

Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos

David Tirado-Torres¹, Otilio Acevedo-Sandoval², Claudia Romo-Gómez¹, Yolanda Marmolejo-Santillán¹,
Martha Gayosso-Canales²

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería¹, Instituto de Ciencias Agropecuarias²
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Pachuca de Soto, Hidalgo, México
datira_torres@hotmail.com, gayossoc@yahoo.com.mx

Abstract— Polycyclic aromatic hydrocarbons are compounds highly toxic, carcinogenic and mutagenic for the human. Their insolubility in water is directly proportional to the increase of their molecular weight. Microorganisms play a very important role for bioremediation processes of these contaminants. The use of microbial consortia is a trend for purposes of bioremediation. The aim of this review is provide information on the microbial consortia used in the bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons from petroleum and of the techniques used for the isolation and identification of microbial consortia.

Keyword— *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Bioremediation, Microbial consortium.*

Resumen— Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son altamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos para el hombre. Su insolubilidad en agua es directamente proporcional al aumento de su peso molecular. Los microorganismos desempeñan un papel muy importante en los procesos de biorremediación. El uso de consorcios microbianos para degradar estos contaminantes es una tendencia importante para fines de biorremediación. El objetivo de esta revisión es proporcionar información sobre los consorcios microbianos utilizados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo y de las técnicas de aislamiento e identificación de los consorcios microbianos.

Palabras claves— *Hidrocarburos aromáticos policíclicos, Biorremediación, Consorcio microbiano.*

I. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son altamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos para el ser humano [1]. Su insolubilidad en agua es directamente proporcional al incremento de su peso molecular. Se pueden encontrar tanto en combustibles fósiles, como en carnes y especies vegetales. También son producto de la combustión incompleta de un compuesto orgánico y están asociados a una amplia gama de actividades humanas [2]. Del mismo modo, los compuestos residuales de los incendios forestales contienen altas concentraciones de HAPs [3]. Debido a su toxicidad y recalcitrancia permanecen mucho tiempo en el ambiente; su poca solubilidad en agua hace que no se encuentren en altas concentraciones en ésta, pero presentan mayor concentración en suelo y aire [4].

Aunque existen diversas tecnologías para la eliminación de HAPs, éstas presentan ciertas limitaciones. Los métodos fisicoquímicos y térmicos pueden remover, alterar, aislar o transformar el contaminante a un producto menos peligroso. Los métodos térmicos son muy eficaces para eliminar HAPs del suelo, pero una de las desventajas principales es que generan cenizas y toxinas que pueden ser expulsadas a la atmósfera sino se hace un lavado y purificación de gases. Además, este proceso deja al suelo como un residuo inerte. Por otra parte, su alto costo y consumo de energía hacen a esta tecnología inaplicable en países subdesarrollados [5].

En contra parte, la biorremediación es un proceso viable para remover los hidrocarburos del ambiente y dependiendo del tipo de hidrocarburo, la remediación se logra en días o meses [6]. Además, de ser un tratamiento económico, es amigable con el ambiente, al transformar los compuestos tóxicos en

compuestos no peligrosos o menos peligrosos [7]. En la biorremediación, los microorganismos juegan un papel muy importante en los procesos de degradación, se ha comprobado que las cepas puras o consorcios bacterianos, son capaces de degradar HAPs, usándolos como fuente de carbono [8]. La degradación de estos contaminantes también se logra con hongos, ya sea de forma independiente o en consorcio con bacterias [9]. La biotransformación de los contaminantes por lo regular siempre termina en la mineralización en procesos aerobios, con la producción de H₂O y CO₂; mientras que en procesos anaerobios se obtiene CH₄. Además la biotransformación de los HAPs de peso molecular alto genera metabolitos secundarios [10].

Por lo tanto, para lograr una biorremediación y velocidades de remoción efectivas de un contaminante se deben tomar en cuenta factores como las condiciones ambientales, el tipo de microorganismo y estructura química del compuesto a degradar [11]. La aplicación de consorcios microbianos en la descontaminación de suelos con HAPs suele tener buenos resultados, que se traducen en el aumento de masa microbiana con la consecuente eficiencia de remoción del contaminante. El consorcio microbiano que se implemente para fines de remediación puede ser nativo del sitio contaminado o exógeno [12]. El objetivo de esta revisión es proporcionar información sobre los consorcios microbianos utilizados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo y de las técnicas de aislamiento e identificación de estos consorcios.

II. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CONSORCIOS

En el suelo, los microorganismos se encuentran en poblaciones mixtas, su identificación se consigue mediante el estudio de cepas o consorcios aislados y cultivados. El estudio molecular conduce a la identificación de los microorganismos, aún en poblaciones mixtas [3]. La técnica que más se ha utilizado para adaptar la biota edáfica al contaminante es el medio enriquecido y se aplica antes de aislar a los microorganismos. Consiste en agregar una muestra de suelo a un medio enriquecido que contiene los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para los microorganismos. Las concentraciones y tipos de nutrientes pueden variar en ésta técnica y el contaminante a degradar se añade como fuente de carbono.

Después, sigue la adaptación de la flora microbiana, que además es el principio de la purificación y aislamiento, ya que solo crecerán las células viables. Este proceso lleva de días a meses y en ocasiones el nivel de concentración del contaminante va en aumento. Por lo general los microorganismos mesófilos inoculados en medio enriquecido son incubados en intervalos de temperatura y agitación de 25 a 33°C y 100-250 rpm, respectivamente [13]. Los consorcios degradadores de HAPs son adaptados en medio enriquecido con altas concentraciones del contaminante e incubado a 30°C y 200 rpm por cierto periodo de tiempo. El agar Bushnell Hass y el agar Luria son los medios sólidos más utilizados para iniciar el aislamiento microbiano [14]. Y el agar M9 es un buen medio para el aislamiento de un consorcio o cepa bacteriana [15]. El uso de diluciones seriadas permite obtener colonias separadas y facilita el aislamiento microbiano [16,17].

Asimismo, el uso de métodos moleculares, gracias a su fiabilidad y rapidez, ha permitido identificar un mayor número de especies bacterianas con la capacidad de degradar HAPs, ya sean en forma de consorcio o cepas puras. Para la identificación microbiana, la secuenciación de la región 16S del ARNr es la herramienta más utilizada, ya que este marcador está presente en todas las bacterias y además tiene un buen tamaño para realizar el análisis. La identificación y el análisis filogenético se hace mediante la comparación de secuencias en bases de datos como el GenBank y otras [18]. Además, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se debe tener especial cuidado en la amplificación y purificación del gen 16S ARNr, para aumentar su concentración y evitar problemas de lectura por falta de muestra. Este proceso se acopla con la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) [14].

La PCR es muy importante para identificar especies bacterianas [18], ya se han identificado consorcios degradadores de HAPs, tales como *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pandorea sp.* y *Paenibacillus sp* [15,19]. El ADN se extrae con solventes específicos para hacer la lisis celular sin dañar el material genético de la célula, una vez extraído el ADN, se hace su amplificación. Se han identificado por esta técnica géneros como *Burkholderia spp.*, *Cupriavidus spp.*, *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.* y *Rhodanobacter spp.* [20,21,22]. También *Mesorhizobium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.* y el consorcio M10, aislado de suelos de la Antártida se identificaron por el gen 16S ARNr en PCR-DGGE [23, 24], así como, el consorcio de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia*, degradador de fenantreno [25].

También especies como *Staphylococcus warneri* y *Bacillus pumilus* se han identificado por secuenciación del gen 16S ARNr en DGGE, con un 100% de homología con *S. warneri* y un 99% con *B. pumilus* [26]. De igual manera se identificó el consorcio bacteriano DV-AL, integrado por cuatro cepas: *Achrobacter sp.* BAB239, *Pseudomonas sp.* DV-AL2, *Enterobacter sp.* BAB240 y *Pseudomonas sp.* BAB241 [27]. Y el consorcio N°22, degradador de compuestos aromáticos de un suelo experimental, integrado por *Pandora sp.*, *Hyphomicrobium facile* y *Burkholderia multivorans* [28]. Igualmente se ha extraído el ADN de las células que conforman un consorcio mediante el uso de mini kits, tal es el caso de *Rhizobiales sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brucella sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Microbacterium sp.* y *Roseomonas sp* [29].

La identificación bacteriana del gen 16S ARNr se ha complementado con otras técnicas como el estudio con microscopio electrónico de barrido de la dinámica poblacional en procesos de remediación de suelos [30]; con pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (UKMP-8T), *Rhodococcus sp.* M15-2 (UKMP-5T) y *Rhodococcus sp.* ZH8 (UKMP-/T) [31] y pruebas bioquímicas para un consorcio microbiano, *Sphingobacterium sp.*, *Bacillus cereus* y *Achromobacter insolitus* [32]. En particular, en la actualidad, la identificación de microorganismos degradadores de HAPs mediante PCR-DGGE es la técnica más usada para identificar consorcios bacterianos por medio del gen 16S ARNr.

III. ENSAYOS *IN VITRO*

Los ensayos *in vitro* se utilizan para mantener un sistema controlado en los factores ambientales para lograr un metabolismo óptimo y generar una tasa mayor de degradación del contaminante. Esto se hace en biorreactores a escala piloto, medios líquidos enriquecidos y con suelos, en microcosmos para la remoción de HAPs. Una de las técnicas *in vitro* más importantes para estudiar la cinética de degradación de contaminantes es la bioaumentación [33], se ha realizado estudios en microcosmos para evaluar la degradación de HAPs. La cinética de degradación en microcosmos consiste en agregar inóculo de un consorcio conocido en un frasco que contenga suelo estéril con una concentración conocida del contaminante; el periodo de incubación varía de acuerdo a las condiciones de estudio y oscila de días a meses [23].

Incluso, los consorcios han sido estudiados en temperaturas extremas con el fin de probarlos en campo, las variaciones extremas de los parámetros fisicoquímicos y con contaminantes inorgánicos, como metales pesados da buenos resultados, lo que demuestra la capacidad de los microorganismos para adaptarse a ambientes extremos [26]. También el estudio *in vitro* ha servido para evaluar HAPs de forma individual para elucidar la ruta metabólica del xenobiótico. El fenantreno es uno de HAPs, del que se ha estudiado la ruta de degradación en microcosmos por un consorcio bacteriano; donde las actividades enzimáticas de las deshidrogenasas del consorcio provocan la mineralización del tóxico [14]. También el pireno se ha estudiado en microcosmos por un consorcio de tres basidiomicetos aislados de una composta [34].

Además, el estudio de bioaumentación en laboratorio es de gran ayuda para evaluar los factores incontrolables y las interferencias que se generan al realizar una biorremediación a gran escala [29]. Este tipo de pruebas permite contaminar de manera artificial el suelo, determinar la dinámica tanto del contaminante como del consorcio y tener un mayor control de las concentraciones iniciales de HAPs [30]. También se ha evaluado la capacidad de degradación de ciertos consorcios microbianos en suspensión [35]. Hay reportes de bacterias de la clase *Betaproteobacteria* que degradan fracciones del keroseno en medio mineral [20], de la cinética de degradación solo de la fracción de HAPs [12]. *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia* en forma de consorcio, degradan fenantreno en un medio mineral enriquecido [25]. Otras pruebas *in vitro* que se han aplicado en la degradación de HAPs por consorcios microbianos son la limpieza de zona de rociado en placa y escala bioreactor [36]. Asimismo, *Moraxella saccharolytica*, *Alteromonas putrefaciens*, *K. pneumoniae subsp. aerogenes* y *P. fragi* en forma de consorcio se estudiaron para degradar HAPs en un reactor a escala piloto [37].

IV. CONSORCIOS NATIVOS

Diversos estudios demuestran que los microorganismos autóctonos degradan con mayor facilidad los contaminantes locales, que los provenientes de otras regiones [38]. Cuando las poblaciones microbianas se encuentran en bajas densidades, se puede retardar o no llevar a cabo la degradación del contaminante. Sin embargo, la bioaumentación con la microflora nativa acelera la degradación [39], el uso de consorcios nativos para remediar suelos contaminados con HAPs, es una de las herramientas esenciales para descontaminar un suelo [40]. El proceso de degradación de HAPs en suelos es lento por la flora nativa, por ello el aislamiento e identificación de los microorganismos con capacidad de degradarlos se vuelve una tecnología muy eficiente ya que al bioaumentar un suelo se incrementa la velocidad de degradación del contaminante [23]. Los estudios de degradación biótica de HAPs con concentraciones del contaminante de 300 a 1000 ppm reportan como degradadores a *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Marinobacter*, entre otras [15]. Las especies nativas evaluadas son *Bacillus sp.* ASP1, *Pseudomonas sp.* ASP2, *Stenotrophomonas maltophilia* ASP3, *Staphylococcus sp.* ASP4, *Geobacillus sp.* ASP5 y *Alcaligenes sp.* ASP6, aisladas de sedimentos del astillero Alang-Sosiya, India [14].

La importancia del uso de consorcios estriba en que en ocasiones un solo microorganismo no es capaz de degradar completamente el contaminante, generando metabolitos secundarios, que otra especie es capaz de transformar en metabolitos más simples o lograr la degradación completa [18]. El primer paso para estudiar un microorganismo degradador es aislarlo de suelos contaminados por algún hidrocarburo, ya sea de campos petroleros [41,42], plantas químicas de coque [43], refinerías antiguas [32] e incluso de suelos antárticos contaminados con diesel [24]. Para degradar HAPs también se aíslan bacterias en forma de consorcios de sedimentos en manglares, que tienen potencial para su uso en la remediación de suelos [44]. Tal es el caso del consorcio formado por *Achromobacter sp.* BAB239, *Pseudomonas sp.* DV-AL2, *Enterobacter sp.* BAB240 y *Pseudomonas sp.* BAB241, aislado de sedimentos del patio de un puerto en Gujarat, India, este consorcio degrada naftaleno en presencia de otros hidrocarburos y puede utilizar otros hidrocarburos como fuente de carbono [27].

Diversos estudios destinados a aislar consorcios de suelos contaminados con HAPs prueban su eficacia en la degradación de contaminantes de forma individual [45,46], como el fenantreno [47]. Los consorcios aislados no solo están formados por bacterias, también hay hongos que degradan estos contaminantes, un ejemplo claro son los hongos de la pudrición blanca [48]. Además hay aislados consorcios nativos que estimulan la degradación de hidrocarburos mediante la producción de surfactantes, estos tensoactivos hacen que el contaminante esté más disponible, mediante la

emulsificación de los hidrocarburos y así ser asimilados por los microorganismos [48]. También hay consorcios nativos halófilos con potencial de aplicación en suelos salinos contaminados con HAPs [36,49,50].

V. CONSORCIOS PREPARADOS

El uso de consorcios preparados es otra herramienta de biorremediación de suelos, que se utiliza en suelos contaminados, donde la flora nativa no presenta capacidad para degradar HAPs, también se emplea para formar un consorcio de mayor capacidad degradativa. Los consorcios artificiales se forman con flora nativa combinada con cepas exógenas, algunos consorcios de hongos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella sp.*, *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*) con bacterias (*Bacillus sp.*, *Zoogloea sp.* y *Flavobacterium sp.*) se preparan para remediar suelos contaminados con HAPs [51].

También hay consorcios de microalgas-bacterias para mejorar la degradación de dichos tóxicos, como el de *Sphingomonas* GYB2 y *Burkholderia cepacia* GS3C, junto con *Pseudomonas* GP3A y *Pandorea pnomenusa* GP3B, ambas especies formar un consorcio artificial que no solo degrada HAPs, sino que también degrada los hidrocarburos alifáticos [52]. *Pseudomonas aeruginosa* (UKMP-8T), *Rhodococcus sp.* M15-2 (UKMP-5T) y *Rhodococcus sp.* ZH8 (UKMP-/T) son otras de las especies combinadas en laboratorio para probar su capacidad de degradación [31]. En laboratorio se estudian en consorcio cepas bacterianas obtenidas de diferentes ambientes, y así probar su capacidad de degradación de las fracciones de diesel y petróleo [53]. *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia* degradan HAPs, tanto en forma individual como en consorcio, con una tasa de degradación mayor en forma de consorcio [25].

VI. CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE HAPs

El uso de consorcios microbianos para degradar fracciones de hidrocarburos genera muchos estudios que comprueban la importancia de los microorganismos para fines de biorremediación. Entre las fracciones más peligrosas del petróleo se encuentran los HAPs, presentan una gran problemática para la salud humana. La identificación de las fracciones del petróleo degradadas por consorcios microbianos se lleva a cabo por pruebas de degradación y su cuantificación por métodos cromatográficos [54]. La cinética de degradación depende de distintos factores como son la concentración del contaminante, concentración de HAPs, tiempo de incubación, medio utilizado, así como los factores ambientales de incubación y sobre todo el tipo de microorganismo (Cuadro I).

CUADRO I. Cinética de degradación de HAPs por consorcios microbianos

Consortio	HAPs	Concentración mg/kg	Periodo de incubación (días)	% de degradación	Referencia
ASP	Fenantreno	300	5	67	[14]
	Naftaleno	1000	2	100	
5BAC	THAPs	600	84	85	[30]
MAB	THAPs	9.36	56	35.8	[23]
BSBA	THAPs	125	129	84	[57]
5H3B	THAPs	8.15	64	41.3	[51]

THAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos totales

La capacidad para degradar petróleo de consorcios tiene una tasa mayor al 80%. Algunos resultados revelan que la bioaumentación con un consorcio es más eficaz para la degradación de los componentes

aromáticos hasta en un 68% [53]. Los consorcios bacterianos degradan HAPs de bajo y alto peso molecular entre un 54% y 99% [55]. La degradación de fenantreno por un consorcio nativo registra una degradación de 100%, 57% y 26% en concentraciones de 100 mg/L, 250 mg/L y 500 mg/L, en medio líquido [32].

También los consorcios logran degradar fracciones del petróleo en suelo con una tasa del 52% del petróleo crudo con concentraciones iniciales de 10,000 mg/L en un medio líquido [29]. El fenantreno es el HAP más estudiado en su forma individual, en concentraciones de 200 mg/L es degradado hasta en un 71.4% [56]. Consorcios del *filum Betaproteobacteria* se han estudiado para degradar las fracciones aromáticas del keroseno en tres días. En la prueba experimental en un medio líquido con 1% de keroseno se observa la degradación preferente de las fracciones aromáticas, que son las más tóxicas [20,21].

Por otra parte, los consorcios aislados de composta degradan pireno en un suelo contaminado, el consorcio remueve 56 de 100 mg de pireno/kg de suelo, en 28 días de incubación [34]. Sin embargo, hay consorcios microbianos que degradan hasta 76% de los hidrocarburos totales aunque prefieren degradar las fracciones alifáticas en vez de las fracciones aromáticas [58]. Mientras que, los consorcios halófilos estudiados degradan fenantreno hasta un 90% en seis días con condiciones de salinidad de 5% [50]. Otros consorcios halotolerantes degradan hasta 79% de HAPs en cuatro días, en medios líquidos con concentraciones salinas de 60 g/L [36].

También un consorcio del *filum Proteobacteria* degrada HAPs con cinéticas de degradación de 83% y 96% de pireno y fluoranteno en ocho días de incubación a una temperatura de 30°C y una tasa de degradación de 65% para el benzo [a] pireno [43]. Además, el consorcio DV-AL degrada hasta 1000 ppm de fenantreno con una tasa de degradación de 80 mg/h [27]. Asimismo *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans* y el hongo *Fusarium oxysporum* en forma de consorcio degradan en 70 días de incubación 99%, 99% y 96% de HAPs, a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/kg de suelo, respectivamente [59].

VII. CONCLUSIONES

El medio enriquecido es el más utilizado para adaptar bacterias en las técnicas de aislamiento e identificación de consorcios microbianos y poder usar el contaminante como única fuente de carbono. Asimismo, la técnica de diluciones seriadas junto con el estriado en placa son las estrategias más útiles si lo que se busca es aislar microorganismos. Además, gracias a las técnicas moleculares hoy en día, es más fácil y confiable identificar tanto una cepa microbiana, como un consorcio y la identificación del gen 16S ARNr por PCR-DGGE es la técnica más usada. El desarrollo de estrategias de remediación eficientes requiere del conocimiento de los parámetros ambientales y funcionamiento metabólico que rigen a un consorcio microbiano. Estas condiciones son obtenidas gracias a los ensayos *in vitro* que se realizan con los microorganismos y son una parte integral para gestionar y controlar los procesos de biorremediación. El uso de consorcios nativos para remediar suelos contaminados con HAPs muestra un gran potencial para su uso en la biorremediación. La exposición prolongada de los consorcios a los HAPs los hace más eficientes para degradar el contaminante como única fuente de carbono. Las ventajas que se obtienen con un consorcio nativo es que se forma de manera natural y tiene mayor potencial para la degradación. En cuanto a los consorcios preparados en laboratorio se tienen ventajas y desventajas, las ventajas son se forman consorcios con cinéticas de degradación más eficientes y que toleran concentraciones más altas de contaminante. Una gran desventaja de los consorcios preparados es la dificultad para formarlos y que estos convivan de manera armoniosa y que no compitan por el

sustrato y el espacio. No obstante en el estudio de los consorcios se observa que aún hay parámetros no establecidos que limitan la biodegradación del contaminante. Los resultados de la degradación de los HAPs en medio líquido son inaplicables al uso de los consorcios en la remediación de un suelo contaminado con petróleo, además es difícil predecir si el consorcio degradará la fracción de los compuestos aromáticos o preferirá los hidrocarburos alifáticos o tal vez presente inhibición por las demás fracciones presentes. Mientras que las cinéticas de degradación obtenidas por consorcios microbianos en experimentos con suelo en microcosmos tienen más probabilidad de éxito al implementarse en campo para la remediación de suelos.

REFERENCIAS

- [1] Wang, Y., & Tam, N. (2011). Microbial community dynamics and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted marine sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 63(1), 424-430.
- [2] Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., & Leyval, C. (2012). PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68(1), 28-35.
- [3] Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, S., & Andreoni, V. (2011). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: A feasibility study in solid and slurry-phase microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 191-197.
- [4] Juhász, A.L., & Ravendra, N. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1), 57-88.
- [5] Haritash, A., & Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1), 1-15.
- [6] Lisiecki, P., Chrzanowski, L., Szulc, A., Ławniczak, L., Białas, W., Dziadas, M., & Heipieper, H.J. (2014). Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel*, 116(1), 321-327.
- [7] Shi, Z., Tian, L., & Zhang, Y. (2010). Molecular biology approaches for understanding microbial polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. *Acta Ecologica Sinica*, 30(1), 292-295.
- [8] Wolicka, D., Agnieszka, S., Borkowski, A., & Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, 100(1), 3221-3227.
- [9] Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Wang, Z., & Xu, P. (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology*, 101(1), 8452-8456.
- [10] Gan, S., Lau, E., & Ng, H. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), 532-549.
- [11] Lors, C., Damidot, D., Ponge, J.F., & Périé, F. (2012). Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAHs-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution*, 165(1), 11-17.
- [12] Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., & Dick, W.A. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environmental Pollution*, 178(1), 152-158.

- [13] Dashti, N., Khanafer, M., El-Nemr, I., Sorkhoh, N., Ali, N., & Radwan, S. (2009). The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*, 74(1), 1354-1359.
- [14] Patel, V., Patel, J., & Madamwar, D. (2013). Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 199-207.
- [15] Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2012). Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation*, 23(6), 823-835.
- [16] Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Diels, L., & Damidot, D. (2010). Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, 81(1), 1263-1271.
- [17] Greenwood, P.F., Wibrow, S., George, S.J., & Tibbett, M. (2009). Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Organic Geochemistry*, 40(1), 293-300.
- [18] Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formane, P., Martinez-Chois, C., & Falla, J. (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of the Total Environment*, 409(1), 4489-4495.
- [19] Cerqueira, V., Hollenbach, E., Maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Peralba, M., & Bento, F. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(1), 11003-11010.
- [20] Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2010). Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(8), 702-710.
- [21] Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2011). Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects degradation pattern in aliphatic-aromatic hydrocarbon binary mixtures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 1109-1117.
- [22] Bacosa, H., Suto, K., & Inoue, C. (2012). Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74(1), 109-115.
- [23] Mao, J., Luo, Y., Teng, Y., & Li, Z. (2012). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70(1), 141-147.
- [24] Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Cristie-Oleza, J., Ferrero, M., & Cormack, W. P. (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: Towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77(1), 22-30.
- [25] Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., & Park, J.M. (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 293-298.
- [26] Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F., & Sanromán, M. (2012). Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*, 119(1), 270-276.
- [27] Patel, V., Jain, S., & Madamwar, D. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresource Technology*, 107(1), 122-130.

- [28] Ozaki, S., Kishimoto, N., & Fujita, T. (2007). Change in the predominant bacteria in microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. *Microbes and Environments*, 22(2), 128-135.
- [29] Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., & Wu, W.M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 1244-1248.
- [30] Silva, I., da Costa-dos Santos, E., Ragagnin de Menezes, C., Fonseca de Faria, A., Franciscan, E., Grossman, M., & Durrant, L.R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100(20), 4669-4675.
- [31] Hamzah, A., Phan, C.W., Abu-Bakar, N.F., & Wong, K.K. (2013). Biodegradation of Crude Oil by constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacterial Isolated From Malaysia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 1-10.
- [32] Janbandhu, A., & Fulekar, M.H. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1), 333-340.
- [33] Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.O., & Lugtenberg, B.J. (2004). Rhizoremediation. A beneficial plant microbe interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(1), 6-15.
- [34] Anastasi, A., Coppola, T., Prigione, V., & Varese, G.C. (2009). Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1), 1229-1233.
- [35] Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., & Gong, Z. (2008). Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials*, 150(1), 21-26.
- [36] Arulazhagan, P., & Vasudevan, N. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum sp.* VA1. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 388-394.
- [37] Sharma, A., & Rehman, M.B. (2009). Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon in soil by indigenous bacterial consortium. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(9), 766-769.
- [38] Genside, A.F., Agbo, E.B., Agbo, M.O., & Dike, E.F. (2008). Bioremediation of Some Nigerian and Arabian Crude Oils by Fungal Isolates. *Int. J. Pure App*, 2(3), 37-44.
- [39] D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., & Petruccioli, M. (2006). Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 28-36.
- [40] Wang, C., Wang, F., Wang, T., Bian, Y., Yang, X., & Jiang, X. (2010). PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). *Journal of Hazardous Materials*, 176(1), 41-47.
- [41] Ozaki, S., Kishimoto, N., & Fujita, T. (2007). Change in the predominant bacteria in microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. *Microbes and Environments*, 22(2), 128-135.
- [42] Xu, N., Bao, M., Sun, P., & Ly, Y. (2013). Study on Bioadsorption and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Microbial Consortium. *Bioresource Technology*.
- [43] Sun, R., Jin, J.H., Sun, G.D., Liu, Y., & Liu, Z.P. (2010). Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial consortium from contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences-China*, 22(10), 1576-1585.

- [44] HuiJie, L., CaiYun, Y., Yun, T., GuangHui, L., & TianLing, Z. (2011). Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 269-275.
- [45] Tang, J.Z., Feng, T.C., Cui, C.Z., & Feng, Y.Y. (2013). Simultaneous biodegradation of phenanthrene and oxidation of arsenite by dual-functional bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82(1), 173-179.
- [46] Festa, F., Coppotelli, B.M., & Morelli, I.S. (2013). Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1), 42-51.
- [47] Chen, B., Wang, Y., & Hu, D. (2010). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 179(01), 845-851.
- [48] Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., & Niazi, A. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 292-300.
- [49] Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D., & Grifoll, M. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *Fems Microbiology Ecology*, 73(2), 349-362.
- [50] Dastgheib, S.M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Shavandi, M., & Ventosa, A. (2012). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Applied microbiology and Biotechnology*, 95(3), 789-798.
- [51] Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, M., & Chukwuka, K. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172(02), 601-605.
- [52] Tang, X., He, L., Tao, X., Dang, Z., Guo, C., Lu, G., & Yi, X. (2010). Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1), 1158-1162.
- [53] Grace-Liu, P.W., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T., & Cheng, S.S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 1119-1127.
- [54] Kumar, M., Wu, P.C., Tsai, J.C., & Lin, J.G. (2009). Biodegradation of soil-applied polycyclic aromatic hydrocarbons by sulfate-reducing bacterial consortium. *Journal Environmental Science and Health Part a Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 44(1), 12-20.
- [55] Simarro, R., Gonzalez, N., Bautista, L.F., & Molina, M.C. (2013). Biodegradation of high-molecular eight polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-degrading consortium at low temperatures. *Fems microbiology Ecology*, 83(2), 438-449.
- [56] Tang, J.Z., Feng, T.C., Cui, C.Z., & Feng, Y.Y. (2013). Simultaneous biodegradation of phenanthrene and oxidation of arsenite by dual-functional bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82(1), 173-179.
- [57] Chagas-Spinelli, A., Kato, M., de Lima, E., & Gavazza, S. (2012). Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*, 113(1), 510-516.
- [58] Mukherjee, A.K., & Bordoloi, N.K. (2011). Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(3), 471-478.
- [59] Jacques, R.J., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C., & Camargo, F.A. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(7), 2637-264.