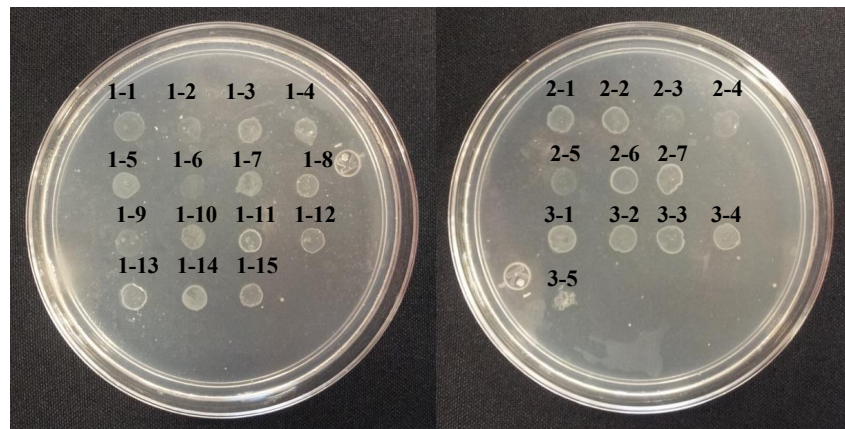


Figura 1. Morfologías de algunos aislados empleados en este estudio.

Tabla 1. Crecimiento de cepas evaluadas inoculadas en agar Touson con petróleo clarificado.

Aislado	Crecimiento	Género
SA1-1	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-2	-	<i>Providencia rettgeri</i>
SA1-3	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-4	+	NI
SA1-5	+	<i>Providencia rettgeri</i>
SA1-6	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-7	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-8	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-9	+	NI
SA1-10	-	<i>Enterbacter ludwigi</i>
SA1-11	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-12	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA1-13	+	NI
SA1-14	+	NI
SA1-15	+	<i>Providencia rettgeri</i>
SA2-1	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>
SA2-2	+	<i>Staphylococcus</i> sp.
SA2-3	-	<i>Achromobacter</i> sp.

SA2-4	-	NI
SA2-5	-	<i>Providencia rettgeri</i>
SA2-6	+	NI
SA2-7	+	NI
SA3-1	+	NI
SA3-2	+	<i>Providencia rettgeri</i>
SA3-3	+	<i>Providencia sp.</i>
SA3-4	+	NI
SA3-5	-	NI

* NI= No identificada.

3.2. Selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Para determinar que bacterias eran capaces de crecer en presencia de hidrocarburos se preparó agar Touson al cual se le adicionó por separado hexano, ciclohexano y tolueno al 1% con respecto al volumen del medio. Se inocularon 15 μ L de pre-inóculos cultivados en caldo nutritivo de los aislados pre-seleccionados como degradadores de petróleo en cada uno de los hidrocarburos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una semana. Como se muestra en la Figura 2, la mayoría de los aislados bacterianos se desarrollaron, sin embargo, solo se seleccionaron aquellos en las que se observó mayor crecimiento. Los aislados que no presentaron crecimiento fueron descartados.

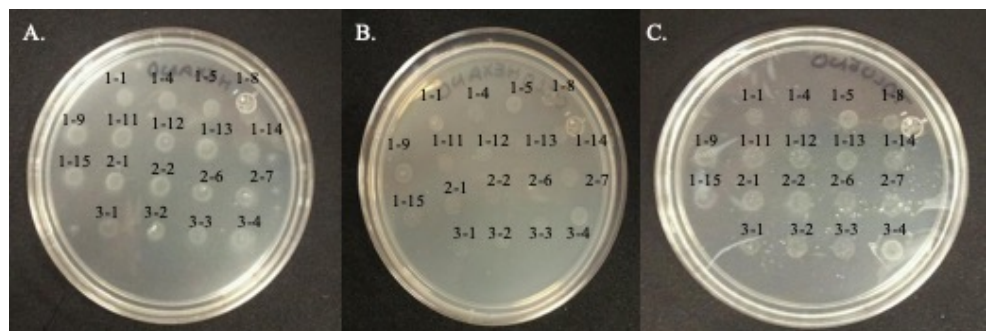


Figura 2. Crecimiento bacteriano observado al inocular las cepas en agar Touson con hidrocarburos. A. Hexano; B. Ciclohexano; C. Tolueno. La nomenclatura de las bacterias se indica sobre el área donde se colocaron los inóculos, omitiendo las siglas SA, solo se expresa el número del sitio de muestreo y el número de aislado.

Los aislados seleccionados para realizar las cinéticas de crecimiento se muestran en la Tabla 2, donde el signo negativo indica un menor crecimiento y el signo positivo indica mayor crecimiento.

Tabla 2. Crecimiento de cepas evaluadas inoculadas en agar Touson con diferentes hidrocarburos.

Aislado	Hexano	Ciclohexano	Tolueno
SA1-1	-	+	-
SA1-4	+	-	-
SA1-5	-	-	+
SA1-8	-	+	-
SA1-9	-	+	-
SA1-11	+	-	-
SA1-12	+	-	-
SA1-13	+	-	-
SA1-14	+	-	-

SA1-15	+	-	-
SA2-1	+	-	-
SA2-2	+	-	-
SA2-6	+	-	-
SA2-7	-	+	-
SA3-1	+	-	-
SA3-2	+	-	-
SA3-3	-	+	-
SA3-4	-	-	+

3.3 Evaluación del desarrollo bacteriano en presencia de hidrocarburos

Para determinar si los aislados candidatos presentaban la capacidad de emplear hidrocarburos lineales, cíclicos y aromáticos, se inocularon 50 mL de medio líquido Touson con 2 mL de pre-inóculo procedente de caldo nutritivo y 300 µL de cada hidrocarburo, como control empleamos el medio Touson inoculado individualmente con los hidrocarburos. La densidad óptica de los diferentes cultivos se estimó a 600 nm cada 24 h hasta las 96 h, cada lectura se realizó por duplicado, se determinó el promedio y se graficó. En las Figuras 3 y 4, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas.

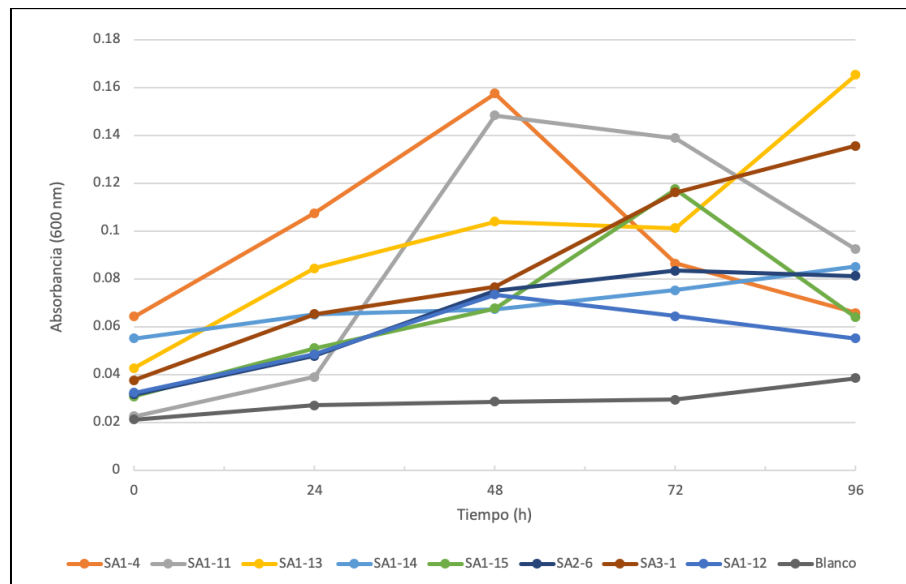


Figura 3. Curvas de crecimiento de bacterias degradadoras de hexano. Se muestran los valores promedio de tres réplicas biológicas. Los valores de desviación estándar no se indicaron para facilitar la visualización de los resultados.

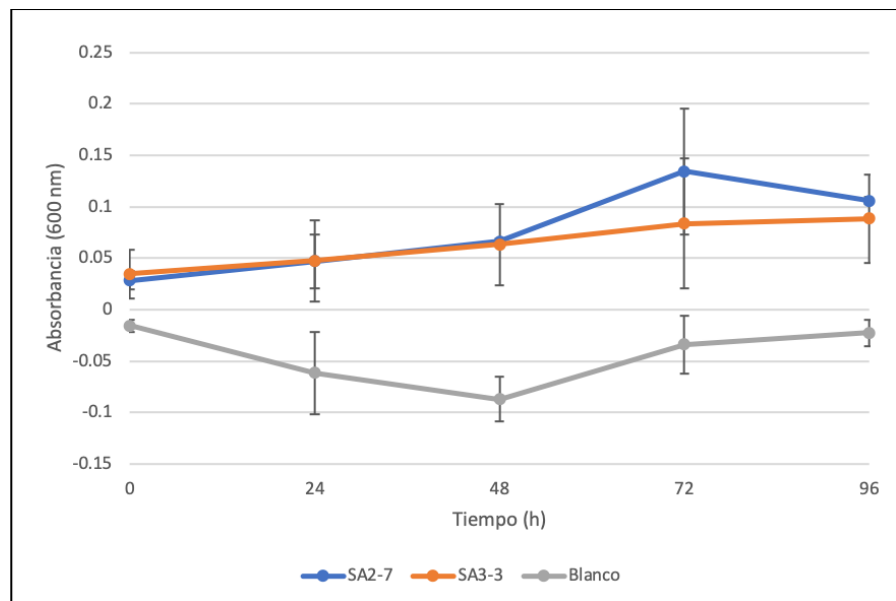


Figura 4. Curvas de crecimiento de bacterias degradadoras de ciclohexano. Se muestran los valores promedio de tres réplicas biológicas y los valores de desviación estándar en cada .

Posteriormente se graficó el $\ln X$ contra el tiempo para identificar los puntos en la fase exponencial de crecimiento, se obtuvo la ecuación de la gráfica y a partir de ésta se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) que está representada por la pendiente de la curva y el tiempo de duplicación (t_d) siguiendo el modelo matemático de crecimiento microbiano (Ecuación 1).

$$t_d = \ln 2 / \mu, \quad (1)$$

Los valores de velocidad específica de crecimiento (μ) estimadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) estimado para cada aislado en presencia de hidrocarburo.

Aislado	μ (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)	Hidrocarburo	Género
SA1-4	0.0187	37.06	Hexano	NI
SA1-11	0.0392	17.68	Hexano	<i>P. aeruginosa</i>
SA1-12	0.0171	40.53	Hexano	<i>P. aeruginosa</i>
SA1-13	0.0186	37.26	Hexano	NI
SA1-14	0.0052	133.30	Hexano	NI
SA1-15	0.0174	39.83	Hexano	<i>P. rettgeri</i>
SA2-6	0.0188	36.87	Hexano	NI
SA2-7	0.0218	31.80	Ciclohexano	NI
SA3-1	0.0109	63.60	Hexano	NI
SA3-3	0.0117	59.24	Ciclohexano	<i>Providencia sp.</i>

*NI = No identificado.

4. Discusión

La descripción del desarrollo microbiano a través del análisis de las cinéticas de crecimiento permite reconocer el tiempo de duplicación y la capacidad metabólica para emplear hidrocarburos como fuente de carbono, para poder emplearlos en estudios

posteriores para biorremediación de suelos o cuerpos de agua contaminados con petróleo o sus derivados. En este trabajo se realizó la caracterización del crecimiento de bacterias aisladas del Río Lerma seleccionadas por su habilidad de desarrollarse en presencia de distintas formas estructurales de hidrocarburos como única fuente de carbono

A menudo se utilizan bacterias capaces de degradar compuestos del petróleo dentro de tratamientos de biorremediación, aunque muy pocos estudios han reportado parámetros cinéticos o curvas de crecimiento. En este trabajo se realizaron curvas de crecimiento de cada aislado en presencia de hidrocarburos, el crecimiento se monitoreó mediante la determinación de la densidad óptica con respecto al tiempo ($\lambda=600\text{ nm}$). Estos datos se emplearon para estimar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación en cada tratamiento.

Algunos de los géneros bacterianos empleados correspondían a cepas del género *Pseudomonas*, que han sido reportadas como degradadoras de compuestos lineales tales como el hexadecano e hidrocarburos aromáticos policíclicos además de alcanzar la mineralización de hidrocarburos alifáticos en condiciones anaerobias. Particularmente, *Pseudomonas aeruginosa* contribuye a la solubilización y movilización de contaminantes [6,10]. Así mismo, algunos autores refieren que los géneros *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., y *Enterobacter* sp. son capaces de degradar asfaltenos cuando forman parte de diferentes consorcios microbianos [11].

En el caso del aislado del género *Achromobacter* sp. empleado en este trabajo no exhibió crecimiento en ninguno de los hidrocarburos utilizados, aunque autores como Villaverde et al., (2019) [12] demostraron que este género es capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, y Nejidat et al., (2004) previamente lo habían identificado como degradador de 2,4,6-tribromofenol, en presencia de extracto de levadura [13].

Por otra parte, el aislado de *Staphylococcus* sp. no se desarrolló en alguno de los hidrocarburos, pero al igual que las cepas de *Pseudomonas* sp., se han descrito como géneros dominantes en consorcios microbianos que crecen en presencia de compuestos alifáticos o aromáticos y son ampliamente utilizados en la biorremediación de ambientes afectados por petróleo [14].

Narváez-Flórez et al., (2008) [15], realizaron curvas de crecimiento de una mezcla de bacterias degradadoras de hidrocarburos, determinando el porcentaje de degradación de algunos tipos de hidrocarburos. Al igual que en el presente estudio, se observó que el crecimiento de las bacterias era exponencial durante los primeros 6 días, los días posteriores el crecimiento solo declinó. La mezcla de bacterias degradadoras no tenía la capacidad de degradar los compuestos aromáticos, sin embargo, los compuestos alifáticos tenían un porcentaje de remoción de aproximadamente el 96%.

Por su parte, Khelil et al., (2014) [16] realizaron el monitoreo del crecimiento de diferentes cepas bacterianas entre ellas *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus* sp. en presencia de petróleo. Se determinaron sus tiempos de duplicación los cuales fueron 1.57 y 1.44 h. Estos valores no coinciden con los valores obtenidos en nuestro estudio dado que nos enfocamos en el análisis de la degradación de hidrocarburos individuales.

En las curvas de crecimiento del presente estudio no se observa una amplia fase de adaptación debido a que realizó un preinóculo que permite que las bacterias sintetizen algunas enzimas para consumir los nutrientes presentes en el medio en presencia de hidrocarburos, además de que los intervalos de tiempo en que se tomaron las mediciones fueron amplios. En la mayoría de las curvas se observa un crecimiento máximo entre las 48 y 96 h. En las curvas de los aislados SA1-11, SA1-12, SA1-15, y SA2-7, el declive comienza a partir de las 72 h ya que la biodisponibilidad de los nutrientes es limitada. La fase de muerte en algunos casos se origina por las secreciones de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para las bacterias [16]. Dentro de los géneros empleados en este trabajo ninguno logró crecer en presencia de tolueno debido a su estructura compleja. Existen diversos estudios donde cepas de *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus* sp. destacan por su capacidad de degradar compuestos aromáticos tales como el fenantreno [17,18].

5. Conclusiones

Las cinéticas de crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos permiten conocer el comportamiento de aislados frente a estos compuestos y son utilidad para optimizar las condiciones de crecimiento para biorremediar sitios contaminados. En este estudio se observó que las estructuras lineales de hidrocarburos son asimiladas a través del metabolismo bacteriano, ya que se obtuvo mejor crecimiento de las bacterias en presencia de hexano en comparación con el ciclohexano, así mismo no se detectó crecimiento en presencia de tolueno. Este estudio no asegura totalmente que estas bacterias pueden ser aplicadas directamente en proyectos de degradación de hidrocarburos a gran escala ya que la biorremediación depende de otros factores como la concentración del hidrocarburo, temperatura, pH, la presencia de otros contaminantes, la disponibilidad de nutrientes u otros tipos de microorganismos. Sin embargo, es de gran utilidad determinar cómo se comportan las bacterias al crecerlas en presencia de hidrocarburos con distintas estructuras como fuentes de carbono, ya que pueden ser aplicadas dentro de consorcios microbianos para obtener un mejor rendimiento de las mismas. Este trabajo es un primer escrutinio del comportamiento de cepas bacterianas aisladas del Río Lerma en Salamanca, Guanajuato, se considera conveniente continuar con el análisis incorporando factores que intervienen en la biorremediación de ambientes contaminados tales como la concentración de hidrocarburos, pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes entre otros, ya que el comportamiento cinético puede variar.

Contribución: Conceptualización, Álvarez-Mejía, C. y López-Ramírez, V; metodología, Álvarez-Mejía, C. y Rosales-García, Y. M.; validación: Rosales-García, Y. M., Álvarez-Mejía, C. y López-Ramírez, V.

Financiamiento: Esta investigación fue apoyada por el Depto. de Investigación del INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE IRAPUATO.

Agradecimientos: Agradecemos al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, por las facilidades e infraestructura prestada para la realización de este proyecto. Así como al Dr. Adán T. Morales Vargas por su apoyo técnico.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses. Las instituciones que apoyaron no tuvieron ningún rol en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados.

Referencias

1. Cho K, Myung E, Kim H, Purev O, Park C, Choi N. Removal of Total Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soil through Microwave Irradiation. *Int J Environ Res Public Health*. **2020**; 17(16):5952. doi:10.3390/ijerph17165952
2. Pérez Silva R. M, Camacho Pozo M. I, Gómez Montes de Oca J. M, Ábalos Rodríguez A, Viñas M, , Cantero Moreno D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. **2008**; 39(1):44-51. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181214889004>.
3. Joye S, Kleindienst S, Peña-Montenegro TD. SnapShot: Microbial Hydrocarbon Bioremediation. *Cell*. **2018**, 172(6):1336-1336.e1. doi:10.1016/j.cell.2018.02.059.
4. Sherry A, Grant RJ, Aitken CM, Jones DM, Head IM, Gray ND. Volatile hydrocarbons inhibit methanogenic crude oil degradation. *Front Microbiol*. **2014**, 5:131. doi: 10.3389/fmicb.2014.00131.
5. Yu T, Liu X, Ai J, Wang J, Guo Y, Liu X, He X, Deng Z, Jiang Y. Microbial community succession during crude oil-degrading bacterial enrichment cultivation and construction of a degrading consortium. *Front Microbiol*. **2022**, 13:1044448. doi:10.3389/fmicb.2022.1044448.
6. Yang Y, Zhang ZW, Liu RX, Ju HY, Bian XK, Zhang WZ, Zhang CB, Yang T, Guo B, Xiao CL, Bai H, Lu WY. Research progress in bioremediation of petroleum pollution. *Environ Sci Pollut Res Int*. **2021**, 28(34):46877-46893. doi: 10.1007/s11356-021-15310-6.
7. Fathepure BZ. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol*. **2014**, 5:173. doi: 10.3389/fmicb.2014.00173.
8. Lyu L, Li J, Chen Y, Mai Z, Wang L, Li Q, Zhang S. Degradation potential of alkanes by diverse oil-degrading bacteria from deep-sea sediments of Haima cold seep areas, South China Sea. *Front Microbiol*. **2022**, 19;13:920067. doi: 10.3389/fmicb.2022.920067.

9. Razo Ventura R. M. Aislamiento y caracterización de microorganismos degradadores de petróleo en el Río Lerma en puntos cercanos a la refinería de Salamanca. Tesis de Licenciatura. Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato, Irapuato, Guanajuato, 2016.
10. Vizuite-García RA, Pascual-Barrera AE, Taco-Taco CW, Morales-Padilla MM. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias utilizadas como bioproductos. *Rev. Lasallista Investig.* **2020**; 17(1):177-187. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a19>.
11. Shahebrahimi Y, Fazlali A, Motamedi H, Kord S, Mohammadi AH. Effect of various isolated microbial consortiums on the biodegradation process of precipitated asphaltenes from crude oil. *ACS Omega.* **2020**, 17;5(7):3131-3143. doi: 10.1021/acsomega.9b02056.
12. Villaverde J, Láiz L, Lara-Moreno A, González-Pimentel JL, Morillo E. Bioaugmentation of PAH-contaminated soils with novel specific degrader strains isolated from a contaminated industrial site. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin as PAH bioavailability enhancer. *Front Microbiol.* **2019**, 10:2588. doi: 10.3389/fmicb.2019.02588.
13. Nejdat A, Saadi I, Ronen Z. Degradation of 2,4,6-tribromophenol by bacterial cells attached to chalk collected from a contaminated aquifer. *J Appl Microbiol.* **2004**, 96(4):844-52. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02222.x.
14. Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, Gao X, Li F, Li H, Yu H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Front Microbiol.* **2018**, 3;9:2885. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885.
15. Narváz-Flórez S, Gómez ML, Martínez MM. Selección de bacteria con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* **2008**, 37(1): 61-75. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612008000100004&lng=en.
16. Khelil F, Matallah-Boutiba A, Chemlal-Kherras D, Boutiba Z. Characterization of hydrocarbonoclastes bacteria isolated from marine waters west Algeria: Evolution analysis in presence of crude oil. *Journal of Current Research in Science*, **2014**, 2(5), 557.
17. Jiang L, Song M, Luo C, Zhang D, Zhang G. Novel phenanthrene-degrading bacteria identified by DNA-stable isotope probing. *PLoS One.* **2015**, 10(6):e0130846. doi: 10.1371/journal.pone.0130846.
18. Mawad AMM, Abdel-Mageed WS, Hesham AE. Quantification of naphthalene dioxygenase (*NahAC*) and catechol dioxygenase (*C23O*) catabolic genes produced by phenanthrene-degrading *Pseudomonas fluorescens* AH-40. *Curr Genomics.* **2020**, 21(2):111-118. doi: 10.2174/1389202921666200224101742.