



Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina

Characterization of oil bioremediating strains of *Vibrio* spp. isolated from seawater

Robert Peralta Otero^{1,*}; Tessa Peralta Ortiz²; Alberto Ordinola-Zapata^{2,3}

1 Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, Avenida Universitaria S/N, Tumbes. Perú.

2 Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, Calle Los Ceibos S/N, Puerto Pizarro, Tumbes. Perú.

3 Grupo de Investigación en Biodiversidad en Ecosistemas Acuáticos Tropicales (BioTrop) de la Universidad Nacional de Tumbes, Calle Los Ceibos S/N, Puerto Pizarro, Tumbes. Perú.

*Autor corresponsal: rperaltao@untumbes.edu.pe (R. Peralta Otero).

ID ORCID de los autores

T. Peralta Ortiz:  <https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>

A. Ordinola-Zapata:  <https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue aislar y caracterizar cepas de *Vibrio* obtenidas de agua marina en la línea de playa y la zona adyacente a la plataforma de extracción petrolera CX-11 del Lote Z1 ubicado a 17 km de la ciudad de La Cruz (Tumbes, Perú). Las cepas fueron aisladas en caldo mineral Bushnell Haas suplementado con petróleo crudo, luego fueron subcultivadas en caldo de tripticasa soya (TSB) hasta obtener colonias puras, las cuales fueron caracterizadas mediante tinción de Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa; además fueron identificadas mediante secuenciamiento de un fragmento de sus genes 16S ARNr. Se verificó que las cepas portaran genes de benceno di oxigenasas. Se pudo aislar seis cepas correspondientes a *Vibrio fluvialis* y *Vibrio* spp., que portaban los genes indicados. La investigación demostró que en aguas de la línea de playa y zonas adyacentes a la plataforma de extracción CX-11 del Lote Z1, existen cepas de *Vibrio fluvialis* y *Vibrio* spp. con capacidad para degradar hidrocarburos.

Palabras clave: biorremediación; degradación; petróleo; hidrocarburos; benceno; oxigenasa.

ABSTRACT

The aim of research was to isolate and characterize *Vibrio* strains obtained from seawater in the beach line and the area adjacent to the oil extraction platform CX-11 of Z1 block located 17 km from the city of La Cruz (Tumbes, Peru). The strains were isolated in Bushnell Haas mineral broth supplemented with crude oil, then they were subcultured in trypticase soy broth (TSB) until obtaining pure colonies, which were characterized by Gram staining and oxidase and catalase tests; they were also identified by sequencing a fragment of their 16S rRNA gene. It was verified that the strains carried benzene di oxygenase genes. It was possible to isolate six strains corresponding to *Vibrio fluvialis* and *Vibrio* spp. that carried the indicated genes. The investigation demonstrated that in waters of the beach line and adjacent areas to the extraction platform CX-11 of Z1 block, there are strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio* spp. with capacity to degrade hydrocarbons.

Keywords: bioremediation; degradation; oil; hydrocarbons; benzene; oxygenase.

Recibido: 04-12-2020.

Aceptado: 12-02-2021.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

INTRODUCCIÓN

En el mundo los derrames de petróleo ocasionan grandes impactos en el ambiente. Se ha estimado que entre 1970 y 2017 se han vertido más de 5,7 millones de toneladas de petróleo en los océanos; uno de los mayores derrames registrados fue el incidente de la plataforma *Deepwater Horizon* en el Golfo de México, en 2010, en tan solo éste se derramaron 3,19 millones de barriles de petróleo (Cerqueda-García et al., 2020; Singh et al., 2020); Los derrames de petróleo se han producido también en la costa y selva peruana, por ejemplo, en 1995 se vertieron varios cientos de barriles en el litoral de Conchán, posteriormente, el año 2000, más de 101 barriles de petróleo, en La Libertad y 5500 barriles en la amazonia, en el río Maraón. También se han producido derrames en Pariñas (Piura) en 2002, en el río Maraón en 2007 y 2010, así en Trompeteros (Loreto) en 2012 (Austermühle, 2010). Tumbes también cuenta con explotación petrolera a cargo de la compañía BPZ Exploration and Production en zonas marítima cercanas a la costa; en éstas también se han registrado incidentes por vertimiento de petróleo como la ocurrida en 2007 por un accidente en la plataforma Corvina (CX-11 del Lote Z-1) (Geolab SRL, 2011). Existe por lo tanto el riesgo de derrames que afecten el mar y costa tumbesina, incluyendo la zona de los manglares, siendo por lo tanto necesario buscar métodos para minimizar los posibles daños y acelerar la recuperación de los ambientes contaminados. El petróleo es un mezcla compleja de hidrocarburos no polares y polares; los primeros son relativamente de menor peso molecular, pudiendo ser saturados (alcanos lineales, ramificados, cíclicos) y no saturados (alquenos y aromáticos); en los hidrocarburos polares, se presentan los más complejos y pesados como los naftalenos y resinas; el petróleo constituye pues una mezcla de sustancias tóxicas, mutagénicas, incluso carcinogénicas y perjudiciales para el ambiente (Ławniczak et al., 2020; Li et al., 2019; Odukoya et al., 2019; Sari et al., 2019). La contaminación por petróleo es problemática en todos los ecosistemas, pero lo es aún más cuando se produce en las playas; normalmente el contaminante es vertido en el mar y llevado por las olas y mareas hasta las orillas, donde es difícil de remover y puede permanecer largo tiempo debido a sus características de viscosidad, baja solubilidad, alta estabilidad química y bioacumulación (Dai et al., 2020); por ello las tecnologías para eliminar tales contaminantes son esenciales, una de ellas, muy prometedora, es la biorremediación (Lee et al., 2018). La biorremediación usando microorganismos tiene como objetivo metabolizar los compuestos contaminantes del petróleo, complejos y pesados, para hacerlos más sencillos y livianos, y de ser posible llegar a reducirlos a CO₂ y metano (Logeshwaran et al., 2018);

los microorganismos más utilizados para la biorremediación son las bacterias, las cuales pueden poseer enzimas mono oxigenasas o dioxigenasas que catalizan la conversión de alcanos lineales y aromáticos a alcoholes primarios, como primer paso de su degradación (Pi et al., 2016). La biorremediación microbiana del petróleo se fundamenta en la utilización de los hidrocarburos como fuente de energía, por parte de los microorganismos. Varias investigaciones han mostrado que se pueden usar bacterias para biorremediar el petróleo, así Cerqueda-García et al. (2020), encontraron que consorcios bacterianos obtenidos del agua y sedimento marino tienen capacidad de degradar las distintas fracciones de petróleo, desde extraligeras hasta pesadas, pero en el caso de las comunidades del sedimento incluso pudieron hacerlo con las fracciones extrapesadas; por otra parte Dai et al. (2020), ensayaron la combinación de un consorcio bacteriano (*Brevibacillus* sp., *Bacillus* sp. y *Acinetobacter* sp.) y enzimas bacterianas inmovilizadas en arena de playa contaminada con petróleo, encontrando que pudieron degradar n-alcanos de 26 a 35 carbonos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de 3 anillos. En otra investigación realizada por Lee et al. (2018), se utilizaron cepas bacterianas de *Bacillus algicola*, *Rhodococcus soli*, *Isoptericola chiayiensis* y *Pseudoalteromonas agarivorans* para degradar petróleo, encontrando además que dichas cepas fueron productoras de surfactantes lo que ayudó a su actividad biorremediadora. Un género de bacterias que se ha empleado mucho en bioremediar petróleo es el género *Vibrio*, incluso se ha afirmado que las bacterias del dicho género están entre las principales y más abundantes degradadoras de PAHs (Liu et al., 2021). El género *Vibrio* abarca a más de 100 especies, de bacilos Gram negativos muy comunes en ecosistemas acuáticos (Baker-Austin et al., 2018); las cepas que poseen actividad biorremediadora de hidrocarburos corresponden a las especies: *Vibrio fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *Vibrio* spp. (Bravo, 2018; Çardak et al., 2007; Fernandes et al., 2020; Hernández et al., 2015; Li et al., 2019; Quintana-Saavedra et al., 2012); La existencia de bacterias biorremediadoras de petróleo (portadoras de genes oxigenasas) en la zona costera de Tumbes, fue reportada por Ramírez et al. (2016), quienes lograron aislar e identificar cinco cepas bacterianas del manglar, una de las cuales fue identificada como *Vibrio fluvialis*, estas cepas bacterianas mostraron poder reducir los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) en suelo, en un 77% a 82%, siendo promotoras como potenciales biorremediadores. Por ello en esta investigación se buscó aislar de una zona costera de Tumbes, cepas de *Vibrio* capaces de degradar petróleo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó entre febrero a diciembre de 2019 en los Laboratorios de Biología Molecular y de Microcultivos, ubicados en Villa Puerto Pizarro (Tumbes, Perú), en las instalaciones de la

Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes. La caracterización de las cepas de *Vibrio* spp. se realizó como sigue:

Obtención de la muestra

Se recolectaron siete muestras: cuatro en la línea de playa y tres en el área de extracción de petróleo del lote Z-1 plataforma CX-15 y CX-11. La recolección de las muestras de agua en la línea de playa se hizo durante la baja marea y en forma aleatoria, a lo largo de un recorrido de 2500 m en playa Caleta Grau. La recolección en el mar adyacente a la zona de extracción de petróleo (plataformas de extracción petrolera y buque tanque de almacenamiento) se hizo de manera aleatoria con una embarcación de fibra de vidrio con motor fuera de borda, a 17 km mar adentro de Caleta La Cruz. En cada punto de muestreo, tanto en playa como en mar, se tomaron dos submuestras de agua utilizando envases de vidrio de 250 ml esterilizados, una en la superficie del agua y la otra a 30 cm de profundidad. Las coordenadas de las zonas de muestreo fueron registradas con un equipo GPS (Garmin modelo Etrex-10). Se registraron los parámetros fisicoquímicos del agua de mar: salinidad, pH, oxígeno disuelto y temperatura utilizando un refractómetro (ATC), un pH metro portátil (Hanna modelo HI-98103), y un oxímetro (YSI Modelo DO200A). Las muestras fueron transportadas en una caja térmica de tecnopor a una temperatura promedio de 7 °C hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la FIPCM.

Siembra de las muestras

Las muestras de agua fueron sembradas inicialmente para su enriquecimiento, en matraces de 120 ml adicionándose 60 ml de caldo Bushnell Haas (marca Himedia) al cual se agregó 500 µl de crudo mesa 30 como fuente de carbono, los matraces fueron colocados en un agitador de laboratorio (Labnet modelo Orbit-1000). El aislamiento de las bacterias con capacidad de degradar petróleo, se realizó en placas petri con agar Bushnell Haas (marca Himedia) complementado con 60 µl de crudo mesa 30, y con agar triptona soya (TSA) (marca Oxoid) enriquecido con 3 % de NaCl y complementado con 60 µl de crudo mesa 30, en las que se sembró 20 µl del agua de la muestra extraída, mediante el método de barrido y se dejó incubar a 35 °C por 24 a 48 horas en una incubadora (Memmert modelo SN76).

Caracterización fenotípica de las colonias bacterianas

La caracterización fenotípica de las bacterias, se realizó observando al estereoscopio, colonias bacterianas aisladas del agar Bushnell Haas, tomándose en cuenta color, forma y tamaño.

Obtención de colonias puras

Las colonias puras se obtuvieron luego de repetidas siembras, por la técnica por agotamiento, en placas petri con medio agar Bushnell Haas (BHA) (marca Himedia) y con TSA enriquecido con 3% de NaCl. Se confirmó la pureza de las colonias bacterianas en las placas de medio selectivo utilizando la tinción Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa. Las cepas puras fueron conservadas en microtubos de 1,5 ml

conteniendo 1 ml de caldo de tripticasa soya (TSB) con 150 µl de glicerol a 4 °C.

Tinción de Gram

Una colonia de cada una de las cepas puras se procedió a colocar con un asa de siembra en una lámina porta objeto se fijó con fuego y se cubrió con cristal violeta por 1 min, luego se lavó con agua destilada (los sucesivos lavados también se hicieron con ésta), se aplicó lugol por 1 min y se volvió a lavar, se cubrió con acetona por 30 s y se lavó. Se aplicó safranina por 1 min y se volvió a lavar, dejándose secar a temperatura ambiente, para luego ser observadas al microscopio a una resolución de 1000X.

Prueba de catalasa y oxidasa

Se tomó algunas colonias de las cepas de bacterias puras crecida en placas petri con TSA por 24 h a 35 °C, se colocaron en láminas portaobjeto y se les aplicó una gota de agua oxigenada comercial (peróxido de hidrogeno al 3%), verificándose si se formaban burbujas, como indicador de una cepa catalasa positiva.

Para la prueba de oxidasa se tomó algunas de las cepas de bacterias, se colocaron en láminas portaobjeto, se les agregó solución salina al 0,85%, se procedió a colocar sobre ellas, tiras de oxidasa (Oxoid) y se observó por 1 min si se produjo un cambio de color de la tira a azul violáceo, indicador de una cepa oxidasa positiva.

Extracción de ADN de las cepas bacterianas

Para la extracción de ADN se tomó una muestra de 950 µl de cultivo bacteriano puro en TSB, el cual fue centrifugado a 16 000 xg a 4 °C por 5 min en una centrifuga (Orto Alresa modelo Digicen 21R). Se desechó el líquido de la parte superior y se aplicó 500 µl de tampón fosfato salino (PBS) 1X (Sigma-Aldrich), se colocó en la centrifuga a 12 000 xg a 4 °C por 2 min; descartándose el líquido sobrenadante e incorporándose 200 µl de TE 1X (Tris 10 mM y EDTA 1mM), pH 8, después fue calentado por 10 min a 100 °C colocándose rápido en hielo por 5 min. A continuación el producto lisado fue centrifugado a 16 000 xg por 1 min, recuperándose, en un nuevo tubo, el líquido sobrenadante (en el cual se halla el ADN). A continuación, se realizó dilución 1:10 del sobrenadante en agua ultrapura (AUP), Al final se adicionó 2 µl de ARNasa, incubándose por 30 min a 37 °C, para eliminar cualquier residuo de ARN y purificar el ADN.

Identificación genómica de cepas bacterianas

Se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida al gen 16S ARNr, para lo cual se colocó en un microtubo de 200 µl; 2,5µl de tampón para PCR 10X (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂, ajustado a pH 8,3), 1,5 µl de solución 25 mM de MgCl₂; 0,5 µl de solución 10 mM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs); 17,4 µl de agua ultrapura (AUP), 0,5 µl del cebador forward 27F y 0,5 µl del cebador reverse 1492R, 0,1 µl de Taq ADN polimerasa platinum (Invitrogen), al cual se adicionó 2 µl del ADN extraído de cepa bacteriana pura. La reacción tuvo lugar en un

volumen de 25 µl en un Termociclador (Applied Biosystems modelo SimpliAmp), programado con pre desnaturalización por 5 min a 94 °C, a continuación 35 ciclos de proceso (desnatura- lización por 30 s a 94 °C, hibridación a 54 °C por 40 s, polimerización por 1 min 30 s a 72 °C) y un paso final de extensión por 4 min a 72 °C. El producto de amplificación fue enviado a la Empresa BTS Consultores para su secuenciamiento. Una vez recibidas las secuencias nucleotídicas, se realizó una búsqueda en la base de datos de GenBank para la identificación de las cepas.

Detección de genes codificadores de di oxigenasas

Realizó la amplificación de un fragmento del gen codificador de benceno dioxigenasa mediante PCR en un volumen de reacción total de 25 µl, conteniendo: de tampón para PCR 10X, 1,5 µl de

solución 25 mM de MgCl₂, 17,4 µl de AUP, 0,5 µl de solución 10 mM de dNTPs, 0,5 µl del cebador forward BenF (5'-AGC GTC TGG GTA GTA TAG AG-3'), 0,5 µl del cebador reverse BenR (5'-AGA AGG TAC GTA CGT AGT GTC TGA-3'), 0,1 µl de Taq ADN polimerasa platinumium (Invitrogen) y 2 µl del ADN extraído de cepa bacteriana pura. La PCR se realizó en un Termociclador (Applied Biosystems modelo SimpliAmp), programado con pre desnatura- lización por 5 min a temperatura de 95 °C, al cual siguió 35 ciclos de proceso (desnatura- lización por 30 s a 94 °C, hibridación por 15 s a 58 °C, polimerización por 45 s a 72 °C) y un paso final de extensión por 10 min a 72 °C. El producto de amplificación fue migrado en un equipo de electroforesis para visualizar las bandas fluorescentes que indicaran la presencia del fragmento del gen benceno di oxigenasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 156 cepas cultivables aisladas y purificadas se identificaron y caracterizaron, seis cepas de *Vibrio* procedentes de la zona de estudio, en la cual el agua de mar tuvo una salinidad de 40 ‰, pH 8, oxígeno disuelto de 6,60 mg/l y temperatura de 23,30 °C.

Caracterización fenotípica de las colonias bacterianas

Las colonias de las cepas de *Vibrio* aisladas, mostraron las características que se muestran en la tabla 1, cuando fueron cultivadas en TSA, siendo algunas blancas cremosas circulares de borde liso, otras blancas cremosas irregulares y algunas cremosas circulares; los diámetros de las colonias formadas estuvieron en el rango de 0,5 a 2 mm; que son características típicas de colonias de *Vibrio* al crecer en dicho medio como lo señalan Sabir et al. (2013) y Aguirre (2019).

Tabla 1

Características fenotípicas de las colonias de *Vibrio* aisladas

Cepa	Características fenotípicas	Diámetro (mm)
T2-1#2	Blanco cremoso circular borde liso	0,5
P1M52	Blanco cremoso circular borde liso	1,0
P3M21	Blanco cremoso borde irregular	2,0
P3M31	Blanco cremoso borde irregular	2,0
2K-BII-#5	crema circular borde liso	0,5
3K-AII#2	crema circular borde liso	1,5

Caracterización de las cepas mediante tinción de Gram, y las pruebas de catalasa y oxidasa

Las seis cepas al ser observadas con tinción Gram, mostraron ser Gram negativas y con formas de bacilocos o bacilos Gram negativos; adicionalmente todas ellas mostraron ser oxidasa positivas, mientras que la mayoría fueron catalasa positivas, a excepción de las cepas P3M21 y P3M31 (Tabla 2). Las características mostradas son comunes en *Vibrio*: bacilos Gram negativos, generalmente oxida- sa positivos y catalasa positivos, aunque algunas cepas pueden ser catalasa negativo (Aguirre, 2019; Baker-Austin et al., 2018; Hoffmann et al., 2012).

Tabla 2

Caracterización de las cepas de *Vibrio* aisladas

Cepa*	Medio	Forma	Catalasa
T2-1#2	BHA	Bacilococo	(+)
P1M52	TSA	Bacilococo	(+)
P3M21	TSA	Bacilo	(-)
P3M31	BHA	Bacilo	(-)
2K-BII-#5	TSA	Bacilococo	(+)
3K-AII#2	BHA	Bacilococo	(+)

* Todas las cepas fueron Gram negativas y oxidasa positivas

Identificación genómica de las cepas de *Vibrio*

La búsqueda de las secuencias nucleotídicas de las cepas de *Vibrio* se realizó usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) implementada en la base de datos GenBank, esto permitió identificar a las seis cepas con un porcentaje de similitud alto (entre 99,80 y 100 %); encontrándose que las cepas; T2-1#1, 2K-BII-#5 y 3K-AII#2, corres- pondieron a *Vibrio* spp. y P1M52, P3M21 y P3M31, a *Vibrio fluvialis* (Tabla 3).

Tabla 3

Identificación genómica de las cepas de *Vibrio* aisladas

Cepa	Identificación	Similitud (%)
T2-1#1	<i>Vibrio</i> spp.	99,8
P1M52	<i>Vibrio fluvialis</i>	100,0
P3M21	<i>Vibrio fluvialis</i>	100,0
P3M31	<i>Vibrio fluvialis</i>	99,8
2K-BII-#5	<i>Vibrio</i> spp.	100,0
3K-AII#2	<i>Vibrio</i> spp.	100,0

Detección del gen de benceno dioxigenasa

La PCR dirigida al gen benceno dioxigenasa mostró que las seis cepas de *Vibrio* aisladas poseyeron tal gen, lo que se evidenció en las bandas fluorescentes que se observaron en el gel de agarosa utilizado en la electroforesis (Figura 2), esto es consistente con un producto de alrededor de 200 pb, que es el tamaño del fragmento esperado para los cebadores empleados.



Figura 1. Gel de migración mostrando las bandas de 200 pb indicadoras de la presencia del gen benceno dioxigenasa.

El aislamiento de seis cepas de *Vibrio* con capacidad de biorremediar petróleo al poseer el gen de la benceno dioxigenasa en el litoral de Tumbes, es compatible con lo expresado por Bravo (2018),

Fernandes et al. (2020), Hernández et al. (2015), quienes afirmaron que *Vibrio* spp. ve favorecido su crecimiento en aguas contaminadas con hidrocarburos, pues las cepas de este género tienen la capacidad de degradar y transformar los contaminantes complejos en compuestos más sencillos de cadena más cortas (Hernández et al., 2002).

Estos hallazgos se suman a los ya realizados por Ramírez et al. (2016), quienes aislaron e identificaron cepas bacterianas del manglar de Tumbes, entre ellas de la especie *Vibrio fluvialis* con capacidad de biorremediar petróleo, indicando que existen cepas bacterianas nativas con capacidad de degradar hidrocarburos, que pueden utilizarse para desarrollar tratamientos de biorremediación biológica ante posibles futuros derrames de petróleo que se produzcan en el mar y zona litoral de la región Tumbes.

CONCLUSIONES

En esta investigación se aisló, a partir de muestras de agua marina del lote Z1 en Tumbes (Perú), seis cepas de *Vibrio* spp. y *Vibrio fluvialis*, que portan el gen de la benceno di oxigenasa y que por lo tanto poseen capacidad para degradar ciertas fracciones de hidrocarburos del petróleo, lo que les otorga una potencial utilidad como cepas nativas para biorremediar derrames de petróleo en el mar y

zona litoral, que puedan producirse en el futuro. Como siguiente paso, se debe desarrollar investigaciones para evaluar el efecto de dichas cepas por separado o como consorcios en la degradación de hidrocarburos en un ensayo de campo, a fin de determinar si tales cepas son capaces de mostrar capacidades similares de degradación a las que han tenido en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tumbes por financiar esta investigación que se desarrolló como parte del Proyecto de Investigación Científica formativa financiado con fondos de Canon y Sobrecanon del año 2018, autorizado mediante Resolución de Consejo Universitario 0904-2018/UNTUMBES-C-U. A los estudiantes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar que colaboraron en la

ejecución del Proyecto. A la Mg. Yeni Emperatriz Seminario Yamunaqué y al Mg. Erick Antonio Suárez Peña, quienes apoyaron en la identificación microbiológica y análisis de PCR, de igual manera a la Br. en Ingeniería Pesquera, Sigrid Campoverde Peña, por su apoyo en la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, L. E. (2019). Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. Resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus vannamei*. [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes].
- Austermühle, S. (2010). *Historia de derrames de petróleo en el Perú*. ONG Grupo Mundo Azul.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martínez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. Infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 8.
- Bravo, P. (2018). *Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México* [Tesis de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada].
- Çardak, M., Altug, G., Çiftçi Türetken, P., & Sevan, G. (2007). PAH Degradation Effects Of Some Bacteria Isolated From The Istanbul Strait And Soil Of Batman Oil Refinery. Proc. of 8th CIESM Congress, Turkey, 38, 358.
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110775.
- Dai, X., Lv, J., Yan, G., Chen, C., Guo, S., & Fu, P. (2020). Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresource Technology*, 309, 123305.
- Fernandes, C., Khandeparker, R. D. S., & Shenoy, B. D. (2020). High abundance of *Vibrio* in tarball-contaminated seawater from Vagator beach, Goa, India. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110773.
- Geolab SRL. (2011). Estudio de impacto ambiental para el proyecto de instalación de la plataforma marina CX-15 y facilidades de producción para la exploración y producción de 24 pozos en el yacimiento corvina -lote Z-1, región Tumbes. Geolab SRL.
- Hernández, S. A., Martínez, J., Sánchez, J. S., & Ramos, R. (2002). Capacidad biodegradativa de cepas del género *Vibrio* sobre una mezcla de hidrocarburos. *Foresta Veracruzana*, 4(2), 29-40.
- Hernández, S. A., Martínez, J., & Pérez, L. B. (2015). Bacterias hidrocarbonoclasticas biodegradantes de poliestireno expandido. *Foresta Veracruzana*, 17(2), 21-28.
- Hoffmann, M., Monday, S. R., Allard, M. W., Strain, E. A., Whittaker, P., Naum, M., McCarthy, P. J., Lopez, J. V., Fischer, M., & Brown, E. W. (2012). *Vibrio caribbeanicus* sp. Nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1736-1743.
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, 25(4), 856. h

- Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B.-O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J.-J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*, *241*, 254-264.
- Li, X., Zheng, R., Zhang, X., Liu, Z., Zhu, R., Zhang, X., & Gao, D. (2019). A novel exoelectrogen from microbial fuel cell: Bioremediation of marine petroleum hydrocarbon pollutants. *Journal of Environmental Management*, *235*, 70-76.
- Liu, X., Liu, M., Zhou, L., Hou, L., Yang, Y., Wu, D., Meadows, M. E., Li, Z., Tong, C., & Gu, J. (2021). Occurrence and distribution of PAHs and microbial communities in nearshore sediments of the Knysna Estuary, South Africa. *Environmental Pollution*, *270*, 116083.
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., & Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*, *10*, 175-193.
- Odukoya, J., Lambert, R., & Sakrabani, R. (2019). Understanding the impacts of crude oil and its induced abiotic stresses on agrifood production: A review. *Horticulturae*, *5*(2), 47.
- Pi, Y., Meng, L., Bao, M., Sun, P., & Lu, J. (2016). Degradation of crude oil and relationship with bacteria and enzymatic activities in laboratory testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *106*, 106-116.
- Quintana-Saavedra, D. M., Cabrera, M., Tous, G., & Echeverry, G. (2012). Aislamiento de microorganismos oligotróficos degradadores de hidrocarburos en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Boletín Científico CIOH*, *30*, 3-12.
- Ramírez, B. E., Hidalgo, A., Ordinola, A., Vieyra, E. G., Palacios, P., & Ordinola, J. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Química Viva*, *15*(1), 20-30.
- Sabir, M., Ennaji, M. M., & Cohen, N. (2013). *Vibrio Alginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. *International Journal of Science and Technology*, *2*(4), 302-309.
- Sari, G., Trihadiningrum, Y., & Ni'matuzahroh, N. (2019). Isolation and identification of native bacteria from total petroleum hydrocarbon polluted soil in Wonocolo public oilfields, Indonesia. *Journal of Ecological Engineering*, *20*(8), 60-64.
- Singh, H., Bhardwaj, N., Arya, S. K., & Khatri, M. (2020). Environmental impacts of oil spills and their remediation by magnetic nanomaterials. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, *14*, 100305.