

Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de Cuba

Evaluation of the hydrocarburoclastic capacity of a bacterial consortium isolated from coastal areas of Cuba

Silvia Acosta Díaz^{a,*}, Yaima Barrios San Martín^a, Heidy Toledo León^a, Yumirka Comesaña García^a, Karelía Aldana Jiménez^a.

^{a, *} **Conceptualización, investigación, curación de datos, redacción del borrador original** (0000-0002-0140-2760). Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churrucá No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba. sacosta@ceinpet.cupet.cu

a **Investigación, curación de datos, revisión del borrador original** (0000-0002-8274-434X). Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churrucá No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba.

a **Investigación, curación de datos, revisión del borrador original** (0000-0002-6268-9646). Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churrucá No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba.

a **Curación de datos, software** (0000-0001-8853-8830). Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churrucá No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba.

a **Curación de datos, software** (0000-0002-9930-0948). Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churrucá No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba.

Recibido: 1 de abril de 2021;

Aceptado: 14 de julio de 2021;

RESUMEN

La recuperación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos empleando microorganismos ofrece una solución práctica y viable. Varios investigadores han reportado microorganismos con una alta capacidad de degradar hidrocarburos, aislados de hábitats naturales históricamente contaminados con petróleo o sus derivados. El objetivo de la investigación trabajo fue evaluar la capacidad de degradación de un consorcio bacteriano, compuesto por cuatro cepas (*Pseudomonas* sp. B10, *Alcaligenes* sp. F10S1, *Bacillus* sp. F9S y *Bacillus* sp. RFA) aisladas de zonas costeras de Cuba. Se diseñó un ensayo microcosmo utilizando petróleo crudo y derivados del petróleo (queroseno, diésel, gasolina, Jet A1) como fuentes de carbono. Los cultivos se incubaron en agitación a 130 rpm y temperatura de 30^o C por 90 días. Durante el ensayo se evaluó la viabilidad del consorcio a 0, 21, 45 y 90 días por conteo en placas de bacterias aerobias cultivables (UFC/mL). La eficiencia de degradación del consorcio se determinó por la técnica de Espectroscopia Infrarrojo (IR) para el petróleo crudo, diésel, queroseno y Jet A1, se utilizó Cromatografía de Gases para la gasolina e Hidrocarburos totales (HCT) para el diésel, queroseno y Jet A1. Se determinaron los componentes del petróleo crudo saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (SARA) al inicio y final del ensayo por los procedimientos EPA, 2020. El consorcio se mantuvo viable en el cultivo con el petróleo crudo y los derivados, lo que indica que fue capaz de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía. El consorcio fue capaz de degradar parcialmente los componentes del petróleo crudo: saturados (38,46 %), resinas (89,5%) y asfáltenos (19,42 %), degradó también los hidrocarburos del diésel (14,22 %), queroseno (41,69 %) y Jet A1 (59,68 %), transformó la gasolina con mayor influencia en las olefinas (100 %) y parafinas (66,37 %). El consorcio demostró ser eficiente en la degradación de petróleo crudo y diferentes derivados del petróleo, su aplicación en procesos de bioaumentación puede ser una alternativa viable para el saneamiento de ecosistemas impactados con petróleo.

Palabras claves: consorcio, biodegradación, hidrocarburos.

ABSTRACT

The recovery of ecosystems contaminated with hydrocarbons using microorganisms offers a practical and viable solution. The objective of the research work was to evaluate the degradation capacity of a bacterial consortium, composed of four strains (*Pseudomonas* sp. B10, *Alcaligenes* sp. F10S1, *Bacillus* sp. F9S and *Bacillus* sp. RFA) isolated from coastal areas of Cuba. A microcosm test was designed using crude oil and petroleum derivatives (kerosene, diesel, gasoline, Jet A1) as carbon sources. The cultures were incubated with shaking at 130 rpm and a temperature of 30^o C for 90 days. During the trial, the viability of the consortium was evaluated at 0, 21, 45 and 90 days by counting on plates of cultivable aerobic bacteria (CFU/mL). The Infrared Spectroscopy (IR) technique for crude oil, diesel, kerosene and Jet A1, Gas Chromatography was used for gasoline and Total Hydrocarbons (HCT) determined the degradation efficiency of the consortium for diesel, kerosene and Jet A1. The saturated, aromatic, resin and asphaltene (SARA) components of crude oil were determined at the beginning and end of the trial by the EPA, 2020 procedures. The consortium remained viable in cultivation with crude oil and derivatives, indicating that was able to use these compounds as a source of carbon and energy. The consortium was able to partially degrade the components of crude oil: saturated (38.46%), resins (89.5%) and asphalt (19.42 %), it also degraded diesel hydrocarbons (14.22 %), Kerosene (41.69 %) and Jet A1 (59.68 %), transformed the gasoline with the greatest influence on olefins (100 %) and paraffin (66.37 %). The consortium proved to be efficient in the degradation of crude oil and different petroleum derivatives, its application in bioaugmentation processes can be a viable alternative for the sanitation of ecosystems impacted by oil.

Keywords: consortium, biodegradation, hydrocarbons.

INTRODUCCION

Existen diferentes tecnologías y métodos para la recuperación de ecosistemas contaminados con petróleo crudo y derivados del petróleo, sin embargo la biorremediación es una tecnología que en los últimos años se ha venido desarrollando como una alternativa más económica y ambientalmente sostenible. La biorremediación utiliza la capacidad de los microorganismos presentes en ambientes afectados para degradar compuestos o convertirlos a otros menos tóxicos. La recuperación de zonas afectadas con el uso de microorganismos ofrece una solución práctica y viable para la restauración de ecosistemas. Varios investigadores han reportado microorganismos con una alta capacidad de degradar hidrocarburos, aislados de hábitats naturales históricamente contaminados con petróleo o sus derivados. (Song, Tang, Zhen, Liu, 2019). Se ha demostrado que durante el crecimiento los microorganismos que viven en ambientes impactados con petróleo y sus derivados utilizan estos como fuente de carbono. Los compuestos saturados y aromáticos de uno a cinco anillos bencénicos son los más utilizados, en cambio los aromáticos de peso molecular elevado (con más de seis anillos bencénicos), las resinas y asfaltenos son difíciles de degradar por su recalcitrancia (Abdel, Hussein, Mansour, 2016). Las parafinas son hidrocarburos fácilmente degradables. Los isómeros, hidrocarburos cíclicos y de larga cadena carbonada tienen una lenta biodegradación por lo que necesitan una microbiota específica. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos también pueden ser usados como fuente de carbono por diferentes especies de microorganismos (Kumari, Regar, Rajr, Manickam, Natesan, 2018). Al estar el petróleo constituido por numerosos compuestos químicos, ningún microorganismo puede degradar por sí solo todos sus constituyentes, sino que necesita agruparse con otros formando poblaciones mixtas o consorcios microbianos. Los consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático del consorcio es más completa y por tanto es más probable la degradación de las mezclas complejas de hidrocarburos presentes en un área dañada. La bioaumentación con cultivos mixtos de bacterias aisladas de ambientes impactados con crudo ofrecen claramente una mejor opción de biorremediación que otros tratamientos (Brzeszcz, Kapusta, Steliga, Turkiewicz, 2020).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la degradación de petróleo crudo y derivados a escala de laboratorio empleando un consorcio compuesto por cuatro cepas bacterianas aisladas de zonas costeras de Cuba. Este consorcio se encuentra en desarrollo, y una de las características que se le puede atribuir y de alta importancia es la versatilidad que pueda demostrar al enfrentarse a diferentes compuestos del petróleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de degradación

El consorcio empleado para el ensayo está compuesto por bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de la zona costera del Oriente de Cuba. El mismo está compuesto por cepas de los géneros: *Pseudomonas sp.* B10, *Alcaligenes sp.* F10S1, *Bacillus sp.* F9S y *Bacillus sp.* RFA, se sembraron individualmente en 30 ml de medio de cultivo para la producción biomasa QBP (Sacarosa 30 g.l⁻¹; MgSO₄·7 H₂O 0,2 g.l⁻¹; NH₄(₂) HPO₄ 5,0 g.l⁻¹ y Levadura forrajera 1,0 g.l⁻¹). Los cultivos se incubaron en zaranda por 24 h en agitación de 130 rpm a una temperatura de 37^o C. Para preparar el inóculo se tomaron los cultivos en medio QBP y se centrifugaron y el pellet de cada uno fue lavado y se re-suspendió en 20 ml de

solución salina 0,85% hasta lograr una concentración en el orden de 10^6 UFC.mL⁻¹ según la escala de McFarland, luego se mezclaron en un frasco estéril y se homogenizaron (Barrios, 2014).

Para evaluar la capacidad de degradación del consorcio se diseñó un ensayo microcosmo, se utilizó medio mínimo mineral (MMM) que contenía por litro: NH₄Cl 1,2g, KNO₃ 2,4 g, CaCl₂ 6H₂O 0,0005 g, NaSO₄ 2,4 g, MgSO₄ 1,2 g, K₂HPO₄ 0,6 g, FeSO₇H₂O 0,002 g. Se utilizaron frascos de cristal estériles con 250 mL de MMM al que se le agregó un 5 % de la fuente de carbono (petróleo crudo, queroseno, diésel, gasolina y Jet A1) y 10 % del inóculo. Se prepararon tres réplicas por tratamiento y dos controles sin inocular. Los cultivos se incubaron en agitación constante en una incubadora marca Incubator Shaker, modelo 625, a 130 rpm por 90 días a 37° C. Se evaluó la viabilidad de las cepas mediante un conteo de bacterias aerobias cultivables (UFC/mL) a los 0, 21, 45 y 90 días (ISO IS 15188, 2014).

Se emplearon técnicas analíticas para cuantificar la remoción de los diferentes hidrocarburos, la Espectroscopia Infrarrojo (IR) se utilizó para petróleo crudo, diésel, queroseno y el Jet A1. Los espectros se obtuvieron mediante la técnica de transmisión entre ventanas de cloruro de sodio, para el registro de los mismos se empleó un espectrómetro PerkinElmer, modelo Frontier (ASTM E 1252-98, 2013). El registro se realizó en el modo fotométrico absorbancia en el intervalo de frecuencias de 4000 a 400 cm⁻¹, resolución de 4 cm⁻¹ y 16 barridos por punto. Se realizó el procesamiento de los espectros y los datos se interpolaron en el intervalo de frecuencias de 1550 a 1300 cm⁻¹ con el objetivo de estudiar el comportamiento de las vibraciones de doblajes de metilos y metilenos (δ_{-CH} de grupos metilenos y metilos CH_2/CH_3 y δ_{-CH_3} de grupos metilos CH_3 terminales presentes en cadenas alifáticas) localizadas en torno a las frecuencias 1470 y 1377 cm⁻¹, respectivamente. Se realizó corrección de línea base y la integración de las señales se efectuó de valle a valle para lo cual fue necesario establecer los valores iniciales y finales y los valores de las bases de las mismas. Posteriormente se calculó la relación de áreas A_{1470}/A_{1377} para comparar los resultados entre muestras y controles (PerkinElmer Spectrum: 2015).

Se determinaron los componentes PIANO de la gasolina: parafinas, isoparafinas, aromáticos, naftenos y oleofinas, por Cromatografía de Gases empleando un Cromatógrafo Agilent 7890A con detector de Ionización de Llama (FID) (ASTM D6729, 2020). Se determinó el contenido de Hidrocarburos Totales del petróleo al inicio y al finalizar el ensayo para el diésel, queroseno y Jet A1 (APHA, 2017). Se determinaron los diferentes compuestos del petróleo crudo: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) al inicio y final del ensayo (EPA, 2020).

Las tasas de degradación de los hidrocarburos totales en diésel, queroseno y Jet A1 respecto al control y de las fracciones del crudo (SARA) Se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$T_d = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

Td: es tasa de degradación expresada en %;

C_i: concentración inicial del producto;

C_f: concentración final del producto en mg/L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento bacteriano

En la tabla 1 se muestra el resultado del conteo de las bacterias durante el ensayo en presencia de crudo, diésel, queroseno, Jet A1 y gasolina y se mostró un incremento de 10^6 a 10^8 UFC/mL a los 21 días. A los 45 días aumentó el título bacteriano alcanzando niveles de 10^{11} UFC/mL. A los 90 días se observó una disminución en el crecimiento de 3 a 5 órdenes, lo cual puede estar asociado al agotamiento de los hidrocarburos accesibles a las cepas del consorcio. La biodisponibilidad de los hidrocarburos es directamente proporcional al incremento de la población de bacterias hidrocarburoclásticas (Ichor, Okerentugba, Okpokwasili, 2014).

Tabla 1. Recuento de bacterias (UFC/mL), durante el proceso de degradación en los tratamientos. Tiempo (días)

Fuente de carbono	0	21	45	90
Crudo	3,50E+06	4,90E+08	2,50E+10	2,50E+07
Diésel	2,50E+06	4,38E+08	7,00E+10	5,00E+05
Queroseno	1,50E+06	2,27E+08	3,75E+11	2,00E+07
Gasolina	4,00E+06	4,47E+07	4,925E+11	4,00E+06
Jet A1	5,50E+06	4,87E+08	3,75E+11	6,00E+07

Este crecimiento sugiere que las cepas emplearon al petróleo crudo y sus derivados como fuente de carbono para su crecimiento y por tanto que se ha estado produciendo un proceso de biotransformación. Cuando las bacterias crecen en medios con hidrocarburos o en presencia de estos producen sustancias tensoactivas (biosurfactantes) capaces de solubilizar compuestos no polares, como los que presenta el petróleo, además estas moléculas estimulan el crecimiento microbiológico (Rodríguez, 2017).

Degradación de hidrocarburos

Degradación del petróleo crudo

En la Figura 1 se muestra la comparación de las intensidades relativas entre las bandas 1460 cm^{-1} (grupos CH_2/CH_3) y 1377 cm^{-1} (grupos CH_3), obtenidas a partir de los espectros infrarrojos del petróleo crudo tratado y su control. Los valores de relación obtenidos para el crudo tratado y su control fueron de 3,49 y 3,71 cm^{-1} respectivamente, lo que demuestra que existe un proceso de transformación y degradación que ha alterado la composición del petróleo crudo, aumentando los grupos CH_3 con respecto a los grupos CH_2 , esto se debe a los procesos de ruptura de cadenas que provocan los microorganismos para obtener energía y emplear los átomos de carbono en su metabolismo.

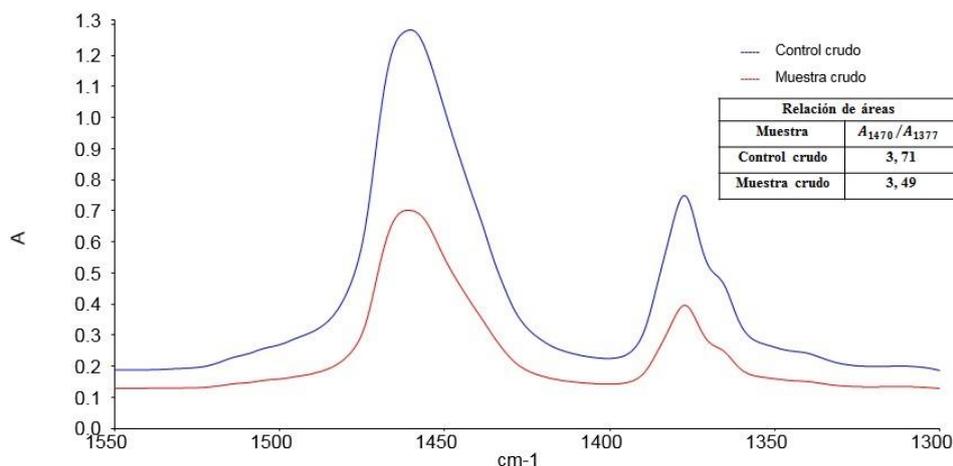


Fig. 1. Espectro IR del crudo tratado y su control a los 90 días.

El análisis cuantitativo de los componentes del petróleo y sustancias relacionadas (SARA) a los 90 días del petróleo crudo tratado y su control, permitió determinar el comportamiento de cada una de las fracciones (tabla 2). Se aprecia una disminución del 89,5 % de las resinas del tratamiento con respecto al control y de 19,4 % de los asfaltenos y la fracción de aromáticos aparentemente ha sido poco degradada esto se debe a que el proceso de transformación de las resinas y asfaltenos resulta en un incremento de aromáticos y saturados. Estos últimos a pesar de que aumentan en el proceso de degradación de resinas, asfaltenos y aromáticos, disminuyeron en un 38,46 %.

Tabla 2. Valores de concentración de los componentes de petróleo crudo (SARA) a los 90 días. **Concentración (mg/L)**

	hidrocarburos saturados	hidrocarburos aromáticos	resinas	asfaltenos
Tratamiento	2131	870	572	141
Control	3463	866	5471	175

De manera general se observa una disminución de los hidrocarburos alifáticos en comparación con los encontrados en el control abiótico, se espera que la biodegradación se produzca en mayor extensión en los hidrocarburos alifáticos, ya que estos suelen ser más susceptibles a la degradación que los aromáticos y estos que resinas y asfaltenos (Germano de Almeida, 2017).

Los n-alcenos son los más propensos a la oxidación; sin embargo, a los 90 días, la biodegradación de saturados es menor que la de las resinas, y estas a su vez mayor que la de aromáticos, los cuales aparentemente no se degradaron. Los hidrocarburos aromáticos no disminuyeron significativamente posiblemente debido a las altas concentraciones de alifáticos, que son preferidos por las bacterias para su metabolismo y son fácilmente degradables, aun cuando se ha encontrado que algunos aromáticos de bajo peso molecular son metabolizados antes que muchos compuestos saturados (Tian, Wang, Peng, Zhou, 2018).

El análisis de estos resultados hace suponer que en los primeros 10-15 días ocurrió la degradación de las cadenas lineales de hasta 30 átomos de carbono. Las diferentes

generaciones bacterianas en los cultivos debieron ajustar su metabolismo luego del agotamiento de sustratos menos complejos (saturados lineales y aromáticos de bajo peso molecular), los mecanismos de regulación del metabolismo probablemente indujeron un cambio enzimático orientado a la degradación de compuestos más complejos; la mineralización de estos compuestos, obviamente, no fue completa, sino que se acumularon como metabolitos intermediarios en forma de cadenas lineales y compuestos aromáticos; por lo que la batería enzimática debió variar en función de las fluctuaciones de las concentraciones de los diferentes compuestos. La capacidad de un microorganismo para asimilar diferentes mezclas de hidrocarburos como fuentes de carbono depende de la especificidad de sus enzimas. Algunas monooxigenasas, dioxigenasas y lipooxigenasas tienen el potencial para convertir el petróleo y sus derivados en enantiómeros que puedan ser asimilados, ampliándose de esta forma el ámbito de sustratos disponibles para el metabolismo (Naga & Scalvenzi, 2017).

Degradación de diésel

La figura 2 muestra el espectro IR del diésel, donde la relación de las intensidades de las bandas 1470 cm^{-1} (grupos CH_2/CH_3) y 1377 cm^{-1} (grupos CH_3) en el control es de $3,74\text{ cm}^{-1}$ y en la muestra tratada de $3,39\text{ cm}^{-1}$. Esta variación se debe a un cambio en la composición del producto debido a una modificación de las cadenas carbonadas, la ruptura de compuestos que presentan grupos CH_2 da lugar a grupos CH_3 que posteriormente se mineralizan totalmente.

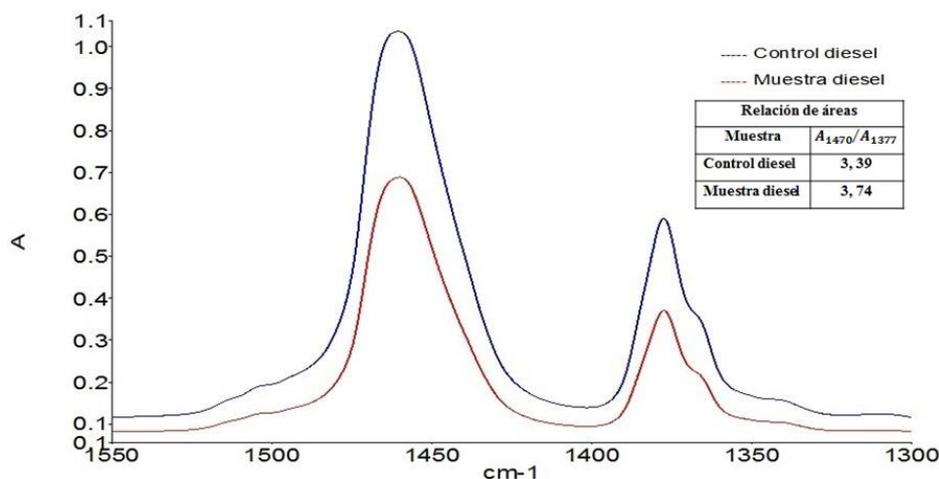


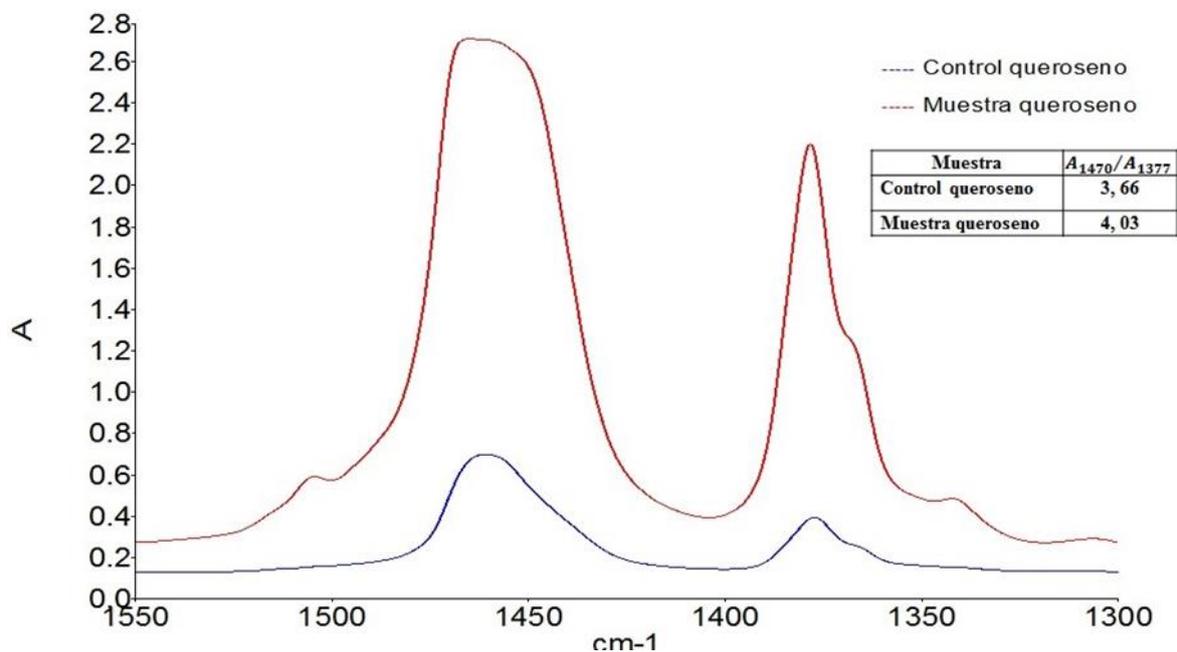
Fig. 2. Espectro IR del diésel tratado y su control a los 90 días.

Los hidrocarburos totales a los 90 días en el diésel tratado (8183 mg/L) y el control (9540 mg/L) experimentan una disminución del 14.22 %. Estos resultados validan lo que se aprecia en el espectro infrarrojo. El diésel está compuesto principalmente por hidrocarburos alifáticos y bajos niveles de aromáticos (Akwukwaegbu, Okerentugba, Okpokwasili, Stanley, 2019).

Degradación del queroseno

La figura 3 muestra el espectro IR para el queroseno tratado y su control. Las relaciones de intensidades de banda de 1470 cm^{-1} (grupo CH_3) y 1377 cm^{-1} resultaron de $4,03\text{ cm}^{-1}$ y $3,66\text{ cm}^{-1}$ en el control en el tratado respectivamente, mostrando una transformación en la composición del queroseno, con un incremento relativo en la

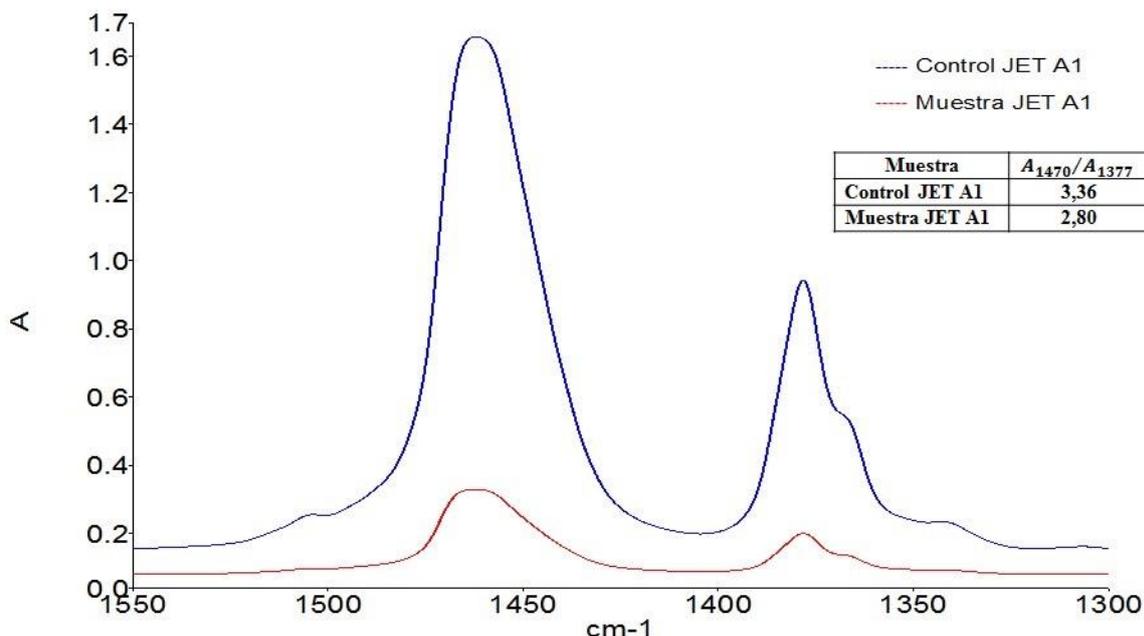
proporción de grupos CH₃ terminales. Este resultado está respaldado por la tasa de degradación de los hidrocarburos totales (41,69 %) a los 90 días. El contenido de hidrocarburos totales del queroseno fue de 166 mg/L en el tratamiento y de 96,8 mg/L en el control.



Degradación del Jet A1

En el espectro IR para el Combustible Jet A1 las bandas seleccionadas para la comparación fueron 1470 cm⁻¹ (grupos CH₃) y 1377 cm⁻¹ (deformaciones de al menos 3 grupos CH₂ consecutivos (figura 4). Las relaciones de áreas fue de 3,36 y 2,80 cm⁻¹ en el control y tratamiento respectivamente, lo que demuestra una variación en la composición del Jet A1, ya que en el tratamiento la proporción de grupos CH₃ con respecto a la deformaciones del al menos 3 grupos CH₂ es mayor que en el control. La tasa de degradación de los hidrocarburos totales del Jet A1 fue de un 59,68%, calculada a partir de la concentración de hidrocarburos totales en la muestra tratada (117mg/L) y en el control (439 mg/L).

Figura 3. Espectro IR del JetA1 tratado y el control a los 90 días.



3.2.5 Degradación de gasolinas

Las muestras analizadas (tratamiento y control) se compararon con patrones de gasolina coincidiendo los tiempos de retención tanto de las muestras como de los patrones. Los resultados están expresados en porcentaje de área, a partir de los cuales se determinaron las tasas de degradación (tabla 3). Numéricamente se observa una desaparición de los compuestos no identificados y las olefinas; los aromáticos disminuyeron en un 27, 5 % y las parafinas en un 66, 37 %; mientras que se observa un incremento en los naftenos y las isoparafinas producto de la transformación de las olefinas y aromáticos.

Tabla 3. Determinación de los componentes PIANO en la gasolina a los 90 días.

Componentes	% Masa	
	control	tratamiento
Parafinas	5, 71	1, 92
Isoparafinas	29, 02	46, 44
Aromáticos	51, 27	37, 17
Naftenos	8, 67	14, 47
Olefinas	4, 07	0
No Identificados	1, 26	-
Total (%)	100	100

La aplicación de un consorcio donde cada miembro revela capacidades para la degradación de diferentes hidrocarburos puede ser una interesante alternativa de bioaumentación para ambientes contaminados con hidrocarburos alifáticos y de alto peso molecular (Brzeszcz, Kapusta, Steliga, Turkiewicz, 2020). Varios autores reportan la efectividad de consorcios integrados por cepas que producen biosurfactantes (*Pseudomonas* y *Bacillus*) en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Pugazhendi et al, 2017), (Kumari, Regar, Manickam, 2018), (Sagar, Avani, Kunal, Seema, Datta M, 2021).

CONCLUSIONES

Las cepas del consorcio utilizaron el petróleo crudo y derivados (diésel, queroseno, Jet A1 y gasolina) como única fuente de carbono y energía, degradando los compuestos del petróleo crudo (saturados, resinas, asfáltenos) y los hidrocarburos del diésel, queroseno y el Jet A1, asimismo el consorcio transformó las olefinas, parafinas y aromáticos presentes en la gasolina. Según estos resultados el consorcio tiene potencialidades para degradar hidrocarburos del petróleo y pudiera ser una alternativa viable para su aplicación el saneamiento de ecosistemas impactados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abdel, S., Hussein, I., Mansour, M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25 (1), pp. 107-123.
- Akwukwaegbu, R., Okerentugba, O., Okpokwasili, C., Stanley, O. (2019). Hydrocarbon Degradation Potential of Heterotrophic Bacteria Isolated from Oil Polluted Sites in Sakpenwa Community in Rivers State. *South Asian Journal of Research in Microbiology* (ISSN: 2582-1989) volumen 4. Pag 1-12.
- APHA-AWWA-WEF, (2017). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 23rd ed. Ed. R.B. Baird, A.D. Eaton & E.W. Rice. ISSN 55-1979. Washington DC, 2017.
- ASTM E 1252-98, (2013). *Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis*.
- ASTM D6729, (2020). *Determination of Individual Components in Spark Ignition Engine Fuels by 100 Metre Capillary High Resolution Gas Chromatography*.
- Barrios, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotecnología Aplicada*, Vol.29, No2, p.80-86 ISSN 1027 - 2852.
- Barrios San Martin, Y. (2011). *Obtención de un consorcio microbiano para la remoción de hidrocarburos del petróleo. (Tesis en Opción al Título académico de Master en Microbiología)*. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Julio
- Barrios, Y., Acosta, S., Hayes, R., González, F. Rev. (2014). Optimización del medio de cultivo QBP para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF. *Colombo. Biotecnol*, Vol. XVI No. 1. Pp.171-176.
- Benchouk, A., Chibani, A. (2017). Petroleum-hydrocarbons biodegradation by *Pseudomonas* strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *J Fundam Appl Sci.*, 9(2), 713-726
- Brzeszcz, J., Kapusta, P., Steliga, T., Turkiewicz, A. (2020). Hydrocarbon Removal by Two Dierently Developed Microbial Inoculants and Comparing Their Actions with Biostimulation Treatment. *Molecules* 25, 661
- Colca, JL. (2017). *Eficiencia en el cultivo de microorganismos eficaces para reducir hidrocarburos totales de petróleo contenidos en fuentes de grifo, Huarochirí (Tesis para obtener el título profesional de: Ingeniero Ambiental)*. Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú
- Germano de Almeida, D., Conceicao da Silva, MG., Barbosa, R., Pereira, D., Oliveira da Silva, R., Manoella de Souza Lima, G. (2017). Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the

- petrochemical Suape Port, Brazil. International Bio deterioration & Biodegradation.
- ISO 7218: 2020. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el análisis microbiológico.
- Ichor, T., Okerentugba, P., Okpokwasili, G. (2014). Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon by Aerobic Heterotrophic Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Brackish Waters of Bodo Creek. *J Bioremed Biodeg.*, 5 (5): 1-6.
- Omrani, R., Spini, G., Puglisi, E., SaiWang, Y., Dong, B., Fan, Y., Hu, Y., Zhai, X., Deng, C., Xu, Y., Shen, D., Dai, X. (2019). Nitrogen transformation during pyrolysis of oilfield sludge with high polymer content. *Chemosphere*, pp, 383–389.
- Omrani, R., Spini, G., Puglisi, E. Saidane D. (2018). Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. *Biodegradation*, Apr 29 (2):187-209.
- US EPA, U. (2020). Methods 3540C. Ultrasonic Extraction. EPA, Washington, Virginia, USA: Environmental Protection Agency of United States, pp. 1-17.
- Pugazhendhi, A., Wazin, H., Qari, H., Basahi J., Godon, J., Dhavamani, J. (2017). Biodegradation of low and high molecular weight hydrocarbons in petroleum refinery wastewater by a thermophilic bacterial consortium. *Environ Technol*, 38 (19): 2381-2391.
- PerkinElmer Spectrum, version 10.4.4.449, copyright 2015.
- Raju, M., Scalvenzi, L. (2017). Petroleum Degradation: Promising Biotechnological Tools for Bioremediation, Recent Insights in Petroleum Science and Engineering, Mansoor Zoveidavianpoor, Intech Open, DOI: 10.5772/intechopen.70109.
- Sagar, S., Avani, B., Kunal, J., Seema, A., Datta, M. (2021). Characterizing the bacterial consortium ASDF capable of catabolic degradation of fluoranthene and other mono- and poly-aromatic hydrocarbons. *Biotech*, 10 (11):491.
- Song, B., Tang, J., Zhen, M., Liu, X. (2019). Effect of rhamnolipids on enhanced anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons in nitrate and sulfate sediments. *Sci. Total Environ*, 678, 438–447.
- Tirado, D., Acevedo, O., Rodríguez, B., Gayosso, M. (2017). Phylogeny and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation potential of bacteria isolated from crude oil-contaminated site. *J Environ Sci Health Tox Hazard Subst Environ Eng*, Jul 29, 52(9):897-904.
- Trejos Delgado, M. (2020). Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo. (Tesis Magister en Medio Ambiente y Desarrollo). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Varjani, S., Pandey, A., Upasani, V. (2020). Oilfield waste treatment using novel hydrocarbon utilizing bacterial consortium- A microcosm approach. *Science of the Total Environment*, 745, 141043.
- Wu, M., Wu, J., Zhang, X., Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on Hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum contaminated loessal soil. *Chemosphere*, 237, 124456.