

Estudio de la microbiota degradadora de hidrocarburos en suelos mediante técnica metagenómica

Gamarra M Marco, Camargo M Isaías¹, García Cuan Aracely², Peña Freile Mario³.

RESUMEN

A través de los años, los hidrocarburos han sido una de las principales fuentes de energía del planeta, por lo tanto, existe un alto riesgo de que el medio ambiente se vea contaminado por ellos. Una de las estrategias usadas para lidiar con esta problemática es la biorremediación; en la cual se hace uso de microorganismos con la capacidad de degradar estos contaminantes en compuestos menos tóxicos. Esto ha hecho necesario que se empleen técnicas para la identificación de estos microorganismos que presentan la capacidad de degradar hidrocarburos para su posterior uso en ensayos de biorremediación. Este artículo de revisión tiene como objeto actualizar el conocimiento sobre técnicas para la determinación de organismos que trabajan en consorcio para degradar hidrocarburos en suelos contaminados, utilizando técnicas moleculares de metagenómica y presentar los marcadores moleculares más utilizados; además, se hará una revisión de las enzimas producidas por estos organismos con potencial degradador y se abordará el papel de la bioinformática en los estudios metagenómicos. Basados en fuentes bibliográficas, se mostrarán los microorganismos comúnmente identificados en estos estudios.

Palabras clave: Hidrocarburos, metagenómica, biorremediación, biología molecular

1. Estudiante programa de Microbiología, Semilleros Grupo IMB – Universidad Libre Barranquilla. Correo Electrónico: marcoa-gamarram@unilibre.edu.co
2. Tutor del trabajo de grado. Profesor integrante del grupo de investigación IMB Programa Medicina Universidad Libre Barranquilla. Correo electrónico: aracely.garciac@unilibre.edu.co
3. Microbiólogo Universidad Libre Barranquilla, MSc. Ciencias Básicas Biomédicas. marioa.penaf@unilibre.edu.co

Study of hydrocarbon degrading microbiota in soils by metagenomics technique

ABSTRACT

Over the years, hydrocarbons have been one of the main sources of energy on the planet, therefore, there is a high risk that the environment will be contaminated by them. One of the strategies used to deal with this problem is bioremediation, in which microorganisms with the capacity to degrade these pollutants into less toxic compounds are used. This has made it necessary to use techniques for the identification of these microorganisms that have the capacity to degrade hydrocarbons for their subsequent use in bioremediation tests. This review article aims to update the knowledge on techniques for the determination of organisms that work in consortium to degrade hydrocarbons in contaminated soils, using molecular techniques of metagenomics and present the most used molecular markers; in addition, a review of the enzymes produced by these organisms with degradative potential will be made and the role of bioinformatics in metagenomic studies will be addressed. Based on bibliographic sources, the microorganisms commonly identified in these studies will be shown.

Keywords: Hydrocarbons, metagenomics, bioremediation, molecular biology.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos han representado una gran fuente de materia prima en la cual basan su economía muchos países a nivel mundial, debido a la explotación de este recurso y su utilización, se ha convertido en una problemática a nivel ambiental por los contaminante que pueden llegar a ser todos sus derivados que en forma de desechos de grandes industrias contaminan suelos y cuerpos de agua ¹, provocando una afectación a fauna y flora, entre ellos, compuestos como los bifenilos policlorados, contaminantes que perduran por un largo periodo de tiempo en la naturaleza ² u otros hidrocarburos aromáticos policíclicos que son contaminantes orgánicos presentes en el ambiente y que pueden llegar a tener un efecto carcinogénico y generar afecciones crónicas a la salud ³.

Estos contaminantes peligrosos deben ser removidos de los ambientes contaminados; para ello se ha recurrido a técnicas físicas, químicas y biológicas. La biodegradación de estos compuestos por parte de comunidades de microorganismos autóctonos, los cuales son capaces de convertir estas moléculas complejas en otros fácilmente biodegradables es una de las tecnologías recomendadas ya que no aumenta la contaminación al no usar químicos también peligrosos para la salud, además, es más rentables respecto al costo-beneficio ⁴.

Los microorganismos autóctonos de suelos contaminados deben contar con las enzimas necesarias para subsistir en el medio adverso, enzimas como la lacasa fúngica o la bifenil dioxigenasa que permiten la degradación de los hidrocarburos y hacer uso de estos para convertirlos en sus nutrientes, esta función se lleva a cabo mediante el esfuerzo compartidos entre las diferentes poblaciones microbianas que habitan ese ecosistema, lo que ecológicamente se denomina trabajar en consorcios (aislarlos disminuye la actividad degradadora)⁵. Es por ello que los microorganismos degradadores deben ser identificados del conglomerado de poblaciones microbianas allí presentes (hongos, bacterias y arquea entre otros). El problema es que, al utilizar los métodos convencionales de laboratorio para la identificación de la biomasa microbiana del suelo, no logran mucha eficiencia, puesto que se ha demostrado que aproximadamente el 99% de los microorganismos que habitan el planeta no se han podido aislar, ni estudiar y aún siguen siendo desconocidos.

Por las razones anteriores, en este trabajo se propone realizar una revisión de estudios que hayan realizado una investigación con estos microorganismos y sus enzimas metabolizadoras capaces de biodegradar hidrocarburos contaminantes en su propio ecosistema. Para ese efecto se ha realizado esta revisión de información de fuentes, tales como artículos científicos o de revisión que poseen información de estudios acerca de la utilización de distintas técnicas

moleculares que permiten identificar ADN específico en una mezcla de ADN genómicos (estudio metagenómico del suelo contaminado) sin alterar los genes de todos los miembros presentes en la muestra, como lo sería el uso de la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) en conjunto con la secuenciación de primera y segunda generación, de los segmentos amplificados y por el anterior proceso que estos permitan la identificación de los microorganismos presentes en la muestra por medio de las herramientas bioinformáticas, el uso de base de datos y de programas de reconocimiento de secuencias génicas.

Al realizar esta revisión de estudios enfocados en temas como la identificación metagenómica, se obtendrán los datos necesarios de la información recopilada con el fin de aportar una mejor comprensión a la utilización de la metagenómica para futuros ensayos de biorremediación de hidrocarburos.

Identificación de grupos microbianos y marcadores moleculares: metagenómica

Se conoce como análisis metagenómico a aquel estudio donde se secuencia el material genético de una muestra ambiental, en el cual no se selecciona un gen específico, sino que se toma todo el material genético de la muestra para su posterior análisis con herramientas bioinformáticas⁶. Los análisis metagenómicos constan de varias fases, primero se debe tomar la muestra del ambiente y posteriormente extraer y purificar el DNA de esta. Una vez

se ha obtenido el material genético, se procede a secuenciar el mismo, es decir, establecer el orden de los nucleótidos del DNA. Existen numerosas técnicas para realizar la secuenciación del material genético, entre las cuales tenemos el método de Sanger como la primera técnica utilizada para secuencia, y las técnicas de secuenciación de la pirosecuenciación, como la secuenciación 454, y que es uno de los métodos más utilizados en los últimos tiempos⁷. Una vez obtenidas las secuencias de Por las razones anteriores, en este trabajo se propone realizar una revisión de estudios que hayan realizado una investigación con estos microorganismos y sus enzimas metabolizadoras capaces de biodegradar hidrocarburos contaminantes en su propio ecosistema. Para ese efecto se ha realizado esta revisión de información de fuentes, tales como artículos científicos o de revisión que poseen información de estudios acerca de la utilización de distintas técnicas moleculares que permiten identificar ADN específico en una mezcla de ADN genómicos (estudio metagenómico del suelo contaminado) sin alterar los genes de todos los miembros presentes en la muestra, como lo sería el uso de la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) en conjunto con la secuenciación de primera y segunda generación, de los segmentos amplificados y por el anterior proceso que estos permitan la identificación de los microorganismos presentes en la muestra por medio de las herramientas bioinformáticas, el uso de base de datos y de programas de reconocimiento de secuencias génicas.

Al realizar esta revisión de estudios enfocados en temas como la identificación metagenómica, se obtendrán los datos necesarios de la información recopilada con el fin de aportar una mejor comprensión a la utilización de la metagenómica para futuros ensayos de biorremediación de hidrocarburos.

Identificación de grupos microbianos y marcadores moleculares: metagenómica

Se conoce como análisis metagenómico a aquel estudio donde se secuencia el material genético de una muestra ambiental, en el cual no se selecciona un gen específico, sino que se toma todo el material genético de la muestra para su posterior análisis con herramientas bioinformáticas⁶. Los análisis metagenómicos constan de varias fases, primero se debe tomar la muestra del ambiente y posteriormente extraer y purificar el DNA de esta. Una vez se ha obtenido el material genético, se procede a secuenciar el mismo, es decir, establecer el orden de los nucleótidos del DNA. Existen numerosas técnicas para realizar la secuenciación del material genético, entre las cuales tenemos el método de Sanger como la primera técnica utilizada para secuencia, y las técnicas de secuenciación de la pirosecuenciación, como la secuenciación 454, y que es uno de los métodos más utilizados en los últimos tiempos⁷. Una vez obtenidas las secuencias de los genes de la muestra, se procederá a compararlas con las presentes en bases de datos científicas para así determinar a qué

especie conocida corresponde esta misma, permitiendo así la identificación de los organismos⁸.

Los análisis metagenómicos han sido de gran utilidad en el análisis de la microbiota presente en suelos contaminados, ya que permite conocer en su totalidad las especies o géneros presentes en estos sin afectar su proceso de degradación del hidrocarburo, pues estos organismos funcionan asociándose para degradar estos contaminantes⁹.

Otra gran ventaja de los análisis metagenómicos es que permite conocer e identificar una gran variedad de organismos; ya sean procariotas como bacterias y arqueas, Eucariotas como lo son hongos y protozoos, o seres acelulares como son los virus; ya sean cultivables o no, a diferencia de la microbiología tradicional⁶. Para la identificación de especies se usan marcadores moleculares, de los cuales los más usados son los específicos para el gen 16S para bacterias, el segmento ITS para hongos y el gen 18S para protozoos y algas. El gen del 16S es aquel segmento genético que codifica para el rRNA 16s de los organismos procariotas, se trata de un segmento genético altamente conservado en los dominios bacteria y archea por lo cual una pequeña variación en su secuencia puede interpretarse como una diferencia entre especies.

Debido a las características de este gen es el que usa comúnmente para la identificación de especies pertenecientes a estos géneros ya que permite la elaboración de primers universales que son útiles para numerosas especies, además es un gen que se aísla fácilmente debido a que generalmente las bacterias y arqueas contienen varias copias de este ¹⁰. En el caso de los hongos la identificación de hongos se hace uso del ITS (Internal Transcribed Spacebar), la cual es

una región de DNA no codificante altamente polimórfica, ubicada en el operón del RNA ribosomal, con un tamaño de entre 450 a 750 pb. Las ventajas del uso de esta es lo sencillo de su proceso de amplificación y la gran cantidad de información en distintas bases de datos¹¹.

A continuación, se mostrarán algunos de los oligonucleótidos más utilizados para la identificación metagenómica.

ORGANISMOS	PRIMERS 5' – 3'	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Bacterias y Cianobacterias	<ul style="list-style-type: none"> •27F: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' •1525R: 5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3' 	Primers universales, secuencias conservadas 16S rRNA.	DeLong EF (1992)
Archaea	<ul style="list-style-type: none"> •EukAF: 5'AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' •EukBR: 5'TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' 	Primers universales, secuencias conservadas 18S rRNA	Covacevich F.(2012)
Microalgas verdes y rojas	<ul style="list-style-type: none"> •UnivF15: 5'CTCCAGTAGTCATATGC 3' •UnivR1765S: 5'ACCTGTTACGACTT 3' 	Primers universales, secuencias conservadas 18S rRNA microorganismos eucariotas.	Nejstgaard, J. (2003)
Hongos	<ul style="list-style-type: none"> •NSA3: 5'AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA 3' •NLC2: 5'GAGCTGCATTCCCAAACAATC 3' 	Primers universales región ITS 1-5.8S – ITS4 microorganismos eucariotas	Martin, K. (2005)

Enzimas degradadoras de hidrocarburo y sus genes: bifenil dioxigenasa (bpdobph), lacasa fúngica (genes lcc), peroxidasa (lip y mnp)

Debido a las enzimas que poseen, tanto hongos, bacterias y otros microorganismos como arqueas se han propuesto para ser usados en ensayos de biorremediación con el fin de degradar hidrocarburos¹⁶. En los hongos se han utilizados para comprender la

estructura y mecanismo de acción diversas enzimas como lacasa fúngica, manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa¹⁷. La acción de estas enzimas puede ser aplicada en diferentes ensayos para probar su poder biodegradador de los diferentes hidrocarburos que causan contaminación¹⁸.

Sin embargo, la degradación de contaminantes con la ayuda de

microorganismos es un proceso lento, que hace de la biorremediación un proceso más lento en la práctica real ¹⁹. Por lo que, en los últimos años, las enzimas microbianas aisladas de sus células se han utilizado para la biorremediación. Las enzimas son macromoléculas biológicas complejas que actúan como biocatalizadores de una serie de reacciones bioquímicas implicadas en las vías de degradación de contaminantes como los hidrocarburos. Las enzimas pueden mejorar la velocidad de una reacción al reducir la energía de activación de las moléculas.

La lacasa fúngica hace parte del grupo de enzimas llamadas oxidasas del cobre azul, el mecanismo de acción de estas consiste en una transferencia de electrones del sustrato a una molécula de oxígeno molecular que dará como resultado una molécula de agua, los compuestos que tengan estructuras similares a la lignina pueden oxidados por esta enzima ²⁰. La manganeso y lignina peroxidasas son enzimas que hacen parte del grupo de las fenoloxidasas que usan el peróxido de hidrogeno como cosustrato aceptor de electrones, están involucradas en el proceso de la degradación de la lignocelulosa y tiene un alto potencial biorremediador debido a su mecanismo de acción frente a diferentes compuestos orgánicos ¹⁸.

Estas enzimas biocatalizan las reacciones de degradación de los hidrocarburos de maneras diferentes, por ejemplo, las oxigenasas, como la bifenil dioxigenasa

(BPDO-Bph) catalizan la oxidación de compuestos aromáticos tales como bifenilos clorados, incorporando una o dos moléculas de oxígeno y haciendo a estas más propensas a una mayor transformación y mineralización.

Las lacasas tienen la capacidad de escindir el anillo presente en compuestos aromáticos y reduce una molécula de oxígeno en el agua y produce radicales libres.

Las peroxidasas pueden catalizar la reacción de reducción en presencia de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y generando radicales libres reactivos después de la oxidación de los compuestos orgánicos ²¹.

Herramientas bioinformáticas para la identificación de microbiota degradadora de hidrocarburos

Una vez obtenidas las secuencias de los genes de interés, se procede a comparar las mismas haciendo uso de herramientas bioinformáticas. La bioinformática puede definirse como la ciencia que se encarga de entender las correlaciones, las estructuras y los patrones en los datos biológicos. Esta implica el uso de tecnologías informáticas y métodos estadísticos para manejar y analizar un gran volumen de datos biológicos sobre el ADN, el ARN y las secuencias de proteínas, estructuras de las proteínas, los perfiles de expresión genética y las interacciones de la proteína ²².

La bioinformática juega un papel crucial en los estudios metagenómicos ya que permite el análisis de secuencias de DNA a través de bases de datos científicas y herramientas de análisis de nucleótidos, permitiendo así la identificación de las especies presentes en la muestra. El análisis de secuencias de DNA se basa en la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias registradas, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, y la formación y la comparación del genoma. El proceso más fundamental de los análisis es la alineación de secuencias, que es en el cual se comparan las secuencias mediante la búsqueda de caracteres comunes y el establecimiento de los residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas ²³. Para estos análisis se hace uso de bases de datos y herramientas de análisis como son; el Genbank, que cuenta con alrededor de 66.000 genomas procariotas y cerca de 3000 genomas eucariotas, disponibles para su análisis ²⁴.

La transición de la microbiología clásica a los estudios de metagenómica moderna ha requerido que se desarrollen nuevas ramas de conocimiento y especialización. La disponibilidad de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha transformado la microbiología y la bioinformática y cómo abordar los desafíos computacionales inherentes que surgen de la revolución de la secuenciación del ADN.

Se han venido desarrollando constantemente nuevos métodos computacionales para recopilar, procesar y extraer información biológica útil de una variedad de muestras y conjuntos de datos complejos, por esta razón la metagenómica necesita la integración de varios de estos métodos computacionales para poder llevar a cabo análisis de mejor exactitud y la presentación de resultados más acertados ²⁵.

La reducción de costos junto con el aumento en la cantidad de datos debido al advenimiento de la secuenciación de próxima generación condujo a una demanda en rápido crecimiento de software bioinformática en metagenómica. El centro Bielefeld-Gießen de bioinformática microbiana como parte de la Red Alemana de Infraestructura Bioinformática agrupa e imparte conocimientos expertos en el análisis de conjuntos de datos metagenómicos, especialmente en la investigación sobre comunidades microbianas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la selección de los artículos utilizados como referencia en esta revisión, se utilizará criterios de inclusión y de exclusión de la información los cuales tendrían que cumplirse para que la información se incluyese en el trabajo. Al realizar la revisión exhaustiva de 70 artículos por medio de los criterios de selección mencionados anteriormente se seleccionó un total de 50 que cumplían con estos. Los criterios de selección estarán basados en:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- El tema de estudio del artículo debe ser acerca del análisis por medio de técnicas moleculares de suelos contaminados con hidrocarburos, enzimas utilizadas para la biodegradación de hidrocarburos y los análisis bioinformáticos de las secuencias génicas presentes en la muestra y obtenidas por medio del análisis metagenómico.
- La información debe provenir de artículos científicos o de revisión relacionados con la temática mencionada anteriormente

Criterios de exclusión:

- Que el estudio fue llevado a cabo antes del año 2015.
- Si la información no proviene de una revista indexada, por ejemplo: Science Direct, Nature, Science, Elsevier.

Al realizar el análisis de los artículos que fueron seleccionados (50 en total), se encontró que en 22 de estos se hacía referencia a la distribución de las poblaciones de microorganismos en suelos contaminados con hidrocarburos, mostrando que:

- Con respecto al dominio Bacteria, se evidenció la predominancia del phylum Proteobacteria, seguido de los phyla Actinobacteria y Firmicutes, ofreciendo un paradigma de lo que se esperaba encontrar con respecto a la

población bacteriana en los suelos contaminados con hidrocarburos.

- Con respecto a el dominio Archaea se evidenciaron resultados a nivel de phyla, teniendo como los principales Methanomicrobia, y Halobacteria.
- Con respecto al dominio Eukarya se obtuvo que el reino fungi fue el que predominó con los phyla Ascomycota y Basidiomycota.

Por parte del análisis a 12 estudios acerca de enzimas que fueron revisados, se obtuvo como resultado que las enzimas del tipo lacasa fueron las que predominaron en los estudios como las encontradas por los investigadores, seguidos por la peroxidasa y por último las dioxigenasas.

Para la complementación de este estudio fueron revisados 6 artículos referentes a la temática de las herramientas bioinformáticas que son utilizadas para complementar estos estudios con la posibilidad de que los resultados puedan ser analizados y depositados como recurso para investigaciones que sean realizadas en esta área. Como la herramienta CAMISIM un software de simulación de comunidades microbianas y los estudios Fritz, A., Hofmann, P., Majda, S. et al. (2019). El resto de los estudios fueron tomados para el aporte de valiosa información la cual no fue incluida en los análisis debido a que no cumplían con los criterios de selección, sin embargo, eran portadores de información que podía nutrir este artículo

CONCLUSIÓN

La revisión de estos estudios busca aportar conocimiento actualizado con respecto a la determinación de la microbiota presente en suelos contaminados con hidrocarburos. Una vez revisada la información se puede concluir que los grupos bacterianos más encontrados fueron los correspondientes a los Phyla Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria; los hongos más encontrados fueron los pertenecientes a los Phyla Ascomycota y Basidiomycota; las arqueas que fueron identificadas por los diferentes estudios fueron correspondientes a los phyla Methanomicrobia, Halobacteria, Thermoprotei, Thaurmachaeota, Methanobacteria, Methanococci, Thermococci. Por otra parte, las enzimas identificadas en los análisis realizados por distintos autores fueron la lacasa fúngica, la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la bifenil dioxigenasa. La presencia y el mecanismo de acción conocido para estas enzimas, sugiere que juegan un papel crucial en el proceso de degradación del hidrocarburo por parte de los microorganismos aislados de suelos contaminados. Además, de esta información, se tomaron como referencia artículos que usaran técnicas metagenómicas de secuenciación y que estuvieran en bases de datos científicas, con una publicación no mayor al año 2015, en su mayoría, ya que se tomaron algunos artículos publicados con fecha anterior al 2015 debido a que contenían información valiosa para este estudio.

Referencias bibliograficas

1. Koshlaf, E., Shahsavari, E., Haleyur, N., Mark Osborn, A., & Ball, A. (2019). Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. *Geoderma*, 338, 216-225.
2. Elangovan, S., Pandian, S., S. J., G., & Joshi, S. (2019). Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Fate, Challenges and Bioremediation. *Microorganisms For Sustainability*, 165-188.
3. Košnář, Z., Částková, T., Wiesnerová, L., Praus, L., Jablonský, I., Koudela, M., & Tlustoš, P. (2019). Comparing the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil after different bioremediation approaches in relation to the extracellular enzyme activities. *Journal Of Environmental Sciences*, 76, 249-258.
4. Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745-755.
5. Napp, A., Pereira, J., Oliveira, J., Silva-Portela, R., Agnez-Lima, L., & Peralba, M. et al. (2018). Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. *Chemosphere*, 209, 7-16.
6. Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1125-1136.
7. Zafra, G., Taylor, T., Absalón, A., & Cortés-Espinosa, D. (2016). Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *Journal Of Hazardous Materials*, 318, 702-710.
8. Chang, C. Y., Li, Y. C., Chen, N. C., Huang, X. X., & Lu, Y. C. (2016, November). A special processor design for nucleotide basic local alignment search tool with a new banded two-hit method. In *2016 IEEE Nordic Circuits and Systems Conference (NORCAS)* (pp. 1-5). IEEE.
9. Bao, Y., Xu, Z., Li, Y., Yao, Z., Sun, J., & Song, H. (2017). High-throughput metagenomic analysis of petroleum-contaminated soil microbiome reveals the versatility in xenobiotic aromatics metabolism. *Journal Of Environmental Sciences*, 56, 25-35.

10. Kamble, A., Sawant, S., & Singh, H. (2020). 16S ribosomal RNA gene-based metagenomics: A review. *Biomedical Research Journal*, 7(1), 5.
11. Fajarningsih, N. D. (2016). Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: A Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(2), 37.
12. DeLong EF (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;89(12):5685-5689.
13. Covacevich, F. (2012). First archaeal rDNA sequences from Argentine coastal waters: Unexpected PCR characterization using eukaryotic primers. *Ciencias Marinas*, 38(2), 427-439.
14. Nejstgaard, J., Frischer, M., Raule, C., Gruebel, R., Kohlberg, K., & Verity, P. (2003). Molecular detection of algal prey in copepod guts and fecal pellets. *Limnology And Oceanography: Methods*, 1(1), 29-38.
15. Martin, Kendall & Rygiewicz, Paul. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*. 5. 28.
16. Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Screening*, 2(10), 5377-5383.
17. Kale, S. K., & Deshmukh, A. G. (2016). 3D structure prediction of lignolytic enzymes lignin peroxidase and manganese peroxidase based on homology modelling. *Journal of BioScience& Biotechnology*, 5(1).
18. Kües, U. (2015). Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion In Biotechnology*, 33, 268-278
19. Ghosh, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2017. Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119, 448-460
20. Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1).
21. Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10–22.
22. Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016, March 1). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and

- remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. Egyptian Petroleum Research Institute.
23. Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). MoghThe road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, 6, 348.
 24. Raggi, L., García-Guevara, F., Godoy-Lozano, E. E., Martínez-Santana, A., -Zepeda, A., Gutierrez-Rios, R. M., Loza, A., Merino, E., Sanchez-Flores, A., Licea-Navarro, A., Pardo-Lopez, L., Segovia, L., & Juarez, K. (2020). Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 11, 1825.
 25. vanAerle, R., & vander Giezen, M. (2017). Next-generation sequencing, bioinformatics, and infectious diseases. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 405.
 26. Moghimi, H., Heidary Tabar, R., & Hamedi, J. (2017). Assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and laccase production by new fungus *Trematophoma* sp. UTMC 5003. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 33(7).
 27. Moreno-Ulloa, A., Diaz, V., Tejada-Mora, J., Macias Contreras, M., Díaz Castillo, F., & Guerrero, A. et al. (2019). Metabolic and metagenomic profiling of hydrocarbon-degrading microorganisms obtained from the deep biosphere of the Gulf of México.
 28. Mukherjee, A., Chettri, B., Langpoklakpam, J. S., Basak, P., Prasad, A., Mukherjee, A. K. & Chattopadhyay, D. (2017). Bioinformatic approaches including predictive metagenomic profiling reveal characteristics of bacterial response to petroleum hydrocarbon contamination in diverse environments. *Scientific reports*, 7(1), 1-22.
 29. Hernández-León R, I Velázquez-Sepúlveda, M C Orozco-Mosqueda, G Santoyo. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *FYTON ISSN 0031 9457*, (2010) 79: 133-139
 30. Martínez Álvarez, L. M., Lo Balbo, A., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. A. M. (2015). Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Regions Science and Technology*, 119, 61–67.
 31. Bharagava, R. N., Purchase, D., Saxena, G., & Mulla, S. I. (2019). Applications of metagenomics in microbial bioremediation of pollutants: from genomics to environmental cleanup. In *Microbial diversity in the genomic era* (pp. 459-477). Academic Press

32. Yu, Y., Yin, H., Huang, W., Peng, H., Lu, G., & Dang, Z. (2020). Cellular changes of microbial consortium GY1 during decabromodiphenyl ether(BDE-209) biodegradation and identification of strains responsible for BDE-209 degradation in GY1. *Chemosphere*, 249, 126205.
33. Prenafeta-Boldú, F., de Hoog, G., & Summerbell, R. (2018). Fungal Communities in Hydrocarbon Degradation. *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons And Lipids: Members, Metagenomics And Ecophysiology*, 1-36.
34. Bhatt, P., Pathak, V. M., Joshi, S., Bisht, T. S., Singh, K., & Chandra, D. (2019). Major metabolites after degradation of xenobiotics and enzymes involved in these pathways. *Smart Bioremediation Technologies*, 205–215.
35. Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of The Total Environment*, 133971.
36. Rodriguez-Couto S. (2019) Fungal Laccase: A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. In: Yadav A., Mishra S., Singh S., Gupta A. (eds) *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. Fungal Biology. Springer, Cham.
37. Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S., Maiti, M., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, 242, 15-27.
38. Saxena, R., Dhakan, D., Mittal, P., Waiker, P., Chowdhury, A., Ghatak, A., & Sharma, V. (2017). Metagenomic Analysis of Hot Springs in Central India Reveals Hydrocarbon Degrading Thermophiles and Pathways Essential for Survival in Extreme Environments. *Frontiers In Microbiology*, 7.
39. Khudur, L. S., Shahsavari, E., Webster, G. T., Nugegoda, D., & Ball, A. S. (2019). The impact of lead co-contamination on ecotoxicity and the bacterial community during the bioremediation of total petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Environmental Pollution*.
40. Tan, B., Jane Fowler, S., Laban, N., Dong, X., Sensen, C., Foght, J., & Gieg, L. (2015). Comparative analysis of metagenomes from three methanogenic hydrocarbon-degrading enrichment cultures with 41 environmental samples. *The ISME Journal*, 9(9), 2028-2045.

41. Toth, C., Berdugo-Clavijo, C., O'Farrell, C., Jones, G., Sheremet, A., Dunfield, P., & Gieg, L. (2018). Stable Isotope and Metagenomic Profiling of a Methanogenic Naphthalene-Degrading Enrichment Culture. *Microorganisms*, 6(3), 65.
42. Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., & Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrACTrends in Analytical Chemistry*.
43. Yadav, T. C., Pal, R. R., Shastri, S., Jadeja, N. B., & Kapley, A. (2015). Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. *Bioresource Technology*, 188, 24–32.
44. Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., & Krivoruchko, A. V. (2017). Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria and Their Potential in Eco-Biotechnology and Bioremediation. *Microbial Resources*, 121–148.
45. Zhang, S., Hu, Z., & Wang, H. (2019). Metagenomic analysis exhibited the co-metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacterial community from estuarine sediment. *Environment International*, 129, 308-319.
46. Hazim, R. N., & Al-Ani, M. A. (2019). Effect of Petroleum Hydrocarbons Contamination on Soil Microorganisms and Biodegradation. *Rafidain Journal of Science*, 28(1), 13-22.
47. Fritz, A., Hofmann, P., Majda, S. et al. (2019) CAMISIM: simulating metagenomes and microbial communities. *Microbiome* 7, 17
48. Ruiz, O. N., Brown, L. M., Radwan, O., Bowen, L. L., Gunasekera, T. S., Mueller, S. S., ... & Striebich, R. C. (2021). Metagenomic characterization reveals complex association of soil hydrocarbon-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 157, 105161.
49. Eze, M. O., Hose, G. C., George, S. C., & Daniel, R. (2021). Diversity and metagenome analysis of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium from asphalt lakes located in Wietze, Germany. *AMB Express*, 11(1), 1-12.
50. Jurelevicius, D., Pereira, R. D. S., da Mota, F. F., Cury, J. C., de Oliveira, I. C., Rosado, A. S., ... & Seldin, L. (2022). Metagenomic analysis of microbial communities across a transect from low to highly hydrocarbon-contaminated soils in King George Island, Maritime Antarctica. *Geobiology*, 20(1), 98-111.