

Biodegradación de queroseno por cultivos de bacterias aisladas de una fosa petrolera en Venezuela

Laugeny Díaz¹, Beltrán Briceño¹, Mónica García¹, Néstor Rosales¹, Julio Marín²,
Cateryna Aiello³ y Ever Morales¹

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Maracaibo 4001-A, estado Zulia, Venezuela.

*e-mail: laugeny@yahoo.com

² Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, LUZ.3

³ Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, LUZ.

Recibido: 19-10-2012 Aceptado: 10-05-2013

Resumen

Se evaluó la producción de proteínas, biodegradación de queroseno al 0,5% y al 1,0%, y el crecimiento de bacterias aisladas de una fosa petrolera venezolana, en cultivos axénicos y mixtos, usando medio mínimo mineral con queroseno. Las bacterias se identificaron taxonómicamente como: *Yersinia rohdei* (K6), *Pantoea agglomerans* (K3), *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7), alcanzando el siguiente orden en cuanto a crecimiento poblacional: K3>cultivo mixto>H7>K6> K2, en queroseno al 0,5%. Mientras que, en queroseno al 1,0%, hubo el mejor crecimiento, para: cultivo mixto> K2> K6> H7>K3. En promedio, el mayor contenido de proteínas se encontró al 1,0% de queroseno en *Sphingobacterium thalpophilum* (K2), con $135,92 \pm 0,64$ µg/mL y en *Actinobacillus* sp. (H7) con $81,06 \pm 1,13$ µg/mL, difiriendo significativamente con el resto de las cepas ($p < 0,05$). En los cultivos con queroseno 0,5%, la remoción de hidrocarburos totales osciló entre 48,12% y 52,54%; en cambio al 1,0% estuvo entre 49,99% y 60,00%. Los hallazgos permiten recomendar el uso de las cepas bacterianas en cultivos axénicos y mixtos como modelos biológicos para estudios sobre biodegradación de derivados de petróleo y biorremediación de fosas de residuales petroleros.

Palabras clave: Cultivos bacterianos, biodegradación, queroseno, fosa petrolera, biorremediación.

Kerosene biodegradation by bacterial cultures isolated from oil pit in Venezuela

Abstract

The protein production, biodegradation of kerosene at 0.5% and 1.0% and bacterial growth isolated from an oil pit in Venezuela, both in pure cultures and in mixed culture in minimal saline medium with kerosene, were evaluated. The bacteria were taxonomically identified as *Yersinia rohdei* (K6), *Pantoea agglomerans* (K3), *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) and *Actinobacillus capsulatus* (H7), reaching the following order in terms of population: K3>mixed culture>H7>K6> K2 in kerosene 0.5%. While the best growth at 1.0% was obtained with the mixed culture> K2> K6> H7>K3. *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) and *Actinobacillus* sp. (H7) had the highest mean value of protein production in kerosene to 1.0% (135.92 ± 0.64 and 81.06 ± 1.13 µg /mL) respectively.

The removal of kerosene for the 0.5% ranged from 48.12% to 52.54% and for the 1.0% ranged from 49.99% to 60%. The findings can therefore allow recommending the bacterial strains in pure and mixed culture for the biodegradation and bioremediation of the oil pit.

Key words: Bacterial cultures, biodegradation, kerosene, oil pit, biorremediation.

Introducción

La actividad petrolera en Venezuela está ampliamente desarrollada y el aumento exponencial en la demanda del crudo, ha provocado la acumulación de grandes cantidades de desechos industriales, conduciendo a la construcción de fosas petroleras para descargar estos residuos sin tratamiento [7], constituyendo una de las principales causas de contaminación ambiental.

El crecimiento de microorganismos en ambientes impactados con petróleo, obedece a un proceso de adaptación, que les permite modificar sus actividades metabólicas para reproducirse en este ambiente [5]. Diversas investigaciones se han realizado sobre el uso de bacterias autóctonas provenientes de ambientes impactados para la biotransformación y/o biodegradación de petróleo y sus derivados [1, 2, 4, 6, 8, 12, 21, 22], con el fin de utilizarlos en procesos de biorremediación *in situ* de las zonas contaminadas [14, 19, 20, 23].

A nivel nacional, Araujo *et al.* [4], evaluaron el efecto de surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas del Lago de Maracaibo contaminadas con crudo liviano, obteniendo que el mejor tratamiento fue la combinación de agua del lago contaminada con hidrocarburos, el biosurfactante y el cultivo mixto bacteriano, logrando una remoción de hidrocarburos totales del 81% y remoción de nitrógeno y fósforo.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento, producción de proteínas y la biodegradación de queroseno al 0,5 y al 1,0%, por bacterias aisladas de una fosa petrolera venezolana, en cultivos axénicos y mixtos, a fin de proponer aquellas cepas bacterianas autóctonas con mayor capacidad de crecimiento y degradación de hidrocarburos del petróleo para la recuperación de la fosa petrolera.

Parte experimental

Toma de las muestras

Se tomaron asépticamente muestras de agua (1 L) y petróleo crudo (500 g) de una fosa petrolera, ubicada en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, en las coordenadas N 10° 17' 52'' y W 71° 20' 38'', a 20 m.s.n.m. Las muestras de agua presentaron las siguientes características fisicoquímicas: pH 5,50±0,40; salinidad 0 UPS, DBO₅₋₂₀ 0,10±0,00 mg/L, DQO 201,73±15,66 mg/L, oxígeno disuelto 8,46±0,48 mg/L, sólidos suspendidos totales 123,66±96,97 mg/L, sólidos suspendidos volátiles 39,66±6,42 mg/L, nitrógeno total Kjeldahl 4,64±1,61 mg/L, fósforo total 0,60±0,13 mg/L, hidrocarburos totales del petróleo (TPH) 747,50±74,24 mg/L y fracciones de hidrocarburos (SARA) en el crudo: saturados: 48,1%, aromáticos: 23,60%, resinas: 19,4% y asfaltenos: 8,90%, siguiendo metodologías estándar [3],

Aislamiento e identificación de bacterias

Se empleó el método de dilución en placas [3] con medio mínimo mineral y queroseno al 1,0% [13]. Las colonias obtenidas fueron transferidas a medio mínimo mineral líquido con queroseno al 1,0% y cultivadas en agar tripticasa de soya (TSA) para su caracterización microscópica [17] e identificación bioquímica [11, 18].

Estimación del crecimiento bacteriano en queroseno

Las cepas bacterianas en cultivos axénicos y mixtos se cultivaron, por triplicado, en fiolas con 100 mL de medio mínimo mineral, el cual contenía (g/L): NH_4Cl (1,2); KNO_3 (2,4); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,00067); Na_2SO_4 (2,4); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,04); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,65); $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,5); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02) [13], y queroseno al 0,5% y al 1,0% v/v, esterilizado mediante filtración con membrana de nitrocelulosa de 0,22 μm .

Los cultivos axénicos se iniciaron con un inóculo de 1×10^7 cel/mL de cada cepa bacteriana axénica; mientras que el cultivo mixto correspondió a la mezcla de cuatro cepas bacterianas en igual proporción; ambos cultivos comparados a controles no inoculados y con queroseno (Control I), e inoculados sin queroseno (Control II). Todos los cultivos se incubaron a $30 \pm 2^\circ \text{C}$, en agitación constante a 150 rpm, durante 30 días. El crecimiento bacteriano, pH y contenido de proteínas fue analizado cada tres días. Las proteínas se determinaron mediante el método de Lowry *et al.* [15] modificado por Hebert *et al.* [10] y los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) [3] a los 0, 15, 27 y 30 días del cultivo, mediante extracción con cloroformo de las muestras en una relación 1:1 seguido del método gravimétrico.

Adicionalmente se estimaron los siguientes parámetros de crecimiento: velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) durante el crecimiento bacteriano en queroseno, de acuerdo a Madigan *et al.* [16].

Análisis estadístico de los resultados

Se determinaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos y se realizó comparación de medias (ANOVA de una vía) y Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% para determinar grupos significativamente diferentes, empleando el programa SPSS for Windows versión 10.0.

Resultados y Discusión

Las bacterias con mejor crecimiento en queroseno, fueron identificadas como: *Yersinia rohdei* (K6), *Pantoea agglomerans* (K3), *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7). La presencia de enterobacterias en la fosa petrolera puede relacionarse con descargas de materia fecal por actividad ganadera de la zona [9].

Perfil de crecimiento bacteriano en queroseno

El recuento bacteriano, la velocidad de crecimiento, el tiempo de duplicación y el contenido de proteínas totales obtenidos en la experimentación se presentan en la Tabla 1.

En los cultivos iniciados con 0,5% de queroseno, las bacterias alcanzaron el siguiente orden en cuanto a población: K3 > cultivo mixto > H7 > K6 > K2; mientras que, al 1,0% de queroseno hubo el mejor crecimiento: cultivo mixto > K2 > K6 > H7 > K3. Se obtuvo diferencias significativas ($p < 0,05$) durante el crecimiento bacteriano en queroseno a las dos concentraciones ensayadas para las cepas bacterianas axénicas y para el cultivo mixto, con excepción de *Sphingobacterium thalpophilum* (K2), que exhibió un crecimiento similar en ambos ($2,41 \pm 0,10 \times 10^8$ UFC/mL en queroseno 0,5% y $2,36 \pm 0,39 \times 10^8$ UFC/mL al 1,0%), respectivamente.

Por otra parte, con queroseno al 0,5% hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el crecimiento de los cultivos axénicos en relación al cultivo mixto; siendo el mayor crecimiento el obtenido para *Pantoea agglomerans* (K3) con $7,16 \pm 0,33 \times 10^{10}$ UFC/mL; mientras que, con queroseno 1,0% el mayor crecimiento lo obtuvo el cultivo mixto ($4,11 \pm 0,88 \times 10^8$ UFC/mL) seguido por las cepas *Actinobacillus capsulatus* (H7) ($5,37 \pm 0,66 \times 10^6$ UFC/mL) y *Yersinia rohdei* (K6) ($3,09 \pm 1,62 \times 10^7$ UFC/mL), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas.

Al analizar las curvas de crecimiento (Figura 1a), en queroseno 0,5% se observa que las enterobacterias *Pantoea agglomerans* (K3) y *Yersinia rohdei* (K6) iniciaron su fase exponencial de crecimiento desde el día cero, extendiéndose por tres días, después de lo cual decaen los recuentos bacterianos, presumiéndose que el queroseno es utilizado por las bacterias en este período de tiempo.

La cepa *Sphingobacterium thalophilum* (K2) y el cultivo mixto, por su parte, presentan una fase de adaptación de unos tres días, después de lo cual incrementan sustancialmente los recuentos bacterianos; sin embargo, *Sphingobacterium thalophilum* (K2) al sexto día comienza a estabilizarse la curva (fase estacionaria) hasta el final del ensayo. La cepa *Actinobacillus capsulatus* (H7) ($\mu=0,91$ div.días⁻¹, $t_d=0,76$ días) incrementó su población vertiginosamente dentro de los primeros nueve días, alcanzando un máximo de crecimiento el día 12, luego de lo cual experimenta una serie de fluctuaciones que indican decaimiento de la población bacteriana.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento bacteriano y producción de proteínas totales

Queroseno 0,5%				
Cepa bacteriana	Media de Recuento bacteriano (UFC/mL)	Velocidad de crecimiento (μ , div.días ⁻¹)	Tiempo de duplicación (t_d , días)	Media de Proteínas totales (μ g/mL)
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> (K2)	2,41±0,10x10 ⁸	2,12	0,32	30,79±0,63
<i>Pantoea agglomerans</i> (K3)	7,16±0,33x10 ¹⁰	0,37	1,87	66,88±1,19
<i>Yersinia rohdei</i> (K6)	3,30±1,71x10 ⁸	2,01	0,34	35,91±0,76
<i>Actinobacillus capsulatus</i> (H7)	2,78±0,02x10 ¹⁰	0,91	0,76	14,29±0,34
Cultivo mixto	2,86±0,01x10 ¹⁰	-	-	37,21±1,54
Queroseno 1,0%				
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> (K2)	2,36±0,39x10 ⁸	0,95	0,72	135,92±0,64
<i>Pantoea agglomerans</i> (K3)	4,63±0,31x10 ⁶	0,15	4,62	40,88±1,04
<i>Yersinia rohdei</i> (K6)	3,09±1,62x10 ⁷	0,20	3,46	31,42±0,62
<i>Actinobacillus capsulatus</i> (H7)	5,37±0,66x10 ⁶	0,31	2,23	81,06±1,13
Cultivo mixto	4,11±0,88x10 ⁸	-	-	36,31±1,00

Comparativamente, en queroseno 1,0% (Figura 1b) la mayoría de las cepas bacterianas axénicas (excepto *Yersinia rohdei* (K6)) experimentaron inhibición del crecimiento durante los tres primeros días, después de los cuales se inicia la fase exponencial de crecimiento bacteriano. El cultivo mixto y *Sphingobacterium thalophilum* (K2) presentaron los máximos recuentos a los seis días, pero después se evidenció decaimiento de las poblaciones.

Actinobacillus capsulatus (H7) y *Yersinia rohdei* (K6) presentaron un crecimiento gradual desde el inicio de la curva, con máximos recuentos a los 18 días para K6 y a los 21 días para H7, respectivamente. Mientras que, el queroseno al 1,0% afectó significativamente el crecimiento de *Pantoea agglomerans* (K3), con un máximo poblacional a los 15 días y decaimiento brusco a partir de este momento, ex-

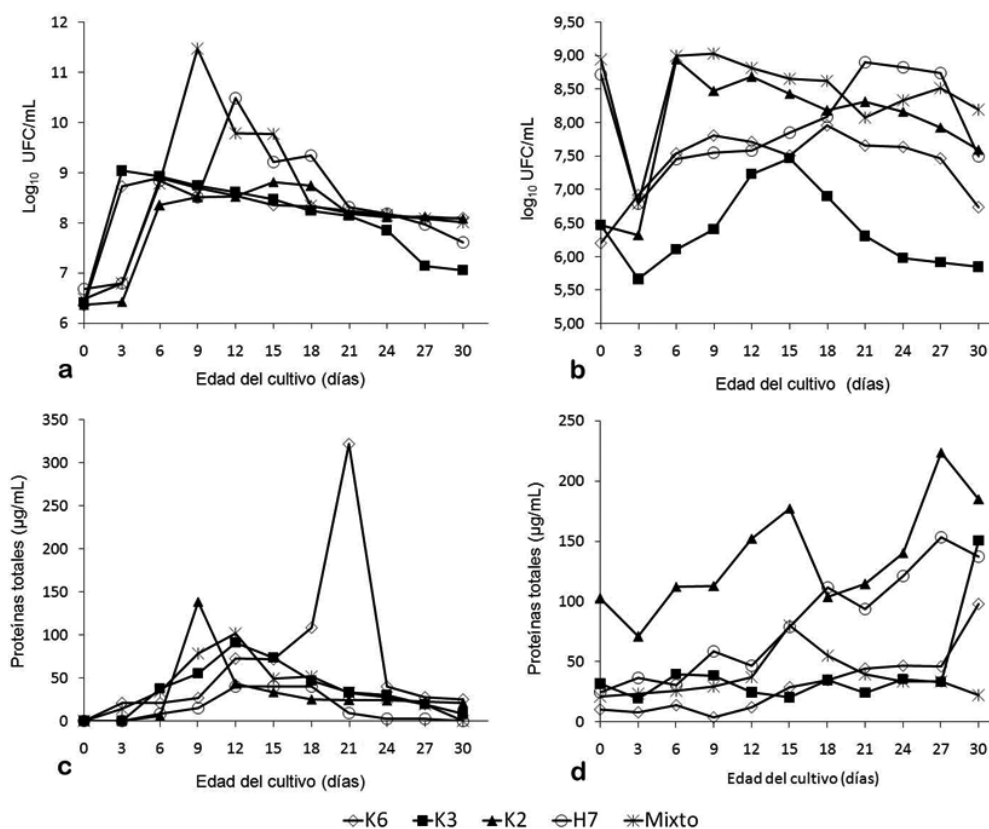
hibiendo el crecimiento más lento y el mayor tiempo de duplicación (Tabla 1); comparable a lo obtenido por Obayori *et al.* [21] con cepas de *Pseudomonas* sp. capaces de crecer en una variedad de hidrocarburos y con escaso crecimiento en queroseno, diesel y dibenzotiofeno, con tiempos de duplicación entre 3,07 y 8,55 días.

El pH (datos no mostrados) se mantuvo cercano a la neutralidad durante los primeros seis días, pero luego disminuyó a cerca de 6,0; indicando probablemente la producción de ácidos orgánicos [1] como resultado de la biodegradación del queroseno.

Producción de proteínas totales

El análisis del contenido de proteínas, contribuye a valorar el crecimiento microbiano vinculado con la capacidad biodegradadora, a fin de relacionarla con la conversión de la fuente de carbono y de nitrógeno del medio en proteínas [22].

Figura 1. Crecimiento bacteriano en queroseno 0,5% (a) y 1,0% (b) y contenido de proteínas totales de las bacterias en queroseno 0,5% (c) y 1,0% (d). K6: *Yersinia rohdei*; K3: *Pantoea agglomerans*, K2: *Sphingobacterium thalpophilum*, H7: *Actinobacillus capsulatus*, Mixto: cultivo mixto con las cuatro cepas bacterianas



En la Figura 1c-d se presenta la producción de proteínas. La cepa bacteriana que en promedio exhibió la mayor producción de proteínas fue *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) en queroseno al 1,0% ($135,92 \pm 0,64$ µg/mL) hacia los 27 días con respecto al resto de las cepas y al cultivo mixto ($p < 0,05$). Asimismo, *Pantoea agglomerans* (K3) produjo la mayor concentración de proteínas con un promedio de $66,88 \pm 1,19$ µg/mL, con queroseno 0,5%; sin embargo, al 1,0% de queroseno la producción de proteínas

es menor ($40,88 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$), caso contrario al presentado con la cepa *Sphingobacterium thalpophilum* (K2), que multiplica su producción de proteínas de casi cuatro veces en queroseno al 1,0% en comparación con queroseno al 0,5%; por lo que es posible que esta cepa sea productora de biosurfactantes tipo proteínicos. Estos resultados, soportan la probabilidad de que la tasa metabólica de estas bacterias está relacionada con el consumo de hidrocarburos. Sarma *et al.* [22] aislaron a la enterobacteria *Leccrercia* sp. con degradación de hidrocarburos aromáticos del 61,5 % a los 14 días, e incremento sustancial de proteínas a medida que ocurre el consumo del sustrato, similar a lo ocurrido con las enterobacterias *Yersinia rohdei* (K6) y *Pantoea agglomerans* (K3).

Biodegradación de queroseno

Se estimó una concentración inicial de TPH de 1720-2200 mg/L en cultivos con queroseno al 0,5% y de 4080-5785 mg/L con queroseno al 1,0%; mientras que las pérdidas por evaporación fueron del 5% en los controles no inoculados.

La biodegradación de queroseno por acción bacteriana (Figura 2) fue similar en ambas concentraciones de queroseno a los 30 días de edad del cultivo para las cepas bacterianas axénicas y para el cultivo mixto, sin diferencias significativas ($p > 0,05$), a excepción de *Sphingobacterium thalpophilum* (K2), cuya biodegradación de queroseno al 1,0% fue mayor (60%) en comparación con queroseno al 0,5% (52,54%) ($p < 0,05$).

En líneas generales la remoción de queroseno 0,5% osciló entre 48,12-52,54%, mientras que al 1,0% estuvo entre 49,99-60%, con tendencia a una mayor remoción de hidrocarburos a la máxima concentración de queroseno. Puede apreciarse en la Figura 2a-b que las bacterias removieron mayor cantidad de queroseno al 0,5% que al 1,0% durante los primeros 15 días; no obstante, a partir del día 27 este comportamiento cambia evidenciándose mayores porcentajes de biodegradación al 1,0%. Esto se corresponde con el crecimiento exhibido por las cepas bacterianas en queroseno al 0,5% el cual fue mayor durante los 12-15 días; mientras que al 1,0% el máximo crecimiento se observó luego de los 15 días.

Las mayores remociones al 1,0% fueron realizadas por las cepas *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Yersinia rohdei* (K6) (58,82%), seguidas por el cultivo mixto (54,72%), *Actinobacillus capsulatus* (H7) (51,74%) y *Pantoea agglomerans* (K3) (49,99%), siendo esta última cepa la más afectada en su crecimiento, y con diferencias significativas entre las bacterias de los cultivos axénicos ($p < 0,05$).

De forma individual, *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) fue la cepa bacteriana que presentó la mayor capacidad de utilización de queroseno y la mayor producción de proteínas totales en queroseno al 1,0%, seguida por *Actinobacillus capsulatus* (H7).

Por su parte, el cultivo mixto (Figura 2) se comportó de forma similar a los cultivos puros en cuanto a la biodegradación del queroseno, a pesar de que la literatura señala que los cultivos mixtos son más eficientes al degradar mezclas de hidrocarburos; puesto que éstos pueden utilizar diferentes fracciones orgánicas de la mezcla, en comparación con los puros, que degradan sólo fracciones específicas de hidrocarburos [5].

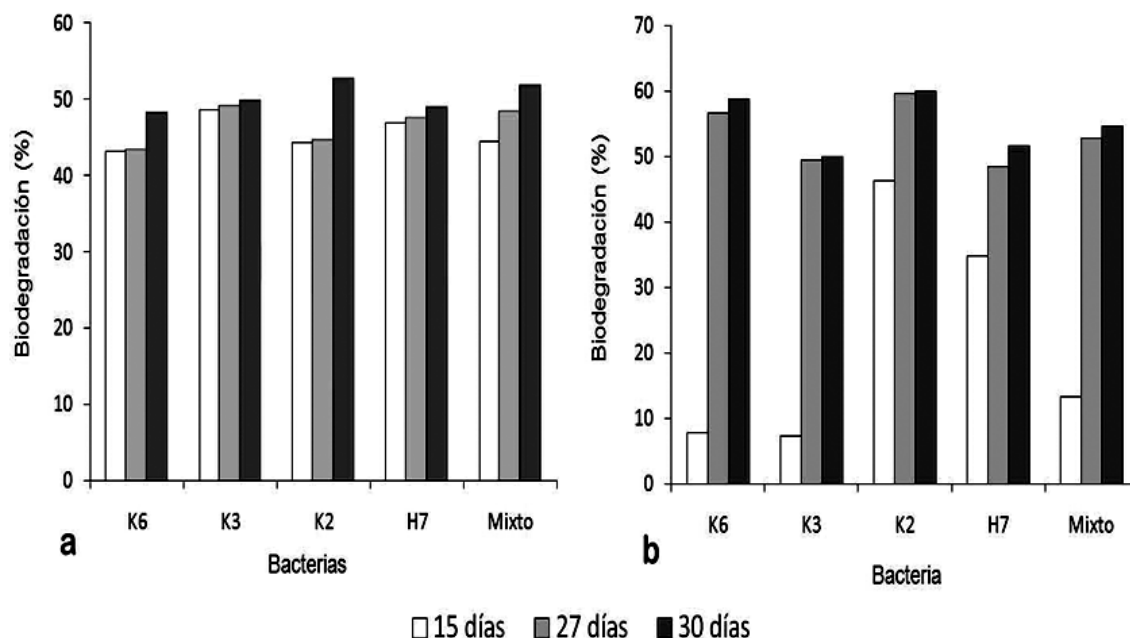
En base a los resultados obtenidos podría recomendarse el uso de las bacterias *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7) en cultivos puros, así como el cultivo mixto para la remoción de los hidrocarburos del petróleo contenidos en la fosa petrolera.

Investigaciones realizadas por otros autores comprueban la capacidad de biodegradación de petróleo y cortes de petróleo, incluido el queroseno, por acción bacteriana. Nocentini *et al.* [20], reportan la biodegradación de queroseno, aceite mineral y combustible diesel, por cultivos puros bacterianos hasta concentraciones menores de 2000 mg/ Kg; mientras que Wongsa *et al.* [24], aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* biodegradadoras de queroseno entre el 20,5 y el 70%.

Bertrand *et al.* [6] evaluaron la degradación de petróleo crudo (6 g/L) por un cultivo bacteriano mixto, estimado en un 83%. Ito *et al.* [12] emplearon un consorcio conformado por nueve cepas bacterianas capaces de degradar aceite de turbina (mezcla de cicloalcanos recalcitrantes e isoalcanos) en un 90% en 5 días.

Más recientemente, Wolicka *et al.* [23] aislaron microorganismos de suelos contaminados con petróleo capaces de degradar benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) a concentraciones de 500 mg/L entre el 80 y el 95%; mientras que, Obayori *et al.* [21] aislaron cepas de *Pseudomonas* sp. del suelo biodegradadoras de petróleo crudo, gasolina, antraceno, pireno, queroseno, diesel y dibenzotiofeno en más del 70% en 6 días.

Figura 2. Biodegradación de hidrocarburos totales por las bacterias en queroseno 0,5% (a) y al 1,0% (b). *Yersinia rohdei* (K6), *Pantoea agglomerans* (K3), *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7), Mixto: cultivo con las cuatro cepas bacterianas en iguales proporciones de inóculo



Conclusiones

Se logró el aislamiento e identificación taxonómica de las cepas bacterianas *Yersinia rohdei* (K6), *Pantoea agglomerans* (K3), *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7) a partir de la fosa petrolera, con capacidad de crecer en queroseno como única fuente de carbono y energía.

Las bacterias aisladas de la fosa petrolera venezolana lograron degradar el queroseno (0,5 y 1,0%) entre el 48 y el 60% a los 30 días, con tendencia a una mayor remoción de hidrocarburos a la máxima concentración de queroseno. Las cepas bacterianas más eficientes en la degradación de queroseno y que produjeron mayor contenido de proteínas fueron *Sphingobacterium thalpophilum* (K2) y *Actinobacillus capsulatus* (H7), con porcentajes de remoción de queroseno similares al cultivo mixto, por lo que se recomienda su uso como modelos biológicos para la biorremediación de la fosa petrolera.

Agradecimiento

Al FONACIT Proyecto N° 20060002219 y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), Proyecto N° 0269-10 por el financiamiento de la investigación.

Referencias bibliográficas

1. Adebusoye S. A., Ilori M. O., Amund O. O., Teniola O. D., Olatope S. O., Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23, N° 8, (2007), 1149-1159.
2. Al-Mailem D. M., Sorkhoh N. A., Salamah S. S., Eliyas M., Radwan S. S., Oil bioremediation potential of Arabian Gulf mud flats rich in diazotrophic hydrocarbon-utilizing bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 64, N° 3, (2010), 218-225.
3. APHA, AWWA and WEF., American Public Health Association, Standard methods for examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington DC, USA (1998).
4. Araujo I., Gómez A., Barrera M., Angulo N., Herrera L. Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. Vol. 33, N° 4, (2008), 245-250.
5. Atlas R., Bartha, R., Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, (4ed.), Editorial Pearson Educación, S.A., Madrid, España, (2002), 509-586.
6. Bertrand J. C., Rambeloarisoa E., Rontani J. F., Giusti G., Mattei G., Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture, *Journal of Biotechnology Letters*, Vol. 5 N° 1, (2005), 567-572.
7. Culshaw F., Fosas tóxicas en Venezuela: ¿Es factible una limpieza total?, *VenEconomía Mensual*, Vol. 23, N° 4, (2006), 9-11.
8. Escapa I. F., Del Cerro C., García J. L., Prieto M. A. The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glicerol, *Environmental Microbiology*, Vol. 5, (2013), 93-110.
9. Farmer J., Boatwright K., Janda M. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification, En: Murray P., Baron E., Jorgensen J., Landry M. L., Pfaller M. A., *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Volume 1, ASM Press, USA, (2007), 649-802.
10. Hebert D., Phipps P. J., Strange, E., Chemical analysis of microbial cells, *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, (1971), 209- 343.
11. Holt J. G., *The shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (8ed), The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA, (1984), 1-184.
12. Ito H., Hosokawa R., Morikawa M., Okuyama H., A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristic, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 61, N° 3, (2008), 223-232.
13. Jobson A., Cook F. D., Westlake D. W. S., Microbial utilization of crude oil, *Applied Microbiology*, Vol. 23, N° 6, (1972), 1082-1089.
14. Karamalidis A. K., Evangelou A. C., Karabika E., Koukkou A. I., Drainas C., Voudria E., A. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain, *Spet. Bioresource Technology* Vol. 101, N° 16, (2010), 6545-6552.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, Vol. 193, N° 1, (1951), 265- 275.

16. Madigan M., Martinko J., Parker J., Brock *Biología de los Microorganismos*, (10ed.), Ediciones Prentice Hall. Inc., Madrid, España, (2004), 149-588.
17. Mata S., Gómez M., Muñoz F., Carballo M., González S., Montes T., Landaeta C, Hernández C., Uzcategui C., *Guía de trabajo práctico de Microbiología*, Ediciones de la Biblioteca-EBUC, Caracas, Venezuela, (2003), 47-110.
18. MacFaddin J., *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, (3ed.), Editorial Anamericana, Madrid, España, (2004), 451-744.
19. Muckian L. M., Grant, R. J., Clipson N. J. W., Doyle E. M., *Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene and fluoranthene-amended soil*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 63, N° 1, (2009), 52-56.
20. Nocentini M., Pinelli D., Fava F., *Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem*, *Chemosphere*, Vol. 41, (2000), 1115- 1123.
21. Obayori, O. S., Adebusoye, S. A., Adewale, A. O., Oyetibo, G. O., Oluyemi, O. O., *Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four Pseudomonas strains*, *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 21, N° 2, (2009), 243-248.
22. Sarma, P., Bhattacharya B., Krishnan S., Lal B., *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, Leclercia adecarboxylata*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, N° 5, (2004), 3163–3166.
23. Wolicka D., Suszeck A., Borkowski A., Bielecka A., *Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products*, *Bioresource Technology*, Vol. 100, N° 13, (2009), 3221-3227.
24. Wongs P., Tanaka M., Ueno A., Hasanuzzaman M., Yumoto I., Okuyama H., *Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil*, *Current Microbiology*, Vol. 24, (2004), 415- 422.