



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS *POR Rhodococcus sp. B7-I*
AISLADO DE SEDIMENTO DEL GOLFO DE MÉXICO**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

LIZETH NARAI REZA VAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DOCTORA PALOMA LARA FIGUEROA

CUERNAVACA, MORELOS

Diciembre, 2021

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme terminar un ciclo más en mi vida. A mis padres Odilon Vázquez y Raquel Ortega, que me motivaron e impulsaron a seguir mi sueño de prepararme profesionalmente, que gracias a ellos eh podido culminar mis estudios, y por supuesto a mis padres biológicos que, sin su ayuda tanto económicamente como emocionalmente siempre estuvieron presentes, Marco Antonio Reza y Loida Vázquez, mil gracias por tanto sacrificio que hicieron por mí, a los cuatro los amo. A mis hermanas, Linet, mi otra mitad mi mejor amiga mi mayor ejemplo, gracias, porque en este proceso siempre estuviste en mis altas y bajas apoyándome con tus consejos acertando en todo, te amo, y a ti Dani, que siempre tenías palabras de aliento hacia mí, te amo hermanita. A mi tía Magda y a mis otras hermanas Saray y Dafne, que también fueron una parte fundamental, a todos muchas gracias, porque sin ustedes no lo hubiera logrado.

“Haz de tu vida un sueño, y de tu sueño una realidad”

Antoine de Exupéry

AGRADECIMIENTOS

A una gran mujer que admiro, la Doctora Katy Juárez, que me permitió ser parte de su equipo de trabajo, que me dio la oportunidad de trabajar en unos de sus proyectos y que me asignó con una gran persona, la Doctora Paloma Lara.

Gracias Paloma, porque en este trayecto fuiste mi mejor maestra, gracias por enseñarme y prepararme de la mejor manera, por todo el tiempo que me dedicaste, por tu paciencia que me brindaste, por tus sabios consejos que me diste y por mentalizarme en creer más en mí. Me llevo una gran enseñanza de ti, tanto profesionalmente y como persona, eres una gran mujer que admiro, por todo muchas gracias.

Agradezco a mis sinodales por su colaboración y su tiempo invertido en este proyecto; Dra. María del Refugio Trejo Hernández, Dr. Fernando Martínez Morales y Dr. Edgar Dantán González, gracias. También quiero agradecer al Dr. Daniel Morales, por ser mi mentor en algunos procesos de análisis del proyecto y por su colaboración en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron apoyándome, Fany, Eliel, Alan, Dulce, Dani, Manuel, Adrián y al Dr. Beto, que cualquier duda o necesidad que me surgiera ellos siempre me ayudaban, por todo gracias.

También agradezco a mis amigos de la facultad, los cuales se convirtieron en mi familia con los que pase mis cuatro años de carrera viviendo buenos y malos momentos, Dianita, Martha, Luz y Daniel, muchas gracias porque siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente.

A TODOS MIL GRACIAS!!!!

“Nada en la vida debe ser temido, solo comprendido. Ahora es el momento de comprender más para temer menos”.

Marie Curie

ÍNDICE

Introducción	1
Importancia y naturaleza de los hidrocarburos.....	1
Contaminación y toxicidad por hidrocarburos.....	1
Degradación aeróbica microbiana de hidrocarburos.....	3
Degradación de hidrocarburos aromáticos	4
Hierro oxigenasas Rieske Non-Heme.....	4
Diiron monooxigenasas solubles	5
Monooxigenasas flavoproteína	5
Degradación de hidrocarburos alcanos	5
Hidroxilación de alcanos	6
La familia alcano hidroxilasa AlkB	7
Citocromo P450 de alcano hidroxilasa	7
Degradación anaeróbica microbiana de hidrocarburos.....	8
Adición del fumarato	9
Hidroxilación anaeróbica de hidrocarburos	9
Carboxilación anaeróbica de hidrocarburos.....	9
Metilación anaeróbica de hidrocarburos	9
Mecanismos bacterianos para acceder e internalizar hidrocarburos.....	10
Solubilización de hidrocarburos mediante la producción de surfactantes y emulsificantes.	10
Por contacto directo.....	13
Antecedentes	14
Consortio de investigación del Golfo de México.....	14
Degradación de hidrocarburos por <i>Rhodococcus</i> spp.	15

Degradación aeróbica de hidrocarburos por <i>Rhodococcus spp.</i>	16
Degradación de hidrocarburos por <i>Rhodococcus</i> bajo condiciones limitantes de oxígeno	18
Justificación.....	19
Hipótesis	19
Objetivos.....	19
General.....	19
Particulares.....	19
Metodología.....	19
Purificación de la cepa <i>Rhodococcus sp. B7-I</i>	19
Microscopía de epifluorescencia (DAPI)	20
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	20
Condiciones de oxigenación.	22
Monitoreo de crecimiento.....	22
Determinación de la degradación de hidrocarburos	23
Degradación de hidrocarburos puros.	23
Cuantificación gravimétrica y análisis por GC-FID	23
Medición de tensión superficial	24
Enriquecimientos, medios utilizados y criopreservación	24
Degradación de crudo extra ligero API 40 por consorcios bacterianos cB7-MMSw, cB7-MARS y cB7-MARNP	25
Resultados	26
Degradación aeróbica de crudo API 40 por la cepa B7-I.....	26
Degradación micro-aeróbica de crudo API 40 por la cepa B7-I	28
Degradación de hidrocarburos puros	32
Detección de actividad surfactante por <i>Rhodococcus sp. B7-I</i>	37

Consortios bacterianos degradadores de hidrocarburos obtenidos a partir de sedimentos de la estación B7 del Golfo de México.....	40
Degradación de crudo API 40 por los consorcios bacterianos.....	44
Discusión.....	47
Conclusiones.....	51
Perspectivas.....	52
Referencias	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos naturales del crudo ante los derrames en ambientes marinos.....	2
Figura 2. Esquema general de las vías de degradación aeróbica microbiana.....	3
Figura 3. Degradación del fenol por la vía ortho.....	4
Figura 4. Degradación de hidrocarburos alcanos.....	6
Figura 5. Esquema general de degradación de hidrocarburos	8
Figura 6. Genes involucrados en la vía de degradación aeróbica de tolueno	15
Figura 7. Estrategia metodológica.....	19
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I en medio MMSw con crudo API 40	26
Figura 9. Análisis de degradación por gravimetría de crudo API 40 al 860mg/L por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I bajo condiciones aeróbicas.....	27
Figura 10. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 0.1% v/v	27
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>R. sp.</i> B7-I en medio MMSw con crudo API 40 al 0.1% v/v.....	29
Figura 12. Análisis de degradación por gravimetría de crudo API 40 al 0.1% v/v por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I bajo condiciones micro-aeróbicas.....	29
Figura 13. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 0.1% v/v por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I bajo condiciones micro-aeróbicas.	30
Figura 14. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición aeróbica & micro- aeróbica de crudo API 40 al 1% v/v por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I.....	31

Figura 15. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v por <i>R. sp.</i> B7-I bajo condiciones aeróbicas & micro-aeróbicas.....	31
Figura 16. Se muestra el crecimiento de B7-I con undecano, dodecano y hexadecano de cadena corta como única fuente de carbono y energía.....	34
Figura 17. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición aeróbica de hidrocarburos alifáticos de cadena corta al 0.1% v/v por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I.....	35
Figura 18. Análisis de degradación por GC-FID de hidrocarburos alifáticos de cadena corta al 0.1% v/v por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I bajo condiciones aeróbicas.	35
Figura 19. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición micro-aeróbica de hidrocarburos alifáticos (C28, C24 y C20) por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I.	36
Figura 20. Crecimiento de <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I con diferentes azúcares y ácidos orgánicos como única fuente de carbono.....	38
Figura 21. Producción de actividad surfactante por <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I con diferentes fuentes de carbono.....	38
Figura 22. Crecimiento de <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I con diferentes hidrocarburos alifáticos y API 40 como única fuente de carbono.....	39
Figura 23. Producción de surfactante de <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I con diferentes hidrocarburos alifáticos y API 40.....	39
Figura 24. Abundancia relativa de las clases que componen la microbiota del sedimento B7 y tres consorcios establecidos a partir de éste en diferentes medios	42
Figura 25. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en el sedimento B7.....	43
Figura 26. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en el consorcio B7 MMSw.....	43

Figura 27. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en los consorcios B7 MARS y MARNP.....	44
Figura 28. Análisis de degradación por gravimetría en tres diferentes medios de cultivo con crudo API 40 al 1% v/v, por los consorcios bacterianos obtenido a partir de una muestra de sedimento de la estación B7.....	45
Figura 29. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MMSw.....	45
Figura 30. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MARS.....	46
Figura 31. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MARNP.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas de diferentes familias que participan en la hidroxilación terminal inicial de n-alcános.....	7
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los bio-surfactantes y bio-emulsificantes.....	13
Tabla 3. Genes de diferentes cepas de <i>Rhodococcus</i> que participan en la degradación de hidrocarburos.....	17
Tabla 4. Componentes de DL Vitaminas.....	21
Tabla 5. Componentes de solución DL Minerales.....	21
Tabla 6. Clasificación de crudos de acuerdo con su densidad.....	22
Tabla 7. Crecimiento de <i>Rhodococcus sp.</i> B7-I, en presencia de diferentes hidrocarburos puros como única fuente de carbono.....	23

INTRODUCCIÓN

Importancia y naturaleza de los hidrocarburos

El petróleo es un recurso natural de gran importancia para el ser humano, con un alto valor comercial pues a partir de este se fabrican productos que se utilizan en la vida diaria, como la gasolina y el diésel, los cuales son la principal fuente de energía. El petróleo crudo está compuesto principalmente por una mezcla de hidrocarburos y otros compuestos en menor proporción como metales incluyendo plomo, fierro, cromo, níquel y vanadio (Doble y Kumar 2005).

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que contienen principalmente hidrógeno y carbono y se clasifican en alifáticos, aromáticos, asfaltenos y resinas.

Los hidrocarburos alifáticos pueden ser lineales (undecano, dodecano, hexadecano, octacosano, etc.), cíclicos (ciclohexano), con o sin sustituyentes. Los hidrocarburos aromáticos son aquellos que están compuestos por anillos con dobles enlaces coordinados y son clasificados por el número de anillos que contienen: hidrocarburos aromáticos monocíclicos los de un solo anillo (benceno, tolueno, fenol, etc.), hidrocarburos policíclicos de bajo peso molecular conformados por dos a tres anillos (naftaleno, fenantreno, antraceno) y los de alto peso molecular de cuatro o más anillos (pireno, fluoranteno). Las resinas contienen grupos funcionales polares formados por N, S, O y metales traza, son sólidos amorfos que contienen compuestos aromáticos con cadena alquílica larga. Los asfaltenos al igual que las resinas contienen grupos funcionales polares, son de alto peso molecular compuestos por grupos policíclicos (Varjani 2017).

Contaminación y toxicidad por hidrocarburos

En México la mayoría de los yacimientos de hidrocarburos se encuentran en ambientes marinos y debido a los procesos de exploración extracción, refinación y transporte, ocurren de manera frecuente derrames que contaminan gravemente el ambiente marino (Babcock-Adams *et al.*, 2017). Los efectos tóxicos de los hidrocarburos han sido ampliamente estudiados en humanos, organismos acuáticos, así como en bacterias (Tormoehlen *et al.*,

2014) (Sharaf y Shehata, 2015). Los hidrocarburos afectan tanto la salud de los organismos vivos como su capacidad reproductiva. Dicha toxicidad de los hidrocarburos afecta cuando hay interacción con diferentes componentes celulares. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos causan estrés oxidativo y por lo tanto daños en el DNA, lo cual tiene efectos mutagénicos y teratogénicos (Wang *et al.*, 2017). Por otra parte, los hidrocarburos alifáticos alteran la estructura de las membranas celulares, lo cual tiene efectos sobre su función, por ejemplo, causando la disipación del potencial de membrana (Sikkema *et al.*, 1995).

En el mar los hidrocarburos del petróleo están sujetos a dispersión, disolución, emulsificación, evaporación y biodegradación (Figura 1) (Dellagnezze et al. 2018). En las últimas décadas se han realizado diversos estudios de biodegradación microbiana de hidrocarburos para mitigar los graves problemas de contaminación. Se ha encontrado que los principales degradadores son las bacterias y hongos, siendo las bacterias los agentes más activos en la degradación ante los derrames en ambientes marinos (Das y Chandran, 2011), llevando a cabo este proceso de degradación bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

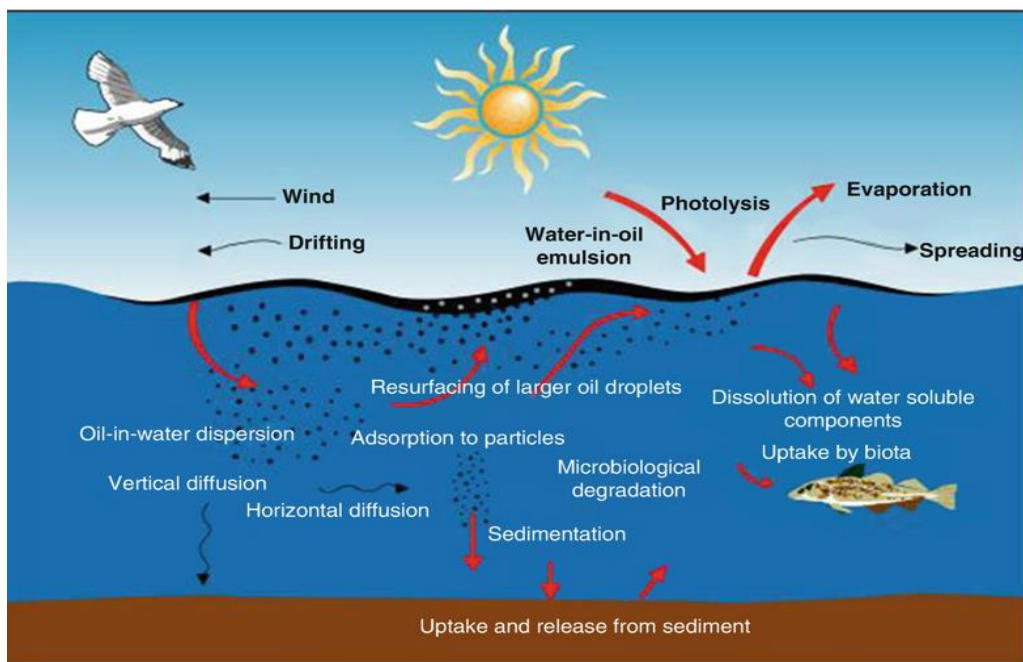


Figura 1. Procesos naturales del crudo ante los derrames en ambientes marinos (Dellagnezze *et al.*, 2018).

Degradación aeróbica microbiana de hidrocarburos

La biodegradación aeróbica suele ser más rápida que la anaeróbica. De manera general esta consiste en la activación inicial mediante la adición de oxígeno, posteriormente la degradación por vías periféricas para convertir los contaminantes orgánicos en intermediarios centrales que pueden ser utilizados para la generación de biomasa, o degradados por vías centrales como el ciclo de Krebs, para la generación de energía (Figura 2) (Das y Chandran, 2011).

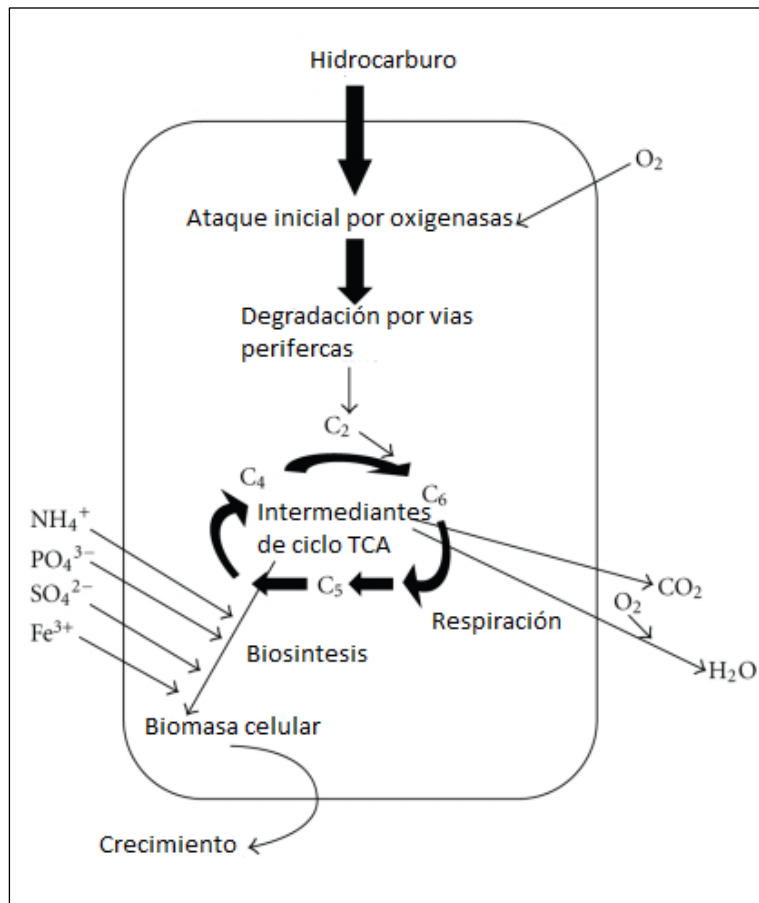


Figura 2. Esquema general de las vías de degradación aeróbica microbiana (Das y Chandran, 2011).

Degradación de hidrocarburos aromáticos

La degradación de los hidrocarburos aromáticos inicia con la activación del núcleo aromático mediante reacciones de oxigenación, que consiste en la introducción de grupos hidroxilo en las posiciones *ortho* o *para*, derivado de este proceso se generan intermediarios centrales como, catecol, protocatecuatos, gentisatos e hidroxibenzoquinoles, posteriormente dichos intermediarios son sujetos a ruptura oxigenolítica del anillo o en pocos casos son convertidos en **CoA tioester** para su degradación (Figura 3). Estas reacciones de oxidación son catalizadas por monooxigenasas pertenecientes a diferentes familias que se describen a continuación (Pérez-Pantoja *et al.* 2010).

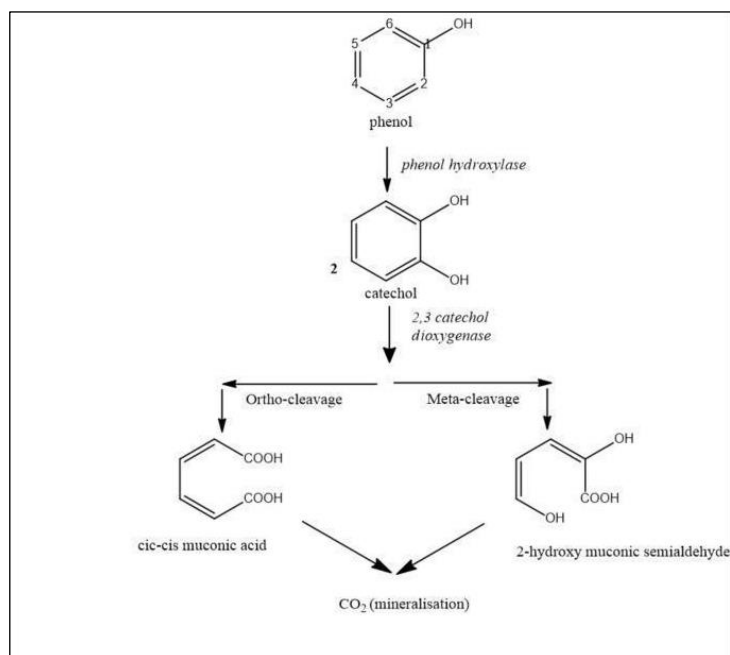


Figura 3. Degradación del fenol por la vía ortho (Nzila, 2018).

- **Hierro oxigenasas Rieske Non-Heme**

Las hierro-oxigenasas Rieske non-hemo participan en la activación aeróbica de hidrocarburos aromáticos como el benceno, tolueno, naftaleno o bifenol. Estas enzimas están conformadas por varias subunidades, usualmente catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno dentro del anillo aromático para formar arene-cis-dihidrodiols, posteriormente el compuesto es sujeto a una deshidrogenación usualmente catalizada por cis-dihidrodiol deshidrogenasa para obtener un catecol (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010).

- **Diiron monooxigenasas solubles**

Las monooxigenasas transforman benceno/tolueno a fenol/metilfenol y fenoles a catecoles. Están constituidas por una reductasa, un dominio catalítico de proteína que no contiene cofactores orgánicos ni metal, una hidroxilasa terminal y un centro de dihierro contenido en cada α -subunidad (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010).

- **Monooxigenasas flavoproteína**

Las monooxigenasas flavoproteínas utilizan NADPH en las reacciones y O_2 como co-sustrato insertando un átomo de oxígeno dentro del sustrato. En estas enzimas, el NADPH reduce la flavina reaccionando con O_2 para formar un intermediario $C_4\alpha$ -hidroxiperoxyflavin, el cual es el agente oxigenado. Dentro de estas monooxigenasas se encuentran la Clase A componente-individual flavin monooxigenasa, distribuidas en diferentes taxas de bacterias que hidroxilan en posición *ortho* o *para* de compuestos aromáticos que ya contienen un grupo hidroxilo (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010).

Degradación de hidrocarburos alcanos

La degradación de alcanos inicia por la oxidación de un grupo metilo terminal por una enzima alcano-hidroxilasa (alcano-monooxigenasa) produciendo un alcohol primario, el cual es convertido en el correspondiente aldehído por una enzima alcohol deshidrogenasa, posteriormente una enzima aldehído deshidrogenasa actúa sobre el grupo aldehído generando un ácido graso (Figura 4) (Moreno y Rojo, 2017). Los ácidos grasos son conjugados con CoA y degradados por β -oxidación que genera acetil-CoA. La oxidación subterminal ha sido reportada solo por algunos microorganismos, mientras que la oxidación de alcoholes y ácidos grasos es muy general (Moreno y Rojo, 2017).

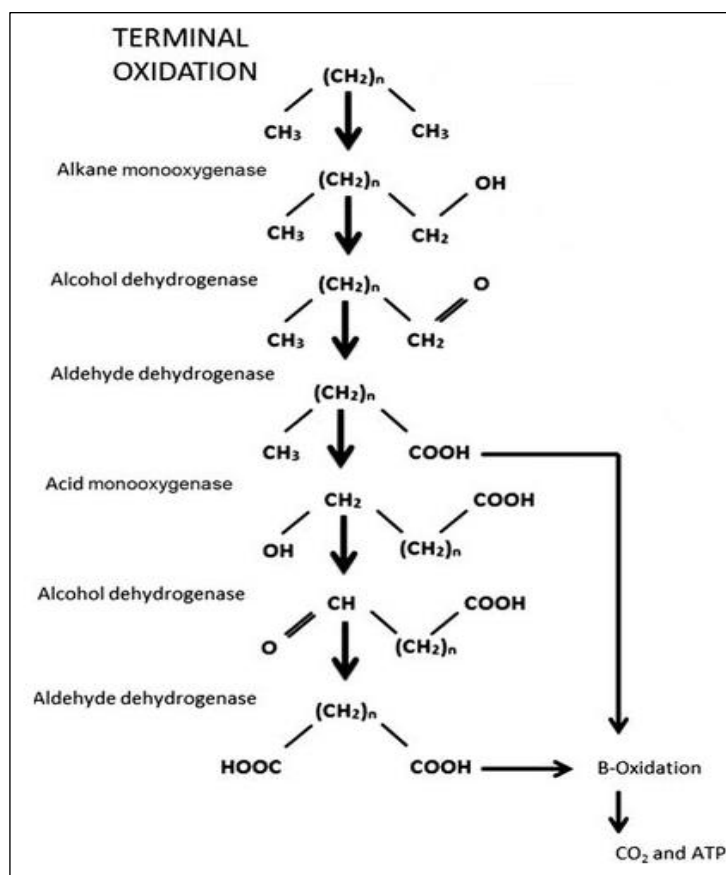


Figura 4. Degradación de hidrocarburos alcanos (Valdivia-Rivera *et al.*, 2019).

- **Hidroxilación de alcanos**

La hidroxilación terminal de n-alcanos es catalizada por diferentes enzimas que tienen especificidad sobre alcanos de cadenas largas o cortas (Tabla.1). Los microorganismos que degradan cadenas cortas de n-alcanos ($\text{C}_2\text{-C}_4$) poseen enzimas relacionadas con metano monooxigenasas, mientras que los que degradan cadenas medianas ($\text{C}_5\text{-C}_{11}$) o largas (C_{12}) comúnmente contienen monooxigenasas unidas a membrana, relacionadas con non-hemo hierro monooxigenasas (Moreno y Rojo, 2017).

Clase de enzimas	Características	Longitud del sustrato	Anfitrión
PRM, propano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hemo similar a sMMO	C ₃	bacterias
sBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hemo similar a sMMO	C ₂ –C ₉	bacterias
pBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa que contiene cobre similar a pMMO	C ₂ –C ₉	bacterias
CYP153	Citocromo soluble P450 (clase I)	C ₅ –C ₁₂	bacterias
CYP116B5	Citocromo P450 autosuficiente (clase VII)	C ₁₄ –C ₁₆	bacterias
CYP52	Membrana unida al citocromo P450	C ₁₀ –C ₁₆	Levaduras
AlkB-relacionado	Monooxigenasa de hierro no hemo	C ₃ –C ₁₃ o C ₁₀ –C ₂₀	bacterias
AlmA	Monooxigenasa de unión a la flavina	C ₂₀ –C ₃₆	bacterias
LadA	Monooxigenasa termofílica dependiente de flavina	C ₁₀ –C ₃₀	bacterias
Dioxigenasa	Cobre dioxigenasa dependiente de flavina	C ₁₀ –C ₃₀	bacterias
PT7_2466 monooxigenasa	Monooxigenasa tipo Rieske	C ₅ –C ₂₄	bacterias

Tabla 1. Enzimas de diferentes familias que participan en la hidroxilación terminal inicial de n-alcanos (Moreno y Rojo, 2017).

- **La familia alcano hidroxilasa AlkB**

AlkB es una enzima integral de membrana non-heme monooxigenasa de di-hierro que hidroxila n-alcanos en posición terminal. Esto requiere la asistencia de dos proteínas solubles de transferencia de electrones llamadas rubredoxina y rubredoxina reductasas. El di-hierro de AlkB permite la activación dependiente del oxígeno de la molécula de alcano mediante un sustrato intermediario radical (Moreno y Rojo, 2017).

- **Citocromo P450 de alcano hidroxilasa**

Los citocromos P450s son solubles, requieren ferredoxina y ferredoxina reductasa para transferir electrones de NADPH al citocromo. Un ejemplo del citocromo P450 involucrado en degradación de hidrocarburos es el de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 que hidroxila C₆-C₁₁ a 1-alcanos con alta selectividad. Se ha demostrado que las proteínas P450 pueden sustituir funcionalmente a *P. putida*, GPo1 y AlkB ya que son hidroxilasas de alcanos verdaderas (Moreno y Rojo, 2017).

Degradación anaeróbica microbiana de hidrocarburos

La degradación anaeróbica, es más lenta, pero es de gran relevancia en diversos ambientes, por ejemplo, en sedimentos marinos o en acuíferos profundos, de manera general, está consiste en activación, degradación por vías periféricas y degradación final acoplada a la reducción de aceptores de electrones alternativos al oxígeno como el Fe(III), CO₂ (condiciones metanogénicas), el nitrato (NO₃⁻), sulfato (SO₄⁻²) y en algunos casos compuestos orgánicos como fumarato (Figura 5) (Holliger y Zehnder, 1996). La degradación microbiana anaeróbica de hidrocarburos ha sido menos estudiada que la degradación aeróbica, pero en las últimas décadas se ha reconocido su relevancia ecológica (Meckenstock *et al.*, 2016).

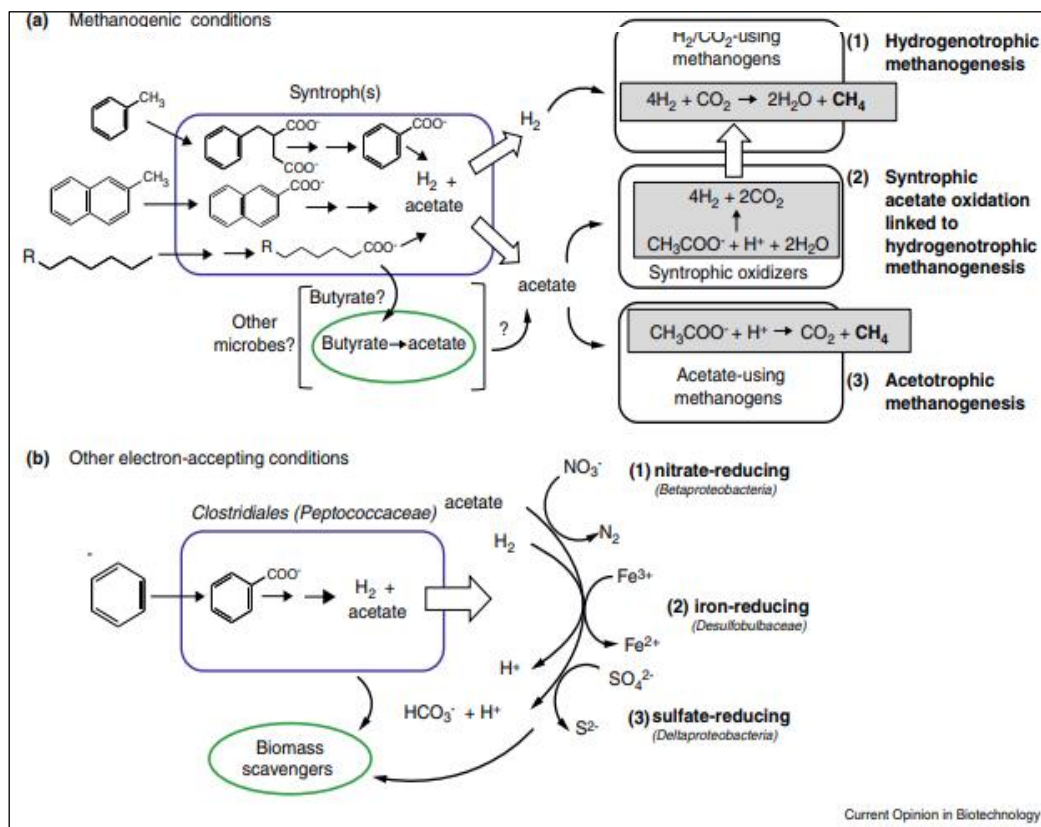


Figura 5. Esquema general de degradación de hidrocarburos aromáticos a) bajo condiciones metanogénicas, b) en presencia de un aceptor final de electrones (Tomada de Gieg *et al.*, 2014).

Al igual que en condiciones aeróbicas, la activación de hidrocarburos es limitante para su degradación en condiciones anóxicas, sin embargo, los mecanismos y las enzimas involucradas son muy diferentes, e incluyen activación por adición de fumarato, hidroxilación, carboxilación y metilación (Boll y Heider, 2010).

- **Adición del fumarato**

En *Thauera aromática* se ha descrito la activación de hidrocarburos aromáticos como el tolueno mediante la adición de fumarato, mediante la benzoil succinato sintasa (BSS) la cual genera un radical transitorio en el hidrocarburo y posteriormente cataliza la adición de fumarato, este tipo de enzimas también han sido identificadas y estudiadas en otros microorganismos que degradan hidrocarburos anaeróbicamente (Rabus *et al.*, 2016). La activación de compuestos alifáticos también puede efectuarse mediante la adición de fumarato por enzimas denominadas alquil succinato sintasas (Boll y Heider, 2010).

- **Hidroxilación anaeróbica de hidrocarburos**

En bacterias desnitrificantes se ha demostrado que el etilbenceno es inicialmente atacado por hidroxilación con agua produciendo (S)-feniletanol y dos equivalentes de electrones utilizando la enzima etilbenceno deshidrogenasa (Boll y Heider, 2010).

- **Carboxilación anaeróbica de hidrocarburos**

La activación por carboxilación ha sido reportada en el caso de algunos hidrocarburos como el naftaleno, el cual es transformado en 2-[carboxil] ácido naftoico, sin embargo, este tipo de activación ha sido muy escasamente descrita (Mouttaki *et al.*, 2012).

- **Metilación anaeróbica de hidrocarburos**

La enzima que participa para iniciar la degradación anaeróbica por una metilación se desconoce, pero se cree que podría participar una metiltransferasa que contiene B12. Para la degradación de naftaleno se identificó que la metilación inicial se obtuvo en 2-metilnaftaleno en un reductor de sulfato (Boll y Heider, 2010).

Mecanismos bacterianos para acceder e internalizar hidrocarburos

Uno de los requisitos más importantes para la degradación microbiana de hidrocarburos es su capacidad para acceder, unirse y transportar este tipo de compuestos que son altamente hidrofóbicos. Para comenzar la degradación, la bacteria debe tener interacción con el hidrocarburo y así poder realizar el transporte transmembranal del hidrocarburo. En bacterias se han identificado diversos mecanismos para cumplir este requisito, las cuales incluyen la solubilización del hidrocarburo, el cual depende de la producción de surfactantes y/o emulsificantes, o por contacto directo mediante en el cual se requiere que la envoltura celular sea hidrofóbica. Estas estrategias se describen a continuación (Hua y Wang 2014).

Solubilización de hidrocarburos mediante la producción de surfactantes y emulsificantes.

Para que los hidrocarburos estén disponibles para las bacterias y así puedan ser degradados, algunos microorganismos tienen la capacidad de producir bio-surfactantes y/o bio-emulsificantes, los cuales permiten que el hidrocarburo se vuelva más soluble.

Los bio-surfactantes y bio-emulsificantes son moléculas anfifílicas, presentan una parte hidrofílica compuesta por un éster, un grupo hidroxilo, un grupo fosfato, carboxilato o un carbohidrato, y otra hidrofóbica compuesta por una proteína, un péptido o un ácido graso (Hua y Wang 2014). Su clasificación puede ser por su origen microbiano, composición química o peso molecular, los bio-surfactantes de bajo peso molecular: glucolípidos y lipopéptidos en general solo tienen actividad surfactante, en comparación con los de alto peso molecular: lipopolisacáridos y lipoproteínas (o una combinación de ambos) que tienen actividad emulsificante (Tabla 2) (Uzoigwe *et al.*, 2015).

Biosurfactante	Clase	Origen microbiano	Propiedades fisicoquímicas	Roles fisiológicos	Referencia
Bajo peso molecular	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	Una o dos azúcares ramnosa ligados al 3-ácido hidrodecanoico	Tecnología de biodegradación	Rahman et al., 2002
Glicolípidos			ST-28 mN/m EI24- 53- 73%		
	Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i>	Soforosas de disacáridos (2-O-β-D-glucopiranosil-D-glucopiranosas) unidas a ácidos grasos	Aditivo detergente para un mejor rendimiento y eliminación de manchas	Develter and Laurysen, 2010; Joshi-Navare et al., 2013
		<i>Candida tropicalis</i>	ST-32.1-34.2 mN/m EI-23-70%	Limpieza de superficies duras, actividad antibacterial	
	Lípido de trehalosa	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> BN38	Disacárido no reductor con dos unidades de glucosa unidas en un enlace α, α-1, 1-glicosídico.	Biorremediación de sitios contaminados, actividad antitumoral	Tuleva et al., 2008; Christova et al., 2014
		<i>Nocardia farcinica</i> BN26	ST 24.4 mN/m EI- 23-70%		
Lipopéptidos	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> K1	Depsipéptidos heptacíclicos que constan de dos aminoácidos, cuatro aminoácidos hidrofóbicos y C13-17 β- ácidos hidroxigrasos	Recuperación mejorada de petróleo	Ongena y Jacques, 2007; Varadavenkatesan y Ramachandra, 2013; Pathak y Keharia, 2014

Biosurfactante	Clase	Origen microbiano	Propiedades fisicoquímicas	Roles fisiológicos	Referencia
		<i>Bacillus siamensis</i>	ST- 2227.9 mN/m	Antibacterial, antiviral, antitumoral, anticoagulante, inhibición de enzimas	
	Iturin	<i>Bacillus subtilis K1</i>	Cicloheptapéptido con siete aminoácidos y C3-16 β-aminoácidos grasos	Antifúngico	Arrebola et al., 2010; Pathak y Keharia, 2014
		<i>Bacillus amylofaciens</i>	ST-30-37 mN/m EI 32-66%	Biopesticidas	
	Fengycin	<i>Bacillus subtilis</i>	Depsipéptidos deca cíclico con C14-21 β-ácido hidroxigraso y 10 aminoácidos	Fuerte agente fungitoxico contra hongos filamentosos, actividades inmunomoduladoras	Arrebola et al., 2010; Pathak and Keharia, 2014
Bioemulsionantes de alto peso molecular	Emulsan RAG-1	<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 31012 (RAG-1)	Lipopolisacáridos, parte lipídica (ácido graso insaturado de C10-18), parte polisacárido (D-galactosamina, ácido D-galactosaminurónico, di-amino-6-desoxi-D-glucosa)	Incrementar el área de superficie y la biodisponibilidad de sustratos poco solubles	Choi et al., 1996; Ron y Rosenberg, 2001
	BD4 Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD4 13	Complejo proteína-polisacárido	La unión a metales pesados tóxicos Estabiliza las emulsiones de aceite en agua	Kaplan and Roseberg, 1985; Kaplan et al., 1987

Biosurfactante	Clase	Origen microbiano	Propiedades fisicoquímicas	Roles fisiológicos	Referencia
			Parte polisacárido (repetición de heptasacáridos de L-ramnosa, ácido D-glucourónico, D-manosa)		
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Polisacáridos y proteínas que contienen alanina	Emulsificación y actividad solubilizante	Navon-Venezia et al., 1995; Walzer et al., 2006
	Manoproteínas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polisacáridos y proteínas	Formación de emulsión estable con sustratos hidrófobos Estimulación del sistema inmune	Casanova et al., 1992; Lukondeh et al., 2003
	Ácido urónico bioemulsiones	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Halomonas eurihalina</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	Poliacáridos- proteínas- ácidos urónicos	Emulsificación y desintoxicación de hidrocarburos	Martínez-Checa et al., 2002; Jain et al., 2013

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los bio-surfactantes y bio-emulsificantes (Uzoigwe et al., 2015).

Por contacto directo

Este mecanismo consiste en que las células microbianas pueden adherirse directamente a gotas grandes o películas de hidrocarburos y así llevar a cabo la adsorción. Se han estudiado cepas que pueden acceder al hidrocarburo sin secretar algún surfactante extracelular o emulsionante como *Pseudomonas alcaligenes*, en lugar de ello, esta cepa modifica su envoltura haciéndola más hidrofóbica (Hua y Wang 2014). El mecanismo bacteriano de unión directa a hidrocarburos para su absorción se conoce poco en comparación a la producción de biosurfactantes/emulsificantes. (Pini et al. 2007).

ANTECEDENTES

Consorcio de investigación del Golfo de México.

El Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) se fundó en el año 2015 como un consorcio de investigación científica y de servicios de consultoría, la formación de dicho consorcio estuvo motivada principalmente por el derrame catastrófico que ocurrió en el Golfo de México por la petrolera británica British Petroleum (BP). El CIGoM está conformado por diversas líneas de investigación que buscan entender las corrientes marinas y los procesos bioquímicos del Golfo, los seres que lo habitan, cómo afecta un derrame, e incluso, cómo detener o revertir un daño”.

La línea cuatro de este proyecto, está enfocada en el estudio de la degradación natural de hidrocarburos, uno de los objetivos de esta línea es identificar las bacterias degradadoras de hidrocarburos que se encuentran en el Golfo de México, mediante estudios metagenómicos y de la composición de las comunidades microbianas, así como mediante el aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de hidrocarburo.

Dentro de la línea cuatro, específicamente en el subproyecto bajo el cargo de la Dra. Katy Juárez, fue aislada la cepa *Rhodococcus* sp. B7-I a partir de sedimentos provenientes de la estación B7 (1374 metros de profundidad, 95° 35.629' longitud W y 25° 40.523' latitud N) en la región de perdido del Golfo de México, tomados durante la campaña oceanográfica Metagenómica 2. Su aislamiento se llevó a cabo bajo condiciones de bajo oxígeno, el núcleo de sedimento original se mantuvo cerrado y sin agitación a 4°C desde su toma hasta los ensayos de aislamiento. Dentro de una cámara anaeróbica, se realizaron diluciones seriadas del sedimento (sin enriquecimiento previo) en agua de mar, estas fueron sembradas en medio de cultivo con sedimento estéril y acetato 20 mM. A partir de dicho aislamiento se obtuvieron dos morfologías de colonia. Ambas mostraron la capacidad para crecer en condiciones aeróbicas, por lo que su purificación se llevó a cabo en medio sólido aeróbico. Mediante la secuenciación del gen 16S, estos aislados fueron identificados como *Rhodococcus* sp. B7-I y *Bacillus conii* cepa B7-II.

Se determinó que la cepa B7-I tiene la capacidad de crecer con petróleo crudo de diferentes grados API como única fuente de energía y de carbono. El estudio de la cepa B7 resulta de gran interés tanto para comprender su posible participación en la atenuación natural en sedimentos del Golfo de México, así como por sus posibles aplicaciones biotecnológicas dado que varios de los organismos con mayor potencial degradador pertenecen al género *Rhodococcus*, a continuación, se describen algunos ejemplos.

Degradación de hidrocarburos por *Rhodococcus* spp.

El género *Rhodococcus* es un grupo de microorganismos taxonómicamente asociado con el phylum *Actinobacteria*, uno de los más grandes en el dominio de las bacterias, representa bacterias Gram-positivas y pueden ser encontradas en ecosistemas acuáticos y terrestres. Las bacterias de este grupo exhiben una notable versatilidad catabólica y una gran variedad de capacidades enzimáticas únicas que revelan su importancia ambiental y biotecnológica. Por ejemplo, pueden degradar un gran número de compuestos orgánicos y xenobióticos a menudo tóxicos y recalcitrantes categorizados en diferentes grupos, tales como alifáticos, aromáticos policíclicos y heterocíclicos, derivados halogenados y compuestos nitro-sustituídos (Zampolli *et al.*, 2019).

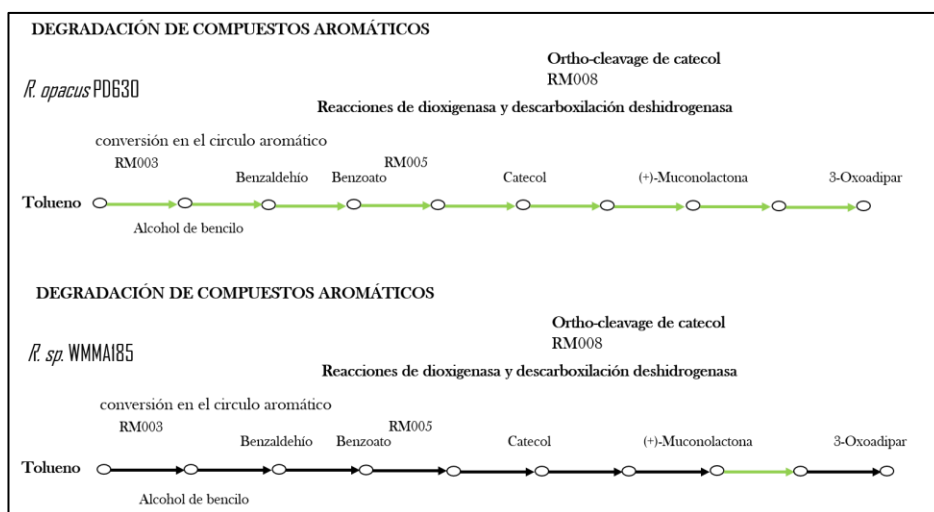


Figura 6. Genes involucrados en la vía de degradación aeróbica de tolueno presentes en *R. opacus* PD630 y *Rhodococcus* sp. WMMA185 (las flechas verdes indican la presencia del gen que codifica para la enzima involucrada, flechas negras indican ausencia del gen) (Análisis basado en información de KEGG).

Degradación aeróbica de hidrocarburos por *Rhodococcus* spp.

Existen diversos reportes sobre degradación aeróbica de hidrocarburos tanto alifáticos (Li *et al.*, 2013) como aromáticos (Marcos *et al.*, 2009) por diferentes cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*. En algunos casos se han identificado los elementos genéticos, por ejemplo, *Rhodococcus* sp. TMP2 que se identificó el gen alcano hidroxilasa AlkB y en *Rhodococcus opacus* R7 se encontró un grupo de genes alKB, (Takei *et al.*, 2008) (Zampolli *et al.*, 2014) relacionados a la degradación de compuestos específicos, además la secuenciación de los genomas de varios *Rhodococcus* spp. ha evidenciado el gran número de genes relacionados a la degradación de hidrocarburos en los microorganismos de este género. Al analizar las vías metabólicas predichas de las cepas cuyo genoma ha sido secuenciado podemos inferir que poseen grandes diferencias en sus capacidades metabólicas, por ejemplo, en la Figura 6 se muestra la ruta de degradación de tolueno por las cepas *R. opacus* PD630 y *Rhodococcus* sp. WMMA185 y podemos observar que la primera posee un mayor potencial que la segunda y ocurre lo mismo para otros compuestos aromáticos.

Entre los microorganismos degradadores de hidrocarburos del género *Rhodococcus*, destacan *R. sp.* MK1 (Kis *et al.*, 2017), *R. opacus* R7 (Zampolli *et al.*, 2014), *R. erythropolis* DN1 (Shevtsov *et al.*, 2013), *R. sp.* P14 (Zhang *et al.*, 2012) (Shong *et al.*, 2011) y *R. erythropolis* DCL14 (Carvalho y Fonseca, 2004), ya que poseen la capacidad de degradar hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos (Tabla 3)

En diferentes cepas pertenecientes al género *Rhodococcus* además de la actividad hidrocarbonoclasta también se ha encontrado la producción de biosurfactantes, específicamente trehalolípidos (glicolípidos) los cuales se caracterizan por su diversidad estructural, en algunos casos su producción es inducida por la presencia de hidrocarburos como el naftaleno y el hexadecano (Kuyukina e Ivshina, 2010).

Cepa	Sitio de aislamiento	Capacidad degradadora	Genes encontrados	Referencias
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14	Sedimento de zanja en Reeuwijk Países Bajos	Hidrocarburos aromáticos y alcanos de la gasolina	-----	(Carvalho y Fonseca, 2004)
<i>Rhodococcus</i> P14	Sedimento contaminado con petróleo crudo en el puerto de Xiamen China	PHAs, con tres a cinco anillos incluyendo fenantreno e hidrocarburos alifáticos	Se identificaron tres genes de alcano hidroxilasa (alkB) y 43 dioxigenasas relacionadas a degradación de PHA.	(Song et al., 2011) (Zhang et al., 2012)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DN1	Suelo contaminado con petróleo	Alcanos, cicloalcanos y compuestos aromáticos del petróleo crudo	Se identificaron dioxigenasas alifáticas y aromáticas, las cuales están involucradas en la degradación de xenobióticos.	(Shevtsov et al., 2013)
<i>Rhodococcus opacus</i> R7	Suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos	Alcanos de cadena variable, naftaleno y xileno	Se identificó el grupo de genes alkB, codificando un alcano monooxigenasa.	(Di Gennaro et al., 2001) (Zampolli et al., 2014)
<i>Rhodococcus</i> sp. MKI	Suelos contaminados por residuos industriales de una empresa química	Hidrocarburos alifáticos como aromáticos	Cinco genes que codifican las enzimas alcano-1-monooxigenasa (AlkB)	(Kis et al., 2017)

Tabla 3. Genes de diferentes cepas de *Rhodococcus* que participan en la degradación de hidrocarburos.

Degradación de hidrocarburos por *Rhodococcus* bajo condiciones limitantes de oxígeno

Se ha sugerido la participación de *Rhodococcus spp.* en degradación anaeróbica en diversos ambientes (Wan *et al.*, 2012), sin embargo, esta capacidad ha sido pobremente estudiada (Holliger y Zehnder, 1996). Wan y colaboradores reportaron la presencia de *Rhodococcus* en un consorcio microbiano con *Bacillus*, *Azotobacter* y *Herbaspirillum*, el cual fue capaz de degradar anaeróbicamente antraceno (Wan *et al.*, 2012). En 2018 Wilhelm y colaboradores reportaron el enriquecimiento de *Rhodococcus* y *Pseudomonas* durante la degradación de naftaleno en aguas subterráneas en condiciones anóxicas y encontraron la presencia del gen que codifica a la 2,3-catecol dioxigenasas (*catE*) el cual se sabe que es característico de organismos que degradan aromáticos bajo condiciones limitantes de oxígeno (Wilhelm *et al.*, 2018). Dado que los sedimentos son ambientes en los que se generan zonas de transición oxicas/anóxicas, es importante el estudio de los procesos microbianos bajo estas condiciones, sin embargo, los estudios de degradación microbiana de hidrocarburos se han centrado principalmente en estudios bajo condiciones estrictamente aeróbicas o anaeróbicas. El presente proyecto de investigación estuvo centrado en evaluar la capacidad degradadora de petróleo crudo API 40 por la cepa *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones aeróbicas, micro-aeróbicas y anaeróbicas.

JUSTIFICACIÓN

Los organismos del género *Rhodococcus* poseen un gran potencial metabólico, particularmente para degradación de hidrocarburos, sin embargo, cada cepa posee capacidades específicas que la hacen importante para aplicaciones biotecnológicas específicas. Por lo que el estudio de la cepa B7-I, es de gran interés y relevancia.

HIPÓTESIS

Rhodococcus sp. B7-I es capaz de degradar hidrocarburos tanto bajo condiciones aeróbicas y micro-aeróbicas.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la capacidad degradadora de hidrocarburos por el género *Rhodococcus sp.* B7-I.

Particulares

1. Determinar la capacidad de *Rhodococcus sp.* B7-I para degradar aeróbica y micro-aeróbicamente crudo API 40.
2. Determinar la capacidad de *Rhodococcus sp.* B7-I para degradar micro-aeróbicamente hidrocarburos puros alifáticos y aromáticos.
3. Determinar si la cepa *Rhodococcus sp.* B7-I produce alguna actividad surfactante.
4. Obtener consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos a partir de las muestras de sedimentos de donde fue aislada la cepa B7-I y comparar su capacidad degradadora.

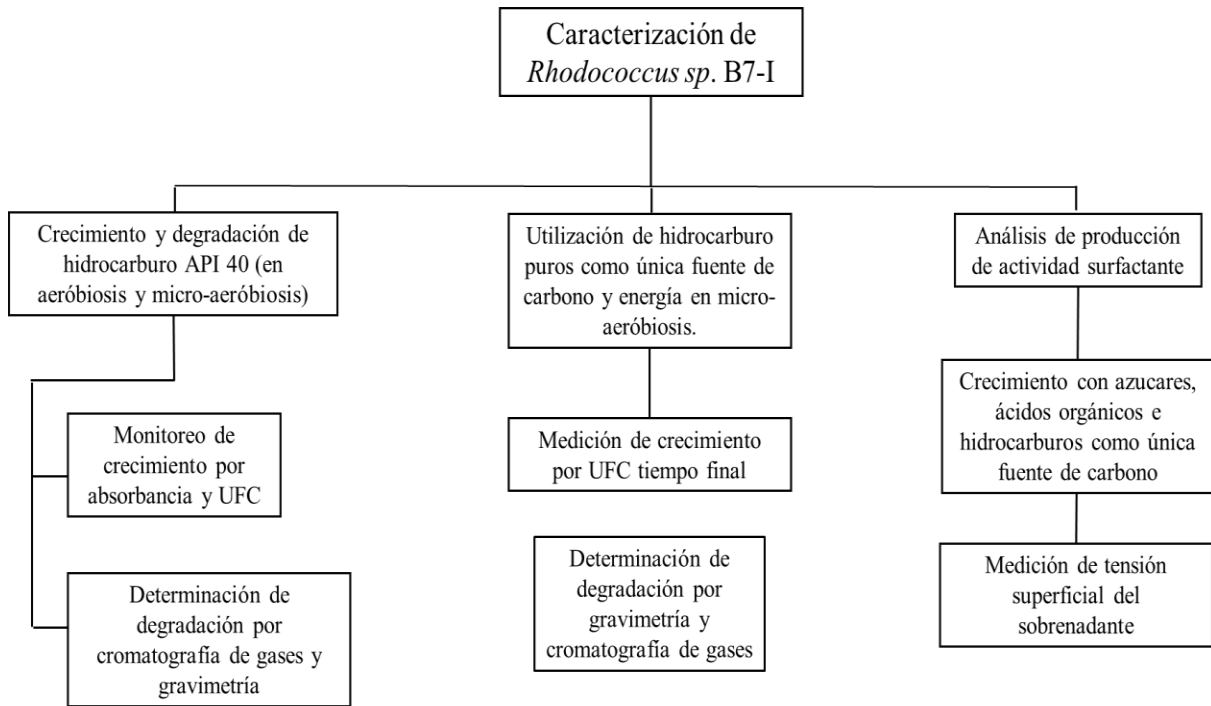


Figura 7. Estrategia metodológica.

METODOLOGÍA

Purificación de la cepa *Rhodococcus sp. B7-I*

La cepa B7-I fue aislada y purificada previamente mediante diluciones seriadas y 5 pases de estriado y posteriormente preservada a -65°C con glicerol al 20%. Para asegurar que se trabaja con un cultivo axénico, se realizaron pases adicionales de purificación y un análisis por microscopía de fluorescencia antes de comenzar con la caracterización de dicho microorganismo, a continuación, se describe el procedimiento.

A partir de un glicerol de la cepa B7-I, se sembró en medio sólido MMSw-acetato y se incubó a 30°C , posteriormente se realizaron diez pases de estriado en medio sólido tomando una colonia aislada en cada pase para realizar el siguiente estriado. Posteriormente, se puso un cultivo líquido en MMSwAc y se incubó a 30°C con agitación toda la noche, finalmente se analizó mediante microscopía de epifluorescencia para determinar su pureza.

Microscopía de epifluorescencia (DAPI)

La fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia, propiedad de algunos elementos químicos denominados fluorocromos (componentes de moléculas que hacen que sean fluorescentes). Este es utilizado como un marcador colorante fluorescente para crear contraste en zonas de interés de la muestra. En este caso fue utilizado DAPI, el cual es un fluorocromo que se une a DNA, cuyo máximo de absorción es a 358 nm (ultravioleta) y de su máximo de emisión es a 461 nm (azul), mediante el siguiente procedimiento:

Centrifugar 200µl de cultivo durante un minuto a 13000 rpm, retirar el sobrenadante y colocar la muestra en hielo, posteriormente agregar 5µl de DAPI e incubar por 5 minutos en hielo, a continuación, lavar la muestra con 1 ml de MMSw. Centrifugar nuevamente y retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no remover la pastilla. Resuspender la pastilla en 100µl de medio MMSw, finalmente colocar 5µl de muestra en un portaobjetos, colocar un cubreobjetos y analizar la muestra en un microscopio de epifluorescencia EVOS FL.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de las bacterias es importante el medio del cultivo, pues este tiene que cumplir con ciertas condiciones como lo son la temperatura, pH, presencia o ausencia de oxígeno, nutrientes necesarios y una buena esterilidad para que los microorganismos no sean contaminados.

La cepa B7-I fue caracterizada inicialmente bajo condiciones aeróbicas para estandarizar condiciones de crecimiento y determinar qué ácidos orgánicos, azúcares e hidrocarburos que es capaz de degradar. En la primera parte se probaron dos medios de cultivo distintos (MMSw y MM) para determinar cuál es el más adecuado para el crecimiento de *Rhodococcus sp.* B7-I

Medio MMSw: contiene 1.49 g/L de NH₄Cl, 0.099 g/L de KCl, 0.599 g/L de NaH₂PO₄, 0.099 g/L de Na₂SO₄, 0.246 g/L de MgSO₄*7H₂O, 21 g/L NaCl, 0.022 g/L de CaCl₂, 6.04 g/L de PIPES, 10 ml de solución DI Vitaminas, 10 ml de DI Minerales y 1 ml de Na₂SeO₄ 1 mM.

DL Vitaminas	g/L
H ₂ O Milli-Q	800 ml
Biotina	.0002 g
Ácido pantoténico	0.005 g
B-12	0.0001 g
Ácido p-aminobenzóico	0.005 g
Ácido tióvtico	0.005 g
Ácido nicotínico	0.005 g
Tiamina	0.005 g
Riboflavina	0.005 g
Clorhidrato de Piridoxina	0.01 g
Ácido Fólico	.002 g

Tabla 4. Componentes de DL Vitaminas.

Compuesto	g/ L
Milli-Q H ₂ O	800 ml
NTA Trisodium Salt (Free acid)	1.5 g
MgSO ₄	3.0 g
MnSO ₄ * H ₂ O	0.5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.1 g
ZnCl ₂	0.13 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.01 g
AlK(SO ₄) ₂ * 12 H ₂ O	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.025 g
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.024 g
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	0.025 g
Completar volumen con agua Milli-Q	1000 ml

Tabla 5. Componentes de solución DL Minerales.

Soluciones para suplementar: acetato 2.5M, lactato 2.5M, glucosa 2M, Glicerol 80%, sacarosa 2M, hidrocarburo API 40, tolueno, hexadecano y asfaltenos.

Hidrocarburos ensayados.

La capacidad degradadora de *Rhodococcus sp.* B7-I fue ensayada con hidrocarburos puros alifáticos y aromáticos, así como con crudo API 40. La gravedad API se refiere a la medida de densidad de cuán pesado o liviano es el petróleo, estos se clasifican en petróleo crudo extra ligero, petróleo crudo ligero, petróleo crudo liviano, petróleo crudo pesado y petróleo crudo extrapesado (Tabla 6).

Tipo de petróleo	Densidad (g/mL)	Grado API
Extrapesado	>1.0	<10
Pesado	0.92 a 1.0	<22
Mediano	0.87 a 0.92	<31
Ligero	0.83 a 0.87	<30
Extra ligero	<0.83	<39

Tabla 6. Clasificación de crudos de acuerdo con su densidad.

Condiciones de oxigenación.

Para obtener condiciones aeróbicas los cultivos fueron incubados a 30°C a 250 rpm por 168 horas, para condiciones micro-aeróbicas *Rhodococcus sp.* B7-I fue cultivado en botellas serológicas cerradas con tapones de teflón e incubados a 30°C sin agitación.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y repetidos cuando la variación fue grande.

Monitoreo de crecimiento

Uno de los métodos de monitoreo de crecimiento bacteriano es mediante la medición de la absorbancia a 600 nm. Para esto se utilizó un espectrofotómetro que mide la cantidad de luz que atraviesa en la suspensión de microorganismos, en comparación con un blanco sin microorganismos, sin embargo, en presencia de hidrocarburos estos pueden tener cierto grado de interferencia. Otro método es mediante la medición de unidades formadoras de colonia (UFC), al combinar ambos métodos se obtuvo una mejor aproximación para caracterizar el crecimiento de la cepa B7-I bajo las distintas condiciones de cultivo.

Para determinar la capacidad de la cepa B7-I de utilizar los diferentes compuestos como fuente de energía y de carbono mediante el conteo de UFC, se realizó el siguiente procedimiento:

Cada 24 horas se realizaron diluciones seriadas de una muestra del cultivo en NaCl 21 g/L, posteriormente se sembró en LB sólido cada dilución, monitoreando el tiempo de crecimiento y contabilizando el número de colonias.

Determinación de la degradación de hidrocarburos

Los ensayos de degradación de crudo extra ligero (API 40) por *Rhodococcus* sp. B7-I se llevaron a cabo en botellas con 50 ml de medio MMSw, adicionado 43 mg de crudo en 50 ml (equivalente a 860 mg/L) o 430 mg de crudo en 50 ml (equivalente a 8600 mg/L) y fueron inoculados con 500 µl de cultivo fresco, mientras que los controles se trataron de la misma manera sin inocular. Las botellas de ensayos y controles fueron incubadas a 30 °C con o sin agitación. Fueron sacrificados a los 7 y 30 días de incubación a 30°C para realizar la extracción y cuantificación de los hidrocarburos.

Degradación de hidrocarburos puros.

Los ensayos de degradación de hidrocarburos puros alifáticos de cadena larga se llevaron a cabo en botellas con 50 ml de medio MMSw, adicionado por separado 0.05 gramos de eicosano, tetracosano y octacosano (para obtener una concentración de 1 g/L), e inoculando con 500 µl de cultivo fresco de *Rhodococcus* sp. B7-I. Las botellas fueron incubadas a 30°C sin agitación por 48 horas. Posteriormente, para cada hidrocarburo, un triplicado fue utilizado para el conteo de UFC y otro triplicado para la extracción y cuantificación gravimétrica de hidrocarburos.

Cuantificación gravimétrica y análisis por GC-FID

Adicionar 10 ml de diclorometano al medio de cultivo, agitar durante 5 min, posteriormente recuperar la fase orgánica mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, concentrar las muestras por destilación en un evaporador rotatorio a 40°C (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2011), eliminar el agua residual de la muestra pasándola a través de una columna de sulfato de sodio y finalmente, pesar la muestra para hacer la determinación gravimétrica de degradación y

analizarla por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama (GC-FID). Para el análisis de las muestras se utilizó un equipo de cromatografía de gases Hewlett Packard HP 5890 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Phenomenex ZB-5, utilizando helio como gas acarreador.

Medición de tensión superficial

Para determinar si *Rhodococcus sp.* B7-I produce biosurfactantes, los cultivos en fase de crecimiento exponencial y en fase estacionaria fueron centrifugados a 4000 g/min, y el sobrenadante fue analizado inmediatamente utilizando un tensiómetro Krüss modelo K20 con placa whilheman.

Enriquecimientos, medios utilizados y criopreservación

Para el enriquecimiento de consorcios bacterianos de sedimento de la estación B7, (donde se obtuvo a *Rhodococcus sp.* B7-1) de la campaña oceanográfica Metagenómica 2 del CIGOM, se utilizaron tres medios de cultivo: MMSw (descrito anteriormente), MARS y MARNP.

El medio MARS contiene agua de mar, 0.19 g/L NH₄Cl, 0.006 g/L K₂HPO₄, 0,012 g/L KH₂PO₄, 10 ml de solución DL Vitaminas y 10 ml DL Minerales

El medio MARNP contiene agua de mar, 0.19 g/L NH₄Cl, 0.006 g/L K₂HPO₄ y 0,012 g/L KH₂PO₄.

Los enriquecimientos se realizaron en 50 ml de cada medio de cultivo con 0.1 % v/v (860 mg/L) de crudo extra ligero API 40 (se esterilizó el crudo antes de usar) inoculando con 0.5 ml de sedimento, y fueron incubados a 30°C. Posteriormente, se realizaron 6 resiembras cada 8 días, obteniendo los consorcios cB7-MMSw, cB7-MARS y cB7-MARNP, a partir de la última resiembra se prepararon 50 alícuotas de cada consorcio, las cuales fueron adicionadas con DMSO (Dimetil sulfoxido) al 10% y criopreservadas a -65°C. A partir de muestras crio-preservadas se realizaron los ensayos de degradación y la extracción y purificación de DNA genómico con el Kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN), para la posterior amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S utilizando los oligonucleótidos S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013). Los amplicones 16S fueron

enviados a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del IBT, UNAM.

Degradación de crudo extra ligero API 40 por consorcios bacterianos cB7-MMSw, cB7-MARS y cB7-MARNP

Para determinar la degradación de crudo API 40, se realizaron ensayos en 50 ml de medio de cultivo correspondiente (MMSw, MARS o MARNP) con API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) en botellas serológicas con tapones de viton, los cuales fueron inoculadas con las alícuotas criopreservadas de los diferentes consorcios. Los ensayos y controles abióticos fueron realizados por triplicado, y se incubaron a 30°C sin agitación. Dichos cultivos fueron sacrificados después de 30 días, los hidrocarburos totales fueron extraídos y analizados por gravimetría y cromatografía de gases.

RESULTADOS

Degradación aeróbica de crudo API 40 por la cepa B7-I

Para determinar la capacidad de *Rhodococcus sp.* B7-I de crecer con crudo extra ligero (API 40) como única fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas, la cepa fue inoculada en 50 ml de medio MMSw crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por triplicado e incubada a 30°C a 250 rpm y su crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600nm.

En la **Figura 8** podemos observar que B7-I es capaz de crecer con crudo extra ligero (API 40) como única fuente de carbono, dicho crecimiento inicia a las 24 horas de incubación. Este crecimiento sugiere que B7-I es capaz de degradar los componentes del crudo y utilizarlos como energía y para generar biomasa.

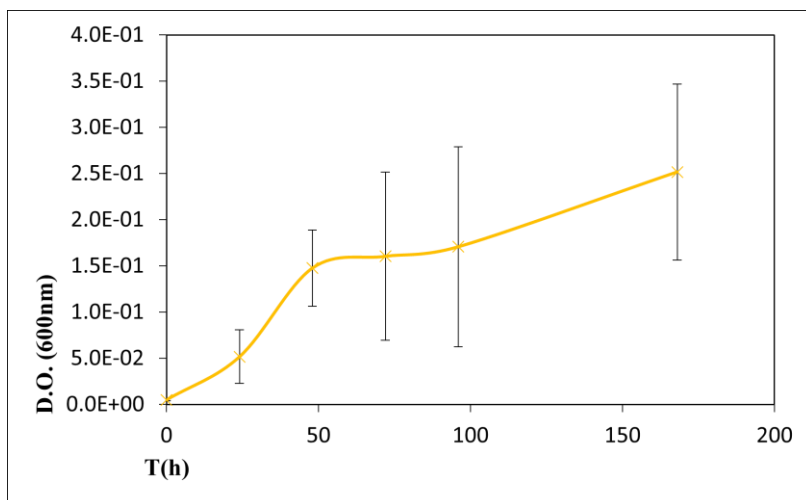


Figura 8. Curva de crecimiento de *Rhodococcus sp.* B7-I en medio MMSw con crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) a 30°C por 250 rpm.

Para comprobar la capacidad de *Rhodococcus sp.* B7-I de degradar crudo extra ligero (API 40) bajo condiciones aeróbicas la cepa fue inoculada en medio MMSw y crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por triplicado, además se estableció un triplicado correspondiente al control abiótico y estos ensayos fueron cosechados a los siete días de incubación a 30°C a 250 rpm, y los hidrocarburos remanentes fueron extraídos y analizados por gravimetría y GC-FID.

En el análisis gravimétrico (**Figura 9**) se determinó una degradación del 29.5 % del crudo a los 7 días, comparando los triplicados inoculados con la cepa B7-I respecto a los controles abióticos. Por otra parte, en el análisis por GC FID (**Figura 10**) se observó que los picos detectados en los controles abióticos (**Figura 10A**) correspondientes a los diferentes hidrocarburos del API 40 que logran volatilizarse a 280°C, sufren una disminución significativa en los ensayos inoculados con la cepa B7-I (**Figura 10B**) comprobando su capacidad para degradar hidrocarburos.

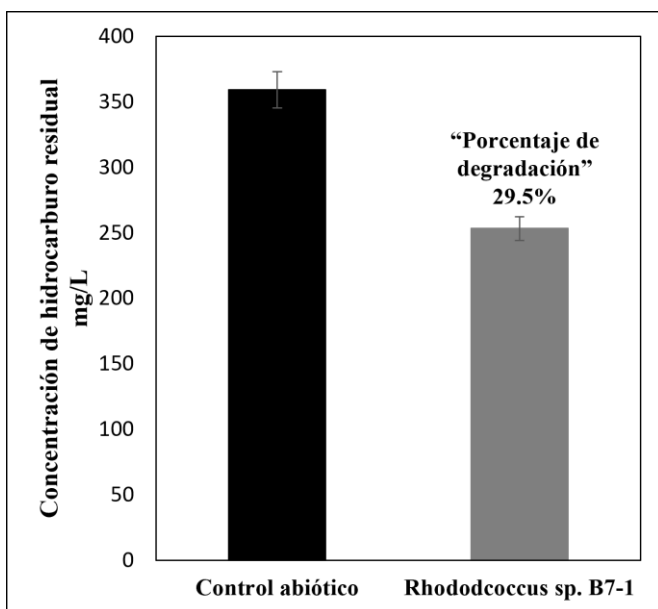


Figura 9. Análisis de degradación por gravimetría de crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones aeróbicas. (Se muestra el porcentaje de degradación del crudo extra ligero que se obtuvo a los siete días de incubación).

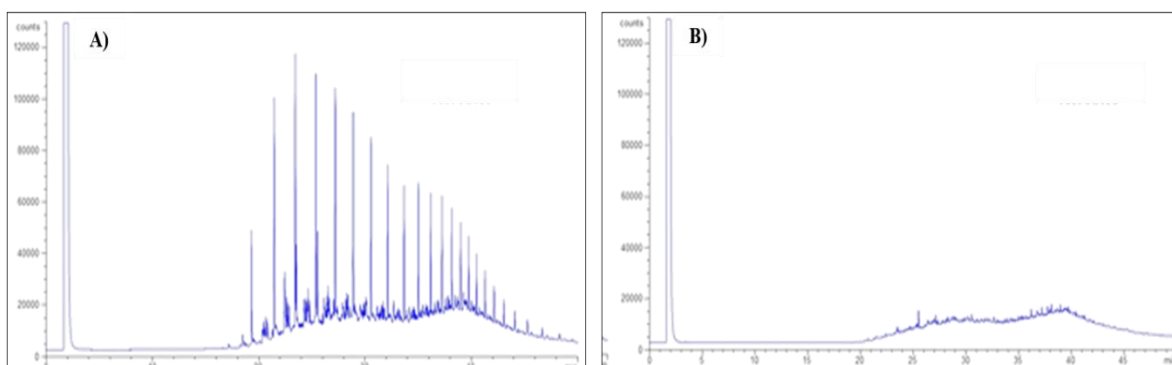


Figura 10. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones aeróbicas. A) Réplica 1 del control abiótico. B) Réplica 1 del ensayo inoculado con *Rhodococcus sp.* B7-I (Se muestra la degradación del crudo extra ligero que se obtuvo a los siete días de incubación).

Degradación micro-aeróbica de crudo API 40 por la cepa B7-I

Para determinar la capacidad de *Rhodococcus sp.* B7-I, para crecer y degradar crudo extra ligero (API 40) como única fuente de carbono y energía bajo condiciones micro-aeróbicas, la cepa B7-I fue inoculada en 50 ml MMSw con API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) en botellas serológicas con tapón de teflón, y se incubó a 30°C sin agitación por siete días. El ensayo se realizó por triplicado en el cual se destinó un triplicado para monitorear crecimiento, otro para determinar degradación a los siete días de incubación y el último correspondiente al control abiótico.

El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm y de manera adicional por unidades formadoras de colonia (UFC), esto debido a que en el ensayo de crecimiento aeróbico se observó una desviación estándar de los datos grande. Para determinar las UFC se realizaron diluciones seriadas que posteriormente fueron sembradas en placas LB sólido (incubada a 30 ° C).

En la **Figura 11** se observa que la cepa B7-I es capaz de crecer bajo condiciones micro-aeróbicas utilizando crudo API 40 como única fuente de carbono, sin embargo, podemos observar que con el análisis de UFC el inicio del crecimiento se puede observar entre las 24 y 48 horas (**Figura 8B**), mientras que con densidad óptica se pudo detectar entre las 48 y 72 horas (**Figura 8A**) comprobando que el análisis por UFC es más sensible y por lo tanto más adecuado para monitorear crecimiento en presencia de hidrocarburos.

El análisis de degradación micro-aeróbica por gravimetría arrojó un porcentaje de degradación del 51.9% a los 7 días de incubación (**Figura 12**). Por otra parte, en la **Figura 13**, se muestra el resultado del análisis por GC FID, en el cual se observa que los picos detectados en el control (**Figura 13A**) desaparecen casi en su totalidad en el ensayo inoculado con *Rhodococcus sp.* B7-I (**Figura 13B**).

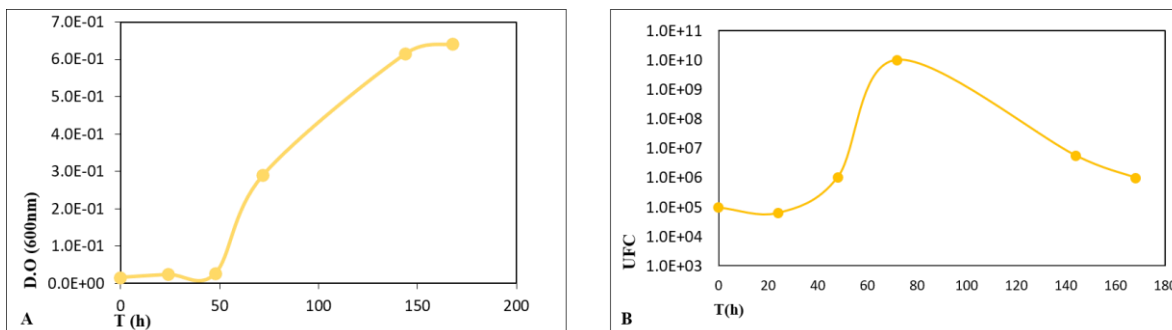


Figura 11. Curva de crecimiento de *Rhodococcus sp.* B7-I en medio MMSw con crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) a 30°C. A) monitoreo por D.O., B) monitoreo por UFC.

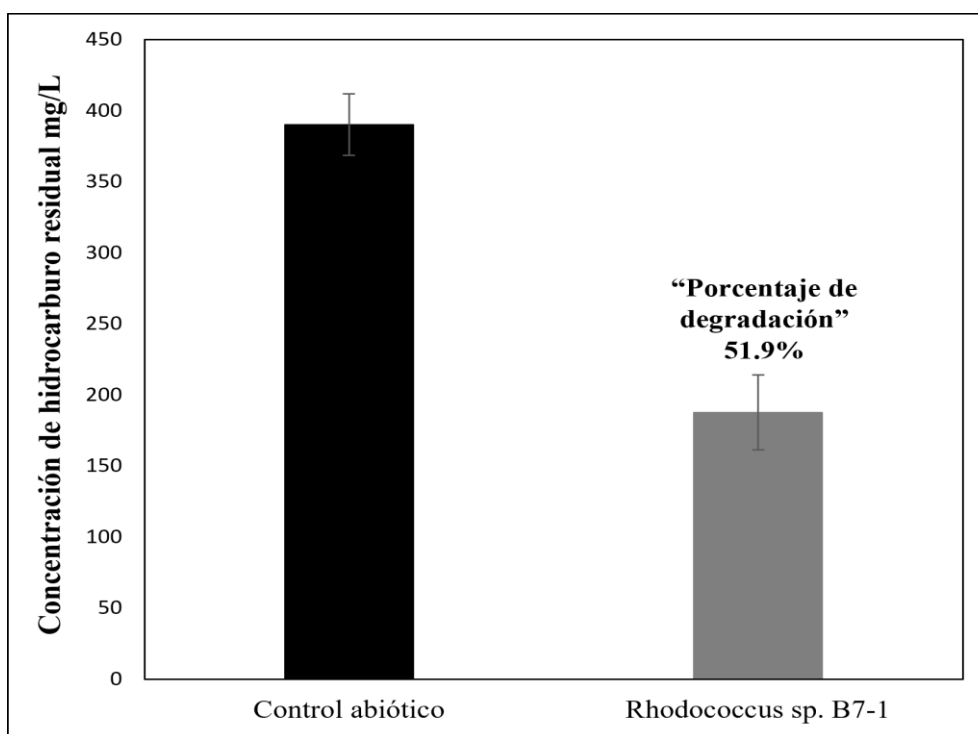


Figura 12. Análisis de degradación por gravimetría de crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones micro-aeróbicas. (Se muestra el porcentaje que se obtuvo de degradación del crudo extra ligero a los siete días de incubación).

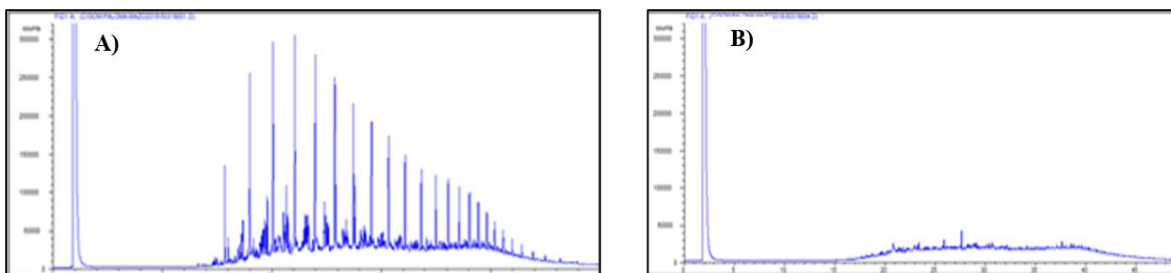


Figura 13. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones micro-aeróbicas. A) Réplica 1 del control abiótico. B) Réplica 1 del ensayo inoculado con *Rhodococcus sp.* B7-I.

Al comparar los ensayos que se realizaron en condiciones aeróbicas y micro-aeróbicas, los resultados sugieren que la degradación de crudo API 40 por *Rhodococcus sp.* B7-I es favorecida en las condiciones micro-aeróbicas utilizadas. Sin embargo, si comparamos los controles abióticos de ambos ensayos (**Figura 10A** y **Figura 13A**) podemos observar diferencias, que se deben a los cambios que va sufriendo el lote del crudo API 40, por ello para comprobar que la degradación de crudo extra ligero (API 40) por *Rhodococcus sp.* B7-I es mejor bajo condiciones micro-aeróbicas, se corrió un ensayo al mismo tiempo de ambas condiciones de oxigenación. Para que las diferencias fueran más claras se decidió incrementar diez veces la concentración del crudo extra ligero API 40 1% v/v (8600 mg/L) y cosechar el ensayo después de un mes de incubación a 30°C. Para cada ensayo se establecieron sus controles abióticos por triplicado.

El análisis gravimétrico (**Figura 14**) nos arrojó un porcentaje de degradación del 34.6 % en el ensayo aeróbico y del 60.4% en el ensayo micro-aeróbico. Por otra parte, el análisis por GC-FID (**Figura 15**) muestra una mayor degradación bajo condiciones micro-aeróbicas, pues se observa una mayor disminución de los picos respecto a la condición aeróbica. De esta manera se pudo comprobar que las condiciones micro-aeróbicas utilizadas favorecen la degradación de crudo extra ligero (API 40) por *Rhodococcus sp.* B7-I respecto a las condiciones aeróbicas.

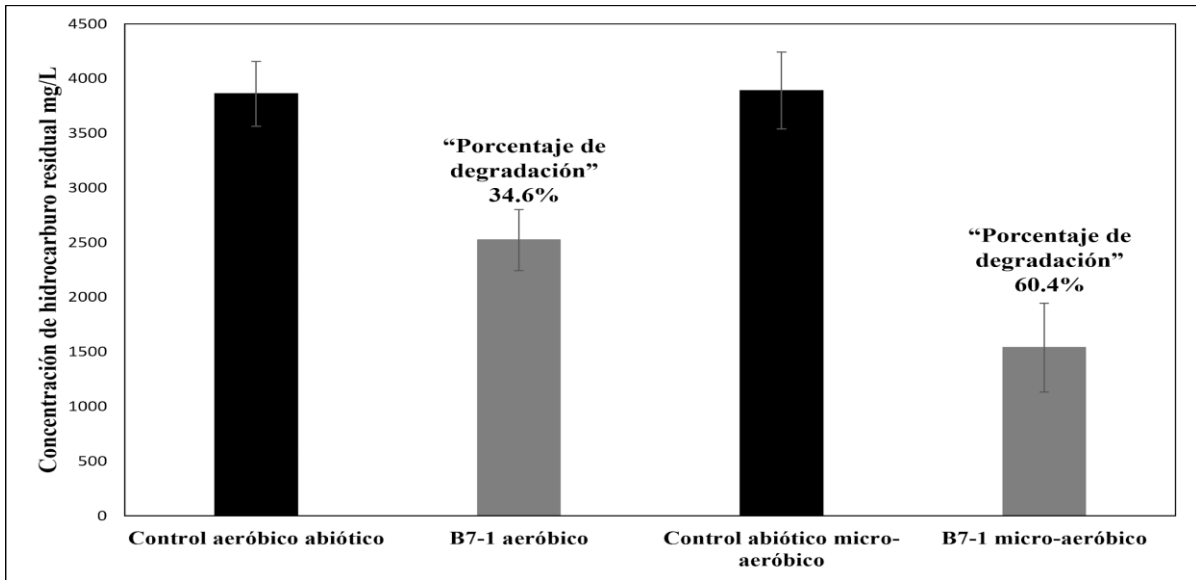


Figura 14. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición aeróbica & micro-aeróbica de crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I. (Se muestra el porcentaje que se obtuvo de degradación del crudo extra ligero al mes de incubación).

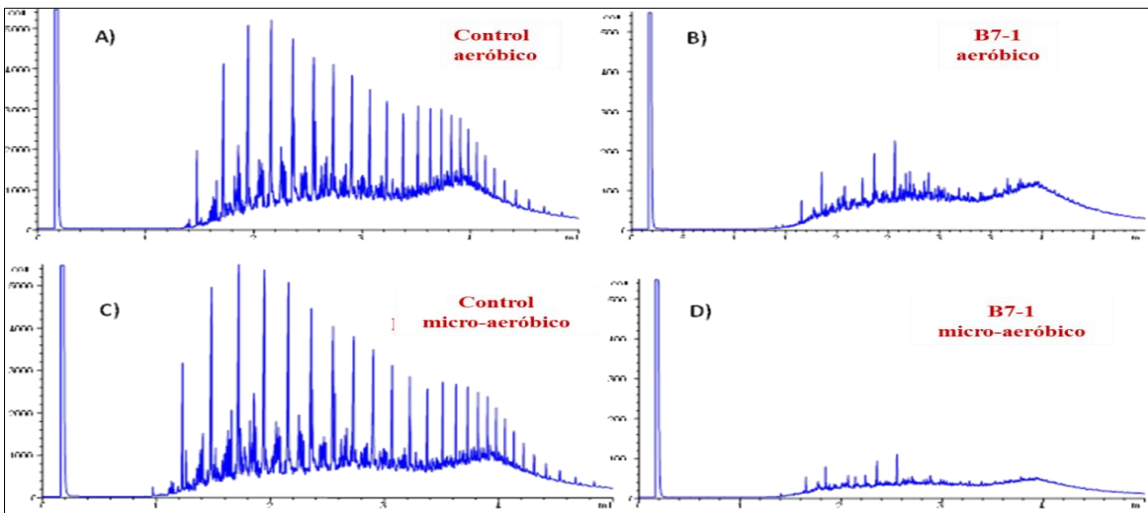


Figura 15. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones aeróbicas & micro-aeróbicas. A) Réplica 1 del control abiótico aeróbico. B) Réplica 1 del ensayo inoculado con *R. sp.* B7-I aeróbico. C) Réplica 1 del control abiótico micro-aeróbico D) Réplica 1 del ensayo inoculado con *R. sp.* B7-I micro-aeróbico

Degradación de hidrocarburos puros

Para determinar el crecimiento y degradación de *Rhodococcus sp.* B7-I con hidrocarburos puros (alifáticos y aromáticos) como única fuente de carbono y energía, se realizó un ensayo de crecimiento en el cual se seleccionaron seis hidrocarburos alifáticos y siete hidrocarburos aromáticos (**Tabla 8**), posteriormente se creció en MMSw con cada uno de los hidrocarburos puros (por separado) y se inoculó con B7-I, los cuales fueron incubados a 30°C a 250 rpm (condiciones aeróbicas), esto con la finalidad de saber cuáles eran los hidrocarburos alifáticos y aromáticos que utilizaba *Rhodococcus sp.* B7-I como única fuente de carbono y energía para su crecimiento.

En la Tabla 8 inciso A, se muestra que la cepa B7-I es capaz de crecer con todos los hidrocarburos alifáticos utilizados, con excepción de decano, la ausencia de crecimiento con ese hidrocarburo puede deberse a su alta volatilidad. Por otra parte, en la Tabla 8 inciso B, podemos observar que la cepa B7-I es incapaz de crecer con los hidrocarburos aromáticos ensayados como única fuente de carbono y energía, para determinar si la ausencia de crecimiento se debía a una baja resistencia a la toxicidad de estos hidrocarburos por la cepa B7-I, se optó por agregarles hexadecano. Como se indica en la tabla 8 la cepa B7-I fue capaz de crecer en presencia de hexadecano en los hidrocarburos aromáticos utilizados (con excepción del ácido benzoico), indicando que es capaz de tolerar las concentraciones utilizadas, pero no de utilizar los hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono, por lo que en proyectos posteriores será necesario determinar si la cepa B7-I es capaz de degradarlos en presencia de una fuente de carbono alternativa.

A) Alifáticos	Creció	No creció
Decano		-
Undecano	+	
Dodecano	+	
Hexadecano	+	
Octadecano	+	
Octacosano	+	

B) Aromáticos	Solo Aromático	Aromático c/hexadecano
Benceno	-	+
Naftaleno	-	+
Antraceno	-	+
Fenantreno	-	+
Acenafteno	-	+
Tolueno	-	+
Ácido benzoico	-	-

Tabla 7. Crecimiento de *Rhodococcus sp.* B7-I, en presencia de diferentes hidrocarburos puros como única fuente de carbono A) Hidrocarburos alifáticos. B) Hidrocarburos aromáticos.

Para comprobar la degradación por *Rhodococcus sp.* B7-I de hidrocarburos alifáticos de cadena corta se realizaron ensayos de crecimiento y degradación aeróbica. Se hizo una mezcla con los hidrocarburos alifáticos de cadena corta los cuales fueron: undecano, dodecano y hexadecano, posteriormente se inoculó a B7-I en MMSw con 0.1% v/v (860 mg/L) de la mezcla y se incubó a 30°C a 250 rpm por siete días. El ensayo se realizó por triplicado donde se destinó un triplicado para monitorear crecimiento, otro para determinar degradación y el último correspondiente al control abiótico.

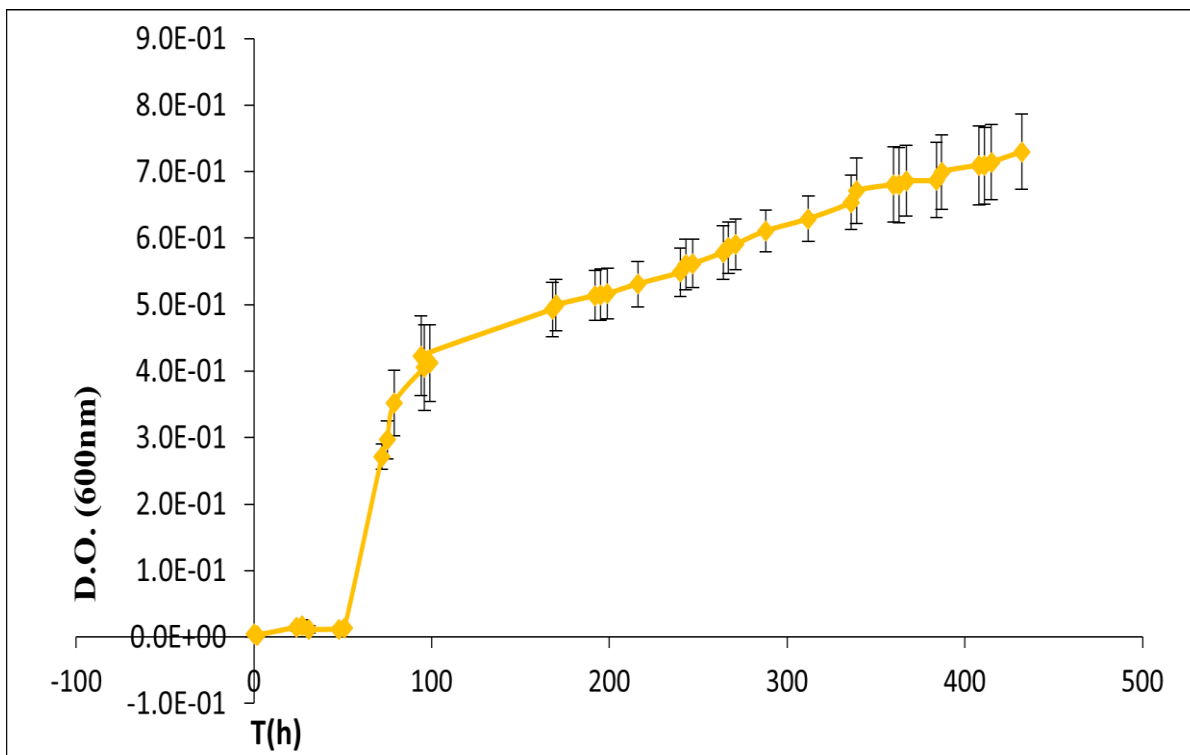


Figura 16. Se muestra el crecimiento de B7-I con undecano, dodecano y hexadecano de cadena corta como única fuente de carbono y energía.

Para la degradación de estos hidrocarburos, el triplicado de los ensayos inoculados, así como el de los controles abióticos fueron cosechados después de los siete días de incubación y se realizó el análisis de degradación por gravimetría y GC-FID.

En el análisis gravimétrico (**Figura 17**) nos muestra un porcentaje de degradación del 85.18%. Por otra parte, el análisis por GC- FID muestra que el undecano y el dodecano se pierden en el control (**Figura 18A**), (debido a su volatilidad) y solo fue posible comprobar la degradación del hexadecano, cuyo pico disminuyó drásticamente en los ensayos (**Figura 18B**).

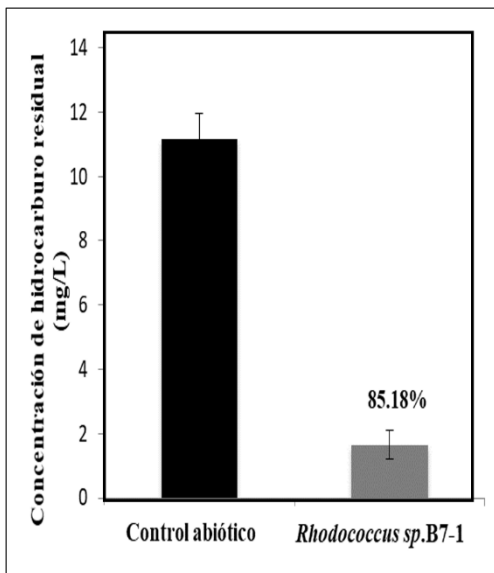


Figura 17. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición aeróbica de hidrocarburos alifáticos de cadena corta (undecano, dodecano, hexadecano) al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I. (Se muestra el porcentaje que se obtuvo de degradación de hidrocarburos alifáticos de cadena corta a los siete días de incubación).

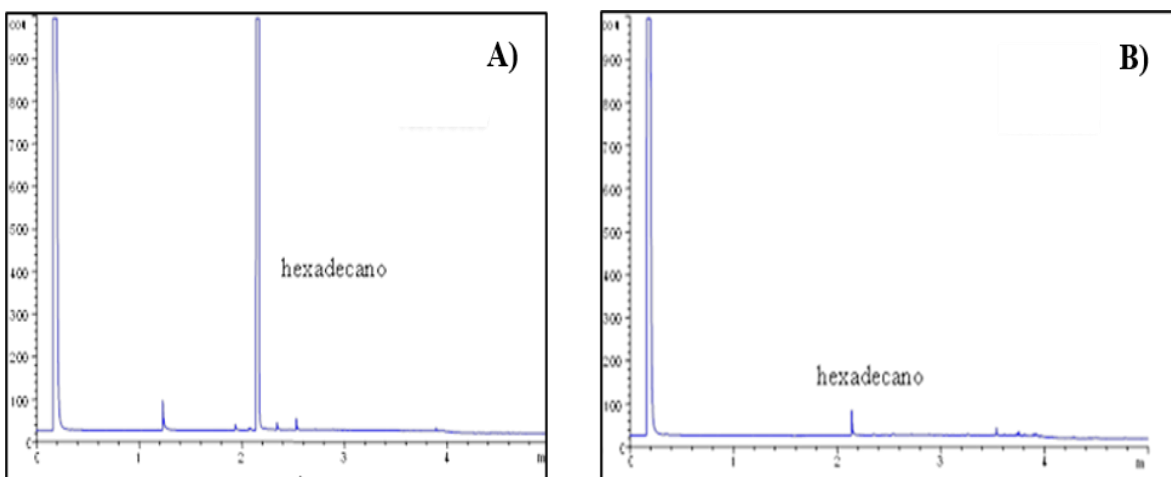


Figura 18. Análisis de degradación por GC-FID de hidrocarburos alifáticos de cadena corta al 0.1% v/v (860 mg/L) por *Rhodococcus sp.* B7-I bajo condiciones aeróbicas. A) Réplica 1 del control abiótico. B) Réplica 1 del ensayo inoculado con *Rhodococcus sp.* B7-I.

Posteriormente, se optó por evaluar la degradación de hidrocarburos alifáticos puros por separado, de modo que esta se pudiera determinar por gravimetría, además se seleccionó la condición de micro-aeróbiosis dado a los resultados observados con el crudo API 40. Se analizó la degradación de octacosano, tetracosano, eicosano 1 g/L por separado, en medio de cultivo MMSw, después de 96 horas de incubación a 30°C sin agitación. Para cada hidrocarburo los ensayos y controles fueron realizados por triplicado.

La figura 19 nos muestra los resultados del análisis gravimétrico del ensayo de degradación de hidrocarburos alifáticos puros por *Rhodococcus sp.* B7-I. Después de 96 horas de incubación se obtuvo una degradación de 7.7%, 4.4% y 25.81% para octacosano, tetracosano y eicosano respectivamente, demostrando que *Rhodococcus sp.* B7-I tiene la capacidad de degradar alcanos de cadena larga como lo sugería el ensayo de crecimiento con hidrocarburos puros como única fuente de carbono, pero con una tasa de degradación diferente para cada uno.

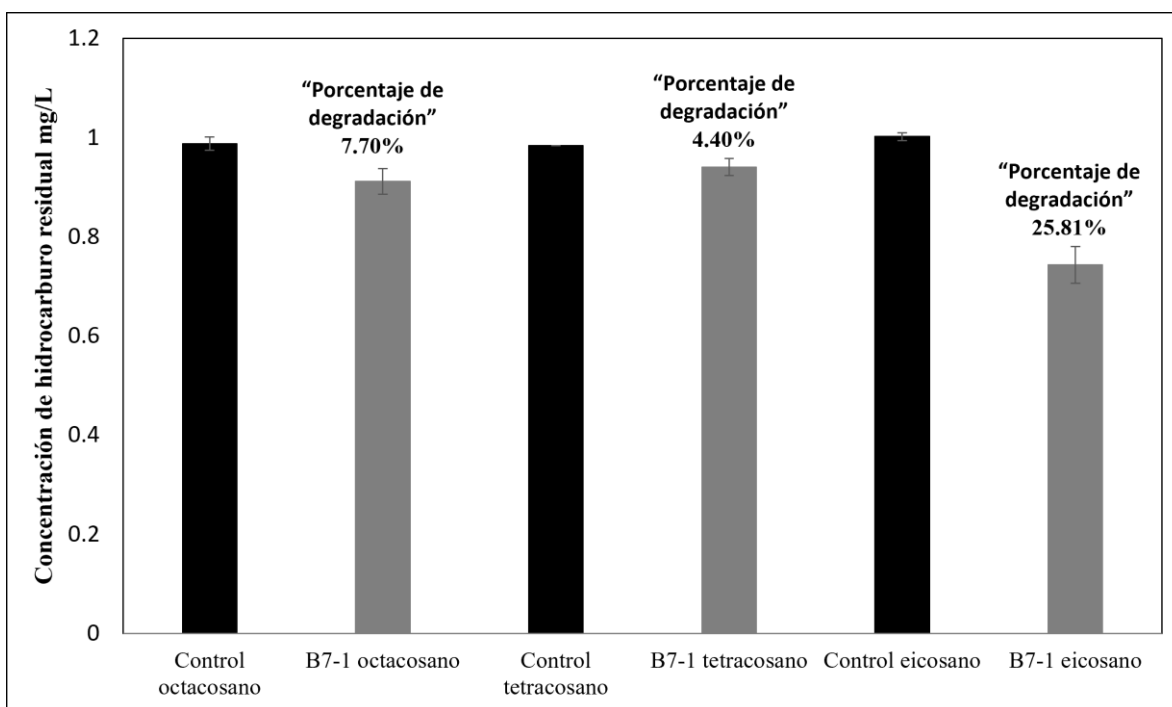


Figura 19. Análisis de degradación por gravimetría bajo condición micro-aeróbica de hidrocarburos alifáticos (C28, C24 y C20) por *Rhodococcus sp.* B7-I. (Se muestra el porcentaje que se obtuvo de degradación de hidrocarburos alifáticos después de las 96 horas de incubación).

Detección de actividad surfactante por *Rhodococcus sp.* B7-I

La producción de surfactantes por la cepa B7-I fue ensayada en presencia de diferentes fuentes de carbono incluyendo azúcares, ácidos orgánicos, hidrocarburos puros y crudo API 40.

Rhodococcus sp. B7-I fue inoculado en medio MMSw con glicerol, acetato, lactato, sacarosa, citrato y casaminoácidos, se incubó a 30°C a 250 rpm. Posteriormente, a las 48 horas se midió su crecimiento por D.O. a 600 nm para después centrifugar los cultivos y medir la tensión superficial de cada uno de los sobrenadantes.

En la **Figura 20** se muestra que B7-I es capaz de crecer con los diferentes azúcares y ácidos orgánicos como única fuente de carbono, pero no se detectó actividad surfactante (**Figura 21**).

En el ensayo con hidrocarburos puros, *Rhodococcus sp.* B7-I fue inoculado en MMSw con los hidrocarburos alifáticos (undecano, hexadecano, octadecano, octacosano) y crudo API 40, se incubó a 30°C a 250 rpm, y se cosechó a las 72 horas para analizar su crecimiento por D.O. a 600 nm, posteriormente los cultivos fueron centrifugados para después medir la tensión superficial de cada uno de los sobrenadantes.

Como se muestra en la **Figura 22**, B7-I puede crecer con hidrocarburos alifáticos y crudo API 40 como única fuente de carbono, pero tampoco se detectó actividad surfactante con ninguno de estos compuestos (**Figura 23**).

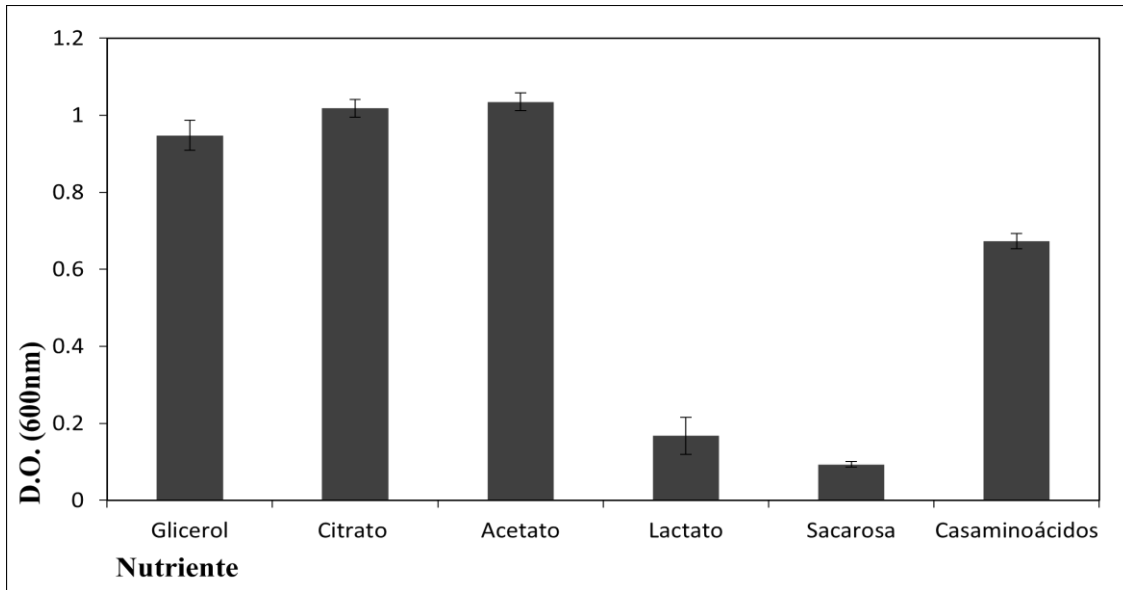


Figura 20. Crecimiento de *Rhodococcus sp.* B7-I con diferentes azúcares y ácidos orgánicos como única fuente de carbono.

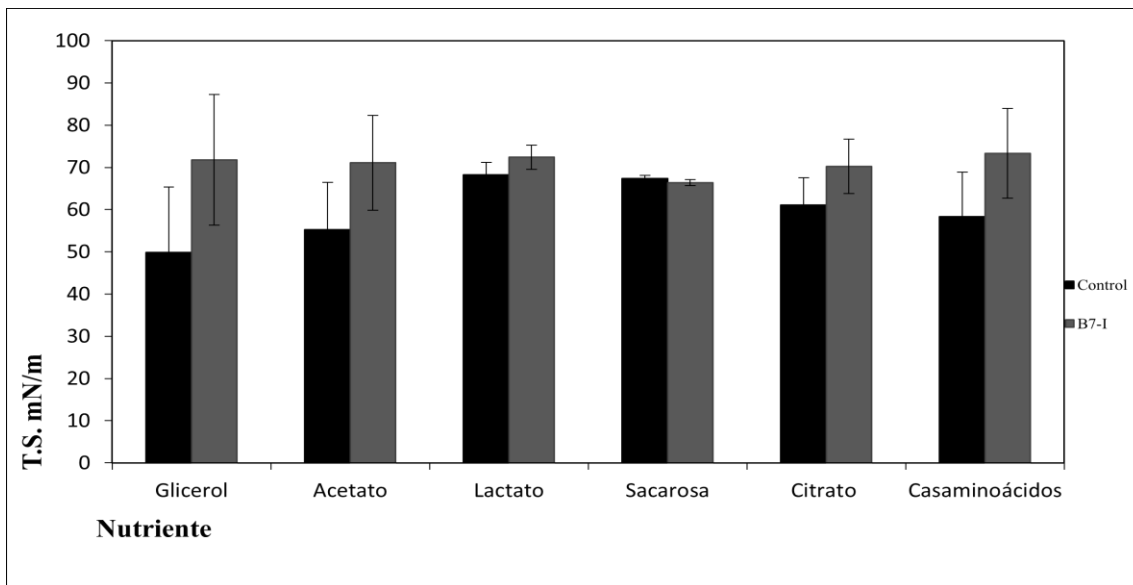


Figura 21. Producción de actividad surfactante por *Rhodococcus sp.* B7-I con diferentes fuentes de carbono.

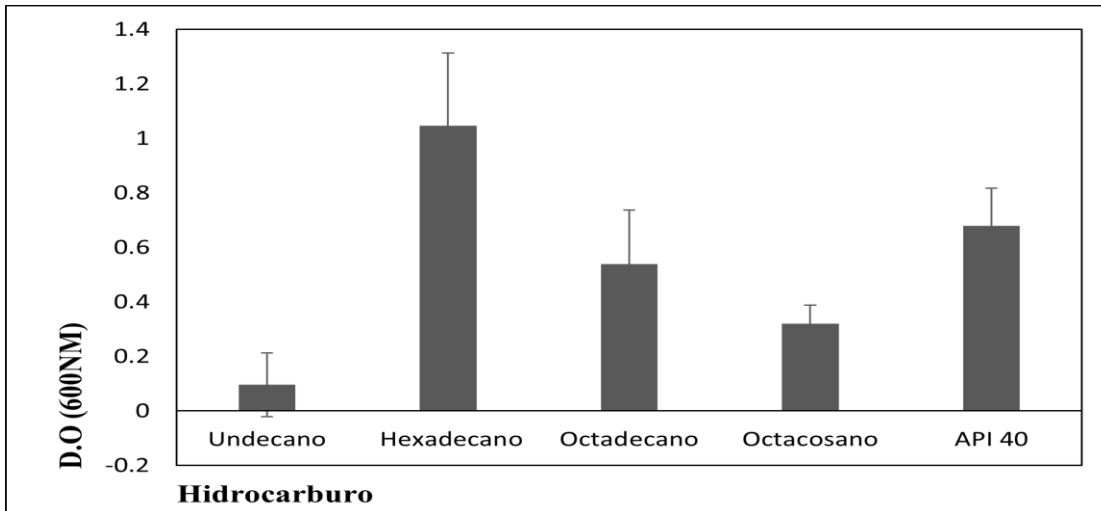


Figura 22. Crecimiento de *Rhodococcus* sp. B7-I con diferentes hidrocarburos alifáticos y API 40 como única fuente de carbono.

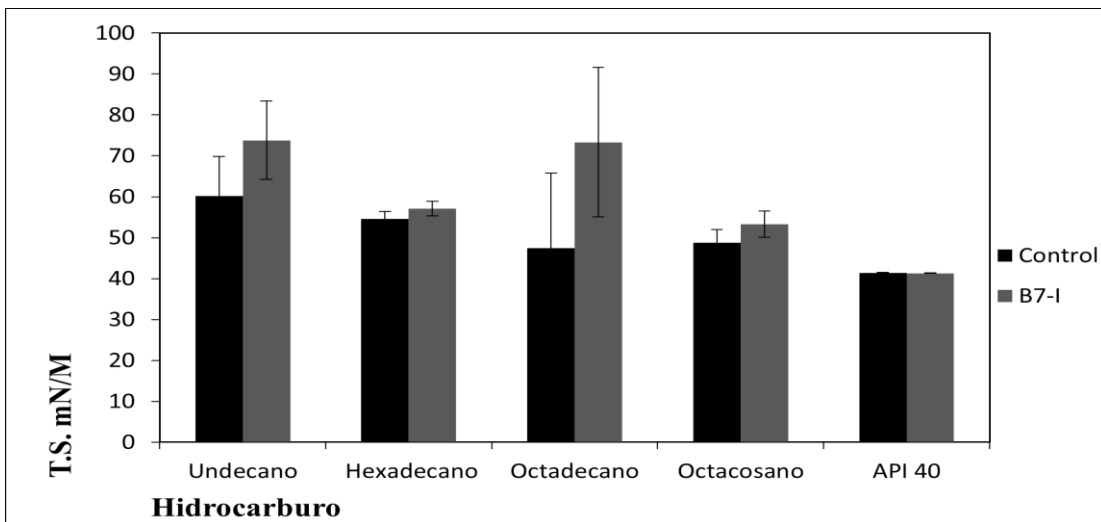


Figura 23. Producción de surfactante de *Rhodococcus* sp. B7-I con diferentes hidrocarburos alifáticos y API 40.

CONSORCIOS BACTERIANOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS OBTENIDOS A PARTIR DE SEDIMENTOS DE LA ESTACIÓN B7 DEL GOLFO DE MÉXICO

La cepa *Rhodococcus sp.* B7-I fue aislada de una muestra de sedimento marino de la estación B7, para su aislamiento no se realizaron enriquecimientos previos sugiriendo que este microorganismo podría ser abundante en dicho sedimento, para determinarlo, se purificó el DNA metagenómico de una muestra de dicho sedimento y posteriormente se realizó la síntesis y secuenciación de amplicones de la región V3-V4 gen rRNA 16S.

Por otra parte, con el objetivo de determinar si es posible cultivar otros microorganismos degradadores de hidrocarburos, además de la cepa B7-I, a partir del mismo sedimento (Estación B7, Campaña Metagenómica 2), se realizaron enriquecimientos empleando crudo API 40 como única fuente de carbono en tres diferentes medios de cultivo 1) MMSw, MARS (Agua de mar suplementada con vitaminas, minerales, nitrógeno y fósforo) y MARNP (Agua de mar suplementada solo con nitrógeno y fósforo) como se describe en la sección de materiales y métodos.

En los tres medios de cultivo se logró cultivar microorganismos con crudo como única fuente de carbono, incluso en el medio MARNP con el crudo como única fuente de carbono, indicando la presencia de microorganismos hidrocarbonoclastas en los tres diferentes enriquecimientos. Se realizaron varios intentos de obtener enriquecimientos con agua de mar sin suplementar en presencia de crudo API 40, sin embargo, nunca se detectó crecimiento, indicando que la adición de nitrógeno y fósforo al agua de mar empleada es necesaria. Para determinar la composición de la comunidad microbiana de cada uno de los tres consorcios, se realizó la purificación de DNA y posteriormente se realizó la síntesis y secuenciación por illumina de amplicones de la región V3-V4 gen rRNA 16S.

Los datos obtenidos de secuenciación por illumina fueron filtrados, ensamblados y finalmente se realizó su asignación taxonómica como se describe en materiales y métodos (Lara P.).

La composición de la comunidad microbiana del sedimento B7 y de los consorcios B7_MMSw, B7_MARS y B7_MARNP fue analizada a diferentes niveles taxonómicos. En la figura 24, se muestra la abundancia relativa a nivel de clase de las 4 diferentes muestras y en las figuras 25, 26 y 27 se muestra la abundancia relativa a nivel de género, estas últimas fueron separadas para una mejor representación ya que a este nivel se encontraron diferencias muy importantes.

En la muestra del sedimento B7 la clase más abundante fue *Gammaproteobacteria*, seguida por *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidia* y *Deltaproteobacteria* (figura 24). En los consorcios B7_MARS y B7_MARNP la clase *Gammaproteobacteria* fue la más abundante, pero también se encontraron organismos de las familias *alphaproteobacteria* y *Bacteroidia* en abundancias relativamente altas, mientras que en el consorcio B7_MMSw se encontró conformado por *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* en un 76% y 24% respectivamente (figura 24).

De las secuencias que lograron asignarse a nivel de género, en el sedimento B7, C1-B045 (perteneciente a *Gammaproteobacterias*) fue el más abundante, representando menos del 10% (Figura 25). También se encontraron relativamente abundantes los géneros *Colwellia*, *Porticoccus*, *Woeseia*, sin embargo, en esta muestra, el 60% de las secuencias corresponden a géneros con menos del 1% de abundancia y en algunos casos, secuencias que no lograron asignarse a nivel de género (Figura 25).

En el consorcio B7_MMSw los géneros *Rhodococcus* (*Actinobacteria*) y *Aurantimonas* (*Aurantimonas*) fueron los más abundantes representando un 76% y 22% respectivamente (Figura 26).

En los consorcios B7_MARS y B7_MARNP se encontró una población muy similar entre ellos, constituida principalmente por los géneros *Alcanivorax* y *Marinobacter* (*Gammaproteobacterias*) con una abundancia relativa del 78% y 10%, respectivamente. En estos consorcios también se encontraron los géneros *Sneathiella* (*Alphaproteobacteria*), *Muricauda* (*Bacteroidia*) e *Idiomarina* (*Gammaproteobacteria*) en abundancias mayores al 1% (Figura 27).

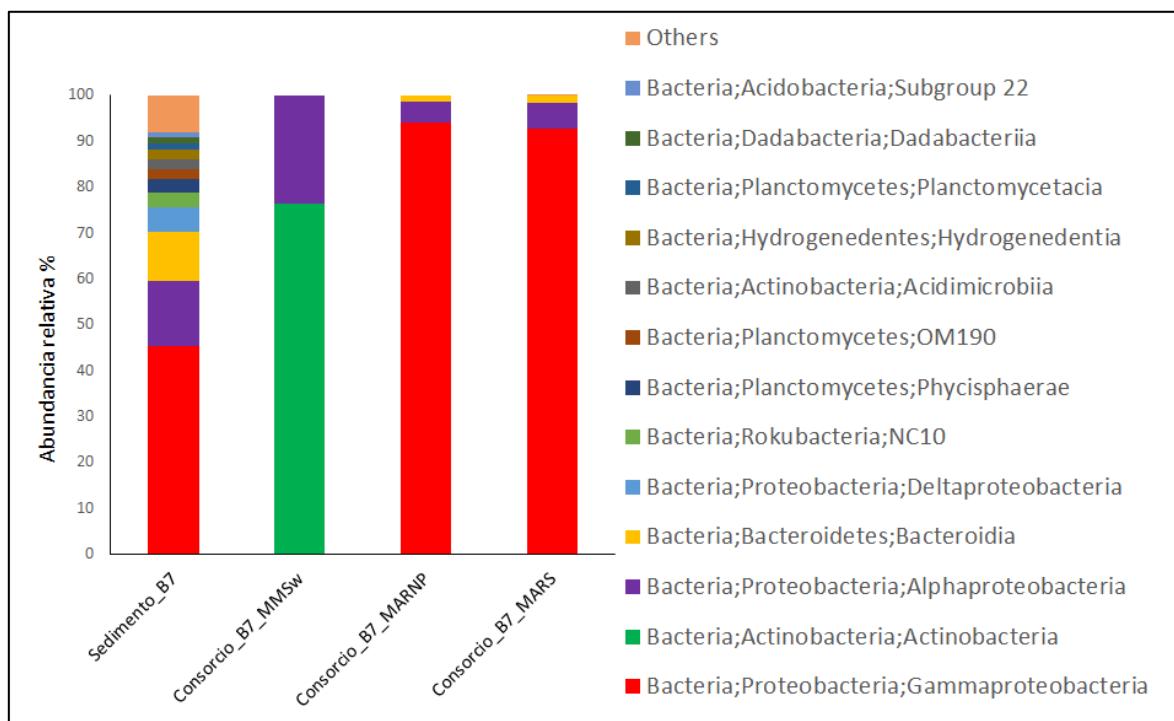


Figura 24. Abundancia relativa de las clases que componen la microbiota del sedimento B7 y tres consorcios establecidos a partir de éste en diferentes medios de cultivo (MMSw, MARNP Y MARS).

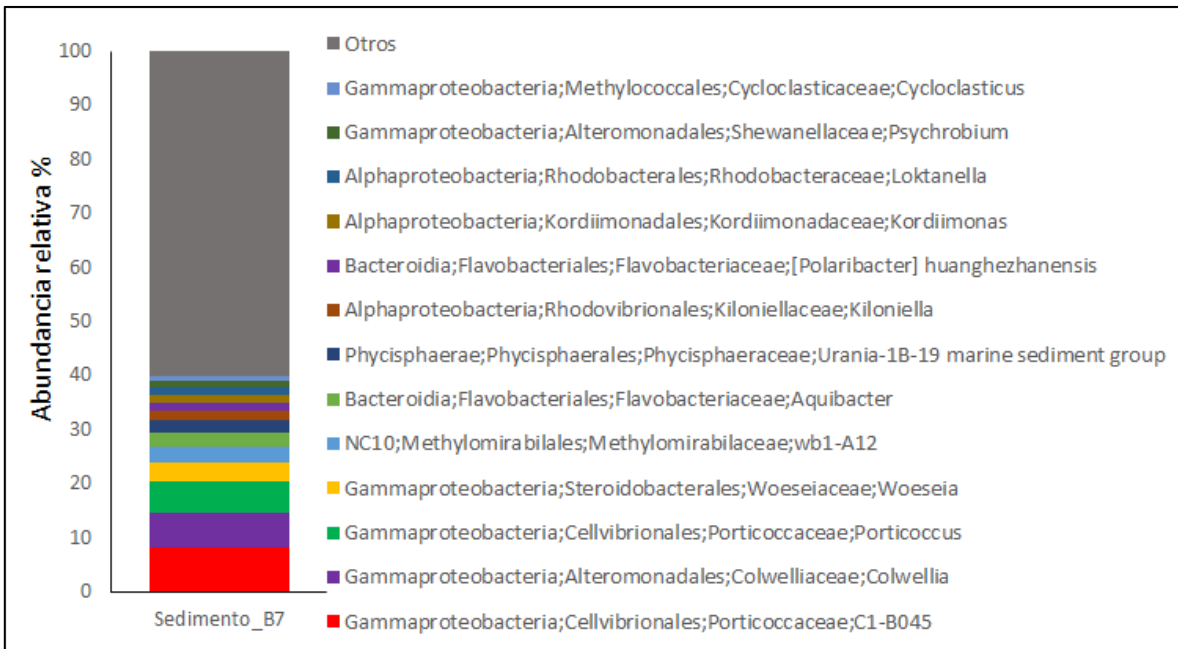


Figura 25. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en el sedimento B7.

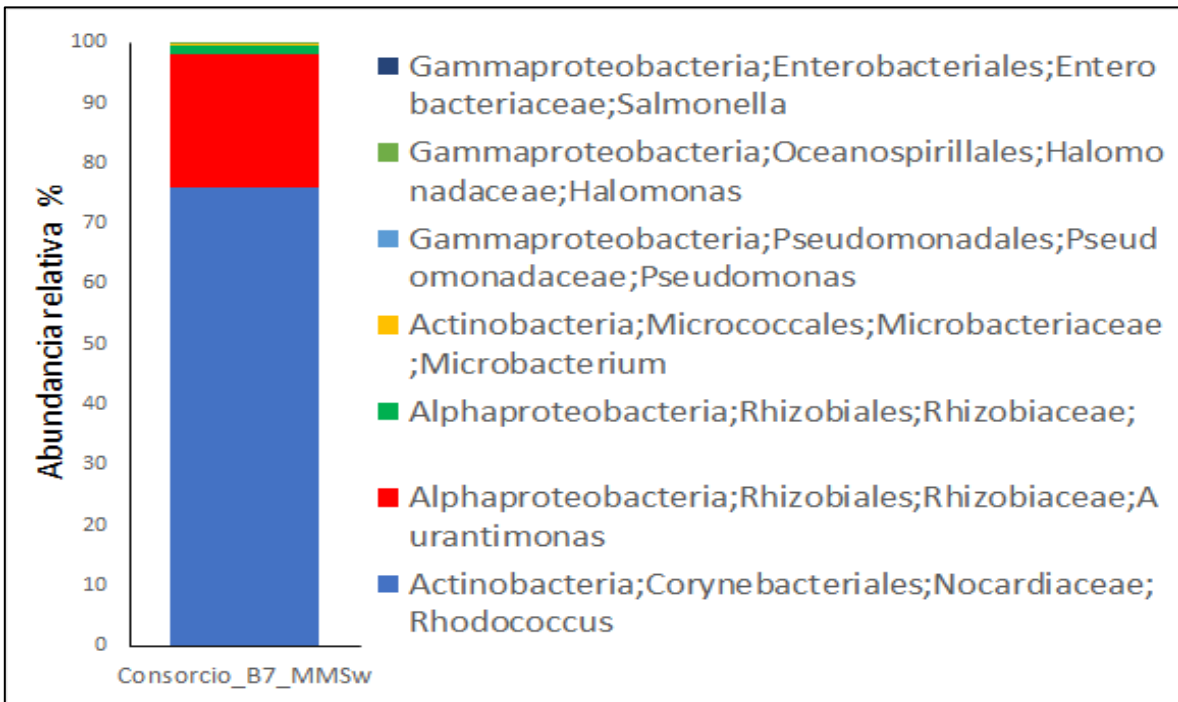


Figura 26. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en el consorcio B7 MMSw.

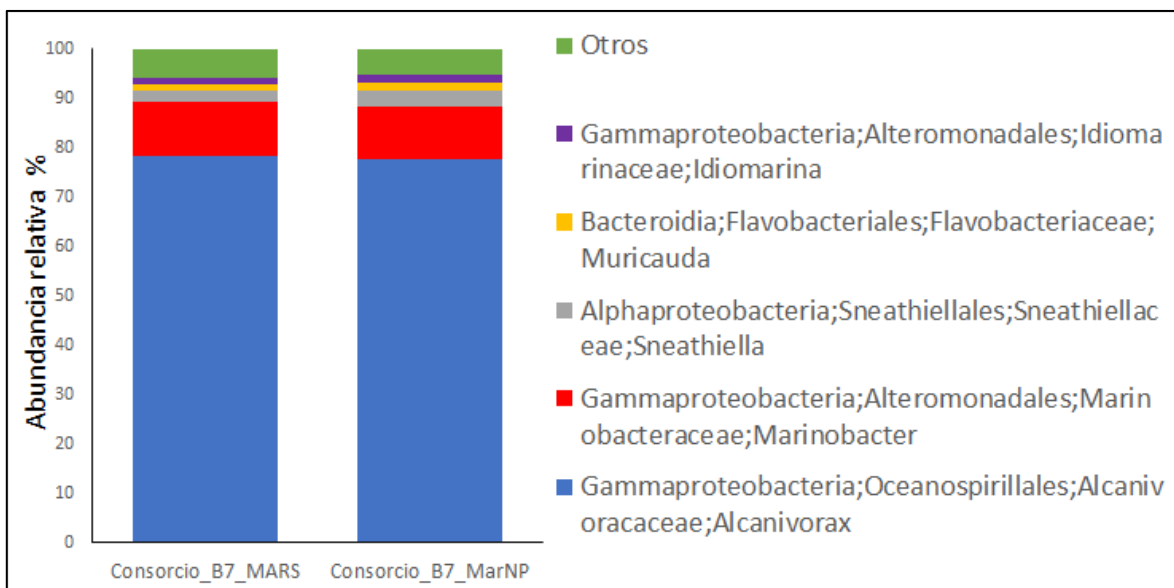


Figura 27. Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos que componen la microbiota en los consorcios B7 MARS y MARNP.

Degradación de crudo API 40 por los consorcios bacterianos

Para evaluar la capacidad de degradación de crudo extra ligero (API 40) por los consorcios cB7-MMSw, cB7-MARS y cB7-MARNP, se realizaron ensayos por triplicado en el medio de cultivo correspondiente, adicionando crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) e inoculando cada ensayo con la alícuota criopreservada de consorcio correspondiente. Los cultivos fueron incubados a 30°C sin agitación durante 30 días. Para cada medio de cultivo se realizó su control abiótico por triplicado.

De acuerdo con el análisis gravimétrico, se encontró un porcentaje de degradación del 21.8%, 6% y 4.6% por los consorcios cB7-MMSw, cB7-MARS y cB7-MARNP respectivamente (Figura 28). Posteriormente, en el análisis cromatográfico, únicamente se detectó degradación en el ensayo con el consorcio cB7-MMSw (Figura 29), mientras que los otros mostraron un perfil de hidrocarburos básicamente idéntico a sus controles (Figuras 30 y 31). Estos resultados indican que sí fue posible establecer consorcios de microorganismos capaces de crecer con crudo API 40 con requerimientos nutricionales mínimos (MARNP: agua de mar, amonio y fosfato) sin embargo, bajo esas condiciones su actividad degradadora fue escasa. Dado que no hubo diferencias importantes entre la degradación por cB7-MARS (agua

de mar, vitaminas, minerales, amonio y fosfato) y cB7-MARNP, se puede concluir que la presencia de vitaminas y minerales no mejoró la actividad degradadora.

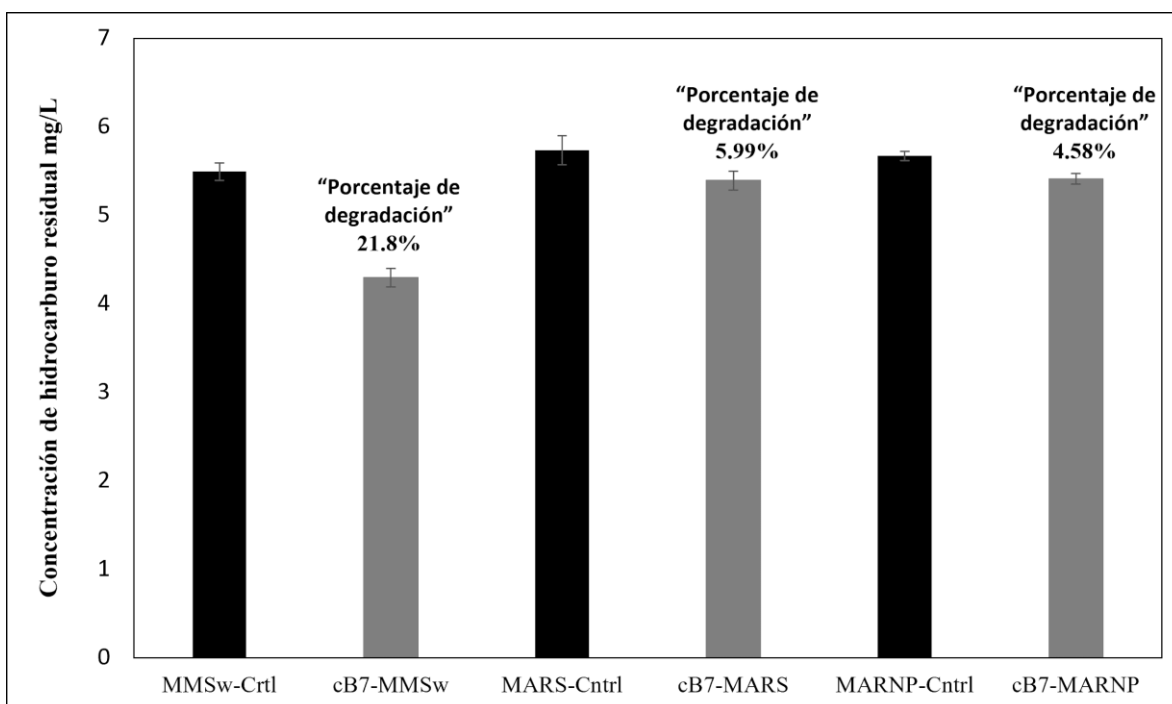


Figura 28. Análisis de degradación por gravimetría en tres diferentes medios de cultivo con crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L), por los consorcios bacterianos obtenidos a partir de una muestra de sedimento de la estación B7 (Metagenómica 2) (se muestra el porcentaje de degradación que se obtuvo después de 30 días de incubación).

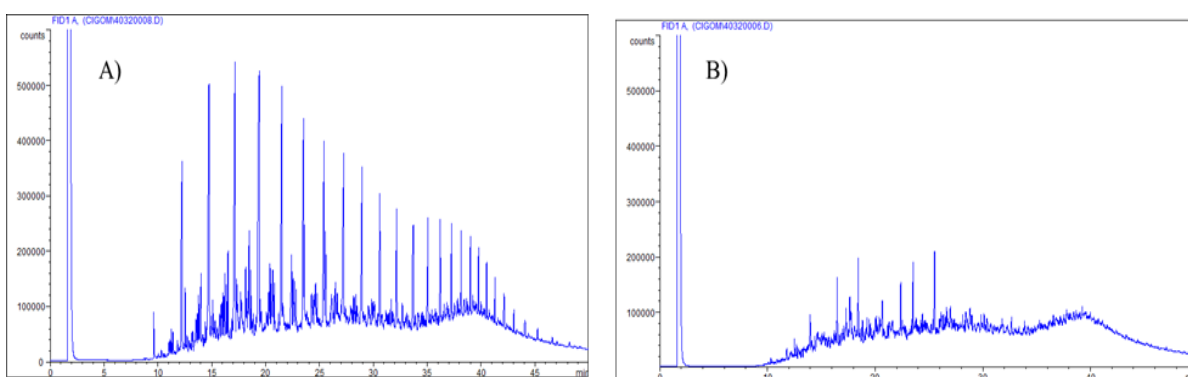


Figura 29. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MMSw. A) control abiótico MMSw, B) ensayo inoculado con el consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7.

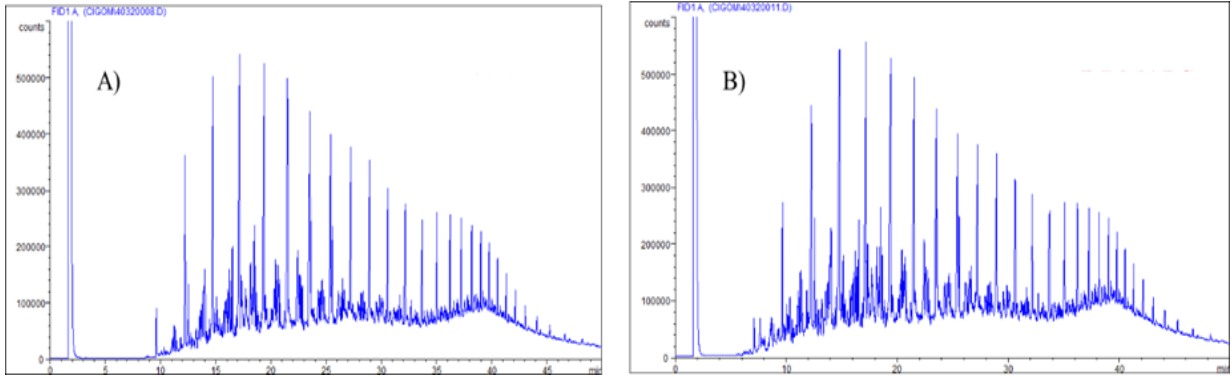


Figura 30. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MARS. A) control abiótico MARS, B) ensayo inoculado con el consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7.

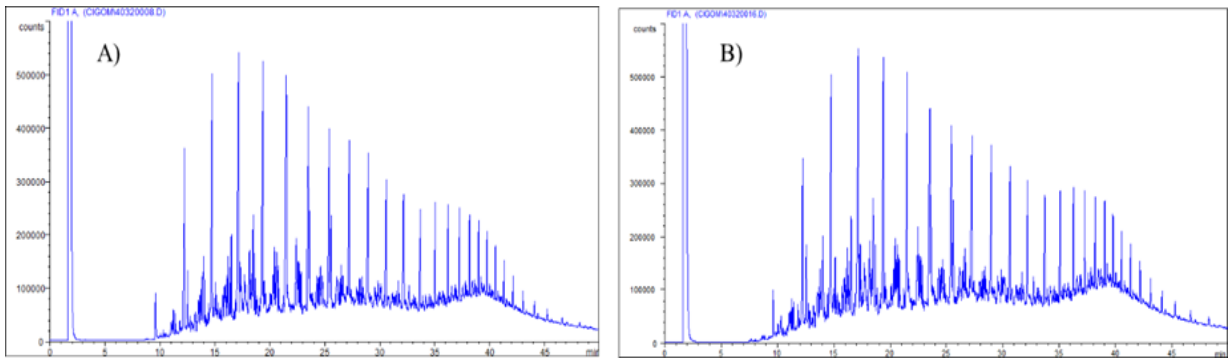


Figura 31. Análisis de degradación por GC-FID de crudo API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) por un consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7 en medio MARNP. A) control abiótico MARNP, B) ensayo inoculado con el consorcio bacteriano obtenido de sedimento B7.

DISCUSIÓN

El género *Rhodococcus*, es de gran interés biotecnológico, ya que se han reportado un importante número de cepas con actividad degradadora de contaminantes orgánicos, incluyendo hidrocarburos derivados de petróleo, por ello la caracterización de nuevas cepas con capacidades metabólicas distintas es de gran interés.

En este proyecto de tesis se estudió la capacidad degradadora de crudo bajo condiciones aeróbicas y micro-aeróbicas por la nueva cepa *Rhodococcus sp.* B7-I aislada de sedimentos del Golfo de México.

Rhodococcus sp. B7-I es capaz de degradar crudo API 40 bajo condiciones aeróbicas y micro-aeróbicas, siendo esta última la condición más favorable para dicha actividad,

En diversas cepas del género *Rhodococcus*, tales como *Rhodococcus erythropolis* M-25 (Pi *et al.*, 2017), *Rhodococcus sp.* cepa JZX-01 (Li *et al.*, 2013), *Rhodococcus erythropolis* cepa OSDS1 (Xia *et al.*, 2017) y *Rhodococcus sp.* cepa NJ2 (Kumari *et al.*, 2012), se ha reportado la degradación de crudo de diferentes grados API, en todos estos casos, los ensayos han sido llevados a cabo de manera aeróbica en presencia de agitación. Por ello, resulta muy interesante encontrar que en la cepa B7-I degrade crudo de manera más eficaz bajo condiciones micro-aeróbicas respecto a las aeróbicas, y sería relevante determinar si en otras cepas del género *Rhodococcus* se pueden obtener mejores resultados empleando condiciones micro-aeróbicas.

Una mayor degradación bajo condiciones micro-aeróbicas, es en general algo novedoso, ya que comúnmente, se ha reportado que una buena aireación favorece la degradación de hidrocarburos. En nuestro estudio, la condición microaerobiosis es provocada por la ausencia de agitación, lo cual implica dos diferencias principales respecto a las condiciones aeróbicas comúnmente empleadas, 1) la concentración de oxígeno y 2) la agitación. En muy pocos estudios se ha evaluado el impacto que tienen la agitación sobre la biodegradación de hidrocarburos. Syafruddin y colaboradores, reportaron que entre mayor era la agitación (250 rpm), la degradación de hidrocarburos era más favorable (Syafruddin *et al.*, 2010). Asimismo, Ferreira y colaboradores, reportaron que la agitación tuvo un efecto positivo en la degradación del petróleo crudo (Ferreira *et al.*, 2012). Por otra parte, Stroud y

colaboradores, mencionan que la degradación en muestras de crudo no envejecidas se ve favorecida en presencia de agitación, a comparación del petróleo ya envejecido para el cual la degradación es mejor en condiciones sin agitación (Stroud *et al.*, 2009). La agitación (o su ausencia) podrían influir de manera positiva o negativa en el contacto que tiene el microorganismo con los componentes del crudo dependiendo de los mecanismos que este posea para acceder a los hidrocarburos. Por estos motivos, se propone que en futuros estudios se realicen experimentos para determinar el efecto sobre la degradación tanto de la oxigenación como de la agitación de manera independiente.

En diversas cepas del género *Rhodococcus* se ha reportado la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos de cadena variable. Por ejemplo, *Rhodococcus* BZ22, el cual degrada C16 en un 75% después de 14 días (Margesin *et al.*, 2012), *Rhodococcus* sp. p52 el capaz de degradar tetradecano y tetracosano (Yang *et al.*, 2014), *R. sp.* TMP2 degrada n-alcános de entre C9 y C24 (Takei *et al.*, 2008) y *R. wratislaviensis* IFP 2016 que degrada octano y hexadecano (Auffret *et al.*, 2009). En este trabajo encontramos que la cepa B7-I, tiene la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos de cadena variable en diferentes porcentajes, observando una degradación de C20 del 25.4% después de 96 horas. Por otra parte, se encontró que es capaz de resistir altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos, pero es incapaz de utilizarlos como única fuente de carbono y energía bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Para algunas cepas de *Rhodococcus* se ha reportado la necesidad de adicionar algún surfactante para que el microorganismo sea capaz de degradar compuestos aromáticos (Peng *et al.*, 2007) (Iwabuchi *et al.*, 2002), por lo que en estudios futuros se explorará dicha condición para evaluar degradación de hidrocarburos aromáticos por la cepa B7-I.

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos para acceder a los hidrocarburos son de gran importancia para permitir la degradación de estos. En el caso de la cepa B7-I, no se encontró actividad surfactante en presencia de hidrocarburos ni de otras fuentes de carbono, en contraste con diferentes cepas del *Rhodococcus* degradadoras de hidrocarburos tales como la cepa JZX-01, la cual se reportó por Li y colaboradores como un gran degradador de hidrocarburos de cadena larga del petróleo crudo en un tiempo corto y a diferentes temperaturas, esto gracias a su gran capacidad de producción de biosurfactante (Li *et al.*, 2013). Lo cual sugiere que la cepa B7-I posee otras estrategias para poder iniciar el contacto

con hidrocarburos, que podría incluir contacto directo o la producción de emulsificantes (sin actividad surfactante).

Entre las cepas del género *Rhodococcus* degradadoras de hidrocarburos derivados del petróleo se han identificado un gran número de genes asociados a degradación de hidrocarburos, tales como *alkB*, que participan en la degradación de alcanos, dioxigenasas que participan en la degradación de xileno y tolueno, los genes *tmoA*, *xylM* y *xylE1*, involucrados en la degradación de benceno, tolueno, xileno y etilbenceno (BETEX) (Gürtler y Seviour 2010). Para estudiar la presencia de este tipo de genes en la cepa B7-I, su genoma completo fue secuenciado, desafortunadamente por motivos de la pandemia originada en este año 2020, el análisis de dicho trabajo quedó pendiente y es una de las perspectivas a corto plazo.

En el presente proyecto de tesis, en adición a la caracterización de *Rhodococcus* sp. cepa B7-I, se llevó a cabo el estudio de la composición de la comunidad microbiana de la muestra de sedimento B7 y se obtuvieron enriquecimientos bacterianos a partir de este con crudo como única fuente de carbono con el objetivo de determinar si era posible aislar otros microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de la misma muestra, pero mediante enriquecimientos selectivos.

El análisis de la comunidad microbiana presente en la muestra de sedimento de la estación B7 mediante la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, indica que el género *Rhodococcus* forma parte de la microbiota rara ya que no fue posible detectarlo. Por otra parte, se identificaron otros géneros con posible capacidad hidrocarbonoclasta.

En el sedimento B7 se encontraron muy abundantes, el género C1-B045 el cual ha sido pobremente estudiado, el género *Colwellia*, previamente reportado como un grupo de organismos psicrófilicos, facultativamente anaeróbicos, y resulta muy interesante su presencia, pues este género fue encontrado como dominante durante el derrame Deepwater Horizon oil, y se demostró su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos (Mason *et al.*, 2014), otros géneros presentes en el sedimentos B7 potencialmente capaces de degradar hidrocarburos (de acuerdo a otros reportes), son *Porticoccus* (Gutiérrez *et al.*, 2012) *Cycloclasticus* (Kasai *et al.*, 2002) y *Woeseia* (Bacosa *et al.*, 2018).

Como se esperaba, la diversidad en los tres consorcios fue menor que en la muestra de sedimento del cual provienen. Como se describe en la sección de resultados los consorcios cMARS y cMARNP fueron muy similares, en ellos se encuentran enriquecidos los géneros *Alcanivorax* y *Marinobacter* y en menor medida *Sneathiella*, *Muricauda* e *Idiomarina*. *Alcanivorax*, *Marinobacter* son dos de los géneros más estudiados con capacidades hidrocarbonoclastas, en cepas pertenecientes a estos géneros se ha encontrado las capacidades de degradar alcanos pesados y aromáticos policíclicos (SadrAzodi *et al.*, 2019; Dell'Anno *et al.*, 2020; Rodrigue *et al.*, 2020). También existen algunos reportes de cepas pertenecientes al género *Idiomarina* capaces de degradar hidrocarburos, tales como *Idiomarina piscisalsi* cepa 10PY1A, la cual es capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos como el pireno, gracias a que cuenta con genes que codifican a la degradación de este compuesto (Nzila *et al.*, 2018). En organismos pertenecientes a los géneros *Sneathiella* y *Muricauda* la degradación de hidrocarburos no ha sido demostrada, sin embargo, se han encontrado ambientes y en consorcios durante procesos de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Sauret *et al.*, 2014; Uribe-Flores *et al.*, 2019), lo cual sugiere que podrían degradar hidrocarburos o algunos de sus derivados. En nuestros ensayos MARS Y MARNP fueron suplementados con crudo API 40 como única fuente de carbono, y se comprobó que en la ausencia de hidrocarburo no se obtenía crecimiento bacteriano, esto implica que los microorganismos enriquecidos en estos medios de cultivo son capaces de degradar hidrocarburos o alguno de los productos de degradación producidos por algunos de los organismos que componen el consorcio.

En el consorcio B7-MMSw, se obtuvo una población drásticamente diferente, en este, se encontraron únicamente 7 géneros, entre ellos *Rhodococcus* (Actinobacteria) y *Aurantimonas* (Alphaproteobacteria) fueron los dominantes. El enriquecimiento mayoritario de *Rhodococcus* en el medio MMSw sugiere que este medio además de ser adecuado para la degradación de hidrocarburos, también es muy adecuado para enriquecer al género *Rhodococcus*, ya que este no fue detectado en el análisis de la muestra de sedimento, lo cual sugiere que su abundancia en este es muy baja. En el género *Aurantimonas* no ha sido demostrada la capacidad para degradar hidrocarburos, sin embargo, su presencia en el consorcio MMSw resultó muy interesante pues se ha reportado el aislamiento de cepas de este género a partir de microambientes que se encuentran en la interfase óxica/anóxica tales

como la cepa SI85-9A1 (Anderson *et al.*, 2009) y en nuestro caso el enriquecimiento se llevó a cabo en condiciones micro-aeróbicas. El género *Aurantimonas* se ha reportado en enriquecimientos bacterianos en presencia de hidrocarburos aromáticos (Gallego et al., 2014). Bajo las condiciones ensayadas, se encontró una mayor degradación API 40 al 1% v/v (8600 mg/L) después de un mes de incubación con la cepa *Rhodococcus sp.* B7-I (64.4%), en comparación con el consorcio cB7-MMSw (21.8%), sin embargo, estos ensayos no son totalmente comparables ya que el ensayo de degradación con el consorcio cB7-MMSw fue inoculado con alícuotas criopreservadas, mientras que el ensayo con la cepa *Rhodococcus sp.* B7-I fue inoculado con cultivos frescos, por ello será necesario realizar estudios posteriores para explorar las capacidades degradadoras del consorcio cB7-MMSw bajo condiciones óptimas.

CONCLUSIONES

- *Rhodococcus sp.* B7-I es capaz de degradar crudo API 40, así como alcanos de cadena larga, utilizándolos como única fuente de carbono y energía, tanto como con algunos hidrocarburos puros alifáticos. Las condiciones micro-aeróbicas empleadas fueron más favorables que las aeróbicas para la degradación por esta cepa.
- No se detectó actividad surfactante en los cultivos de *Rhodococcus sp.* B7-I, indicando que posee estrategias diferentes para acceder a los hidrocarburos.
- Por estas características *Rhodococcus sp.* B7-I posee un potencial biotecnológico muy importante, ya que puede ser utilizado para el tratamiento de aguas contaminadas, con las ventajas de que genera poca biomasa, no requiere gastos en aeración y degrada muy rápido.

PERSPECTIVAS

- ❖ Degradación de hidrocarburos aromáticos por *Rhodococcus sp.* B7-I, en presencia de una fuente de carbono y energía adicional y en presencia de surfactante.
- ❖ Monitorear concentraciones de oxígeno.
- ❖ Análisis de las fracciones que degradan crudo API 40.

REFERENCIAS

Anderson, C. R.; Dick, G. J.; Chu, M-L; Cho, J-C; Davis, R. E.; Bräuer, S. L.; Tebo, B. M. (2009): *Aurantimonas manganoxydans*, sp. nov. and *Aurantimonas litoralis*, sp. nov.: Mn(II) oxidizing representatives of a globally distributed clade of alpha-Proteobacteria from the order Rhizobiales. En: *Geomicrobiology journal* 26 (3), pág. 189–198. DOI: 10.1080/01490450902724840.

Auffret, Marc; Labbé, Diane; Thouand, Gérald; Greer, Charles W.; Fayolle-Guichard, Françoise (2009): Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. En: *Applied and environmental microbiology* 75 (24), pág. 7774–7782. DOI: 10.1128/AEM.01117-09.

Babcock-Adams, Lydia; Chanton, Jeffrey P.; Joye, Samantha B.; Medeiros, Patricia M. (2017): Hydrocarbon composition and concentrations in the Gulf of Mexico sediments in the 3 years following the Macondo well blowout. En: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 229, pág. 329–338. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.05.078.

Bacosa, Hernando P.; Erdner, Deana L.; Rosenheim, Brad E.; Shetty, Prateek; Seitz, Kiley W.; Baker, Brett J.; Liu, Zhanfei (2018): Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. En: *The ISME journal* 12 (10), pág. 2532–2543. DOI: 10.1038/s41396-018-0190-1.

Boll, M.; Heider, J. (2010): Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of C–H-Bond Activation in the Absence of Oxygen. En: Kenneth N. Timmis (ed.): *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, t. 68. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pág. 1011–1024.

Carvalho, Carla C. C. R. de; da Fonseca, M. Manuela R. (2005): Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. En: *FEMS microbiology ecology* 51 (3), pág. 389–399. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.09.010.

Das, Nilanjana; Chandran, Preethy (2011): Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. En: *Biotechnology research international* 2011, pág. 941810. DOI: 10.4061/2011/941810.

Dell'Anno, Filippo; Brunet, Christophe; van Zyl, Leonardo Joaquim; Trindade, Marla; Golyshin, Peter N.; Dell'Anno, Antonio et al. (2020): Degradation of Hydrocarbons and Heavy Metal Reduction by Marine Bacteria in Highly Contaminated Sediments. En: *Microorganisms* 8 (9). DOI: 10.3390/microorganisms8091402.

Dellagnezze, Bruna Martins; Gomes, Milene Barbosa; Oliveira, Valéria Maia de (2018): Microbes and Petroleum Bioremediation. En: Vivek Kumar, Manoj Kumar y Ram Prasad (eds.): *Microbial Action on Hydrocarbons*, t. 32. Singapore: Springer Singapore, pág. 97–123.

Doble, Mukesh; Kumar, Anil (2005): Petroleum Hydrocarbon Pollution. En: *Biotreatment of Industrial Effluents*: Elsevier, pág. 241–253.

Ferreira, Tatiana Felix; Coelho, Maria Alice Zarur; Rocha-Leão, Maria Helena Miguez da (2012): Factors influencing crude oil biodegradation by *Yarrowia lipolytica*. En: *Braz. arch. biol. technol.* 55 (5), pág. 785–791. DOI: 10.1590/S1516-89132012000500019.

Gallego, Sara; Vila, Joaquim; Tauler, Margalida; Nieto, José María; Breugelmans, Philip; Springael, Dirk; Grifoll, Magdalena (2014): Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium. En: *Biodegradation* 25 (4), pág. 543–556. DOI: 10.1007/s10532-013-9680-z.

Gieg, Lisa M.; Fowler, S. Jane; Berdugo-Clavijo, Carolina (2014): Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. En: *Current opinion in biotechnology* 27, pág. 21–29. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.09.002.

Gürtler, Volker; Seviour, Robert J. (2010): Systematics of Members of the Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998. En: Héctor M. Alvarez (ed.): *Biology of Rhodococcus*, t. 16. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Microbiology Monographs), pág. 1–28.

Gutierrez, Tony; Nichols, Peter D.; Whitman, William B.; Aitken, Michael D. (2012): *Porticoccus hydrocarbonoclasticus* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium identified in laboratory cultures of marine phytoplankton. En: *Applied and environmental microbiology* 78 (3), pág. 628–637. DOI: 10.1128/AEM.06398-11.

Holliger, C.; Zehnder, A. J. (1996): Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. En: *Current opinion in biotechnology* 7 (3), pág. 326–330.

Hua, Fei; Wang, Hong Qi (2014): Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. En: *Biotechnology, biotechnological equipment* 28 (2), pág. 165–175. DOI: 10.1080/13102818.2014.906136.

Iwabuchi, Noriyuki; Sunairi, Michio; Urai, Makoto; Itoh, Chiaki; Anzai, Hiroshi; Nakajima, Mutsuyasu; Harayama, Shigeaki (2002): Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. En: *Braz. arch. biol. technol.* 68 (5), pág. 2337–2343. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2337-2343.2002.

Kasai, Yuki; Kishira, Hideo; Harayama, Shigeaki (2002): Bacteria Belonging to the Genus *Cycloclasticus* Play a Primary Role in the Degradation of Aromatic Hydrocarbons Released in a Marine Environment. En: *Applied and environmental microbiology* 68 (11), pág. 5625–5633. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5625-5633.2002.

Kis, Ágnes Erdeiné; Laczi, Krisztián; Zsíros, Szilvia; Kós, Péter; Tengölics, Roland; Boundedjoun, Naila et al. (2017): Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. En: *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 64 (4), pág. 463–482. DOI: 10.1556/030.64.2017.037.

Klindworth, Anna; Pruesse, Elmar; Schweer, Timmy; Peplies, Jörg; Quast, Christian; Horn, Matthias; Glöckner, Frank Oliver (2013): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. En: *Nucleic acids research* 41 (1), e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.

Kumari, Babita; Singh, S. N.; Singh, D. P. (2012): Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. En: *Process Biochemistry* 47 (12), pág. 2463–2471. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.10.010.

Kuyukina, Maria S.; Ivshina, Irena B. (2010): Rhodococcus Biosurfactants: Biosynthesis, Properties, and Potential Applications. En: Héctor M. Alvarez (ed.): *Biology of Rhodococcus*, t. 16. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Microbiology Monographs), pág. 291–313.

Li, Chen; Zhou, Zheng-Xi; Jia, Xiao-Qiang; Chen, Yu; Liu, Jiao; Wen, Jian-Ping (2013): Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. En: *Applied biochemistry and biotechnology* 171 (7), pág. 1715–1725. DOI: 10.1007/s12010-013-0451-4.

Marcos, M. S.; Lozada, M.; Dionisi, H. M. (2009): Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. En: *Letters in applied microbiology* 49 (5), pág. 602–608. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02711.x.

Margesin, Rosa; Moertelmaier, Christoph; Mair, Johannes (2013): Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. En: *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, pág. 185–191. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.05.004.

Mayolo-Deloisa, K.; Machín-Ramírez, C.; Rito-Palomares, M.; Trejo-Hernández, M. R. (2011): Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Partially Purified Laccase from Residual Compost of *Agaricus bisporus*. En: *Chem. Eng. Technol.* 34 (8), pág. 1368–1372. DOI: 10.1002/ceat.201000205.

Mason, Olivia U.; Han, James; Woyke, Tanja; Jansson, Janet K. (2014): Single-cell genomics reveals features of a *Colwellia* species that was dominant during the Deepwater Horizon oil spill. En: *Frontiers in microbiology* 5, pág. 332. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00332.

Meckenstock, Rainer U.; Boll, Matthias; Mouttaki, Housna; Koelschbach, Janina S.; Cunha Tarouco, Paola; Weyrauch, Philip et al. (2016): Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 26 (1-3), pág. 92–118. DOI: 10.1159/000441358.

Moreno, Renata; Rojo, Fernando (2017): Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes in Bacteria. En: Fernando Rojo (ed.): *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, t. 460. Cham: Springer International Publishing, pág. 1–25.

Mouttaki, Housna; Johannes, Jörg; Meckenstock, Rainer U. (2012): Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons. En: *Environmental microbiology* 14 (10), pág. 2770–2774. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02768.x.

Nzila Alexis, Jung Byung Kwon, Kim Min-Chul, Jerald Conrad Ibal, Fitri Budiyanto, Musa M. Musa, Assad Thukair, Sang-Jun Kim y Jae-Ho Shin (2018): Complete genome sequence of the polycyclic aromatic hydrocarbons biodegrading bacterium *Idiomarina piscisalsi* strain 10PY1A isolated from oil-contaminated soil. En: *The Microbiological Society of Korea*, pag. 289-292.

Peng, F.; Liu, Z.; Wang, L.; Shao, Z. (2007): An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. En: *Journal of applied microbiology* 102 (6), pág. 1603–1611. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03267.x.

Pérez-Pantoja, D.; González, B.; Pieper, D. H. (2010): Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. En: Kenneth N. Timmis (ed.): *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, t. 187. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pág. 799–837.

Pi, Yongrui; Chen, Bing; Bao, Mutai; Fan, Fuqiang; Cai, Qinhong; Ze, Lv; Zhang, Baiyu (2017): Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. En: *Bioresource technology* 232, pág. 263–269. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.007.

Pini, Francesco; Grossi, Cristina; Nereo, Sabrina; Michaud, Luigi; Lo Giudice, Angelina; Bruni, Vivian et al. (2007): Molecular and physiological characterisation of psychrotrophic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). En: *European Journal of Soil Biology* 43 (5-6), pág. 368–379. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2007.03.012.

Rabus, Ralf; Boll, Matthias; Heider, Johann; Meckenstock, Rainer U.; Buckel, Wolfgang; Einsle, Oliver et al. (2016): Anaerobic Microbial Degradation of Hydrocarbons: From Enzymatic Reactions to the Environment. En: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 26 (1-3), pág. 5–28. DOI: 10.1159/000443997.

Rodrigue, Matthew; Elango, Vijaikrishnah; Curtis, David; Collins, Autumn W.; Pardue, John H. (2020): Biodegradation of MC252 polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in two coastal wetlands. En: *Marine pollution bulletin* 157, pág. 111319. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111319.

SadrAzodi, Seyedeh Mandana; Shavandi, Mahmoud; Amoozegar, Mohammad Ali; Mehrnia, Mohammad Reza (2019): Biodegradation of long chain alkanes in halophilic conditions by *Alcanivorax* sp. strain Est-02 isolated from saline soil. En: *3 Biotech* 9 (4), pág. 141. DOI: 10.1007/s13205-019-1670-3.

Sauret, Caroline; Séverin, Tatiana; Vétion, Gilles; Guigue, Catherine; Goutx, Madeleine; Pujo-Pay, Mireille et al. (2014): 'Rare biosphere' bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. En: *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)* 194, pág. 246–253. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.07.024.

Sharaf, Hesham M.; Shehata, Abdalla M. (2015): Heavy metals and hydrocarbon concentrations in water, sediments and tissue of *Cyclope neritea* from two sites in Suez Canal, Egypt and histopathological effects. En: *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 13. DOI: 10.1186/s40201-015-0171-5.

Shevtsov, Alexander; Tarlykov, Pavel; Zholdybayeva, Elena; Momynkulov, Dauren; Sarsenova, Ainur; Moldagulova, Nazira; Momynaliev, Kuvat (2013): Draft Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* DN1, a Crude Oil Biodegrader. En: *Genome announcements* 1 (5). DOI: 10.1128/genomeA.00846-13.

Sikkema, J.; Bont, J. A. de; Poolman, B. (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. En: *Microbiological Reviews* 59 (2), pág. 201–222.

Song, Xiaohui; Xu, Yan; Li, Gangmin; Zhang, Ying; Huang, Tongwang; Hu, Zhong (2011): Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. En: *Marine pollution bulletin* 62 (10), pág. 2122–2128. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.013.

Stroud, Jacqueline L.; Paton, Graeme I.; Semple, Kirk T. (2009): The effect of agitation on the biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil slurries. En: *Chemosphere* 77 (1), pág. 123–128. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.05.005.

Syafruddin, S.; Wieshammer, G.; Puschenreiter, M.; Langer, I.; Wieshammer-Zivkovic, M.; Wenzel, W. W. (2010): Effect of N and P fertilisation and aeration on biodegradation of crude oil in aged hydrocarbon contaminated soils. En: *Plant Soil Environ.* 56 (No. 4), pág. 149–155. DOI: 10.17221/146/2009-PSE.

Takei, Daisuke; Washio, Kenji; Morikawa, Masaaki (2008): Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. En: *Biotechnology letters* 30 (8), pág. 1447–1452. DOI: 10.1007/s10529-008-9710-9.

Tormoehlen, L. M.; Tekulve, K. J.; Nañagas, K. A. (2014): Hydrocarbon toxicity: A review. En: *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 52 (5), pág. 479–489. DOI: 10.3109/15563650.2014.923904.

Uribe-Flores, M. M.; Cerqueda-García, D.; Hernández-Nuñez, E.; Cadena, S.; García-Cruz, N. U.; Trejo-Hernández, M. R. et al. (2019): Bacterial succession and co-occurrence patterns of an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. En: *Journal of applied microbiology* 127 (2), pág. 495–507. DOI: 10.1111/jam.14307

Uzoigwe, Chibuzo; Burgess, J. Grant; Ennis, Christopher J.; Rahman, Pattanathu K. S. M. (2015): Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. En: *Frontiers in microbiology* 6, pág. 245. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00245.

Valdivia-Rivera, Sergio; Lizardi-Jiménez, Manuel Alejandro; Medina-Moreno, Sergio Alejandro; Sánchez-Vázquez, Victor (2019): Multiphase partitioning airlift bioreactors: An alternative for hydrocarbon biodegradation in contaminated environments. En: *Advances and Applications of Partitioning Bioreactors*, t. 54: Elsevier (Advances in Chemical Engineering), pág. 275–297.

Varjani, Sunita J. (2017): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. En: *Bioresource technology* 223, pág. 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.

Wan, Rui; Zhang, Shuying; Xie, Shuguang (2012): Microbial community changes in aquifer sediment microcosm for anaerobic anthracene biodegradation under methanogenic condition. En: *Journal of environmental sciences (China)* 24 (8), pág. 1498–1503.

Wang, I-Jen; Karmaus, Wilfried J. J.; Yang, Chen-Chang (2017): Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. En: *International archives of occupational and environmental health* 90 (3), pág. 297–303. DOI: 10.1007/s00420-017-1198-y.

Wilhelm, Roland C.; Hanson, Buck T.; Chandra, Subhash; Madsen, Eugene (2018): Community dynamics and functional characteristics of naphthalene-degrading populations in contaminated surface sediments and hypoxic/anoxic groundwater. En: *Environmental microbiology* 20 (10), pág. 3543–3559. DOI: 10.1111/1462-2920.14309.

Xia, Mingqian; Liu, Yi; Taylor, Alicia A.; Fu, Dafang; Khan, Abdur Rahim; Terry, Norman (2017): Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California. En: *International Biodeterioration & Biodegradation* 123, pág. 70–77. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.06.003.

Yang, Hai-Yan; Jia, Rui-Bao; Chen, Bin; Li, Li (2014): Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52. En: *Environmental science and pollution research international* 21 (18), pág. 11086–11093. DOI: 10.1007/s11356-014-3027-0.

Zampolli, Jessica; Collina, Elena; Lasagni, Marina; Di Gennaro, Patrizia (2014): Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism. En: *AMB Express* 4, pág. 73. DOI: 10.1186/s13568-014-0073-4.

Zampolli, Jessica; Zeaiter, Zahraa; Di Canito, Alessandra; Di Gennaro, Patrizia (2019): Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. En: *Applied microbiology and biotechnology* 103 (3), pág. 1069–1080. DOI: 10.1007/s00253-018-9539-7.

Zhang, Ying; Qin, Fujun; Qiao, Jing; Li, Gangmin; Shen, Chenghui; Huang, Tongwang; Hu, Zhong (2012): Draft genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain P14, a biodegrader of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. En: *Journal of bacteriology* 194 (13), pág. 3546. DOI: 10.1128/JB.00555-12.

Cuernavaca, Morelos a 18 de octubre de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **LIZETH NARAI REZA VÁZQUEZ**, con el título del trabajo: **DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR *Rhodococcus sp.* B7-1 AISLADO DE SEDIMENTO DEL GOLFO DE MÉXICO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto de calidad** y pueda optar por la Modalidad de **Titulación Profesional por Etapas** como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

SECRETARIO: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

VOCAL: DRA. PALOMA LARA FIGUEROA

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

SUPLENTE: DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2021-10-18 14:24:58 | Firmante

MoaITTyNN1cldFW6X5XRvD46CTAJAOXIDOrThG8YUgD03dR5m4v8VUA9k5nUaYE7R2Um6vgWZz8f6wFvW6talmCA22wb6K2IMa8W4Ca0UJCyL4hKc2G92u8vh4yN1qzz+UaFOQL78D7130vrbcyE+H+atG2RrR0jpaqmaxJvOfz6w9evd+HMxIE58w6HL0KUm7uJTFZaadRkkaamEUFic1pPTXdo6DD+qPaPpQIFBj64jGm+HQd26tn9Cm28C Pe8KkocE8 UapR4WnyM0H2C0m0E AwjM4gN3cd08F848MqKA39x00m8vmlL20YH+1ZaCpH1dwb2v***

MARSA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2021-10-18 16:56:15 | Firmante

ruM2p5aT7qVML9CaE4c0bJ5vcoaPCPaica0IevR455c4MGPO6WML0KEmV0ZwMTAFAspuFyGr0POayHkuzUyhoCFUhh1eT5icDclH01FvMRH+dV8+d8gD4Acbae7jerZPka0gXba1aZp186gR4uq8HUpjaFMQ7COGn00y1PaFC8ap8ax7Vgbd81aVE3jg48+TLv4N1mo1758ngjprVM6vYX08ggK86MlMpa00wTCAs3WME MQJ(Tx0GW0e0Cw6WtZ6hrtUvgn8p0qT7YvHodHppp4Qip0MPHrR8w200v0CwPAs01db886U0+OY3mMT+LUT7g***

KATY JUÁREZ LÓPEZ | Fecha:2021-10-18 17:20:06 | Firmante

doCg5W6j9QCPmUosrJXwXZQ8ey8HvL85mQD+hGc7DU8CFT2J8m37Rq+VvuQJmb6j8KT2m03pKvYK0NHLTG08dK5pm6eul8oPTbFUSEvM6toQv83v8PapuuAGgoFHREtaa mG48tE0xvY0YgA819gTTPaIMELvGdYJwG0jP5C0K95RauHPHwUHQ37327yaDnGdFVJcbxogjgJ2a8uA8OTLUmouxDT+60EWH8rj(DMSLLJvdA4LE1ao+6TAwLMac0VMqcaWjNv1PajwC860eQPT05Jv0UgE0NqUgRPaAS1T2ov8PZ2c08n009p05W0+aw8Nw***

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2021-10-20 08:33:43 | Firmante

HUBAVFP+H08u0HE8pG5NykCaJ+8GK146A8p8p0Lu7HaloQzxG163PpR0FVWV0COb400xKoz390n8m8vdA22a13KaH8QY7m+GwNpaX0Im+r8MH1Q8Rv6Cb/28EY1C28 Gu0HqUean8v8PofPwDulSTP8HLETbU PVeZ+0MVLd3+8NAH78jPzUj86hu2v088UUTdehV8h8a2JUSJurdwV88nPH1Hn8nuUgouYcZ08RfVvYvYvM0pJYcNOCx06cMKw8 00wHveL0Y0dYdH0hUM43wcdAYo45Ueul0Uv8d5W87536v8YVZCQDN8aTUAe2k0w***

PALOMA LARA FIGUEROA | Fecha:2021-10-20 15:14:14 | Firmante

Zqpp6bo1vRrpd1mGE2v8oq+8PnH08uU00m8P873hPeEuTyZhgPondHM/MK8X0n8g+MjwWjphUd51dH+32aTCMKpU0hCa3WqL8x816NAvg0W8+pmDzA180CfPm0A9jL8 2VvM238EavV8LJ08p0Gn02jg10CbLUBH58NgX8NR8AgjFA8bU5485zH8gmHVL252aUH+8X0X00C04e4V41o8YvRC0a0h1N8K20c1q8yugW+882ThyvUcTaaP8KqY8 R9H0x0smfcd4eZyWNB8ELMLCaFWmeJ+Ogr13Avcd7C28709a8C08RyYF8rImArg***

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hPR0nemLT

<https://firma.uaem.mx/hojarepublica/80prf1ChrbuAid5m1z0Cam6Z7Yupe80>

