

# Potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated water by alkane-oxidizing actinobacteria



Romanova V.A.\* , Kupriyanova O.V., Grigoryeva T.V., Laikov A.V.

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** Water pollution with oil and its components is common in oil-producing and industrialized countries of the world. High molecular weight alkanes, constituting significant portion of oil, exist in a solid state at room temperature and exhibit resistance to decomposition when released into the environment. Bioremediation is the most promising technology for cleaning up hydrocarbon-contaminated aquatic ecosystems because of its environmental safety and economic efficiency. This article presents data on the potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated objects by the alkane-oxidizing bacterium *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2. Strain PS2 was isolated from petrochemical waste and showed a significant increase to  $10^7$  CFU/ml when cultivated on a mineral medium with solid paraffin as the sole source of carbon and energy. It was found that strain PS2 has high adhesion to liquid and solid alkanes, compared to cells grown in a medium with sucrose. The degree of decomposition of solid paraffin was evaluated using gas chromatography/mass spectrometry. The results indicated that strain PS2 metabolizes alkanes with a chain length of C20-C31 in 7 days with varying efficiencies. The findings of this study demonstrate the potential of the *T. tyrosinosolvans* PS2 strain for the bioremediation of sites contaminated with complex mixtures of hydrocarbons.

**Keywords:** bioremediation, alkane-oxidizing bacteria, actinobacteria, alkanes, gas chromatography, solid paraffin

**For citation:** Romanova V.A., Kupriyanova O.V., Grigoryeva T.V., Laikov A.V. Potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated water by alkane-oxidizing actinobacteria // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1066-1071. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066

## 1. Introduction

Oil spills into aquatic environment resulting from disruptions in the functioning of oil production, transportation and refining facilities causes significant environmental damage (Chen et al., 2017; Deegan et al., 2019). All groups of living organisms are adversely affected, including the flora and fauna of aquatic ecosystem. Additionally, changes in the microbial community are observed, leading to a disruption of its trophic function and the disintegration of biogeochemical cycles (Zaki et al., 2015).

Alkanes are a significant component of oil (Alonso-Gutierrez et al., 2011). Low molecular weight alkanes, which are liquid under standard state conditions, can be subject to abiotic transformation and biological degradation by a wide range of microorganisms (Rojo, 2009), whereas high molecular weight paraffins pose a more serious problem. These compounds are solid under standard state conditions, and can accumulate in aquatic organisms and lead to chronic pollution (Sakthipriya et al., 2016).

In the event of contamination of water bodies' extensive surface areas with oil and hydrocarbons, the most economically viable remediation method is bioremediation (Li et al., 2020; Xu et al., 2022). This technology is based on the ability of microorganisms to transform and mineralize a wide range of organic pollutants, which provides them with energy and carbon (Rojo, 2009). The extensive metabolic capabilities of microorganisms make it possible to create biological products that are effective under the most challenging conditions, including low temperatures, high osmotic pressure, and contamination with heavy metals.

*Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 strain was isolated from petrochemical waste (Romanova et al., 2019) and demonstrated its ability to utilize medium-chain alkanes (Romanova et al., 2022). The aim of this study is to assess the potential of the isolated strain for the utilization of solid alkanes in combination with other biotechnologically valuable properties, such as alterations in cell hydrophobicity.

\*Corresponding author.

E-mail address: [avonamora-94@mail.ru](mailto:avonamora-94@mail.ru) (V.A. Romanova)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Cultivation of the *T. tyrosinosolvens* PS2 strain under different conditions

Strain PS2 was cultivated on liquid mineral salts medium (MS) for 7 days (g/l: 1.0 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.25 –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3.0 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4.5 –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Phale et al., 1995)) supplemented with the various carbon sources: sucrose (10 g/l), hexadecane (4% vol.) or solid paraffin (10 g/l). The initial inoculation of strain cells was  $10^6$  CFU/ml. The number of cells in the suspension was determined by serial dilutions on LB medium (g/l: 10 – tryptone; 5 – yeast extract; 5 – NaCl; 20 – agar-agar).

### 2.2. Assessment of *T. tyrosinosolvens* PS2 strain cell adhesion to hydrocarbons

To determine the adhesion of bacteria to hydrocarbons, the cells of the strain were centrifuged and washed twice with MS medium. The next step involved combining equal volumes of the cell suspension with an OD=1 with hexadecane. Then this mixture was shaken for 60 seconds and incubated to separate into two phases for 30 minutes. Following the separation process, the optical density of the hexadecane phase was measured at a wavelength of  $\lambda = 400$  nm using an xMark spectrophotometer (Bio-Rad, USA) (Zhang and Miller, 1994; Sotirova et al., 2009).

### 2.3. Evaluation of hydrocarbons degradation by GC-MS

The biodegradation of solid paraffin by PS2 strain was analyzed using an Agilent Technologies 7890B GC System gas chromatograph (USA) combined with a mass selective detector (GC-MS) after extraction with hexane. For the analysis, an HP-5MS capillary quartz column (length 30 m, diameter 0.25 mm, phase film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) with a chemically grafted phase of 5%-diphenyl-95%-dimethylpolysiloxane was employed. The GC-MS conditions were as follows: chromatograph evaporator temperature – 280°C; detector interface temperature – 280°C; carrier gas – helium, constant flow mode – 1.0 ml/min. A mass calibration was conducted automatically in the Autotune mode using perfluorotributylamine (99.8%, Agilent Technologies) as a standard.

## 3. Results and discussion

The *T. tyrosinosolvens* strain PS2 demonstrated significant growth when cultivated with various carbon sources. The final cell concentration was  $10^8$  CFU/ml in the medium with the addition of sucrose,  $10^7$  CFU/ml in hexadecane, and  $10^7$  CFU/ml in solid paraffin. The strain was able to utilize hexadecane, which was reduced by 3.39 mg/ml in 8 days (Romanova et al., 2022). Furthermore, when cultivated on a medium with hexadecane, an increase in emulsifying activity and a decrease in the surface tension of the culture liquid

were observed, which indicates the ability of the strain to produce biological surfactants (biosurfactants).

When the strain was cultivated on a liquid mineral medium with hexadecane or with solid paraffin, cell adhesion to the hydrophobic substrate increased by 2.2-2.5 times compared to cells grown on a medium with sucrose. The high adhesion of cells to a hydrophobic substrate and the ability to produce biosurfactants enhance the efficiency of bioremediation of reservoirs contaminated with floating hydrocarbons and oils, since cells together with biosurfactants are concentrated in the contaminated zone (the surface film) and are not distributed throughout the entire thickness of water reservoir (Vaccari et al., 2017).

The results of gas chromatography indicated that alkanes with chain lengths ranging from C25 to C28 constituted a significant proportion of the composition of solid paraffin. However, when cultivated on a liquid mineral medium with solid paraffin was found that PS2 strain predominantly utilized alkanes with chain lengths C20 ( $61 \pm 4\%$ ), C21 ( $40 \pm 4\%$ ), C22 ( $25 \pm 5\%$ ) and C23 ( $14 \pm 4\%$ ) in 7 days. At the same time, the content of alkanes with a chain length of C24-C31 also decreased significantly, but to a lesser extent (from 6% to 13%) (Fig.). Probably solid alkanes with a low chain length are more actively metabolized due to their greater bioavailability in an aqueous culture medium. This is due to the fact that substances of this class are known to become more hydrophobic with increasing carbon chain length (Naether et al., 2013).

## 4. Conclusion

The *T. tyrosinosolvens* PS2 strain is able to metabolize a wide range of solid alkane mixture components, adapting to a new substrate by increasing the degree of lipophilicity of its surface, which facilitates for better contact with the hydrocarbon molecule.

Thus, the strain under investigation can be used in the remediation of contaminated aquatic ecosystems without the necessity of utilizing specialized floating sorbents or the introduction of additional biosurfactants.

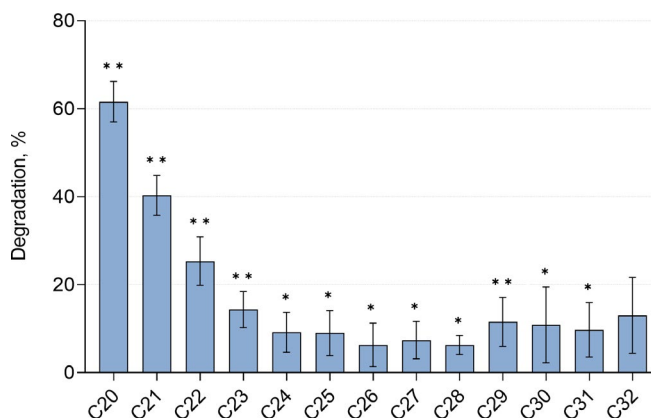


Fig. Biodegradation of solid paraffin by *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2 strain compared to control. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$

## 5. Funding

This research was funded by the subsidy allocated to the Kazan Federal University for the state research assignment (№ FZSM-2023-0013) and the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Alonso-Gutiérrez J., Teramoto M., Yamazoe A. et al. 2011. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of applied microbiology* 111(4): 800–810. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x)
- Chen W., Li J., Sun X. et al. 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 118: 110–118. DOI: [10.1016/j.ibiod.2017.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.029)
- Delegan Y.A., Valentovich L.N., Shafieva S.M. et al. 2019. Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. *Folia Microbiologica* 64: 41–48. DOI: [10.1007/s12223-018-0623-2](https://doi.org/10.1007/s12223-018-0623-2)
- Li Y.P., Pan J.C., Ma Y.L. 2020. Elucidation of multiple alkane hydroxylase systems in biodegradation of crude oil n-alkane pollution by *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Journal of applied microbiology* 128(1): 151–160. DOI: [10.1111/jam.14470](https://doi.org/10.1111/jam.14470)
- Naether D.J., Slawtschew S., Stasik S. et al. 2013. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and environmental microbiology* 79(14): 4282–4293. DOI: [10.1128/AEM.00694-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00694-13)
- Phale P.S., Mahajan M.C., Vaidyanathan C.S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Archives of microbiology* 163: 42–47. DOI: [10.1007/BF00262202](https://doi.org/10.1007/BF00262202)
- Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477–2490. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x)
- Romanova V.A., Boulygina E.A., Siniagina M.N. et al. 2019. Draft genome sequence of a medium- and long-chain n-alkane-degrading bacterium, *Tsukamurella tyrosinosolvens* strain PS2, with two genetic systems for alkane degradation. *Microbiology Resource Announcement* 8: e00218-e219. DOI: [10.1128/MRA.00218-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00218-19)
- Romanova V., Markelova M., Boulygina E. et al. 2022. Significance of both alkB and P450 alkane-degrading systems in *Tsukamurella tyrosinosolvens*: proteomic evidence. *Applied microbiology and biotechnology* 106(8): 3153–3171. DOI: [10.1007/s00253-022-11906-1](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11906-1)
- Sakthipriya N., Doble M., Sangwai J.S. 2016. Influence of thermophilic *Bacillus subtilis* YB7 on the biodegradation of long chain paraffinic hydrocarbons (C 16 H 34 to C 36 H 74). *RSC Advances* 6: 82541–82552. DOI: [10.1039/C6RA18774A](https://doi.org/10.1039/C6RA18774A)
- Sotirova A., Spasova D., Vasileva-Tonkova E. et al. 2009. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research* 164(3): 297–303. DOI: [10.1016/j.micres.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005)
- Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R. et al. 2017. Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science* 247: 561–572. DOI: [10.1016/j.cis.2017.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.016)
- Xu H.X., Tang Y.Q., Nie Y. et al. 2022. Comparative transcriptome analysis reveals different adaptation mechanisms for degradation of very long-chain and normal long-chain alkanes in *Dietzia* sp. DQ12-45-1b. *Environmental microbiology* 24(4): 1932–1945. DOI: [10.1111/1462-2920.15928](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15928)
- Zaki M.S., Mohammad A.M.N., Abbas H.H.H. 2015. Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments (Review Article). *Life Science Journal* 12(5): 109-121.
- Zhang Y., Miller R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2101-2106.

# Потенциал биоремедиации загрязненных углеводородами водоемов представителем алкан-окисляющих актинобактерий

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Романова В.А.\*, Куприянова О.В., Григорьева Т.В., Лайков А.В.

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Загрязнение водоемов нефтью и ее компонентами распространено в нефтедобывающих и промышленно развитых странах мира. Высокомолекулярные алканы находятся в твердом состоянии при комнатной температуре, составляют значительную часть нефти и проявляют устойчивость к разложению при попадании в окружающую среду. Биоремедиация является наиболее перспективной технологией очистки водных экосистем, загрязненных углеводородами, вследствие своей экологической безопасности и экономической эффективности. В данной статье приводятся данные о потенциале биоремедиации загрязненных углеводородами объектов алкан-окисляющей бактерией *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2. Штамм PS2 выделен из нефтехимических отходов как деструктор алканов и показал значительный рост до  $10^7$  КОЕ/мл при культивировании на минеральной среде с твердым парафином в качестве единственного источника углерода и энергии. Было установлено, что штамм PS2 имеет высокую адгезию к жидким и твердым алканам, по сравнению с клетками, выращенными на среде с сахарозой. Оценена степень разложения твердого парафина с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии и обнаружено, что штамм PS2 метаболизирует алканы с длиной цепи C20-C31 за 7 суток с различной эффективностью. Результаты этого исследования расширяют сферу применения штамма *T. tyrosinosolvens* PS2 для биоремедиации объектов, загрязненных сложными смесями углеводородов.

**Ключевые слова:** биоремедиация, алкан-окисляющие бактерии, актинобактерии, алканы, газовая хроматография, твердый парафин

Для цитирования: Романова В.А., Куприянова О.В., Григорьева Т.В., Лайков А.В. Потенциал биоремедиации загрязненных углеводородами водоемов представителем алкан-окисляющих актинобактерий // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1066-1071. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-1066)

## 1. Введение

Выбросы нефти в водоемы, происходящие в результате нарушения функционирования предприятий и инфраструктуры по добыче, транспортировки и переработки нефти, приводят к серьезному экологическому ущербу (Chen et al., 2017; Deegan et al., 2019). Вред получают все группы живых организмов, включая флору и фауну водоемов, а также наблюдаются изменения в микробном сообществе, приводящие к нарушению его трофической функции и дезинтеграции биогеохимических циклов (Zaki et al., 2015).

Значительной компонентной частью нефти являются алканы (Alonso-Gutierrez et al., 2011). И если низкомолекулярные алканы, жидкие в стандартных условиях, могут подвергаться абиотиче-

ской трансформации и биологической деградации широким спектром микроорганизмов (Rojo, 2009), то высокомолекулярные парафины представляют более серьезную проблему. Твердые при стандартных условиях, данные соединения могут накапливаться в водных организмах и приводить к хроническому загрязнению (Sakthipriya et al., 2016).

В условиях загрязнения больших площадей поверхности водоемов нефтью и углеводородами наиболее экономически обоснованным способом очистки является биоремедиация (Li et al., 2020; Xu et al., 2022). Данная технология основана на способности микроорганизмов трансформировать и минерализовывать широкий спектр органических поллютантов, удовлетворяя таким образом свои потребности в энергии и углероде (Rojo, 2009). Широкие метаболические возможности микроор-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [avonamora-94@mail.ru](mailto:avonamora-94@mail.ru) (В.А. Романова)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





ганизмов позволяют создавать биопрепараты, действенные в самых неблагоприятных условиях – от низких температур до высокого осмотического давления и сопутствующего загрязнения тяжелыми металлами.

Из нефтехимических отходов нами выделен штамм *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 (Romanova et al., 2019), и продемонстрирована его способность к утилизации алканов со средней длиной цепи (Romanova et al., 2022). Целью настоящей работы являлась оценка потенциала выделенного штамма к утилизации твердых алканов в совокупности с иными биотехнологически ценными свойствами, таким как изменение гидрофобности клеток.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Культивирование штамма *T. tyrosinosolvans* PS2 в разных условиях

Штамм PS2 выращивали на жидкой минеральной среде MS в течение 7 суток (г/л: 1.0 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.25 –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3.0 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4.5 –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Phale et al., 1995)) с добавлением различных источников углерода: сахароза (10 г/л), гексадекан (4% об.) или твердый парафин (10 г/л). Начальный засев клеток штамма составлял  $10^6$  КОЕ/мл. Количество клеток в суспензии определяли высевом серийных разведений на среду LB (г/л: 10 – триптон; 5 – дрожжевой экстракт; 5 – NaCl; 20 – агар-агар).

### 2.2. Оценка адгезии клеток штамма *T. tyrosinosolvans* PS2 к углеводородам

Для определения бактериальной адгезии к углеводородам, клетки штамма центрифугировали и промывали два раза средой MS. Далее смешивали равные объемы суспензии клеток с OD = 1 с гексадеканом, встряхивали в течение 60 сек, оставляли для разделения фаз на 30 мин. После разделения измеряли оптическую плотность гексадекановой фазы при длине волны  $\lambda = 400$  нм с помощью спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США) (Zhang and Miller, 1994; Sotirova et al., 2009).

### 2.3. Определение убыли углеводородов методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии

Биодеградацию твердого парафина штаммом PS2 анализировали с помощью газового хроматографа «Agilent Technologies 7890B GC System» (США), совмещенного с масс-селективным детектором (ГХ-МС) после экстракции гексаном. Для анализа использовалась капиллярная кварцевая колонка HP-5MS (длина 30 м, диаметр 0.25 мм, толщина пленки фазы 0.25 мкм) с химически привитой фазой 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан. Условия проведения ГХ-МС были следующими: температура испарителя хроматографа - 280°C; температура интерфейса детектора - 280°C; газ-носитель

– гелий, режим постоянного потока – 1.0 мл/мин. Калибровка по массе осуществлялась автоматически в режиме «Автонастройка», используя перфтортрибутиламин (99.8%, Agilent Technologies) в качестве стандарта.

## 3. Результаты и обсуждение

Штамм *T. tyrosinosolvans* PS2 показал значительный рост при культивировании с разными источниками углерода. На среде с добавлением сахарозы конечная концентрация клеток составляла  $10^8$  КОЕ/мл, для гексадекана –  $10^7$  КОЕ/мл, для твердого парафина –  $10^7$  КОЕ/мл. Штамм способен утилизировать гексадекан, снижая концентрацию на 3.39 мг/мл за 8 дней (Romanova et al., 2022). Также, при культивировании на среде с гексадеканом наблюдали увеличение эмульгирующей активности и снижение поверхностного натяжения культуральной жидкости, что свидетельствует о способности штамма продуцировать биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ).

При культивировании штамма на жидкой минеральной среде как с гексадеканом, так и с твердым парафином адгезия клеток к гидрофобному субстрату увеличивалась в 2.2-2.5 раз, по сравнению с клетками, выращенными на среде с сахарозой. Высокая адгезия клеток к гидрофобному субстрату и способность к продукции биоПАВ повышает эффективность биоремедиации загрязненных всплывающими углеводородами и маслами водоемов, поскольку клетки вместе с синтезированными биоПАВ концентрируются в загрязненной зоне - поверхностной пленке, и не распределяются по всей толще водоема (Vaccari et al., 2017).

По результатам газовой хроматографии было обнаружено, что алканы с длиной цепи от C25 до C28 вносят значительный вклад в состав твердого парафина. Однако, при культивировании на жидкой минеральной среде с твердым парафином, штамм PS2 утилизировал преимущественно алканы с длиной цепи C20 ( $61 \pm 4\%$ ), C21 ( $40 \pm 4\%$ ), C22 ( $25 \pm 5\%$ ) и C23 ( $14 \pm 4\%$ ) за 7 суток. При этом содержание алканов с длиной цепи C24-C31 также достоверно снижалось, но в меньшей степени (от 6% до 13%) (Рис.). Вероятно, твердые алканы с низкой длиной

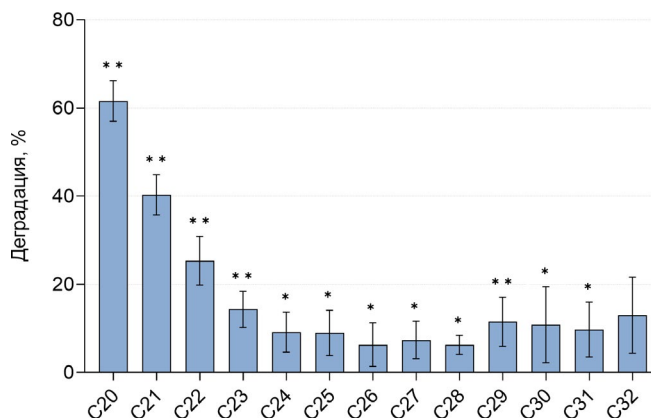


Рис. Биодеградация твердого парафина штаммом *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 по сравнению с контролем. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$

цепи активнее метаболизируются вследствие их большей биодоступности в водной среде культивирования, поскольку известно, что вещества данного класса становятся более гидрофобными с увеличением длины углеродной цепи (Naether et al., 2013).

#### 4. Заключение

Штамм *T. tyrosinosolvans* PS2 способен метаболизировать широкий спектр компонентов смеси твердых алканов, адаптируясь к новому субстрату путем увеличения степени липофильности своей поверхности для лучшего контакта с углеводородной молекулой.

Таким образом, исследуемый штамм может быть использован в очистке загрязненных водоемов без применения специальных всплывающих сорбентов и без внесения дополнительных биоПАВ.

#### 5. Финансирование

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Приоритет-2030) и в рамках выполнения проекта № FZSM-2023-0013 государственного задания КФУ.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

Alonso-Gutiérrez J., Teramoto M., Yamazoe A. et al. 2011. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. HOB, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of applied microbiology* 111(4): 800–810. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05104.x)

Chen W., Li J., Sun X. et al. 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 118: 110–118. DOI: [10.1016/j.ibiod.2017.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.029)

Delegan Y.A., Valentovich L.N., Shafieva S.M. et al. 2019. Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. *Folia Microbiologica* 64: 41–48. DOI: [10.1007/s12223-018-0623-2](https://doi.org/10.1007/s12223-018-0623-2)

Li Y.P., Pan J.C., Ma Y.L. 2020. Elucidation of multiple alkane hydroxylase systems in biodegradation of crude oil n-alkane pollution by *Pseudomonas aeruginosa* DN1. *Journal of applied microbiology* 128(1): 151–160. DOI: [10.1111/jam.14470](https://doi.org/10.1111/jam.14470)

Naether D.J., Slawtschew S., Stasik S. et al. 2013. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and environmental microbiology* 79(14): 4282–4293. DOI: [10.1128/AEM.00694-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00694-13)

Phale P.S., Mahajan M.C., Vaidyanathan C.S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Archives of microbiology* 163: 42–47. DOI: [10.1007/BF00262202](https://doi.org/10.1007/BF00262202)

Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477–2490. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x)

Romanova V.A., Boulygina E.A., Siniagina M.N. et al. 2019. Draft genome sequence of a medium- and long-chain n-alkane-degrading bacterium, *Tsukamurella tyrosinosolvans* strain PS2, with two genetic systems for alkane degradation. *Microbiology Resource Announcement* 8: e00218-e219. DOI: [10.1128/MRA.00218-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00218-19)

Romanova V., Markelova M., Boulygina E. et al. 2022. Significance of both alkB and P450 alkane-degrading systems in *Tsukamurella tyrosinosolvans*: proteomic evidence. *Applied microbiology and biotechnology* 106(8): 3153–3171. DOI: [10.1007/s00253-022-11906-1](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11906-1)

Sakthipriya N., Doble M., Sangwai J.S. 2016. Influence of thermophilic *Bacillus subtilis* YB7 on the biodegradation of long chain paraffinic hydrocarbons (C 16 H 34 to C 36 H 74). *RSC Advances* 6: 82541–82552. DOI: [10.1039/C6RA18774A](https://doi.org/10.1039/C6RA18774A)

Sotirova A., Spasova D., Vasileva-Tonkova E. et al. 2009. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research* 164(3): 297–303. DOI: [10.1016/j.micres.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.005)

Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R. et al. 2017. Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science* 247: 561–572. DOI: [10.1016/j.cis.2017.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.016)

Xu H.X., Tang Y.Q., Nie Y. et al. 2022. Comparative transcriptome analysis reveals different adaptation mechanisms for degradation of very long-chain and normal long-chain alkanes in *Dietzia* sp. DQ12-45-1b. *Environmental Microbiology* 24(4): 1932–1945. DOI: [10.1111/1462-2920.15928](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15928)

Zaki M.S., Mohammad A.M.N., Abbas H.H.H. 2015. Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments (Review Article). *Life Science Journal* 12(5): 109-121.

Zhang Y., Miller R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2101-2106.