

# CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HALOFÍLAS AISLADAS DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE LODOS ACTIVADOS DEL TERMINAL PETROLÍFERO ALMIRANTE BARROSO SAO PAULO, BRASIL

José A. Valeriano-Zapana <sup>1,a,b</sup>, Elmer E. Gonzales-Limache <sup>2,a</sup>

## RESUMEN

La búsqueda de microorganismos extremófilos con potencial uso en procesos de biorremediación ha fascinado a diferentes investigadores, explorando diferentes tipos de ecosistemas tales como los efluentes de terminales petrolíferos, dada a sus condiciones hipersalinas, nos lleva a plantearnos si existen microorganismos que puedan tolerar estas condiciones y ser usado como alternativas potenciales en procesos de descontaminación de la industria petrolera. En el presente trabajo se ha realizado la caracterización de 4 cepas bacterias aisladas del Sistema de Tratamiento de Lodos Activados del Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR-SP), los resultados a través del análisis filogenético revelan que las bacterianas aisladas corresponden a *Idiomarina* sp, *Halomonas* sp, *Brevibacterium casei* y *Bacillus flexus*. Estos microorganismos muestran una alta tolerancia para crecer a niveles elevados de salinidad (9% NaCl) y su capacidad para degradar hidrocarburos específicos (Hexadecano 1%, Fenol 0.02% Naftaleno 0.01%, Fenantreno 0.01% y Pireno 0.01% Benzopireno 0.005%), siendo más representativos *Bacillus flexus* y *Idiomarina* sp. Estos resultados permitirán realizar pruebas de biodegradación en plantas pilotos a mayor escala de la industria petrolera.

**Palabras clave:** Sistema de lodos, bacterias, hidrocarburos, salinidad, filogenia molecular.

## CHARACTERIZATION OF BACTERIA ISOLATED halophytes SYSTEM ACTIVATED SLUDGE TREATMENT OF PETROLEUM TERMINAL ALMIRANTE BARROSO OF SAO PAULO, BRAZIL

## ABSTRACT

The search for extremophile microorganisms with potential use in bioremediation processes has fascinated different researchers, exploring different types of ecosystems such as effluents from oil terminals due to their hypersaline conditions leads us to ask ourselves if there are microorganisms that can tolerate these conditions and be used as potential alternatives in decontamination processes in the oil industry. In the present work has been carried out the molecular characterization of 4 strains isolated bacteria Treatment System Activated Sludge Oil Terminal Almirante Barroso (TEBAR-SP), the results through phylogenetic analysis revealed that the bacteria isolated correspond to: *Idiomarina* sp, *Halomonas* sp, *Brevibacterium casei* and *Bacillus flexus*. These organisms show a high capacity to grow under high salinity levels (9% NaCl) and degrade aromatic hydrocarbons (Hexadecane 1% Phenol 0.02% Naphthalene 0.01%, Phenanthrene 0.01% and pyrene 0.01% Benzopyrene 0,005), it is concluded that *Bacillus flexus* and *Idiomarina* sp are microorganisms that show better characteristics for biodegradation of hydrocarbons.

**Key words:** Sludge System, bacteria, hydrocarbons, salinity, molecular phylogeny.

<sup>1</sup> Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad José Carlos Mariátegui. Moquegua-Perú; jvalerianozapana@ujcm.edu.pe

<sup>2</sup> Instituto de Biología (IB), Universidad de Campinas (UNICAMP). Sao Paulo-Brasil

<sup>a</sup> Biólogo; <sup>b</sup> Magister en Biología funcional molecular

## INTRODUCCIÓN

La industria petrolera es un gran consumidor de agua, generando en contrapartida, grandes cantidades de efluentes difíciles de tratar (Barcellos, 1986). Prácticamente todas las operaciones, desde su extracción hasta su refinamiento requieren grandes cantidades de agua (Nemerow, 1971).

Los requisitos ambientales en crecimiento y el cambio en la legislación sobre el cuidado del agua, han impulsado a muchas industrias a buscar formas de reducir el consumo de agua y considerar la posibilidad de reutilizar sus efluentes tratados. Durante este siglo, muchos sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales han sido desarrollados con el fin de mitigar la contaminación causada por la liberación de aguas (Abed *et al.*, 2006).

La salinidad y la temperatura son los parámetros clave, que intervienen en el proceso de degradación de petróleo, ya que influyen sobre la estructura y fisiología de las comunidades microbianas existentes y cambian las propiedades físico-químicas de los contaminantes, tales como la solubilidad y viscosidad (Abed *et al.*, 2006).

Los lodos activados consisten en un método biológico utilizado por la industria petrolera para el tratamiento de aguas residuales (Aboulhassan *et al.*, 2006). El agua de producción de petróleo es un efluente salino generado durante la extracción de petróleo, tanto en tierra como en alta mar. Volúmenes considerables de agua salada se producen junto con el petróleo. La cantidad de agua generada aumenta de forma significativa con la edad del pozo, pudiendo variar de 0.6 L de agua/ 1L de petróleo producido (Sauer, 1991), hasta 10 veces más del volumen de petróleo producido (Ribeiro, 1995). El agua de producción colectada puede contener bacterias con un alto potencial para la degradación de hidrocarburos en condiciones extremas de salinidad y temperatura (Nazina *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2006).

En general, la diversidad y potencial metabólico de las bacterias que degradan hidrocarburos tienden a disminuir a medida que las condiciones ambientales se vuelven más extrema (Margesin & Schinner, 2001). En alta salinidad, la biodegradación de hidrocarburos es reducida debido a la menor diversidad microbiana

y la baja solubilidad de los hidrocarburos y oxígeno (Patzelt, 2005; Mnif *et al.*, 2009).

En los últimos años, muchos géneros bacterianos han sido reportados, entre los que podemos mencionar a *Halomonas* (Wang *et al.*, 2007), *Alcanivorax* (Yakimov *et al.*, 1998), *Marinobacter* (Gauthier *et al.*, 1992), *Dietzia* (Borzenkov *et al.*, 2006), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.*, 2002), *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2003), *Bacillus* (Kumar *et al.*, 2007; SASS *et al.*, 2008), *Geobacillus* (Chamkha *et al.*, 2008), entre otros.

Hasta el momento, la especie que presenta el mayor potencial para la degradación de hidrocarburos en condiciones de alta salinidad (30%) es *Streptomyces albiacialis* K-3959 (Kuznetsov *et al.*, 1992). En este sentido, el objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar genéticamente cepas bacterianas halófilas aisladas de terminal petrolífero, y evaluar cualitativa y cuantitativamente su potencial de degradación de hidrocarburos en condiciones de alta salinidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en colaboración entre el Magister Elmer Erasmo Gonzales Limache de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP-Brasil) y el Prof. José Antonio Valeriano Zapana, docente de la Universidad José Carlos Mariátegui (Perú) e investigador del laboratorio de química de proteínas-LAQUIP del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP).

### 1.1 Microorganismos

Las bacterias fueron obtenidas por aislamiento de un sistema de lodos activados, diseñado para el tratamiento de las aguas de producción de la empresa petrolera PETROBRAS. Para esto se tomó 5 ml del lodo y se procedió a realizar una dilución seriada en solución salina ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ), luego 100  $\mu$ l de cada dilución fue inoculado en medio de cultivo R2A al 9% de NaCl (Reasoner & Geldreich, 1985), las placas fueron llevadas a una estufa con 30°C durante 5 días. Después del crecimiento de las bacterias presentes en la muestra, cada colonia fue reinoculada sola en una nueva placa, este procedimiento fue realizado hasta obtener colonias puras.

## 1.2 Extracción de ADN genómico

Después de confirmar la pureza de las cepas, el ADN genómico fue extraído de las bacterias aisladas (el número de aislamientos obtenidos se detallan en los resultados), de acuerdo con el protocolo descrito por Soolinger et al. (1993). El resultado de la extracción fue visualizado en un transiluminador UV.

## 1.3 Amplificación y purificación de los genes rRNA 16S

El ADN obtenido de las extracciones fue utilizado en las reacciones de PCR para la amplificación del gen ARNr 16S, para lo cual fueron utilizados los primers 10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') y 1100r (5'AGG GTT GCG CTC GTT G 3') (Lane, 1991).

El programa de amplificación utilizado consistió en 1 ciclo a 95°C durante 2 min; 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 3 min; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 3 min. Cada reacción contenía: tampón de PCR (Invitrogen) 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix (Invitrogen), 0,5 mM de cada primer, 2.0 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5,0 ul de la muestra de ADN; totalizando un volumen final de 25 uL. Los resultados de la amplificación fue confirmado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

## 1.4 Secuenciamiento y análisis filogenético

El secuenciamiento de los fragmentos obtenidos fue realizado en un secuenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems) utilizando los primers 10f y 1100r especificados anteriormente. Las secuencias para el gen ARNr 16S obtenidas con cada primer, fueron ensambladas en una única secuencia de consenso (contig), con la ayuda del programa de phredPhrap (Ewing et al., 1998).

Después del montaje de las secuencias, éstas fueron comparadas con secuencias de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, EE.UU). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal X (Thompson et al., 1997). El software MEGA v. 4 (Tamura et al., 2007) fue utilizado para la obtención de

los árboles filogenéticos calculada a partir de 1000 repeticiones. La metodología usada para la inferencia filogenética fue Neighbor - Joining (NJ).

## 1.5 Test para la actividad de degradación de hidrocarburos

Antes realizar los ensayos de biodegradación, fue comprobada su capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono para cada bacteria. Para lo cual se utilizó el método colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - bromuro de 2,5-difeniltetrazolio), que se basa en la evaluación de la respiración bacteriana (Johnsen et al., 2002).

Los hidrocarburos y sus concentraciones utilizados para el ensayo fueron los siguientes: Hexadecano (1%) (Vasconcellos et al., 2010), Fenol (0.02%) (Kafilzadeh et al., 2010); Naftaleno (0.01%), Fenantreno (0.01%) y Pireno (0.01%) (Zhou et al., 2008); Benzopireno (0.005%) (Juhasz et al., 2000), las concentraciones fueron escogidos de acuerdo a artículos previamente publicados.

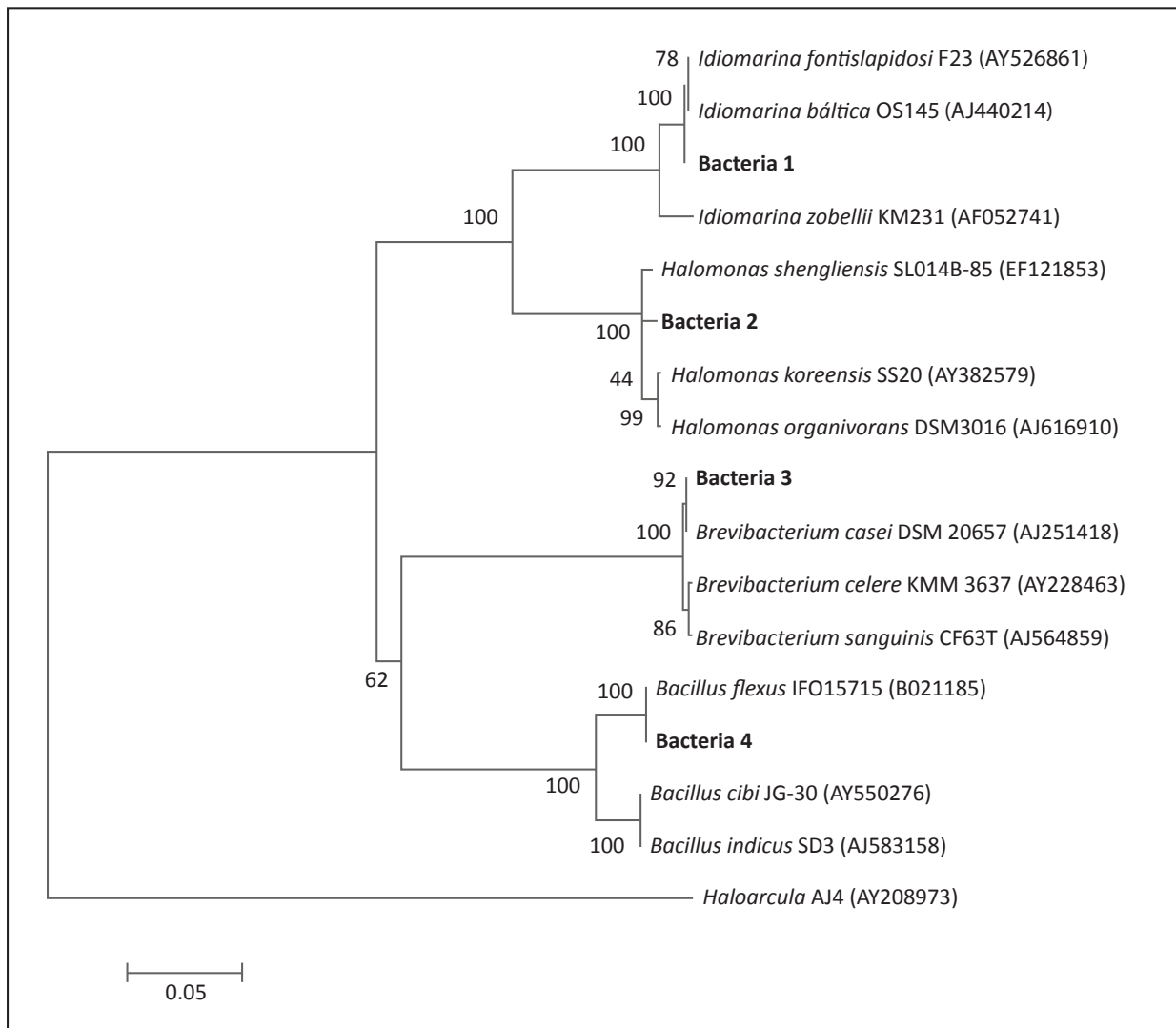
## 1.6 Ensayos de biodegradación

Los ensayos de biodegradación fueron realizados en medio de cultivo BH (Bushnell & Haas, 1940), con las concentraciones de hidrocarburos descritos anteriormente. Las bacterias fueron crecidas en medio de cultivo BH que contenía una mezcla de hidrocarburos, durante 20 días. La evaluación de la biodegradación fue realizada a cada 5 días a través de un Cromatógrafo Gaseoso acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS), todos los reactivos utilizados y equipos se describen en Passarini et al. (2011).

# RESULTADOS

## 1.7 Identificación bacteriana

De acuerdo al análisis filogenético realizado, las cuatro bacterias estudiadas fueron identificadas como *Idiomarina sp.* (**Bacteria 1**), *Halomonas sp.* (**Bacteria 2**), *Brevibacterium casei* (**Bacteria 3**) y *Bacillus flexus* (**Bacteria 4**), como se muestran en la figura 1.



**Figura 1.** Árbol Filogenético resultante del análisis Neighbor joining con secuencias del gen ARNr 16S. Los valores de bootstrap son presentados en todas las ramas. El análisis del bootstrap fue realizado en base a 1000 repeticiones. Grupo externo: Haloarcula sp. A barra de escala corresponde a 0,05 sustituciones.

**1.8 Test de MTT para actividad de degradación de hidrocarburos**

Las bacterias aisladas fueron sometidas al Test de MTT para evaluar su crecimiento frente a hidrocarburos

específicos (hexadecano, fenol, naftaleno, fenantreno, pireno y benzopireno). Los resultados muestran (Tabla 1) que la 4 bacterias metabolizan los diferentes hidrocarburos, siendo los más representativos *Idiomarina sp.* y *Bacillus flexus*

**Tabla 1.** Crecimiento bacteriano frente a distintos hidrocarburos.

Identificación	Hexadecano	Fenol	Naftaleno	Fenantreno	Pireno	Benzopireno
<i>Brevibacterium casei</i>	+	-	-	+	+	+
<i>Halomonas sp.</i>	+	-	+	+	+	-
<i>Idiomarina sp.</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Bacillus flexus</i>	+	+	+	+	+	+

(+) Creció / (-) No creció

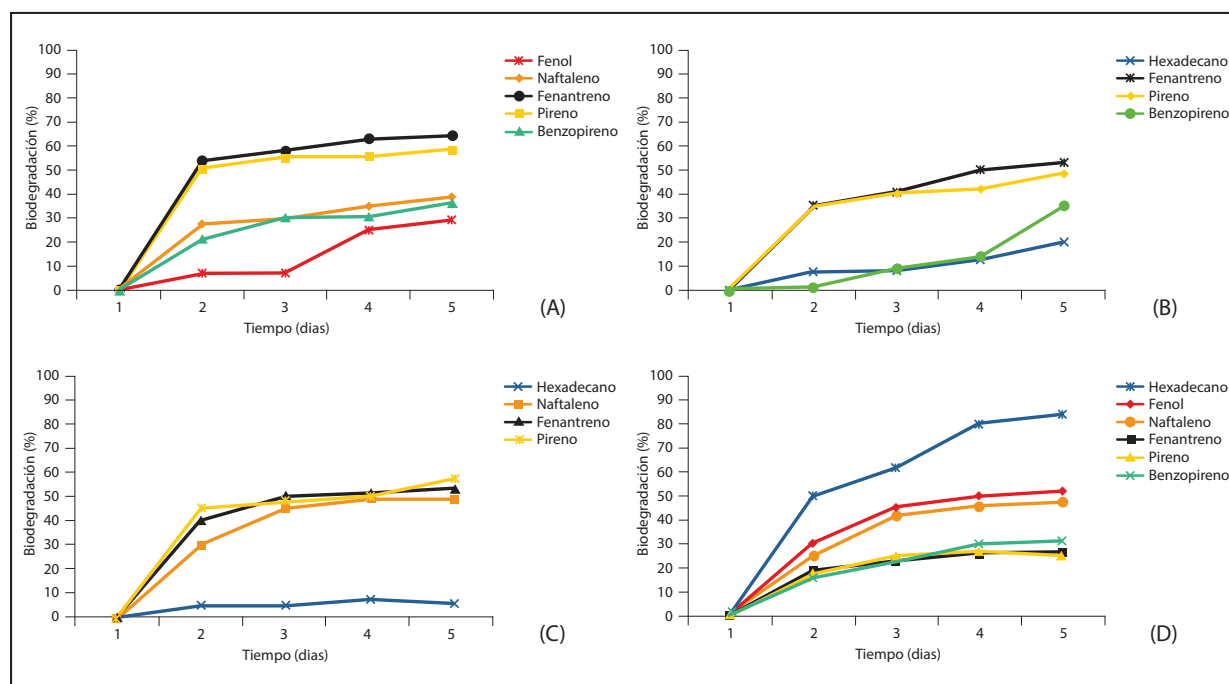
### 1.9 Biodegradación de hidrocarburos

Después de 20 días de seguimiento, las 4 bacterias mostraron distintas tasas de biodegradación de los diferentes hidrocarburos. Los análisis fueron

realizados individualmente para cada muestra, a través de Cromatógrafo Gaseoso acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), como se muestra en la Tabla 2. Las curvas de degradación para cada bacteria son mostradas en la Figura 2.

**Tabla 2:** Degradación de hidrocarburos por las bacterias estudiadas, mediante CG-MS.

Identificación	DEGRADACIÓN (%)					
	Hexadecano	Fenol	Naftaleno	Fenantreno	Pireno	Benzopireno
<i>Brevibacterium casei</i>	65,9	-	-	53,1	48,6	35,0
<i>Halomonas sp.</i>	5,8	-	48,8	53,0	57,2	-
<i>Idiomarina sp.</i>	-	29,1	38,8	64,4	58,4	36,3
<i>Bacillus flexus</i>	84,3	52,2	47,9	26,6	25,0	31,2



**Figura 2.** Curva de biodegradación para los hidrocarburos evaluados durante 20 días. (A) *Idiomarina sp.*, (B) *Brevibacterium casei*, (C) *Halomonas sp.*, (D) *Bacillus flexus*.

## DISCUSIÓN

El éxito de la biorremediación en derrames de petróleo depende de la disponibilidad de los microorganismos adecuados, los factores ambientales y la composición del aceite derramado (Mashreghi *et al.*, 2005 y Echeverri *et al.*, 2010).

En relación con la metodología empleada en el estudio, varios autores coinciden en que la selección de microorganismos a través de pruebas

sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros enriquecidos con derivados de petróleo, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo (Mackey *et al.*, 1996 y Echeverri *et al.*, 2010)

En cuanto a la concentración de 10 % NaCl ensayado en el presente estudio demuestran que los microorganismos aislados *Idiomarina sp.*, *Halomonas sp.*, *Brevibacterium casei* y *Bacillus flexus* presenta

una alta tolerancia y capacidad de biodegradación frente a hidrocarburos específicos (Hexadecano 1%, Fenol 0.02% Naftaleno 0.01%, Fenantreno 0.01% y Pireno 0.01% Benzopireno 0.005%) siendo más representativos *Idiomarina* sp y *Bacillus flexus*.

Muchas especies del género *Idiomarina* ya han sido aisladas de ambientes moderadamente salinos e hipersalinos, tales como, *Idiomarina atlántica*, aislada del sedimento del Océano Atlántico, se observó que esta bacteria era capaz de crecer en medio que contiene 1-15% de NaCl (w / v), con un crecimiento óptimo en el 3-5% de NaCl (Du *et al.*, 2015). *Idiomarina seosinensis* se aisló a partir de agua hipersalina en Corea del Sur (Choi & Cho, 2005), y mostró capacidad para crecer en un medio con 1-20% NaCl (w / v), con un crecimiento óptimo en el rango de 5-10%. *Idiomarina abyssalis* e *Idiomarina zobellii* se aislaron a partir de sedimento del Océano Pacífico (Ivanova *et al.*, 2000), entre muchos otros estudios reportados, los cuales sugieren la adaptación del género *Idiomarina* a condiciones de alta salinidad. El porcentaje de degradación observado en este estudio para *Idiomarina* sp. son resultados inéditos, ya que en la literatura no hay reportes de degradación individual de hidrocarburos. Apenas existe un estudio de *Idiomarina xiamenensis* 10d-4T (Ivanova *et al.*, 2000), que es capaz de degradar petróleo en consorcio con otras especies.

El género *Halomonas* en los últimos años han sido reportados como degradador de una amplia gama de compuestos aromáticos bajo condiciones de hipersalinidad, como el ácido benzoico, ácido cinámico, ácido salicílico, ácido fenilacético, ácido fenilpropiónico, ácido fenol, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, benzoato, salicilato, vainillina, fluoreno y bifenilo (Zhuang *et al.*, 2012). *Halomonas* alimentaria SL014B-69 se aislaron a partir de un suelo contaminado con petróleo crudo en China, y mostro capacidad de crecer a una concentración de 1% -20% de NaCl (w / v) (Zhuang *et al.*, 2012). Seis especies diferentes de *Halomonas*, *H. salina*, *H. shengliensis*, *H. salifodinae*, *H. pacífica*, *H. Aquamarina* y *H. halophila* fueron aisladas de laguna salina en la India, y fueron capaces de crecer de 0,6 % a 18,6% de NaCl (Sahay *et al.*, 2011).

La especie del generao *Bacillus* ya ha sido reportada en otros trabajos, por ejemplo *Bacillus cereus* fue aislado de pozos de petróleo en Río de Janeiro (Cunha

*et al.*, 2006); *Bacillus firmus* se aisló a partir de un medio asociado con petróleo y mostro capacidad de degradar los hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Mancera *et al.*, 2007); *Bacillus megaterium* fue aislado de aguas residuales de Nigeria, y mostro capacidad de degradar hidrocarburos (Rojo, 2009).

Distintas especies del género *Brevibacterium* fueron aislados de ambientes asociados a petróleos. *Brevibacterium casei* fue aislado de tierra contaminada con petróleo (Farahat & Gendy, 2014); *Brevibacterium celere* se aisló a partir de algas marinas (Ivanova *et al.*, 2004) y *Brevibacterium ammoniilyticum* se aisló de un sistema de tratamiento de aguas residuales y mostró un crecimiento óptimo entre en 0-11% de NaCl (w / v) (Kim *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos, corroboran los datos ya publicados, pero con porcentajes de degradación menores.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos de biodegradación revelaron la preferencia de las bacterias para la degradación de hidrocarburos aromáticos, alcanzando altos porcentajes de degradación, estos valores contrastan con la literatura, que establece que la fracción de compuestos saturados son más fácilmente degradados que los no saturados (Alexander, 1999). Estos resultados se podrían explicar por la capacidad enzimática y preferencias metabólicas que cada micro-organismo tiene para degradar componentes de petróleo, algunos de los cuales degradan preferentemente hidrocarburos lineales, y otros prefieren hidrocarburos aromáticos (Larter *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

- *Bacillus flexus* y *Idiomarina* sp son microorganismos que muestran mejores características para la biodegradación de hidrocarburos.
- Las bacterias analizadas en este estudio representa apenas una fracción de la diversidad cultivable que existe bajo estas condiciones. Muchas otras especies seguramente se seguirán reportando bajo otras condiciones como medio de cultivo, temperatura y condiciones de pH



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, R. M.; Thukair, A.A.; De Beer, D. *Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures*. FEMS Microbiol. Ecol. 290-301, 2006.
- Aboulhassan, M., Souabi, S., Yaacoubi, A., Baudu. M. *Removal of surfactante from industrial wastewaters by coagulation flocculation process*. International journal of Enviromental Science and Technology, 3 (4), 327-332, 2006.
- Alexander, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2da ed. New York: Academic Press. 1999.
- Barcellos, P. P. *Impactos Ambientais da Indústria do Petróleo – da Produção ao Consumo Final*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1986.
- Borzenkov, I.A.; Milekhina, E.I.; Gotoeva, M.T.; Rozanova, E.P.; Belyaev, S.S. *The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam*. Microbiology 75(1):66–72, 2006.
- Bushnell, L.D.; Haas, H.F. *The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms*. 1940.
- Chamkha, M.; Mnif, S.; Sayadi, S. *Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading Geobacillus from a Tunisian hightemperature oil field*. FEMS Microbiol Lett 283:23–29, 2008.
- Choi, D.H.; Cho, B.C. *Idiomarina seosinensis sp. nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea*. Int J Syst Evol Microbiol, 55, 379–383. 2005.
- Cunha, C. D.; Rosado, A.S.; Sebastián, G.V.; Seldin, L.; Von Der Weid, I. *Oil biodegradation by Bacillus strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil*. Appl Microbiol Biotechnol, 73: 949-959. 2006.
- Du, J.; Lai, Q.; Liu, Y.; Du, Y. Liu, X.; Sun, F.; Shao, Z. *Idiomarina atlantica sp. nov., a marine bacterium isolated from the deep sea sediment of the North Atlantic Ocean*. Antonie an Leeuwenhoek, 107:393–401. 2015.
- Echeverri, G. E.; Manjarrez, G., Cabrera, M. *Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia*. NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, 8: 1- 120, 2010.
- Ewing, B. Et Al. *Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. Genome Research, v. 8, p. 175-185, 1998.
- Farahat, L.A.; Gendy, N.S. *Biodegradation of Baleyim Mix Crude Oil in Soil Microcosm by Some Locally Isolated Egyptian Bacterial Strains*. Soil & Sediment Contamination, 17(2):150-162. 2014.
- Gauthier, M.J.; Lafay, B.; Christen, R.; Fernandez, L.; Acquaviva, M.; Bonin, P.; Bertrand, J.C. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium*. Int J Syst Bacteriol 42:568–576, 1992.
- Golyshin, P.N.; Chernikova, T.N.; Abraham, W.R.; Lunsdorf, H.; Timmis, K.N.; Yakimov, M.M. *Oleiphilaceae fam. nov., to include Oleiphilus messinensis gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons*. Int J Syst Evol Micr 52:901–911, 2002.
- Ivanova, E.P.; Christen, R.; Alexeeva, Y.V.; Zhukova, N.V.; Gorshkova, N.M.; Lysenko, A.M.; Mikhailov, V.V.; Nicolau, D.V. *Brevibacterium celere sp. nov., isolated from degraded thallus of a brown alga*. Int J Syst Evol Microbiol, 54(6):2107-11. 2004.
- Johnsen, A.R; Bendixen, K; Karlson, U. *Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator wst-1*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2683–2689. 2002.
- Juhasz, A.L.; Stanley, G.A.; Britz, M.L. *Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas maltophilia strain VUN 10,003*. Lett Appl Microbiol. 30(5):396-401. 2000.
- Kafilzadeh, F.; Mohammad-Sadegh, F.; Tahery, Y. *Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay*. African Journal of Biotechnology. 9(40): 6721-6726. 2010.
- Kim, J.; Srinivasan, S.; You, T.; Bang, J.J.; Park, S.; Lee, S.S. *Brevibacterium ammoniolyticum sp. nov., an ammonia-degrading bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant*. Int J Syst Evol Microbiol, 63(3):1111-8. 2013.
- Kumar, M.; León, V.; De Sistro, M.A.; Ilzins, O.A. *A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp. degrades hydrocarbons and produces tension active emulsifying agent*. World J Microbiol Biotechnol 23:211–220, 2007.
- Kuznetsov, V.D.; Zaitseva, T.A.; Vakulenko, L.V.; Filippova, S.N. *Streptomyces albiacialis sp. nov. a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant Streptomyces*. Microbiol Moscow 61:62–67, 1992.
- Lane, D. J. *16S/23S rRNA sequencing*. In: GOODFELLOW, M.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 115-147, 1991.
- Larter, S. R.; Head, I. M.; Huang, H.; Bennett, B.; Jones, M.; Aplin, A. C.; Murray, A.; Erdmann, M.; Wilhelms, A. *Biodegradation,*

- gas destruction and methane generation in deep subsurface petroleum reservoirs: an overview. *Petroleum Geology: Northwest Europe and global perspectives: Proceedings of the 6th Petroleum Geology Conference Series*. Vol. 6, p. 633. 2005.
- Mackey A, Hodgkinson M. *Assesment of the impact of Naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology; 56: 279–286, 1996
- Mancera, M. E. Et Al. *Fungi and Bacteria Isolated from Two Highly Polluted Soils for Hydrocarbon Degradation*. Acta Chimica Slovenica, 54: 201–209. 2007.
- Margesin, R.; Schinner, F. *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments*. Appl Microbiol Biotechnol 56: 650–663, 2001.
- Mashreghi M, Marialigeti K. *Characterization of bacteria degrading petroleum derivates isolated from contaminated soil and water*. Journal of Sciences. 16(4): 317-320, 2005
- Mnif, S.; Chamkha, M.; Sayadi, S. *Isolation and characterization of Halomonas sp. Strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline condition*. J Appl Microbiol 107: 785-794, 2009.
- Nazina, T.N.; Sokolova, D.S.; Grigoryan, A.A.; Shestakova, N.M.; Mikhailova, E.M.; Poltarau, A.B.; Tourova, T.P.; Lysenko, A.M. *Geobacillus jurassicus sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high temperature petroleum reservoir, and the validation of the Geobacillus species*. Syst Appl Microbiol 28: 43–53, 2005.
- Nemerow, N.L. *Liquid Waste of Industry: Theories, Practices and Treatment*, 1ed. New York, Addison Wesley Publishing Company, 1971.
- Passarini, M.R.Z.; Sette, L.D.; Rodrigues, M.V.N. *Improved extraction method to evaluate selected PHAs degradation by marine fungi grow in fermentative medium*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22: 564-570. 2011.
- Patzelt, H. *Hydrocarbon degradation under hypersaline conditions -some facts, some experiments and many open questions*. Springer, Berlin, pp 105–122, 2005.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. *A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water*. Appl. Environ Microbiol 49: 1-7. 1985.
- Ribeiro, C. M. S. *Ozonizacao de Efluentes da Indústria de Petroleo*. 1995.
- Rojó, F. *Degradation of alkanes by bacteria*. Environmental Microbiology 11: 2477-2490. 2009.
- Sahay, H.; Sing, S.; Kaushik, R.; Saxena, A.K.; Arora, D.K. *Characterization of halophilic bacteria from environmental samples from the brackish water of Pulicat Lake, India*. Biologia 66/5: 741–747. 2011.
- Sass, A.M.; Mckew, B.A.; Sass, H.; Fichtel, J.; Timmis, K.N.; Mcgenity, T.J. *Diversity of Bacillus-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments*. Sal Sys 4:8, 2008.
- Sauer, T. C. *Volatile Liquid Hydrocarbon Characterization of Underwater Vents and Formation Waters from Offshore Production Operations*. Environmental Science & Technology, v. 15, n. 8, p. 917-923, 1991.
- Soolinger, D.; De Hasspe, W.; Hermans P.M.; Groenen, P.; Van Embden J.A. *Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of M. tuberculosis*. J. Microbiology. 31:1987-95, 1993.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. *MEGA 4: Molecular Evolutionary genetics analysis. (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- Thompson, J. D. Et Al. *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucleid Acids Research, v. 24, p. 4876- 4882, 1997.
- Vasconcellos, S. P.; Angolini, C. F. F.; Garcia, I. N. S.; Dellagnezze, B. M.; Silva, C. C.; Marsaioli, A. J.; Neto, E. V. S.; Oliveira, V. M. *Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from brazilian petroleum reservoirs*. Organic Geochem. 41, 675–681. 2010.
- Wang, Y.N.; Cai, H.; Yu, S.L.; Wang, Z.Y.; Liu, J.; Wu, X.L. *Halomonas gudaonensis sp. nov., isolated from a saline*. 2007.
- Yakimov, M.M.; Giuliano, L.; Gentile, G.; Crisafi, E.; Chernikova, T.N.; Abraham, W.R.; Lunsdorf, H.; Timmis, K.N.; Golyshin, P.N. *Oleispira antarctica gen nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water*. Int J Syst Evol Micr 53:779–785, 2003.
- Yakimov, M.M.; Golyshin, P.N.; Lang, S.; Moore, E.R.; Abraham, W.R.; Lunsdorf, H.; Timmis, K.N. *Alcanivorax borkumensis gen. nov, sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium*. Int J Syst Bacteriol 48:339–348, 1998.
- Zhou, H.W.; Luan, T.G.; Zou, F.; Tam, N.F. *Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment*. J Hazard Mater. 152(3):1179-85. 2008.
- Zhuang, X.; Han, Z.; Bai, Z.; Zhuang, G.; Shim, H. *Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil*, Environmental Pollution, 158, 1119–112.2012.

**Correspondencia:** Valeriano Zapana José Antonio

Dirección: Av. Mariano Lino Urquieta Mza. L8, Lote 34 San Antonio, Mariscal Nieto, Moquegua 18001 - Perú  
Correo electrónico: zecavalerianozapana@yahoo.com.br