

ACIPET

## Biorremediación aplicada al tratamiento terciario de aguas producidas en la industria del petróleo

S Rosales Universidad Nacional de Colombia, K Zapata Universidad Nacional de Colombia, BA Rojano Universidad Nacional de Colombia, CA Franco Universidad Nacional de Colombia, FB Cortes Universidad Nacional de Colombia.

Categoría: Marque con una “X”

- Artículo Técnico
- Tesis Pregrado
- Tesis Posgrado

Derechos de Autor 2022, ACIPET

Este artículo técnico fue preparado para presentación en el XIX Congreso Regional Colombiano de Petróleo, Gas y Energía organizado por ACIPET en Cartagena, Colombia.  
Este artículo fue seleccionado para presentación por el comité técnico de ACIPET, basado en información contenida en un resumen enviado por el autor(es).

### Resumen

La biorremediación es un proceso biotecnológico que usa microorganismos para la recuperación de ambientes contaminados, gracias a la capacidad estos de oxidar metabólicamente moléculas recalcitrantes. Generalmente los microorganismos biorremediadores de hidrocarburos son endógenos de aguas de producción y crudo, por lo que su aislamiento e identificación se plantea como un método prometedor para la obtención de microorganismo hidrocarburo-degradantes que puedan usarse en procesos terciarios de tratamiento de aguas en la industria del petróleo y gas. La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar cepas hidrocarburo-degradantes a partir de agua de formación y crudo, así como evaluar su capacidad para eliminar crudo miscible de aguas producidas. La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante descripción micro y macro, tinción de Gram y secuenciación molecular, las cinéticas de crecimiento y consumo se ajustaron a modelos teóricos para entender el fenómeno y fueron desarrolladas en medios salinos suplementados con Crudo o Benceno, los cambios en la concentración de biomasa e hidrocarburos se calcularon mediante pruebas espectrofotométricas. Se aislaron e identificaron 5 microorganismos de ambientes relacionados con hidrocarburos, entre ellos *Stenotrofomona maltofila*, *pseudomona aeruginosa* *Pseudomona oryzihabitans*, *Pseudomona ptuzeri* y *Micrococcus luteus*. Siendo *P. stutzeri* y *M. luteus* las más efectivas en el consumo de crudo liviano a partir de agua de formación simulada como única fuente de carbono, *P. stutzeri* y *M. luteus* fueron capaces de consumir 50 y 80 % crudo respectivamente en un período inferior a 22 horas con igual afinidad por el crudo de acuerdo a los modelos teóricos de crecimiento. En relación al consumo de benceno ambas cepas exhibieron inhibición del crecimiento a concentraciones superiores a 90 mg/L, sin embargo *P. stutzeri* degradó 68.77 y 53.37 de benceno de 90 y 600 mg/L mientras que *M. luteus* consumió 47.05 y 5.80%, respectivamente. *P. stutzeri* y presento una producción de hasta 14,25 g/L de ramnolípidos. Al menos de nuestro conocimiento, este es el primer trabajo relacionado con los parámetros cinéticos de *M. luteus* durante la biodegradación de hidrocarburos.

### Introducción

El petróleo junto con el gas natural y el carbón mineral representan las principales fuentes de energía a nivel mundial <sup>1</sup>, por su parte el petróleo crudo y sus derivados son en general una mezcla compleja de compuestos, principalmente de hidrocarburos, con proporciones variables de carbono (83-87%) e hidrogeno (10-14%), de acuerdo a su composición estas moléculas son esencialmente hidrofóbicas, sin embargo poseen una fracción soluble en agua conocida como FSA o WAF (por sus siglas en inglés *Water Associated Fraction*) <sup>2</sup>. La FSA está constituida por moléculas alifáticas, naftaleno y aromáticos, como benceno, tolueno, etilbenceno, xileno y fenoles <sup>3</sup>, estos componentes representan algunos de los componentes más tóxicos del petróleo debido a su biodisponibilidad incrementada <sup>4</sup>. La presencia de este tipo de contaminantes es común tanto en derrames como en aguas de producción que son consideradas como el principal subproducto de la industria del petróleo <sup>5</sup> en cualquiera de los escenarios la persistencia de estos contaminantes esta influenciada por factores como la naturaleza del contaminante, su concentración y su capacidad para interactuar con las condiciones químicas, geológicas, físicas y biológicas del sitio contaminado<sup>6</sup>. Dada la peligrosidad de este tipo de contaminantes ciertas entidades nacionales e internacionales se encargan de la evaluación y monitoreo de la eficiencia de los sistemas de inyección y vertimiento, normas como la NACE ( National Association of Corrosion Engineers) y la resolución 0631 del 2015 expedida por el Ministerio de Ambiente que regula la disposición de aguas domésticas y residuales, exigen a los productores tener protocolos de disposición, tratamiento y reutilización de estas aguas, ya sea que se utilicen para procesos de reinyección o para su vertimiento final <sup>7</sup>.

Para lograr alcanzar los valores reglamentarios, la industria de hidrocarburos ha implementado varios mecanismos físicos y químicos encaminados a la remoción de hidrocarburos de las aguas como son la flotación<sup>8</sup>, ultrafiltración<sup>9</sup>, ósmosis inversa<sup>10</sup>, coagulación química<sup>11</sup>, electrocoagulación<sup>12</sup>, electro-flotación<sup>13</sup> y adsorción<sup>14</sup>, de los cuales, los métodos adsorptivos son los que se han utilizado con mayor frecuencia dada su capacidad de remoción cercana al 100% del crudo que se encuentra fuertemente emulsionado. Sin embargo, la adsorción está basada en una transferencia del contaminante entre fases, sólida líquida y gas, y no resuelve el problema posterior de eliminación final del contaminante<sup>15</sup>. En este escenario el uso de procedimientos biológicos para limpiar el agua contaminada (biorremediación) surge como una estrategia para la eliminación definitiva de los compuestos recalcitrantes debido a la capacidad microbiana de biotransformar el crudo en compuestos más oxidados y menos tóxicos<sup>16</sup>, esta biotecnología emergente ha recibido especial atención, por ser de bajo costo, presentar altas tasas de reúso, eficiencias de remoción superiores al 80% y por ser ambientalmente amigable comparada con los procedimientos químicos y físicos convencionales. Es importante mencionar que para llevar a cabo este tipo de tecnología una de las principales estrategias es realizar un proceso de bioaumentación, el cual consiste en la adición de microorganismos con características catabólicas específicas que permiten la remoción de los contaminantes presentes en el medio<sup>17</sup>.

A las bacterias que son capaces de utilizar petróleo para su crecimiento y mantenimiento se les conoce como *Bacterias degradadoras de hidrocarburos*, son microorganismos con la capacidad de convertir sustratos habitualmente no degradables en metabolitos fácilmente asimilables o susceptibles de ser catalizados enzimáticamente<sup>18</sup>. La velocidad de esta biodegradación depende de la naturaleza del contaminante, por ejemplo, los hidrocarburos de menor peso molecular son más fáciles de metabolizar y por tanto se esperan tasas de recuperación más altas, por su parte los hidrocarburos de cadenas largas o aromáticos policíclicos tienen una menor tasa de biodegradación debido a su mayor hidrofobicidad<sup>19</sup>. Dada la variada naturaleza química de los hidrocarburos, el éxito de un proceso de biorremediación está condicionado por la selección de un grupo heterogéneo de microorganismos con la capacidad de degradar materiales contaminantes de diferente naturaleza a diferentes temperaturas, pH, salinidad, y concentración de nutrientes<sup>6</sup>. En este sentido, dado que uno de los factores biológicos que representan un recurso importante para las estrategias de biorremediación es la diversidad de especies microbianas y sus capacidades metabólicas, en los últimos años la ecología microbiana ha realizado esfuerzos encaminados a la determinación de una amplia gama de microorganismos con la capacidad de adaptarse y explorar hábitat contaminados, algunos autores indican que los ambientes donde habitan los microorganismos con la capacidad de tolerar este tipo de xenobióticos son precisamente las zonas contaminadas con los mismos<sup>20,21</sup>. Por tanto, el primer paso para la aplicación de esta tecnología emergente es la identificación, aislamiento y caracterización de una amplia gama de microorganismos con la capacidad de biodegradar hidrocarburos para un mejor entendimiento de las condiciones biológicas que favorecen la remediación lo cual abre la posibilidad de la aplicación a gran escala de la biorremediación. Por lo anterior este trabajo tuvo como objetivo el aislamiento, e identificación de bacterias hidrocarburo degradantes de ambientes contaminados con hidrocarburos, evaluar el crecimiento de las cepas aisladas y la determinación de las cinéticas de consumo de crudo e hidrocarburos aromáticos en aguas de producción simulada.

## Materiales

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron aguas de producción y crudo que fueron colectados de campos nacionales ubicados en el departamento del Meta (Colombia), posición global 3°59'20"N 73°45'53"O; las muestras se almacenaron en frascos estériles a 4°C para su posterior análisis. Se utilizó Agar Extracto de Levadura Glucosa Triptona (ALGT) y caldo Bushnell Haas (BH, Sigma Aldrich, EE. UU.) para el cultivo bacteriano. Se usó Crudo colombiano (33 ° API), agua desionizada y NaCl (99%, Merck KGaA, Alemania) para preparar las emulsiones aceite en salmuera, mientras reactivos como benceno, tolueno y fenol (≥ 98%, CARLO ERBA Reactive-SDS, Barcelona, España) fueron utilizados en los ensayos de eliminación de hidrocarburos aromáticos. Finalmente, se empleó acetonitrilo (99,8% fracción de masa en H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, EE. UU.) para la cuantificación de biosurfactante ramnolípido.

## Métodos

**Caracterización Agua de producción.** Las siguientes pruebas se llevaron a cabo bajo los Métodos Estándar para el análisis de agua potable y residual propuesto por la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA, 1992)<sup>22</sup>: Método de sólidos fijos 2540, Método de dureza total del agua 2340, Método potenciométrico de pH, Método de oxígeno disuelto (OD) 4500 OC, Demanda Química de Oxígeno (DQO) Método 5220 D, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5) Método 5210 B, Método de Grasa y Aceite 5520 D, Método de Fosfatos 4500-PD, Método de Nitratos 4500-NO<sub>3</sub>-D y Sulfatos Método 4500- SO42.

**Caracterización Crudo.** Las siguientes pruebas se llevaron a cabo bajo los métodos ASTM: API grados ASTM D287, gravedad específica ASTM 1992, destilación de punto de ebullición verdadero (TBP) y analizador de destilación simulada de perfil de hidrocarburos (Agilent Technologies®) ASTM D2892 y métodos ASTM 2003.

**Análisis GC-MS para crudo.** Para determinar el perfil de hidrocarburos del crudo se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N GC, acoplado a un detector selectivo 5973N MS y equipado con un inyector split/splitless (Agilent Technologies, USA). La temperatura del inyector fue de  $300^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se inyectaron automáticamente en el modo splitless. Se utilizó una columna HP-5 MS (5,0% fenilmetilsiloxano) de 30 m, 0,25 mm, espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$  y una temperatura máxima de  $325^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó la base de datos NIST 98 (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, EE. UU.) para identificar el tipo de hidrocarburos. Cada hidrocarburo se expresa como porcentaje relativo de los hidrocarburos totales.

**Aislamiento bacteriano.** El aislamiento bacteriano se llevó a cabo mediante el método sugerido por Angelim et al.<sup>23</sup>. Exactamente, se inocularon 90 ml de medio Bushnell-Haas (BH®) suplementado con NaCl al 2% (p/v) en un matraz de 250 ml con 10 g de agua producida o crudo. Los cultivos se mantuvieron durante 15 días a  $35^{\circ}\text{C}$  en un agitador orbital (150 rpm). Posteriormente, los cultivos se diluyeron en serie en NaCl al 0,9% (p/v) y se cultivaron en placas de Agar Extracto de Levadura Triptona/Glucosa (AETG) que contenían NaCl al 2% (p/v). Las placas se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 72 h. Para la obtención cultivos bacterianos puros, se separaron las colonias a nuevas placas de Agar, de acuerdo a diferencias morfológicas.

**Pruebas bioquímicas.** Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección, puesto que permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos<sup>24</sup>. Las series bioquímicas consisten en una secuencia de medios de reacción que dan una respuesta química observable de acuerdo a relacionada con la actividad metabólica del microorganismo evaluado, los resultados de esta prueba permiten hacer una aproximación a la identificación bacteriana, para esta investigación se utilizó un Kit API® tradicional. Los resultados obtenidos se contrastaron en la base de datos integral, con soporte de APIWEB™

**Identificación bacteriana.** La identificación bacteriana se inició con la tinción de Gram y la descripción fenotípica. Posteriormente para concluir sobre la identidad de los microorganismos aislados se realizaron las pruebas de secuenciación de ADN bacteriano, para ello se utilizó el método sugerido por Bao et al.<sup>24</sup> como se describe a continuación: el ADN<sub>r</sub> se extrajo usando el kit TIANamp; posteriormente para la amplificación del gen 16S rDNA, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando Primer Forward 27F (50- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-30) y Primer Reverse 1492R (50-GGCTACCTTGTTACGACTT-30). Cada reacción de 50  $\mu\text{L}$  contenía lo siguiente: 2  $\mu\text{L}$  de plantilla de ADN, 1  $\mu\text{L}$  de 27F, 1  $\mu\text{L}$  de 1492R (concentración final 0,4  $\mu\text{M}$ / L), 4  $\mu\text{L}$  de dNTP, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  de tampón 10xPCR y 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq. polimerasa. Las mezclas de PCR se precalentaron a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos antes de ejecutar los siguientes ciclos:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $55^{\circ}\text{C}$ , 1 min;  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. Las reacciones se llevaron a cabo durante 30 ciclos en un ciclo térmico de ADN. Al final del ciclo final, se programó un paso de elongación de la cadena a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Después de la purificación de los productos de PCR, la secuencia de ADN del clon positivo se sometió a una búsqueda de similitud con BLAST en el sitio web de NCBI. Veinte secuencias relevantes del gen con nombres válidamente publicados se seleccionaron como referencias y para efectos comparativos del Gen-Bank. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el software MEGA 4.0.

**Emulsiones Crudo-Salmuera (O/W).** Se elaboró una salmuera mezclando NaCl, BH® y agua desionizada para obtener una concentración de 2% y 0,1% p/v, respectivamente. Las emulsiones O/W se prepararon mezclando Crudo 33°API (800, 4100, 5700 y 8200 mg/L) y la salmuera anterior a 10.000 rpm durante 20 minutos. La estabilidad de las emulsiones se controló durante 120 horas verificando ningún cambio observable en el tamaño de las gotas de aceite a través de microscopía óptica ni cambios en el espectro UV- vis espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific, Estados Unidos)<sup>25</sup>.

**Biodegradación de benceno:** para evaluar la capacidad de las cepas de crecer en medios con benceno y eliminarlo, se preparó una solución con NaCl al 2% p/v a diferentes concentraciones de benceno (0, 90, 150, 300 y 600 mg L<sup>-1</sup>); posteriormente, los aislados se inocularon individualmente en 100 mL de esta salmuera (densidad óptica 0,2) y se incubaron entre 70 y 170 horas en matraz de agitación (150 rpm -  $35^{\circ}\text{C}$ ). A intervalos regulares, se analizó la concentración de células usando espectrofotometría visible.

**Cuantificación de benceno (B):** El hidrocarburo se cuantificó mediante HPLC como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ; 250  $\times$  4 mm). Las longitudes de onda de absorción utilizadas fueron 256 nm. El volumen de inyección fue de 15  $\mu\text{L}$ , la temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$  y se utilizó acetonitrilo/agua 1:1 como fase móvil con un caudal de 1,0 ml/min. El tiempo de retención del benceno fue de 6,88 min<sup>26</sup>.

**Cinéticas de crecimiento y consumo de Crudo o Benceno.** para evaluar la cinética de crecimiento y consumo de crudo o benceno de las cepas aisladas se llevó a cabo el protocolo descrito por Angelim et al.<sup>23</sup> con algunas modificaciones: Los aislados se inocularon individualmente en 15 ml de emulsión (densidad óptica inicial 0,2). Todos los experimentos se desarrollaron en un matraz de agitación (150 rpm/ $35^{\circ}\text{C}$ /90 horas). El crecimiento celular se analizó mediante densidad óptica (DO) a 600 nm a intervalos de

tiempo regulares. El contenido de crudo se determinó antes y después del crecimiento utilizando la absorción UV (270 nm) <sup>27</sup>, por su parte el contenido de crudo antes y después del crecimiento de cuantifico mediante HPLC, como se describió anteriormente.

**Cuantificación de ramnolípidos (R):** se usaron soluciones estándar de ramnolípidos para la curva de calibración. Estos se cuantificaron usando HPLC (Prominence, Shimadzu). Se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm; 250×4 mm) como fase estacionaria y agua/acetonitrilo 1:1 como fase móvil <sup>28</sup>. La longitud de onda de absorción utilizada fue de 254 nm, el volumen de inyección de 70 µL, 27°C de temperatura y caudal de 0,8 ml min<sup>-1</sup> y el tiempo de retención de 2,5 min.

**Modelos de Crecimiento-Ajuste experimental.** Para cuantificar la capacidad de las cepas para crecer y consumir hidrocarburos de los medios simulados, se calcularon los parámetros como la como velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), constante de saturación ( $K_s$ ), constante de inhibición ( $K_i$ ), eficiencia de consumo (%E), y las velocidades medias de degradación ( $r_{\text{ave}}$ ). Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) se calcularon usando la ecuación 1 (Haldane)

$$\ln x = \mu t + \ln x_0 \dots\dots\dots (1)$$

donde  $X_0$  es la concentración celular inicial,  $X$  es la concentración celular en cada momento  $t$  (mg/L o unidades de absorbancia);  $\mu$  es la pendiente de la curva de crecimiento. Para establecer la relación entre la concentración de sustrato ( $S$ ) y las velocidades de crecimiento bacteriano ( $\mu$ ) se utilizaron los modelos de Monod (Ecuación 2) o la ecuación 3 (Haldane), que además permite calcular parámetros de crecimiento como  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$  y  $K_i$  de acuerdo con cada caso.

$$\mu = (\mu_{\max} S) / (K_s + S) \dots\dots\dots (2)$$

$$\mu = (\mu_{\max} S) / (K_s + S + K_i S^2) \dots\dots\dots (3)$$

donde  $\mu$  (1/h) es la tasa de crecimiento y  $S$  es la concentración de crudo (mg/L). Los parámetros del modelo se determinaron ajustando los datos experimentales al modelo teórico utilizando el software Data Fit 8.2 (Oackdale Engineering, 2006). La eficiencia de consumo (% E) y la velocidad de degradación ( $r_{\text{ave}}$ ) se estimaron utilizando la ecuación 4 y ecuación 5 respectivamente:

$$\%E = (C_i - C_f) * 100 / C_i \dots\dots\dots (4)$$

$$r_{\text{ave}} = (C_i - C_f) / (C_i \Delta t) \dots\dots\dots (5)$$

donde  $C_i$  = concentración inicial de hidrocarburo;  $C_f$  = concentración final de hidrocarburo o;  $\Delta t$  = duración del tiempo de degradación.

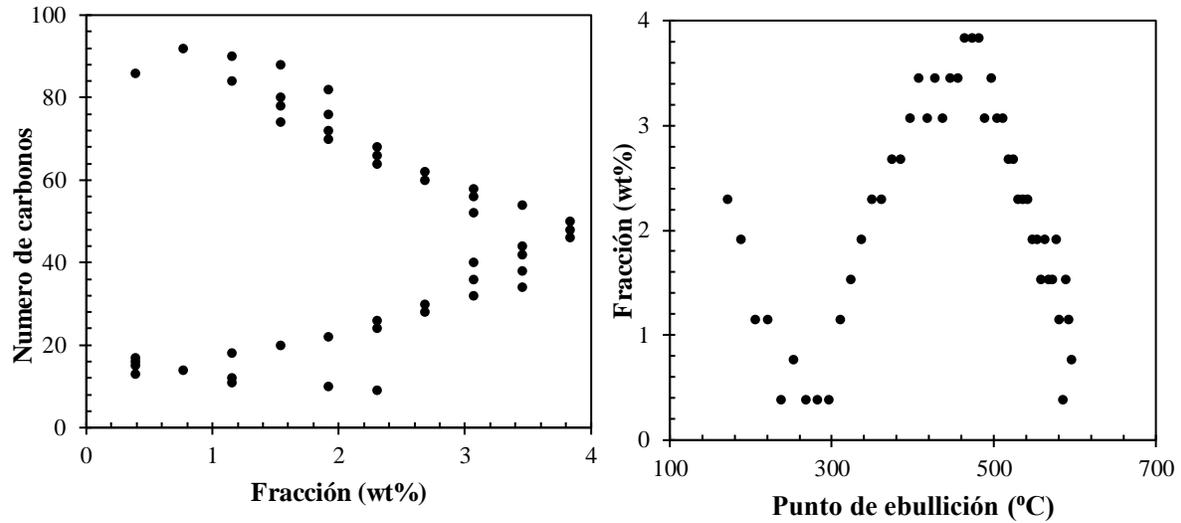
**Ensayo de biorremediación de hidrocarburos aromáticos individuales.** Las pruebas de degradabilidad de crudo e hidrocarburos aromáticos se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por Juang y Tsai <sup>29</sup> con algunas modificaciones. Los biomateriales se inocularon en 15 ml de emulsiones O/W. Después, los matraces se llevaron a 150 rpm y 35 °C durante 24 horas. Se usaron bacterias libres (10<sup>6</sup> u.f.c) como control. El contenido de crudo e hidrocarburos aromáticos se monitoreo mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrofotómetro de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), respectivamente, según el método informado por Galazka <sup>26</sup>.

**Análisis estadístico.** Las caracterizaciones de las muestras, el aislamiento bacteriano y los ensayos de identificación se realizaron una sola vez. Los ensayos de crecimiento y biodegradación se realizaron por triplicado (n=3); los datos reportados corresponden a las medias aritméticas. En ningún caso las desviaciones ( $\pm$  DE) superaron el 10% de las medias (coeficiente de variación). Para determinar las diferencias estadísticas entre las mediciones se realizó un análisis de varianza unidireccional utilizando Statgraphics Centurion V (Statgraphics, EE. UU.). Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan (p<0,05). Se utilizó el software DATA FIT ® para ajustar los datos experimentales al modelo teórico, el coeficiente de correlación (r) y el error cuadrático medio (RMSE) se utilizaron como criterios de ajuste de los datos.

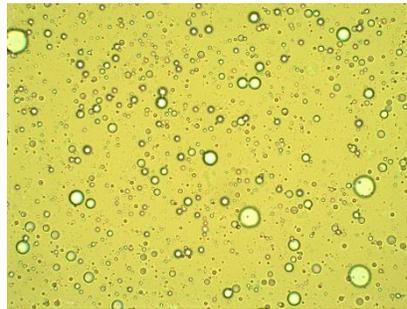
## Resultados y Discusión

**Caracterizaciones agua/crudo.** Las características fisicoquímicas de los ambientes utilizados, agua y crudo, permitieron concluir que el agua producida es un medio con un alto contenido de sólidos fijos (59660 mg/L), hipóxico (OD 0-5 mg/L O<sub>2</sub>), duro (5700 mg/L CaCO<sub>3</sub>) y neutro (pH 6,86); con aceite disperso (2560 mg/L) como únicas sustancias oxidables (COD 2230 mg/L O<sub>2</sub>) y moléculas distintas del oxígeno (DBO<sub>5</sub> 177 mg/L O<sub>2</sub>) como agentes oxidantes (357 mg/L NO<sup>3-</sup> y 4775 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Por su parte, el

crudo arrojó valores de gravedad específica y grados API iguales a 0.8550 y 33.99 25 °C, respectivamente, mostrando ser liviano, menos denso que el agua. Los resultados de la destilación simulada, mostraron que la muestra fue 100% destilable a 595°C y 1 atm. La mayor fracción de hidrocarburos en el crudo, presentan estructuras con un número de carbonos (#C) entre 20 y 80, con temperaturas de ebullición entre 300 y 595°C (Figura 1), por otro lado, las micrográficas revelaron la presencia de gotas de agua emulsionadas en el crudo donde es posible el desarrollo de microorganismos (Figura 2).

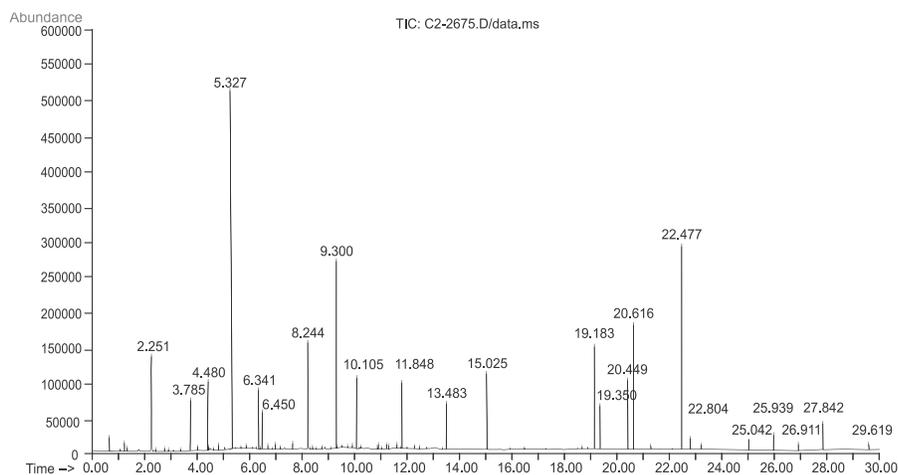


**Figura 1.** Perfil de hidrocarburos del Crudo Colombiano 33° API



**Figura 2.** Micrográficas Crudo Colombiano 33° API

El crudo fue analizado por GC-Masas (Figura 3) los resultados muestran que el benceno fue le compuesto mayoritario presente en la muestra de crudo (32% de abundancia relativa), cabe mencionar que la biodegradación de este hidrocarburo se evaluó de manera individual.



**Figura 3.** Perfil de hidrocarburos presentes en el crudo

**Aislamiento bacteriano** En los primeros ensayos de aislamiento se evidenció el crecimiento de un grupo heterogéneo de microorganismos endógenos de las aguas de producción y del crudo estudiados (Figura 4), en el agua de producción se lograron identificar 3 cepas con diferente morfología, una colonia blanca con borde liso y de color blanco, una segunda cepa de color beige y borde rugoso y una tercera colonia de color rosada y borde liso.

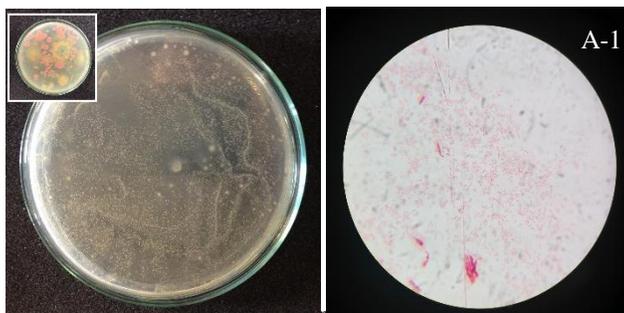


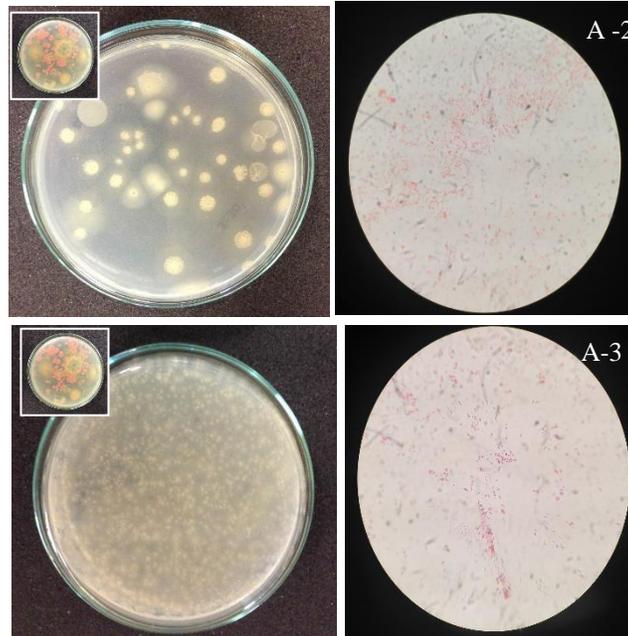
**Figura 4.** Cepas bacterianas aisladas de ambientes relacionados con hidrocarburos (A: Aguas de producción, B: Crudo)

A partir de la muestra de crudo fue posible aislar 2 cepas bacterianas, una de color amarillo y borde liso y otra colonia de color blanco y borde liso, a pesar de que con estos resultados iniciales no es posible conocer con certeza que microorganismos fueron aislados para lo cual se harán una serie de evaluaciones posteriores, este es un resultado satisfactorio en cuanto a la heterogeneidad y número de microorganismos aislados de ambientes relacionados con hidrocarburos.

Cada una de las cepas encontradas en el agua de producción y en crudo fue aislada de manera independiente para su posterior identificación

**Cepas aisladas de agua de producción** En la figura 5 se muestra el aislamiento y la tinción gran de cada una de las cepas aisladas de el agua de producción

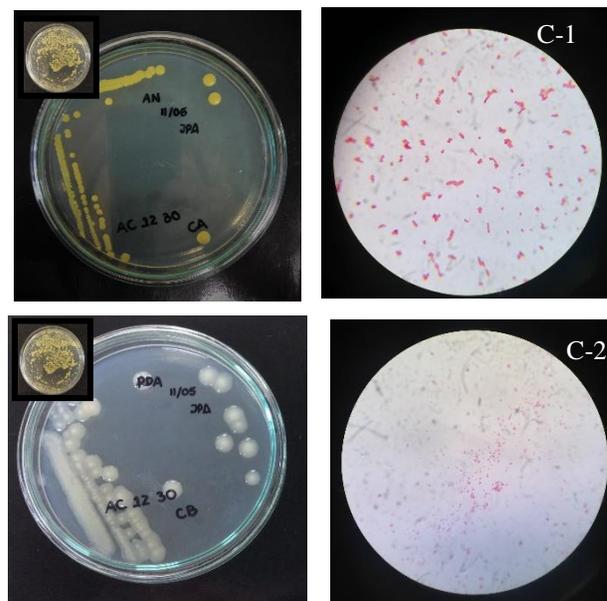




**Figura 5.** Colonias bacterianas aisladas de aguas de producción observación macroscópica de las colonias y Tinción de Gram

Una vez aisladas de manera independiente cada una de las cepas bacterianas que se encontraron en el agua se logró hacer una primera caracterización más especializada de cada una de ellas, se encontró una colonia de color blanco, borde liso, y en cuanto a la observación microscópica se identificó una forma bacilar gran negativo para A-1, la segunda colonia A-2 presento una morfología de color beige-amarillo de borde rugoso, la forma de estas células fue bacilar y con un resultado negativo en la tinción de gram, finalmente A-3 cuando fue aislada de las demás células bacterianas presento colonias de color rosado y bode liso, con células también de forma bacilar y Gam negativa.

**Cepas aisladas de agua de crudo** En la figura 6 se muestra el aislamiento y la tinción gran de cada una de las cepas aisladas de el agua de crudo 33° API



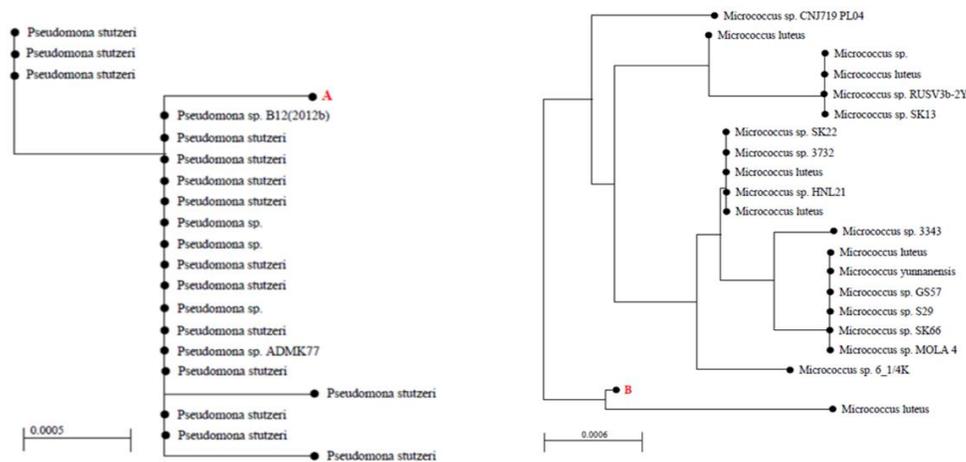
**Figura 6.** Colonias bacterianas aisladas de Crudo 33°- Observación macroscópica de las colonias y Tinción de gram

Por su parte las cepas aisladas de crudo cuando se tuvieron creciendo de manera independiente presentaron colonias de bode liso y color amarillo y células en forma de cocos Gram negativos C-1, por su parte una segunda cepa logro aislarse C-2, presento una morfología en sus colonias de bode liso y coloración blanca, células bacilares también Gram negativas. El siguiente paso para la identificación de los microorganismos aislados se continuó con la elaboración de las pruebas bioquímicas, los resultados relacionados con las pruebas bioquímicas para cada uno de los microorganismos evaluados se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas bioquímicas

Nombre de la cepa aislada	Resultado de la serie bioquímica	Análisis en APIWEB de los resultados	Perfil/Microorganismo	% de Certeza
A-1			2210040/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.1
A-2			0200040/ <i>Pseudo monas oryzihabitans</i>	97.2
A-3			<i>Acinetobacter baumannii</i>	24,3
C-1			<i>Stenotrofomona maltofila</i>	80.5
C-2			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94.0

Los resultados de las pruebas bioquímicas permitieron una mejor la identificación de cada una de las cepas aisladas, dentro de las posibles cepas aisladas se tienen *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrofomona maltofila*. Cabe mencionar que los porcentajes de certeza en cuanto a la identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas no son del 100%, se acepta como resultado definitivo para la identificación microbiana las pruebas relacionadas con el análisis de secuencias de ácidos nucleído. Para una identificación molecular se seleccionaron dos de las 5 cepas aisladas basándose en los mejores desempeños cuanto al consumo de hidrocarburos (Datos no mostrados) y mayor facilidad en cuanto al mantenimiento de la viabilidad de las cepas en condiciones de laboratorio. Para estos fines se seleccionaron las una cepa proveniente de agua producción (A-2) y una del Crudo ligero colombiano 33°API (C-1). Para la identificación final, se construyó un árbol filogenético usando las secuencias de ADN de las cepas aisladas y secuencias de ADN teóricas con la mayor similitud (n = 20) (Figura 5), las descripciones morfológicas y la secuenciación del ADN bacteriano, permitieron la identificación de A-2 y C-1 como *Pseudomonas stutzeri* y *Micrococcus luteus*, respectivamente.

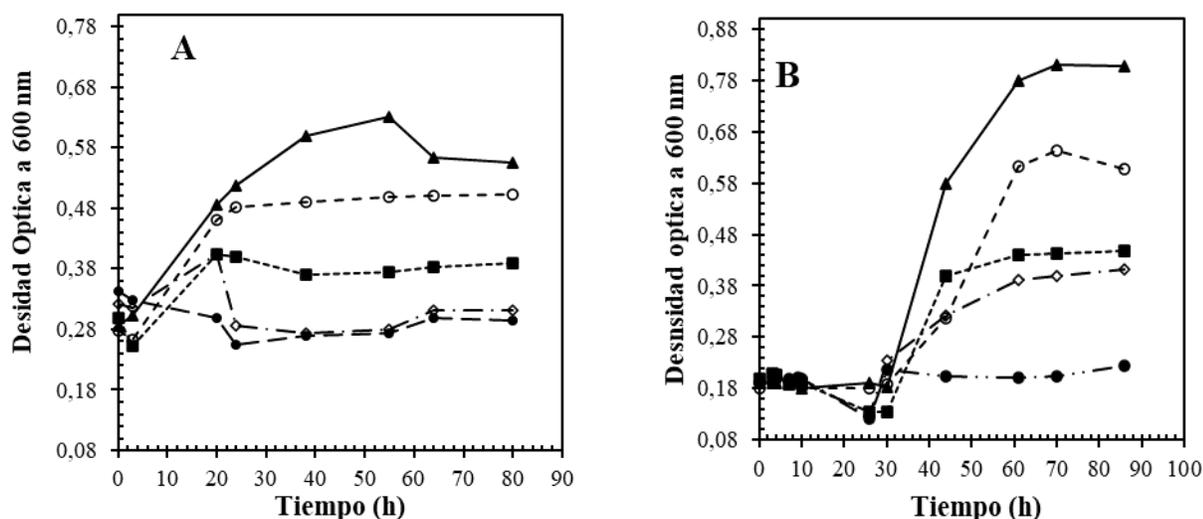


**Figura 5.** Árbol filogenético usando las secuencias de ADN de las cepas aisladas, A: *Pseudomonas stutzeri* y B: *Micrococcus luteus*.

Una de las principales funciones del género *Pseudomonas* es la degradación de compuestos xenobióticos, derivados del petróleo. Un estudio aisló e identificó 297 microorganismos hidrocarburo-degradantes de un acuífero contaminado<sup>30</sup>. De las cepas aisladas un 86.9% pertenecían al género *Pseudomonas* spp.; siendo *P. stutzeri* la tercera especie más frecuentemente aislada en este estudio (7.4% de todas las cepas, 10.2% de las cepas de *Pseudomonas*). La eficacia de *Pseudomonas* reside en el hecho de que sintetiza biosurfactantes (ramnolípidos) que permite el contacto microorganismo-hidrocarburo para la catálisis. Todas las especies de *Pseudomonas* usan oxígeno molecular como oxidante terminal (mecanismo aeróbico); sin embargo, *P. stutzeri* es un microorganismo anaeróbico facultativo que puede usar nitrato como aceptor terminal de electrones; los resultados encontrados en este estudio respaldan esta hipótesis. La caracterización del agua de producción, sugirió que la respiración anaeróbica (baja DBO<sub>5</sub> y OD 0-5 mg/L O<sub>2</sub>) usando nitratos (357 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y sulfatos (4775 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) como aceptor de electrones terminal, con la consiguiente oxidación de hidrocarburos, es la vía metabólica primaria de los microorganismos presentes.

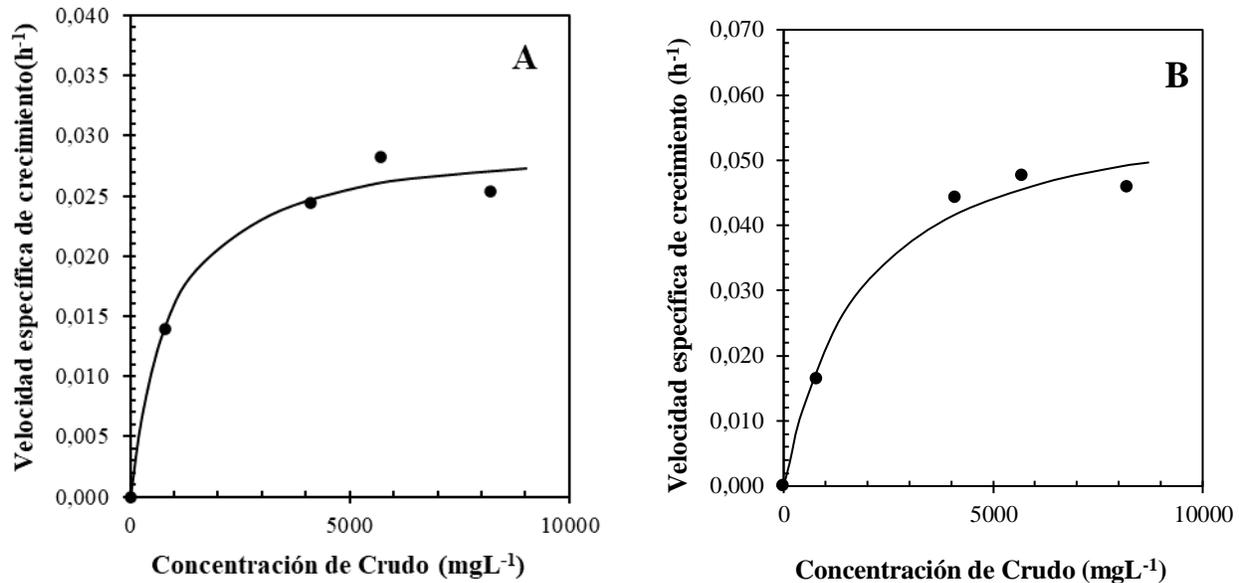
En contraste con el género *Pseudomonas*, hay pocos informes sobre el papel de *M. luteus* en la biodegradación de hidrocarburos. *M. luteus* ha sido descrito como aeróbico, halotolerante, Gram-positivo y no móvil. Las células se encuentran en pares, tétradas o racimos irregulares y forman colonias amarillas brillantes; esta descripción coincide con los resultados obtenidos en el estudio actual. El uso de *M. luteus* en la biorremediación de ambientes contaminados por petróleo (absorciones del 30 al 70%) y su capacidad para producir biosurfactantes se han informado anteriormente<sup>31</sup>.

**Cinéticas de crecimiento y consumo de crudo.** La cinética de crecimiento de *P. stutzeri* y *M. luteus* en emulsiones O/W con diferentes concentraciones de Crudo se muestran en la Figura 6. El crecimiento bacteriano aumentó con la concentración de crudo de 800 a 5700 mg/L, lo que demuestra que *P. stutzeri* y *M. luteus* pueden usar crudo como única fuente de carbono en este rango (catálisis). *P. stutzeri* presentó una mejor adaptación a sistemas emulsificados que *M. luteus* (5 horas vs. 30 horas); sin embargo, la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de *P. stutzeri* después de adaptada fue mayor para todas las concentraciones evaluadas. La fase estacionaria o cese catalítico se alcanzó a las 40 y 60 horas para *P. stutzeri* y *M. luteus*, respectivamente.



**Figura 6.** Cinéticas de crecimiento durante la degradación de 0 (●), 800 (◇), 4100 (□), 5700 (○) y 8200 (▲) mg/L de crudo A) *P. stutzeri* y B) *M. luteus*.

La cinética de crecimiento se ajustó al modelo no inhibitorio Monod (Figura 7), lo que indica que bajo las condiciones evaluadas no hay toxicidad del crudo frente a los microorganismos aislados, y que por el contrario al incrementar la concentración de Crudo en la emulsión se favorece el crecimiento bacteriano.



**Figura 7.** Ajuste de las cinéticas de crecimiento a Modelo Monod-Efecto de la concentración de crudo ((•) Datos experimentales, (-) Modelo) A) *P. stutzeri* y B) *M. luteus*.

Por otro lado, los parámetros cinéticos se estimaron y se muestran en la Tabla 1.  $\mu_{max}$  para *P. stutzeri* (0.030 1/h) fue comparable con otros estudios ( $0.051 \text{ 1/h} \leq \mu_{max} \leq 0.569 \text{ 1/h}$ ) pero el valor  $K_s$  (901 mg/L) fue significativamente mayor, hasta 100 veces más, que los valores encontrados en otras investigaciones dirigidas a *Pseudomonas*<sup>32</sup>; estos resultados demostraron que *P. stutzeri* exhibe una mayor afinidad por el crudo que otras especies del género. Hasta donde sabemos, no hay datos sobre  $\mu_{max}$  y  $K_s$  para *M. luteus* durante la biodegradación de hidrocarburos. Muchos autores han establecido que  $\mu_{max}/K_s$  es un parámetro más preciso para mostrar la capacidad global de los microorganismos para un sustrato específico, porque considera la tasa de crecimiento y la tolerancia a diferentes concentraciones de sustrato y permite la comparación entre diferentes cepas<sup>33</sup>.

**Tabla 1.** Parámetros Cinéticos de crecimiento y consumo de crudo

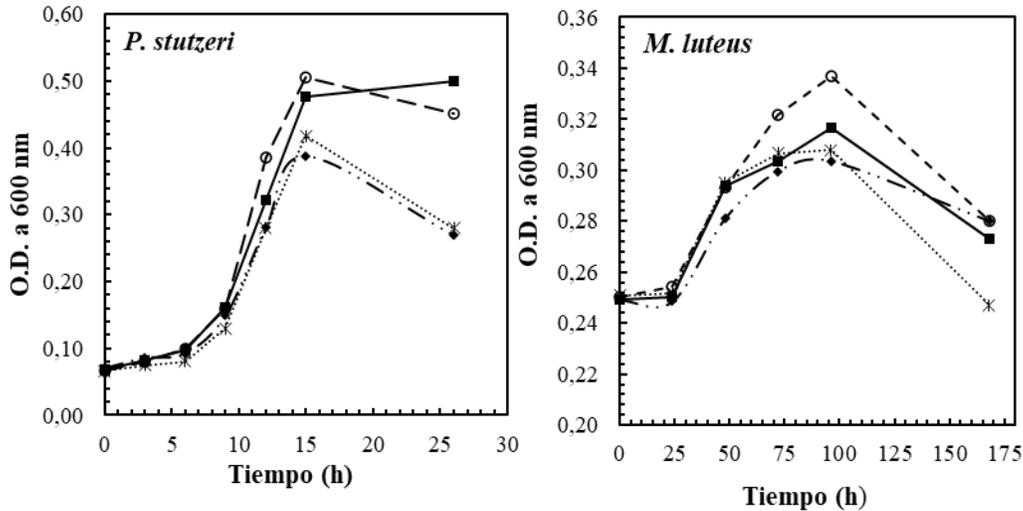
Parámetros de Monod para la degradación de Crudo						
		$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_s$ (mg L <sup>-1</sup> )	$\mu_{max} K_s^{-1}$ (mg <sup>-1</sup> L h <sup>-1</sup> )	r	%RME
<i>P. stutzeri</i>	Crudo	0.030	901	3.4E-05	0,985	7.98E-06
<i>M. luteus</i>		0.061	1809	3.4 E-05	0,986	2,63E-05
Eficiencia de consumo de crudo						
		Concentración de crudo (mg L <sup>-1</sup> )				
		800	4100	5700	8200	
<i>P. stutzeri</i>	Eficiencia de consumo (%E)	51,31	50,55	76,56	69,16	
<i>M. luteus</i>		62,32	77,06	76,48	81,22	

En este estudio, ambos microorganismos exhibieron una capacidad global similar para usar crudo. Algunas investigaciones han reportado la biorremediación de crudo utilizando otras especies de *Pseudomonas*. Siang et al. informaron que *P. pseudoalcaligenes* y *P. aeruginosa* pudieron consumir 57.1 y 56.3% de 1000 mg/L de Crudo en 10 días<sup>34</sup> y *P. fluorescens* puede degradar  $\leq 10\%$  de 5000 ppm de Crudo ligero durante 14 días mientras que *M. luteus* fue capaz de consumir 47,3% de 27000 ppm de Crudo en el suelo durante 90 días<sup>27</sup>. En el estudio actual, los porcentajes de remoción de crudo ligero estuvieron en el rango de 50 - 80% usando concentraciones iniciales entre 800 y 8200 mg/L; estos resultados son promisorios, ya que fueron similares a los reportados previamente, pero se alcanzaron en tiempos menores (80 - 90 horas).

La baja solubilidad de los hidrocarburos en el agua asociada al hecho de que la primera etapa de su degradación implica la acción de una oxigenasa unida a la membrana, hace indispensable que las bacterias entren en contacto directo con el hidrocarburo, siendo la emulsificación una estrategia útil. En consecuencia, es frecuente que las bacterias que crecen en ambientes relacionados con el

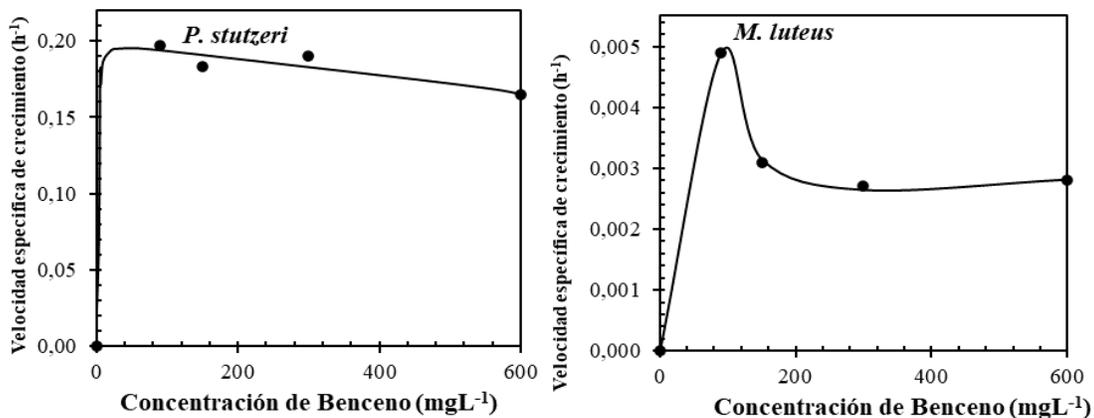
crudo produzcan emulsionantes; estos compuestos aumentan la disponibilidad hidrocarburos y, más tarde, ayudan a separar la bacteria de las gotas de aceite después de que se ha agotado el hidrocarburo utilizable.

**Cinéticas de crecimiento y consumo de benceno** La cinética de crecimiento de *P. stutzeri* y *M. luteus* a diferentes concentraciones de benceno (90 – 600 mg L<sup>-1</sup>) se muestra en la Figura 8. Ambas cepas fueron capaces de crecer en todas las condiciones evaluadas; sin embargo, las tasas de crecimiento disminuyen con el aumento de la concentración de hidrocarburos.



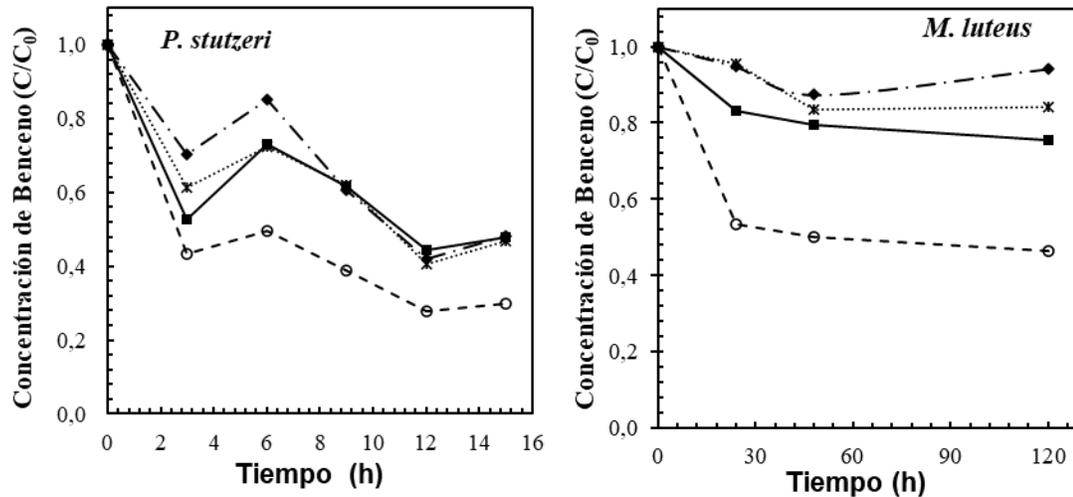
**Figura 8.** Cinéticas de crecimiento de *P. stutzeri* y *M. luteus* durante la biodegradación de benceno a 90 (○), 150 (□), 300 (\*) y 600 (◆) mg L<sup>-1</sup>.

Los datos experimentales (S vs.  $\mu$ ) se ajustaron al modelo de Haldane (Figura 9), la calidad del ajuste fue  $> 0,90$  para ambas cepas; los parámetros estimados se presentan en la Tabla 2. *P. stutzeri* exhibió mayor  $\mu_{max}$  mientras que *M. luteus* mostró mayor  $K_s$



**Figura 9.** Ajuste de las cinéticas de crecimiento a Modelo Haldane -Efecto de la concentración de crudo ((•) Datos experimentales, (-) Modelo)

La cinética de consumo de benceno para *P. stutzeri* y *M. luteus* se muestra en la Figura 10. Ambas cepas pueden consumir benceno; sin embargo *P. stutzeri* exhibió una mayor eficiencia de consumo para todas las concentraciones de hidrocarburo evaluadas; también sus tasas de degradación fueron más altas que las de *M. luteus*.



**Figura 10.** Consumo de benceno a 90 (○), 150 (□), 300 (\*) y 600 (◆) mg L<sup>-1</sup> para *P. stutzeri* y *M. luteus*.

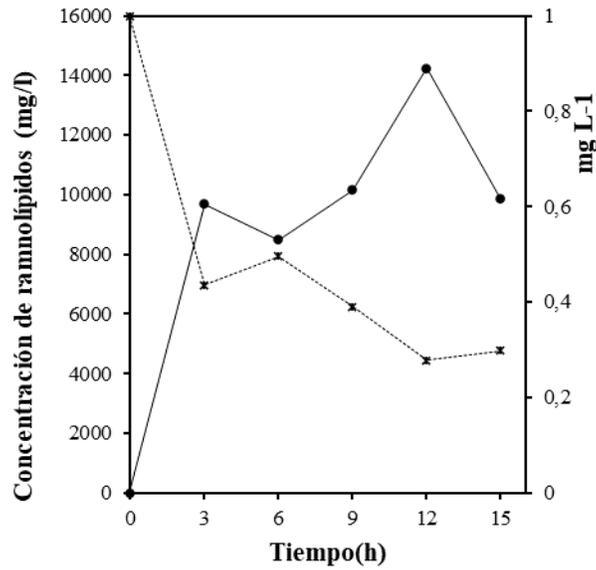
La eficiencia y la tasa de consumo disminuyeron con el aumento de la concentración de hidrocarburos, demostrando inhibición por sustrato (Tabla 2)

**Tabla 2.** Parámetros Cinéticos de crecimiento y consumo de Benceno

Parámetros de Haldane para la biodegradación de Benceno							
		$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_s$ (mg L <sup>-1</sup> )	$\mu_{max} K_s^{-1}$ (mg <sup>-1</sup> L h <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	r	%RME
<i>P. stutzeri</i>	Benceno	0.201	0.656	0.307	3.36 E-04	0.995	1.32E-04
<i>M. luteus</i>		0.002	52.72	3.4 E-05	4.32 E-04	0.999	5.51E-09
Eficiencia de consume de Benceno							
		Concentración de Benceno (mg L <sup>-1</sup> )					
		90	150	300	600		
<i>P. stutzeri</i>	Eficiencia de consumo (%E)	68.77	53.16	55.04	47.05		
<i>M. luteus</i>		53.37	24.40	15.70	5.80		
<i>P. stutzeri</i>	Velocidad de degradación (h <sup>-1</sup> )	0.030	0.020	0.020	0.017		
<i>M. luteus</i>		0.004	0.002	0.001	5E-04		

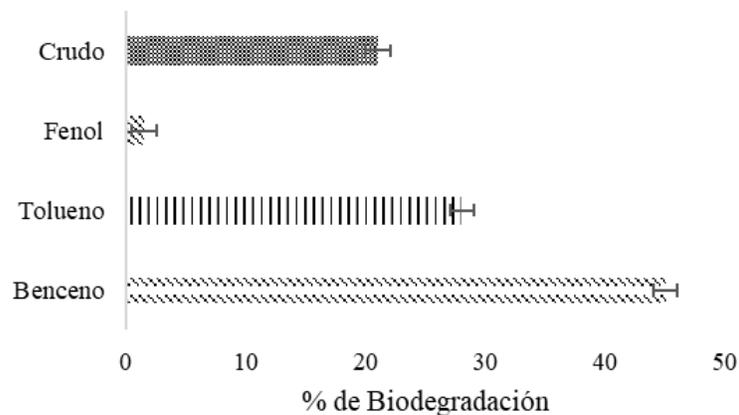
Los ramnolípidos son glicolípidos producidos por varias especies de *Pseudomonas* como emulsionantes, que consisten en dos moléculas de ramnosa y dos de ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico<sup>34</sup>. La cantidad de ramnolípidos sintetizados en la degradación de 800 y 8200 mg/L de Crudo en sistemas emulsificados fue 9.1 y 10.3 g/L después de 80 horas de reacción, la relación entre concentración de crudo en la emulsión y biosurfactante producido fue directa. Algunos autores informaron la producción de 0.5, 2.0, 4.1 y 20 g/L de ramnolípidos para *Pseudomonas* sp. durante la eliminación de Crudo ligero (2.5 g/L), hexadecano (2 g/L), aceite residual (10 g/L) y aceite de soja (20 g/L), respectivamente, durante 3 y 10 días de cultivo<sup>35</sup>. En esta investigación, el contenido de ramnolípidos fue similar al reportado anteriormente sin embargo el tiempo de producción fue menor.

La Figura 11 muestra la producción de ramnolípidos utilizando *P. stutzeri* durante la biodegradación del benceno. A las 12 horas se encontró la mayor concentración de ramnolípidos y la menor cantidad de hidrocarburo. Además, el aumento en la producción de ramnolípidos coincide con el aumento en la cantidad de ingesta de hidrocarburos, lo que indica que la producción de biosurfactantes está directamente relacionada con la capacidad del microorganismo para el consumo y degradación de este tipo de compuestos, que poseen una baja solubilidad en agua,



**Figura 11.** Producción de ramnolípidos vs consumo de benceno para *P. stutzeri* ((•) Producción de ramnolípidos. (x) Consumo de Benceno)

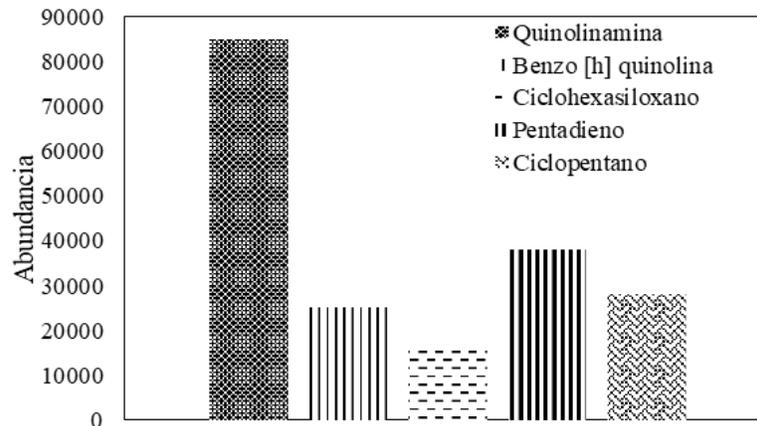
**Ensayos de biorremediación de hidrocarburos aromáticos individuales** La capacidad de *P. stutzeri* para la eliminación de hidrocarburos aromáticos de emulsiones de aceite en salmuera (O/W) se dio en el siguiente orden benceno (45%) >tolueno (28%)>fenol (1.5%), siendo casi inexistente la capacidad de *P. stutzeri* para bio-catalizar fenol de un medio simulado de agua de producción (Figura 12) estas diferencias en la capacidad de degradación de diferentes hidrocarburos pueden asociarse con la polaridad de cada uno de los contaminantes. Por su parte los resultados para la misma cepa microbiana en cuanto a su capacidad de eliminación de crudo de (33°API) fue del 21.9% al cabo de 24 horas.



**Figura 12.** % de biodegradación de Crudo, Fenol, Tolueno y Benceno

Aunque existe evidencia de eficiencias de eliminación de crudo superiores a las alcanzadas en el presente estudio ( $\geq 90\%$  de eliminación en menos de 24 horas), estos resultados se han obtenido con materiales adsorbentes no catalíticos, por lo que las ventajas son parciales, ya que se reduce a la captura de crudo por adsorción y no a la catálisis de las fracciones que lo componen. En este estudio, la acción catalítica del microorganismo se confirma por la presencia de hidrocarburos menores indicadores de oxidación como quinolinamina, benzo [h] quinolina, ciclohexasiloxano, pentadieno y ciclopentano, hallados en el medio de reacción donde tenía lugar la biorremediación realizada por *P. stutzeri* (Figura 13). Cabe mencionar que las moléculas halladas como producto del metabolismo microbiano, son hidrocarburos cíclicos de bajo peso molecular 144,17, 179,22, 444,92, 68,12 y

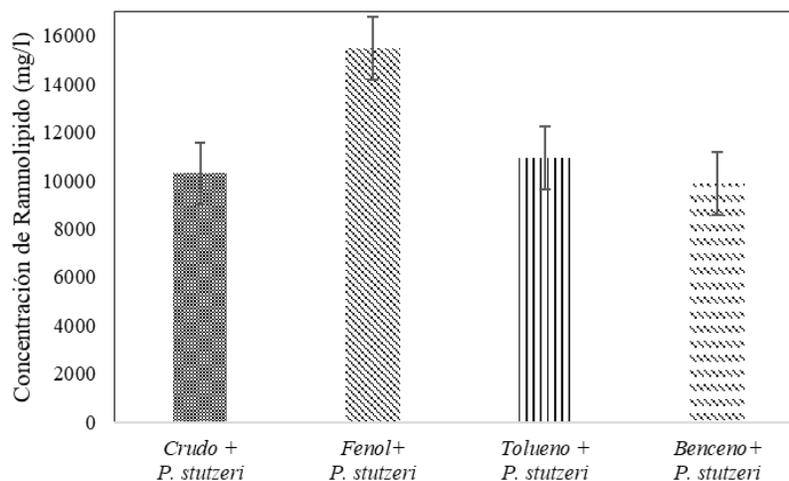
70,10 g/mol respectivamente.



**Figura 13.** Productos de biocatálisis durante la remoción de crudo utilizando *P. stutzeri*

Un carácter bioquímico que los autores han examinado sistemáticamente es el mecanismo de catálisis de hidrocarburos por el género *Pseudomonas*. Se ha evidenciado que este proceso culmina en la escisión de los anillos aromáticos y la formación final de ácidos grasos y/o acetil CoA que se utilizarán en rutas de oxidación para la obtención final de agua y gas. Durante las primeras etapas de la catálisis, se lleva a cabo la adición de grupos oxigenados, específicamente hidroxilos (monooxigenasas) y la posterior oxidación de estos grupos a aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos (deshidrogenasas) <sup>36</sup>.

En el presente estudio, este fenómeno se evidenció por la presencia de metabolitos homólogos de benceno, que se han modificado mediante la adición de grupos funcionales de oxígeno, hidroxilo, carboxilo, éster y éter. Finalmente, los informes existentes sugieren que la disponibilidad de contaminantes es un factor crítico cuando la biocatálisis de hidrocarburos <sup>37</sup>. En consecuencia, la capacidad de biorremediación está relacionada con la habilidad de la cepa para acceder al hidrocarburo, por lo que se cree que las cepas de hidrocarburos degradantes producen tensioactivos para este propósito. La Figura 14 muestra la producción de ramnolípidos al final del metabolismo de *P. stutzeri*. Los resultados confirmaron la generación de biosurfactantes para la acción de biorremediación. La producción de ramnolípidos en presencia de fenol fue mayor; los resultados podrían estar relacionados con la dificultad de *P. stutzeri* para metabolizar exclusivamente este hidrocarburo, esta condición puede forzar la producción de surfactantes por la célula microbiana. Muchos autores han informado sobre la producción de ramnolípidos por las cepas del género *Pseudomonas* para la eliminación efectiva de hidrocarburos (10-20 g /L), estos resultados son comparables con los del presente estudio (9 g /l- 16 g / l) <sup>38</sup>.



**Figura 14.** Producción de ramnolípidos por *P. stutzeri* en la biodegradación de Crudo, Fenol, Tolueno y benceno.

## Conclusiones

*P. stutzeri* y *M. luteus* son cepas nativas de ambientes relacionados con el crudo; que pueden consumir entre el 50 y 80% de Crudo ligero colombiano a concentraciones entre el 800 y 8200 mg/L en un período de 80 horas. Los microorganismos aislados se pueden utilizar en la biocatálisis de Crudo de agua producida sobre todo en etapas de tratamiento terciario. Más allá del alcance técnico, en realidad no hay informes sobre parámetros cinéticos y porcentajes de eliminación de hidrocarburos utilizando las cepas aisladas, en especial *M. luteus*, por lo que los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento científico.

Si bien otras tecnologías como los proceso adsorptivos empleados para la remoción de hidrocarburos. Los microorganismos aislados durante el desarrollo de este trabajo realizan un proceso de catálisis del crudo presente en solución, convirtiéndolos a compuestos más livianos, más oxidados y menos tóxicos. Como evidencia adicional del proceso de biotransformación se determinó que la producción de biosurfactantes como los ramnolípidos por parte de *P. stutzeri* constituyen una estrategia del microorganismo para facilitar el consumo de moléculas hidrofóbicas presentes en el medio.

## Referencias

- Muñoz ML. “El tesoro de Malvinas: La exploración y explotación de hidrocarburos no convencionales en la plataforma continental argentina”. Published online 2022.
- Harrison G, Lamont NA. “Simulated time-based studies to evaluate changes in crude oil composition through evaporation and biodegradation”. *Water Stud.* 2002;**11**:201-210.
- Caja-Molina AV, Iannacone J. “Environmental risk assessment of crude oil in Lemna minor, Daphnia magna, and Danio rerio”. *Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Fis y Nat.* 2021;**45(176)**:777-794. doi:10.18257/raccefy.1398.
- Suthersan SS. “Natural and Enhanced Remediation Systems”; 2019.
- Zapata K, Carrasco-Marín F, Arias JP, et al. “Novel biomaterial design based on Pseudomonas stutzeri–carbon xerogel microspheres for hydrocarbon removal from oil-in-saltwater emulsions”.” A new proposed treatment of produced water in oilfields”. *J Water Process Eng.* 2020;**35**(March):101222. doi:10.1016/j.jwpe.2020.101222.
- Barrera Ó, Zafra C. “Key Factors in Bioremediation Processes for the Wastewater Treatment. a Review”. Published online 2018. doi:10.31910/rudca.v21.n2.2018.1037.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. “Resolución 631 de 2015 vertimientos minambiente”.pdf. Published online 2015:62.
- Sayed K, Baloo L, Sharma NK. “Bioremediation of total petroleum hydrocarbons (Tph) by bioaugmentation and biostimulation in water with floating oil spill containment booms as bioreactor basin”. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;**18**(5):1-27. doi:10.3390/ijerph18052226.
- Gkogkou D, Rizogianni S, Tziassiou C, et al. “Highly efficient removal of crude oil and dissolved hydrocarbons from water using superhydrophobic cotton filters”. *J Environ Chem Eng.* 2021;**9**(5):106170. doi:10.1016/j.jece.2021.106170.
- Jian W, Kitanaka A, Nishijima W, Baes AU, Okada M. “Removal of oil pollutants in seawater as pretreatment of reverse osmosis desalination process”. *Water Res.* 1999;**33**(8):1857-1863. doi:10.1016/S0043-1354(98)00404-7.
- Ye H, Chen L, Kou Y, et al. “Influences of coagulation pretreatment on the characteristics of crude oil electric desalting wastewaters”. *Chemosphere.* 2021;**264**:128531. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128531
- Gobbi LCA, Nascimento IL, Muniz EP, Rocha SMS, Porto PSS. “Electrocoagulation with polarity switch for fast oil removal from oil in water emulsions”. *J Environ Manage.* 2018;**213**:119-125. doi:10.1016/j.jenvman.2018.01.069
- Ben Mansour L, Chalbi S. “Removal of oil from oil/water emulsions using electroflotation process”. *J Appl Electrochem.* 2006;**36**(5):577-581. doi:10.1007/s10800-005-9109-4
- Mohammed RR, Ibrahim IAR, Taha AH, McKay G. “Waste lubricating oil treatment by extraction and adsorption”. *Chem Eng J.* 2013;**220**:343-351. doi:10.1016/j.cej.2012.12.076
- Sakthivel S, Velusamy S, Gardas RL, Sangwai JS. “Adsorption of aliphatic ionic liquids at low waxy crude oil-water interfaces and the effect of brine”. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;**468**:62-75. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.12.010
- Singh R. “Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations”. *J Bacteriol Mycol Open Access.* 2017;**4**(2). doi:10.15406/jbmoa.2017.04.00085
- Windevoxhel R, Nereida S. “Bioaugmentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo”. *Rev Ing UC.* 2011;**18**(1):23-27.
- Mayz JC, Manzi LV. “Bacterias hidrocarburoclásticas del género Pseudomonas en la rizosfera de Samanea saman (Jacq.) Merr”. *Rev Colomb Biotecnol.* 2017;**19**(1):29-37. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408
- Onofre G, Mireles E, Morales J. “Removal of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Associated to Humic Substances”.
- Sorkhoh NA, Ghannoum MA, Ibrahim AS, Stretton RJ, Radwan SS. “Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of Rhodococcus rhodochrous isolated from soil and marine environments in Kuwait”. *Environ Pollut.* 1990;**65**(1):1-17. doi:10.1016/0269-7491(90)90162-6
- Mohamed MES, Al-Yacoub ZH, Vedakumar J V. “Biocatalytic desulfurization of thiophenic compounds and crude oil by newly isolated bacteria”. *Front Microbiol.* 2015;**6**(FEB). doi:10.3389/fmicb.2015.00112
- Wilson DE, Foster F, Cole R, Nichils JD, Rudran R, S. M. “STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER”. *Smithson Books.* Published online 2017.

23. Angelim AL, Costa SP, Farias BCS, Aquino LF, Melo VMM. "An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads". *J Environ Manage*. 2013;**127**:10-17. doi:10.1016/j.jenvman.2013.04.014
24. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. "Métodos de Identificación Bacteriana En El Laboratorio de Microbiología". Vol 29.; 2011. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012
25. Bartholomew JW. "Variables Influencing Results, and the Precise Definition of Steps in Gram Staining as a Means of Standardizing the Results Obtained". *Stain Technol*. 1962;37(3):**139-155**. doi:10.3109/10520296209117723
26. Bao M, Sun P, Yang X, et al. "Biodegradation of marine surface floating crude oil in a large-scale field simulated experiment". *Environ Sci Process Impacts*. 2014;**16**(8):**1948-1956**. doi:10.1039/c4em00166d
27. Franco CA, Cortés FB, Nassar NN. "Adsorptive removal of oil spill from oil-in-fresh water emulsions by hydrophobic alumina nanoparticles functionalized with petroleum vacuum residue". *J Colloid Interface Sci*. 2014;**425**:**168-177**. doi:10.1016/j.jcis.2014.03.051
28. Gałazka A, Król M, Perzyński A. "The efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel". *Polish J Environ Stud*. 2012;21(2):345-353.
29. Dost K, Deli C. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection". *Food Chem*. 2012;**133**(1):**193-199**. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.001
30. Schenk T, Schuphan I, Schmidt B. "High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *J Chromatogr A*. 1995;**693**(1):**7-13**. doi:10.1016/0021-9673(94)01127-Z
31. Lin YH, Gu YJ. "Biodegradation kinetic studies of phenol and p-cresol in a batch and continuous stirred-tank bioreactor with *Pseudomonas putida* atcc 17484 cells". *Processes*. 2021;**9**(1):**1-23**. doi:10.3390/pr9010133
32. Ridgway HF, Safarik J, Phipps D, Carl P, Clark D. "Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer". *Appl Environ Microbiol*. 1990;**56**(11):**3565-3575**. doi:10.1128/aem.56.11.3565-3575.1990
33. Nwankwegu AS, Onwosi CO. "Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation". *Environ Technol Innov*. 2017;**7**:**1-11**. doi:10.1016/j.eti.2016.11.003
34. Abuhamed T, Bayraktar E, Mehmetoğlu T, Mehmetoğlu Ü. "Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation". *Process Biochem*. 2004;**39**(8):**983-988**. doi:10.1016/S0032-9592(03)00210-3
35. Kureel MK, Geed SR, Giri BS, Rai BN, Singh RS. "Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus* sp. M3". *Bioresour Technol*. 2017;**242**:**92-100**. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.167
36. Hii YS, Law AT, Shazili NAM, Abdul-Rashid MK, Lee CW. "Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria". *Int Biodeterior Biodegrad*. 2009;63(2):**142-150**. doi:10.1016/j.ibiod.2008.08.003
37. Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, et al. "Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440". *Microb Cell Fact*. 2011;**10**(October). doi:10.1186/1475-2859-10-80
38. Rapp P, Gabriel-Jürgens LHE. "Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase". *Microbiology*. 2003;**149**(10):**2879-2890**. doi:10.1099/mic.0.26188-0
39. Quintelas C, Costa F, Tavares T. "Bioremoval of diethylketone by the synergistic combination of microorganisms and clays: Uptake, removal and kinetic studies". *Environ Sci Pollut Res*. 2013;**20**(3):**1374-1383**. doi:10.1007/s11356-012-1055-1
40. Reis RS, Pereira AG, Neves BC, Freire DMG. "Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - A review". *Bioresour Technol*. 2011;**102**(11):**6377-6384**. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.074