

## Degradación microbiana de gasolina en suelos agrícolas de Pueblo Nuevo, Guanajuato

ÁLVAREZ-MEJÍA, César†, AGUIRRE-GÓMEZ, Eduardo', NAVARRO-GARRIDO, Abigail' y LÓPEZ-RAMÍREZ, Varinia\*'

Coordinación de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo  
'Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

Recibido Julio 09, 2016; Aceptado Agosto 31, 2016

### Resumen

La introducción accidental o provocada de gasolina en suelos agrícolas en la región del Bajío mexicano es un problema ambiental persistente. Las constantes fugas de tomas de combustible en la zona provocan la pérdida de cultivos de interés agrícola, y favorecen la selección de microorganismos capaces de emplear dicha mezcla de hidrocarburos como fuente de energía. Con el fin de determinar la diversidad microbiana en zonas contaminadas con gasolina, en este trabajo, nos enfocamos al aislamiento y caracterización de microorganismos con capacidad degradadora de gasolina en suelos agrícolas próximos al municipio de Pueblo, Nuevo en el estado de Guanajuato. La microbiota aislada fue identificada por pruebas bioquímicas y moleculares e incluye cepas de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp.*

**Diversidad microbiana, Hidrocarburos, Biorremediación, Ecología microbiana**

### Abstract

The accidental or caused introduction of gasoline in agricultural soils in the Mexican Bajío is a persistent environmental problem. Constant leakage of fuel in the area cause the loss of crops of agricultural interest, and derivating in the selection of microorganisms capable of using this mixture of hydrocarbons as energy source. In order to determine the microbial diversity in areas contaminated with gasoline, in this work, we focus on isolation and characterization of microorganisms with ability to use gasoline in agricultural soils next to the municipality of village, new in the State of Guanajuato. The microbiota isolated was identified by biochemical and molecular tests and includes strains of the genera *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* and *Bacillus sp.*

**Microbial diversity, Hydrocarbons, Bioremediation, Microbial ecology**

**Citación:** ÁLVAREZ-MEJÍA, César, AGUIRRE-GÓMEZ, Eduardo, NAVARRO-GARRIDO, Abigail y LÓPEZ-RAMÍREZ, Varinia. Degradación microbiana de gasolina en suelos agrícolas de Pueblo Nuevo, Guanajuato. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2016. 3-8: 24-32.

\* Correspondencia al Autor (email: valopez@itesi.edu.mx)

† Investigador contribuyente como primer autor

## Introducción

En la actualidad, existe un riesgo constante hacia el medio ambiente debido al incremento de las actividades económicas y sociales de las comunidades, y este riesgo se incrementa en la producción de nuevos compuesto orgánicos, que no se encuentran presentes en la naturaleza y del cual se degradación se vuelve difícil, entre estos compuestos se encuentran los combustibles, y aunque ellos han sido derivados del petróleo, su composición actual y concentraciones durante la refinación, los convierten en compuestos orgánicos permanentes (COP's).

Para la remoción de ellos, se puede realizar por métodos fisicoquímicos, como la fotólisis, a través del uso de compuestos químicos que permiten la oxidación, aunque este último es eficiente en la remoción, genera nuevos compuestos y afecta la diversidad microbiana y vegetal del sitio impactado, por ello, se estudian actualmente la implementación de nuevas estrategias biológicas para la recuperación de estos sitios, considerando que existe microorganismos que son capaces, de manera natural, de degradar compuestos xenobióticos.

Para poder desarrollar metodologías para biorremediar un suelo contaminado, es necesario aislar microorganismos de dicho medio (Lisek, Paszt, & Trzcíński, 2014).

Los microorganismos pueden ser obtenidos a partir del enriquecimiento de cultivos, donde la mayor tasa de crecimiento o la concentración final celular se puede utilizar como criterio de selección (Geetha, Joshi, & Kathrotiya, 2013).

Existen estudios donde se ha determinado que las bacterias tienen un alto potencial en la recuperación de sitios contaminados con gasolina, ayudando en la recuperación incluso de la población vegetal dañada (Roy et al., 2014), debido a que pueden degradar varios componentes provenientes de los hidrocarburos de petróleo como son los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs), hidrocarburos monoaromáticos o hidrocarburos alifáticos de n-alcenos (Geetha et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue identificar bacterias degradadoras de gasolina presente en suelo contaminado, debido a la presencia de fugas del combustible en un predio cercano a la comunidad de "Loma de San Antonio" entre los municipios de Pueblo Nuevo e Irapuato en el estado de Guanajuato.

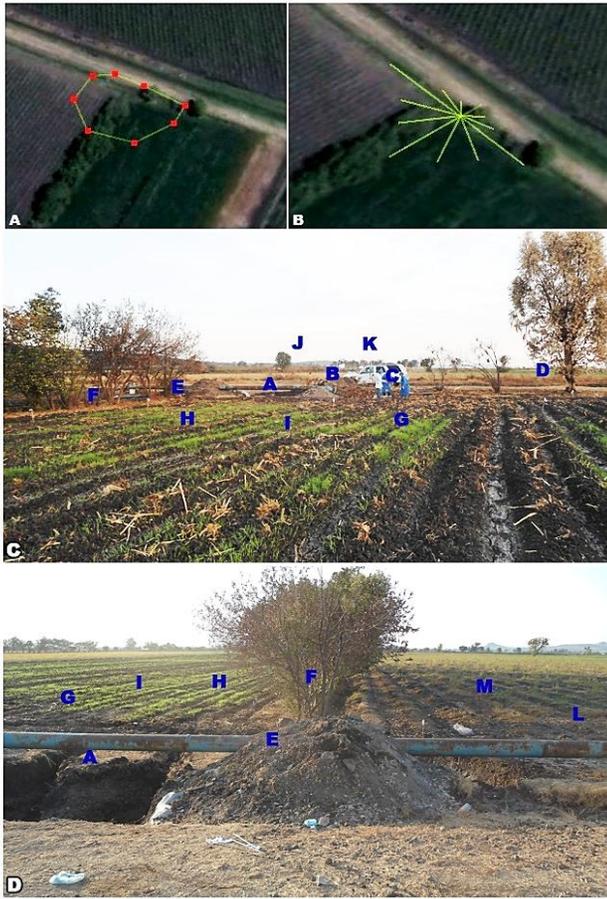
## Metodología

### Ubicación de la zona de muestreo

Las muestras fueron colectadas en una toma de gasolina clandestina que presentó una fuga de combustible (Figura 1), la cuál está localizada a una distancia de 7.387 km de la carretera Irapuato-Pueblo Nuevo en la comunidad de Loma de San Antonio a un costado del Canal de Coria (20.570621,-101.310999).

### Toma de muestras

Se seleccionaron 13 puntos de muestreo alrededor del punto de fuga, delimitando el área por la presencia de vegetación con síntomas de estrés (Figura 1). Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 20 cm. Las muestras se preservaron en bolsas de polietileno con sello hermético y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.



**Figura 1** Sitios de muestreo. A. Mancha delimitada por sequía de vegetación causada por la contaminación de gasolina. B. Mapa del muestreo radial en la zona dañada. C y D. Puntos de muestreo

### Aislamiento de microorganismos degradadores de gasolina

El aislamiento de microorganismos con capacidad de degradar la gasolina, se realizó a través de una técnica de enriquecimiento. Se inoculó inicialmente 50 mL de medio mineral Bushnell-Haas (Bushnell & Haas, 1941) suplementado con 0.04 % de extracto de levadura y 1 mL de gasolina, con 1 g de suelo. Los matracos fueron incubados a temperatura ambiente a 120 rpm durante una semana.

Posteriormente se utilizaron 2 mL de cultivo y se inocularon nuevamente en 50 mL de medio mineral Bushnell-Haas con 1 mL de gasolina y 0.02% de extracto de levadura, se incubaron a temperatura ambiente a 120 rpm por una semana. Finalmente se utilizaron 2 mL de cultivo para inocular 50 mL de medio mineral Bushnell-Haas y 2 mL de gasolina como única fuente de carbono, incubándose a temperatura ambiente a 120 rpm durante dos semanas. Al terminar el enriquecimiento de la muestra, se utilizaron 100  $\mu$ L de este cultivo y se espatularon en cajas Petri con agar nutritivo y agar YPD, incubándose a temperatura ambiente por 48 hrs. Los cultivos axénicos fueron obtenidos a partir de resiembras secuenciales en agar nutritivo, para posteriormente inocular 10 mL de caldo nutritivo, incubándose a temperatura ambiente, a 120 rpm durante 24 hrs. Se utilizó alternativamente al enriquecimiento, siembra directa de diluciones seriales de las muestras colectadas en agar nutritivo y papa dextrosa agar (PDA).

### Caracterización bioquímica y molecular de los aislados

La identificación de los aislados se realizó a través de pruebas bioquímicas (actividad de catalasa, oxidasa, almidasa, utilización de citrato y fermentación de lactosa), características microscópicas, coloniales, y a través de la amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA, empleando los oligonucleótidos 27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492R:5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'. (Pérez-Gutiérrez et al., 2013).

Para ello, se realizó la extracción de ADN total empleando el método reportado en el Manual de Laboratorio Molecular Cloning (Maniatis, Fritsch, & Sambrook, 1982).

La reacción de polimerización se llevó a cabo en el termociclador TC-3000 de la marca TECHNE.

El programa de amplificación incluyó 30 ciclos, con paso de desnaturalización a 95°C/30 s, alineamiento de oligos a 50°C/30 s y polimerización a 72°C/2 min.

La integridad del material genético, así como de los productos de amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en la unidad de secuenciación del Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Se utilizó el programa BLASTn para el análisis comparativo utilizando la base de datos de Nucleotide collection nr/nt de NCBI (Sayers et al., 2009), aplicando un valor de expectancia de 10, límites de coincidencia/incompatibilidad de 4, -5 y un costo por introducción de huecos de 6 y 5 de extensión.

### Reconstrucción filogenética

El diseño y la construcción del árbol filogenético se realizó empleando las secuencias de los aislados obtenidos y aquellas que por análisis BLASTn, presentaron la mejor calificación de identidad con los aislados (Tabla 2; Números de acceso:

KF817747.1, KF788246.1, KC920586.1, JQ398852.1, GQ280808.1, FJ227312.1, JF441244.1, JN999831.1, KF515653.1, HQ324912.1, JF681286.1, KF437632.1, JF825890.1, HQ840771.1, KU862318.1, JX196957.1, KF751674.1, KC790300.1, KT943977, JF895527.1, KC139411.1, KF746895.1) correspondientes a las cepas *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter* sp. F65, 09-M1 y VITNC1, *Bacillus cereus* MG209 y bh11, *Serratia marcescens* A4 y *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* JLZM21, *Pseudomonas plecoglossicida* LJ3, *Pseudomonas putida* P-1017-1, *Pseudomonas montelli* EU45, *Pseudomonas* sp. DHC8, Raj12, N1, D9-1, Yangling-14, SSKSD6, SK9, R873, Ebht3, *Citrobacter braakii* Hb-7 y *Citrobacter* sp. W-137-1, respectivamente.

Las secuencias se alinearon en el programa *BioEdit* (Hall, 1999) con la herramienta *ClustalW* (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) usando los parámetros estándar. Una vez alineadas y editadas las secuencias, se realizó la búsqueda del modelo de sustitución en el programa *JModelTest* 2.1.7 v20150530 (Posada, 2008).

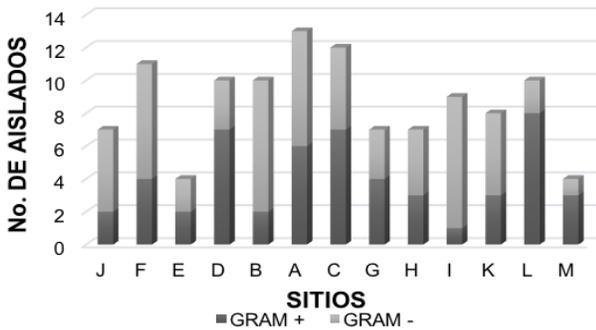
El árbol filogenético se elaboró en el programa *MEGA5.2* (Tamura et al., 2011) empleando como método de reconstrucción máxima verosimilitud, con el modelo de sustitución *General Time Reverse* (GTR+G).

La distribución discreta Gamma fue utilizada para modelar las diferencias evolutivas entre los sitios (4 categorías (G = 1.2206), obtenido con el programa *JmodelTest* con un LnL=-7725. En la reconstrucción filogenética se utilizó un Bootstrap de 1100.

**Resultados**

**Aislamiento microbiano**

Los microorganismos obtenidos a través de las dos estrategias descritas en la metodología, permitieron la obtención de 116 aislados microbianos. Su distribución través de la tinción Gram, así como sus características coloniales y celulares de los aislados mostró que 43 son Gram positivos y 69 Gram negativos, de los cuales 37 fueron bacilos y 32 cocobacilos. La diversidad encontrada fue variable dependiendo del sitio de colecta de la muestra (Gráfico 1).



**Gráfico 1** Distribución de aislados por punto de muestreo

El acomodo de las columnas está en base a la localización de los puntos de muestreo con respecto al sitio de fuga que corresponde al punto A.

**Identificación de los aislados**

De ésta colección, fueron seleccionados 50 aislados, considerando sus características macro y microscópicas, a los cuales se les realizó una caracterización bioquímica, para determinar su respuesta frente a las pruebas de actividad de catalasa y oxidasa, movilidad, hidrólisis de almidón, utilización de citrato, crecimiento en medio Vogues Proskauer y agar Mac-Conkey (Tabla 1; Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

	C	OX	MOV	HA	UC	VP	FL	F.L	Aislado seleccionado
PG1									
PG2									AG1
PG3									AG2
PG4									
PG5									
PG6									AG3
PG7									
PG8									
PG9									AG4
PG10									AG5
PG11									
PG12									AG6
PG13									
PG14									AG7
PG15									
PG16									
PG17									
PG18									AG8
PG19									AG9
PG20									AG10
PG21									AG11
PG22									
PG23									
PG24									
PG25									
PG26									AG12
PG27									
PG28									AG13
PG29									
PG30									
PG31									
PG32									
PG33									
PG34									
PG35									
PG36									
PG37									
PG38						N			
PG39									
PG40									
PG41									
PG42									
PG43									AG14
PG44									
PG45									
PG46									AG15
PG47									
PG48									
PG49									
PG50									AG16

Negativo  
 Positivo

**Tabla 1** Resultados de las pruebas bioquímicas (C: Catalasa, OX: Oxidasa, MOV: movilidad, H.A: Hidrólisis de almidón, UC: Utilización de Citrato, VP: Voges-Proskauer, FL (EMB): Fermentación de Lactosa (Medio EMB), F.L (M.C): Fermentación de Lactosa (Mac-Conkey). N.- Presenta oxidación del medio cambiando a color negro

Se seleccionaron 16 aislados con características bioquímicas distintas, para caracterizarlos molecularmente por medio de la amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la comparación genética contra la base de datos nr/nt.

Aislado	Punto de muestreo	Especie	% Cobertura	% Identidad	Tamaño de secuencia (nt)
AG1	F	<i>Enterobacter</i> sp. MTNC1	98	96	1240
AG2	F	<i>Enterobacter</i> sp. 09-M1	99	78	1051
AG3	G	<i>Pseudomonas</i> sp. Yangling 14	99	99	1167
AG4	A	<i>Bacillus cereus</i> MG209	99	97	1167
AG5	D	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> JLMZ21	98	97	1171
AG6	A	<i>Pseudomonas</i> sp. Ebht3	99	93	1205
AG8	C	<i>Pseudomonas</i> sp. SSKSD6	99	92	1220
AG9	C	<i>Pseudomonas</i> sp. NI	98	93	1226
AG10	D	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R873	99	99	1196
AG11	E	<i>Pseudomonas peccoglossici</i> da LJ3	98	94	1173
AG12	G	<i>Pseudomonas putida</i> 5IIANH	88	71	1060
AG13	H	<i>Citrobacter</i> sp. W-137-1	92	90	1220
AG14	B	<i>Pseudomonas peccoglossici</i> da LJ3	97	94	1204
AG15	C	<i>Pseudomonas montellii</i> EU45	87	90	1197

Las secuencias correspondientes a los aislados AG7 y AG16 se eliminaron del análisis por la baja calidad que presentaban.

**Tabla 2** Resultados del análisis comparativo de secuencias en la base de datos GeneBank de NCBI

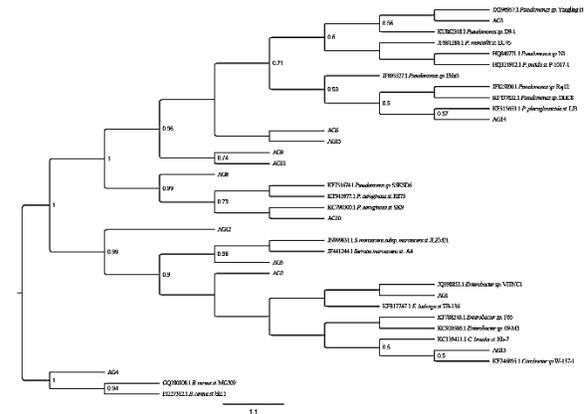
### Reconstrucción Filogenética

Para determinar la filiación genética de los aislados, se realizó una reconstrucción filogenética empleando como marcador molecular, un fragmento de aproximadamente 1100 nucleótidos del gen 16S rDNA (Figura 3). Las secuencias tipo de microorganismos con las que se compararon nuestros aislados correspondían a los principales blancos obtenidos mediante análisis tipo BLASTn.

### Reconstrucción Filogenética

Para determinar la filiación genética de los aislados, se realizó una reconstrucción filogenética empleando como marcador molecular, un fragmento de aproximadamente 1100 nucleótidos del gen 16S rDNA (Figura 2).

Las secuencias tipo de microorganismos con las que se compararon nuestros aislados correspondían a los principales blancos obtenidos mediante análisis tipo BLASTn.



**Figura 2** Reconstrucción filogenética del gen 16S rDNA de los aislados obtenidos. La historia evolutiva fue obtenida por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo General-Time-Reverse (GTR+G). El análisis involucró 36 secuencias de nucleótidos con 952 posiciones. Los valores de Bootstrap  $\geq 0.5$  se indican.

### Discusión de resultados

La emisión accidental al ambiente de derivados del petróleo, como la gasolina, hacen necesaria la implementación de técnicas eficientes para su remoción, con el fin de afectar en menor medida el ecosistema en la zona impactada.

En nuestro estudio, nos enfocamos en el aislamiento e identificación de bacterias con capacidad de degradar gasolina presentes en suelos agrícolas cercanos a tomas de dicho combustible, que presentan un potencial biotecnológico en biorremediación, a través de aislados naturales y autóctonos.

La caracterización bioquímica nos permitió observar la diversidad metabólica de los aislados.

Por su parte, la caracterización molecular mostró una distribución de los aislados en tres clados principales, donde las cepas AG1 y AG13 se asociaron con los géneros *Enterobacter* spp y *Citrobacter* spp, ambos géneros son de interés clínico (Dziri et al., 2016), aunque existen reportes asociados a cepas de *Enterobacter* spp y *Citrobacter* spp con capacidad de degradar compuestos aromáticos policíclicos y poliestireno (Sekhar et al., 2016; Singh, Srivastava, Gupta, & Gupta, 2011).

El aislado AG5 se agrupa con especies de *Serratia marcescens*, con un soporte estadístico de 0.96, lo que sugiere que dicho aislado se identifica con la cepa propuesta. En un reporte, Wongsa y col. (2004), aislaron y caracterizaron una cepa de *Serratia marcescens* capaz de degradar compuestos aromáticos de gasolina, así como keroseno y aceite lubricante, hasta en un 60% (Wongsa et al., 2004).

Por otro lado, aunque en este clado se agruparon los aislados AG2 y AG12, su filiación genética no es clara pero sugiere que están emparentados con la familia *Enterobacteriaceae*.

El clado con mayor proporción de OTUs, agrupó a los aislados (AG3, AG6, AG8, AG9, AG10, AG11, AG14 y AG15) con especies del género *Pseudomonas* (Figura 2).

Este resultado muestra la diversidad genética asociada a este género y que puede ser encontrada en los sitios contaminados con hidrocarburos.

Por ejemplo, John y col. (2012), aislaron e identificaron de suelo contaminado con diésel cepas de *Pseudomonas putida* y *Alcaligenes faecalis*, capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (John, Essien, Akpan, & Okpokwasili, 2012).

El aislado AG4, el único Gram positivo que se seleccionó para secuenciar, se relacionó con *Bacillus cereus*. Se ha reportado que dada la capacidad de especies del género *Bacillus* por esporular puede ser aislado con mayor frecuencia de muestras de suelo, dado que las esporas pueden tolerar con éxito las condiciones cambiantes del suelo. Asimismo, se han reportado *Bacillus subtilis* con capacidad de emplear el petróleo como fuente de carbono (Das & Mukherjee, 2007).

## Conclusiones

La introducción accidental o intencional de gasolina en suelos afecta el desarrollo de especies vegetales de interés agrícola. La identificación y caracterización de bacterias con capacidad de utilizar gasolina como fuente de carbono permitirá el diseño de estrategias para remediar zonas impactadas. Los aislados bacterianos identificados en este trabajo dan la pauta para generar consorcios microbianos y establecer las condiciones de manejo y aplicación en caso de la introducción de gasolina en suelos de interés agrícola, para favorecer su recuperación.

## Agradecimientos

Queremos agradecer a los miembros del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana (ITESI) y al Laboratorio de Bioquímica y Microbiología Ambiental (ITESA) por su apoyo durante la realización de experimentos y las discusiones de resultados.

## Fuentes de financiamiento

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (PIFOCA-2015).

### Contribución de los autores

El diseño experimental estuvo a cargo de VLR y CAM, el desarrollo de experimentos fue realizado por EAG y AGN, los análisis de los datos y escritura del artículo por CAM y VLR. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este artículo.

### Referencias

- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 653–673.
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339–1345.
- Dziri, R., Klibi, N., Andrea, C., Ben, L., Bellaaj, R., Ben, K., ... Torres, C. (2016). Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Citrobacter* obtained in environmental samples of a Tunisian hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(2), 7–10.
- Geetha, S. J., Joshi, S. J., & Kathrotiya, S. (2013). Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacterial Isolate from Oil Contaminated Sites. *APCBEE Procedia*, 5, 237–241.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Holt, J. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H. a., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition*. European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society, 13(6), 560.
- John, R. C., Essien, J. P., Akpan, S. B., & Okpokwasili, G. C. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Aviation Fuel Spill Site at Ibeno, Nigeria. *Bull Environ Contam Toxicol*, 88, 1014–1019.
- Lisek, A., Paszt, L. S. A. S., & Trzciński, P. (2014). Identification and Assessment of Genetic Similarity of Soil Bacterial Isolates of *Pseudomonas* spp. Using Molecular Techniques. *Polish Journal of Microbiology*, 63(3), 291–298.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring)*. New York: Cold Spring Harbor.
- Pérez-Gutiérrez, R.-A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C. L., ... Olmedo-Alvarez, G. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *The ISME Journal*, 7(3), 487–97.
- Posada, D. (2008). jModelTest - Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25(7), 1253–1256.
- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Deka Boruah, H. P., Saikia, N., ... Chandra Bora, T. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79–89.

Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin., V., ... Ye, J. (2009). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 5–15.

Sekhar, V. C., Nampoothiri, K. M., Mohan, A. J., Nair, N. R., Bhaskar, T., & Pandey, A. (2016). Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 347–354.

Singh, G., Srivastava, S., Gupta, S., & Gupta, N. (2011). Evaluation of Carbazole Degradation by *Enterobacter* sp. Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soil. *Rec. Res. Sci. Tech.*, 11(3), 44–48.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Masatoshi, N., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10), 2731–2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology*, 49(6), 415–422.