

## Article:

# Preliminary Evaluation of the Dearomatization Capacity of Bacterial Isolates on a Refinery Current (Light Cycle Oil)

Francis Gómez<sup>1,3\*</sup> , Laynet Puentes<sup>1</sup> , Angela De Sisto<sup>1</sup> ,  
Antonietta Porco<sup>2</sup> , Paulino Betancourt<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Dirección de Energía y Ambiente, Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Sartenejas, Caracas, Venezuela

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética Molecular Humana, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, Caracas, Venezuela

<sup>3</sup>Laboratorio de Desarrollo de Procesos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Recibido: noviembre, 2020

Aceptado: diciembre, 2020.

\*Autor para correspondencia: F. Gómez e-mail: francisbgomez86@gmail.com.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4625781>

## Abstract

Light Cycle Oil (LCO) is a by-product of Fluidized Catalytic Fractionation (FCC) considered a poor-quality diesel due to its high content of sulfur (3% by weight) and aromatic compounds (50-80% by weight) which has been enhanced by i) aromatic saturation (ASAT), ii) mild hydrocracking, and iii) aromatic saturation followed by selective ring opening (SRO) of naphthenic structures. On the other hand, it has been reported that different bacterial genera degrade aromatic compounds in a simple and economical way. Consequently, in this work, the ability of bacterial isolates to degrade naphthalene and other aromatic compounds present in an LCO from the Puerto La Cruz refinery (Anzoátegui State-Venezuela) was evaluated. Using UV-Visible spectroscopy, a decrease in naphthalene present in the LCO was observed from 24 to 44% approximately and by Fourier Transform Infrared spectroscopy, a decrease in aromatic compounds from 27 to 45%. The results suggest that the bacterial isolates evaluated are capable of using the aromatic compounds present in the LCO as a source of carbon and energy, leaving their consequent effect on the quality of the LCO obtained to be evaluated.

**Keywords:** bacterial isolates; light cycle oil; naphthalene; biocatalysis.

## Artículo:

# Evaluación preliminar de la capacidad de desaromatización de aislados bacterianos sobre una corriente de refinería (Light Cycle Oil)

## Resumen

El aceite de ciclo liviano (Light Cycle Oil, LCO por sus siglas en inglés) es un subproducto del Fraccionamiento Catalítico Fluidizado (FCC) considerado un diésel de mala calidad debido a su alto contenido de azufre (3% en peso) y compuestos aromáticos (50–80% en peso) que ha sido mejorado por i) saturación aromática (ASAT), ii) hidrocrqueo suave y iii) saturación aromática seguida de apertura selectiva del anillo (SRO) de estructuras nafténicas. Por otra parte, se ha reportado que diferentes géneros bacterianos degradan compuestos aromáticos de forma sencilla y económica. En consecuencia, en este trabajo se evaluó la capacidad de aislados bacterianos para degradar naftaleno y otros compuestos aromáticos presentes en un LCO, proveniente de la refinería de Puerto La Cruz (Estado Anzoátegui-Venezuela). Mediante espectroscopia de UV-Visible fue observada la obtención de una disminución del naftaleno presente en el LCO del 24 al 44% aproximadamente y por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier, una disminución de compuestos aromáticos del 27 al 45%. Los resultados sugieren que los aislados bacterianos evaluados son capaces de utilizar los compuestos aromáticos presentes en el LCO como fuente de carbono y energía, quedando por evaluar su consecuente efecto sobre la calidad del LCO obtenido.

**Palabras clave:** aislados bacterianos; aceite de ciclo liviano; naftaleno; biocatálisis.

## 1. Introducción

Debido a la gran dependencia de los combustibles fósiles, la sociedad enfrenta actualmente problemas ambientales severos, como el cambio climático y la contaminación del aire. Williams *et al.* [1] han informado que los combustibles fósiles con un alto contenido poliaromático promueven la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Los HAP son contaminantes orgánicos recalcitrantes que afectan al ambiente y son un problema crítico de salud pública debido a sus efectos tóxicos y/o propiedades cancerígenas. En vista de estos efectos, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. EPA) enumeró dieciséis HAP como contaminantes prioritarios [2]. Entonces, la mayoría de los países exigen concentraciones de azufre y aromáticos policíclicos de menos del 8% en peso y 10 ppm en diésel, respectivamente [1]; lo que conlleva a las refinerías de petróleo a la necesidad de actualizar o convertir muchas corrientes pesadas, como el aceite de ciclo liviano (LCO) de la unidad de Fraccionamiento Catalítico Fluidizado (FCC) y residuos de vacío (RV).

Actualmente, los LCO de rango de ebullición diésel se utilizan como aditivo y mejorador de la viscosidad para pool de diésel; sin embargo, sus aplicaciones serán limitadas en el futuro debido a su alto contenido de aromáticos, que puede alcanzar más de 80% en peso de diaromáticos que representan más del 70%, así como su alto contenido de azufre y de nitrógeno [3]. La conversión de LCO a diésel atrajo un gran interés académico e industrial como una solución a largo plazo, por ello se mejora mediante: i) saturación aromática (ASAT), ii) hidrocraqueo suave y iii) saturación aromática seguida de apertura selectiva del anillo (SRO) de estructuras nafténicas [4], que en algunos casos adicionalmente necesita la suma de aditivos químicos para acortar el encendido del motor [2], ocasionando efectos ambientales negativos y altos costos.

Sin embargo, por otra parte, varios investigadores han reportado que diferentes géneros bacterianos degradan compuestos aromáticos policíclicos principalmente naftaleno, fenantreno, pireno, entre otros, demostrado un alto grado de especificidad

y eficiencia catalítica que requieren condiciones moderadas de presión y temperatura [5]–[10].

Umar y Umar [11] analizaron los principales microorganismos implicados en degradar o transformar HAP, las principales vías de degradación aeróbica y anaeróbica, además de los factores que afectan el metabolismo microbiano de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Ghosal, *et al.* [12] proporcionaron una descripción general sobre la degradación y transformación de los HAP mediada por bacterias, arqueas halófilas, hongos y algas; también destacan los factores que afectan la degradación de los HAP en el medio ambiente, avances en técnicas genéticas, genómicas, proteómicas y metabolómicas con el objetivo de facilitar el desarrollo de una nueva perspectiva sobre la biorremediación de los HAP en el medio ambiente.

Considerando lo antes descrito, el objetivo del presente trabajo fue realizar la evaluación preliminar de aislados bacterianos para degradar naftaleno y otros compuestos aromáticos presentes en un LCO, proveniente de la refinería de Puerto La Cruz (Estado Anzoátegui–Venezuela).

## 2. Experimental

### Reactivos

Medio mineral M9 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM,  $\text{NaHPO}_4$  40 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM,  $\text{NaCl}$  8 mM) suplementado con  $\text{MgSO}_4$  1 M,  $\text{FeCl}_3$  0,5 M,  $\text{CaCl}_2$  1 M y solución de microelementos en 1 L de agua desionizada.

### Equipos

Estufa de incubación Labnet, espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25 y espectrofotómetro de infrarrojo con transformada (FT-IR) de Fourier Perkin Elmer.

### Aislados bacterianos evaluados

Los microorganismos que se emplearon en el presente estudio se aislaron a partir de un aceite de ciclo liviano LCO (proveniente de la refinería de Puerto La Cruz). Se evaluaron sus capacidades metabólicas para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, con especial énfasis en el

naftaleno [13]. La Tabla 1 muestra los resultados de las caracterizaciones químicas y microbiológicas realizadas.

Tabla 1: Degradación de naftaleno por aislados bacterianos

Aislados bacterianos	% degradación de naftaleno
D	69,51 ± 0,02
E	66,27 ± 0,01
80-1	65.70 ± 0,01

### Biodegradación de compuestos aromáticos presentes en Light Cycle Oil

Los ensayos de degradación fueron realizados en matraces estériles de 250 mL, conteniendo 50 mL de Medio mineral M9 suplementado y el 10% de LCO (filtrado) como fuente de carbono. Se inocularon de manera independiente con cada aislado bacteriano (0,10 de D.O<sub>(610 nm)</sub>) y pre-crecidos en un medio mineral con naftaleno). Los cultivos fueron incubados a 30 °C, 200 rpm (Agitador orbital) durante 30 días. Los ensayos se realizaron por triplicado y un grupo de matraces sin inóculo fueron empleados como control abiótico.

### Caracterización fisicoquímica de los ensayos biocatalíticos en Light Cycle Oil

La capacidad microbiana en la degradación de hidrocarburos se puede evaluar a través del crecimiento, el uso de hidrocarburos como única fuente de carbono (disminución), y los metabolitos secundarios producidos por los microbios [14].

El crecimiento de cada aislado bacteriano se monitoreó tomando alícuotas de 1 mL (libres del extracto orgánico) y leyéndolas en un espectrofotómetro a 610 nm, esto con la finalidad de evaluar el potencial de estos microorganismos de utilizar moléculas poliaromáticas presentes en el LCO como fuente de carbono y energía [5]-[14].

Por otra parte, a fin de determinar la disminución del naftaleno, se midió la absorbancia a 276 nm del extracto orgánico (LCO inicial y final), ya que a esta longitud de onda se obtiene la señal característica del naftaleno y por medio de una curva de calibración previamente elaborada, se pudo

determinar la variación de este compuesto presente en el LCO [14].

Finalmente, se analizaron los extractos orgánicos (LCO) antes y después de los biotratamientos mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR), con la intención de evidenciar la variación de los compuestos aromáticos y alifáticos presentes en el LCO. Para ello, se colocaron directamente muestras del LCO evaluado sobre ventanas de KCl para la obtención de su espectro, y mediante la medición del área bajo las bandas correspondientes con las frecuencias 2953, 2926, 2872, 1700, 1600, 1460, 1376, 1030, 864, 814, 743 y 724 cm<sup>-1</sup> y el área entre 3000-2700 cm<sup>-1</sup> se obtuvieron los índices de aromaticidad ( $A_{1600}/\Sigma A$ ) y de alifaticidad ( $(A_{1460}+A_{1376})/\Sigma A$ ) de Permanyer *et al.* [15]-[19].

## 3. Resultados y análisis de resultados

### Aislados bacterianos evaluados

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados a partir de una corriente de refinación, el aceite de ciclo liviano (LCO) con un alto contenido de azufre (3% en peso) y compuestos aromáticos (50–80% en peso). Toleraron y crecieron en el diaromático naftaleno [13] y mantuvieron su viabilidad en presencia de un medio mineral suplementado con un 10% de LCO.

En este contexto, diferentes autores han reportados la presencia de grupos bacterianos (Gram positivos y negativos) en combustibles, aguas, suelos y sedimentos contaminados con hidrocarburos un antecedente importante asociado con la capacidad de tolerancia a este tipo de contaminantes y una de las características que debe ser considerada para seleccionar potenciales microorganismos en procesos degradativos [20]-[25].

Algunos microorganismos tienen la capacidad de degradar compuestos aromáticos ya que presentan en su material genético, genes (ubicados cromosoma o plásmidos) que codifican diversas enzimas específicas de rutas metabólicas asociadas a estos compuestos. La capacidad de degradación está sujeta a diferentes variables donde destacan: naturaleza química y concentración del compuesto a

ser degradado, disponibilidad, concentración inicial de células, oxígeno disuelto, temperatura, adición de otras fuentes de carbono, entre otras [26]-[29].

Los compuestos aromáticos pueden ser potencialmente tóxicos para los microorganismos, incluso para aquellos que pueden degradarlos. Por su naturaleza lipofílica se acumulan en las membranas citoplasmáticas, aumentando su fluidez y pudiendo llegar a lisar la membrana causando muerte celular [30, 31].

Una estrategia para mantener la viabilidad en presencia de compuestos aromáticos potencialmente tóxicos para la célula, independientemente de su capacidad para degradar estos compuestos, consiste en desarrollar mecanismos de tolerancia. Estos han sido bien estudiados en algunos géneros como pseudomonas y algunos de ellos parecen ser comunes a otras bacterias Gram negativas como *Vibrio* o *Escherichia coli*, así como a Gram positivas como por ejemplo *Clostridium acetobutylicum*. Incluyen: a) alteraciones a nivel de permeabilidad de la membrana; b) expulsión de los compuestos tóxicos mediante bombas; c) activación de mecanismos de reparación del ADN, chaperonas y respuesta a estrés oxidativo, y d) cambios en el metabolismo energético [32]-[36].

Ramos et al. [33, 34] presentan un resultado bien interesante fue reportado por Oleaza et al., quienes encontraron cambios en el proteoma de la bacteria *Ruegeria pomeroyi* tras la exposición a naftaleno y diesel, también en otros siete aislados bacterianos. Observaron que tras la exposición a naftaleno de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3T se detectaba una mayor abundancia de ciertas proteínas que podían estar implicadas en la estabilización de la membrana, así como de bombas de expulsión y de una proteína que podía estar implicada en la detoxificación celular. Adicionalmente, Ramos et al. también reportaron un incremento de la expresión de proteínas implicadas en la reducción del estrés oxidativo y chaperonas.

### Biodegradación y caracterización fisicoquímica de los ensayos biocatalíticos de compuestos aromáticos en LCO

Al culminar los 30 días de ensayo, se observó turbidez en los extractos acuosos, por ello se midió

la densidad óptica a 610 nm, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores de densidad óptica a 610 nm

muestra	Densidad óptica a 610nm	
	inicial	final
D	$0,1020 \pm 0,0004$	$0,6872 \pm 0,0002$
E	$0,1398 \pm 0,0003$	$0,8785 \pm 0,0001$
80-1	$0,1276 \pm 0,0003$	$0,5784 \pm 0,0002$
Control	$0,0002 \pm 0,0001$	$0,0002 \pm 0,0001$

Con el aumento de la absorbancia a 610 nm, se evidenció el crecimiento de cada aislado bacteriano en medio mineral M9 suplementado y 10% de LCO. Alcanzándose valores de 0,68, 0,87 y 0,50 unidades de absorbancia respectivamente, después de 30 días de ensayo. El incremento en los valores de la D.O bajo las condiciones experimentales ensayadas (concentración de inóculo, condición de pre-crecimiento en naftaleno, 30 °C, 200 rpm y pH 7) sugiere que estos microorganismos son capaces de asimilar los compuestos poliaromáticos presentes en el LCO, como fuente de carbono y energía [5]-[14].

El crecimiento celular depende en gran medida de la capacidad que tiene un microorganismo para degradar un sustrato, transformándolo en un producto de interés. En ese sentido, la tasa de biodegradación de un compuesto está relacionada con la tasa de formación de biomasa, por consiguiente, la cinética de crecimiento resulta muy útil si se quiere evaluar la capacidad de una cepa bacteriana particular para degradar un sustrato, puesto que permite obtener una evidencia indirecta de la asimilación del contaminante por el microorganismo, así como otros factores ambientales fundamentales dentro del proceso [26].

El monitoreo de la biodegradación del compuesto de interés se puede realizar de forma directa, esto cuantificando en el tiempo la reducción en concentración de estos, mediante técnicas cromatografías, espectrofotométricas, gravimétricas, entre otras [26].

A los fines de evaluar la capacidad de cada aislado bacteriano para degradar compuestos aromáticos presentes en el LCO, se realizaron determinaciones espectrofotométricas a dos longitudes de ondas dife-



rentes, 304 nm para un metabolito asociado a la ruta metabólica de naftaleno y 276 para este mismo diaromático (uno de los compuestos más abundante en el LCO).

Tabla 3: Estimación de la formación de salicilato en los extractos acuosos

muestra	señal a 304nm	% formación de salicilato
D	0,4677 ± 0,0003	27,40 ± 0,01
E	0,4706 ± 0,0002	28,20 ± 0,02
80-1	0,4205 ± 0,0001	14,55 ± 0,01
Control	0,3667 ± 0,0001	-0,10 ± 0,01
Inicial	0,3671 ± 0,0003	-

La Tabla 3 presenta los valores de la señal a 304 nm del extracto acuoso de cada uno de los ensayos biocatalíticos. Se observa un incremento en los valores de la D.O a 304 nm (inicial vs final) y un incremento del porcentaje de formación del salicilato en los extractos acuosos correspondientes a los aislados bacterianos E, D en relación al aislado 80-1.

Tabla 4: Estimación de la disminución de naftaleno en los extractos orgánicos (LCO)

muestra	Señal a 276 nm	% disminución de naftaleno
D	0,3756 ± 0,0001	41,39 ± 0,01
E	0,3584 ± 0,0001	44,08 ± 0,02
80-1	0,4862 ± 0,0002	24,14 ± 0,01
Control	0,6398 ± 0,0001	0,17 ± 0,01
Inicial	0,6409 ± 0,0003	-

En cuanto a la estimación de la absorbancia en el extracto orgánico (LCO) de cada ensayo experimental, se observa una disminución a 276 nm, lo que se traduce en una disminución de la concentración de naftaleno presente en el LCO después de 30 días (rango entre 24 y 44 %). Estos resultados sugieren (Tabla 4) que los aislados bacterianos utilizados en el presente trabajo, degradaron de manera diferencial el naftaleno presente en el LCO.

Finalmente y a los fines de evaluar la capacidad de cada aislado bacteriano para degradar compuestos aromáticos presentes en el LCO, se realizaron determinaciones químicas de los extractos orgánicos de cada ensayo biocatalítico. Se utilizó la espec-

troscopia FT-IR que permite una caracterización rápida y simultánea de varios grupos funcionales presentes en moléculas biológicas (alifáticos, aromáticos, cicloalcanos, lípidos y cetonas) y en estructuras complejas esto por sus vibraciones en bandas especiales [37, 38].

La Figura 1 presenta los espectros de FT-IR de las muestras de LCO de cada ensayo biocatalítico.

Tabla 5: Evaluación de la variación de compuestos aromáticos

muestra	índice de aromaticidad	% disminución de aromaticidad
D	0,05823 ± 0,00001	44,39 ± 0,01
E	0,05736 ± 0,00001	45,22 ± 0,01
80-1	0,07618 ± 0,00001	27,23 ± 0,01
Control	0,10474 ± 0,00001	-0,04 ± 0,01
Inicial	0,10470 ± 0,00001	-

Al considerar las áreas bajo las curvas de las señales fueron obtenidos los valores mostrados en la Tabla 5 de índice de aromaticidad y en la Tabla 6 los índices de alifaticidad, a su vez se reportan las variaciones porcentuales de estas medidas.

Tabla 6: Evaluación de la variación de compuestos alifáticos

muestra	índice de alifaticidad	% variación de alifaticidad
D	0,33849 ± 0,00001	2,22 ± 0,01
E	0,33380 ± 0,00001	3,57 ± 0,01
80-1	0,31935 ± 0,00001	7,75 ± 0,01
Control	0,33837 ± 0,00001	2,25 ± 0,01
Inicial	0,34617 ± 0,00001	-

Como se puede observar en la Tabla 5, los valores porcentuales de disminución de compuestos aromáticos se encuentran entre 27 y 45 %, siendo E el aislado que degradó mayor cantidad de estos compuestos.

Por otra parte, ocurre una disminución de los compuestos alifáticos menor al 8 %, lo cual pudiese justificarse por la presencia de compuestos solubles o pocos solubles de este tipo en el medio acuoso mineral, más no podría considerarse que se utilizaron como fuente de carbono por parte de los microorganismos evaluados, ya que no fueron

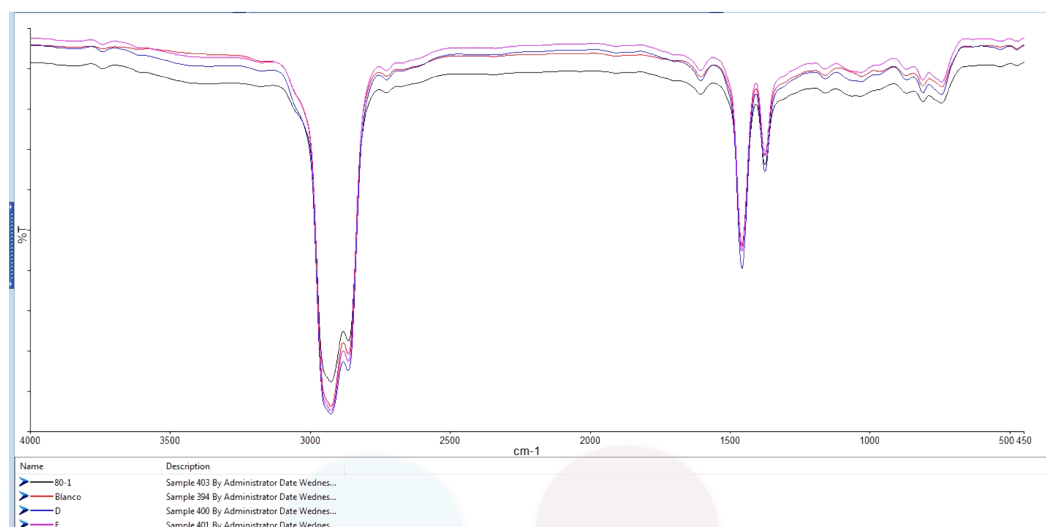


Figura 1: Espectros de FT-IR de las muestras de LCO de cada ensayo biocatalítico

activadas estas rutas metabólicas. Debe recordarse que el inoculo original fue pre-crecido en un medio mineral suplementado con el compuesto aromático naftaleno.

En relación a los resultados asociados a la degradación, presentados anteriormente, se debe destacar que la literatura señala que existe una diferencia entre las tasas de degradación de compuestos en estado puro y aquellos que forman parte de una mezcla de hidrocarburos, algunos de los compuestos que han sido evaluados son el diesel y la gasolina, donde existe un orden en la degradación [39].

En relación a los HAPs, los de bajo peso molecular (2 y 3 anillos) son más fácilmente degradables debido a su naturaleza y mayor solubilidad. Con el aumento del número de anillos en la molécula aumenta su hidrofobicidad y recalcitrancia, siendo menos biodisponibles para su degradación [40].

Otro aspecto importante para los HAPs es el ingreso de estos compuestos al interior celular, atravesando las membranas bacterianas para alcanzar las enzimas catabólicas. Se conoce muy poco sobre este aspecto, pero los mecanismos descritos incluyen tanto difusión pasiva como una captación dependiente de la energía que se activará durante el crecimiento con aromáticos como única fuente de energía [41].

Variables como la temperatura, oxigenación para la degradación aeróbica, el pH, la concentración del

sustrato y otras (mencionadas anteriormente) son determinantes en los procesos biocatalíticos [42].

## 4. Conclusiones

Los aislados bacterianos utilizados en el presente trabajo (autóctonos del LCO) mostraron la capacidad de degradar naftaleno, esto entre un 24 y 44%. También produjeron salicilato, unos de los metabolitos asociados a la ruta del diaromático y mantuvieron su viabilidad a las concentraciones de LCO evaluadas.

Los resultados obtenidos mediante el espectrofotómetro UV-Vis y los espectros de FT-IR sugieren que el aislado bacteriano E es el que presenta el mayor porcentaje de degradación para el naftaleno presente en el LCO.

Los valores asociados a las áreas bajo las curvas para los índices de aromaticidad de Permanyer (entre 27 y 45%) indican que todos los microorganismos evaluados degradan compuestos aromáticos presentes en el LCO, siendo el aislado E el que presenta el mayor porcentaje de degradación.

Estos resultados sugieren que los microorganismos evaluados son capaces de utilizar los compuestos aromáticos presentes en la corriente de refinación como única fuente de carbono y energía, quedando por estudiar el consorcio constituido por

los 3 aislados E, D y 80-1, también el efecto sobre la calidad del LCO obtenido.

## Referencias

- [1] P.T. Williams, M.K. Abbass, G.E. Andrews, and K.D. Bartle. Diesel particulate emissions: The role of unburned fuel. *Combust Flame*, 75(1):1–24, 1989.
- [2] H. Dandajeh, M. Talibi, N. Ladommatos, and P.Hellier. Influence of combustion characteristics and fuel composition on exhaust PAHs in a compression ignition engine. *Energies*, 12(13):2575, 2019.
- [3] S. Pinto-Castilla P. Betancourt, S. Marrero. V–Ni–Mo sulfide supported on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Preparation, characterization and LCO hydrotreating. *Fuel Processing Technology*, 114:21–21, 2013.
- [4] V. Calemma, R. Giardino, and M. Ferrari. Upgrading of LCO by partial hydrogenation of aromatics and ring opening of naphthenes over bi-functional catalysts. *Fuel Processing Technology*, 91:770–776, 2010.
- [5] C.E. Cerniglia. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2–3):351–368, 1992.
- [6] R.H. Peng, A.S. Xiong, Y. Xue, X.Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y-S. Tian, and Q-H. Yao. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6):927–955, 2008.
- [7] J.S. Seo, Y.S. Keum, and Q.X. Li. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 6(1):278–309, 2009.
- [8] S. Mallick, J. Chakraborty, and T.K. Dutta. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1):64–90, 2011.
- [9] A.M. Partila. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum oil contaminating the environment*. Thesis Ph.D. of Science (Microbiology), Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, 2013.
- [10] S.M. Bamforth and I. Singleton. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(7):723–736, 2005.
- [11] A. Umar M. and M. Umar M. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(4), 2015.
- [12] D. Ghosal, S. Ghosh, T.K. Dutta, and Y. Ahn. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers of Microbiology*, 80(7):1369, 2016.
- [13] F. Gómez, L. Puentes, A. De Sisto, A. Porco, and P. Betancourt. Evaluación de la actividad biocatalítica de cepas bacterianas con capacidad de degradación de naftaleno. In *Memorias XXII Congreso Venezolano de Catálisis*, pages 105–112, Caracas, 2019. Sociedad Venezolana de Catálisis.
- [14] N. Ni'matuzahroh, A.R.A. Trikurniadewi, I. Pramadita, F. A. Pratiwi, Salamun, and S. Sri. Biodegradation of naphthalene and phenanthren by bacillus subtilis 3kp. In *Proceeding of International Biology Conference 2016: Biodiversity and Biotechnology for Human Welfare*, volume 1854, pages 020026(1–6), Surabaya, Indonesia, 2017. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, AIP Conference Proceedings.
- [15] A. Permanyer, L. Douifi, A. Lahcini, J. Lamontagne, and J. Kister. FTIR and SUVF spectroscopy applied to reservoir compartmentalization: a comparative study with gas chromatography fingerprints results. *Fuel*, 81(7):861–866, 2002.
- [16] A. Permanyer, L. Douifi, N. Dupuy, A. Lahcini, and J. Kister. FTIR and SUVF spectroscopy

- as an alternative method in reservoir studies. Application to Western Mediterranean oils. *Fuel*, 84(2–3):159–168, 2005.
- [17] A. Permanyer, C. Rebufa, and J. Kister. Reservoir compartmentalization assessment by using FTIR spectroscopy. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 58(3–4):464–471, 2007.
- [18] J. Pelczar and M. Dasar-Dasar. *Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta, 1986.
- [19] E. Madsen G. Pumphrey. Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in polaromonas naphthalenivorans strain CJ2. *Microbiology*, 153:3730–3738, 2007.
- [20] H. Abbasnezhad, M. Gray, and J. M. Foght. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Applied Microbiology Biotechnology*, 92:653–675, 2011.
- [21] S. K. Samanta, B. Bhushan, and R. K. Jain. Efficiency of naphthalene and salicylate degradation by a recombinant pseudomonas putida mutant strain defective in glucose metabolism. *Applied Microbiology Biotechnology*, 55:627–631, 2001.
- [22] C.O. Obuekwe, Z.K. Al-Jadi, and E.S. Al-Saleh. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63:273–279, 2009.
- [23] Y. Sardesai and S. Bhosle. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Research in Microbiology*, 153:263–268, 2002.
- [24] A. Mukhopadhyay. Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals. *Trends in Microbiology*, 23(8):498–508, 2015.
- [25] R. Margesin and F. Schinner. Biological decontamination of oil spills in cold environments. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(5):381–389, 1999.
- [26] J.S. Arenas Soler and N. Rivera Alcázar. Evaluación de la capacidad de biodegradación de diésel por células libres e inmovilizadas de chromobacterium violaceum. Trabajo especial de grado, Departamento de Ciencias Básicas, Programa de Biología, y Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad La Salle, Bogotá, 2020.
- [27] Y. Ma, L. Wang, and Z. Shao. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*, 8(3):455–465, 2006.
- [28] KK. Jyothi, B. Surendra, and CK. Nancy. Identification and isolation of hydrocarbon-degrading bacteria by molecular characterization. *Helix*, 2:105–111, 2012.
- [29] WS. El-Sayed. Molecular cloning of gene nahH encoding extradiol-type dioxygenase from the NAH plasmid of pseudomonas stutzeri NA1. *Annals of Microbiology*, 56(89), 2006.
- [30] C.M. Alejandro M. *Catabolismo y tolerancia a hidrocarburos en el linaje de Roseobacter*. Aproximación multiómica. Tesis Doctoral, Microbiología Ambiental y Biomédica, Universitat de les Illes Balears, Palma (Illes Balears), España, 2018.
- [31] JL. Ramos, E. Duque, MT. Gallegos, P. Godoy, MI. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán, and A. Segura. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 56:743–768, 2002.
- [32] JL. Ramos, M. Sol Cuenca, C. Molina-Santiago, A. Segura, E. Duque, MR. Gómez-García, Z. Udaondo, and A. Roca. Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in pseudomonas putida. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4):555–566, 2015.
- [33] M. Mas Lladó. *Proteogenomic and physiologic characterization of new members of Roseobacter lineage from Mallorca harbors*. Tesis Doctoral, Microbiología Ambiental i Biotecnología,



Universitat de les Illes Balears, Palma (Illes Balears), España, 2017.

- [34] A. Segura, L. Molina, S. Fillet, T. Krell, P. Bernal, J. Muñoz-Rojas, and J.L. Ramos. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3):415–421, 2012.
- [35] Z. Udaondo, E. Duque, M. Fernández, L. Molina, J. De La Torre, P. Bernal, J.L. Niqui, C. Pini, A. Roca, M.A. Matilla, M.A. Molina-Henares, H. Silva-Jiménez, G. Navarro-Avilés, A. Busch, J. Lacal, T. Krell, A. Segura, and J.L. Ramos. Analysis of solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E based on its genome sequence and a collection of mutants. *FEBS Letters*, 586(18):2932–2939, 2012.
- [36] P. Loera, S. Valenzuela, and C. Flores. Biodegradación de compuestos aromáticos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(7):1–13, 2016.
- [37] V. Kanokkantapong, T. F. Marhaba, B. Panyapinyophol, and P. Pavasant. FTIR evaluation of functional groups involved in the formation of haloacetic acids during the chlorination of raw water. *Journal of Hazardous Materials*, 136(2):188–196, 2006.
- [38] M. Li, D. Cheng, X. Pan, L. Dou, D. Hou, Q. Shi, Z. Wen, Y. Tang, S. Achal, M. Milovic, and L. Tremblay. Characterization of petroleum acids using combined FT-IR, FT-ICR-MS and GC-MS: implications for the origin of high acidity oils in the Muglad Basin. *Organic Geochemistry*, 41(9):959–965, 2010.
- [39] P. Franzmann, W. Robertson, L. Zappia, and G. David. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodegradation*, 13:65–78, 2002.
- [40] A. Greene, J. Kay, K. Jaber, L. Stehmeier, and G. Voordouw. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12):5282–5289, 2000.
- [41] F. Hua and H.Q. Wang. Uptake and transmembrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology & Biochemical Equipment*, 28(2):165–175, 2014.
- [42] J. Leahy and R. Colwell. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3):305–315, 1990.