



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO CON CAPACIDAD
DEGRADADORA DE PETRÓLEO LIGERO EN AGUA DE MAR**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias**

PRESENTA:

JORGE ALEXANDER ROJAS VARGAS

TUTOR PRINCIPAL

DRA LILIANA PARDO LÓPEZ

[Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR FIDEL ALEJANDRO SÁNCHEZ FLORES

[Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México](#)

DR ALEXEI FEDOROVISH LICEA NAVARRO

[Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada](#)

DRA ERIA REBOLLAR CAUDILLO (Invitada)

[Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México](#)

Cuernavaca, Morelos. Marzo de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Liliana Pardo López en el Departamento de Microbiología del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El estudio de doctorado se realizó gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 965003). Este trabajo fue Apoyado por CONACYT – Secretaría de Energía de México- Fideicomiso de Hidrocarburos, proyecto 201441.

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este logro a esos seres amados que se entregaron a llenar mi vida con cuidados y amor. Esto es para ustedes:

A mi padre, quien fuera mi fuerza para emprender cada aventura y quien ahora está esperándome en el cielo.

A mi madre, quien es mi ejemplo y mi sostén en el diario caminar.

Y a mi hermana, quien me ha enseñado a creer y a confiar en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Liliana Pardo, porque me abrió las puertas a México y siempre confió en mí.

A los miembros de mi comité tutor, por su paciencia y guía: Dr. Alejandro Sánchez, Dr. Alexei Licea y Dra. Eria Rebollar.

A los miembros del jurado: Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, Dr. Jorge Luis Folch Mallol, Dra. Luz de María Bretón Deval, Dr. Enrique Merino y Dr. Luis David Alcaraz.

A mis compañeros de laboratorio, por sus recomendaciones y acompañamiento: Dra. Libertad Adaya, M. en C. Sofía Millán, M. en C. Itzel Hidalgo, M. en C. Diego Cuervo, Dr. Luis Felipe Muriel, y el Dr. José Luis Rodríguez.

Al Dr. Hugo Castelán Sánchez, por su apoyo en el área Bioinformática.

Al Ing. Arturo Aguilar, por su apoyo técnico en el diseño experimental.

Al personal de Planta Piloto del IBt, por su apoyo técnico: Dr. Leobardo Serrano Carreón, Ing. Verónica Albíter Hernández, y el M. en C. José Raunel Tinoco Valencia.

Agradezco infinitamente al pueblo mexicano, porque me han acogido con brazos abiertos y me han permitido vivir y estudiar en su tierra.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Un riesgo latente	10
1.2. El destino del petróleo derramado en el mar.....	11
1.3. Mitigación del daño.....	13
1.4. Estrategias alternativas	14
1.5. Antecedentes en México	15
1.6. Diseño de consorcios microbianos.....	17
1.6.1. Enfoque <i>bottom-up</i>	18
1.6.2. Enfoque <i>top-down</i>	20
1.7. Alcance del proyecto.....	22
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo General.....	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. Bacterias iniciales.....	24
4.2. Selección de 19 aislados para el diseño experimental de Plackett-Burman	26
4.3. Identificación taxonómica por análisis del gen 16S ribosomal de los 19 aislados seleccionados	26
4.4. Diseño Experimental de Plackett-Burman.....	27
4.5. Cinética de degradación de HCs y abundancia relativa de las bacterias que conforman el consorcio diseñado.....	28
4.6. Dinámica de poblaciones y predicción de interacciones microbianas	29
4.7. Secuenciación, ensamblado de genomas, asignación taxonómica y filogenia	30
4.8. Comparación de sintenia	31

4.9.	Búsqueda de genes relacionados con la degradación	32
4.10.	Estudio de patogenicidad de las cepas del consorcio diseñado	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1.	Selección de 19 aislados para el diseño experimental de PB	34
5.2.	Selección de los aislados del consorcio mediante PB	35
5.3.	Remoción de hidrocarburos y biodegradación	38
5.3.1.	Crecimiento bacteriano y remoción de hidrocarburos	38
5.3.2.	Biodegradación de hidrocarburos	40
5.4.	Dinámica de poblaciones e interacciones microbianas	44
5.5.	Genomas de cepas seleccionadas	46
5.6.	Asignación taxonómica y filogenia	50
5.7.	Genómica comparativa	52
5.8.	Anotación funcional con HADEG	54
5.9.	Ensayos de patogenicidad	59
6.	CONCLUSIONES	61
7.	PERSPECTIVAS	63
8.	REFERENCIAS	64
	ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destino natural del petróleo en el océano o “ <i>weathering</i> ”.	12
Figura 2. Modelo de distribución bidireccional luego de la reconstrucción metabólica del consorcio de <i>Dietzia</i> sp. DQ12-45-1b y <i>P. stutzeri</i> SLG510A3-8, con hexadecano como fuente de carbono. Adaptado de (Hu et al., 2020).	19
Figura 3. Sitios de muestreo de los 111 aislados marinos de muestras ambientales obtenidas en campañas del CIGoM y de la UABC, entre 2015 y 2017.	25
Figura 4. Resultados del diseño experimental de PB.	36
Figura 5. Diferencia cualitativa en el color de algunos extractos obtenidos en el experimento de PB luego de 75 días de incubación	37
Figura 6. Resultados de concentración de proteína por Lowry y remoción de HCs por gravimetría.	39
Figura 7. Resultados por CG-MS para la cinética de degradación con el consorcio.	41
Figura 8. Resultados por CG-MS para la cinética de degradación con los aislados crecidos individualmente.	42
Figura 9. Dinámica poblacional e interacciones microbianas durante la degradación de petróleo ligero.	44
Figura 10. Representación circular de los genomas completos de las bacterias del Consorcio.	47
Figura 11. Genomas reconstruidos con PLACNETw para la búsqueda de plásmidos.	48
Figura 12. Reconstrucción filogenética con 92 genes marcadores de procariontes.	51
Figura 13. Número de hits. A. y abundancias relativas. B. luego de anotar los genomas usando Blast con HADEG.	55
Figura 14. Número de hits bidireccionales en vías metabólicas relacionadas con la degradación de HCs luego de anotar los genomas usando Blastp con HADEG.	56
Figura 15. Número de hits en genes relacionados con la degradación de hidrocarburos luego de anotar los genomas usando Blast con HADEG.	58

Figura 16. Índice de salud de los grupos de larvas inyectados con las cepas del consorcio y los controles. **60**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de petróleos mexicanos **10**

Tabla 2. Matriz de combinaciones del método PB para los 19 aislados seleccionados..... **27**

Tabla 3. Sistema de puntaje del Índice de Salud de la *G. mellonella*, adaptada de (Loh et al., 2013) **33**

Tabla 5. Estadísticas de los ensamblajes híbridos **46**

Tabla 6. Asignación taxonómica con los genomas completos **50**

RESUMEN

Se describe un consorcio de bacterias marinas diseñado para la degradación de petróleo ligero en agua de mar suplementada con nutrientes, basado en un método estadístico que utiliza el enfoque factorial fraccionado de Plackett-Burman (PB). El consorcio final consta de cuatro aislados del Golfo de México: *Pseudomonas aeruginosa*, *Halopseudomonas aestusnigri*, *Paenarthrobacter sp.* y *Alloalcanivorax xenomutans*. Individualmente, la remoción de hidrocarburos del petróleo por parte de estos microorganismos se evaluó por gravimetría, alcanzando un máximo de 39% después de 75 días, mientras que en consorcio fue de ~62%. También se determinaron los niveles de biodegradación mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) observando la degradación de 12 hidrocarburos poliaromáticos (PAH) analizados y la degradación de *n*-alcanos con preferencia por longitudes de cadena específica. El análisis de la población del consorcio utilizando la región V3-V4 del rRNA 16S mostró una comunidad con presencia de las 4 bacterias durante los 75 días, lo que sugiere que la carga metabólica pudo haberse distribuido entre los aislados.

Posteriormente se secuenciaron y ensamblaron los genomas completos de las bacterias del consorcio, se identificaron taxonómicamente usando criterios filogenómicos y se realizaron análisis de genómica comparativa. Finalmente, se anotaron las secuencias de aminoácidos, mediante un método bidireccional, para identificar las proteínas asociadas a la degradación de hidrocarburos potencialmente presentes en el consorcio, tomando como referencia un banco de datos manualmente curado.

En este trabajo se muestra que el uso de un método factorial para el diseño de consorcios sintéticos ofrece la posibilidad de mejorar la eficiencia de degradación del petróleo. Complementado con un análisis genómico, se puede describir el rol potencial de las bacterias del consorcio en la degradación.

ABSTRACT

The present document describes an assembled marine bacteria consortium designed for the degradation of light crude oil in nutrient-supplemented seawater, based on a statistical method using the fractional factorial Plackett-Burman (PB) experimental screening approach. The final consortium consists of four isolates from the Gulf of Mexico: *Pseudomonas aeruginosa*, *Halopseudomonas aestusnigri*, *Paenarthrobacter* sp., and *Alloalcanivorax xenomutans*. Individually, the removal of hydrocarbons from petroleum by these microorganisms was evaluated by gravimetry, reaching a maximum of 39% after 75 days, whereas in consortium it was ~62%. Biodegradation levels were also determined by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) by observing the degradation of 12 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analyzed and the degradation of n-alkanes with preference for specific chain lengths. Consortium population analysis using the V3-V4 region of the 16S rRNA showed a community with the presence of the 4 bacteria during the 75 days of incubation, suggesting that the metabolic load was distributed among the isolates.

Subsequently, the complete genomes of the consortium bacteria were sequenced and assembled, taxonomically identified using phylogenomic criteria, and comparative genomics analyzes performed. Finally, the amino acid sequences were annotated, using the bidirectional best hit method, to determine the potential proteins associated with hydrocarbon degradation present in the consortium, taking as reference a manually curated database.

In this work it is shown that the use of a factorial method for the design of synthetic consortia offers the possibility of improving the efficiency of petroleum degradation. Complemented by genomic analysis, the potential role of the consortium bacteria in the degradation can be described.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Un riesgo latente

Actualmente, México es el 11^o país productor de petróleo en el mundo, y cuenta con infraestructura de exploración, producción, transporte y almacenamiento de hidrocarburos (HCs) en todo su territorio. El mayor volumen de actividades se concentra en las zonas productoras marinas del Golfo de México (GdM), en donde se produce cerca del 80% del petróleo nacional (PEMEX, 2022).

Los petróleos mexicanos se clasifican en cinco tipos, Altamira, Istmo, Maya, Olmeca y Talam (Tabla 1), y todos ellos se pueden encontrar en el GdM. Según sus fichas técnicas de seguridad, estos aceites crudos se consideran sustancias peligrosas para la salud y el medio ambiente, por lo que su liberación es nociva para el ambiente marino.

Tabla 1. Tipos de petróleos mexicanos

Tipo de crudo	°API	Clasificación
Altamira	15.0 - 16.5	Pesado
Istmo	32.0 - 37.0	Ligero
Maya	21.0 - 22.0	Pesado
Olmeca	38.0 - 39.0	Superligero
Talam	15.8 - 16.0	Pesado

Si bien se ha registrado la presencia de emanaciones naturales de petróleo en el fondo del GdM (MacDonald et al., 2015), el creciente aumento de actividades de la industria petrolera en esta zona, evidencia el enorme riesgo de derrames que afectarían al ecosistema del Golfo, dada la compleja naturaleza química del petróleo y su capacidad para tener diferentes niveles de toxicidad (Patowary et al., 2016). Un aumento repentino en la concentración de los HCs de petróleo en zonas que no

están acostumbradas a su presencia constituye una amenaza y un riesgo para la vida.

1.2. El destino del petróleo derramado en el mar

El petróleo liberado al océano se distribuye a lo largo de toda la columna de agua, dependiendo de la interacción de factores físicos, químicos y biológicos (Gregson et al., 2021). Descrito de forma general, luego de una emanación natural o accidentes en el fondo marino de pozos petroleros, la mayor parte del petróleo tiende a ascender o permanece en la superficie en el caso de derrames superficiales como los que acontecen en barcos, debido a que su densidad es menor a la del agua (Fig. 1). Mientras asciende o permanece en la superficie, una fracción de los HCs se disuelve en la matriz acuosa (Sammarco et al., 2013), y otra comienza a extenderse y a dispersarse debido al oleaje. Los HCs más volátiles se evaporan durante los primeros días de exposición a la atmósfera y otros se comienzan a degradar debido a la fotooxidación (Guipeng et al., 2006; Shankar et al., 2015). Los microorganismos presentes en el mar (representados como círculos blancos en la Fig. 1), y con capacidad de utilizar los HCs como fuente de carbono y energía, también inician el proceso de biodegradación. Esta fase dependerá de factores como la biodisponibilidad de HCs, la concentración de HCs y nutrientes, la temperatura, entre otros. En esta zona superficial o epipelágica, algunos microorganismos secretan sustancias poliméricas como polisacáridos, proteínas, o glicoproteínas, formando micro geles que atrapan algunas gotas del petróleo y materia orgánica. Este conglomerado de materia da origen a la nieve marina de petróleo (NMP), un material orgánico particulado que gradualmente se vuelve más denso que el agua (Gregson et al., 2021). Finalmente, los HCs más pesados y los atrapados en la NMP, se depositarán en el sedimento marino en áreas remotas a la

zona del accidente por efecto de las corrientes marinas, donde continuarán con su proceso de degradación y/o acumulación por años.

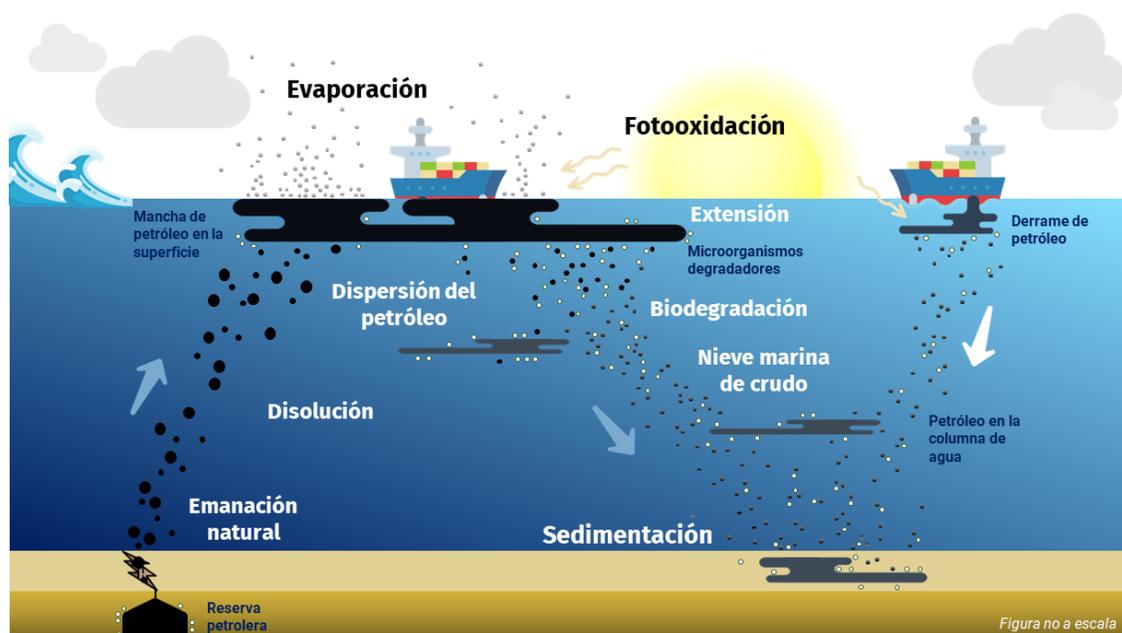


Figura 1. Destino natural del petróleo en el océano o “weathering”.

Los procesos descritos anteriormente pueden durar meses en completarse. Este fenómeno aumenta el riesgo de que la mancha superficial sea arrastrada centenares de kilómetros hacia las costas por acción del viento y del oleaje, afectando áreas de interés ambiental, comercial, cultural e industrial. En el caso del derrame de petróleo ligero del *Deepwater Horizon* (DwH), ocurrido en abril de 2010 en el GdM, la mancha llegó a las costas continentales estadounidenses luego de recorrer 84 km en 20 días. 16 meses después del incidente se reportó la presencia de petróleo superficial y en la columna de agua con concentraciones de hasta 0.1 g/L (Sammarco et al., 2013; Wade et al., 2016), y altas concentraciones de HCs en superficie cercanas a la costa luego de 4 años (NOAA, 2015). En otro caso paralelo, se detectó la presencia de petróleo superficial en altas concentraciones luego de 20

años del derrame del *Dalian New Port* en el Mar Amarillo de China, ocurrido en 2010 (Guo et al., 2022).

1.3. Mitigación del daño

México cuenta desde 2016 con un Plan Nacional de Contingencia para derrames de Hidrocarburos y Sustancias Nocivas Potencialmente Peligrosas en las Zonas Marinas Mexicanas, el cual establece una línea de acción ante uno de estos incidentes no deseables. Las acciones inmediatas comprenden la contención, la recuperación y la dispersión mecánica del petróleo (usando chorros de agua). Los HCs que se hayan recuperado se deben disponer en sitios determinados para su disposición final según lineamientos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2011, 2012, 2016). Como alternativas secundarias se proponen la quema *in situ* y/o el uso de dispersantes químicos dentro de las primeras 24-96 h luego del derrame. El empleo de estas alternativas necesita previa licencia de autoridades ambientales debido a que los humos de la quema son tóxicos, y los dispersantes químicos actuales siguen siendo nocivos para la biota marina e ineficaces para petróleo pesado y/o meteorizado.

Los anteriores métodos fisicoquímicos (recuperación, quema, dispersión, etc.) para minimizar los daños de los derrames han demostrado no ser suficientes (Chuah et al., 2022; Ndimele et al., 2018). Los datos son variables, pero se estima que con este tipo de tecnologías se recuperó alrededor de un 25% del petróleo derramado en el accidente del DWH (Zavala-Hidalgo et al., 2012). 49% del aceite crudo se disolvió, se dispersó o se evaporó, mientras que el 26% restante permaneció en la superficie, llegando a contaminar el 37% de las costas del GdM de Estados Unidos (Wilson et al., 2021). En el caso del segundo derrame de petróleo más grande en el

GdM, el Ixtoc-I, se estima que sólo se recuperó el 13% con los métodos fisicoquímicos (Radović et al., 2020).

1.4. Estrategias alternativas

Debido a que el uso de los métodos fisicoquímicos descritos en el apartado anterior ha sido insuficiente para remediar la persistencia del petróleo derramado, se han fomentado estrategias alternativas. La biorremediación es una de las opciones más prometedoras, en donde algunos microorganismos usan los HCs como fuente de carbono, con mínimos impactos ambientales, gasto de energía y costos (Mapelli et al., 2017; Ndimele et al., 2018; Perdigão et al., 2021).

Se ha señalado que la presencia de HCs en el océano estimula el crecimiento de microorganismos nativos (bacterias, hongos, algas) capaces de degradarlos (Hazen et al., 2010; Xue et al., 2015), por lo cual se han propuesto como agentes potenciales de la biorremediación de HCs (Dash et al., 2013). La identificación de dichos microorganismos se ha realizado a través del aislamiento de cepas cultivables en laboratorios, a partir de muestras de agua de mar y de sedimentos (Maamar et al., 2020; Muriel-Millán et al., 2019; Rodríguez-Salazar et al., 2021). También se han realizado estudios metagenómicos ambientales, demostrando que los ambientes marinos albergan un grupo de microbios que hacen parte de esa “biosfera rara” y que aumenta en abundancia (hasta constituir casi el 90% de las especies) cuando hay presencia de HCs (Kleindienst et al., 2016). Dentro de los géneros bacterianos degradadores de HCs que más se han estudiado se encuentran: *Alloalcanivorax*, *Bacillus*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Halomonas* y *Arthrobacter*, entre otros (Varjani, 2017).

La identificación de estos microorganismos, y los estudios de su capacidad para degradar HCs, han servido para proponer dos estrategias en la biorremediación de petróleo: i) la *bioestimulación*, la cual consiste en adicionar nutrientes, como nitrógeno y fósforo, en el sitio afectado por un derrame, para aumentar la capacidad de degradación de la población microbiana nativa (Ebadi et al., 2017; Ndimele et al., 2018), y ii) la *bioaumentación*, que consiste en la adición de uno o más microorganismos degradadores con el fin incrementar la diversidad genética asociada a la degradación. Esta bioaumentación también podría ir acompañada de la bioestimulación (El Fantroussi & Agathos, 2005).

1.5. Antecedentes en México

El derrame del DwH en 2010 despertó un enorme interés por estudiar a detalle el GdM, desde modelos para simular mejor sus corrientes marinas y cambios en la temperatura, hasta la descripción de sus comunidades microbianas complejas, (Lilly & Pérez-Brunius, 2021; Maslo et al., 2020; Miron et al., 2019; Rodríguez-Vera et al., 2019). Debido a la relevancia y afectaciones del derrame, diversos grupos de investigación han desplegado técnicas (de ingeniería, microbiológicas y ómicas), en grandes escalas espaciales y temporales, para estudiar el efecto de este tipo de accidentes sobre el ambiente (Kleindienst et al., 2016).

Como resultado de estas investigaciones en México, nuestro grupo ha obtenido aislados bacterianos de muestras de agua de mar y de sedimentos contaminados con petróleo, y enriquecidos posteriormente con HCs (Muriel-Millán et al., 2021, 2019; Rodríguez-Salazar et al., 2021; Rojas-Vargas et al., 2022; Rosas-Díaz et al., 2021). Este trabajo de aislamiento se desarrolló en el marco de las campañas oceanográficas del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) (Pardo-López & Gutiérrez-Ríos, 2021). Los aislados cuentan con reportes que describen su

capacidad para degradar HCs del petróleo, aumentando el conocimiento sobre la biología de los microorganismos que metabolizan xenobióticos y, convirtiéndose en recursos potenciales para ser usados en estrategias de biorremediación. Aunado a este esfuerzo en el GdM, y en la búsqueda de organismos degradadores, se han aislado bacterias en zonas marinas cercanas a lugares de almacenamiento y transporte de petróleo en la región noroeste del Océano Pacífico mexicano (Silva-Jiménez et al., 2018). También se han estudiado otros microorganismos como hongos halófilos con capacidad de degradar HCs, obtenidos de otras fuentes naturales como el bagazo de caña (González-Abradelo et al., 2019).

Se ha determinado la línea base de la población bacteriana en el suroeste del GdM. A partir de muestras de sedimentos marinos recolectadas en un área de 200.000 km², y mediante secuenciación de alto rendimiento, se han identificado al menos 450 géneros pertenecientes a la línea base bacteriana del Golfo (Godoy-Lozano et al., 2018; Raggi et al., 2020). Buscando secuencias de genes asociados a la degradación aeróbica y anaeróbica de HCs, estos datos genómicos han permitido confirmar el potencial metabólico de las comunidades estudiadas (Raggi et al., 2020).

Aun cuando el petróleo representa una fuente de carbono y energía para ciertos microorganismos, también puede ser tóxico para otros. Se han replicado estudios de sucesiones de poblaciones bacterianas a medida que consumen HCs del petróleo en condiciones de agua de mar superficial (Cerqueda-García et al., 2020; Uribe-Flores et al., 2019). Dichos trabajos han tomado comunidades bacterianas de muestras de sedimentos y de agua de mar del GdM, reportando el aumento en abundancia relativa de géneros reconocidos como degradadores (*Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Dietzia*, *Marinobacter*, *Alloalcanivorax*, *Bacillus*, *Idiomarina*), y la desaparición de otros géneros cuando se incuban con diferentes

tipos de petróleo (ligero, mediano, pesado) o derivados como el diésel. El enriquecimiento de estos taxa fue comparable con lo reportado en estudios con muestras ambientales de otros lugares del GdM, y las diferencias en géneros obedece a la composición inicial de las comunidades y a los cambios en las condiciones de experimentación (Cerqueda-García et al., 2020). Esta sucesión de poblaciones debida a la presencia de HCs también ha sido observada de forma natural en muestras de arena costera y en la columna de agua luego del derrame del DWH (Kostka et al., 2011; Yang et al., 2016).

1.6. Diseño de consorcios microbianos

Un solo microorganismo no cuenta con toda la maquinaria metabólica para degradar todas las fracciones del petróleo (alifáticos, aromáticos, resinas y asfáltenos), por lo que se propone el diseño de comunidades microbianas o consorcios para ser utilizados en métodos de biorremediación (Yu Chen et al., 2014; McGenity et al., 2012). Hasta el 2019, de las 500 patentes dirigidas a la biorremediación de agua de mar contaminada con petróleo, 368 hacían referencia a consorcios sintéticos bacterianos, 24 con hongos y levaduras y 32 a consorcios mixtos (Villela et al., 2019), revelando un enorme interés y confianza en este tipo de alternativas.

Un consorcio microbiano se define como una comunidad de dos o más especies, y su ventaja radica en que se aumenta la diversidad genética asociada a la degradación, como en el caso de la bioaumentación. Esta característica le confiere reducir la carga metabólica, dividir el trabajo entre las especies y/o mayor robustez a las perturbaciones. Sin embargo, un consorcio aporta una complejidad biológica adicional debido a las interacciones entre sus miembros (San León & Nogales, 2022).

Los microorganismos se encuentran presentes en todos los ambientes, interaccionan con los más cercanos y comparten recursos entre ellos (Ben Said & Or, 2017). Estas comunidades naturales son dinámicas debido al flujo permanente de materia y energía al que están sometidas. Particularmente, esta es una característica inherente del ambiente marino (Mestre et al., 2020). El uso de estas comunidades naturales ha consistido en tomar muestras ambientales y someterlas a condiciones bien definidas según el interés biotecnológico. Si bien es un enfoque prometedor, esta aproximación está sujeta a la selección de la muestra, a la disminución en la diversidad de la muestra estando en condiciones de laboratorio, a la habilidad de medir con precisión la diversidad de la comunidad y al reto de explorar a detalle la relación estructura-función (Grosskopf & Soyer, 2014).

Estas limitaciones se pueden superar manipulando el nivel de diversidad de una comunidad mediante el uso de consorcios sintéticos. El diseño de estos consorcios busca la estabilidad de sus miembros, garantizando la funcionalidad, simulando las condiciones naturales donde los microorganismos se encuentran interactuando entre sí para contribuir a su estabilidad y funcionalidad (García-Jiménez et al., 2021). Dicha estabilidad puede no ser favorecida cuando existe competencia por los mismos recursos. Sin embargo, en el caso del petróleo como fuente de carbono, los microorganismos pueden acceder a una miríada de compuestos orgánicos, que se encuentran en distintas concentraciones según el tipo de crudo (Léandre et al., 2023).

1.6.1. Enfoque *bottom-up*

El diseño de un consorcio microbiano se puede realizar empleando dos enfoques. El primero de ellos, conocido como aproximación *bottom-up*, requiere de un conocimiento biológico completo del sistema. Este método exige un esfuerzo por conocer las relaciones metabólicas entre las especies y sus sinergismos

funcionales, a partir de datos experimentales y de las ciencias ómicas como en el caso de los GEMs (modelos metabólicos a escala del genoma, siglas en inglés). De esta manera, se pretende diseñar un consorcio de forma sistemática, seleccionando los componentes que cumplan una función específica para garantizar su estabilidad y funcionalidad (Grosskopf & Soyer, 2014; Karkaria et al., 2021; Kong et al., 2018). Esta aproximación ha sido empleada para la producción de productos naturales como flavonoides, ácido 2-ceto-L-gulónico, polihidroxialcanoatos (PHA), entre otros (García-Jiménez et al., 2021; San León & Nogales, 2022).

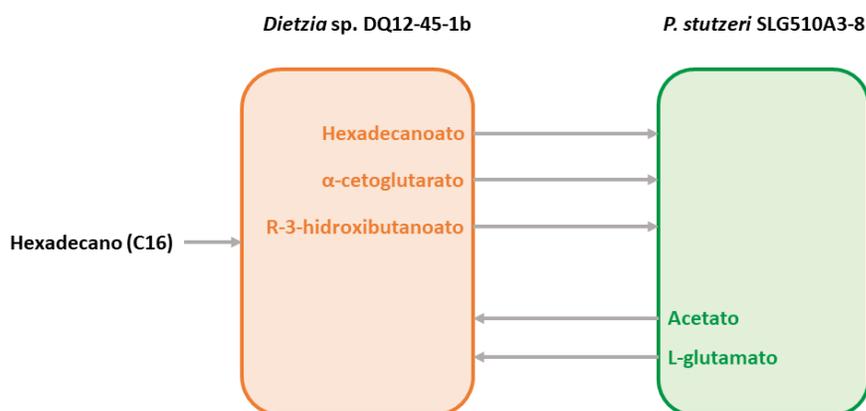


Figura 2. Modelo de distribución bidireccional luego de la reconstrucción metabólica del consorcio de *Dietzia* sp. DQ12-45-1b y *P. stutzeri* SLG510A3-8, con hexadecano como fuente de carbono. Adaptado de (Hu et al., 2020).

En el caso de degradación de HCs, el enfoque *bottom-up* se empleó para diseñar un consorcio para la degradación de diésel en un medio mineral suplementado con nutrientes. El consorcio conformado por la cepa degradadora *Dietzia* sp. DQ1245-1b y la no-degradadora *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8, demostró un trabajo sinérgico entre ambas para aumentar los niveles de degradación de diésel (Hu et al., 2020). Tomando los datos experimentales, la anotación de los genomas y algunas bases de datos de vías metabólicas, se reconstruyó un modelo metabólico entre ambas cepas (Figura 2). El modelo señala que, durante la degradación en

medio mineral, *Dietzia* sp. consume hexadecano y produce algunos metabolitos intermedios que son aprovechados por *P. stutzeri* para crecer. *P. stutzeri*, a su vez, produce acetato y glutamato que son consumidos por *Dietzia* sp. y estimulan su crecimiento.

1.6.2. Enfoque *top-down*

El segundo enfoque, conocido como *top-down*, no requiere de un conocimiento a fondo del sistema. La metodología básica empleada en este enfoque consiste en probar diferentes combinaciones de bacterias hasta seleccionar la que mejor se ajuste a los objetivos del diseño. Aplicando esta metodología a consorcios sintéticos degradadores de petróleo, Gallego *et al.* (Gallego *et al.*, 2007) diseñaron una comunidad de 4 bacterias, probando diferentes combinaciones entre 8 aislados de lodos y aguas residuales de la industria petroquímica. Demostrando que el consorcio final presentó niveles superiores de degradación que las otras combinaciones probadas, y que los aislados por separado. Chuah *et al.* (Chuah *et al.*, 2022) combinaron la cepa degradadora *P. pseudoalcaligenes* AR3 con otras dos bacterias no degradadoras, *Erythrobacter citreus* OG1 y OG2, en combinaciones de 2 y 3 cepas. Obtuvieron que el consorcio con 3 aislados presentó la mayor degradación de petróleo extraligero (44 °API) en medio marino sintético.

En el enfoque *top-down* también se podrían probar todas las combinaciones posibles entre un conjunto de n bacterias, empleando un método factorial completo (Box *et al.*, 2005). En este caso, se deberían probar $n! + 1$ combinaciones totales, lo cual sería útil para describir los efectos entre los candidatos del consorcio. Sin embargo, un método factorial completo tiene la desventaja de ser poco práctico cuando el número de candidatos es grande. Por ejemplo, para el caso de 6 bacterias, el número de ensayos totales serían 720, sin contar las réplicas. Esta aproximación factorial ha sido probada en el diseño de consorcios bacterianos

degradadores de HCs. Un ejemplo de ellos fue el diseño con 3 aislados recuperados de sedimentos marinos contaminados con petróleo (Ma et al., 2021). Se probaron las 7 combinaciones posibles entre *Acinetobacter junii* H11S-25, *Pseudomonas* sp. H11S-28 y *Nitratireductor* sp. H11S-31, en experimentos realizados durante 21 días de incubación en medio mineral ONR-7a con petróleo 1% (m/v), a 25 °C y 150 rpm. Se alcanzó una degradación máxima del 57.1% de petróleo combinando las 3 cepas, cuantificando por gravimetría.

Dada la imposibilidad de evaluar todas las combinaciones posibles de especies bacterianas en un consorcio cuando los números aumentan (Kong et al., 2018), se puede utilizar un enfoque combinatorio basado en métodos estadísticos (Lv et al., 2014; Mazzucotelli et al., 2014). Uno de estos métodos es el método factorial fraccional de Plackett-Burman (PB), que permite identificar los factores dominantes en un sistema a través del análisis de sus arreglos ortogonales (Box et al., 2005). Las aplicaciones del método PB incluyen la optimización de los parámetros de crecimiento del cultivo bacteriano (Jiang et al., 2013), el diseño de medios de cultivo microbiano (Ghanem & Al-Zahrani, 2016; Prajapati et al., 2014) y el establecimiento de parámetros que influyen en la remoción de metales por bacterias (Migahed et al., 2017). En el diseño de consorcios bacterianos, se ha utilizado PB para diseñar un consorcio bacteriano sintético para tratar las aguas residuales de la industria láctea (Mazzucotelli et al., 2014). En este caso, se redujeron 32,000 posibles combinaciones de cepas bacterianas para llevar a cabo solo 16 experimentos, lo que dio como resultado un consorcio diseñado de 4 bacterias aisladas con mayores niveles de degradación de contaminantes.

Hasta la fecha en que se realizó el presente trabajo, no había reportes del uso de PB en el diseño de consorcios bacterianos para la degradación de petróleo.

Tampoco se encontraron estudios de diseños de consorcios sintéticos en México, o con cepas aisladas en territorio mexicano.

1.7. Alcance del proyecto

- Este trabajo se presenta como un proyecto académico a nivel de microcosmos, en el cual se diseña el primer consorcio sintético de bacterias marinas de México con capacidad para degradar HCs del petróleo ligero. Se escogió este tipo de petróleo para el proyecto porque: 1) Se evidencia de manera más clara su biodegradación debido a que es el petróleo con mayor fracción alifática. Se estima que el petróleo ligero se compone de aproximadamente 60% de alifáticos, 25% aromáticos y 15% resinas y asfaltenos (PEMEX, 2019; Stauffer et al., 2008). 2) Alrededor del 40% del petróleo producido en el GdM es petróleo ligero (PEMEX, 2022) y se apuesta por aumentar su producción en los próximos años. 3) Los dos derrames de crudo registrados más grandes en el GdM, el DwH y el Ixtoc-I, han sido con petróleo ligero.
- Las condiciones de experimentación empleadas en microcosmos procuran aproximarse a las condiciones de agua de mar superficial, en respuesta a la persistencia de las manchas de petróleo que flotan luego de un derrame. Sin embargo, estas condiciones no describen plenamente los procesos que se llevan a cabo en mar abierto.
- En el presente trabajo se describe una estrategia basada en el enfoque estadístico y predictivo de PB, que involucra un diseño experimental utilizando 19 cepas bacterianas marinas nativas de una colección de cepas de nuestro laboratorio, y conduce a la selección final de los aislados más

importantes para la degradación del petróleo crudo ligero en agua de mar. El número de 19 se ajustó a limitaciones experimentales.

- El consorcio resultante, que constó de cuatro cepas bacterianas, mostró niveles mejorados de remoción y biodegradación, lo que sugiere interacciones sinérgicas entre los aislados. También se predicen de forma *in silico* las interacciones bacterianas durante la degradación y se presentan los genomas completos y anotados de estas bacterias.

2. HIPÓTESIS

Un consorcio bacteriano diseñado con un método factorial fraccionado con aislados marinos del Golfo de México y del Pacífico mexicano, exhibirá una dinámica poblacional e interacciones microbianas que promoverán la degradación de petróleo ligero como única fuente de carbono en agua de mar suplementada con nitrógeno y fósforo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Diseñar y caracterizar un consorcio bacteriano con capacidad de degradación de petróleo ligero en agua de mar.

3.2. Objetivos Específicos

1. Seleccionar 19 aislados dentro de un grupo de 111 para el diseño del consorcio mediante el método factorial de Plackett-Burman (PB).

2. Diseñar mediante el método PB un consorcio bacteriano capaz de degradar petróleo ligero en agua de mar.
3. Determinar la cinética de degradación de petróleo ligero con el consorcio diseñado.
4. Realizar un análisis de la dinámica comunitaria y predicción de interacciones entre las bacterias del consorcio durante la cinética de degradación de petróleo ligero.
5. Secuenciar los genomas de las bacterias que conforman el consorcio y analizarlos mediante genómica comparativa.
6. Elaborar un banco de datos a partir de secuencias de proteínas relacionadas con la degradación de hidrocarburos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Bacterias iniciales

Para diseñar el consorcio se partió de un conjunto de 111 aislados marinos recuperados de muestras de agua de mar y de sedimentos, en trabajos previos al presente estudio. Las muestras ambientales se tomaron de zonas expuestas al petróleo. 70 bacterias fueron aisladas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt) y por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) de muestras tomadas durante campañas del Consorcio de

Investigación del Golfo de México (CIGoM) en el GdM (Fig. 3, Anexo Tablas A1, A4 y A5). Los otros 41 aislados los obtuvo la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) de sedimentos en el Océano Pacífico frente a Puerto Rosarito (Baja California) (Anexo Tablas A2 y A3) (Silva-Jiménez et al., 2018). Una vez aisladas las bacterias, fueron preservadas en glicerol a -80°C .

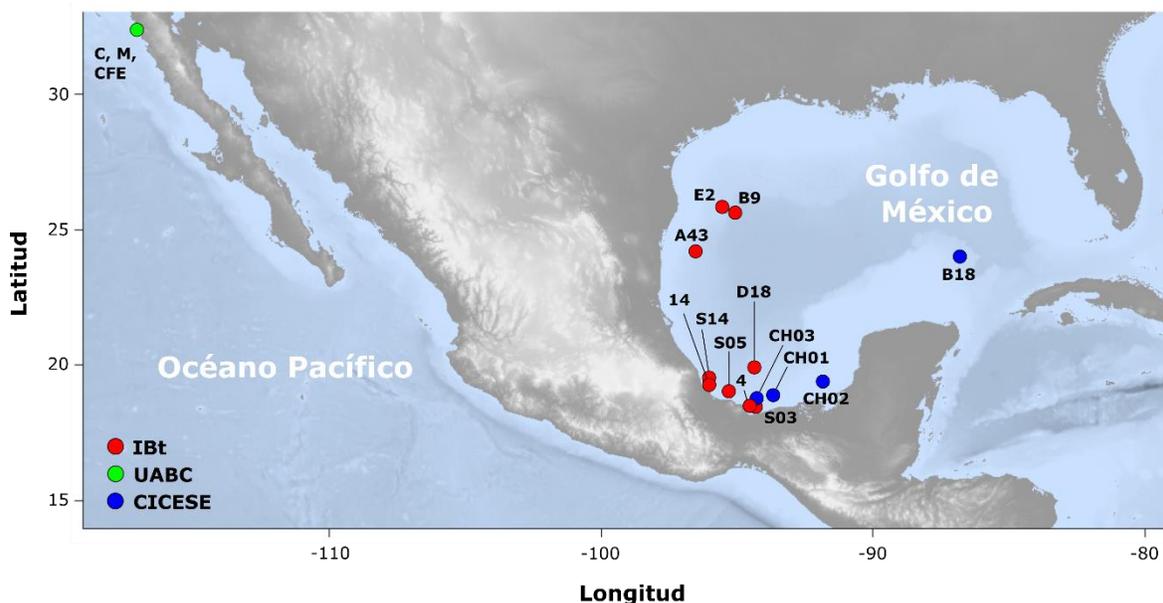


Figura 3. Sitios de muestreo de los 111 aislados marinos de muestras ambientales obtenidas en campañas del CIGoM y de la UABC, entre 2015 y 2017. Los nombres de los sitios corresponden a las estaciones descritas en Anexo Tablas A1-A5. En color se representan las instituciones que aislaron las bacterias.

La identificación taxonómica correspondió a estudios previos (Silva-Jiménez et al., 2018), y se realizó mediante de secuenciación del gen 16S (Anexo Tablas A1, A4 y A5), y por el sistema MALDI-Biobyper (Tabla A2 y A3). Entre los aislados se identificaron géneros asociados a la degradación de petróleo, tales como *Alcanivorax*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*.

4.2. Selección de 19 aislados para el diseño experimental de Plackett-Burman

Para la selección de las 19 bacterias se cultivaron los 111 aislados, por separado, con petróleo ligero como única fuente de carbono. Para esto, se prepararon los preinóculos en medio mineral basal (Muriel-Millán et al., 2019) con peptona y extracto de levadura al 0.3%, incubando 5 mL durante 24h a 30°C y 180 RPM. De allí se tomaron muestras de 50 µL de cultivo para inocular tubos de ensayo con 7 mL de agua de mar estéril, petróleo ligero 0.05%, cloruro de amonio y fosfatos (C:N:P de 100:10:1), con sus controles sin petróleo. El crecimiento de los 111 aislados se siguió durante 5 semanas, tomando alícuotas de 300 µL semanalmente y cuantificando proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Finalmente se escogieron los 19 aislados que presentaron mayor concentración de proteína durante el período de evaluación.

4.3. Identificación taxonómica por análisis del gen 16S ribosomal de los 19 aislados seleccionados

Los 19 aislados seleccionados se crecieron individualmente en medio LB, a 30°C y 180 RPM, en cultivos *overnight*. Se extrajo su DNA con el kit *Quick-gDNA mini prep* de Zymo Research (Irvine, CA, Estados Unidos), y se amplificó el gen 16S ribosomal utilizando la Taq polimerasa y los cebadores universales F27 y R1492. Se secuenciaron por Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA en el IBt, para su posterior identificación taxonómica con la base de datos de 16S del NCBI.

4.4. Diseño Experimental de Plackett-Burman

Los 19 aislados seleccionados se utilizaron como factores o variables (codificados de forma aleatoria como A, B, C, ... T) para alimentar el diseño experimental de PB. Los aislados se organizaron en una matriz ortogonal (Tabla 2) compuesta con valores de 1 (bacteria presente con concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL) y -1 (bacteria ausente), para un total de 20 experimentos o combinaciones (19 consorcios de 10 bacterias cada uno, y el control abiótico).

Tabla 2. Matriz de combinaciones del método PB para los 19 aislados seleccionados

Combinaciones	Aislados Bacterianos																		
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Para cada combinación descrita en la Tabla 2, las bacterias se hicieron crecer por separado, inoculando 50 mL de medio mineral basal (Muriel-Millán et al., 2019) con peptona y extracto de levadura 0.3%. Las células se recuperaron para una

concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL. Posteriormente se mezclaron las bacterias de cada combinación y se lavaron 3 veces con solución de $MgSO_4$ 10 mM con el fin de eliminar el medio mineral basal. Luego de conformar cada consorcio, se inocularon matraces con 20 mL de medio marino, compuesto por agua de mar filtrada ($0.22 \mu m$) y esterilizada en autoclave, petróleo ligero 0.5 g/L, y nitrógeno y fósforo como nutrientes (C:N:P 100:10:1). Cada consorcio se incubó a 180 RPM y $30^\circ C$ durante 75 días. Adicional a las combinaciones de la matriz de PB, se decidió probar un consorcio con todos los 19 aislados juntos para evaluar su remoción. Cada combinación se hizo por triplicado.

Luego de 75 días de incubación aeróbica, se determinó el porcentaje de remoción de HCs de cada combinación por gravimetría. El porcentaje de remoción por acción bacteriana de cada ensayo se calculó sustrayendo el valor de remoción del control abiótico. Para la extracción de HCs se empleó la extracción con diclorometano (DCM) (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) descrita en Muriel-Millán *et al.* (Muriel-Millán *et al.*, 2019). Se calcularon los efectos de cada aislado sobre la remoción con los porcentajes y se realizó un análisis ANOVA, con el software Design-Expert versión 7.0.0 (Stat-Ease Inc., MN, USA). Con los resultados de este análisis estadístico se identificaron las bacterias significativas para la remoción, las cuales conformaron el consorcio final.

4.5. Cinética de degradación de HCs y abundancia relativa de las bacterias que conforman el consorcio diseñado

Las bacterias significativas determinadas por el análisis de PB se crecieron de forma individual y en consorcio bajo las mismas condiciones de cultivo usadas en PB, con una concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL para cada aislado, por triplicado. Se siguió el crecimiento bacteriano midiendo el contenido de proteína total por el

método de Lowry (Lowry et al., 1951) durante los días 7, 15, 30, 50 y 75. Los HCs se extrajeron en los mismos días mediante extracción con DCM (Muriel-Millán et al., 2019). La remoción se estimó por gravimetría (W. Richter, 1997).

Los extractos de petróleo fueron enviados al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, para obtener la concentración de los *n*-alcanos C8-C38 y de los 12 hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) prioritarios como altos contaminantes para la Agencia de Protección Ambiental (EPA) por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), siguiendo el procedimiento descrito en (Rojas-Vargas et al., 2022). Con las concentraciones obtenidas (en $\mu\text{g/g}$) y los pesos de los extractos de HCs, se calcularon los porcentajes de biodegradación, restando en todos los días de muestreo el control abiótico como línea base.

4.6. Dinámica de poblaciones y predicción de interacciones microbianas

Se colocaron conjuntos adicionales de cultivos del consorcio final, al igual que los utilizados para la cinética de degradación. Se recuperaron células en los días 0, 7, 15, 30, 50 y 75 para determinar la dinámica de las poblaciones. La extracción de DNA total se realizó con el kit *ZymoBIOMICS DNA Miniprep* de Zymo Research (Irvine, CA, Estados Unidos). El DNA extraído se usó para amplificar las regiones V3-V4 del gen 16S usando polimerasa Taq con los cebadores Bakt_341F y Bakt_805R (Herlemann, et al., 2011). La amplicones se secuenciaron en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva del IBt (UUSM) en la plataforma de Illumina MiSeq. Para obtener las abundancias relativas se usó Flash v1.2.11 para concatenar las lecturas crudas (Magoč & Salzberg, 2011), y los fragmentos extendidos se agruparon con un 99% de similitud con CD-HIT (Li & Godzik, 2006).

La anotación taxonómica se realizó mediante Megablast (Ying Chen et al., 2015) con un e-value de 1×10^{-10} contra la base de datos ribosomal 16S del NCBI (02-2021). El perfil taxonómico se corrigió dividiendo por el número de copias del 16S (Stoddard et al., 2015).

Los datos de la abundancia bacteriana en el tiempo, obtenidos en el punto anterior, se analizaron en el simulador MetaMIS v1.02 (Shaw et al., 2016), el cual infiere las interacciones microbianas entre los aislados del consorcio a partir de un modelo de Lotka-Volterra.

4.7. Secuenciación, ensamblado de genomas, asignación taxonómica y filogenia

Para obtener los genomas completos, se hicieron crecer las bacterias del consorcio por separado en 50 mL de medio LB, 30°C y 180 RPM, en cultivos *overnight*. El DNA se extrajo con el kit *Quick-gDNA mini prep* (Zymo Research). Luego se secuenciaron en la UUSM mediante las plataformas Oxford Nanopore MinION e Illumina MiSeq (Illumina, Inc.). Los análisis primarios se realizaron según lo descrito en Rojas-Vargas *et al.* (Rojas-Vargas et al., 2022). Los ensamblados de los genomas *de novo* se hicieron con Unicycler v0.4.8 (Wick et al., 2017), el análisis de calidad con el programa QUAST y la integridad y contaminación con el software CheckM v1.1.3 (Parks et al., 2015). La anotación estructural y funcional se realizó con RASTtk (Brettin et al., 2015) en la plataforma de BV-BRC v.3.6.7 (Olson et al., 2022). Se buscaron plásmidos a partir de las secuencias crudas de Illumina con PLACNETw (Vielva et al., 2017) y a partir de los ensamblados con PLSDB v2021_06_23_v2 (Schmartz et al., 2022) usando los parámetros por defecto.

Los genomas completos se analizaron con Type (Strain) Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) para determinar la cepa tipo más cercana a las nuestras. Los genomas de estas cepas tipo se descargaron del NCBI y se utilizaron para calcular el ANI con JSpeciesWS basado en MUMmer (M. Richter et al., 2016), y la dDDH y la diferencia en porcentaje de contenido G y C con TYGS. Para afirmar que un aislado pertenecía a determinada especie, se debía cumplir con los criterios de porcentaje de ANI (Average Nucleotide Identity) > 96%, la hibridación DNA-DNA digital (dDDH) >70% y diferencia en contenido de G+C < 1% (Barco et al., 2020; Meier-Kolthoff & Göker, 2019).

Para la filogenia, se tomaron las diez cepas tipo más cercanas según TYGS para cada uno de los aislados del consorcio. Se descargaron sus genomas de NCBI y se extrajeron 92 genes marcadores de procariontes del grupo de genomas, con el software UBCG v3.0 (Na et al., 2018). El alineamiento de los genes marcadores, obtenido con UBCG, se usó para obtener un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud con IQ-TREE v2.0.3 (Nguyen et al., 2015) y 1,000 de *bootstrap*. En ambos programas se usaron los parámetros por defecto. Los genomas completos de control fueron *Labrenzia aggregata* CECT 4801 (GCA_001403915), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (GCA_000009045.1), y *Dietzia lutea* YIM 80766 (GCA_003096075.1), descargados del sitio web del NCBI (consultado el 12 de noviembre de 2022).

4.8. Comparación de sintenia

Se comparó la sintenia de los nuevos genomas completos con genomas (preferiblemente completos) de especies tipo filogenéticamente más cercanas según los resultados de TYGS, utilizando la herramienta Sibelia v3.0.7 con los parámetros por defecto. En este caso, se compararon contra los genomas de *A.*

xenomutans P40 (GCA_002072815.1), *H. aestusnigri* VGXO14 (GCA_002197985.1), *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 (GCA_021919345.1), y *P. aeruginosa* DSM 50071 (GCA_001045685.1), descargados del NCBI el 12 de noviembre de 2022.

4.9. Búsqueda de genes relacionados con la degradación

Se recopilaron y clasificaron las vías metabólicas involucradas en la degradación de alcanos, alquenos y aromáticos, y en la producción de biosurfactantes, de la literatura primaria y de 2 bases de datos curadas validadas experimentalmente: KEGG y MetaCyc (Krieger et al., 2004). Luego, la información molecular se combinó en un banco de datos como se describe en Rojas-Vargas et al. (2022) (Rojas-Vargas et al., 2022b). Las secuencias FASTA de las proteínas con demostración experimental que codifican estos genes se descargaron de Uniprot y NCBI, y se utilizaron como entrada para la anotación de los dominios de sus proteínas (PFams) utilizando InterProScan v.5.51-85.0 (Jones et al., 2014). Este banco de datos de proteínas se utilizó para anotar los genomas de las bacterias del consorcio usando el método de “*reciprocal best hit*” con Blastp (Ward & Moreno-Hagelsieb, 2014), usando como corte un porcentaje de identidad del 30% y un e-value de 1×10^{-10} .

4.10. Estudio de patogenicidad de las cepas del consorcio diseñado

Se evaluó la potencial patogenicidad de las cepas del consorcio como antecedente ante una posible aplicación en estrategias de biorremediación. El estudio se hizo mediante una aproximación bioinformática y otra experimental *in vivo*. En la primera aproximación, se usaron los genomas ensamblados para predecir la probabilidad de patogenicidad para humanos utilizando la herramienta PathogenFinder del *Center of Genomic Epidemiology* (Cosentino et al., 2013) con sus parámetros por

defecto. Un microorganismo se considera patógeno si la probabilidad calculada por el programa es superior al 0.70.

Para los ensayos *in vivo* se utilizó el modelo de *G. mellonella*, con larvas suministradas por el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM, Cuernavaca, Morelos, México). Siguiendo el protocolo de Cools et al. (2019), se probaron los aislados del consorcio, y se usaron como controles las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* DH5 α (proporcionadas por el CEIB), PBS estéril y sin inyección. Las cepas de control se hicieron crecer en medio LB líquido durante 4 horas a 37°C, 180 RPM, y se ajustó la DO600 a 0.6 (1×10^8 UFC/mL). Las cepas del consorcio se hicieron crecer bajo las mismas condiciones de cultivo usadas en PB, con una concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL para cada aislado. Luego se diluyeron todos los cultivos en PBS estéril hasta obtener 1×10^4 UFC/mL de cada cepa.

Tabla 3. Sistema de puntaje del Índice de Salud de la *G. mellonella*, adaptada de (Loh et al., 2013)

Categoría	Descripción	Puntaje
Actividad	Sin movimiento	0
	Movimiento mínimo con estimulación	1
	Movimiento con estimulación	2
	Movimiento sin estimulación	3
Formación de capullo	Sin capullo	0
	Capullo parcial	0.5
	Capullo total	1
Melanización	Larva negra	0
	Larva café o con puntos negros	1
	Larva beige con ≥ 3 puntos	2
	Larva beige con ≤ 3 puntos	3
	Sin melanización	4
Supervivencia	Muertas	0
	Vivas	2

Las larvas fueron infectadas con 100 UFC de cada cepa en 10 μ L de solución en PBS estéril, a través de una inyección en la última pata posterior izquierda con jeringas para aplicar insulina. Se inyectaron 5 larvas por cada cepa y las del control negativo con sólo PBS. Después de la inyección, las larvas se incubaron a 30°C y se les dio un puntaje en cada monitoreo para calcular un Índice de Salud (IS) (Loh et al., 2013). Este índice asigna un puntaje a las larvas, según 4 observaciones principales: movimiento, formación de capullo, melanización y supervivencia (Tabla 3). El puntaje máximo del IS es 10, cuando las larvas están sanas, y disminuye hasta cero a medida que las larvas van enfermando.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Selección de 19 aislados para el diseño experimental de PB

Se monitoreó la concentración de proteína de cultivos de los 111 aislados en agua de mar y petróleo ligero y nutrientes, con el método de Lowry, durante 5 semanas. Los valores máximos de concentración se reporta en Anexo Figura A1. Los 19 aislados con mayor concentración durante el período de evaluación se muestran en la Tabla 4, junto con sus datos de códigos para el diseño de PB, coordenadas marinas, profundidad e identificación taxonómica del 16S. Casi todos los aislados presentaron una máxima concentración de proteínas a la 4a semana de la cinética de crecimiento. Del conjunto seleccionado, 10 bacterias (53%) corresponden al Phylum Proteobacteria, 4 (21%) al de Actinobacteria, 3 (16%) al de Firmicutes y 2 (11%) al Bacteroidota. Todos los géneros identificados han sido reportados en la literatura con potencial capacidad de degradar HCs.

Tabla 4. Fuente e identificación de los 19 aislados

Fuente	No. Aislado	Código	Profundidad de la muestra	Prueba de Lowry		Organismo más cercano	Análisis 16S rRNA			
				Máx. [µg/ml] prot	Semana		Cober. De Consulta [%]	Valor E	Porcent. Ident. [%]	No. de acceso
Agua de mar GdM	79	A	1188 m	191.16	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	0.0	99.86	NR_117678.1
	80	J	1188 m	191.16	4	<i>Pseudomonas balearica</i>	100	0.0	99.71	NR_025972.1
	67	F	1188 m	160.08	4	<i>Pseudomonas balearica</i>	100	0.0	99.71	NR_025972.1
	68	K	1188 m	160.08	4	<i>Pseudomonas khazarica</i>	100	0.0	99.93	NR_169334.1
	76	N	1188 m	152.31	4	<i>Pseudomonas khazarica</i>	100	0.0	100.00	NR_169334.1
	83	O	1188 m	151.52	5	<i>Bacillus subtilis</i>	100	0.0	99.93	NR_027552.1
Sedimentos GdM	90	Q	330 m	145.22	5	<i>Bacillus aerius</i>	100	0.0	99.79	NR_118439.1
	19	D	187 m	200.49	3	<i>Bacillus megaterium</i>	100	0.0	99.79	NR_112636.1
	98	G	350 m	188.06	3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	0.0	99.49	NR_118798.1
	14	T	307 m	174.07	4	<i>Alloacalivorax dieselolei</i>	91	0.0	87.49	NR_074734.1
	20	B	187 m	156.97	4	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	99	0.0	99.93	NR_042505.1
	97	P	350 m	156.97	4	<i>Halopseudomonas aestusnigri</i>	99	0.0	99.86	NR_126210.1
	106	R	346 m	152.31	5	<i>Dietzia psychralcaliphila</i>	100	0.0	99.06	NR_112224.1
	15	E	308 m	150.76	4	<i>Halomonas denitrificans</i>	99	0.0	96.74	NR_042491.1
	18	C	187 m	113.54	3	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	99	0.0	99.93	NR_042505.1
	16	S	275 m	113.54	4	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	98	0.0	95.07	NR_027199.1
Sedimentos Pacifico	63	H	20 m	156.97	4	<i>Pseudomonas balearica</i>	99	0.0	99.78	NR_025972.1
	66	L	15 m	150.76	4	<i>Rhodococcus ruber</i>	100	0.0	99.93	NR_026185.1
	28	M	15 m	150.76	4	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	99	0.0	98.95	NR_026468.1

Proteobacteria (53%)

Firmicutes (16%)

Actinobacteria (21%)

Bacteroidota (11%)

5.2. Selección de los aislados del consorcio mediante PB

Luego de seleccionar los 19 aislados con mayor crecimiento, se procedió a realizar el montaje de experimentos según el método de PB (Tabla 2, sección 4.4). Luego de 75 días de incubación, los porcentajes de remoción por acción bacteriana obtenidos para las 20 combinaciones se muestran en la Figura 4A, y los porcentajes sin la normalización se muestran en el Anexo Figura A2. La máxima remoción de petróleo ligero debida a la acción bacteriana fue de ~46% (combinación 5), mientras que otros valores estuvieron cercanos al control abiótico ~0% (ej. combinación 14). Estos resultados indican que la remoción de HCs se vio favorecida con algunos consorcios, pero también sugiere que en las muestras que presentaron menores porcentajes de remoción pudieran estar ocurriendo interacciones competitivas entre algunos aislados, o producción de metabolitos secundarios que inhiban el crecimiento de otros miembros, como se ha reportado en estudios previos de consorcios (Yu Chen et al., 2014; Freilich et al., 2011).

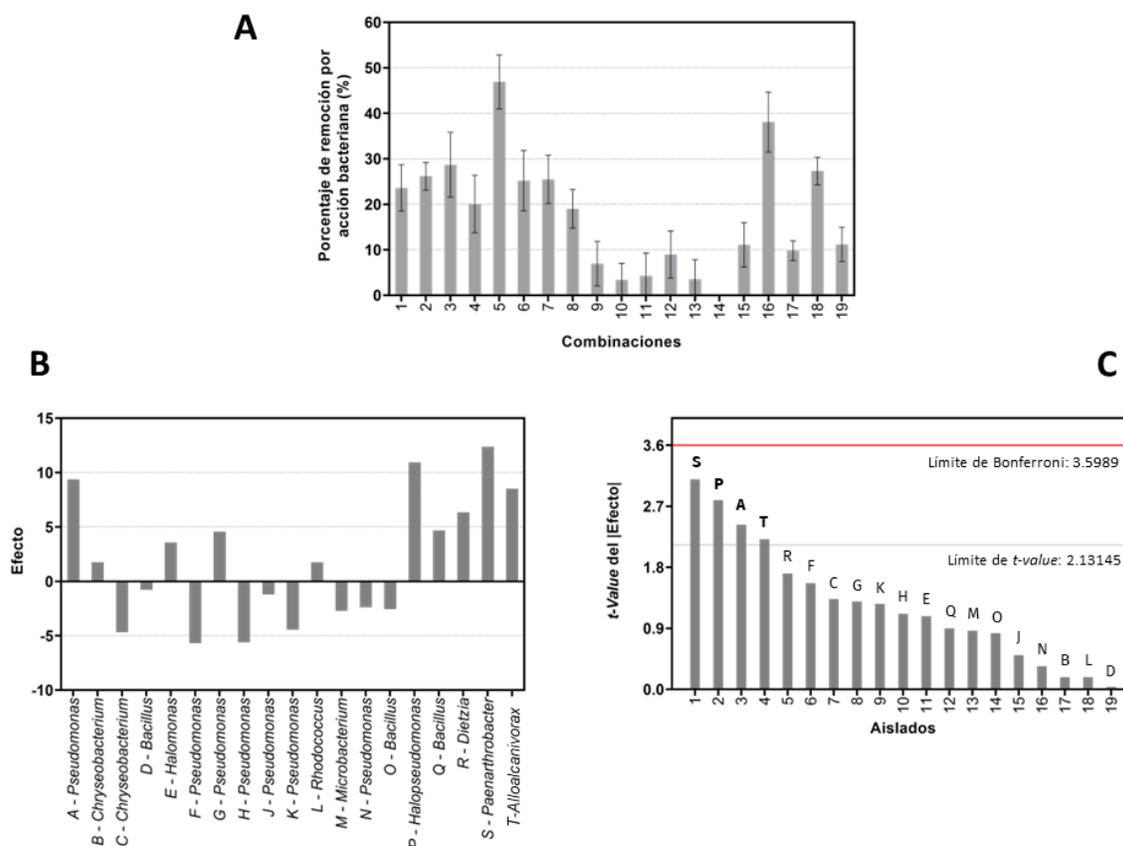


Figura 4. Resultados del diseño experimental de PB. **A.** Porcentajes de remoción bacteriana de las combinaciones de PB. Las barras de error representan ± 1 la desviación estándar. $n=3$. **B.** Efectos calculados de los aislados sobre la remoción. **C.** Diagrama de Pareto de los efectos de los aislados.

Con el experimento adicional combinando todas las 19 cepas se obtuvo un porcentaje de remoción del $10,76 \pm 4,68$. Aunque este experimento no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico de PB, fue útil para sugerir que las interacciones entre todas las bacterias seleccionadas, bajo las condiciones de experimentación utilizadas, no favorecieron la remoción, en comparación con otros consorcios de 10 aislados probados. De tal manera que no siempre, a un mayor número de bacterias degradadoras en un consorcio, habrá una mayor remoción de HCs.

Una comparación cualitativa de algunos extractos de petróleo total recuperados luego de los 75 días se observa en la Figura 5. Se evidencia el cambio de coloración entre las muestras de las combinaciones relacionadas, lo cual es un indicio de la concentración de HCs disueltos en el DCM. La muestra de la combinación 5, con el mayor porcentaje de remoción bacteriana del ensayo, es la muestra más clara del conjunto. Por su parte, la muestra del control abiótico es la más oscura.



Figura 5. Diferencia cualitativa en el color de algunos extractos obtenidos en el experimento de PB luego de 75 días de incubación: combinación 5 (código 23), combinación 10 (47), combinación con todos los 19 aislados (97) y control abiótico (102). Cada extracto total fue diluido en 1 mL de DCM luego de ser deshidratado en columnas de sulfato de sodio.

Con el software Design-Expert 7.0.0 se analizaron los resultados de las remociones del experimento de PB. Los efectos “E” calculados para cada aislado exhibieron valores positivos y negativos (Fig. 4B), siendo los positivos más altos para las cepas A (*Pseudomonas*), P (*Halopseudomonas*), S (*Paenarthrobacter*) y T (*Alloalcanivorax*). Llevando las magnitudes de “E” a un diagrama de Pareto (Fig. 4C), se identificaron los aislados estadísticamente significativos en la remoción. Teniendo como líneas de referencia los límites para *t-value* y la prueba de

Bonferroni (Fig. 4C), se determinó que los 4 aislados con los efectos positivos más altos son los significativos y se seleccionaron para conformar el consorcio final.

5.3. Remoción de hidrocarburos y biodegradación

Se hizo el montaje de las cinéticas con las cuatro bacterias seleccionadas, crecidas individualmente y en consorcio. De forma individual, para evaluar la preferencia de cada aislado hacia ciertos HCs. Los resultados se muestran a continuación:

5.3.1. Crecimiento bacteriano y remoción de hidrocarburos

Los cuatro aislados pudieron crecer individualmente y en consorcio en agua de mar suplementada con nutrientes y petróleo ligero (Fig. 6). De manera individual, las curvas de concentración de proteína muestran que la *Pseudomonas* y la *Paenarthrobacter* tuvieron sus máximos valores en el día 30 y luego disminuyeron (Fig. 6A). Esto indica una reducción en su crecimiento, aunque algunas de sus células siguieron teniendo un metabolismo activo según los resultados por cromatografía de gases que se exponen más adelante (Rojas-Vargas et al., 2022a). La *Halopseudomonas* también presentó una disminución entre los días 30 y 50, y luego un crecimiento entre los días 50 y 75. Y aunque no hay diferencias significativas entre las concentraciones de los días 30, 50 y 75, la variación se puede deber a que tuvo acceso a otros hidrocarburos que pudo consumir entre los días 50 y 75. En el caso de la *Alloalcanivorax* aumenta su concentración hasta el día 75 con tendencia asintótica. La curva de concentración del consorcio alcanzó la fase estacionaria en el día 15 (Fig. 6C). Posterior a esto, presentó un comportamiento similar al de la *Halopseudomonas*, decreciendo un poco para el día 50 y volviendo a aumentar para el día 75. Sin embargo, el cambio en estos días tampoco presentó diferencias significativas.

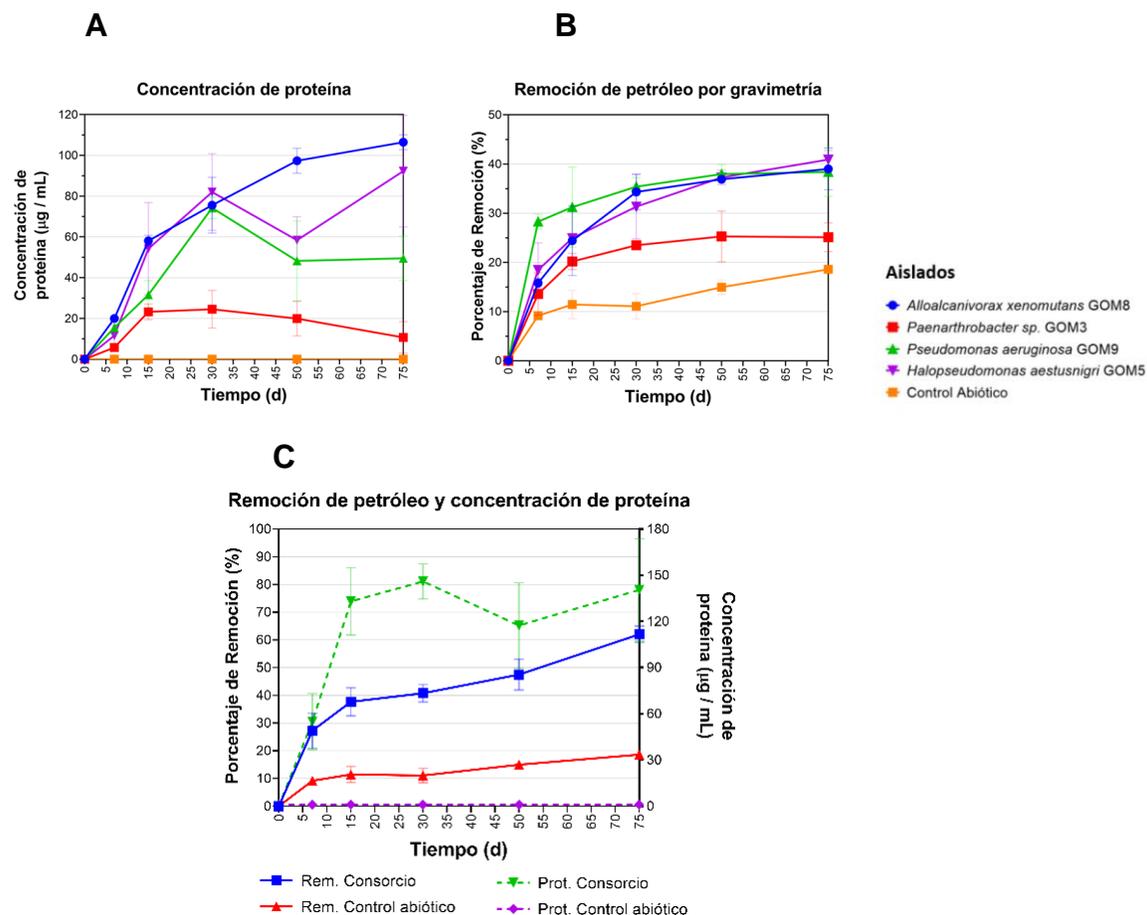


Figura 6. Resultados de concentración de proteína por Lowry y remoción de HCs por gravimetría. **A.** Concentración de los aislados crecidos individualmente. **B.** Remoción de HCs de los aislados crecidos individualmente. **C.** Resultados de las bacterias crecidas en consorcio. Las barras de error representan ± 1 la desviación estándar. $n=3$

Los porcentajes de remoción obtenidos por gravimetría muestran que la *Pseudomonas* (Fig. 6B) fue la que más rápido removió petróleo durante los primeros 7 días en comparación con los otros aislados. Esto se explicaría, porque como se describe más adelante, este aislado es el que tiene mayor densidad de genes

asociados a la degradación de hidrocarburos. Con el paso de los días la *Alloalcanivorax* y la *Halopseudomonas* fueron igualando sus niveles de remoción, alcanzando con la *Pseudomonas*, ~40% para el día 75. La *Paenarthrobacter*, representada en la línea roja, fue el aislado con los menores porcentajes de remoción, alcanzando ~25% al día 75. Todas las curvas de remoción no presentaron diferencias significativas entre los valores del día 50 y del día 75, indicando una tendencia asintótica de las curvas.

Por su parte, en consorcio, se alcanzó ~62% de remoción (Fig. 6C). Restándole el control abiótico en este día (~18%), el resultado de remoción por acción bacteriana es del ~44%, un valor comparable al obtenido con la mejor combinación de PB (~46%) que consta de diez aislados bacterianos (combinación 5 en Tabla 1). El obtener una remoción similar con un consorcio con menos miembros, representa una ventaja biotecnológica que se logró con la aplicación del método factorial de PB. Un consorcio reducido en su número de miembros se traduce en una reducción de tiempo y de recursos empleados para obtener los mismos resultados.

5.3.2. Biodegradación de hidrocarburos

En consorcio, la máxima biodegradación de los *n*-alcanos C8-C38 alcanzada fue ~60% en el día 30 y disminuyó hasta ~45 % el día 75 (Fig. 7). Los porcentajes de biodegradación obtenidos en consorcio fueron comparables con los máximos obtenidos por las cepas individuales, indicando que no disminuyó el porcentaje de biodegradación en conjunto (Fig. 8).

Analizando los niveles de biodegradación de los subgrupos de los *n*-alcanos, presentados en la Figura Suplementaria S2 de la publicación de Rojas-Vargas et al. (2022a) sobre este trabajo, se sugiere que la *Pseudomonas* cumplió un papel clave

en la biodegradación de esta fracción durante los primeros días de la cinética del consorcio.

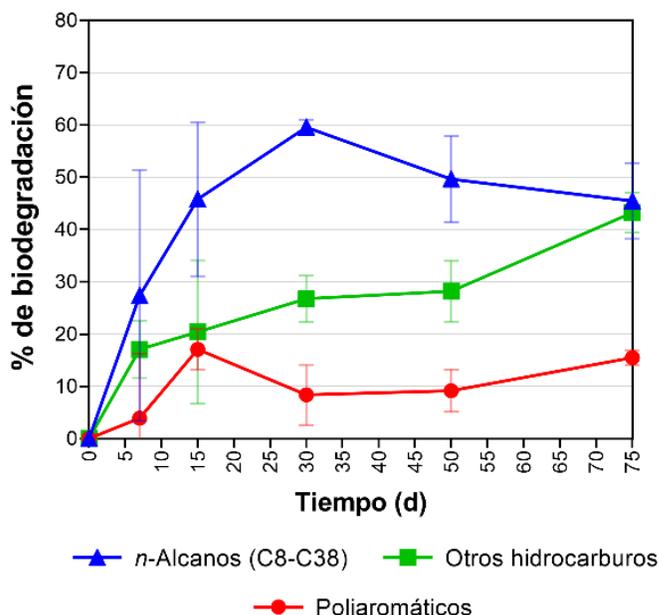


Figura 7. Resultados por CG-MS para la cinética de degradación con el consorcio. Las barras de error representan ± 1 la desviación estándar. $n=3$

De forma individual, la *Pseudomonas* consumió más rápido las fracciones C23-C27, C28-C32 y C33-C38 en los primeros 7 días. Suponiendo que en el consorcio tuvo este mismo comportamiento, el rápido consumo de estas fracciones aumentaría la biodisponibilidad de otros hidrocarburos. Sin embargo, junto con la *Alloalcanivorax*, la *Pseudomonas* exhibió un perfil de biodegradación de C13-C17 comparable en todos los 75 días, indicando posibles relaciones de competencia entre ambas especies durante el consumo de esta fracción en consorcio. Por su parte, la *Alloalcanivorax* presentó individualmente porcentajes de biodegradación más altos en la fracción C18-C22 entre los días 15 al 30, con lo cual se infiere que pudo haber consumido más rápido estos HCs que los demás aislados en consorcio.

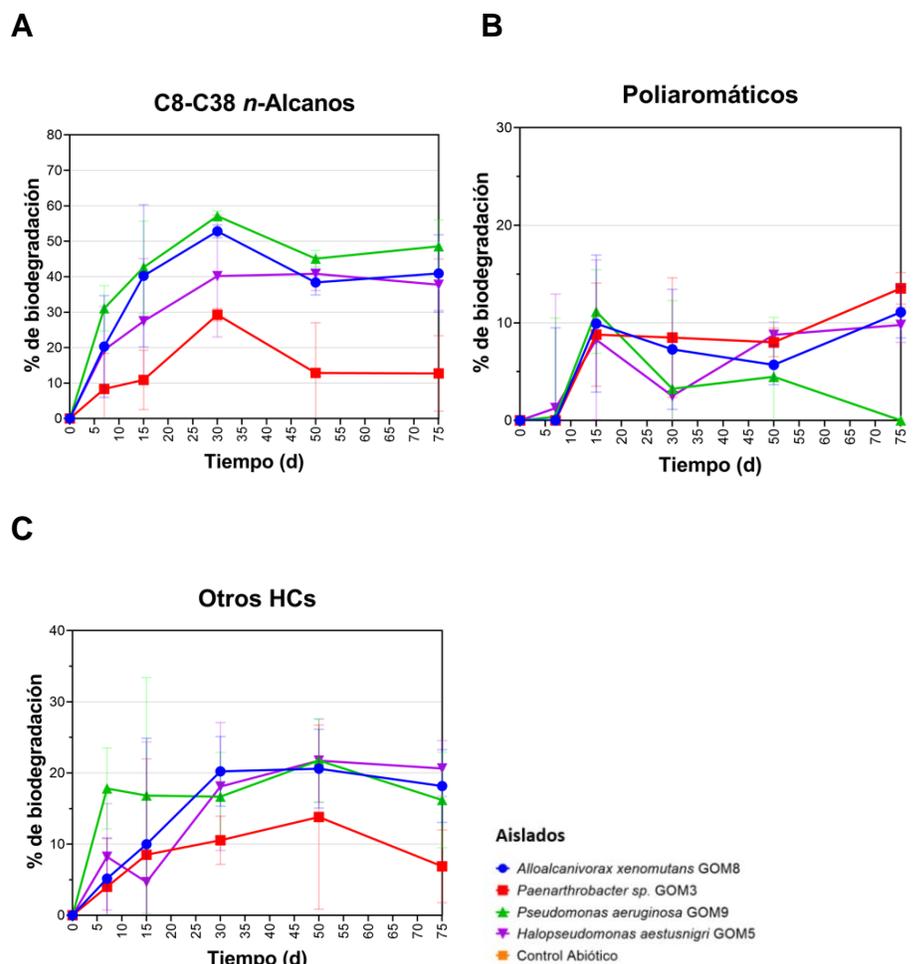


Figura 8. Resultados por CG-MS para la cinética de degradación con los aislados crecidos individualmente. **A.** C8-C38 *n*-alcanos. **B.** Poliaromáticos. **C.** Otros HCs. Las barras de error representan ± 1 la desviación estándar. $n=3$

Adicionalmente, la *Halopseudomonas* presentó un perfil de biodegradación similar a la *Alloalcanivorax* durante los primeros 7 días en todas las fracciones de C8-C38. Sin embargo, sus niveles de biodegradación posteriores más bajos indican que consumió más lento estos HCs. Finalmente, la *Paenarthrobacter* presentó curvas de biodegradación de C28-C32 y C33-C38 comparables con la *Halopseudomonas* los primeros 30 días en las cinéticas individuales, exhibiendo luego un

decrecimiento en sus niveles. En todas las demás fracciones la *Paenarthrobacter* presentó niveles de degradación inferiores. Como se describirá más adelante, el genoma de este aislado no contiene los genes monooxigenasas *alkB* o *almA*, los cuales se han identificado enormemente en organismos degradadores de alifáticos. Sin embargo, cuenta con 3 genes homólogos a la monooxigenasa *ladA*, reportada en organismos como *Geobacillus thermodenitrificans* y *Pseudomonas fluorescens* para la degradación de *n*-alcanos C10-C36 (Ji et al., 2013).

El otro grupo de hidrocarburos analizados por CG-MS fueron 12 poliaromáticos (PAHs) de prioridad ambiental. El consorcio exhibió un comportamiento comparable con los máximos obtenidos con las cinéticas individuales de *Alloalcanivorax* y *Paenarthrobacter* (Fig. 7 y 8B), con porcentajes de biodegradación inferiores a los obtenidos con el análisis de los alifáticos lineales. El máximo alcanzado fue de ~16% en el día 75. De forma particular, la *Pseudomonas* alcanzó un máximo de biodegradación de ~11 % en el día 15, pero luego disminuyó posteriormente hasta un valor insignificante en el punto final. Con lo anterior se infiere que este aislado pudo haber tenido un papel menos importante en la degradación de PAHs luego de los 15 días en el consorcio, comparado con las otras cepas.

Realizando un balance de materia se determinó la biodegradación de todos los demás HC que no fueron analizados o no resueltos por GC-MS (alcanos ramificados y cíclicos, alquenos, monoaromáticos, resinas, etc.). El perfil de biodegradación de estos HC, denominados “otros”, reveló un máximo de alrededor de ~20 % para *Halopseudomonas*, *Alloalcanivorax* y *Pseudomonas*, y ~11% para *Paenarthrobacter*, en el día 50 (Fig. 8C). A diferencia del consorcio, con el cual se sobrepasó el 20% luego del día 15, y alcanzó un máximo de ~46% en el día 75 (Fig. 7). Con este grupo de “otros HCs” se infiere que combinando las 4 cepas

significativas se mejoraron los niveles de biodegradación de algunos hidrocarburos no cuantificados con patrones por CG-MS, trabajando de forma sinérgica.

5.4. Dinámica de poblaciones e interacciones microbianas

Se utilizaron los análisis de amplicones (Anexo Tablas A6-A7) para estudiar la dinámica de poblaciones de los aislados seleccionados durante la biodegradación de HCs en consorcio. Las lecturas de los amplicones obtenidas con MiSeq Illumina fueron de buena calidad para el análisis bioinformático, ~70 % de las secuencias tenían $\geq Q20$ (Anexo Tabla A5). Las abundancias relativas a nivel de género se muestran en la Fig. 9A. Para el día 7, el género *Alloalcanivorax* había desplazado en gran medida las poblaciones de *Pseudomonas* y *Paenarthrobacter*, y, a partir de ese momento, las abundancias relativas de las cuatro cepas se mantuvieron poco variables.

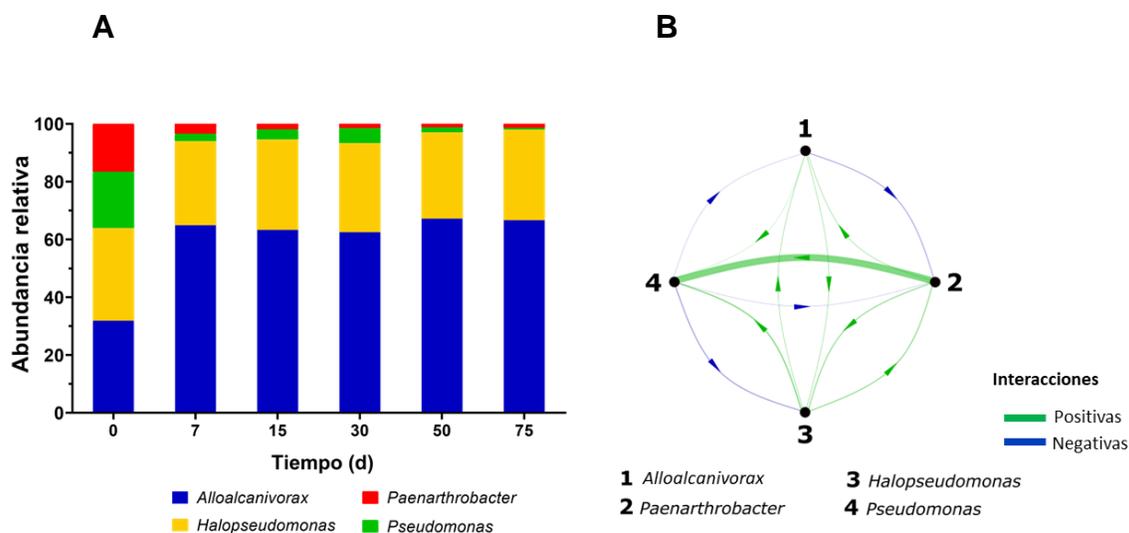


Figura 9. Dinámica poblacional e interacciones microbianas durante la degradación de petróleo ligero. **A.** Abundancia relativa normalizada de los 4 aislados. **B.** Interacciones microbianas predichas por MetaMIS.

Dicha característica permitió suponer que, en ese período de 7 días de adaptación de las poblaciones, los aislados estarían definiendo sus roles en el contexto de la degradación, justamente cuando ocurrió la mayor caída en la concentración de los hidrocarburos, según lo evidenciado por gravimetría y por los análisis cromatográficos. La abundancia relativa de *Halopseudomonas* permaneció esencialmente sin cambios.

Posteriormente se infirió una red de interacciones consenso entre los miembros del consorcio, utilizando los valores de abundancias relativas de la dinámica poblacional con la herramienta MetaMIS (Shaw et al., 2016) (Fig. 9B). De acuerdo con esta simulación, hubo ocho interacciones positivas y cuatro negativas entre las cepas, lo que indica que las relaciones fueron más cooperativas que competitivas en general. Esto se puede explicar por la naturaleza misma del petróleo, conformado por miríadas de HCs.

La interacción más fuerte fue positiva, de *Paenarthrobacter* a *Pseudomonas* (Fig. 9B). *Pseudomonas* tuvo una influencia negativa en todos los demás miembros del consorcio, probablemente debido a interacciones de competencia por los mismos recursos de HCs, como se mencionó en la anterior sección sobre los alcanos lineales; la interacción negativa restante fue de *Alloalcanivorax* a *Paenarthrobacter*, sugiriendo relaciones de competencia por algunos recursos. *Alloalcanivorax* y *Paenarthrobacter* exhibieron patrones de biodegradación similares para algunos HAP como 1-metil-9H-fluoreno, fluoreno y 2,6-dimetilnaftaleno, durante los primeros 15 días (ver Figura complementaria S3 de Rojas-Vargas et al., 2022a), y para las fracciones de alcano C23-C27 y C33-C38 durante los primeros siete días (Figura complementaria S2).

5.5. Genomas de cepas seleccionadas

Para obtener información sobre la maquinaria metabólica de las cepas que conforman el consorcio, se obtuvieron los genomas de cada aislado mediante una estrategia híbrida de Illumina y Oxford Nanopore. Las estadísticas de cada uno (Tabla 5) sugieren ensamblajes de buena calidad en un solo *contig*, con lo cual se pudo hacer un análisis comparativo y de potencial metabólico de cada uno.

Tabla 5. Estadísticas de los ensamblajes híbridos

Características	Aislados			
	<i>Alloalcanivorax</i>	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Halopseudomonas</i>
Tamaño (pb)	4,528,424	4,464,400	6,889,943	3,996,286
No. Contigs	1	1	1	1
Contenido GC (%)	61.62	63.16	66.03	60.61
Sesgo G+C (%)	0.31	-0.20	0.04	0.19
Integridad (%)	100.00	99.71	99.68	100.00
Contaminación (%)	0.19	0.39	0.19	0.52
Densidad codificante	0.90	0.91	0.89	0.90
16S RNA	2	6	4	4

La anotación con RASTtk indicó una densidad codificante del 90% en promedio para las 3 bacterias, valor típico entre procariontes (Koonin & Wolf, 2008), y el número completo de copias del gen 16S esperado para cada organismo. Una representación circular del cromosoma de cada bacteria se observa en la Figura 10. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de cada genoma.

Con la herramienta PLACNETw (Vielva et al., 2017) se hizo la búsqueda de posibles plásmidos. PLACNETw ensambla las lecturas crudas de Illumina con Velvet (Zerbino & Birney, 2008), selecciona la longitud del *kmer* óptimo, compara los contigs con la base de datos de NCBI y las secuencias codificantes son definidas con Prodigal. Finalmente representa los *contigs* de los ensamblajes en redes como la

Figura 11. Los nodos de color azul, rojo y/o verde de la red son los *contigs*, mientras que los naranjas son las referencias. El color rojo indica que el *contig* es homólogo a genes de relaxasas, el verde a genes de relaxasas y replicación, y el azul a otras funciones (Vielva et al., 2017). Los potenciales plásmidos se pueden identificar visualmente como redes pequeñas separadas de la red mayor. Según PLACNETw, ninguno de los 4 genomas del consorcio tendría plásmidos, porque no hay redes adicionales a las del cromosoma.

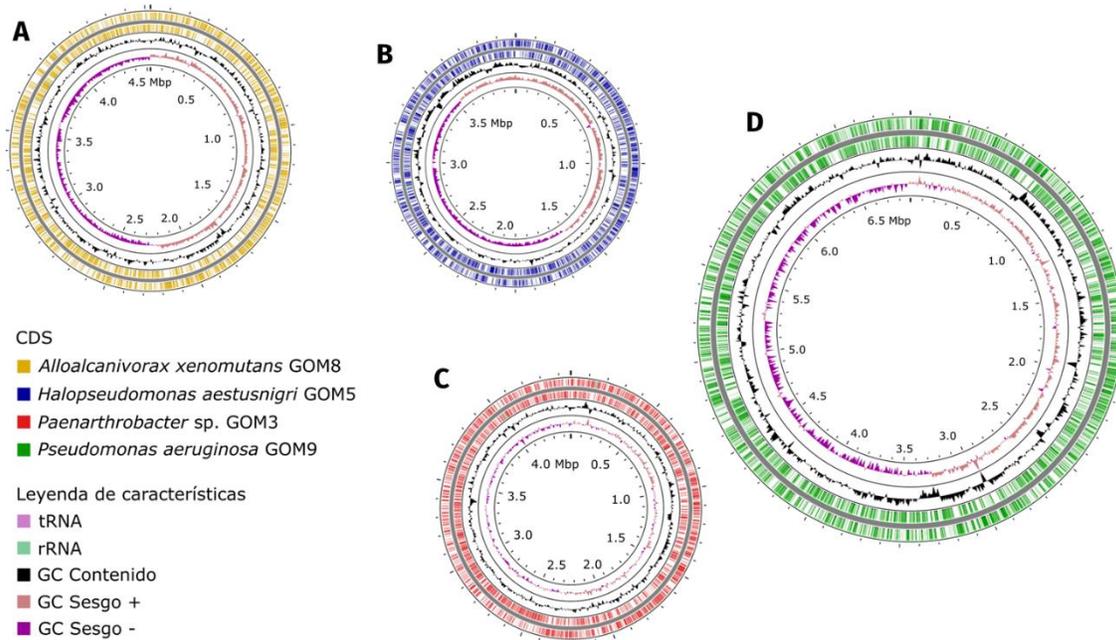


Figura 10. Representación circular de los genomas completos de las bacterias del Consorcio. **A.** *Alloalcanivorax xenomutans* GOM8. **B.** *Halopseudomonas aestusnigri* GOM5. **C.** *Paenarthrobacter* sp. GOM3. **D.** *Pseudomonas aeruginosa* GOM9. Graficados en CG-Viewer.

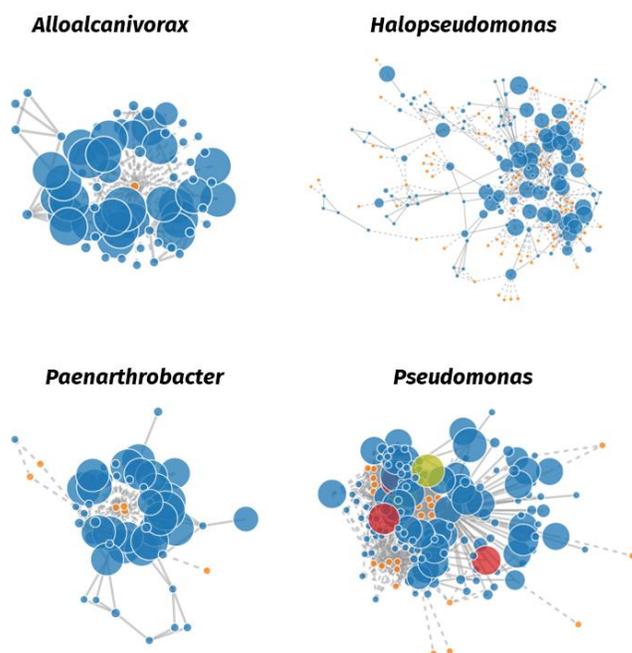


Figura 11. Genomas reconstruidos con PLACNETw para la búsqueda de plásmidos. Ningún plásmido fue identificado para los 4 genomas.

Se utilizó la herramienta PLSDB (Schmartz et al., 2022) para buscar secuencias plasmídicas incorporadas en los genomas completos ensamblados con Unicycler. Solamente se detectaron este tipo de plásmidos en el genoma de la *Pseudomonas*. El primer plásmido encontrado correspondió al pKLC102 (103.532 pb, NC_019202.1) encontrado como isla genómica en una cepa de la misma especie ((Klockgether et al., 2004). Se identificaron 111 de los 114 genes de la isla, junto a 33 genes adicionales de forma continua (CDS 4'761.877-4'898.002), para un total de 144 genes flanqueados por dos genes de tRNA (Lys). Los 111 genes presentan porcentajes de identidad superiores al 99.9% y *e-value* de cero contra los genes de referencia. Los tres genes que no se detectaron codifican para proteínas con función desconocida; una con dominio DUF2845 (CDS 64.889-65.200) y otras dos proteínas hipotéticas (CDS 7.039-7.485, 99.396-99.752). Klockgether y colaboradores encontraron que el plásmido pKLC102 se caracteriza por ser un híbrido de origen

plasmídico y de fagos. El linaje del plásmido confirió genes para la replicación, partición y conjugación, incluido un grupo de *pil* que codifica pili sexuales delgados tipo IV y un gen de glucano sintetasa que es un determinante importante para el tropismo y la virulencia del huésped. El linaje del fago confirió integrasa y un conjunto de genes hipotéticos (Klockgether et al., 2004), todos encontrados en el genoma de nuestra *Pseudomonas*. Entre los 33 genes adicionales (CDS 4'768.337-4'769.588, 4'803.066-4'803.200, 4'813.194-4'846.350), se encontraron algunos que codifican potencialmente para diez proteínas hipotéticas, para una transposasa, una porina, tres fago-integrasas, dos oxidoreductasas y una peroxiredoxina *OsmC*, entre otros.

El segundo plásmido incorporado en el genoma de la *Pseudomonas* es uno predicho por primera vez *in silico* en 2019 en el genoma completo de la cepa de *P. aeruginosa* HOU1 (167.069 pb, NZ_CP042268.1) (Spinler et al., 2019). El plásmido de la HOU1 se obtuvo durante la construcción del genoma híbrido de la cepa con Unicycler en modo normal, partiendo de las lecturas crudas de Illumina MiSeq y Oxford Nanopore, método similar al usado en el presente trabajo. La diferencia estuvo en que Spinler et al. obtuvieron lecturas de 150 pb, en lugar de 300 pb. Unicycler normaliza la profundidad de las lecturas con el valor de profundidad media, y toma como potenciales plásmidos las secuencias con profundidades normalizadas superiores a 1 x (Wick et al., 2017). Este método de predicción está sujeto a sesgos en la secuenciación. En el genoma de la *Pseudomonas* se encontraron 144 de los 156 genes del plásmido (con porcentajes de identidad y cobertura superiores al 99%), junto a 18 genes adicionales, de forma continua (CDS 1'841.520 y -2'016.482), e incorporados entre cuatro genes de rRNA (-Val-TAC y -Asp-GTC). Entre los genes adicionales (CDS 1'945.499- 1'965.158), se incluyen algunos para la biosíntesis de bloques de unión del antígeno O derivado de UDP-N-acetilglucosamina (*wbpABEDIG*), una transposasa y una aciltransferasa. Dentro

de los genes que no se encontraron (CDS 100.365-100.645, 134.817-147.750) está uno que codifica para endonucleasa, algunos para proteínas hipotéticas, para la biosíntesis de polisacáridos (*WecB*, *WbjB*) y lipopolisacáricos (*LapA*), entre otros. Los genes del plásmido de HOU1 también se encontraron incorporados en los cromosomas de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 (GCA_001045685.1) y GOM1 (GCA_006802095.1). En estas cepas no se encontraron estas secuencias como plásmidos extracromosomales (Muriel-Millán et al., 2019; Nakano et al., 2015).

5.6. Asignación taxonómica y filogenia

Usando TYGS y JSpeciesWC se calcularon algunos criterios filogenómicos comparando con las cepas tipo más cercanas (Tabla 6). El aislado de *Alloalcanivorax* cumple con todos los parámetros de comparación utilizados para ser identificada como *Alloalcanivorax xenomutans*. La *Halopseudomonas* también cumple para ser identificada como *Halopseudomonas aestusnigri* (Rojas-Vargas et al., 2002c). Con la *Paenarthrobacter* no se pudo inferir a qué especie pertenece porque no cumple con la métrica de dDDH > 70%, pero se sugiere, como en el artículo de Rosas-Díaz et al. (Rosas-Díaz et al., 2021) que puede ser una nueva especie. Finalmente, la *Pseudomonas* cumple con los criterios para ser considerada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 6. Asignación taxonómica con los genomas completos.

Aislado	Cepa tipo	ANIm (%)	Alin. (%)	dDDH (d4)	Dif. Cont. G+C (%)
<i>Alloalcanivorax</i>	<i>Alloalcanivorax xenomutans</i> P40	99.44	92.74	93.9	0.03
<i>Halopseudomonas</i>	<i>Halopseudomonas aestusnigri</i> VGXO14	97.01	87.22	73.1	0.31
<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i> DSM 20126	85.04	53.59	25.5	0.05
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	99.43	87.55	94.9	0.45

ANI > 96%, Alineamiento > 80%, dDDH > 70, Dif. Cont. G+C < 1%

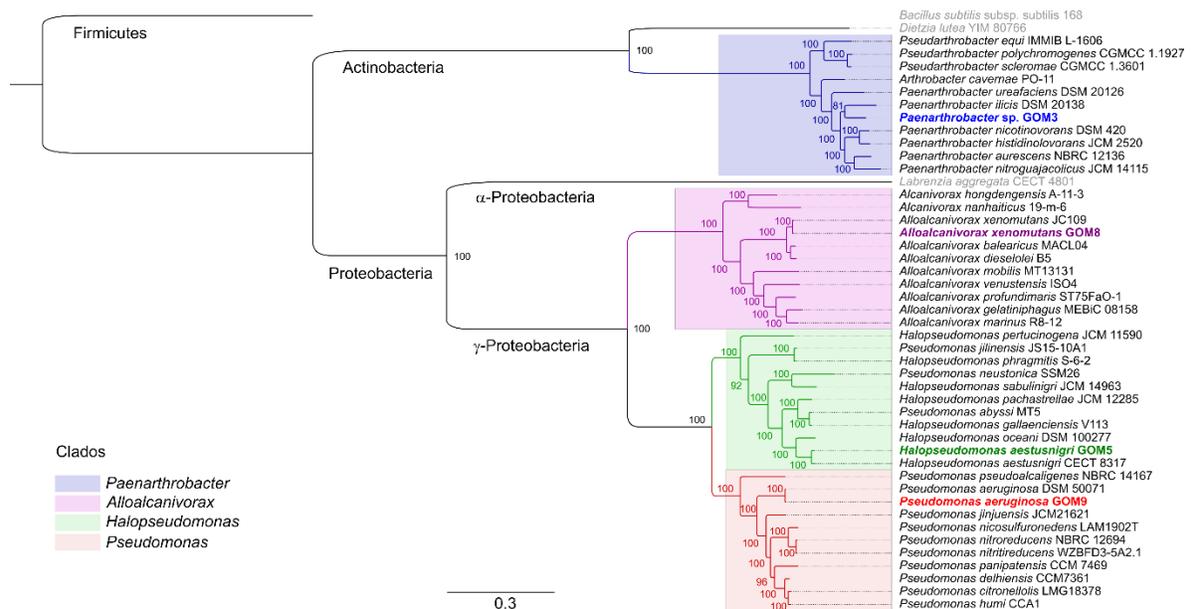


Figura 12. Reconstrucción filogenética con 92 genes marcadores de procariontes. Los genomas del consorcio están resaltados en negrita.

Luego de extraer y obtener el alineamiento de 92 genes marcadores de procariontes de los genomas descritos para la reconstrucción filogenética, se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud con IQ-TREE (Fig. 12). Se observa la formación de 4 clados diferenciados para cada uno de los genomas del consorcio, con ramas bien soportadas. Un clado para la *Paenarthrobacter*, perteneciente al Phylum Actinobacteria, y otros para la *Alloalcanivorax*, *Halopseudomonas* y *Pseudomonas*, ubicados en el Phylum Proteobacteria. Los genomas de *A. xenomutans* GOM8, *H. aestusnigri* GOM5 y *P. aeruginosa* GOM9 se agruparon con los genomas de su misma especie y una longitud mínima de las ramas, corroborando la asignación taxonómica obtenida por los criterios filogenómicos. La *Paenarthrobacter* sp. GOM3 se agrupó con la *Paenarthrobacter illicis* DSM 20138. Sin embargo, sus ramas son más largas, acorde al hecho de ser una nueva especie.

5.7. Genómica comparativa

Se comparó la sintenia de los genomas completos del consorcio contra genomas de referencia de la misma especie, que tuviesen genomas cerrados de preferencia.

- ***A. xenomutans* GOM8 / *A. xenomutans* P40:** Los dos genomas comparten 9 bloques sinténicos, los cuales cubren el 99.96% del genoma de la GOM8 y el 98.31% de la P40 (Anexo Fig. A3). En la región no compartida de la P40, se encontraron 30 genes sin ortólogos en la GOM8, no así en caso contrario. Entre estos genes se incluye un citocromo P450 (CDS 2'152.138-2'153.550) no encontrado en el genoma de la GOM8 y cuyos ortólogos se han asociado a la degradación de hidrocarburos (Moreno & Rojo, 2019), una transposasa *InsK* y algunas proteínas hipotéticas.
- ***H. aestusnigri* GOM5 / *H. aestusnigri* VGXO14:** Estos genomas comparten 32 de 34 bloques sinténicos, cubriendo el 88.64% del genoma de GOM5 y el 87.06% de la VGXO14 (Anexo Fig. A4). En las regiones no compartidas de la GOM5, se encontraron genes sin ortólogos en la VGXO14. Entre estos genes se comprenden proteínas de fagos (estructurales y funcionales), una reductasa de nitrito con sus unidades grande y pequeña, un transportador ABC de nitrato, un homólogo de proteína G de choque térmico, la proteína de eflujo de Co/Zn/Cd y su transportador, la fosfonato deshidrogenasa y su transportador, proteínas hipotéticas, entre otros.
- ***Paenarthrobacter* sp. GOM3 / *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919:** Los genomas completos de estas dos especies comparten 7 de los 9 bloques sinténicos identificados con Sibelia, cubriendo el 53.21% de GOM3 y 51.27% de la ATCC 49919 (Anexo Fig. A5). En las regiones no compartidas por la GOM3, se encontraron genes sin ortólogos en la ATCC 49919, involucrados en la

degradación de hidrocarburos. Entre estos genes está un transportador de benzoato (*benK*), de los tres contenidos en su genoma. También se encontró el gen que codifica para la Genticato 1,2-dioxigenasa, involucrado en la degradación de este compuesto monoaromático. A diferencia de la GOM3, la ATCC 49919 no cuenta con este gen. Otros genes presentes en estas regiones no compartidas y sin ortólogos en la ATCC 49919, son algunos que codifican para flagelos (*flhAB*, *fliMNOPQRS*), proteínas hipotéticas o con función desconocida.

- ***P. aeruginosa* GOM9 / *P. aeruginosa* PAO1:** Ambos genomas completos comparten 14 de los 15 bloques sinténicos detectados por Sibelia, cubriendo el 96.64% del genoma de la GOM9, y el 99.23% de la PAO1 (Anexo Fig. A6). El porcentaje de regiones no compartidas de la GOM9 (~3% de su genoma), es comparable con el 2.5% de alta diversidad de secuencias codificantes observadas en la especie de *P. aeruginosa* por eventos de delección o inserción (Spencer et al., 2003). Dentro de estas regiones no compartidas se encuentra un gen que codifica para una rubredoxina-NAD(+) reductasa de las 2 contenidas en el genoma de la GOM9. La *P. aeruginosa* PAO1 sólo cuenta con un gen de rubredoxina reductasa, involucrado en la degradación de alcanos. Lo anterior sugiere eventos de adaptación de la GOM9 en el ambiente marino contaminado con petróleo de donde fue aislada. Otros genes en estas regiones, y que no se encuentran en la PAO1, codifican para el transportador ABC del cianato, el transportador de eflujo de níquel/cobalto (*rcnA*), de transporte y de resistencia a cromato (*chrA*, *chrB*) y numerosas proteínas hipotéticas. También se encuentran proteínas estructurales de fagos, pero en su contexto genómico, no son suficientes para conformar un fago completo de alta calidad.

5.8. Anotación funcional con HADEG

Para cumplir con el Objetivo 6, se buscaron en la literatura y en bases de datos las vías metabólicas relacionadas con la degradación aeróbica de alcanos, alquenos y aromáticos. Luego se descargaron del NCBI, Uniprot y literatura primaria las secuencias de los genes y proteínas con evidencia experimental relacionadas con esas vías, junto con las encargadas en la producción de biosurfactantes. De esta búsqueda derivó un banco de datos denominado HADEG (Hydrocarbon Aerobic Degradation Enzymes and Genes), disponible públicamente en <https://github.com/jarojasva/HADEG> y descrito en (Rojas-Vargas et al., 2022b). Sin incluir las secuencias de proteínas involucradas en la degradación de polímeros, también incluidas en HADEG, se cuenta con 295 proteínas para la degradación de HCs y producción de agentes tensoactivos que aumentan la biodisponibilidad de los HCs del petróleo (McGenity et al., 2012). Estas secuencias se utilizaron para anotar los genomas del consorcio utilizando el método “*bidirectional best hit*” con Blastp y estudiar el potencial degradador desde el punto de vista genómico. No obstante, la presencia de genes relacionados con degradación no significa estrictamente que los organismos los expresen.

Un resumen de la búsqueda de genes relacionados con la degradación aeróbica de alcanos, alquenos, y aromáticos, y producción de biosurfactantes en nuestros genomas se presenta en la Figura 13. El genoma de la *Pseudomonas* tiene el mayor número de hits, resultado que podría explicar su velocidad de degradación en los primeros 7 días comparado a los otros organismos. Este genoma tuvo 174 hits, el de la *Alloalcanivorax* 88, el de la *Paenarthrobacter* 91 y el de la *Halopseudomonas* 86.

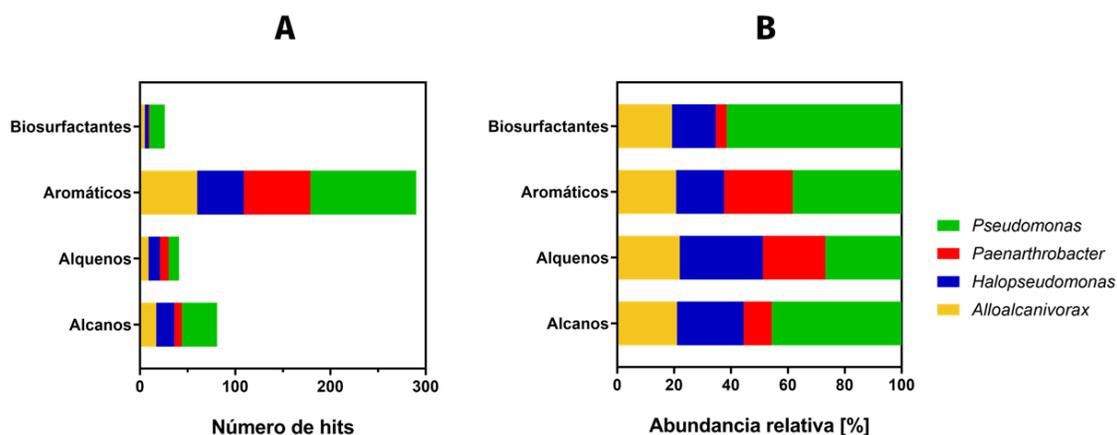


Figura 13. Número de hits. A. y abundancias relativas. B. luego de anotar los genomas usando Blast con HADEG. Cutoff value E-value $< 1 \times 10^{-10}$

En el caso de los alcanos, se identificaron las 4 vías metabólicas reportadas en la literatura (oxidación terminal, biterminal, subterminal y vía de Finnerty) en los genomas de *Alloanivorax*, *Halopseudomonas* y *Pseudomonas* (Fig. 14), indicando su potencial versatilidad para consumir esta fracción del petróleo. En sus genomas se encontró la presencia de los genes *alkB* y *almA* (Fig. 15) que codifican para enzimas que incorporan un oxígeno al carbono terminal de los alcanos, obteniendo hidrocarburos con un grupo alcohol. En nuestro laboratorio se cuenta con un antecedente directo sobre la expresión de estas enzimas en el aislado marino *Pseudomonas aeruginosa* cepa GOM1 (Muriel-Millán et al., 2019). Al segundo día de incubación con glucosa y con alcanos lineales en cultivos separados, Muriel-Millán y colaboradores observaron que esta cepa expresó entre 5 y 30 veces más sus genes *alkB* y *almA*, respectivamente, con los HCs lineales.

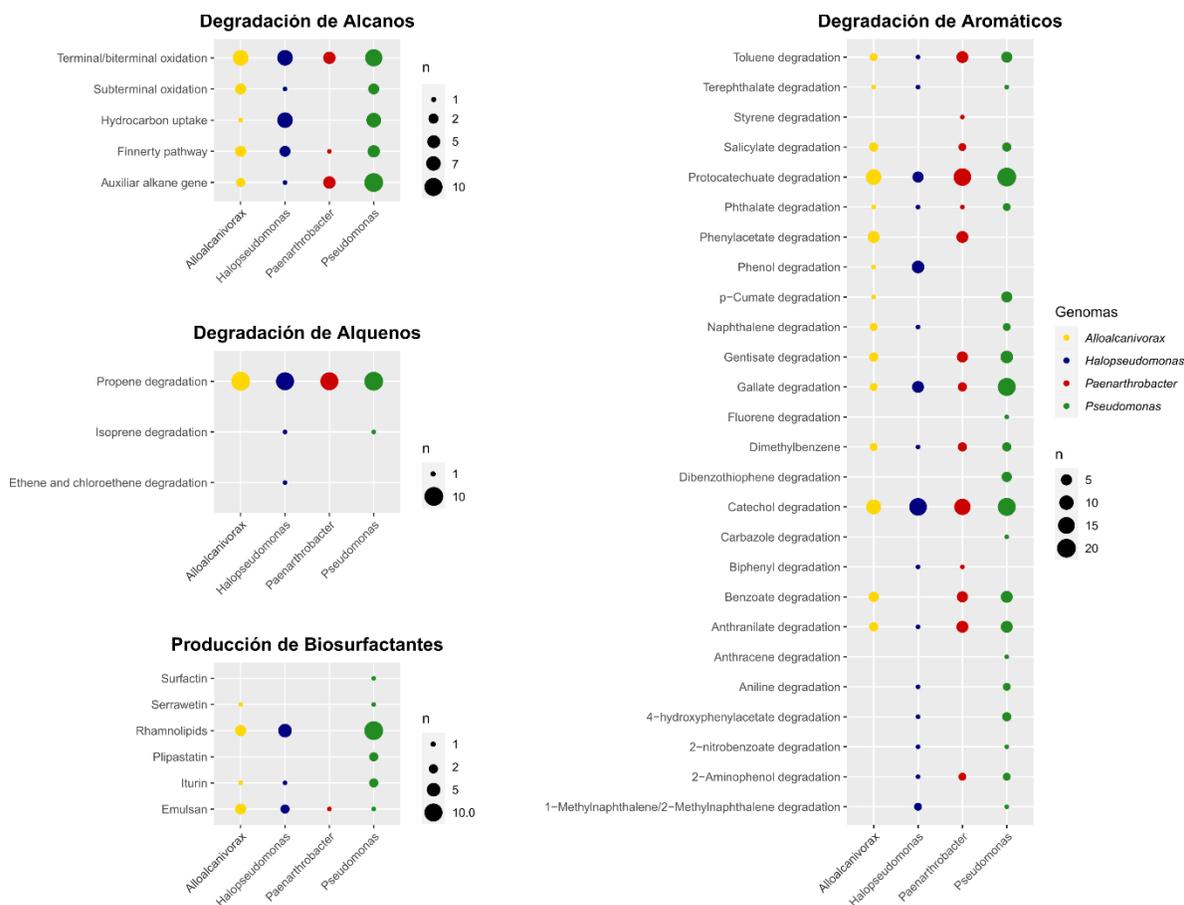


Figura 14. Número de hits bidireccionales en vías metabólicas relacionadas con la degradación de HCs luego de anotar los genomas usando Blastp con HADEG.

Los genomas de *Alloalcanivorax*, *Halopseudomonas* y *Pseudomonas* también cuentan con genes que hicieron hit con la monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) (Fig. 15), con identidades que van entre el 43 y 100%, relacionada en la vía de oxidación subterminal (Gregson et al., 2018). Además, tienen el complejo de hidroperóxido de alquilo reductasa (*ahpCF*) involucrado en la vía de Finnerty, y las alcohol y aldehído deshidrogenasas implicados en todas las rutas. Por su parte, la *Paenarthrobacter* es la que tiene menor densidad de genes asociados a la degradación de alcanos. Entre sus genes cuenta con 3 relacionados con la

monooxigenasa *ladA* para la oxidación de alcanos, reportada en otros microorganismos para la degradación de alcanos de cadena larga. La *Paenarthrobacter* tuvo preferencia por esta fracción.

Para el caso de los alquenos, pocas enzimas han sido caracterizadas en su degradación (Rojas-Vargas et al., 2022b). Los 4 genomas presentaron genes para la degradación de propileno, y otros para isopreno y/o 2-metilpropeno (Fig. 14 y 15). Sin embargo, ninguno de estos genes correspondió a ninguna monooxigenasa para alquenos reportada, sugiriendo que, si esta fracción de HCs es degradada por nuestras bacterias, éstas estarían empleando otras vías diferentes a las incluidas en HADEG.

Con la metodología de anotación empleada se encontró un mayor número de hits con los aromáticos (Fig. 15). Si bien algunos genes son redundantes en el consorcio, se encontraron clúster de genes completos en algunos genomas para la degradación de aromáticos. Es el caso de la *Pseudomonas*, quien presenta los genes para la degradación de 2-nitrobenzoato hasta catecol (*antABC*), y el sistema *p*-cumato dioxigenasa (*cmtAbc*, *cmtB*), la vía del gentisato y la vía I de benzoato (*xyIXYZL*). Al igual que la *Paenarthrobacter*, ambas tienen completa la vía orto para la degradación de catecol (*catABC*, *pcaBDGHI*). Por su parte, la *Paenarthrobacter* tiene la vía 1 de degradación de benzoato (*benAB*), y comparte con la *Alloalcanivorax* los genes para degradar fenilacetato (*paaABCDEK*), y la *Halopseudomonas* posee un clúster para degradar fenol (*dmpLMNOP*) y para degradar catecol por la vía meta (*xyIEGHIK*).

Se observó que genes asociados a la degradación de algunos compuestos se encuentran repartidos entre los genomas, sugiriendo una posible complementariedad entre ellos. Este es el caso del antranilato; la *Alloalcanivorax*,

la *Halopseudomonas* y la *Pseudomonas* tienen los genes para transformar el antracilinato en antranilato-coenzima A (*pqsA*, *abmG1*, *abmG2*), que luego podría utilizar la *Paenarthrobacter* (*abmA*). Un fenómeno similar se identifica con el salicilato entre *Alloalcanivorax* y *Paenarthrobacter*, el tereftalato entre *Alloalcanivorax* y *Halopseudomonas*, y la vía del tolueno entre *Alloalcanivorax*, *Halopseudomonas* y *Pseudomonas*.

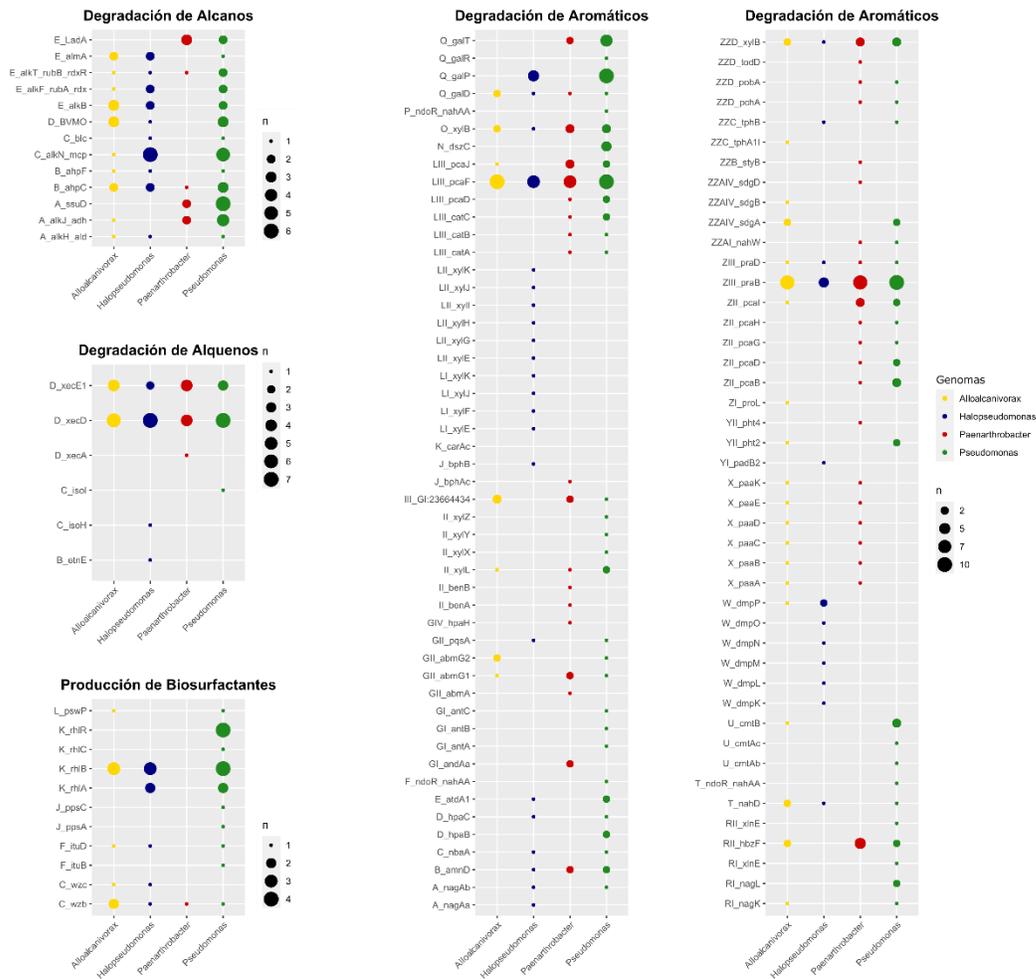


Figura 15. Número de hits en genes relacionados con la degradación de hidrocarburos luego de anotar los genomas usando Blast con HADEG.

Este fenómeno de complementariedad metabólica y trabajo cooperativo se ha identificado en el contexto de la degradación de HCs. Peltz *et al.* (Pelz et al., 1999) rastrearon la biodegradación de 4-clorosalicilato a través de un consorcio de tres miembros de *Pseudomonas* MT1, *Pseudomonas* MT4 y *Achromobacter* MT3 utilizando sustratos marcados con ¹³C. El análisis reveló una red de intercambio de carbono entre las 3 cepas.

Respecto a la producción de biosurfactantes, importantes para aumentar la biodisponibilidad de HCs del petróleo, la *Alloalcanivorax* y la *Halopseudomonas* cuentan con 2 genes relacionados con la síntesis de emulsan (*wzb*, *wzc*), sin embargo, carecen de los genes putativos para su producción. El único genoma con un clúster completo de genes para la producción de biosurfactantes es el de la *Pseudomonas*, con los genes *rhlABCR*, para la síntesis de ramnolípidos. Uno de los roles de esta cepa en el consorcio podría ser el de producir estos compuestos para acceder más rápido a los HCs, efecto que beneficiaría a las demás y aumentaría los niveles de degradación en consorcio. Este aumento en la degradación se observó en un cultivo de *Acinetobacter* sp. XM-02 y *Pseudomonas* sp. XM-01 para la degradación de petróleo (Yu Chen et al., 2014). En el cultivo mixto, la *Pseudomonas* produjo ramnolípidos que redujeron la tensión superficial del petróleo, lo cual aumentó la degradación que los cultivos de las cepas por separado.

5.9. Ensayos de patogenicidad

Se utilizó PathogenFinder (Cosentino et al., 2013) para calcular la probabilidad de que las cepas del consorcio fuesen potencialmente patógenas a humanos. Usando los parámetros del programa por defecto y las secuencias de proteínas de los genomas anotados, el programa compara con su base de datos de familias de proteínas de microorganismos patógenos, filtrando los hits según sus límites de

predicción. PathogenFinder encontró que las probabilidades de ser patógenas para humanos son las siguientes: de la *Alloalcanivorax* es del 0.223, de la *Halopseudomonas* 0.211, de la *Paenarthrobacter* 0.19, y de la *Pseudomonas* 0.875, sugiriendo que la *P. aeruginosa* GOM9 sería potencialmente patógena a humanos. La especie de *P. aeruginosa* es reconocida como un patógeno oportunista y causa infecciones serias cuando el huésped presenta alguna condición que comprometa su salud (ventilación mecánica, inmunodepresión, etc.) (Sadikot et al., 2005).

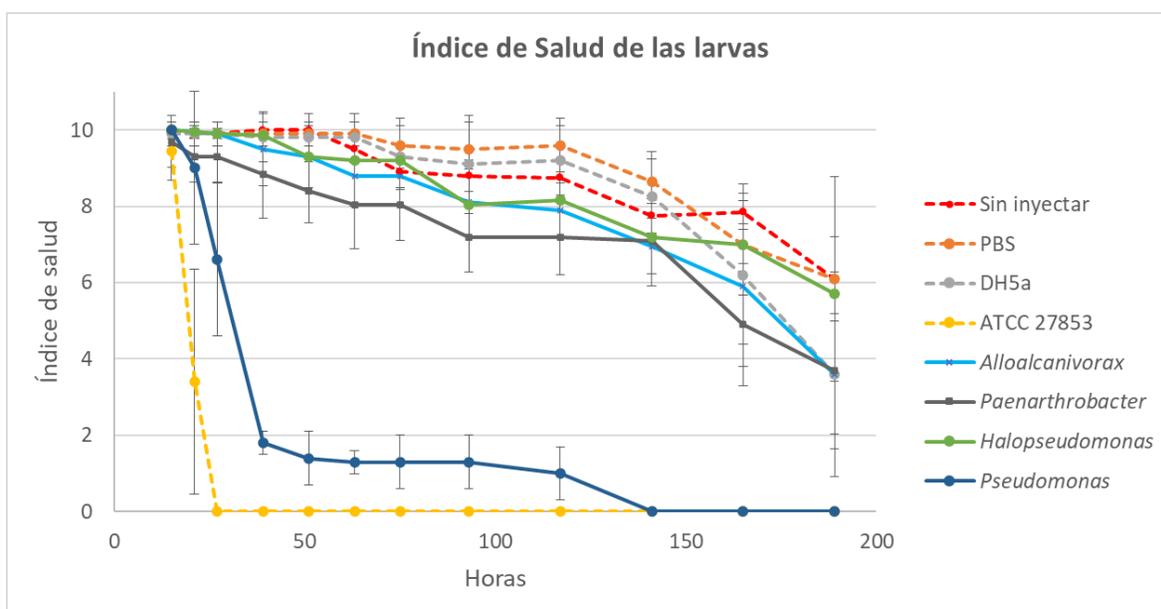


Figura 16. Índice de salud de los grupos de larvas inyectados con las cepas del consorcio y los controles. En rojo el grupo de larvas sin inyectar, en naranja el grupo inyectado con PBS (medio de solución de los inóculos), en gris el grupo inoculado con la *E. coli* DH5 α , en amarillo el inoculado con la cepa patógena *P. aeruginosa* ATCC 27853, en azul claro el grupo inoculado con la *A. xenomutans* GOM8, en negro el correspondiente a la *Paenarthrobacter* sp. GOM3, en verde la *H. aestusnigri* GOM5 y en azul oscuro la *P. aeruginosa* GOM9.

Para corroborar esta predicción *in silico*, se realizaron ensayos *in vivo* con el modelo de larvas de *G. mellonella*. Un microorganismo se considera patógeno si puede producir enfermedad o daños a seres vivos como animales o vegetales. Para el estudio en animales se han propuesto modelos *in vivo* con organismos con sistemas inmunes similares al del ser humano. El más común utiliza roedores, debido a que comparten un 95% de similitud. Sin embargo, este es un método costoso y lento si se desean obtener resultados estadísticamente significativos. Un método alternativo es el uso de *G. mellonella* (larva de cera) (Cools et al., 2019; Cutuli et al., 2019; Hill et al., 2014), el cual presenta una gran similitud con el sistema inmune innato de los vertebrados (Ménard et al., 2021), es económico y fácil de mantener, no requiere un equipo especial y el progreso de los experimentos es más rápido.

Luego de monitorear las larvas de *G. mellonella* después de ser inyectadas durante 7 días, se evidenció que la *Pseudomonas* redujo la salud de las larvas de forma comparable a la cepa clínica *P. aeruginosa* ATCC 27853, usada como control positivo de patogenicidad, sugiriendo que es el único aislado potencialmente patógeno del grupo (Fig. 16). Los otros aislados del consorcio tuvieron curvas del índice de salud similares a los controles negativos. Estos resultados estuvieron en concordancia con la predicción bioinformática obtenida con la herramienta PathogenFinder. No obstante, para describir mejor la patogenicidad de nuestra cepa ambiental, serían necesarios otros estudios complementarios que se enfoquen en la interacción bacteria-hospedero (Casadevall & Pirofski, 2014).

6. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron 19 aislados marinos, de un banco con 111, de mayor crecimiento en agua de mar con petróleo ligero como única fuente de carbono.

- Empleando el método de Plackett-Burman se identificaron las bacterias significativas para la remoción de petróleo ligero, de un conjunto de 19. El consorcio conformado por estas bacterias alcanzó una remoción comparable con la del mejor consorcio de 10 aislados de PB. Esto representa una ventaja biotecnológica lograda con la aplicación del método factorial de PB. Un consorcio reducido en su número de miembros se traduce en una reducción de tiempo y de recursos empleados para obtener los mismos resultados.
- En consorcio, los aislados trabajaron de forma sinérgica durante la degradación de hidrocarburos del petróleo ligero. Esto se reflejó de manera significativa en la degradación del grupo de “otros HCs” no cuantificados con patrones por el método CG-MS.
- Durante la degradación de petróleo ligero en agua de mar suplementada con nutrientes, el consorcio diseñado mantuvo la presencia de las 4 bacterias en abundancias relativas poco variables, la cual refiere relaciones de cooperación entre las poblaciones bacterianas. Sin embargo, se sugiere la presencia de relaciones de competencia por algunos recursos, de acuerdo con los perfiles de degradación de cada aislado y a la predicción de algunas interacciones negativas de forma *in silico*.
- Se elaboró un banco de datos con secuencias de proteínas y genes con demostración experimental, de dominio público, que servirá como referencia para futuros trabajos sobre degradación de hidrocarburos.
- Los genomas de las bacterias del consorcio contienen genes que codifican para proteínas relacionadas con la degradación de hidrocarburos alifáticos,

aromáticos, y con la producción de biosurfactantes. La anotación de los genomas sugiere una complementariedad en vías de degradación, lo que explicaría el trabajo sinérgico del consorcio.

- El consorcio contiene una cepa potencialmente patógena para humanos, la *P. aeruginosa* GOM9. Posteriores trabajos con el consorcio diseñado deben tener presente este factor de riesgo para la salud humana, plantear estrategias para atenuar su patogenicidad y profundizar su interacción con el huésped. Aún se desconoce el efecto real de adicionar bacterias patógenas al ambiente en estrategias de biorremediación.

7. PERSPECTIVAS

- Escalar los ensayos de laboratorio a nivel de mesocosmos para simular condiciones más cercanas a situaciones de derrames de petróleo.
- Desarrollar un experimento para la optimización de la capacidad degradadora del consorcio. Se podría hacer uso de métodos de superficie para evaluar condiciones como la concentración de nutrientes óptima, temperatura, agitación o proporción inicial de las poblaciones. O empleando el enfoque *bottom-up*, combinando el consorcio con otras bacterias, hongos y/o levaduras con capacidad degradadora conocida.
- Escribir un artículo de genómica comparativa del consorcio en el contexto de la degradación de HCs, donde se expongan los hallazgos para una posterior reconstrucción metabólica.
- Evaluar la degradación de HCs de petróleo con un consorcio sin *Pseudomonas aeruginosa* GOM9, dado que demostró ser potencialmente patógena para humanos.

- Se propone una actualización periódica del banco de datos HADEG, adicionando nuevas secuencias con demostración experimental, incorporando las vías de degradación anaeróbicas, y desarrollar una base de datos funcional.
- Estudiar en futuros proyectos la expresión de los genes del consorcio en el contexto de la degradación de HCs.

8. REFERENCIAS

- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formisma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Barco, R. A., Garrity, G. M., Scott, J. J., Amend, J. P., Nealon, K. H., & Emerson, D. (2020). A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02475-19>
- Ben Said, S., & Or, D. (2017). Synthetic microbial ecology: Engineering habitats for modular consortia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01125>
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., 3rd, Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Xia, F. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom

- annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5, 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Casadevall, A., & Pirofski, L.-A. (2014). Microbiology: Ditch the term pathogen. *Nature*, 516(7530), 165–166. <https://doi.org/10.1038/516165a>
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 150(110775), 110775. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110775>
- Chen, Ying, Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Research*, 43(16), 7762–7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>
- Chen, Yu, Li, C., Zhou, Z., Wen, J., You, X., Mao, Y., Lu, C., Huo, G., & Jia, X. (2014). Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3433–3447. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0777-6>
- Chuah, L. F., Chew, K. W., Bokhari, A., Mubashir, M., & Show, P. L. (2022). Biodegradation of crude oil in seawater by using a consortium of symbiotic bacteria. *Environmental Research*, 213(113721), 113721. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113721>
- Cools, F., Torfs, E., Aizawa, J., Vanhoutte, B., Maes, L., Caljon, G., Delputte, P., Cappoen, D., & Cos, P. (2019). Optimization and characterization of a *Galleria mellonella* larval infection model for virulence studies and the evaluation of therapeutics against *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00311>
- Cosentino, S., Voldby Larsen, M., Møller Aarestrup, F., & Lund, O. (2013). PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome

- sequence data. *PloS One*, 8(10), e77302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>
- Cutuli, M. A., Petronio Petronio, G., Vergalito, F., Magnifico, I., Pietrangelo, L., Venditti, N., & Di Marco, R. (2019). Galleria mellonella as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*, 10(1), 527–541. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621649>
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., & Das, S. (2013). Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>
- Ebadi, A., Khoshkholgh Sima, N. A., Olamaee, M., Hashemi, M., & Ghorbani Nasrabadi, R. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advertising Research*, 8(6), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.011>
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Ruppin, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature Communications*, 2, 589. <https://doi.org/10.1038/ncomms1597>
- Gallego, J. L. R., García-Martínez, M. J., Llamas, J. F., Belloch, C., Peláez, A. I., & Sánchez, J. (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*, 18(3), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9061-y>

- García-Jiménez, B., Torres-Bacete, J., & Nogales, J. (2021). Metabolic modelling approaches for describing and engineering microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 226–246. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.003>
- Ghanem, K., & Al-Zahrani, M. (2016). Bioremediation of diesel fuel by fungal consortium using statistical experimental designs. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1), 97–106. <https://doi.org/10.15244/pjoes/42493>
- Godoy-Lozano, E. E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R. M., Juarez, K., Segovia, L., Licea-Navarro, A. F., Gracia, A., Sanchez-Flores, A., & Pardo-Lopez, L. (2018). Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2528. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02528>
- González-Abradelo, D., Pérez-Llano, Y., Peidro-Guzmán, H., Sánchez-Carbente, M. D. R., Folch-Mallol, J. L., Aranda, E., Vaidyanathan, V. K., Cabana, H., Gunde-Cimerman, N., & Batista-García, R. A. (2019). First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresource Technology*, 279, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.002>
- Gregson, B. H., McKew, B. A., Holland, R. D., Nedwed, T. J., Prince, R. C., & McGenity, T. J. (2021). Marine oil snow, a microbial perspective. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.619484>
- Gregson, B. H., Metodieva, G., Metodiev, M. V., Golyshin, P. N., & McKew, B. A. (2018). Differential protein expression during growth on medium versus long-chain alkanes in the obligate marine hydrocarbon-degrading bacterium *Thalassolituus oleivorans* MIL-1. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03130>

- Grosskopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
- Guipeng, Y., Li, Z., Xiaojing, S., & Weiwen, J. (2006). Photochemical degradation of crude oil in seawater. *Zhongguo Hai Yang Hu Zhao Xue Bao [Chinese Journal of Oceanology and Limnology]*, 24(3), 264–269. <https://doi.org/10.1007/bf02842626>
- Guo, W., Wang, X., Liu, S., Kong, X., Wang, P., & Xu, T. (2022). Long-term petroleum hydrocarbons pollution after a coastal oil spill. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(10), 1380. <https://doi.org/10.3390/jmse10101380>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., Jansson, J. K., Probst, A., Borglin, S. E., Fortney, J. L., Stringfellow, W. T., Bill, M., Conrad, M. E., Tom, L. M., Chavarria, K. L., Alusi, T. R., Lamendella, R., Joyner, D. C., Spier, C., ... Mason, O. U. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, 330(6001), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1195979>
- Hill, L., Veli, N., & Coote, P. J. (2014). Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(3), 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.11.001>
- Hu, B., Wang, M., Geng, S., Wen, L., Wu, M., Nie, Y., Tang, Y.-Q., & Wu, X.-L. (2020). Metabolic Exchange with Non-Alkane-Consuming *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8 Improves n-Alkane Biodegradation by the Alkane Degradation Strain *Dietzia* sp. Strain DQ12-45-1b. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.02931-19>

- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, 4, 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058>
- Jiang, R., Sun, L. W., Zhao, Y., Feng, K., & Chen, S. Y. (2013). Optimization of Culture Parameters for Expression of Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor in *Pichia pastoris* Using Response Surface Methodology Combining with Plackett-Burman Design. *Biomaterial and Bioengineering*, 647, 456–461. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.647.456>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Karkaria, B. D., Fedorec, A. J. H., & Barnes, C. P. (2021). Automated design of synthetic microbial communities. *Nature Communications*, 12(1), 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20756-2>
- Kleindienst, S., Grim, S., Sogin, M., Bracco, A., Crespo-Medina, M., & Joye, S. B. (2016). Diverse, rare microbial taxa responded to the Deepwater Horizon deep-sea hydrocarbon plume. *The ISME Journal*, 10(2), 400–415. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.121>
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K., & Tümmler, B. (2004). Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *Journal of Bacteriology*, 186(2), 518–534. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004>
- Kong, W., Meldgin, D. R., Collins, J. J., & Lu, T. (2018). Designing microbial consortia with defined social interactions. *Nature Chemical Biology*, 14(8), 821–829. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0091-7>

- Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*, 36(21), 6688–6719. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn668>
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgado, J., Norton, N., Hazen, T. C., & Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962–7974. <https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11>
- Krieger, C. J., Zhang, P., Mueller, L. A., Wang, A., Paley, S., Arnaud, M., Pick, J., Rhee, S. Y., & Karp, P. D. (2004). MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D438-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh100>
- Léandre, F., Andrey, K., Nicolas, R., & Paul, F. (2023). Natural degradation of spilt fuel oil on seacoasts: Modelling, mapping, and spatial analysis. *Regional Studies in Marine Science*, 58(102782), 102782. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102782>
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Lilly, J. M., & Pérez-Brunius, P. (2021). A gridded surface current product for the Gulf of Mexico from consolidated drifter measurements. *Earth System Science Data*, 13(2), 645–669. <https://doi.org/10.5194/essd-13-645-2021>
- Loh, J. M. S., Adenwalla, N., Wiles, S., & Proft, T. (2013). *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, 4(5), 419–428. <https://doi.org/10.4161/viru.24930>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

Chemistry, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

- Lv, Y., Chen, Y., Sun, S., & Hu, Y. (2014). Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation. *Bioresource Technology*, 155, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.012>
- Ma, M., Zheng, L., Yin, X., Gao, W., Han, B., Li, Q., Zhu, A., Chen, H., & Yang, H. (2021). Reconstruction and evaluation of oil-degrading consortia isolated from sediments of hydrothermal vents in the South Mid-Atlantic Ridge. *Scientific Reports*, 11(1), 1456. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-80991-5>
- Maamar, A., Lucchesi, M.-E., Debaets, S., Nguyen van Long, N., Quemener, M., Coton, E., Bouderbala, M., Burgaud, G., & Matallah-Boutiba, A. (2020). Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the port of Oran (Algeria). *Diversity*, 12(5), 196. <https://doi.org/10.3390/d12050196>
- MacDonald, I. R., Garcia-Pineda, O., Beet, A., Daneshgar Asl, S., Feng, L., Graettinger, G., French-McCay, D., Holmes, J., Hu, C., Huffer, F., Leifer, I., Muller-Karger, F., Solow, A., Silva, M., & Swayze, G. (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research. Oceans*, 120(12), 8364–8380. <https://doi.org/10.1002/2015JC011062>
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., Kalogerakis, N., & Daffonchio, D. (2017). Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>

- Maslo, A., Azevedo Correia de Souza, J. M., & Pardo, J. S. (2020). Energetics of the deep Gulf of Mexico. *Journal of Physical Oceanography*, *50*(6), 1655–1675. <https://doi.org/10.1175/jpo-d-19-0308.1>
- Mazzucotelli, C. A., Durruty, I., Kotlar, C. E., Moreira, M. R., Ponce, A. G., & Roura, S. I. (2014). Development of a microbial consortium for dairy wastewater treatment. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, *19*(2), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0517-8>
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, *8*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *32*(Web Server issue), W20-5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, *10*(1), 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., & Donnio, P.-Y. (2021). *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: Past, present and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 782733. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>
- Mestre, M., Höfer, J., Sala, M. M., & Gasol, J. M. (2020). Seasonal variation of bacterial diversity along the marine particulate matter continuum. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1590. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01590>
- Migahed, F., Abdelrazak, A., & Fawzy, G. (2017). Batch and continuous removal of heavy metals from industrial effluents using microbial consortia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *14*(6), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1229-3>

- Minkin, I., Patel, A., Kolmogorov, M., Vyahhi, N., & Pham, S. (2013). Sibelia: A scalable and comprehensive synteny block generation tool for closely related microbial genomes. In *Lecture Notes in Computer Science* (pp. 215–229). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40453-5_17
- Miron, P., Beron-Vera, F. J., Olascoaga, M. J., Froyland, G., Pérez-Brunius, P., & Sheinbaum, J. (2019). Lagrangian geography of the deep Gulf of Mexico. *Journal of Physical Oceanography*, 49(1), 269–290. <https://doi.org/10.1175/jpo-d-18-0073.1>
- Moreno, R., & Rojo, F. (2019). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes in Bacteria. In F. Rojo (Ed.), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids* (pp. 117–142). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6_6
- Muriel-Millán, L. F., Millán-López, S., & Pardo-López, L. (2021). Biotechnological applications of marine bacteria in bioremediation of environments polluted with hydrocarbons and plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), 7171–7185. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11569-4>
- Muriel-Millán, L. F., Rodríguez-Mejía, J. L., Godoy-Lozano, E. E., Rivera-Gómez, N., Gutierrez-Rios, R.-M., Morales-Guzmán, D., Trejo-Hernández, M. R., Estradas-Romero, A., & Pardo-López, L. (2019). Functional and genomic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from the southwestern gulf of Mexico reveals an enhanced adaptation for long-chain alkane degradation. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00572>
- Na, S.-I., Kim, Y. O., Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Baek, I., & Chun, J. (2018). UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of Microbiology*, 56(4), 280–285. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8014-6>

- Nakano, K., Terabayashi, Y., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Ohki, S., Shinzato, M., Teruya, K., Satou, K., & Hirano, T. (2015). First complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071T), determined using PacBio single-molecule real-time technology. *Genome Announcements*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00932-15>
- Ndimele, P. E., Saba, A. O., Ojo, D. O., Ndimele, C. C., Anetekhai, M. A., & Erondue, E. S. (2018). Remediation of crude oil spillage. In *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem* (pp. 369–384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809399-3.00024-0>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- NOAA. (2015, April). *In mapping the fallout from the Deepwater horizon oil spill, developing one tool to bring unity to the response*. Office of Response and Restoration. <https://response.restoration.noaa.gov/about/media/mapping-fallout-deepwater-horizon-oil-spill-developing-one-tool-bring-unity-response.htm>
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2022). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- Pardo-López, L., & Gutiérrez-Ríos, R. M. (2021). Distribución de bacterias. In S. Z. Herzka, R. A. Zaragoza Álvarez, E. M. Peters, & G. Hernández Cárdenas

- (Eds.), *Atlas de línea base ambiental del golfo de México (tomo X)*. Consorcio de Investigación del Golfo de México. https://atlasigom.cicese.mx/map_data/T010/ATLAS-TOMO-10.pdf
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R. M., Moore, E. R., Timmis, K. N., & Abraham, W. R. (1999). Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unravelling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environmental Microbiology*, 1(2), 167–174. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00023.x>
- PEMEX. (2019). *Petróleo*. PEMEX Productos y Servicios. <https://www.pemex.com/comercializacion/productos/Paginas/petroleo.aspx>
- PEMEX. (2022). *Estadísticas petroleras octubre 2022*. Indicadores Petroleros. <https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Paginas/IndicadoresPetroleros.aspx>
- Perdigão, R., Almeida, C. M. R., Magalhães, C., Ramos, S., Carolas, A. L., Ferreira, B. S., Carvalho, M. F., & Mucha, A. P. (2021). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in seawater: Prospects of using lyophilized native hydrocarbon-degrading bacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112285>

- Prajapati, V. S., Soni, N., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2014). An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.08.008>
- Radović, J. R., Romero, I. C., Oldenburg, T. B. P., Larter, S. R., & Tunnell, J. W., Jr. (2020). 40 years of weathering of coastal oil residues in the southern gulf of Mexico. In *Deep Oil Spills* (pp. 328–340). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11605-7_20
- Raggi, L., García-Guevara, F., Godoy-Lozano, E. E., Martínez-Santana, A., Escobar-Zepeda, A., Gutierrez-Rios, R. M., Loza, A., Merino, E., Sanchez-Flores, A., Licea-Navarro, A., Pardo-Lopez, L., Segovia, L., & Juarez, K. (2020). Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01825>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Richter, W. (1997). Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, 2(8), 354–359. <https://doi.org/10.1007/s007690050165>
- Rodríguez-Salazar, J., Loza, A., Ornelas-Ocampo, K., Gutierrez-Rios, R. M., & Pardo-López, L. (2021). Bacteria from the southern Gulf of Mexico: Baseline, diversity, hydrocarbon-degrading potential and future applications. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.625477>
- Rodriguez-Vera, G., Romero-Centeno, R., Castro, C. L., & Castro, V. M. (2019). Coupled interannual variability of wind and sea surface temperature in the

- Caribbean Sea and the Gulf of Mexico. *Journal of Climate*, 32(14), 4263–4280. <https://doi.org/10.1175/jcli-d-18-0573.1>
- Rojas-Vargas, J., Adaya, L., Silva-Jiménez, H., Licea-Navarro, A. F., Sanchez-Flores, A., Gracia, A., & Pardo-López, L. (2022). Oil-degrading bacterial consortium from Gulf of Mexico designed by a factorial method, reveals stable population dynamics. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.962071>
- Rojas-Vargas, J., Castelan-Sanchez, H. G., & Pardo-Lopez, L. (2022). HADEG: A curated database of Hydrocarbon Aerobic Degradation Enzymes and genes. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.30.505856>
- Rojas-Vargas, J., González-Sánchez, R., Sánchez-Flores, A., Licea-Navarro, A. F., & Pardo-López, L. (2022). Complete Genome Sequence of Halopseudomonas aestusnigri Strain GOM5, Isolated from Asphalt Marine Sediments of the Gulf of Mexico. *Microbiology Resource Announcements*, e0122221. <https://doi.org/10.1128/mra.01222-21>
- Rosas-Díaz, J., Escobar-Zepeda, A., Adaya, L., Rojas-Vargas, J., Cuervo-Amaya, D. H., Sánchez-Reyes, A., & Pardo-López, L. (2021). Paenarthrobacter sp. GOM3 Is a Novel Marine Species With Monoaromatic Degradation Relevance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 713702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713702>
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209–1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044so>
- Sammarco, P. W., Kolian, S. R., Warby, R. A. F., Bouldin, J. L., Subra, W. A., & Porter, S. A. (2013). Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of

- Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 73(1), 129–143.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.029>
- San León, D., & Nogales, J. (2022). Toward merging bottom-up and top-down model-based designing of synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 69(102169), 102169.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102169>
- Schmartz, G. P., Hartung, A., Hirsch, P., Kern, F., Fehlmann, T., Müller, R., & Keller, A. (2022). PLSDb: advancing a comprehensive database of bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D273–D278.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1111>
- SEMARNAT. (2011). *NOM-161-SEMARNAT-2011*.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5286505&fecha=01/02/2013
- SEMARNAT. (2012). *NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012*.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013
- SEMARNAT. (2016). *Guías para la Elaboración de la COA - Tratamiento de Residuos Peligrosos*.
https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/retc/guias/g_trat.pdf
- Shankar, R., Shim, W. J., An, J. G., & Yim, U. H. (2015). A practical review on photooxidation of crude oil: laboratory lamp setup and factors affecting it. *Water Research*, 68, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.012>
- Shaw, G. T.-W., Pao, Y.-Y., & Wang, D. (2016). MetaMIS: a metagenomic microbial interaction simulator based on microbial community profiles. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1359-0>
- Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-Álvarez, N., García-Lara, B., & Corrales-Escobosa, A. R. (2018). Identification by MALDI-TOF MS of Environmental Bacteria with High Potential to Degrade

- Pyrene. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(2).
<https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>
- Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R., & Olson, M. V. (2003). Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1316–1325. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1316-1325.2003>
- Spinler, J. K., Raza, S., Runge, J. K., & Luna, R. A. (2019). Complete genome sequence of the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* endemic Houston-1 strain, isolated from a pediatric patient with cystic fibrosis and assembled using oxford Nanopore and Illumina sequencing. *Microbiology Resource Announcements*, 8(43). <https://doi.org/10.1128/MRA.00903-19>
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Flammable and Combustible Liquids. In *Fire Debris Analysis* (pp. 199–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012663971-1.50011-7>
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D593-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Uribe-Flores, M. M., Cerqueda-García, D., Hernández-Nuñez, E., Cadena, S., García-Cruz, N. U., Trejo-Hernández, M. R., Aguirre-Macedo, M. L., & García-Maldonado, J. Q. (2019). Bacterial succession and co-occurrence patterns of an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 495–507. <https://doi.org/10.1111/jam.14307>
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

- Vielva, L., de Toro, M., Lanza, V. F., & de la Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics*, 33(23), 3796–3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>
- Villela, H. D. M., Peixoto, R. S., Soriano, A. U., & Carmo, F. L. (2019). Microbial bioremediation of oil contaminated seawater: A survey of patent deposits and the characterization of the top genera applied. *The Science of the Total Environment*, 666, 743–758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.153>
- Wade, T. L., Sericano, J. L., Sweet, S. T., Knap, A. H., & Guinasso, N. L., Jr. (2016). Spatial and temporal distribution of water column total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and total petroleum hydrocarbons (TPH) from the Deepwater Horizon (Macondo) incident. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1–2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.002>
- Ward, N., & Moreno-Hagelsieb, G. (2014). Quickly finding orthologs as reciprocal best hits with BLAT, LAST, and UBLAST: how much do we miss? *PloS One*, 9(7), e101850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101850>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wilson, M., Bailey, D., Maung-Douglass, E., Partyka, M., Sempier, S., & Skelton, T. (2021). *Oil on the beach: What happened after Deepwater Horizon?* Oil Spill Science. <https://masgc.org/oilscience/oil-on-beaches-DeepwaterHorizon-2021.pdf>
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: A review. *Current Microbiology*, 71(2), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>

- Yang, T., Nigro, L. M., Gutierrez, T., D'Ambrosio, L., Joye, S. B., Highsmith, R., & Teske, A. (2016). Pulsed blooms and persistent oil-degrading bacterial populations in the water column during and after the Deepwater Horizon blowout. *Deep-Sea Research. Part II, Topical Studies in Oceanography*, 129, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2014.01.014>
- Zavala-Hidalgo, J., Romero-Centeno, R., Galvanovskis-Romero, E., Lagunas-Modesto, M. de la L., & Osorio-Tai, M. E. (2012). *Reconstrucción de la concentración de petróleo proveniente del derrame ocasionado por el accidente de la plataforma de British Petroleum en el Golfo de México ocurrido en 2010 (aguas superficiales)*. SEMARNAT, INECC, UNAM. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/396847/CGACC_2012_CC_A-UNAM_Modelacion_Superficial.pdf
- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>

ANEXOS

Tabla A1. Bacterias aisladas por el IBt a partir de muestras contaminadas con petróleo

No.	Cód	Aislado	Estación/muestra/año	Coordenadas
1	GOM1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
2	B9-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
3	B9-3	<i>Pseudomonas mendocina</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
4	B9-4	<i>Pseudomonas plegoglossicida</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
5	B9-5	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
6	B9-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
7	B9-7	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
8	B9-8	<i>Pseudomonas baleárica</i>	B9, agua, 2016	25.63, -95.03
9	188	<i>Staphylococcus warneri</i>	4, sedimentos, 2017	18.50, -94.50
10	192	<i>Bacillus aereus</i>	S05, sedimentos, 2017	19.01, -95.29
11	197	<i>Bacillus cereus</i>	S05, sedimentos, 2017	19.01, -95.29
12	GOM2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	E2, agua, 2015	25.83, -95.50
13	GOM4	<i>Stutzerimonas chloritidismutans</i>	D18, agua, 2016	19.93, -94.34
14	GOM8	<i>Alloalcanivorax xenomutans</i>	S14, sedimentos, 2017	19.50, -96.00
15	182	<i>Halomonas salina</i>	S05, sedimentos, 2017	19.01, -95.29
16	GOM3	<i>Paenrthrobacter sp.</i>	S03, sedimentos, 2017	18.44, -94.30
17	184	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	S03, sedimentos, 2017	18.44, -94.30
18	187	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	14, sedimentos, 2017	19.30, -96.00
19	198	<i>Bacillus megaterium</i>	14, sedimentos, 2017	19.30, -96.00
20	201	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	14, sedimentos, 2017	19.30, -96.00
21	SN1	<i>Idiomarina loihiensis</i>	A43, sedimentos, 2017	24.18, -96.51
22	BF	<i>Pseudoalteromonas</i>	A43, sedimentos, 2017	24.18, -96.51
23	B1	<i>Rhodococcus sp.</i>	A43, sedimentos, 2017	24.18, -96.51
24	0 1	<i>Idiomarina abyssalis</i>	A43, sedimentos, 2017	24.18, -96.51
25	A11	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	A43, sedimentos, 2017	24.18, -96.51

Tabla A2. Bacterias obtenidas por la UABC aisladas con fenantreno

No.	Cód	Aislado	Estación/muestra/año	Coordenadas
26	CSB13-1	<i>Brevundimonas diminuta</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
27	CSB13-2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08

28	MSB14	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
29	MSB1-1	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
30	CSB8-2	<i>Nesterenkonia sp</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
31	CSB20	<i>Paracoccus communis</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
32	CSB36	<i>Paracoccus sp</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
33	CFESB1	<i>Paracoccus sp</i>	CFE, agua, 2016	32.36, -117.07
34	MSB12	<i>Paracoccus sp</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
35	MSB22	<i>Paracoccus sp</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
36	CSB3-1	<i>Pseudomona stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
37	MSB9-2	<i>Pseudomona stutzeri</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
38	CSB3-2	<i>Pseudomona stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
39	CFELB12-B	<i>Pseudomona stutzeri</i>	CFE, agua, 2016	32.36, -117.07
40	MSB6	<i>Pseudomona stutzeri</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
41	CSB47	<i>Pseudomona stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
42	MSB23(R)	<i>Pseudomona stutzeri</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
43	MSB23	<i>Pseudomona stutzeri</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
44	MSB28-2	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08
45	MSB28-G	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08

Tabla A3. Bacterias obtenidas por la UABC aisladas con pireno

No.	Cód	Aislado	Estación/muestra/año	Coordenadas
46	CSA12	<i>Brachybacterium</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
47	MLA8-1	<i>Brachybacterium</i>	M, agua, 2016	32.33, -117.08
48	CSA38	<i>Brachybacterium</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
49	CSA4-1	<i>Micrococcus luteus</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
50	CFELA2	<i>Micrococcus luteus</i>	CFE, agua, 2016	32.36, -117.07
51	CLA12-1	<i>Pantoea agglomerans</i>	C, agua, 2016	32.35, -117.08
52	CSA37	<i>Paracoccus sp</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
53	CLA12-2	<i>Paracoccus sp</i>	C, agua, 2016	32.35, -117.08
54	CSA35-1	<i>Pseudomonas putida</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
55	CSA17-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
56	CSA17-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
57	CSA15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
58	MLA9	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	M, agua, 2016	32.33, -117.08
59	MLA1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	M, agua, 2016	32.33, -117.08
60	CSA13-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
61	CLA9	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, agua, 2016	32.35, -117.08
62	CSA3-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08

63	CSA10	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
64	CSA1	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	C, sedimentos, 2016	32.35, -117.08
65	CFESA21-2	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	CFE, sedimentos, 2016	32.36, -117.07
66	MSA14	<i>Rhodococcus ruber</i>	M, sedimentos, 2016	32.33, -117.08

Tabla A4. Bacterias aisladas por CICESE de muestras de la estación B18 de la campaña XIXIMI-04

No.	Cód	Aislado	Estación/muestra/año	Coordenadas
67	16C	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
68	16A	<i>Pseudomonas balearica</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
69	16gb	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
70	16b	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
71	40e	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
72	40c	No hay secuencia	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
73	7ca	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
74	16e	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
75	16ga	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
76	7fa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
77	7ab	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
78	16f	<i>Pseudomonas balearica</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
79	7g	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
80	7b	<i>Pseudomonas balearica</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
81	7f	<i>Pseudomonas fluvialis</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
82	7e	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
83	7d	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
84	16d	<i>Pseudomonas balearica</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
85	7fb	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
86	7aa	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
87	7cb	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765
88	7a	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B18, agua, 2015	24.0043, -86.79765

Tabla A5. Bacterias aisladas por CICESE de muestras de la campaña Met-03 del CIGoM

No.	Cód	Aislado	Estación/muestra/año	Coordenadas
89	CH1AM3	<i>Alterythrobacter marinus</i>	CH01, agua, 2017	18.8692, -93.664
90	CH1BM3	<i>Labrenzia aggregata</i>	CH01, agua, 2017	18.8692, -93.664

91	CH2AM3	<i>Agrococcus jenensis</i>	CH02, agua, 2017	19.3967, -91.836
92	CH2BM3	<i>Alteromonas tagae</i>	CH02, agua, 2017	19.3967, -91.836
93	CH2CM3a	<i>Labrenzia sp.</i>	CH02, agua, 2017	19.3967, -91.836
94	CH2CM3b	<i>Labrenzia sp.</i>	CH02, agua, 2017	19.3967, -91.836
95	CH3AM3	<i>Alterythrobacter marinus</i>	CH03, agua, 2017	18.76, -94.26
96	CH3BM3	<i>Croceicoccus sp.</i>	CH03, agua, 2017	18.76, -94.26
97	GOM5	<i>Halopseudomonas aestusnigri</i>	CH03, sedimento, 2017	18.76, -94.26
98	B1	<i>Halopseudomonas aestusnigri</i>	CH03, sedimento, 2017	18.76, -94.26
99	B4	<i>Halopseudomonas aestusnigri</i>	CH03, sedimento, 2017	18.76, -94.26
100	C1	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
101	C3aa	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
102	C3ab	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
103	C3ac	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
104	C3ba	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
105	C3bb	<i>Microbacterium foliorum</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
106	D2	<i>Dietzia lutea</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
107	D3aa	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
108	D3ab	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
109	D3ba	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
110	D3bb	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664
111	D4	<i>Halomonas meridiana</i>	CH01, sedimento, 2017	18.8692, -93.664

Tabla A6. Estadísticas de secuenciación de amplicones 16S rRNA V3-V4

Muestra	Lecturas totales	Long. De secuencias	G+C (%)	Calidad media	Lecturas Ns (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
concat_LP_C0_S7_R1_001.fastq	303,380	301	55.25	22.16	1.36	72.79	1.73
concat_LP_C7_S8_R1_001.fastq	229,860	301	54.82	21.99	1.58	71	1.6
concat_LP_C15_S9_R1_001.fastq	265,636	301	54.65	22.18	1.53	71.84	2.29
concat_LP_C30_S10_R1_001.fastq	290,106	301	54.73	22.52	1.35	75.13	2.48
concat_LP_C50_S11_R1_001.fastq	240,888	301	54.57	22.4	1.4	73.41	2.51
concat_LP_C75_S12_R1_001.fastq	314,176	301	54.3	22.11	1.4	69.98	2.5

Tabla A7. Número de lecturas luego de agrupar al 99% con CD-HIT y de anotar con la base de datos de 16S del NCBI

OTUS	Número de lecturas para cada día de la cinética					
	0	7	15	30	50	75
<i>Alloalcanivorax</i>	16,997	31,962	35,628	38,225	30,546	38,373
<i>Halopseudomonas</i>	34,095	28,558	35,163	37,567	27,094	36,027
<i>Pseudomonas</i>	20,732	2,508	3,867	6,359	1,531	638
<i>Paenarthrobacter</i>	26,609	5,223	3,409	2,828	1,796	2,571
Lecturas totales	98,433	68,251	78,067	84,979	60,967	77,609

Tabla A8. Lista de programas empleados durante el desarrollo del presente proyecto

Programa	Descripción	Referencia
Flash v1.2.11	Herramienta para extender la longitud de lecturas cortas superponiendo lecturas emparejadas de bibliotecas de fragmentos.	(Magoč & Salzberg, 2011)
CD-HIT	Programa usado para agrupar y comparar secuencias de proteínas o nucleótidos, según una similitud de secuencias definida por el usuario.	(Li & Godzik, 2006)
Blastp	Herramienta para el análisis comparativo de secuencias de proteínas. Se puede usar online en el link (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).	(McGinnis & Madden, 2004)
Unicycler v0.4.8	Herramienta para ensamblar genomas bacterianos a partir de una combinación de lecturas cortas y largas. Unicycler crea un gráfico de ensamble inicial a partir de lecturas cortas usando el ensamblador <i>de novo</i> SPAdes y luego simplifica el gráfico usando información de lecturas cortas y largas.	(Wick et al., 2017)
QUAST	Herramienta de evaluación de calidad de ensambles de genomas. Puede evaluar ensambles tanto con un genoma de referencia como sin una referencia. QUAST produce muchos informes, tablas de resumen y diagramas.	(Gurevich et al., 2013)
CheckM v1.1.3	Método automatizado para evaluar la calidad de un genoma utilizando un conjunto de genes marcadores específicos hasta la posición de un genoma dentro de un árbol genómico de referencia. Se pueden calcular métricas como integridad y contaminación de un ensamble.	(Parks et al., 2015)
RASTtk	Programa para la anotación estructural y funcional de genomas proyectando anotaciones genéticas seleccionadas manualmente desde la base de datos SEED.	(Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015)
PLACNETw	Una herramienta basada en gráficos para la reconstrucción de plásmidos a partir de las	(Vielva et al., 2017)

	lecturas crudas pareadas obtenidas por secuenciación Illumina.	
PLSDB v2021_06_23_v2	Un recurso que contiene plásmidos bacterianos completos depositados en NCBI. Usa BLAST para encontrar las secuencias similares. Disponible en https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/plasmids/search_form/seq/	(Schmartz et al., 2022)
TYGS	Type (Strain) Genome Server, un servidor web fácil de usar y de alto rendimiento para determinar la taxonomía de procariontes, conectado a una gran base de datos de información genómica, taxonómica y nomenclatura en continuo crecimiento.	(Meier-Kolthoff & Göker, 2019)
JSpeciesWS	Es un servicio en línea fácil de usar para calcular <i>in silico</i> el grado de identidad entre dos genomas. Permite calcular la identidad de nucleótido promedio (ANI) basada en BLAST+ (ANiB) y MUMmer (ANIm).	(M. Richter et al., 2016)
UBCG v3.0	Programa que permite generar y evaluar árboles filogenéticos, a partir del alineamiento de genes marcadores de copia única presentes en la mayoría de genomas procariontes. El programa extrae y alinea estos genes marcadores.	(Na et al., 2018)
IQ-TREE v2.0.3	Es un programa para la reconstrucción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud. Está disponible en http://www.iqtree.org/	(Nguyen et al., 2015)
Sibelia v3.0.7	Una herramienta para encontrar bloques sinténicos en múltiples genomas microbianos estrechamente relacionados utilizando gráficos iterativos de Bruijn.	(Minkin et al., 2013)
InterProScan v.5.51-85.0	Paquete para la predicción de la función de proteínas.	(Jones et al., 2014)

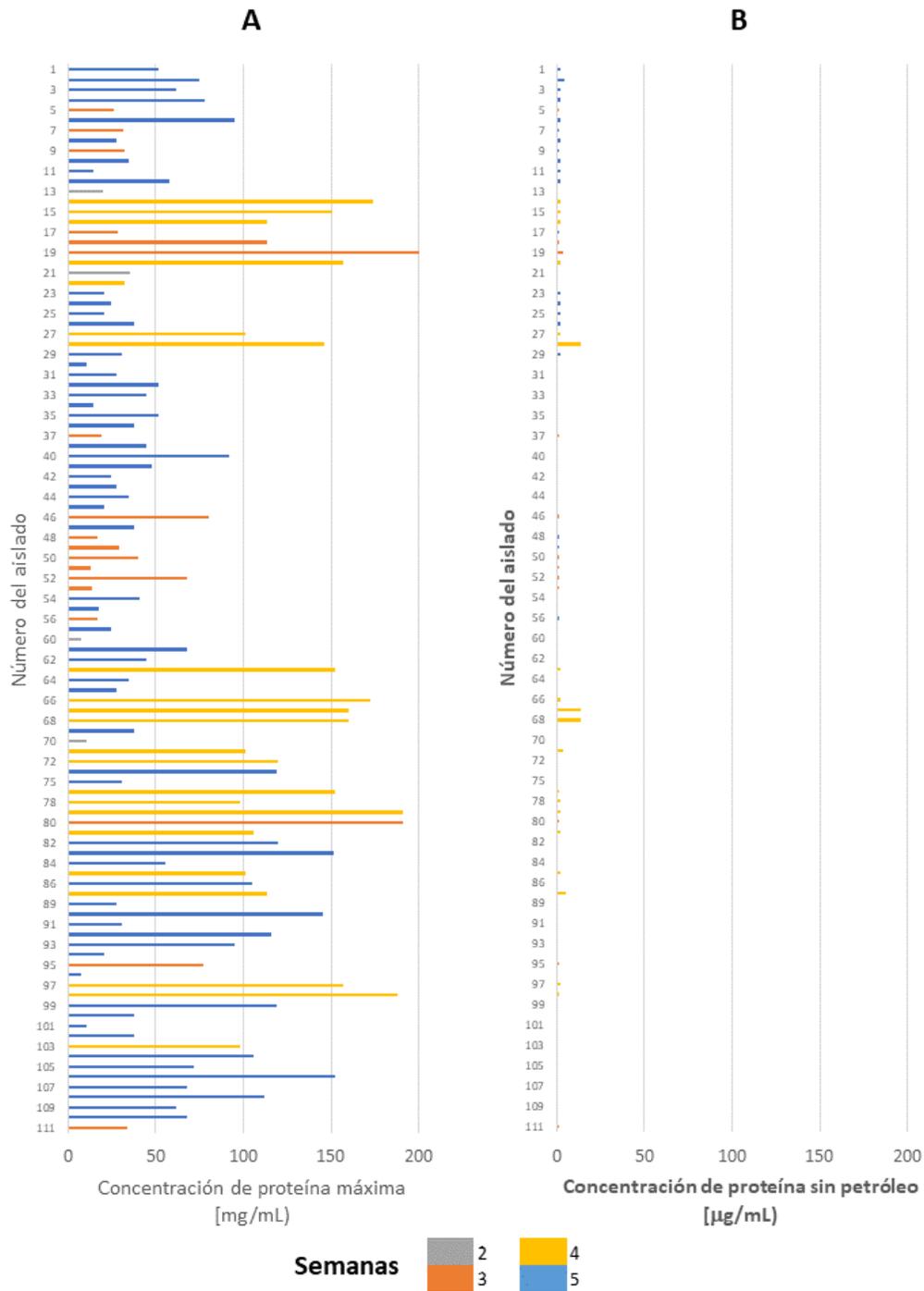


Figura A1. Valores máximos de concentración de proteína de las 111 cepas marinas incubadas durante 5 semanas con agua de mar estéril, nitrógeno y fósforo, a 30 °C y 180 RPM. **A.** Con petróleo ligero API 35. **B.** Controles sin petróleo.

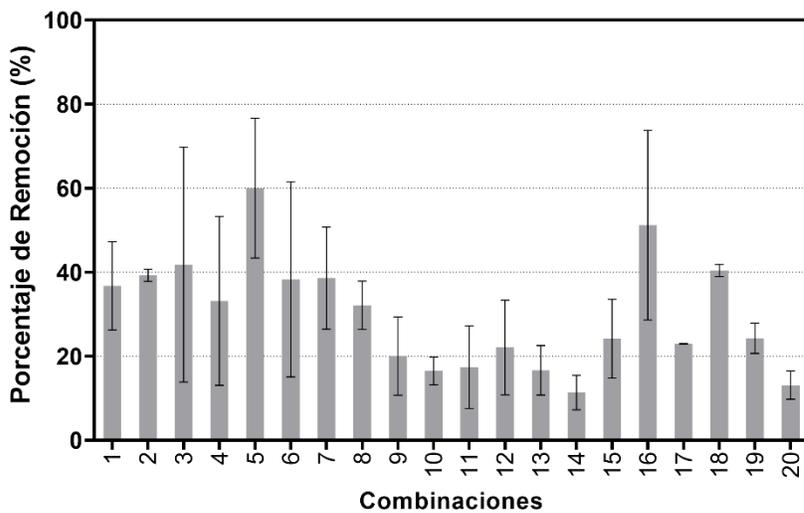


Figura A2. Porcentajes de remoción de petróleo ligero del experimento de Plackett-Burman sin normalizar, determinado por gravimetría.

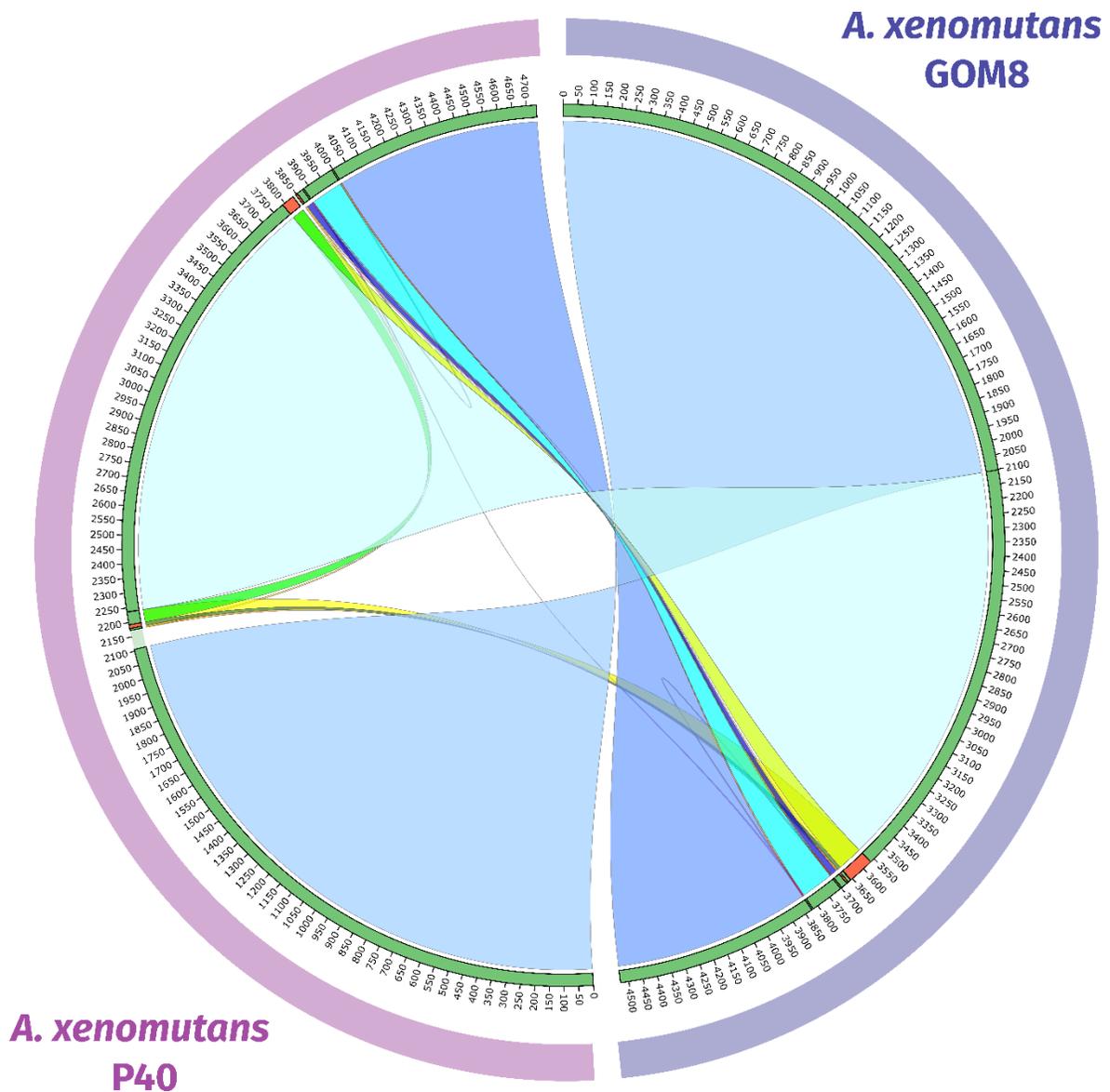


Figura A3. Comparación de los bloques sinténicos entre el genoma del consorcio de *A. xenomutans* GOM8 (azul) y el genoma de referencia de *A. xenomutans* P40 (magenta), obtenido por Sibelia con los parámetros por defecto. Desde el anillo más externo hasta el centro, el contenido es el siguiente: los dos genomas están marcados en azul y púrpura, los contigs de cada genoma están marcados en verde pálido (los contigs rojos indican la dirección inversa de las secuencias) y los bloques sinténicos están representados por diferentes colores.

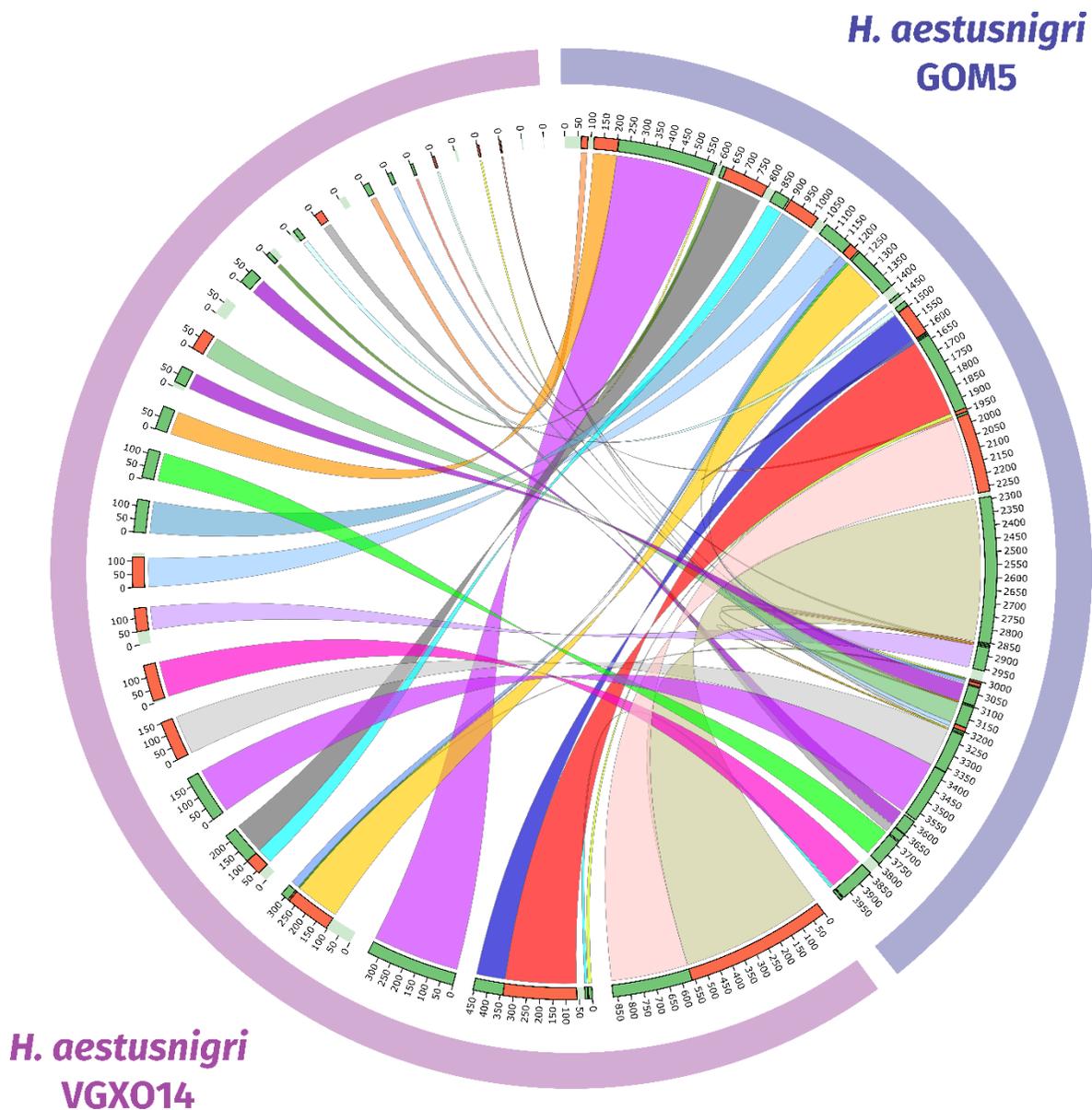


Figura A4. Comparación de los bloques sinténicos entre el genoma del consorcio de *H. aestusnigri* GOM5 (azul) y el genoma de referencia de *H. aestusnigri* VGXO14 (magenta), obtenido por Sibelia con los parámetros por defecto. Desde el anillo más externo hasta el centro, el contenido es el siguiente: los dos genomas están marcados en azul y púrpura, los contigs de cada genoma están marcados en verde pálido (los contigs rojos indican la dirección inversa de las secuencias) y los bloques sinténicos están representados por diferentes colores.

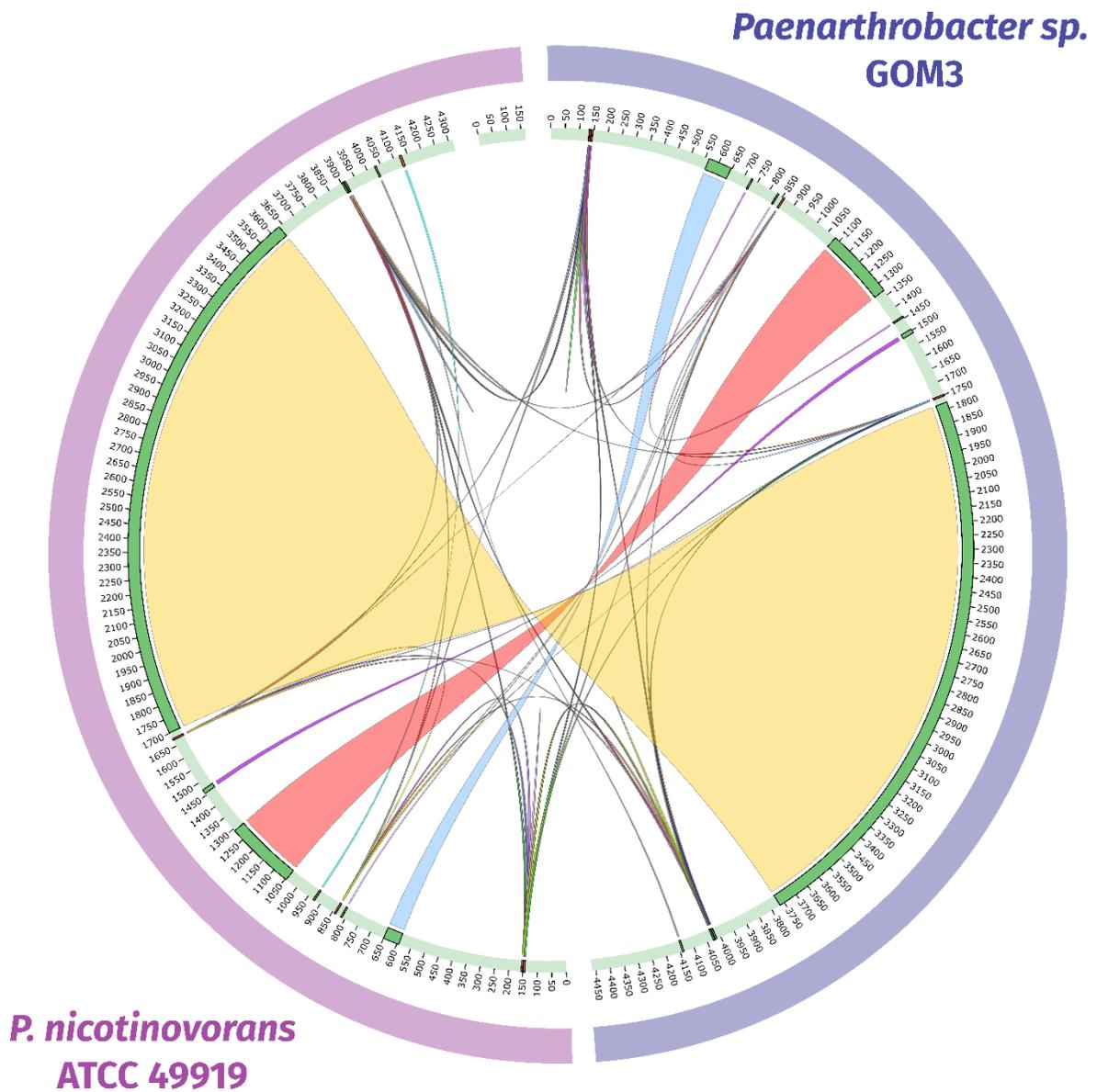


Figura A5. Comparación de los bloques sinténicos entre el genoma del consorcio de *Paenarthrobacter* sp. GOM3 (azul) y el genoma de referencia de *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 (magenta), obtenido por Sibelia con los parámetros por defecto. Desde el anillo más externo hasta el centro, el contenido es el siguiente: los dos genomas están marcados en azul y púrpura, los contigs de cada genoma están marcados en verde pálido (los contigs rojos indican la dirección inversa de las secuencias) y los bloques sinténicos están representados por diferentes colores

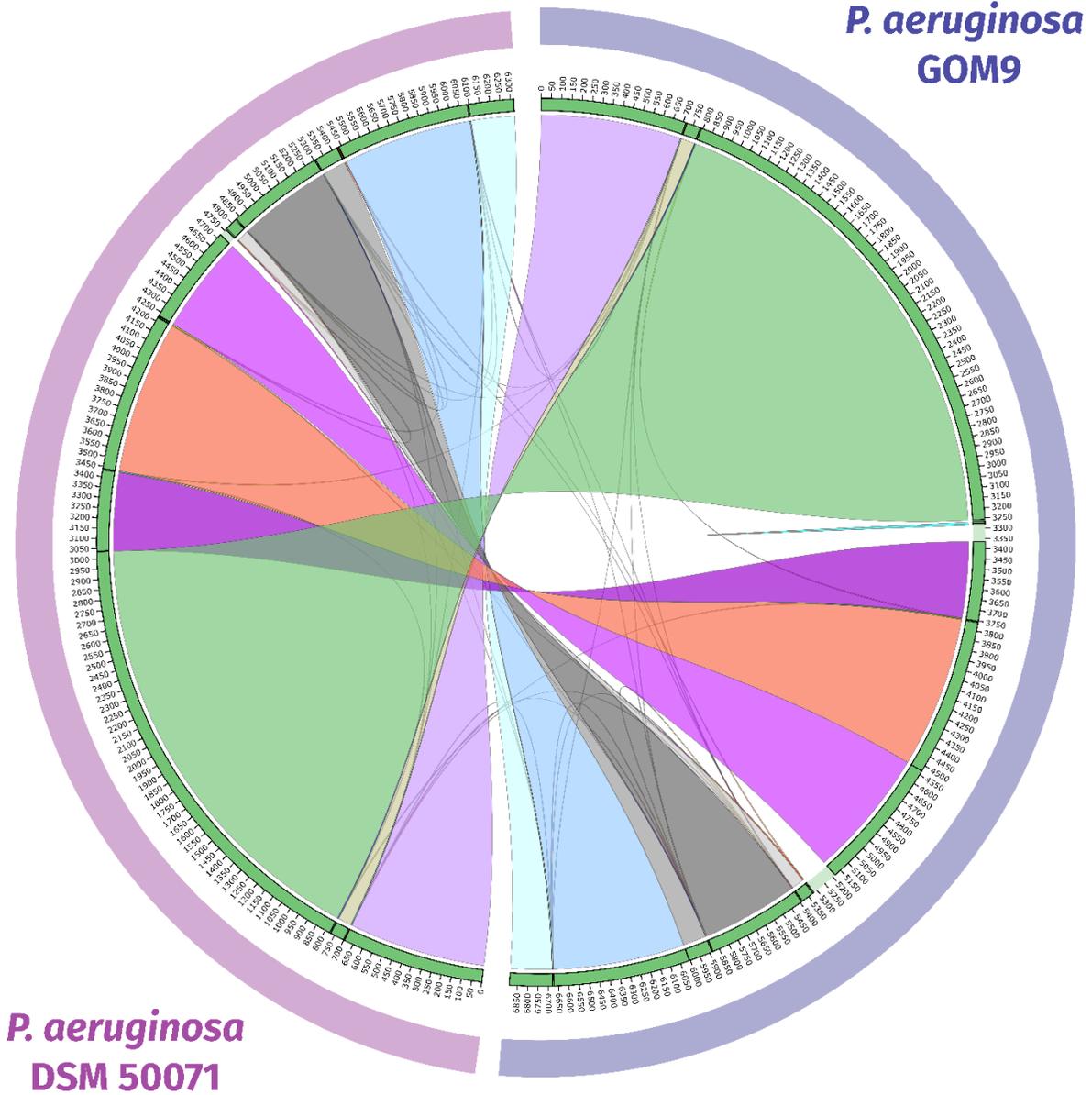


Figura A6. Comparación de los bloques sinténicos entre el genoma del consorcio de *P. aeruginosa* GOM9 (azul) y el genoma de referencia de *P. aeruginosa* DSM 50071 (magenta), obtenido por Sibelia con los parámetros por defecto. Desde el anillo más externo hasta el centro, el contenido es el siguiente: los dos genomas están marcados en azul y púrpura, los contigs de cada genoma están marcados en verde pálido (los contigs rojos indican la dirección inversa de las secuencias) y los bloques sinténicos están representados por diferentes colores