

---

# AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS *Bacillus*, *Enterobacter* y *Yersinia*, PROVENIENTES DE AGUAS CONTAMINADAS CON PETRÓLEO

Melo Penélope, Araujo Ismenia, Ângulo Nancy, Beltrán Alida

Laboratorio de Microbiología Industrial, CIA, LUZ

[melo.penelope@gmail.com](mailto:melo.penelope@gmail.com)

## Resumen

Empleando aguas petrolizadas se realizó un estudio que contempló aislamiento bacteriano, identificación taxonómica y determinación de la capacidad bacteriana para utilizar derivados del petróleo (diesel). Inicialmente, tomando como criterio de selección la morfología celular y afinidad tintorial, el aislamiento permitió la obtención de quince cepas bacterianas, las cuales fueron sometidas a una prueba preliminar selectiva con Diesel, reduciendo el grupo de estudio a ocho, y luego identificadas mediante el software ABIS 7 como: *Bacillus filiclonicus* PM5 (99%) y PM7 (91%); *Bacillus subtilis* PM8 (81%); *Enterobacter sakazakii* PM27 (85%); *Bacillus mycoides* PM29 (87%); *Yersinia aleksiciae* PM30 (82%) y PM32 (83%), además de *Bacillus pumilus* PM37 (92%). El grupo fue evaluado para medir su crecimiento, utilizando hidrocarburos. Se emplearon envases volumétricos aforados (matraces de 250 mL) que contenían MMM 94% + Inóculo 5% + Diesel 1%. Al término de esta fase, las cepas bacterianas presentaron un crecimiento en el siguiente orden: PM30, PM8, PM27, PM37, PM7, PM32, PM5 y PM29, alcanzando en el día sesenta densidades poblacionales de 2159, 1560, 1479, 1393, 1051, 1061, 784 y  $719 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente. El análisis estadístico demostró un efecto significativo en relación al crecimiento bacteriano  $p = 0,000000607$  ( $p < 0,05$ ), indicando que existen diferencias entre los títulos celulares, como producto de las capacidades metabólicas particulares codificadas en el genoma de cada bacteria.

**Palabras clave:** *Bacillus filiclonicus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus mycoides*, *Yersinia aleksiciae*, Biorremediación.

## Introducción

La vida en el planeta se sustenta por un balance biológico frágil, ya que los microorganismos juegan un rol crucial en el desarrollo sustentable de la biosfera y los ciclos biogeoquímicos. Las bacterias, las cuales se originaron hace más de tres mil millones de años, han logrado desarrollar estrategias para obtener energía a partir de cualquier compuesto. La abundancia de los microorganismos, junto con la habilidad de transferencia horizontal de genes y sus elevadas tasas de crecimiento, les ha permitido evolucionar rápidamente y adaptarse a condiciones ambientales de naturaleza cambiante, así como también en aquellos de condición extrema que no permiten la proliferación de otros organismos vivientes (Díaz, 2004). Por lo tanto, los microorganismos adaptando éstas habilidades se han convertido en una influencia importante dentro del sistema ecológico, ya que una gran variedad ha demostrado capacidades de transformación y degradación de muchos tipos de poluentes en diferentes componentes del medio físico natural, entre ellas, el agua [Ilyina *et al.*, (2003)]. El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que, cuando es empleado como combustible o como materia prima en la industria petroquímica, se convierte en una parte indispensable de la sociedad moderna. Sin embargo, cuando es descargado al ambiente, puede ocasionar daños extensos y significativos en los ecosistemas locales, ya que la acumulación de estos poluentes

en tejidos de plantas y animales puede conllevar a la muerte de la progenie o aparición de mutaciones. Por su parte, los microorganismos sobreviven en dichos ambientes contaminados debido a su capacidad metabólica de utilizar estos contaminantes como fuentes potenciales de energía. Hace varias décadas se conoce acerca de la susceptibilidad a la descomposición microbiana de los hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos en las series alifáticas, olefínicas y nafténicas. Cientos de especies de bacterias, hongos y levaduras representan más de 30 géneros descritos involucrados en el ataque a los hidrocarburos y se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza [ZoBell, (1946); Brown, (1987)].

La biorremediación en ambientes acuáticos y terrestres se ha convertido en una tecnología eficiente, con un rango de ventajas en comparación a los métodos tradicionales, ya que es un proceso que explota las habilidades enzimáticas de los organismos vivientes para promover la tasa de destrucción del poluente, constituyendo una herramienta importante para mitigar la contaminación ambiental por hidrocarburos del petróleo [Madigan *et al.*, (2000); Toledo *et al.*, (2006)].

El objetivo de esta investigación fue realizar el aislamiento bacteriano, la identificación taxonómica y la determinación de la capacidad bacteriana para la biodegradación de los derivados del petróleo, particularmente el diesel, en función de la biorremediación de ambientes acuáticos.

## Materiales y Métodos

### Aislamiento bacteriano y prueba preliminar selectiva con diesel

El aislamiento de cepas bacterianas se realizó tomando 10 mL del agua petrolizada, adicionándolo en 90 mL de Solución Salina Peptonada (SSP); a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  en SSP. De cada dilución se transfirieron ansadas a placas de Agar Tripticasa de Soya (ATS) por estría; seguidamente, las placas fueron incubadas a 37° C por un lapso de 24 horas. Al cabo del período de incubación se seleccionaron aquellas colonias macroscópicamente diferentes (tamaño, color, forma) y luego cada colonia aislada fue transferida varias veces, por rayado, en placas de ATS e incubadas nuevamente a 37° C por 24 horas hasta verificar la pureza del cultivo por mantenimiento del fenotipo morfológico [Madigan *et al.*, (2000); Prescott *et al.*, (2004)].

Con el objeto de realizar una selección preliminar de cepas degradadoras de hidrocarburos, una vez aisladas fueron sometidas a una prueba para determinar su capacidad de crecimiento en diesel, la cual consistió en la siembra de las cepas en tubos de ensayo que contenían Medio Mínimo Mineral (MMM) al 5% compuesto por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Jobson *et al.*, (1972)] y Diesel al 0,5%, los tubos fueron incubados durante 16 días a 37° C [Mestre *et al.*, (2007)]; posteriormente fueron seleccionadas las cepas objeto de estudio, tomando como criterio la determinación del crecimiento bacteriano por espectrofotometría a

540 nm [Gamazo *et al.*, (2005); Uaboi-Egbenni *et al.*, (2010)]. La morfología de las cepas aisladas se determinó según la caracterización macromorffológica sugerida por la literatura [Seeley y Vandemark, (1973); Kerr, (1981)]. La micromorfología de cada cepa se determinó utilizando la Tinción de Gram en cultivos de 24 horas [Madigan *et al.*, (2000)].

### Identificación taxonómica

La herramienta empleada para la identificación bacteriana fue el *software online* denominado *Advanced Bacterial Identification Software* (ABIS © 2007-2014) que emplea como criterio características morfológicas y bioquímicas propias de cada cepa bacteriana, las cuales fueron introducidas en la base de datos, arrojando en cada caso un grupo de cinco especies bacterianas con los porcentajes de probabilidad correspondientes.

### Estudio de factibilidad del crecimiento bacteriano utilizando diesel como sustrato carbonado y fuente de energía

Una vez aisladas y seleccionadas las cepas bacterianas, fueron activadas tomando ansadas de los cultivos y transferidas a tubos con Caldo Tripticasa Soya (CTS); luego, se incubaron a 37° C por 24 horas. Al cabo de este período, los cultivos se transfirieron a matraces de 250 mL, conteniendo 100 mL de CTS, para obtener la amplificación de la biomasa. Se realizaron contajes diarios mediante la técnica de contejo en placa vertida hasta alcanzar un crecimiento bacteriano de  $1 \times 10^8$  células/mL [APHA *et al.*, (2005)]. Estos cultivos constituyeron el inóculo del estudio de factibilidad para evaluar el crecimiento

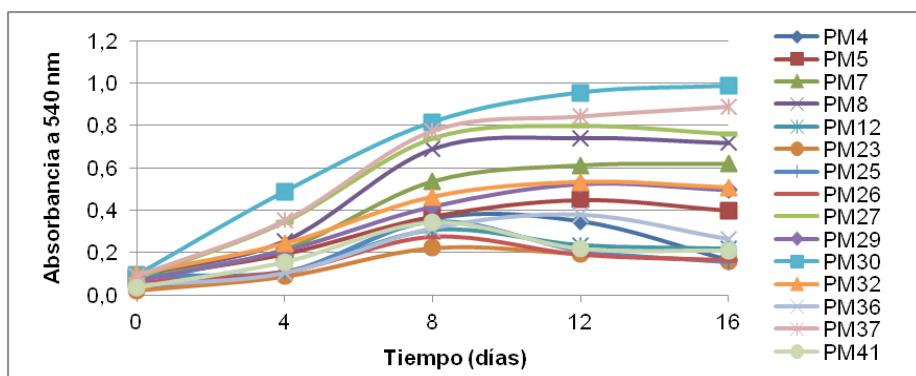
bacteriano, utilizando diesel como sustrato carbonado y fuente de energía. El diseño experimental del estudio de factibilidad consistió en la inoculación de cada cepa bacteriana en matraces Erlenmeyer de 250mL, que contenían 94% p/v de Medio Mínimo Mineral (MMM) [Jobson *et al.*, (1972)]; 1% v/v de la fuente carbonada (diesel) y 5% v/v del inóculo bacteriano; como grupos control se prepararon matraces con MMM 95% + Inóculo bacteriano al 5%. Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado. Finalmente los matraces se colocaron en una incubadora donde se mantuvieron a 37° C, en agitación constante a 120 rpm por 8 semanas, período durante el cual se realizaron los análisis microbiológicos cada 15 días,

determinando el crecimiento bacteriano por placa vertida [APHA *et al.*, (2005)].

## Resultados y Discusión

### Aislamiento bacteriano y prueba preliminar selectiva con diesel

Mediante la técnica de rayado y transferencia en placas, se obtuvo el aislamiento de treinta y ocho cepas bacterianas a partir del agua petrolizada. De acuerdo con la caracterización macromorfológica y micromorfológica se seleccionaron quince cepas bacterianas, las cuales fueron sometidas a una prueba preliminar selectiva en diesel con la finalidad de seleccionar las cepas bacterianas capaces de crecer en dicho sustrato, tomando como criterio el desarrollo de mayor turbidez.



**Figura 1.** Crecimiento bacteriano en diesel determinado por espectrofotometría a = 540 nm.

En la Figura 1, se observa el patrón de crecimiento bacteriano durante la prueba preliminar con diesel al 0,5%. Es notable la presencia de curvas con una cinética de crecimiento ausente de fase de adaptación, ya que las cepas fueron sembradas en fase exponencial y tenían previa exposición a hidrocarburos dadas

las condiciones de contaminación previa del agua, permitiendo el desarrollo de fases exponenciales tempranas, seguido de fases estacionarias estables y en algunos casos fases de declinación definidas. Adicionalmente, cabe destacar que se desarrollaron dos tipos de cinética de crecimiento definidos entre las ocho

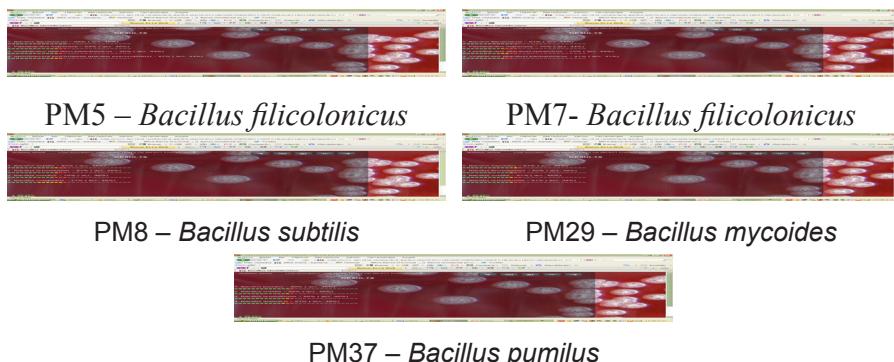
primeras cepas (PM30, PM37, PM27, PM8, PM7, PM32, PM29, PM5) con respecto a las siete restantes (PM36, PM4, PM41, PM25, PM12, PM26 y PM23), lo cual se utilizó como criterio para la selección de las cepas bacterianas más eficientes que utilizaban el diesel como fuente de carbono y energía que fueron empleadas durante el estudio de factibilidad.

Se observó que las ocho primeras cepas presentaron curvas caracterizadas por fases exponenciales con pendientes pronunciadas registrando valores máximos de absorbancia de 0,800; 0,742; 0,613; 0,533; 0,523 y 0,450 para PM27, PM7, PM8, PM32, PM29 y PM5, respectivamente a los doce días, seguidamente se observó el comienzo de la fase estacionaria hasta el final del experimento. Para las dos cepas restantes, PM30 y PM37, se obtuvieron valores máximos de absorbancia de 0,986 y 0,890, respectivamente, observándose que la fase exponencial se extendió progresivamente desde el inicio hasta el final del experimento, en el día dieciséis. En contraste, el grupo de las siete restantes presentaron una cinética con fases exponenciales menos pronunciadas y más cortas, registrándose valores máximos de absorbancia de 0,377; 0,363; 0,341; 0,347; 0,306; 0,276 y 0,223 para PM36, PM4, PM41, PM25, PM12, PM26 y PM23, respectivamente.

En un estudio similar, se determinó el crecimiento bacteriano en queroseno por espectrofotometría a 600 nm, empleando cuatro cepas aisladas de una fosa petrolizada designadas como *Yersinia* sp. K6, *Pantoea agglomerans* K3, *Sphingobacterium thalpophilum* K2 y *Actinobacillus* sp. H7, reportando valores de absorbancia máxima de 1,653; 0,732; 0,328 y 0,567 para las cepas K6, K3, K2 y H7 al alcanzar los días 9, 18, 6 y 36, respectivamente (García, 2007). En otro estudio, se observó el crecimiento de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium* y *Bacillus* en petróleo Bonny Light al 1%, por absorbancia a 600 nm, registrándose valores medio de absorbancia de 0,105; 0,105; 0,105; 0,09 y 0,08, respectivamente [Uaboi-Egbenni et al., (2010)].

### Identificación taxonómica

El análisis de las pruebas bioquímicas y morfológicas mediante ABIS 7, mostró que 5 cepas correspondieron al género *Bacillus*, arrojando los siguientes porcentajes máximos: PM5 – *Bacillus filicolicus* (99%); PM7 – *Bacillus filolonicus* (91%); PM8 – *Bacillus subtilis* (81%); PM29 – *Bacillus mycoides* (87%) y PM37 – *Bacillus pumillus* (92%), (Figura 2).



**Figura 2. Especies bacterianas pertenecientes al género *Bacillus***

Los miembros del género *Bacillus* se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido reportados en numerosas investigaciones relacionadas con la degradación de hidrocarburos del petróleo. Durante un estudio, se utilizaron tres cepas del género *Bacillus* de suelos contaminados con hidrocarburos, designadas como S3.2, 063 y 113i, capaces de crecer empleando crudo, benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno y octanol [Ghazali *et al.*, (2004)]. En otra investigación, se aisló una cepa identificada como *Bacillus*

sp. SV9, la cual fue capaz de degradar aproximadamente el 59% de los hidrocarburos presentes en sedimentos contaminados con crudo al cabo de un período de 5 días a 30° C [Verma *et al.*, (2006)].

El análisis de las pruebas bioquímicas y morfológicas mediante ABIS 7, mostró que dos cepas correspondieron al género *Yersinia*, arrojando los siguientes porcentajes máximos: PM30 – *Yersinia aleksiae* (82%); PM32 – *Yersinia aleksiae* (83%), (Figura 3).



**Figura 3. Especies bacterianas pertenecientes al género *Yersinia***

El género *Yersinia*, pertenece a la familia de las Enterobacterias y ciertas especies han sido reportadas en trabajos relacionados con ambientes impactados con petróleo. A partir de una fosa petrolera inactiva, se aisló una cepa identificada como *Yersinia* sp. K6, la cual mostró capacidad para crecer en queroseno como única fuente de

carbono y energía (García, 2007). Otros investigadores, empleando especies de plantas no asociadas a ambientes con antecedentes de contaminación petrolera lograron aislar la cepa *Yersinia rohdei* LR03, la cual mostró un crecimiento significativo en placas de agar con petróleo al 1% al cabo de 7 días [Ibrahim *et al.*, (2008)].

El análisis de las pruebas bioquímicas y morfológicas mediante ABIS 7, mostró que una cepa correspondió al género *Enterobacter*, arrojando el siguiente porcentaje máximo: PM27 – *Enterobacter sakazakii* (85%), (Figura 4).



**PM27 – *Enterobacter sakazakii***

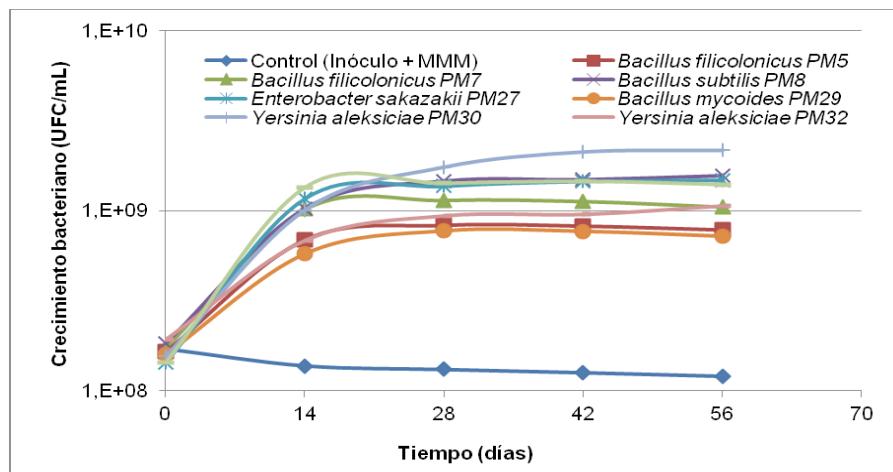
**Figura 4.** Especies bacterianas pertenecientes al género *Enterobacter*

Igualmente, las especies del género *Enterobacter* pertenecen a la familia de las Enterobacterias y también ha sido reportado su aislamiento a partir de ambientes acuáticos y terrestres contaminados con derivados del petróleo. A partir de cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con petróleo, se aisló la cepa *Enterobacter* sp. 214-6, la cual fue capaz de crecer en naftaleno. Posteriormente, se reportó una cepa de *Enterobacter cloacae*, capaz de crecer en gasoil tolerando un rango de concentración del 1 a 8% [Narváez-Flórez *et al.*, (2008)].

**Estudio de factibilidad del crecimiento bacteriano utilizando diesel como sustrato carbonado y fuente de energía**  
La densidad poblacional de las cepas bacterianas inicialmente osciló entre

143 y  $193 \times 10^6$  UFC/mL y al final estuvo entre 719 y  $2159 \times 10^6$  UFC/mL. Las cepas presentaron el crecimiento en el siguiente orden decreciente: *Yersinia aleksiciae* PM30, *Bacillus subtilis* PM8, *Enterobacter sakazakii* PM27, *Bacillus pumilus* PM37, *Bacillus filicolicus* PM7, *Yersinia aleksiciae* PM32, *Bacillus filicolicus* PM5 y *Bacillus mycoides* PM29, alcanzando en el día sesenta densidades poblacionales de 2159, 1560, 1479, 1393, 1051, 1061, 784 y  $719 \times 10^6$  UFC/mL. El análisis estadístico demostró un efecto significativo en relación al crecimiento bacteriano  $p = 0,000000607$  ( $p < 0,05$ ), indicando que existen diferencias entre los títulos celulares, como producto de las capacidades metabólicas particulares codificadas en el genoma de cada bacteria.

En la Figura 5 puede observarse el patrón de crecimiento de las cepas estudiadas en presencia de diesel durante un período de 60 días, presentando curvas con una típica cinética de crecimiento caracterizada por la presencia de la fase exponencial y estacionaria pero carente de la fase adaptativa, ya que las cepas fueron inoculadas en fase exponencial e inicialmente fueron adaptadas al sustrato, igualmente no hubo fase de declinación ya que continuaron los incrementos celulares moderadamente hasta el final del experimento y éste ocurrió antes del agotamiento del sustrato carbonado.



**Figura 5.** Crecimiento bacteriano empleando diesel al 1% como fuente de carbono y energía

Las cepas *Bacillus pumilus* PM37, *Enterobacter sakazakii* PM27, *Yersinia aleksiciae* PM30, *Bacillus subtilis* PM8 y *Bacillus fililcolonius* PM7, registraron fases exponenciales con el mayor incremento de células/mL, en comparación con las cepas *Yersinia aleksiciae* PM32, *Bacillus fililcolonius* PM5 y *Bacillus mycoides* PM29, seguidamente se inició la fase estacionaria donde el crecimiento alcanzó un equilibrio; sin embargo, continuaron registrándose incrementos celulares moderados entre las diferentes cepas.

A diferencia del patrón de crecimiento descrito anteriormente, en una investigación similar empleando un cultivo mixto de dos bacilos Gram negativos designados como DBT2 y E3 utilizando gasoil al 5% como fuente de carbono y energía, se observó en las curvas de crecimiento, fases de adaptación cortas (alrededor de dos

días), con fases exponenciales muy marcadas, seguidas de un descenso violento de crecimiento hasta el final del experimento, sin fase estacionaria (Rondón, 2000).

En condiciones similares de laboratorio, y empleando cepas aisladas de un suelo contaminado con ripios de perforación, se aplicó un ensayo de factibilidad con gasoil como fuente de carbono, obteniendo patrones de crecimiento bacteriano con fases de latencia ausente, fases exponencial y estacionaria de alrededor de cinco días cada una, posteriormente comenzó la fase de muerte debido a una caída brusca del crecimiento. Reportaron cinco cepas como las más eficientes en la degradación del gasoil designadas como: *Yersinia* sp. MI-1; *Aeromonas* sp. MI-16; *Actinobacillus* sp. MI-11, MI-14 y MI-18 [Araujo *et al.*, (2004)].

## Conclusiones

Se logró el aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas identificadas dentro de los géneros *Bacillus*, *Yersinia* y *Enterobacter*, provenientes de aguas contaminadas con petróleo.

En el estudio de factibilidad, todas las cepas demostraron capacidad para crecer en presencia de diesel como fuente de carbono y energía, condición que permite considerar a estos microorganismos para futuros estudios de biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos.

## Agradecimiento

Los autores agradecen al Centro de Investigación del Agua de la Universidad del Zulia, por facilitar materiales y equipos necesarios para el desarrollo de las actividades de trabajo, así como también a la empresa PDVSA por el financiamiento de una parte de la investigación.

## Referencias Bibliográficas

- Advanced Bacterial Identification Software (ABIS) © (2007-2014), [en línea]. [http://www.tgw1916.net/bacteria\\_logare.html](http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html)
- APHA, AWWA, WEF. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 21va Edición. Washington DC, USA.
- Araujo, I.; Angulo N.; Cárdenas, C.; Méndez, M.; Morante, M.; Machado, M. (2004). Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 38 (3): 186-202.
- Brown, L. (1987). Oil degrading microorganisms. Chemical Engineering Progress. 83 (10): 35-40.
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. International Microbiology. 7: 173-180.
- Gamazo, C.; Lopez-Goñi, I.; Díaz, R. (2005). Manual Práctico de Microbiología. Editorial Masson. Tercera Edición. Barcelona, España. 264 pp.
- García, M. (2007). Crecimiento bacteriano en queroseno de cepas aisladas de una fosa petrolera. Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Biología. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. 91 pp.
- Ghazali, F. M.; Rahman, R. N.; Salleh Z. A.; A. B., Barsi, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation. 54: 61-67.
- Ibrahim, M. L.; Ijah, U. J. J., Manga, S. B., Rabah, A. B. (2008). Ocurrence of hydrocarbon utilizing bacteria in the rizosphere of Eucalyptus camaldulensis, Lablab purpureus and Moringa oleifera. International Journal of Pure and Applied Sciences. 2 (3): 21-26.
- Ilyina, A.; Castillo, M. I.; Villareal, J. A.; Ramírez, G.; Candelas, J. (2003). Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. Moscow University Chemistry Bulletin. 44 (1): 88-91.
- Jobson, A.; Cook, F.; Westlake, D. (1972). Microbial utilization of crude oil. Applied Microbiology. 23 (6): 1082-1089

- Kerr, T. (1981). Applications in general microbiology: A laboratory manual. Second Edition. Hunter Publishing Company. Georgia, EEUU. 224 p.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. (2000). Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, España. 1089 p.
- Mestre, M.C.; Vázquez, S.C.; Ruberto, L.; Mac Cormack, W.P. (2007). Identificación de los componentes cultivables del consorcio bacteriano degradador de hidrocarburos M10. Actas del VI Simposio Argentino sobre Investigaciones Antárticas. Instituto Antártico Argentino. Argentina. p 5.
- Narváez-Flórez, S.; Gómez, M. L.; Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. Boletín de Investigaciones Marítimas y Costeras. 37 (1): 61-75.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. (2004). Microbiología. 5ta Edición. MacGraw-Hill. Madrid, España. 1147 pp.
- Rondón, M. (2000). Estudio de la compatibilidad de crecimiento de un cultivo mixto bacteriano para la biodegradación del gasoil. Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Biología. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 55 p.
- Seeley, H.; Vandemark, P. (1973). Manual de Laboratorio para Microbiología. Microbios en acción. Editorial Blume. Barcelona, España. 361 pp.
- Toledo, F. L.; Calvo, C.; Rodelas, B.; González-López, J. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons. Systematic and Applied Microbiology. 29: 244–252.
- Uaboi-Egbenni, P.O.; Amud, O. O.; Okolie, P. N.; Bisi-Johnson, M.; Akinyemi, O. (2010). Post-impact studies of an inland oilfield in South-Western Nigeria: A bacteriological perspective. Middle-East Journal of Scientific Research. 6 (3): 230-238.
- Verma, S.; Bhargava, R.; Pruthi, V. (2006). Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. International Biodeterioration & Biodegradation. 57: 207-213.
- ZoBell, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriology Reviews. 10 (1-2): 1-49.