

ENVIADO

OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN *alkB* INVOLUCRADO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN AMBIENTES MARINOS

Silvia R Peressutti

Resumen

La liberación de hidrocarburos (HC) tóxicos en el ambiente marino, originada principalmente por el incremento del tráfico de embarcaciones en los últimos años, representa una de las principales fuentes de contaminación. Dado que los alcanos constituyen la mayor fracción dentro de los hidrocarburos totales, su biodegradación es el principal proceso durante la remoción de HC del ambiente. El estudio del potencial biodegradativo y de los genes bacterianos involucrados en el metabolismo de HC, es fundamental para comprender la biodegradación natural en los ecosistemas marinos y para la aplicación de tecnologías de biorremediación, destinadas a eliminar hidrocarburos del ambiente. Los genes *alkB* son ampliamente usados como biomarcadores funcionales para la caracterización de bacterias degradadoras de HC en muestras ambientales. El objetivo de este estudio fue poner a punto la extracción de ADN metagenómico y la amplificación de genes *alkB*, con el fin de caracterizar poblaciones bacterianas claves asociadas con procesos aeróbicos de degradación de alcanos en aguas marinas. También se ensayó un método para evaluar el potencial biodegradativo frente a diversos HC.

El protocolo de extracción de ADN microbiano optimizado para agua y sedimentos brindó resultados positivos, sin observarse diferencia con o sin el agregado de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). El uso del *kit* comercial de extracción mostró menor eficiencia. El protocolo seleccionado para la amplificación del gen *alkB* incluyó el uso de la polimerasa Tplus y temperaturas de *annealing* óptimas de 45 °C para agua de mar y de 45,9 °C para las muestras de sedimento. Finalmente, se probó la capacidad de las cepas bacterianas de degradar diferentes hidrocarburos.





OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN *alkB* INVOLUCRADO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN AMBIENTES MARINOS

Silvia R Peressutti

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)

Resumen

La liberación de hidrocarburos (HC) tóxicos en el ambiente marino, originada principalmente por el incremento del tráfico de embarcaciones en los últimos años, representa una de las principales fuentes de contaminación. Dado que los alcanos constituyen la mayor fracción dentro de los hidrocarburos totales, su biodegradación es el principal proceso durante la remoción de HC del ambiente. El estudio del potencial biodegradativo y de los genes bacterianos involucrados en el metabolismo de HC, es fundamental para comprender la biodegradación natural en los ecosistemas marinos y para la aplicación de tecnologías de biorremediación, destinadas a eliminar hidrocarburos del ambiente. Los genes *alkB* son ampliamente usados como biomarcadores funcionales para la caracterización de bacterias degradadoras de HC en muestras ambientales. El objetivo de este estudio fue poner a punto la extracción de ADN metagenómico y la amplificación de genes *alkB*, con el fin de caracterizar poblaciones bacterianas claves asociadas con procesos aeróbicos de degradación de alcanos en aguas marinas. También se ensayó un método para evaluar el potencial biodegradativo frente a diversos HC.

El protocolo de extracción de ADN microbiano optimizado para agua y sedimentos brindó resultados positivos, sin observarse diferencia con o sin el agregado de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). El uso del *kit* comercial de extracción mostró menor eficiencia. El protocolo seleccionado para la amplificación del gen *alkB* incluyó el uso de la polimerasa Tplus y temperaturas de *annealing* óptimas de 45 °C para agua de mar y de 45,9 °C para las muestras de sedimento. Finalmente, se probó la capacidad de las cepas bacterianas de degradar diferentes hidrocarburos.

Palabras Clave

Biodegradación, extracción de ADN, amplificación genes *alkB*

Introducción

La liberación de hidrocarburos (HC) en el ambiente marino representa una de las principales fuentes de contaminación. En océanos y en aguas costeras el mayor aporte de compuestos hidrocarbonados ocurre por derrames accidentales y descargas deliberadas de embarcaciones. El continuo incremento de tráfico de embarcaciones en los últimos años ha contribuido al aumento de HC, especialmente en océanos abiertos. La acumulación de estos polutantes en los tejidos de organismos marinos tiene efectos mutagénicos y carcinogénicos (Shahi et al. 2015), y su bioacumulación en especies comerciales ponen también en riesgo la salud humana (Estevez et al. 2006). Por otro lado, los ambientes marinos son especialmente vulnerables, ya que los derrames de hidrocarburos, tanto de zonas costeras como de mar abierto, son pobremente contenidos y difíciles de mitigar (Shavykin y Karnatov 2018, Paniagua y Rosales 2015).

La biodegradación aeróbica de HC por microorganismos es un proceso complejo que incluye diferentes especies y diversas vías metabólicas. El estudio del potencial biodegradativo y de los genes involucrados en el metabolismo de HC es fundamental para comprender la biodegradación



natural en los ecosistemas marinos y para la aplicación de tecnologías de biorremediación destinadas a eliminar hidrocarburos del ambiente (Viggor et al. 2015).

Dado que los HC saturados (n-alcenos, alcanos ramificados y cicloalcanos) constituyen la mayor fracción del petróleo crudo, su biodegradación es el principal proceso durante la remoción de HC del ambiente (Guibert et al. 2012). Además, existe evidencia que los alcanos podrían servir como co-substratos para la eliminación co-metabólica de compuestos más recalcitrantes del petróleo. Varios microorganismos utilizan alcanos de cadenas cortas y largas (<C10, C20-C40, respectivamente), como fuente de carbono y energía (Li et al. 2013). Los estudios filogenéticos basados en el gen 16S ARNr permiten revelar la diversidad de estos microorganismos (Hamamura, et al. 2006), sin embargo, es difícil relacionar la estructura de las comunidades con su función bioquímica. Una alternativa para elucidar este aspecto es analizar los genes que codifican enzimas claves del estado fisiológico y de los procesos metabólicos (Liu et al. 2017). Las enzimas activantes de alcanos pertenecen a diferentes familias, siendo las monooxigenasas integrales de membrana (Alk B) las más caracterizadas (Rojo et al. 2009). Los genes *alkB* han sido usados como marcadores funcionales para la caracterización de bacterias degradadoras de HC en muestras ambientales y en experimentos de biorremediación (Viggor et al. 2015).

El objetivo de este estudio fue poner a punto la extracción de ADN metagenómico y la amplificación de genes *alkB*, con el fin de caracterizar poblaciones bacterianas claves asociadas con procesos aeróbicos de degradación de alcanos en aguas marinas. También se ensayó un método para evaluar el potencial biodegradativo frente a diversos HC.

Desarrollo del Procedimiento

1. Muestreo de agua y sedimentos

Las muestras de agua fueron tomadas utilizando un balde enjuagado previamente con agua de mar o mediante botellas tipo "Niskin". Aproximadamente 1,5 l de agua fueron concentrados a través de filtros de membrana de 0,22 μm de diámetro de poro (Durapore). Luego, los filtros se enjuagaron con 100 ml de buffer estéril para eliminar sustancias húmicas y sales (Rivera *et al.*, 2003), y fueron transferidos a crioviales y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de ácidos nucleicos.

El muestreo de sedimentos se realizó mediante un extractor tipo *Snapper*. Las muestras se extrajeron con una espátula metálica de acero inoxidable estéril y se colocaron sobre papel de aluminio estéril utilizado como envase primario, el cual fue alojado en una bolsa de polipropileno. Las muestras fueron conservadas en freezer ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su procesamiento en el laboratorio.

2. Extracción de ADN genómico

2.1. Muestras de agua

Protocolo 1:

El ADN genómico fue extraído a partir de las muestras de agua filtrada, de acuerdo con un protocolo estándar (Ellis et al. 2003). Los filtros fueron cortados en tiras finas y la extracción se inició con la adición de 1 ml de buffer CTAB [por 100 ml: CTAB 2% (2g); ClNa 1,4 M (35 ml de solución stock 4 M); EDTA 20 mM (4 ml de solución stock 0,5 M); TRIS-ClH 100 mM pH 8,0 (10 ml de solución stock 1 M)], 20 μl de lisozima (1mg/ml) y 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml) al tubo eppendorf con el filtro. Se mezcló por agitación en bandeja a máxima velocidad por 20 min, se agregó 200 μl de SDS 10% y se incubó por 30 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño termostático. Se recuperó el lisado del filtro y se lo trasvasó a un tubo limpio, manteniendo en hielo por 2 min y luego fue centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, y se repitió la extracción a partir del precipitado obtenido, con 300 μl de buffer CTAB. Se juntaron los



sobrenadantes de ambas extracciones y se agregaron aproximadamente 0,5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; pH 8), centrifugando luego 5 min a 12.000 rpm. Se agregó al sobrenadante igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando con vortex y centrifugando 5 min a 12.000 rpm. Posteriormente, se trasvasó la fase acuosa superior (sin arrastrar interfase) a un tubo limpio y se agregó isopropanol en relación de volumen 1:1. Los tubos fueron guardados en freezer a -20 °C 12 h. Luego de una centrifugación durante 30 min a 12.000 rpm, el sobrenadante fue eliminado (por volcado) y el precipitado de ADN fue lavado con 200 µl de etanol al 80% frío. Los tubos se mantuvieron a -20 °C por 15 min y se centrifugaron 30 min a 12.000 rpm. El precipitado de ADN fue secado en estufa a 55 °C, resuspendido en 30 µl de agua MiliQ esteril y almacenado a -20 °C hasta su uso. Se realizó electroforesis del ADN extraído mediante geles de agarosa al 1% en buffer TBE (108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de una solución de EDTA 0,5M, en 1 l de agua destilada), a 110 V durante 35 min. Se utilizó 4 µl de una solución 1:3 de Lamda ADN/Hind III Markers (PROMEGA) y agua libre de ADNasas como marcador de PM y 5µl del extracto de ADN con bromuro de etidio o Syber safe (Thermo Fisher). El ADN fue visualizado y fotografiado bajo los UV.

Protocolo 2:

Se llevó a cabo la misma metodología que la utilizada en el Protocolo 1 pero sin el agregado de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Protocolo 3:

En el tercer protocolo ensayado la extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit comercial *PureLink Genomic DNA Kit* (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones para bacterias Gram positivas y negativas. El ADN extraído fue visualizado como se indica en el Protocolo 1.

Luego de probar los 3 protocolos, se seleccionó el protocolo 2 (sin adición de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) como método de extracción de ADN genómico bacteriano, ya que no hubo diferencia en los resultados con y sin el agregado de fenol. Los resultados de la extracción con el kit comercial *PureLink® Genomic DNA Kit (Life Technologies)*, mostraron bandas más tenues con respecto a los otros 2 protocolos, usando los reactivos preparados en el laboratorio.

2.2. Muestras de sedimento

Se realizaron 2 extracciones por muestra de sedimentos que fueron combinadas en el último paso de extracción.

2.2.1. Preextracción:

En el caso de matrices como sedimento o suelo es importante el procedimiento de pre-extracción, ya que aún trazas de químicos tóxicos actúan luego como inhibidores, dificultando tanto la extracción de ADN total como la amplificación de genes específicos (Sharma et al. 2012). Por este motivo antes de la extracción de ADN las muestras fueron sometidas a un procedimiento que consistió en tres pasos de pre-extracción con el fin de remover los compuestos orgánicos (Purohit et al. 2003):

- 1) Se tomó 1 g de muestra y se agregó 1 ml de una solución estéril (buffer 1) con 50 mM Tris HCl pH 8, 200 mM ClNa, 5 mM EDTA y 0,05% (v/v) Triton x-100. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12.000 g por 15 min. Si el residuo contenía mucha carga oleosa se repitió este paso.
- 2) El sobrenadante se desechó y al pellet se le agregó 1 ml de una solución estéril (buffer 2) con 50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl y 5 mM EDTA. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12.000 g por 15 min.
- 3) El sobrenadante fue desechado y al pellet se le agregó 1 ml de una solución estéril (buffer 3) con 10 mM Tris HCl pH 8 y 0,1 mM EDTA. Se agitó en vórtex y centrifugó a 12.000 g por 15 min. Este último paso se repitió una vez más antes de la extracción del ADN.



2.2.2. *Extracción de ADN:* Para la extracción del ADN genómico se llevó a cabo la misma metodología (Protocolo 2) que la seleccionada en las muestras de agua de mar.

3. *Amplificación del gen catabólico *alkB**

El ADN genómico extraído fue utilizado como molde para la amplificación de fragmentos de genes que codifican enzimas monoxigenasas involucradas en las vías catabólicas de hidrocarburos lineales, usando los sets de cebadores *alkB* 484F (5'-GGKCA YTTCTWCRTYGARCA-3') y *alkB* 824R (5'-CCGTAGTGYTCRABRTARTT-3'), (Olivera *et al.*, 2009). Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en reacciones de 25 μ l que contenían: 1 X de Buffer Taq, 1,5 mM de Cl_2Mg , 0,2 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de cada cebador, 1 U de ADN polimerasa T-Plus (Inbio-Highway, Tandil) y 5 μ l del ADN. Las amplificaciones se realizaron en un Ciclador Térmico Life Express TC-96/G/H(b) con el siguiente programa: 94 °C durante 4 min; 30 ciclos de 30 s a 94 °C; 45 s a 43 °C, 30 s a 72 °C y una elongación final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con marcador de peso molecular (100 pb, InbioHighway).

La técnica de PCR fue optimizada utilizando las siguientes temperaturas de *annealing*: 45; 45,9; 47,2; 48,1 y 49,4 °C. Además se probaron las ADN polimerasas GoTaq (Promega) y Pfu (Inbio Highway), siguiendo las recomendaciones de los proveedores para la preparación de la mezcla de reacción. Se obtuvieron los mejores resultados utilizando la polimerasa Tplus y las temperaturas de *annealing* óptimas fueron: 45 °C para el agua de mar y 45,9 °C para las muestras de sedimento.

4. *Perfil de degradación de hidrocarburos de las cepas bacterianas*

Con el objetivo de determinar el potencial degradativo de bacterias degradadoras de HC, se aislaron cepas a partir de muestras de agua de mar. Se sembraron 100 μ l de agua en placas de Petri con medio de cultivo MSM (Schlegel *et al.*, 1961) solidificado con agar purificado (Merck) (1,4%, p/v), y suplementado con la adición de ClNa (2%, p/v) y gasoil al 0,5 % (v/v) como única fuente de carbono y energía. Las placas se incubaron durante 7 días a 30 °C.

Los aislamientos fueron luego inoculados en tubos con 5 ml de medio líquido MSM suplementado con diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, en una concentración final de 1 % (v/v) para productos de destilación y alcanos lineales, y 0,5 % (v/v) para ciclohexano y aromáticos (Peressutti *et al.* 2003, Zhao *et al.* 2011). Se probaron productos de destilación de petróleo como gasoil, kerosene y aceite mineral; e hidrocarburos puros como alifáticos (pentano, hexano, pentadecano y hexadecano), cicloalcano (ciclohexano), monoaromáticos (benceno y tolueno) y poliaromáticos (naftaleno, antraceno y fenantreno). Los tubos fueron incubados durante 7 días a 30 °C mediante agitación continua y el crecimiento bacteriano fue evaluado por turbidez visible.



Resumen de pasos del procedimiento

1. Toma de muestra

1.1. Agua de mar

1.1.1. Tomar muestras con balde o botella Niskin.



1.1.2. Concentrar 1,5 l de agua con filtro de 0,22 μm (Durapore, PVDF),



1.1.3. Enjuagar los filtros con 100 ml de buffer estéril para eliminar sustancias húmicas y sales



1.1.4. Transferir a crioviales y almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

1.2. Sedimentos

1.2.1. Tomar muestras con extractor tipo Snapper



1.2.2. Extraer el sedimento con espátula metálica de acero inoxidable estéril



1.2.3. Envolver la muestra en papel de aluminio y colocar en bolsa de polipropileno.
Conservar en freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$



2. Extracción ADN genómico microbiano

2.1. Agua de mar

2.1.1. Cortar el filtro de cada criovial en tiras finas y transferir a eppendorf de 2 ml



2.1.2. Agregar 1 ml de buffer CTAB 2% + 20 µl de lisozima (1mg/ml) + 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) al eppendorf con filtro



2.1.3. Mezclar por agitación en *shaker* a 400 rpm por 20 min



2.1.4. Agregar 200 µl de SDS 10% e incubar 30 min a 65 °C en baño termostatzado o *shaker*



2.1.5. Colocar los tubos en hielo por 2 min, centrifugar a 12.000 rpm por 2 min y transferir la fase superior con ADN a un tubo limpio



2.1.6. Juntar los sobrenadantes de ambas extracciones y agregar igual volumen de CIA (cloroformo:isoamílico, 24:1), mezclando por inversión y centrifugar 5 min a 12.000 rpm



2.1.7. Transferir la fase acuosa (superior, sin arrastrar interfase) a un tubo limpio y agregar isopropanol volumen 1:1 y guardar en freezer a -20 °C *overnight*



2.1.8. Centrifugar las muestras por 30 min a 12.000 rpm, remover el sobrenadante por volcado, lavar el precipitado con etanol al 80% frío y colocar en freezer a -20 °C por 15 min. Centrifugar a 12.000 rpm por 30 min



2.1.9. Remover el sobrenadante, secar el precipitado de DNA en estufa a 55 °C y resuspender el precipitado en 30-50 µl de agua MiliQ y almacenar a -20 °C.



2.1.10. Sembrar 5 µl de las muestras de ADN extraído con 3 µl de bromuro de etidio o Syber safe (Thermo Fisher) y 4 µl de solución 1:3 de Lamda ADN/Hind III Markers (marcador de PM), en geles de agarosa al 1% con buffer TBE.

Realizar electroforesis a 110 V durante 40 min y visualizar bajo luz UV



2.1.11. Medir la concentración de ADN en Fluorómetro QuantiFluor™-ST utilizando QuantiFluor™ dsDNA System



2.2. Sedimentos

Dos extracciones por muestra de sedimentos combinadas en el último paso de extracción

2.2.1. Preextracción



2.2.1.1. Tomar 1 g de muestra y agregar 1 ml Buffer 1 (50 mM Tris HCl pH 8, 200 mM ClNa, 5 mM EDTA, 0,05% (v/v) Triton x-100)



2.1.2. Agitar en vórtex y centrifugó a 12.000 g por 15 min
Si el residuo contiene mucha carga oleosa se repite este paso



2.2.1.3. Desechar el sobrenadante y agregar 1 ml de Buffer 2 50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl y 5 mM EDTA.
Agitar en vórtex y centrifugar a 12.000 g por 15 min



2.2.1.4. Desechar el sobrenadante y agregar 1 ml de Buffer 3 (10 mM Tris HCl pH 8 y 0,1 mM EDTA). Agitar en vórtex y centrifugar a 12.000 g por 15 min.
Repetir este paso antes de la extracción del ADN

2.2.2. Extracción de ADN

Aplicar el mismo protocolo que para agua de mar

3. Amplificación del gen catabólico *alkB* por PCR

3.1. Preparación de *Mix*

<i>Mix</i>	μl	X 10	Por tubo 20 μl de <i>Mix</i>	Concentración final
H ₂ O	8,3	83		
Buff Taq 10X	2,5	25		1X
Mg Cl ₂ (25 mM)	1,5	15		1.5 mM
dNTPs (2 mM)	2,5	25		0.2 mM
Pr F (5 μM)	2,5	25		0.5 μM
Pr R (5 μM)	2,5	25		0.5 μM
T plus (5U/ μl)	0,2	2		1 U
ADN			5 por tubo	



3.2. PCR y electroforesis

3.2.1. Protocolo de PCR: 94 °C por 4 min, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 45 ó 45.9 °C*, 30 s a 72 °C y una elongación final de 10 min a 72 °C en Ciclador Térmico Life Express TC-96/G/H(b)



3.2.2. Visualizar los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1%, con marcador de peso molecular (100 pb, InbioHighway)

* Temperaturas de *annealing* óptimas: 45 °C para agua de mar y 45,9 °C sedimento

4. Perfil de degradación de hidrocarburos de las cepas bacterianas

4.1. Aislar cepas bacterianas sembrando 100 µl de agua de mar en placas con agar MSM, CINa (2%, p/v) y gasoil al 0,5 % (v/v)



4.2. Inocular cada cepa en tubos con 5 ml de medio líquido MSM suplementado con diferentes HC:

gasoil, kerosene, aceite mineral, pentano, hexano, pentadecano y hexadecano (1 %, v/v)
ciclohexano, benceno, tolueno, naftaleno, antraceno y fenantreno y 0,5 % (v/v)



4.3. Incubar los tubos durante 7 días a 30 °C en agitación continua y evaluar el crecimiento bacteriano por turbidez visible

Bibliografía

- Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ, Fry JC. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3223-3230.
- Esteves, JL, Commendatore MG, Nievas ML, Paletto VM, Amín O. 2006. Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego islands, Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 582-590.
- Guibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Lozada M. 2012. Alkane biodegradation genes from chronically polluted Subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microb. Ecol.* 64: 605-616.
- Hamamura N, Olson SH, Ward DM, Inskeep WP. 2006. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6316-6324.
- Li H, Wang X-L., Mu B.-Z, Gu J-D, Liu Y-D, Lin K-F, Lu S-G, Lu Q, Li B-Z, Li Y-Y, Du X-M. 2013. Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 76: 49-478.



- Liu Q, Tang J, Liu X, Song B, Zhen M, Ashbolt NJ. 2017. Response of microbial community and catabolic genes to simulated petroleum hydrocarbon spills in soils/sediments from different geographic locations. *J. Appl. Microbiol.* 123: 875-885.
- Olivera NL, Nieves ML, Lozada M, Del Prado G, Dionisi HM, Sineriz F. 2009. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Res. Microbiol.* 160: 19-26.
- Paniagua MJ, Rosales A. 2015. Marine bioremediation - a sustainable biotechnology of petroleum hydrocarbons biodegradation in coastal and marine environments. *J. Bioremediat. Biodegrad.* 6:273.
- Peressutti SR, Alvarez HM, Pucci OH. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 52: 21-30.
- Purohit HJ, Kapley A, Moharikar AA, Narde G. 2003. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *J. Microbiol. Methods.* 52: 315-323.
- Rivera I, Lipp E, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell R. 2003. Method for extraction and application of Multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* 5: 599-606.
- Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 11: 2477-2490.
- Schlegel HG, Kaltwasser H, Gottschalk G. 1961. A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Arch. Microbiol.* 38: 209-222.
- Shahi A, Aydin S, Ince B, Ince O. 2016. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Mar.* 125: 153-60.
- Sharma N, Tanksale H, Kapley A, Purohit HJ. 2012. Mining the metagenome of activated biomass of an industrial wastewater treatment plant by a novel method Indian. *J. Microbiol.* 52: 538-543.
- Shavykin A, Karnatov A. 2018. Main development problems of vulnerability mapping of sea-coastal zones to oil spills. *J. Mar. Sci. Eng.* 6: 115.
- Viggor S, Joesaar M, Vedler E, Kiiker R, Parnpuu L, Heinaru A. 2015. Occurrence of diverse alkane hydroxylase *alkB* genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water. *Mar. Pollut. Bull.* 101: 507-516.
- Zhao H-P, Liang S-H, Yang X. 2011. Isolation and characterization of catechol 2,3-dioxygenase genes from phenathrene degraders *Sphingomonas*, sp. ZP1 and *Pseudomonas* sp. ZP2. *Environ. Technol.* 32: 1895-1901.