



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Determinación de bacterias hidrocarbonoclasticas y pigmentos
en sedimentos superficiales de la plataforma talud continental
en el noroeste del Golfo de México

TESIS

que para optar por el grado de:
Maestra en Ciencias
(Biología Marina)

presenta:
Biol. Diana Belem Ramírez Ortega

Tutores Principales

Dr. Luis Arturo Soto González (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología)
Dra. Katy Juárez López (Instituto de Biotecnología)

Comité Tutor

Dr. Alfonso Vázquez Botello (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología)
Dra. Rosa María Prol Ledesma (Instituto de Geofísica)
Dr. Javier Carmona Jiménez (Facultad de ciencias)

México, D. F Abril 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México

Determinación de bacterias hidrocarbonoclasticas y pigmentos en sedimentos superficiales de la plataforma talud continental en el noroeste del Golfo de México

TESIS

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

presenta

Biol. Diana Belem Ramírez Ortega

Director de Tesis: **Dr. Luis Arturo Soto González**

Codirectora de Tesis: **Dra. Katy Juárez López**

Comité Tutorial: **Dr. Alfonso Vázquez Botello**
Dra. Rosa María Prol Ledesma
Dr. Javier Carmona Jiménez

México, D. F., Abril 2015

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
JUSTIFICACIÓN.....	5
ÁREA DE ESTUDIO	6

CAPÍTULO UNO BACTERIAS

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Extracción del ADN.....	15
Amplificación por PCR del gen ARNr 16s.....	16
Pirosecuenciación	18
Identificación y análisis de las secuencias del ADNr 16s.....	18
RESULTADOS	20
Clasificación filogenética.....	21
Análisis estadísticos	26
Análisis exploratorio	26
Análisis de similitud.....	27
Genes funcionales	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	41

CAPÍTULO DOS PIGMENTOS

RESUMEN	42
ABSTRACT	43
INTRODUCCIÓN.....	44

METODOLOGÍA.....	46
Análisis de pigmentos.....	47
Cuantificación de pigmentos.....	49
Análisis estadístico.....	49
<i>Prueba de Kruskal-Wallis</i>	49
Prueba de correlación de rangos (Sperman).....	49
RESULTADOS.....	50
Análisis estadístico.....	52
<i>Prueba de Kruskal-Wallis</i>	52
Prueba de correlación de rangos (Sperman).....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	59
LITERATURA CITADA.....	60
BACTERIAS.....	60
PIGMENTOS.....	65
ANEXOS.....	68
Anexo 1.....	68
Genes identificados en la degradación de compuestos contaminantes en la base de datos KEGG,.....	68
Anexos 2.....	70
Prueba de correlación de rangos (Sperman).....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización geográfica de la zona de muestreo en el NW del Golfo de México.	7
Figura 2. Localización de los sitios de muestreo de sedimentos superficiales para análisis de bacterias en la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México.	14
Figura 3. Gel de agarosa al 1%, que muestra el ADN extraído de las muestras de sedimento. A) De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: B-6 y Carril 3: B-25. B) De izquierda a derecha; Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: B-9, y Carril 3:13.	16
Figura 4. Gel de agarosa al 1% que muestra la calidad de los PCR. A) De izquierda a derecha: Carril 1: B-6, Carril 2: B-25 y Carril 3: Marcador de peso molecular. B) De izquierda a derecha; Carril 1: B-9, Carril 2: B-13 y Carril 3: Marcador de peso molecular	17
Figura 5. Clasificación de organismos a nivel phylum, mostrando similitudes entre las secuencias de los cuatro sitios de muestreo en la plataforma interna y talud continental del NW del Golfo de México.	23
Figura 6. Diferencias de clases entre sitios del phylum Proteobacterias, mostrando similitudes entre las secuencias de los sitios (B-13 y B-25) de la plataforma interna y el B6 talud continental del NW del Golfo de México, mientras que el sitio B-9, tuvo presencia mayoritaria de γ -proteobacterias.	24
Figura 7. Clasificación de organismos a nivel Género, revelando similitudes mostrando similitudes entre las secuencias de las estaciones de la plataforma interna (B-13 y B-25), del NW del Golfo de México.	25
Figura 8. Representación gráfica del análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros ambientales.	26
Figura 9. Análisis de conglomerados a nivel Género que separa estaciones someras (B-13 y B-25) de las profundas (B-6 y B-9)	27
Figura 10. Géneros representativos con más números de genes con la capacidad de degradar compuestos contaminantes en sus secuencias. Gráfica expresada en \log_{10}	29
Figura 11. Secuencias a nivel Género representativo por muestra, de acuerdo con la presencia de genes con la capacidad de degradar compuestos contaminantes. Gráfica expresada en \log_{10}	30
Figura 12. Ubicación de los puntos de muestreo para pigmentos al NW del Golfo de México, durante el crucero oceanográfico MARZEE-III en 2012.	47
Figura 13. (Cromatograma (lecturas a 440 y 667 nm) indicando pigmentos identificados y estándares de comparación.	51
Figura 14. Porcentajes totales de cada pigmento en todas las estaciones con concentraciones en ng/g.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros hidrográficos físico-químicos registrados en los cuatro sitios de muestreo sedimentario en la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México. Bacterias-estación (B-#).	15
Tabla 2. Condiciones del PCR ARNr 16s y ciclos programados para el termorreciclador.....	17
Tabla 3. Distribución del número de secuencias para cada uno de las muestras de sedimentos superficiales recolectadas al Noroeste (NW) del Golfo de México durante el crucero oceanográfico MARZEE-III.....	20
Tabla 4. Número de lecturas por cada nivel de clasificación para todas las muestras analizadas.....	20
Tabla 5. Cantidad de secuencias y géneros de bacterias heterótrofas con respecto a la cantidad secuencias y géneros de bacterias hidrocarbonoclasticas, recolectadas NW del Golfo de México durante el crucero oceanográfico MARZEE-III.....	31
Tabla 6. Parámetros físico-químicos de los sedimentos superficiales obtenidos de la plataforma y talud continental en la zona NW del Golfo de México, durante el crucero oceanográfico MARZEE-III en 2012. Pigmentos-estación (P-#)	46
Tabla 7. Programación de los solvente	48
Tabla 8. Concentración de los pigmentos registrados en las estaciones obtenidas del NW del Golfo de México. La concentración se expresa en ng/g	50
Tabla 9. Resultados de las diferencias estadísticas significativas entre pigmentos y profundidad.....	52
Tabla 10. Coeficiente de correlación lineal	53

RESUMEN GENERAL

Con la finalidad de conocer si los sedimentos superficiales de la plataforma y talud continental del Noroeste (NW) del Golfo de México presentan alguna afectación biológica a causa de los hidrocarburos, en este estudio, se han utilizado las comunidades bacterianas y pigmentos como indicadores de las condiciones ambientales. Las muestras fueron colectadas en los meses de Octubre-Noviembre del 2012. Para el análisis de la diversidad bacteriana, se recolectaron cuatro muestras y se examinaron mediante la técnica de pirosecuenciación. Los resultados revelaron un total de 60 phyla, 151 clases, 193 órdenes, 204 familias, 191 géneros y 27 especies, siendo el phylum más representativo las Proteobacterias, y dentro de estas la clase de mayor abundancia fueron las γ -proteobacterias. De acuerdo con la diversidad bacteriana los sitios fueron agrupadas en plataforma continental interna (B-13 y B-25) y talud continental (B-9 y B-6). De los 191 géneros registrados, 81 tienen al menos un gen identificado con rutas metabólicas involucradas en la degradación de compuestos contaminantes. La proporción de géneros con la capacidad de degradar contaminantes fue menor con respecto a las bacterias heterótrofas. Sin embargo, la proporción en lecturas fue inversa. Para los pigmentos, se recolectaron catorce muestras y se analizaron por medio de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Los resultados registraron seis pigmentos (Clorofila-*a*, Feofitina-*a*, Feoforbide-*a*, Pirofeofitina-*a*, β -Caroteno y Zeaxantina), registrando una distribución correspondiente con la profundidad y la distancia a la costa. Mientras que los hidrocarburos no mostraron relevancia en la distribución o concentración de los pigmentos.

ABSTRACT

Bacterial consortiums and photosynthetic pigments were analyzed in surficial sediments from the continental shelf and slope of NW Gulf of Mexico as indicators of the presence of spilled hydrocarbons. The sediments were obtained in the winter of 2013. Pyrosequencing was applied to four sediment samples to determine bacterial diversity. A total of 60 Phyla, 151 classes, 193 orders, 204 families, 191 genera and 27 species were identified. Proteobacteria were dominant and the γ -proteobacteria were the most representative class. Keeping with bacterial diversity, the sites were grouped into the inner continental shelf (B13 and B-25) and the continental slope (B9 and B-6). At least 81 of the recognized genera contained one gene associated to metabolic pathways involving degradation of pollutant compounds. The ratio of genera with the ability to degrade contaminants was lower than that of heterotrophic bacteria. However, the ratio of readings of genera with the ability to degrade contaminants was inverse. Pigments obtained from fourteen sampled sites in the area of study were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). This analysis revealed the presence of six pigments: chlorophyll-a, pheophytin-a, Pheophorbide-a, Pheophytin-a, β -carotene, and Zeaxanthin. The most representative variables were depth and distance from shore. However, hydrocarbons presence was not related to the distribution or concentration of pigments.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El Golfo de México tiene un gran valor en términos ambientales, sociales y económicos. Estas condiciones lo han llevado a soportar actividades humanas que se han incrementado en variedad e intensidad y que pueden poner en riesgo la zona. Una de las actividades de mayor peso es la explotación petrolera, que con sus procesos (exploración y transporte) conlleva a múltiples problemas ambientales, ya que está latente la introducción de hidrocarburos hacía el medio marino, no solo por el riesgo de accidentes fatales, sino también por las pequeñas cantidades de éstos y otros compuestos arrojadas cotidianamente (Yañez, *et al.*, 2004).

Dada la importancia y particularidad del Golfo de México es de sumo interés evaluar las condiciones ambientales del sitio que enfrenta graves impactos por contaminación de hidrocarburos de petróleo y sus derivados (Beltrán, *et al.*, 2005). La introducción se da de forma crónica (descargas petrogénicas por fuentes terrestres o marinas) o aguda (a menudo catastrófico como el caso de un derrame) (Beltrán, *et al.*, 2005). El ejemplo más reciente es lo ocurrido el 20 de abril del 2010, a 50 MN al sureste del Delta del río Mississippi en el norte del Golfo de México; un grave accidente en la plataforma petrolera *Deepwater Horizon* (DWH) operada por *British Petroleum* (BP), derramó aproximadamente 4.9 millones de barriles de petróleo a 1600 m de profundidad, siendo éste el mayor derrame de petróleo en el mar registrado en la historia (Kostka *et al.*, 2011, Soto y Botello, 2011).

A partir de este accidente, se generó una enorme preocupación, tanto por el gobierno como de la comunidad científica y la sociedad, debido a la contaminación y las consecuencias que pueda generar el derrame en los ecosistemas de las costas mexicanas y en la Zona Económica Exclusiva (EEZ) del Golfo de México. Por lo cual a partir del año 2010 se inició un estudio multidisciplinario por parte de un grupo académicos del Instituto de Ciencias Mar y Limnología (ICMyL) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) llamado “Marco Ambiental de las Condiciones Oceanográficas en el Sector NW de la ZEE del Golfo De México (MARZEE)”. Esta campaña exploró los ambientes de plataforma y talud continental del sector noroeste del Golfo de México, frente a las costas de Tamaulipas y norte de Veracruz con el objetivo de establecer una línea base en las características oceanográficas,

geoquímicas y ecológicas del sitio, buscando evidencia de hidrocarburos provenientes del derrame de petróleo del pozo Macondo.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de saber que las bacterias han servido para identificar ambientes en condiciones anormales, el uso de éstas como indicadoras de contaminación por petróleo con respecto a los niveles de hidrocarburos son relativamente recientes (Hood *et al.*, 1975). Es importante poner atención en las comunidades bacterianas ya que, de acuerdo con Lizárraga-Partida (1982), la proporción de bacterias hidrocarbonoclasticas respecto de las heterótrofas (HET/HID) son un buen indicador del grado de impacto ocasionado por la presencia hidrocarburos en el ambiente y, en algunos casos, la fuente de contaminación. La respuesta a la introducción de hidrocarburos al ambiente, se manifiesta con el incremento drástico en la concentración de bacterias degradadoras de hidrocarburos con respecto a las heterótrofas. Lizárraga-Partida (1996), menciona que la identificación de estas bacterias ha permitido determinar zonas contaminadas por hidrocarburos en el medio marino sin contar con información previa de la fuente.

Por su parte, los pigmentos ya sean clorofilas o carotenoides funcionan para la captura de la luz absorbiéndola y transformándola en energía, además de funcionar como protectores de células radicales dañinas en organismos fototróficos y no fototróficos. Los pigmentos están distribuidos de forma no uniforme y son vitales para las algas marinas, bacterias e incluso en algunos macro organismos (Palmer y Baker, 1978; Reuss, 2005). Sin embargo dependen mucho de las condiciones ambientales, por lo que su presencia y calidad pueden considerarse como indicadores de contaminantes en el sitio. Autores como Zsolnay, (1973, 1977 y 1979), han utilizado principalmente la Clorofila-*a* para hacer correlaciones en ambientes contaminados por hidrocarburos.

En el NW del Golfo de México no se han realizado estudios en las poblaciones bacterianas y presencia de pigmentos en sedimento, y con base en lo expuesto con anterioridad, los datos obtenidos en este trabajo son una oportunidad para sentar precedentes con la caracterización de las comunidades bacterianas y los pigmentos contenidos en los sedimentos superficiales presentes en la zona de estudio.

ÁREA DE ESTUDIO

Por sus dimensiones y características de cuenca semicerrada, el Golfo de México es el gran mar interior del Atlántico tropical y un verdadero mediterráneo entre las Américas del norte y del sur. Pocas zonas del planeta pueden ofrecer, a distancia relativamente cortas, la gran diversidad de ambientes que aquí se encuentran. A lo largo de los 4,000 km de litoral, entre las penínsulas de la Florida y de Yucatán se integra una compleja combinación de hábitats (Fig. 1) (Monreal *et al.*, 2004).

La parte litoral de las costas de Tamaulipas y el norte de Veracruz está constituida por una plataforma de menos de 50 km de ancho, la cual termina a 100 o 200 m de profundidad. La plataforma es abrupta y se distingue por relieves paralelos a la línea de costa (Aguirre, 2004).

Tiene una gran influencia rivereña de cuando menos tres ríos (Bravo, Soto La Marina y Pánuco) cuyos caudales enriquecen con nutrientes y materia orgánica las aguas de la plataforma continental adyacente. Además la presencia de extensas lagunas costeras, como la Laguna Madre y la de Tamiahua (Soto y Botello, 2011), provoca que el ambiente sedimentario en la franja costera esté dominado por aportes terrígenos de ríos y lagunas en tanto que a mayor profundidad predominan las arenas y los lodos de origen biogénico (Soto y Botello, 2011).

En la zona, el ciclo anual de la descarga de los ríos es escasa de febrero a mayo, y aumenta entre julio y septiembre durante la época de lluvias. La descarga de los ríos Soto La Marina, Bravo y Pánuco producen una capa con una salinidad baja de 30UPS y temperatura de 21 a 23°C que puede llegar hasta los 100 km de la desembocadura. En la temporada de invierno (enero), en el área comprendida entre la zona de descarga del río Bravo y la Laguna Madre, la temperatura superficial es de 12°C y en el noroeste al interior de la plataforma continental en un área de 110 km es de 10°C (Aguirre, 2004).

Los valores de referencia de nutrientes (PO_4 , NO_3 , NO_2 , y SiO_2) tienden a ser más enriquecidos durante la fase de mezcla de la columna de agua, disminuyendo sus valores de concentración cuando se restablece la fase estratificada. Las concentraciones de metales

pesados y compuestos policíclicos aromáticos de hidrocarburos (HAPs) contenidos en los sedimentos del área de estudio cuentan con registros de concentraciones significativas de Cromo, Níquel, Plomo y Cadmio. Además se han registrado niveles altos ($26.9\mu\text{g}\text{g}^{-1}$) de HAPs en sedimentos de la plataforma continental de Tamaulipas y Veracruz (Soto y Botello, 2011).

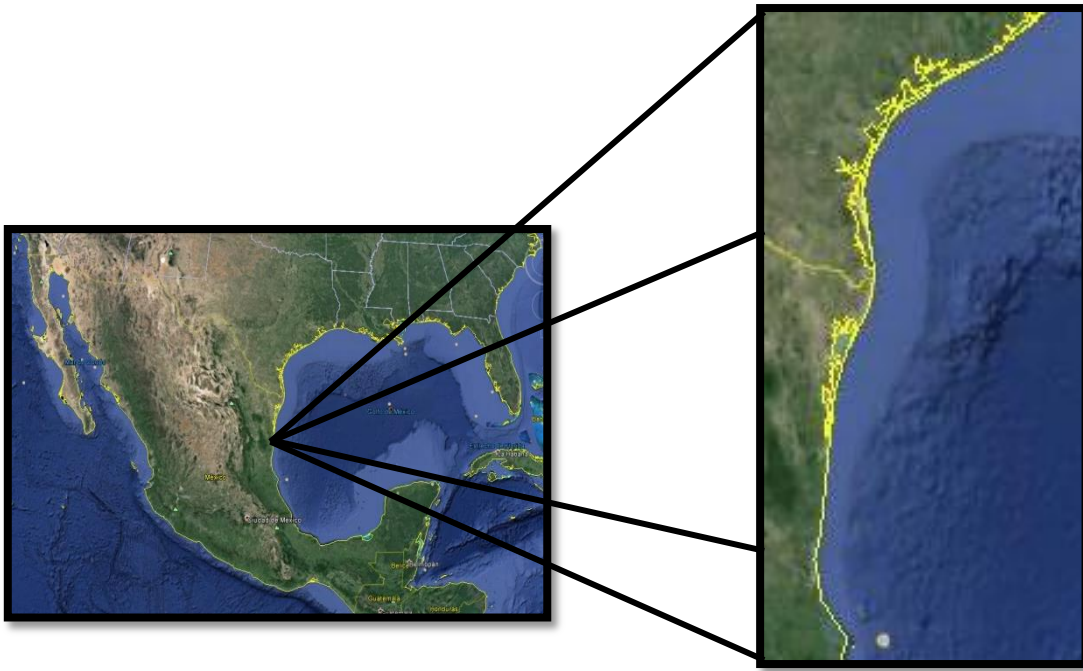


Figura 1. Localización geográfica de la zona de muestreo en el NW del Golfo de México.

CAPÍTULO UNO

BACTERIAS

RESUMEN

En este estudio se evaluó la diversidad bacteriana en los sedimentos superficiales de la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México con la finalidad de conocer la proporción de bacterias heterótrofas con respecto a las hidrocarbonoclasticas; mediante el aislamiento de DNA, amplificación del gen ARNr 16s y pirosecuenciación utilizando la plataforma Roche 454 FLX. Se obtuvo un total de 1, 095,768 secuencias, con un porcentaje de asignación taxonómica por encima del 80%. El análisis filogenético agrupo 60 phyla, 151 clases, 193 órdenes, 204 familias, 191 géneros y 27 especies. El phylum más abundante fue el de las Proteobacterias. Dentro de este phylum las γ -proteobacterias fueron la clase más representada en las estaciones B-13, B-25 (plataforma continental interna) y B-9 (talud continental), mientras que en el sitio de mayor profundidad (>1000m), la estación B-6, la clase más abundante fueron las δ -proteobacterias. El orden con mayor abundancia en las estaciones de la plataforma continental interna (B-13, B-25) y una del talud (B-6) fueron las Thiotrichales, mientras que en la muestra B-9 (talud continental) fueron Alteromodales. Para los géneros, el más representativo fue *Desulfococcus* para los sitios de la plataforma continental interna (B-13 y B-25), para las estaciones del talud continental fueron *Propionibacterium* en la estación B-6 y *Shewanella* en la estación B-9, representando el 87% del total de lecturas de este sitio. De acuerdo con los géneros las estaciones se separan en plataforma continental interna y talud continental, siendo la profundidad, la distancia a la costa, temperatura, la concentración de aluminio y oxígeno disuelto las variables de mayor importancia. De los 191 géneros registrados, 81 tienen al menos un gen identificado con rutas metabólicas involucradas en la degradación de compuestos contaminantes. Los más representativos, presentes en los cuatro sitios fueron: *Shewanella*, *Clostridium*, *Desulfococcus*,

Planctomyces, *Synechococcus* y *Pseudomonas*. La proporción de géneros con la capacidad de degradar contaminantes fue menor con respecto a las bacterias heterótrofas. Sin embargo, la proporción en lecturas de géneros con la capacidad de degradar contaminantes fue inversa.

ABSTRACT

Bacterial diversity was evaluated in surface sediments from the continental shelf and slope of NW Gulf of Mexico. The heterotrophic/hydrocarbonoclastic ratio was determined using DNA purification, 16S rRNA gene amplification, and 454/Roche FLX pyrosequencing. A total of 1,095,768 sequences were generated with a taxonomic assignment percentage above 80%. The phylogenetic analysis congregated 60 Phyla, 151 classes, 193 orders, 204 families, 191 genera and 27 species. The most abundant Phylum was Proteobacteria. The class γ -proteobacteria prevailed on the inner shelf and upper continental slope sediments. In contrast, the class δ -proteobacteria was dominant at depths exceeding 1000 m. Similarly, the order Thiotrichales was the most abundant in the continental shelf (B-13 and B-25) and B-6 site, but in the slope (B-9) was Alteromonadales. The occurrence of the genus *Desulfococcus* was confined to the inner continental shelf while *Propionibacterium* and *Shewanella* were mostly detected in deep-sea sediments. The complexity of the bacterial consortiums studied here seems significantly influenced by depth, distance from the shoreline, temperature, dissolved oxygen and aluminum. At least 81 of the recognized genera contained one gene associated with metabolic pathways involving degradation of pollutant compounds. The most representative were: *Shewanella*, *Clostridium*, *Desulfococcus*, *Planctomyces*, *Synechococcus* and *Pseudomonas*. The ratio of genera with the ability to degrade contaminants was lower than that of heterotrophic bacteria. However, the ratio of readings of genera with the ability to degrade contaminants was inverse.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades económicas en el GM está basada en la extracción, procesamiento y distribución de hidrocarburos y sus derivados, que son compuestos de origen biológico (lípidos y ácidos grasos de plantas y animales). Muchos de estos compuestos constituyen contaminantes con gran impacto en los ecosistemas debido a que alteran el equilibrio ecológico y pueden ser dañinos para el hombre (Bracho *et al.*, 2004; Atlas y Hazen, 2011). Estos compuestos pasan tanto tiempo en los sedimentos marinos, que diversos organismos han desarrollado la capacidad de utilizar estos como fuentes de carbono y energía en su crecimiento (Yakimov *et al.*, 2003; Bracho *et al.*, 2004; Echeverri, 2009; Atlas y Hazen, 2011).

Existe un número significativo de especies entre bacterias, arqueas y hongos de ambientes marinos, con la capacidad de degradar u oxidar petróleo en condiciones ambientales favorables (Echeverri, 2009). La biodegradación bacteriana del petróleo en ambientes contaminados se ha documentado en numerosos trabajos, desde los años sesentas (Mironov, 1969; Turner y Ahearn, 1970; Walker y Colwell, 1973; Hood *et al.*, 1975). En la zona intermareal al sureste del GM, Rosano *et al.* (2009), evaluaron la diversidad bacteriana presente en sedimentos en el suroeste del Golfo de México, identificando a las de metabolismo degradador de hidrocarburos. En el 2012, además analizaron la densidad de bacterias heterótrofas (HAB) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (HDB). Sus resultados fueron muy variable a lo largo de la playa con respecto al grado de influencia de hidrocarburos de petróleo.

Después del derrame en el pozo Ixtoc I (1979), Lizárraga-Partida (1982) midió la proporción de bacterias hidrocarbonoclasticas con respecto de las heterótrofas (HDB/HAB) y concluyó que es un buen indicador del grado de impacto ocasionado por la presencia hidrocarburos en el ambiente. A partir del desastre ocurrido en la plataforma *Deepwater Horizon* (DWH), de la *British Petroleum* (BP) en 2010 frente a las costas de Luisiana, diversos grupos de investigación han colaborado para conocer el impacto causado en las aguas y costas del GM, utilizando a las comunidades bacterianas indígenas heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos como indicadores del medio. Por ejemplo Atlas y Hazen

(2011), hicieron una comparación entre el derrame del *Exxon Valdez* en 1999 y la DWH, donde, a pesar de ser sistemas diferentes, los microorganismos en ambos sitios fueron capaces de degradar estos compuestos, mientras que Kostka *et al.* (2011), determinaron y caracterizaron los taxas degradadores de petróleo en la Playa Pensacola, Florida, sitio directamente impactado por el derrame de la DWH. Beazley *et al.* (2012), analizaron la sensibilidad de las marismas de la misma zona. Al comparar las comunidades bacterianas, encontraron que la diversidad microbiana tuvo cambios significativos a lo largo de los periodos del estudio, confirmando que los grupos descritos como degradadores de hidrocarburos se incrementan con el aumento en la concentración de hidrocarburos, y disminuyeron una vez que estos decrecen.

Con ayuda de técnicas moleculares y el inicio del uso de la pirosecuenciación, tras este mismo evento Chakraborty *et al.* (2012), buscaron una relación entre el petróleo, los gases y los dispersantes, con la actividad en comunidades bacterianas degradadoras de hidrocarburos. Mason *et al.* (2012), determinaron miembros de la comunidad bacteriana indígena. Las secuencias del metagenoma y metatranscriptomic revelaron que los genes de la motilidad, la quimiotaxis y la degradación de hidrocarburos alifáticos se expresan de una manera significativa en las áreas contaminadas por hidrocarburos en comparación con las zonas no contaminadas. Kimes, *et al.*, (2013) analizaron el metagenoma en sedimentos del GM posteriormente al derrame, para corroborar la dominancia de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Liu y Liu (2013), evaluaron la estructura de la comunidad bacteriana en sedimentos de marismas y aguas superficiales. Un año después, evaluaron sedimentos depositados, y con sus resultados proporcionaron información importante de los grupos relevantes en la degradación de hidrocarburos con una línea de tiempo.

En este estudio, se describe la diversidad bacteriana mediante el aislamiento de ADN, amplificación del gen ARNr16s (ribosomal) y pirosecuenciación. Así mismo, se determinó cuál es la proporción de los consorcios bacterianos que se encuentran relacionados con el metabolismo de los hidrocarburos (bacterias hidrocarbonoclasticas), en los sedimentos superficiales de la plataforma y talud continental en la zona NW del Golfo de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante la campaña oceanográfica MARZEE-III a bordo del B/O “Justo Sierra” (Octubre-Noviembre, 2012), se recolectaron muestras de sedimento superficial mediante un nucleador Reineck en 36 lugares situados en la parte NW del Golfo de México sobre la plataforma y talud continental frente a las costas de Tamaulipas y norte de Veracruz. (Fig.2). Para el análisis de bacterias, se tomaron 4 submuestras de sedimento de los primeros 5cm de profundidad y fueron conservadas en tubos Eppendorf de 125 ml previamente esterilizados y congelados a -70° C en nitrógeno líquido, hasta su posterior procesamiento en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (UNAM) en Cuernavaca, Morelos. Los parámetros físico-químicos utilizados en el presente estudio, fueron proporcionados por el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Tabla 1).

Con la finalidad de observar la diversidad bacteriana de las cuatro muestras de sedimento superficial colectadas a diferentes profundidades en el NW del Golfo de México dos en la plataforma continental interna (a 50m; B-13 y B-25), y dos del talud continental (a 500m; B-9, y a 2000m; B-6). Los cuatro núcleos fueron seleccionados con base en las características ambientales que presentaron estos mismos sitios como parte del proyecto en años anteriores (MARZEE I (2010) y MARZEE II (2011)). Las características ambientales para las muestras B-6, B-9 y B-13 fueron: la presencia elevada de Hidrocarburos alifáticos policíclicos (HAPs), Hidrocarburos alifáticos, materia orgánica y algunos elementos como el Al, Mg, Ni, Fe, Va y Co. La muestra B-25 se tomó como blanco, ya que en los cruceros anteriores presentó características inversas, esto es, con baja concentración en las variables antes mencionadas.

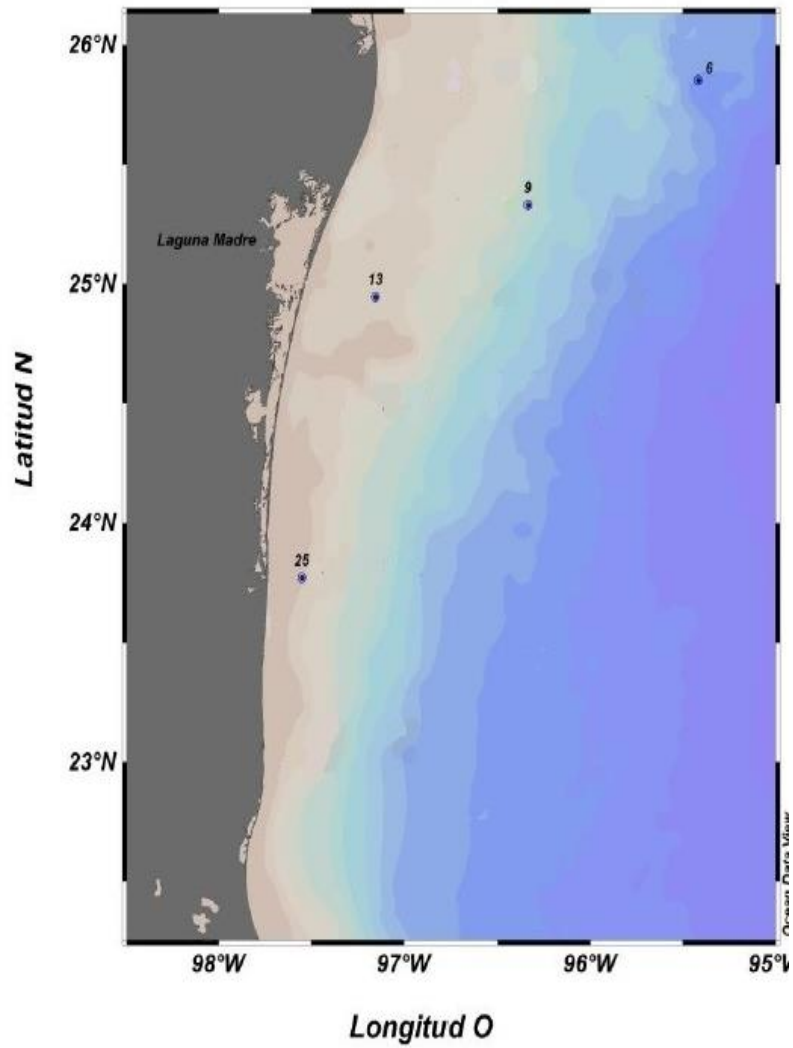


Figura 2. Localización de los sitios de muestreo de sedimentos superficiales para análisis de bacterias en la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México.

Tabla 1. Parámetros hidrográficos físico-químicos registrados en los cuatro sitios de muestreo sedimentario en la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México. Bacterias-estación (B-#).

Estación	B-13	B-25	B-6	B-9
Longitud	97.13	97.53	95.40	96.31
Latitud	24.87	23.76	25.91	25.36
CONDICIONES HIDROGRAFICAS				
Profundidad (m)	52	49	2181	511
Distancia a la costa (Km)	40	19	175	101
BIOGEOQUÍMICA ACUÁTICA				
Temperatura °C	27.3	26.1	4.3	8.8
Salinidad (UPS)	36.4	36.4	35	35.1
Oxígeno disuelto (ml/l ⁻¹)	4.67	4.56	5.6	2.89
CONTAMINACIÓN				
HAPs (µgg ⁻¹)	0.36	0.16	0.99	0.19
Alifáticos(µgg ⁻¹)	27.65	14.39	26.40	25.54
M O%	2.26	2.43	1.92	1.92
Corg%	1.31	1.41	1.12	1.12
δ ¹³ cVPDB (‰)	-21.14	-21.14	-21.52	-21.10
NT	0.13	0.13	0.16	0.14
C/N	9.40	10.35	6.91	7.96
Metales pesados				
Al (%)	8.21	5.93	2.09	8.23
Mg (%)	0.31	0.39	0.60	0.29
Fe (%)	4.27	5.20	3.87	5.21
Co (µgg ⁻¹)	14.32	16.88	19.87	18.44
Ni (µgg ⁻¹)	34.41	39.37	53.31	50.27
Cr(µgg ⁻¹)	78.80	83.79	75.51	91.40
V (µgg ⁻¹)	131.58	159.73	152.59	188.29

Extracción del ADN

Se realizó una extracción directa de ADN en cada muestra de sedimento con el “kit” “Power Soil™ DNA Isolation” (Mo Bio Laboratories, Inc), de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante, utilizando de 0.4 a 1.0 gramos de sedimento. Una vez extraído el ADN se realizó un análisis de calidad mediante electroforesis en forma rutinaria utilizando un gel de agarosa al 1% con buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) a 80 mV, 10µl del ADN extraído, 2µl de colorante y 3µl de marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder) y teñido con bromuro de etilo (Fig. 3).

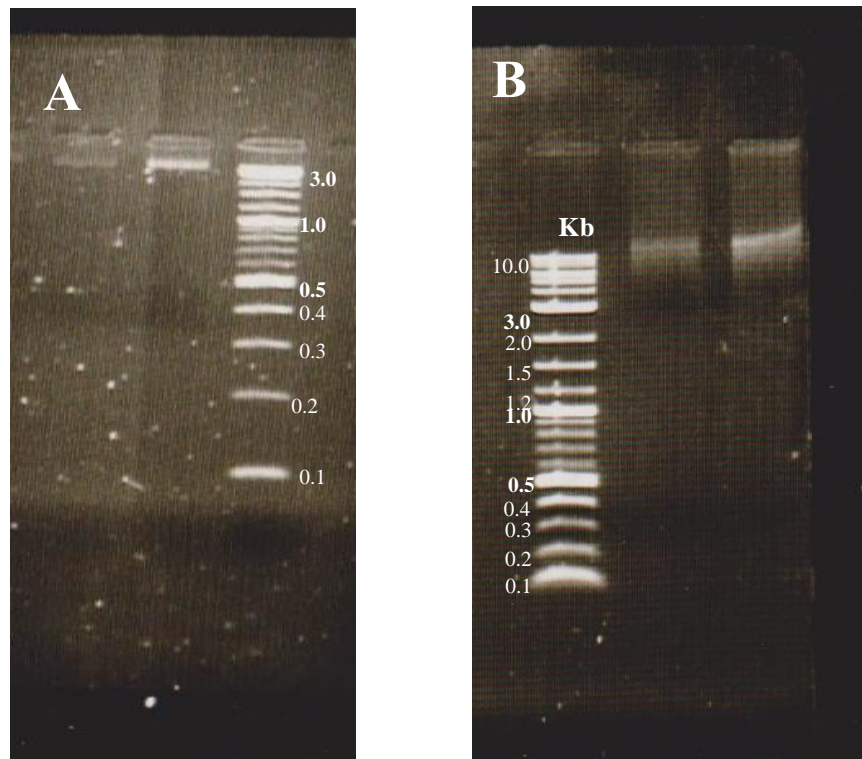


Figura 3. Gel de agarosa al 1%, que muestra el ADN extraído de las muestras de sedimento. A) De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: B-6 y Carril 3: B-25. B) De izquierda a derecha; Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: B-9, y Carril 3:13.

Amplificación por PCR del gen ARNr 16s

Se realizó un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, del ARNr 16s con el objetivo de obtener el mayor número de copias del fragmento de ADN correspondiente, utilizando un termo-reciclador Robo Cicler 40 Stratagene y una Taq polimerasa recombinante del proveedor Invitrogen (Tabla 2) (Díaz, *et al.*, 2014). El gen que codifica para el ARNr 16s se amplificó con los oligonucleótidos universales para bacterias (Ghosh, *et al.*, 2010):

515F (5'-GCGGATCCTCTAGACTGCAGTGCCAGCAGCCGC GGTA-3') y
 1492R (5'-GGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGTTACCTTGTTACGA CTT-3')

Tabla 2. Condiciones del PCR ARNr 16s y ciclos programados para el termorreciclador.

Condiciones		Programa		
Reactivo	Cantidad	Temperatura°C	Tiempo (m)	Ciclos
Agua	29.5µl	94	3	1
Buffer 10x	5µl	94	1	5
Mg 25mM	2µl	50	1:30	
dNtp 10mM	2µl	72	2:00	
fD1	2. 5µl	94	0:45	25
rD1	2. 5µl	50	1:30	
ADN	4µl	72	2:00	
TAQpolimerasa	2. 5µl	72	10	

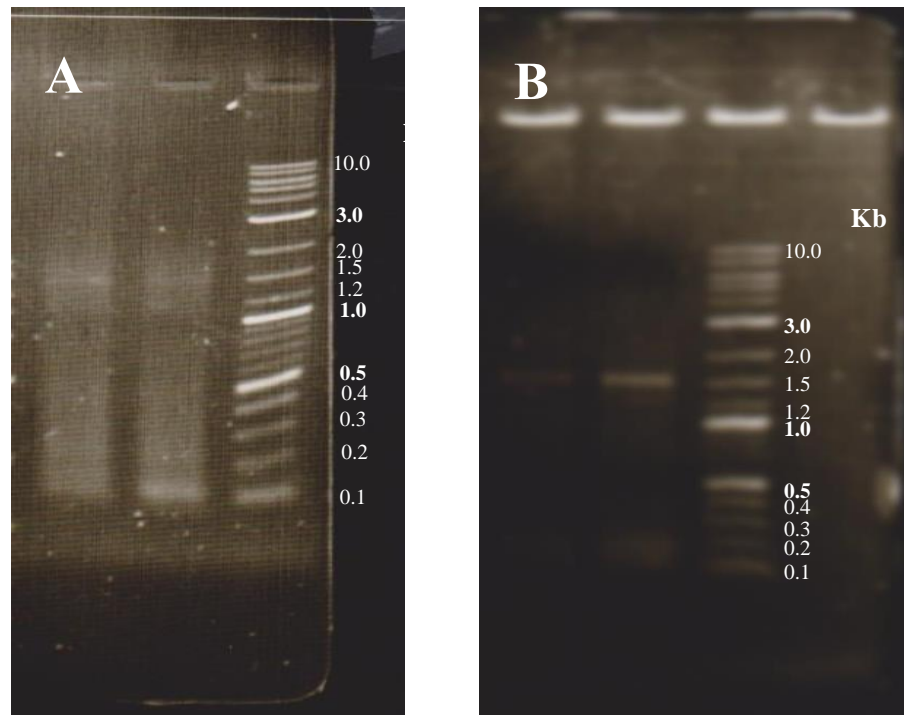


Figura 4. Gel de agarosa al 1% que muestra la calidad de los PCR. A) De izquierda a derecha: Carril 1: B-6, Carril 2: B-25 y Carril 3: Marcador de peso molecular. B) De izquierda a derecha; Carril 1: B-9, Carril 2: B-13 y Carril 3: Marcador de peso molecular

La calidad de amplificación de los PCR fue evaluada mediante electroforesis de rutina con geles de agarosa de la manera descrita anteriormente (Fig. 4).

Se hicieron pruebas de PCR con los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen ARNr 16s de bacterias, con 300pb (pares de bases) (King *et al.*, 2013).

(515F) GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT
(806R) GTG CCA GCM GCC GCG GTA A

Pirosecuenciación

Una vez obtenido el ADN purificado y se corroboró la amplificación por PCR, se determinó su concentración de ADN en un cuantificador de ADN (NanoDrop 2000C). Aproximadamente 100 ng de ADN (por muestra) fue enviada a los laboratorios MOgene, LC, St. Louis, MO, EE. UU., donde se llevó a cabo la secuenciación por pirosecuenciación, utilizando el secuenciador automático Roche 454 FLX, mediante la técnica química del Titanio en la plataforma ¼.

Identificación y análisis de las secuencias del ADNr 16s

El análisis metagenómico para la asignación jerárquica taxonómica bacterial de las lecturas, se realizó utilizando el software Qiime version 1.8 (Caporaso et al., 2010). Para cada una de las cuatro muestras, una vez que las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) fueron asignadas a cada jerarquía, se procesó la información para compactarla en cada nivel. Posteriormente, se determinó que las jerarquías taxonómicas que se iban a considerar como estadísticamente significativas eran aquellas que estuvieran por arriba del primer cuartil. Para las muestras B-13, B-25, B-6 el corte se definió mayor o igual a 4 OTUs, mientras que para B-9 mayor o igual a 3 OTUs. Finalmente, solo se consideraron para el análisis aquellas que llegaran por lo menos a nivel de género compactando el nivel de especie.

Para determinar cuáles géneros identificados en este estudio tienen la capacidad de degradar los diferentes componentes de petróleo y otros contaminantes (ej, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcanos, azufre, benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, fenoles, fenantrenos, etc.), se realizó una búsqueda en la base de datos KEGG (por sus siglas en inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de los 35 genes previamente determinados en la literatura como asociados con la degradación de estos diferentes componentes (Anexo1). Después se corroboró la presencia de estos genes en las secuencias obtenidas.

Análisis estadístico

La matriz compuesta de estaciones, parámetros hidrográficos y físico-químicos, fueron sometidos a un Análisis de Componentes Principales (ACP), aplicando el programa PRIMER-E V.6, para detectar las variables que determinan la estructura de la comunidad bacteriana. Las estaciones de muestreo fueron inicialmente agrupadas de acuerdo con su composición del consorcio bacteriano en un análisis de conglomerados (CLUSTER).

La base de datos fue transformada por $\text{Log}(X+1)$, para reducir el efecto de la abundancia de OTU's y analizar la estructura de la comunidad bacteriana. La similitud entre los sitios de muestreo fueron calculados usando el índice de Bray-Curtis. Los resultados fueron evaluados a través un análisis ordinario por medias de escala multidimensionales no paramétricas (NMDS).

El método de análisis de similitudes (ANOSIM) de una vía, una sub-rutina dentro del PRIMER-E, se utilizó como test de estadística significativa en la composición de grupos de bacterias entre muestras con el valor de R y p . Los valores de $R=0$ indican una similitud entre grupos, mientras que valores $R \neq 0$ comunidades diferentes. Un valor de significancia (p) también fue calculado por el estudio (Rees *et al.*, 2004; Anderson, *et al.*, 2013). Se realizó un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) para identificar los géneros responsables por las diferencias significativas en la composición de la comunidad bacteriana entre estaciones.

RESULTADOS

Para conocer la diversidad microbiana se emplearon métodos no cultivables, mediante la extracción de ADN total, de las diferentes muestras de sedimento y la amplificación del gen RNA16s generando un total de 1, 095,768 secuencias por el método de pirosecuenciación, con un porcentaje de asignación taxonómica por encima del 80%. La herramienta de clasificación reveló entre los cuatro sitios una distribución similar entre el número de secuencias B-13 (24%), B-25 (27%), B-6 (21%) y B-9 (28%) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución del número de secuencias para cada uno de las muestras de sedimentos superficiales recolectadas al Noroeste (NW) del Golfo de México durante el crucero oceanográfico MARZEE-III.

	B-13	B-25	B-6	B-9	TOTAL
Bacterias	231,491	275,126	200,639	303,542	1,010,798
Desconocidos	24,668	23,122	31,295	5,885	84,970
Total de secuencias	256,159	298,248	231,934	309,427	1,095,768

El análisis taxonómico del perfil microbiano permitió conocer la presencia de organismos bacterianos, los cuales se agruparon en un total de 60 phyla, 151 clases, 193 órdenes, 204 familias, 191 géneros y únicamente 27 especies (Tabla 4). Se observaron diferencias entre los cuatro sitios cuando se examinó a nivel de phylum (Fig. 5).

Tabla 4. Número de lecturas por cada nivel de clasificación para todas las muestras analizadas.

	B-13	B-25	B-6GM	B-9	TOTAL
Phyla	55	56	36	39	60
Clase	127	114	79	74	151
Orden	156	145	88	74	193
Familia	158	155	117	85	204
Géneros	127	116	76	53	191
Especie	9	9	10	6	27

Clasificación filogenética

Entre las bacterias clasificadas, las Proteobacterias fue el grupo dominante en todos los sitios (64-83%); el resto de los grupos más representativos fueron los siguientes: En la plataforma continental interna, Planctomycetes (7%) y Acidobacterias (6%) en la muestra B-13, Bacteroidetes (11%) y Planctomycetes (4%) en la muestra B-25, *Actinobacterias* (12%). Mientras que en el talud continental, Acidobacterias (8%) en el B-6, y Firmicutes (14%) en la muestra B-9.

Debido a su dominancia, el grupo de Proteobacterias fue analizado con más detalle (Fig.6). La clase más abundante fue la γ -proteobacteria, con 66% del total. En tres de las muestras (B-13 con el 48%, B-25 con el 54% y B-9 con el 98%), esta clase fue la dominante con respecto a las demás clases, mientras que en la muestra B-6, la clase más abundante fue el de las α -proteobacteria representadas con el 46%, seguida de las γ -proteobacteria con el 41%. Este caso no es similar para los demás sitios, donde las α -proteobacterias representaron apenas el 14% en la muestra B-13, 17% en B-25, y solo el 1% en B-9.

Las δ -proteobacteria presentaron un porcentaje relevante en la muestra de la plataforma continental interna (B-13 y B-25) con el 37% y 28% respectivamente, entre tanto en las muestras del talud continental (B-6 y B-9) con tan solo el 11% y 1% respectivamente.

En general, las β -proteobacterias representaron tan solo el 1%. La muestra con mayor presencia fue en la B-6 (2%) del talud continental, mientras que en la plataforma continental interna (B-13 y B-25) solo tuvieron el 1%. En la muestra B-9 se registró con $>1\%$. El caso es similar para ϵ -proteobacteria y ζ -proteobacteria, que se encontraron apenas con el 1% del total de Proteobacterias, únicamente estuvieron presentes en de la plataforma continental interna (B-13 y B-25).

Dentro de las γ -proteobacterias, el orden de mayor diversidad fue el de los Thiotrichales para las muestras B-13 (49%), B-25 (55%) y B-6 (56%), mientras que para la B-9 fue el orden Alteromodales con el 99%. Los géneros más comunes en estos órdenes fueron *HTCC* en la plataforma continental interna (B-13 y B-25) y *Shewanella* en el talud continental (B-6 y B-9). *Shewanella*, presento una dominancia extrema, con 243,085 secuencias de un total de 309,427 en la muestra B-9.

La distribución a nivel de orden de las α -proteobacterias y δ -proteobacterias varió entre las cuatro muestras. En las α -proteobacterias, los órdenes predominantes dentro de la plataforma continental interna B-13 fueron Rhodospirillales (40%) y Rhodobacterales (37%). En la B-25, la proporción fue inversa: Rhodobacterales (47%) y Rhodospirillales (24%). En el talud continental, en la muestra B-6 se registraron Rhodobacterales (41%) y Rizobiales (36%), mientras que en la B-9 el orden dominante fueron los Rizobiales (82%). Los principales géneros en la plataforma continental interna fueron *Devosia* (B-13 y B-25) y en el talud continental fue *Phaeobacter* (B-6), pero en la muestra B-9 solo se encontraron 4 géneros con una mínima presencia.

En cuanto a las δ -proteobacteria, los órdenes más representativos para las muestras de la plataforma continental interna B-13 y B-25 fueron Desulfobacterales, con el 40% y el 48% respectivamente y, Myxococcales con el 20% y 21%, respectivamente. Para las muestras del talud continental en B-6 los órdenes más dominantes fueron NB1-j (62%) y Myxococcales (20%), mientras que en la B-9, el más abundante fue Syntrophobacterales (50%), seguido de Desulfobacterales (21%). *Desulfococcus* fue el género más común en B-13, B-25 y B-9, seguido de *Nitrospina* en B-13, B-25 y B-6.

Se identificaron pocos géneros en las clases siguientes, β -proteobacteria (*Comamonas*, *Delftia* y *Herbaspirillum*), ϵ -proteobacteria (*Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Sulfurimonas*) y ζ -proteobacteria (*Mariprofundus*), pero éste último solo se registró en la plataforma continental interna B-13 y B-25 (Figura7).

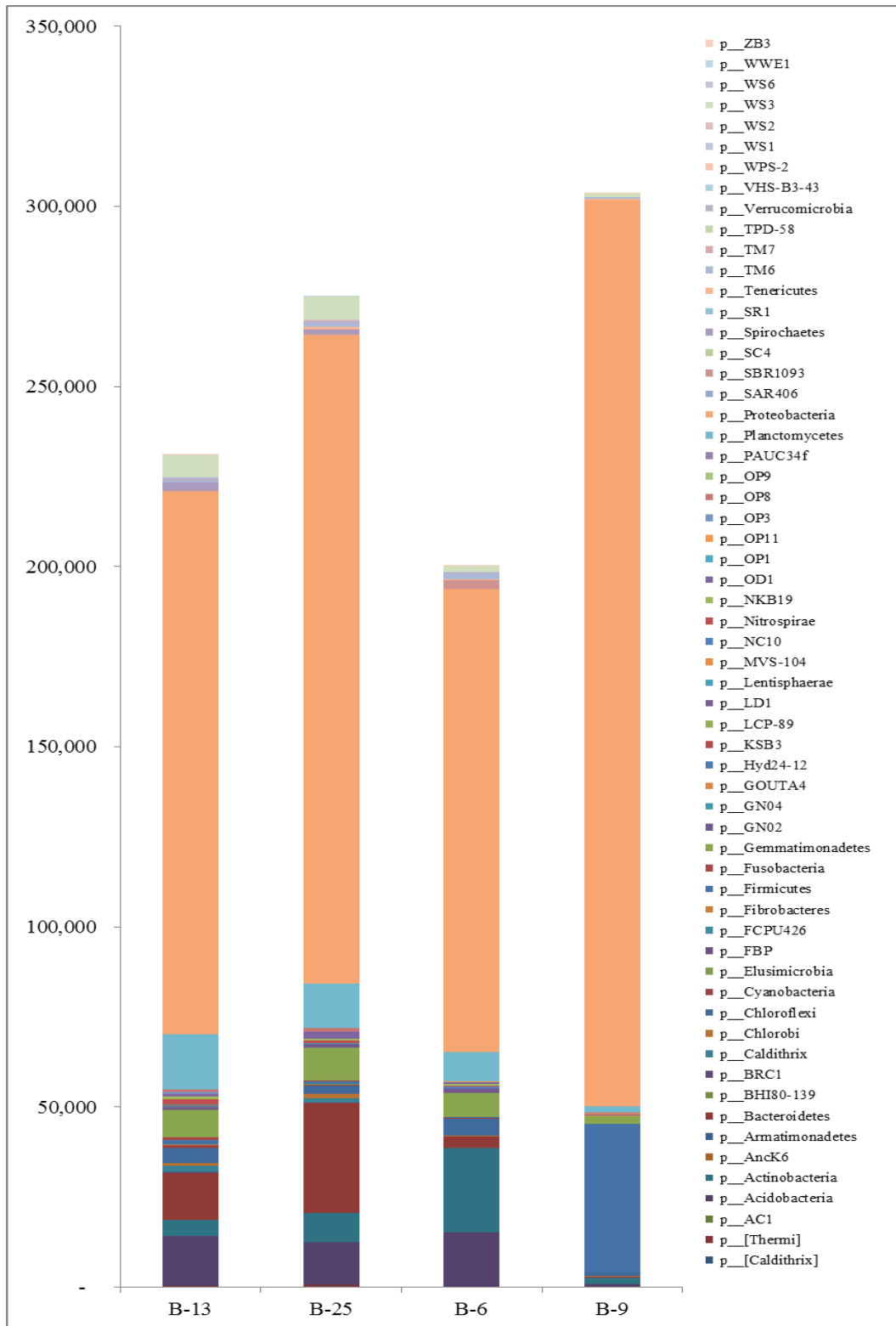


Figura 5. Clasificación de organismos a nivel phylum, mostrando similitudes entre las secuencias de los cuatro sitios de muestreo en la plataforma interna y talud continental del NW del Golfo de México.

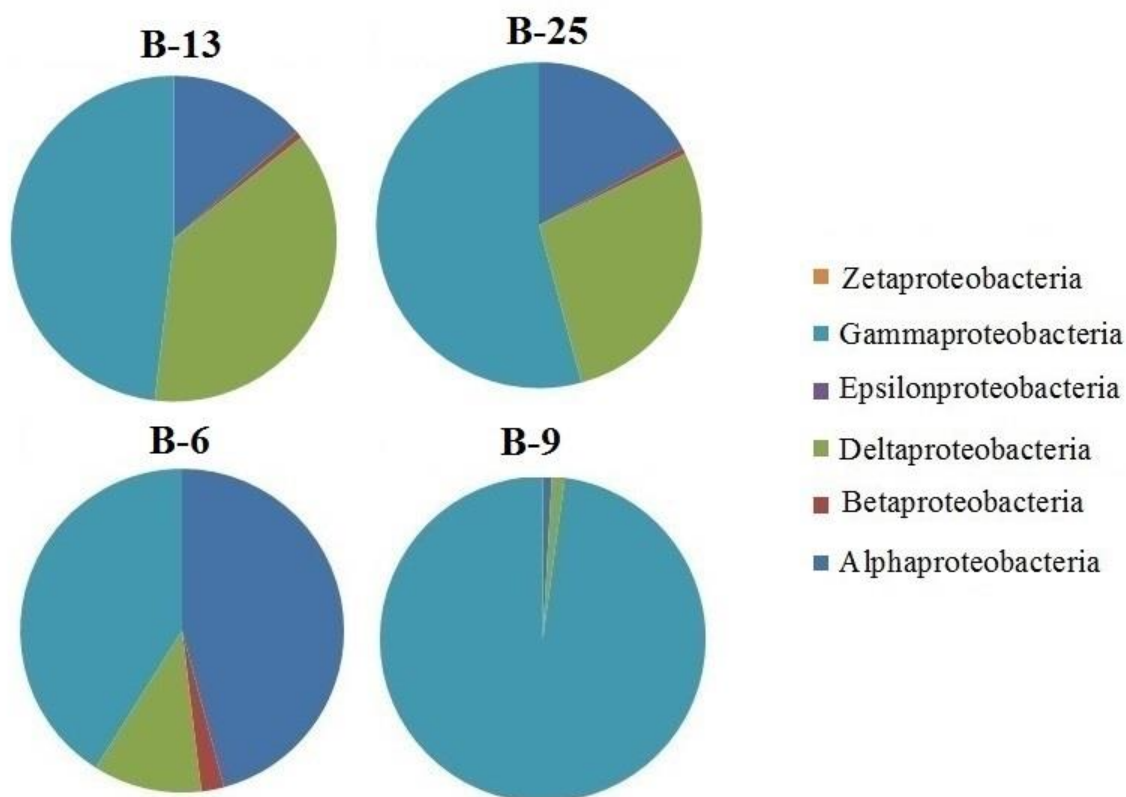


Figura 6. Diferencias de clases entre sitios del phylum Proteobacterias, mostrando similitudes entre las secuencias de los sitios (B-13 y B-25) de la plataforma interna y el B6 talud continental del NW del Golfo de México, mientras que el sitio B-9, tuvo presencia mayoritaria de γ -proteobacterias.

La biodiversidad fue estimada de acuerdo con los índices de diversidad de Shannon y Simpson a nivel de género, los resultados se presentan en el Tabla 5. La muestra que generó mayor diversidad, según el índice de Shannon, fue la B-6 con 76 géneros (2.92), seguida de los sitios de plataforma interna, B-13 con 127 géneros (2.32) y B-25 con 116 géneros (2.24). La diversidad más baja se presentó en la B-9 del talud continental con 53 géneros (0.533), así como también el índice de dominancia de Simpson con un valor de 0.241, lo cual se traduce en una baja diversidad o alta dominancia, mientras que para las otras muestras la diversidad y dominancia es media, por tanto no hay una dominancia marcada de un género bacteriano en particular.

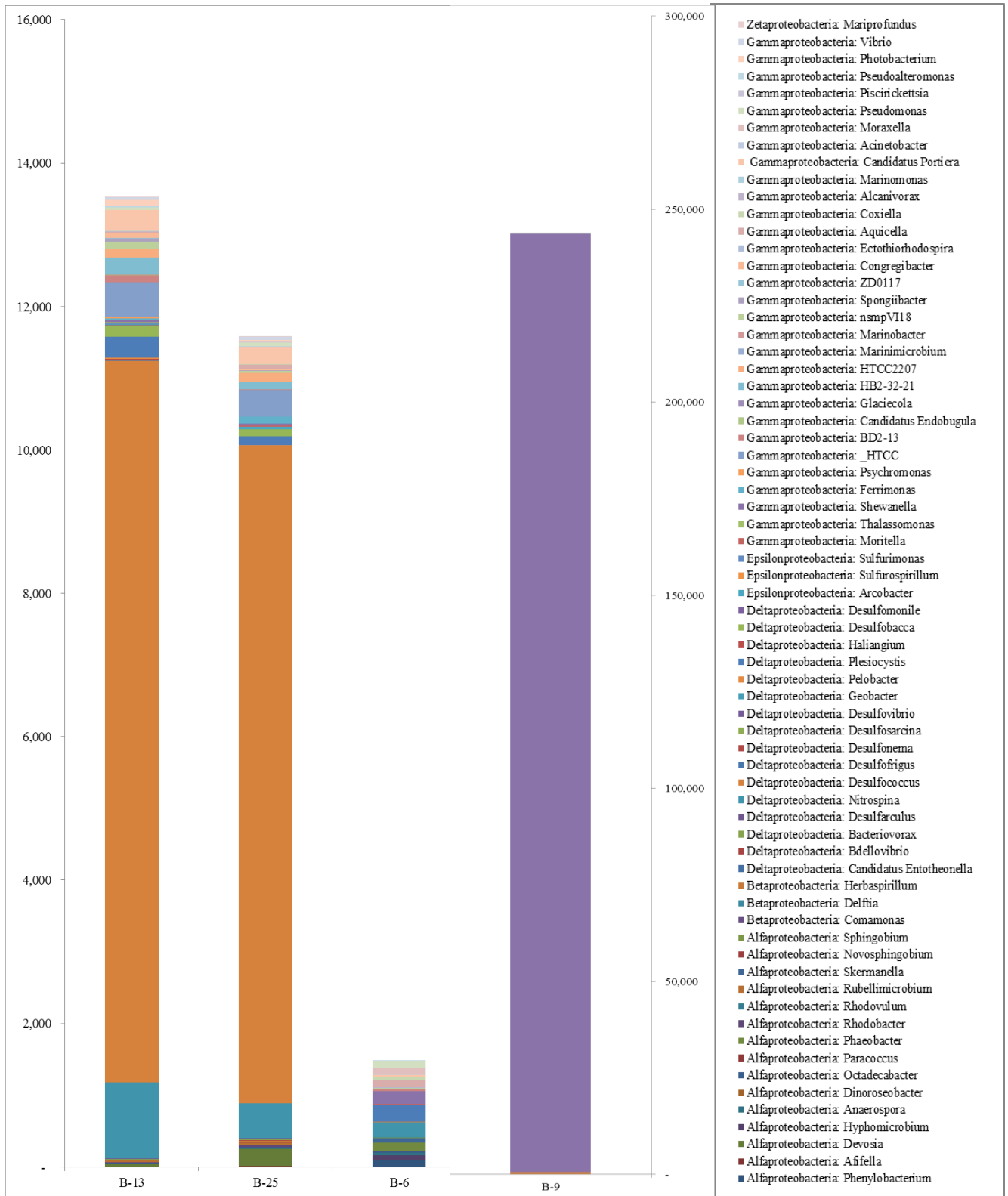


Figura 7. Clasificación de organismos a nivel Género, revelando similitudes mostrando similitudes entre las secuencias de las estaciones de la plataforma interna (B-13 y B-25), del NW del Golfo de México.

Análisis estadísticos

Análisis exploratorio

El PCA de los parámetros ambientales permitió identificar dos componentes con un Eigenvalor de 5.25, describiendo el 97% de la varianza total de los datos. El primer componente del modelo explica el 93% y el segundo el 4%; estos componentes son definidos principalmente por la profundidad y la distancia a la costa, seguidos de la temperatura (negativamente), y las concentraciones de Al y O₂ disuelto (Fig. 8).

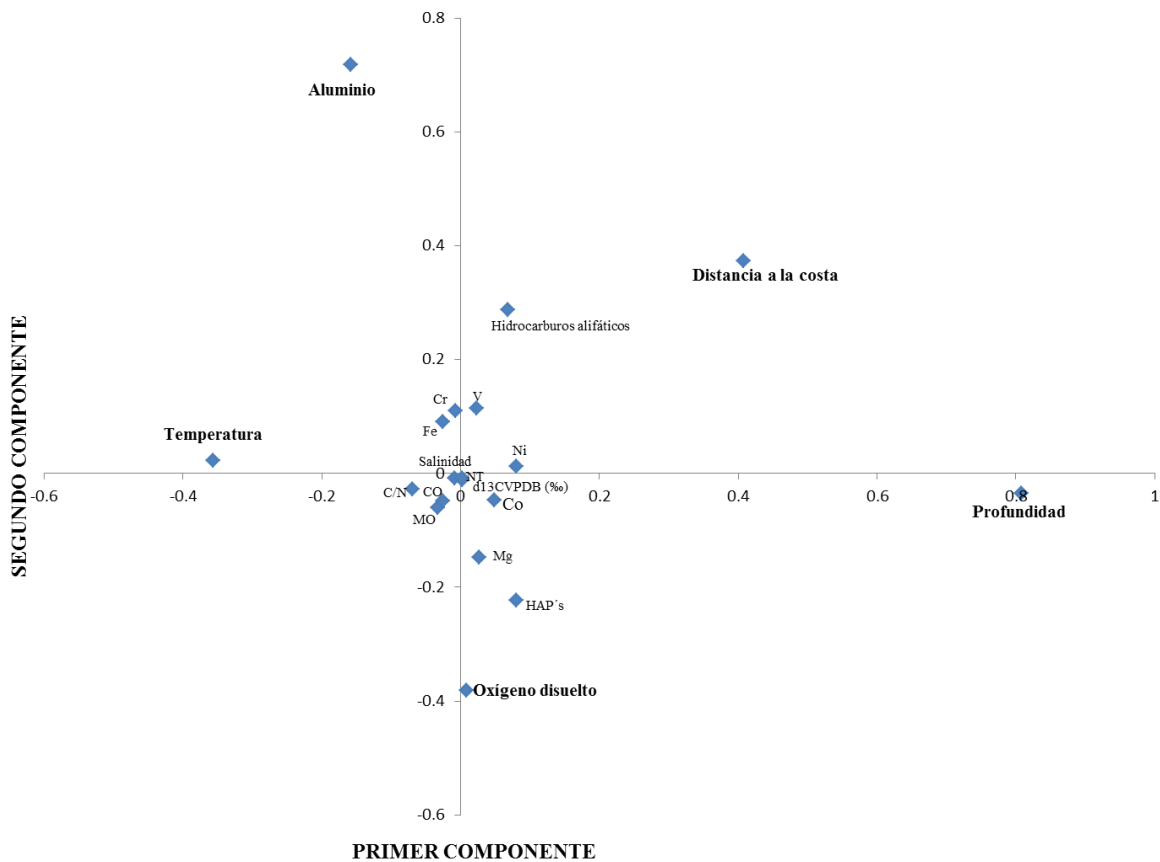


Figura 8. Representación gráfica del análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros ambientales.

El análisis de conglomerados (CLUSTER), agrupó las estaciones muestreadas en dos grupos principales, basado en la diversidad de los consorcios bacterianos identificados. Esta agrupación está influida principalmente por la profundidad (Fig. 9). En el CLUSTER A se

agruparon las estaciones situadas, en la plataforma continental interna (~50m) (B-13 y B-25), claramente separadas de las estaciones del talud continental (>200m). Las estaciones profundas quedaron agrupadas en el CLUSTER B (estaciones B-6 y B-9).

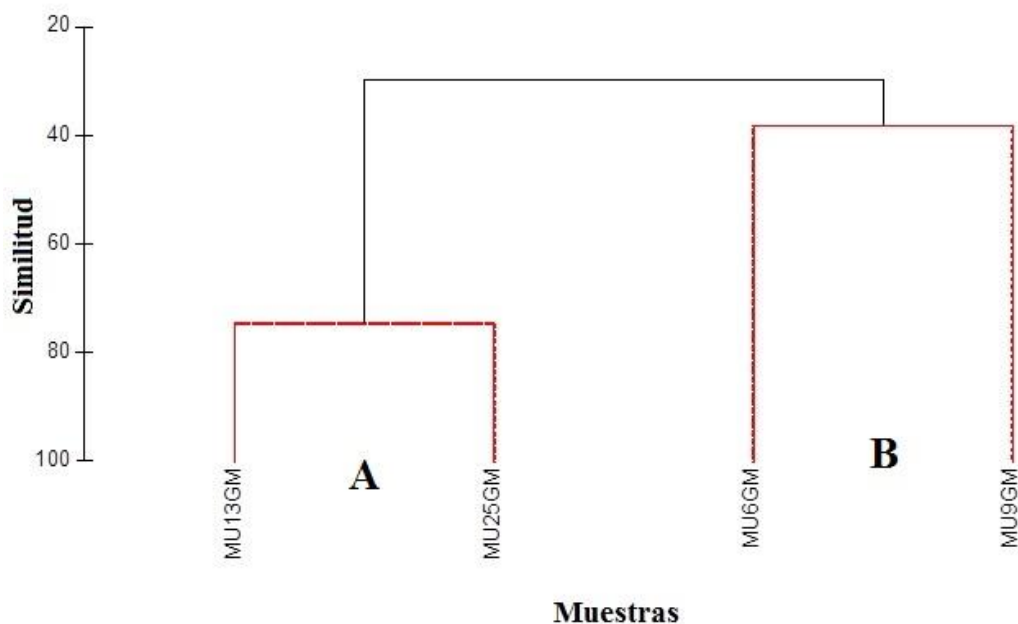


Figura 9. Análisis de conglomerados a nivel Género que separa estaciones someras (B-13 y B-25) de las profundas (B-6 y B-9)

Análisis de similitud

El valor de R arrojado por la prueba ANOSIM fue de 0.75, con una $p=0.3$, lo que demostró que la diferencia global entre los sitios (plataforma interna y talud continental) es grande y de acuerdo con la p no son estadísticamente significativa.

El análisis SIMPER mostró una similitud entre grupos (la plataforma continental interna y talud continental) muy baja, con un índice de disimilitud de 63.95. Los siguientes géneros representaron el 25% de la contribución de esta disimilitud: *Robigintalea* (2.12%), *Propionigenium* (1.85%), *Shewanella* (1.81%), *LCP-6* (1.65%), *HTCC* (1.61%), *HTCC2207* (1.50%), *Desulfococcus* (1.49%), *Propionibacterium* (1.47%), *Spirochaeta* (1.46%), *Desulfobacca* (1.40%), *Fluviicola* (1.38%), *CI_B004* (1.34%), *Devosia* (1.31%), *HB2-32-21* (1.30%), *B-42* (1.29%), *Ferrimonas* (1.25%) y *Pelagicoccus* (1.24%).

La similitud que existe dentro de cada complejo bacteriano fue diferente. Para el grupo A, formado por las estaciones de la plataforma continental interna (B-13 y B-25), el índice de similitud fue alto (74.51), y los géneros que contribuyeron con el 25% de esta similitud fueron: *Desulfococcus* (3.75%), *LCP-26* (2.76%), *Nitrospina* (2.55%), *Robiginitalea* (2.52%), *HTCC* (2.43%), *B-42* (2.36%), *Fluviicola* (2.33%), *Spirochaeta* (2.30%), *Planctomyces* (2.28%) y *Candidatus portiera* (2.25%). Sin embargo, en el grupo B, formado por las estaciones del talud continental (B-9 y B-6), tuvieron un índice de similitud bajo (38.11). Los géneros que tuvieron la contribución de más del 25% fueron: *Shewanella* (7.84%), *Propionibacterium* (7.57%), *Planctomyces* (6.43%) y *Bacillus* (6.19%).

Genes funcionales

La búsqueda en la base de datos KEGG de los 35 genes previamente determinados en la literatura como asociados con la degradación de estos diferentes componentes, indican que el área de estudio contiene una amplia variedad de bacterias con la capacidad de degradar algún compuesto contaminante, ya que de los 191 géneros identificados para este trabajo, 81 tienen al menos un gen registrados.

De los 35 genes, los más comunes fueron, *xylA*, *ASS*, *MAS*, *ali* y *nid*. Mientras que los géneros con mayor cantidad de genes funcionales fueron *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Marinobacter*.

De acuerdo con el análisis de secuencias y la base de datos KEGG, se reconoció que los géneros con mayor número de genes en sus lecturas fueron *Shewanella*, *Clostridium*, *Desulfococcus*, *Robiginitalea*, *Propionibacterium*, *Planctomyces*, *Fluviicola*, *Spirochaeta*, y *Candidatus Portiera*. Se determinó que solo los géneros con más de tres secuencias deben ser considerados representativos.

De los géneros considerados como representativos, seis estuvieron presentes en los cuatro sitios (*Shewanella*, *Clostridium*, *Desulfococcus*, *Planctomyces*, *Synechococcus* y *Pseudomonas*) (Fig.10).

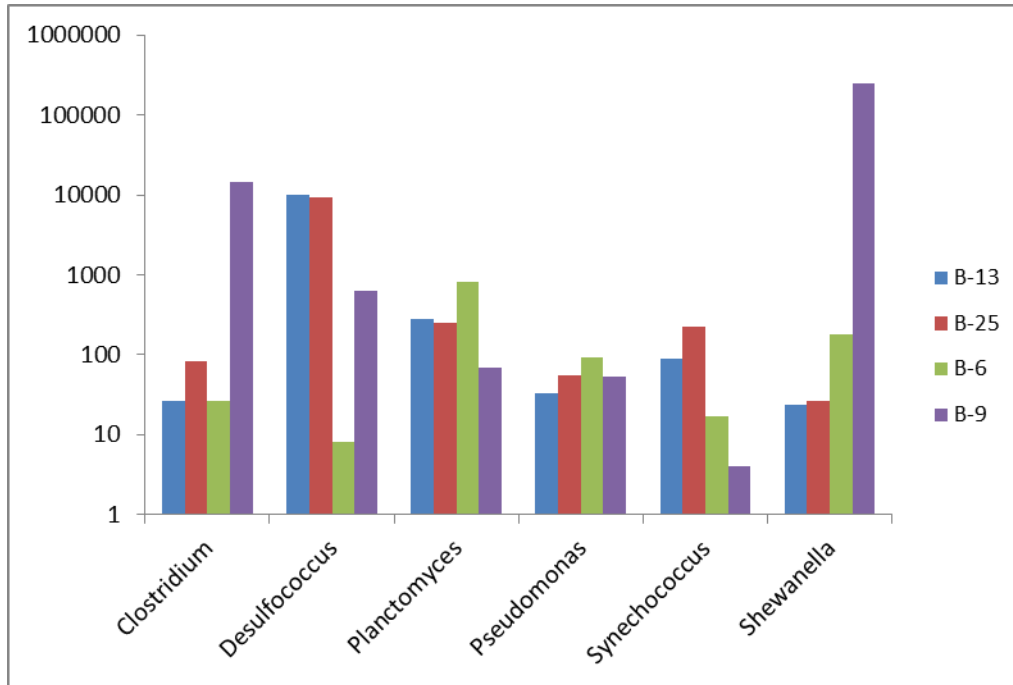


Figura 10. Géneros representativos con más números de genes con la capacidad de degradar compuestos contaminantes en sus secuencias. Gráfica expresada en \log_{10}

Los sitios de la plataforma continental interna, B-13 (con un total 33 géneros) y B-25 (con un total 33 géneros) fueron los que más coincidencias tuvieron con 22 géneros similares. El sitio B-6 (total 26) tuvo mayor similitud con el sitio B-25 en 17 géneros. Mientras que los sitios del talud continental B-9 (total 18), tuvieron 13 géneros coincidentes con el sitio B-6 (Figura11).

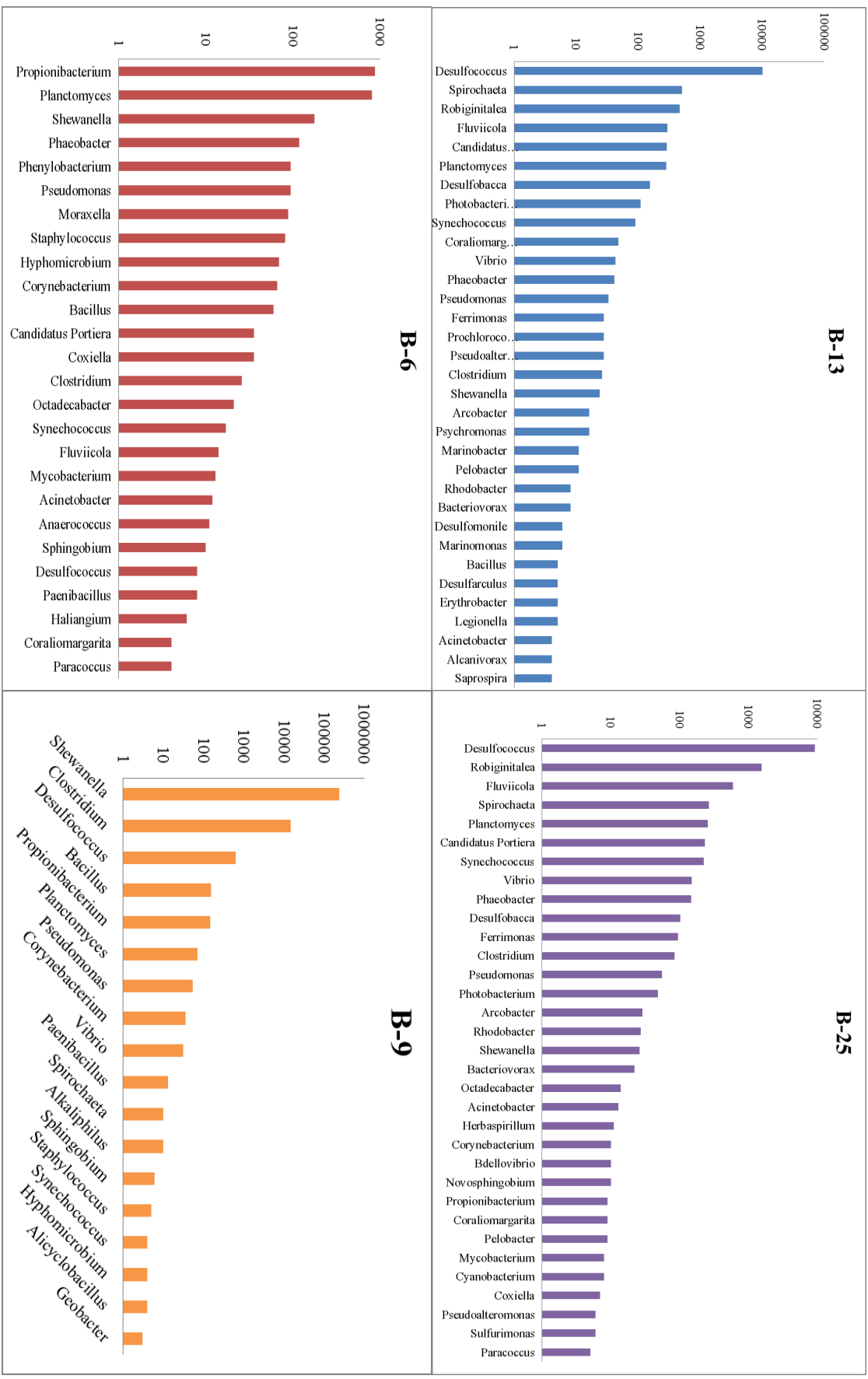


Figura 11. Secuencias a nivel Género representativo por muestra, de acuerdo con la presencia de genes con la capacidad de degradar compuestos contaminantes. Gráfica expresada en log₁₀

De acuerdo a estos géneros, la base de datos KEGG indicó que muchas de sus especies están relacionadas directamente con las vías de degradación de diferentes compuestos contaminantes tales como: azufre, metano, benzoato, aminobenzoato, cloroalcanos, clorocicloalcanos, toueno, xileno, nitrotolueno, etilbenceno, HAPs, HAs, atrazina, bifenol dioxin, naftaleno butano y propano.

De acuerdo con los resultados obtenidos se realizó una aproximación con la cantidad de secuencias y géneros de bacterias heterótrofas con respecto a la cantidad secuencias y géneros de bacterias consideradas degradadoras de contaminantes (Tabla 6).

Tabla 5. Cantidad de secuencias y géneros de bacterias heterótrofas con respecto a la cantidad secuencias y géneros de bacterias hidrocarbonoclasticas, recolectadas NW del Golfo de México durante el crucero oceanográfico MARZEE-III.

ESTACIÓN	Bacterias heterótrofas	Secuencias de Bacterias heterótrofas	Bacterias degradadoras de contaminantes	Géneros representativos	Secuencias de Bacterias degradadoras de contaminantes
B-13	78	6,772	49	34	12,582
B-25	67	4,419	49	34	12,923
B-6	41	1,177	35	26	2,703
B-9	25	21,548	28	17	258,923

DISCUSIÓN

En la zona de estudio, existe la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos y alifáticos debido a diversos factores y fuentes, siendo las más importantes las biogénicas y las petrogénicas. Las primeras, provienen principalmente del aporte de material vegetal terrestre que el continente introduce al medio costero y marino mayoritariamente por vía fluvial. En el caso particular del área de estudio, los material orgánicos exportados por la Laguna Madre, los ríos Bravo, Soto La Marina y Pánuco, contribuyen a la mezcla compleja de compuestos orgánicos que se acumulan en los sedimentos marinos (Botello *et al.*, 2011). Las segundas, se derivan de filtraciones naturales de hidrocarburos que existen en el Golfo de México, así como de las emisiones de tipo antropogénico provenientes de las zonas industriales costeras de Tamaulipas, de las embarcaciones de gran calado que utilizan los puertos mexicanos en sus rutas de transporte de petróleo y de los residuos intemperizados que son llevados por las corrientes desde fuentes lejanas (Botello *et al.*, 2011).

Kimes, *et al.* (2013) y Liu y Liu (2013), mencionan que el phylum más abundante en sedimentos marinos cercanos a la plataforma del *Deepwater Horizon*, son las Proteobacterias con al menos el 60% de la comunidad. El 40% restante está representado por Bacteroidetes, Firmicutes, Acidobacterias, Actinobacterias, y Planctomycetes. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo reportado por estos autores, ya que las Proteobacterias representaron el porcentaje más elevado (>65%). Estas proporciones también se han registrado en sitios severamente contaminados por hidrocarburos como las arenas de playa, columna de agua y marismas (Kostka, *et al.*, 2011; Beazley, *et al.*, 2012; Chakraborty, *et al.*, 2012; King, *et al.*, 2013; Mahmoudi, *et al.*, 2013, King *et al.*, 2014) y la Sonda de Campeche (Rosano, *et al.*, 2012).

En las muestras de la plataforma continental interna (B-13 y B-25), las phyla más abundantes, después de las Proteobacterias, fueron los Bacteroidetes y Planctomycetes. Mientras que en las muestras profundas (B-6 y B-9) las dominantes fueron Firmicutes y Actinobacterias. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Kimes, *et al.* (2013) y Liu y Liu (2013), donde reportan esta misma distribución en las costas de Luisiana después del derrame de la plataforma *Deepwater Horizon*. Las phyla funcionan como bioindicadores

cuando la presencia de gases metagenicos es alta. Además Firmicutes se caracteriza por aumentar su densidad cuando los otros grupos empiezan a decrecer, por lo que se les consideran como un indicador de etapas tardías de biodegradación de compuestos como los HAPs (Beazley *et al.*, 2012; King *et al.*, 2013).

Dentro de las Proteobacterias, la clase más abundante fueron las γ -proteobacteria en las estaciones B-13, B-25 y B-9, tal como lo reportan Chakraborty *et al.* (2012) y Kimes, *et al.* (2013) para el área de Luisiana. La siguiente clase más abundante fueron las δ -proteobacterias, especialmente en las estaciones cercanas a la costa, donde se tiene la influencia directa de la Laguna Madre (B-13) y Río Soto La Marina (B-25). Kimes, *et al.* (2013) sugieren que la concentración de esta clase, así como las ε -proteobacterias (con bajo porcentaje de abundancia), se eleva en relación con la incorporación directa de hidrocarburos antropogénicos (HAPs, HAs, alcanos, alquenos), las zonas de filtraciones naturales principalmente de azufre y metano, la biomasa senescente y la profundidad (Tabla 1).

Por otra parte el aumento en la abundancia que se presenta en la muestra B-6, a pesar de ser la de mayor profundidad, se puede explicar por algunas de sus características quimiolitotróficas como la oxidación de azufre, desnitrificación y metanogenesis (King *et al.*, 2013).

La muestra B-6, presentó consistencia con lo reportado por trabajos anteriores (Kostka *et al.*, 2011; Liu y Liu 2013; Kimes *et al.*, 2013) donde la proporción entre α -proteobacterias y γ -proteobacterias es similar. Se han reportado trabajos donde la presencia de plumas de hidrocarburos, gases subsuperficiales, emanaciones naturales y yacimientos de petróleo, suelen estar relacionados con la estimulación directa de las α -proteobacterias y γ -proteobacterias en el Golfo de México (Hazen *et al.*, 2010; King *et al.*, 2013). Aunque Chakraborty *et al.* (2012) mencionan que las α -proteobacterias tienen una mayor presencia con hidrocarburos ligeros mientras que las γ -proteobacterias con hidrocarburos pesados. Estos autores denominan a estas clases como grupos indicadores de sitios principalmente anaerobios previamente expuestos a hidrocarburos. También sugieren que la proporción entre estas clases pueden estar determinada por los componentes de los hidrocarburos, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura.

Es posible que por ello, la concentración más elevada de α -proteobacterias (B-6, 46%) se reportara en la mayor profundidad (2,182m). Además, de acuerdo con lo que dice King *et al.* (2013), es común que las γ -proteobacterias excedan a las α -proteobacterias en muestras con una profundidad >100m. La dominancia de las α -proteobacterias suele presentarse en las etapas finales de la degradación, cuando ya se perdieron algunos alcanos de cadena corta por procesos de evaporación (King *et al.*, 2013). Incluso hay autores como Mahmoudi *et al.* (2013), que resaltan la dominancia de las α -proteobacterias al menos cinco meses después del impacto de un derrame como fue el caso del DWH.

Las clases ϵ -proteobacteria y ζ -proteobacteria, tuvieron una presencia mínima en las estaciones de la plataforma continental interna (B-13 y B-25). Estas son clases que están asociadas a ambientes sulfurosos y férricos, respectivamente (Campbell *et al.*, 2006; Emerson *et al.*, 2007).

A nivel género, los más conocidos hasta el momento por su actividad en la degradación de compuestos contaminantes, relacionados con los hidrocarburos en ambientes oceánicos y costeros presentes en este trabajo fueron: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Corynebacterium*, *Rhodobacter*, *Shewanella*, *Microbulbifer* (hidrocarburos aromáticos monocíclicos), *Mycobacterium*, *Rhodovulum*, *Hyphomicrobium* y *Methylobacterium* (hidrocarburos aromáticos policíclicos), *Thalassospira* (hidrocarburos alifáticos), *Staphylococcus* (naftaleno, dibenzotriofeno, fenantrenos y fluorenos), *Marinobacter* (también pueden oxidar otras fuentes de carbono), *Candida Portiera*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Acinetobacter* (hidrocarburos saturados), *Erythrobacter* y *Alcanivorax* (alcanos), *Moraxella* (resinas), *Arcobacter*, *Desulfovibrio* y *Geobacter* (oxidación o reducción de azufre), *Beggiota* (zonas de filtraciones) (Bracho *et al.*, 2004; Desai y Pranav, 2006; Echeverri, 2009; Hazen *et al.*, 2010; Valentine *et al.*, 2010; Kostka *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2013; Kimes *et al.*, 2013; King *et al.*, 2013; Liu y Liu, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2013; King *et al.*, 2014). Esta diversidad de bacterias se debe a que no se conoce una sola especie capaz de metabolizar todas las fracciones y componentes que constituyen a los hidrocarburos fósiles (Lizáraga *et al.*, 1996).

De los géneros anteriormente referidos, *Shewanella* fue el género que alcanzó la mayor abundancia, especialmente en las zonas del talud continental (B-9). Este género, es capaz de reducir metales, degradar petróleo y otros compuestos contaminantes como hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), incluso a bajas temperaturas y altas presiones. (Zhao *et al.*, 2005). King *et al.* (2013), mencionan que las γ -proteobacterias, pueden responder a la disponibilidad de hidrocarburos, formando florecimientos a profundidades >500m en respuesta a las altas concentraciones de hidrocarburos; este señalamiento podría explicar porque en la muestra B-9 se tiene la alta dominancia de *Shewanella* (87%). Generalmente, donde ocurren estos florecimientos, se presenta una disminución en la concentración de oxígeno disuelto, que es un indicativo del consumo de éste por respiración microbiana, lo que sería de esperarse por el catabolismo de los hidrocarburos (Hazen *et al.*, 2010). Los valores de oxígeno disuelto para esta muestra fueron los más bajos registrados en el área de estudio (2.9ml/l).

El género *Vibrio*, se ha asociado directamente con la degradación de hidrocarburos. La baja abundancia de este género en sitios contaminados, puede indicar que no son los principales actores de la biodegradación. Lo mismo sucede con el género *Pseudomonas* que se considera como parte de la comunidad que responde a concentraciones grandes de hidrocarburos (Chakraborty *et al.*, 2012). A pesar de que algunos géneros representativos de la degradación de hidrocarburos, de acuerdo con la literatura (Leahay y Colwell, 1990), no se registraron en este estudio (*Colwellia* y *Cycloclasticus*), e incluso *Alcanivorax* se identificó en bajas concentraciones, esto puede deberse a que los hidrocarburos susceptibles a la degradación se agotan rápidamente y la población bacteriana de estos géneros bajan su concentración y la población cambia. Estos géneros solo crecen en emulsiones directas de petróleo. La organización de la diversidad bacteriana en medios naturales y en sitios contaminados es muy variable e implica interacciones complejas entre microorganismos y algunas propiedades en el ambiente circundante (Mahmoudi *et al.*, 2013). Existen diversos parámetros que se consideran relevantes para la distribución de la diversidad bacteriana, como lo son la degradación de hidrocarburos, temperatura, profundidad, salinidad, concentración de oxígeno, geografía y nutrientes (Kostka *et al.*, 2011; Beazley *et al.*, 2012). Aunque algunos autores sugieren que la diversidad bacteriana está sujeta a otros parámetros ecológicos además de los ya mencionados (King *et al.*, 2013). Esto se puede

ver reflejado en los valores del índice de Shannon (2.32, 2.24 y 2.92) que mostraron mayor similitud en las estaciones B-13, B-25 y B-6, que con respecto a la B-9 (0.533); ello indica que no hay un patrón ligado estrechamente a alguna de estas variables, y abre la posibilidad de que puede haber otras variables físico-químicas o biológicas, no consideradas en este estudio, que están determinando la diversidad bacteriana. Cuando las variables físico-químicas y biológicas afectan poco a la diversidad bacteriana, se produce un efecto conocido como “hábitat filtrado” que es cuando más de una variable ambiental determina los patrones de ensamble de la comunidad (Beazley *et al.*, 2012; King *et al.*, 2013).

Según Paul *et al.* (2013), si la abundancia bacteriana es alta pero los índices de diversidad son bajos, indican una comunidad marina perturbada. También revela que cuando se detectan componentes ajenos al ambiente, como los dispersantes químicos de hidrocarburos, algunas bacterias hidrocarbonoclasticas son inhibidas. Kimes *et al.* (2013), proponen que la forma de establecer si el ambiente fue perturbado es buscando que la diversidad en los sedimentos aumente una vez que se acabe la fuente directa del contaminante.

De acuerdo con los resultados del ACP, se registró que las variables de mayor peso fueron la profundidad, las concentraciones de oxígeno, la temperatura, el aluminio y la distancia a la costa. Chakraborty *et al.* (2012), mencionan que la temperatura juega un papel primordial en la selección de la diversidad microbiana, ya que algunos grupos pueden aumentar su abundancia a temperaturas oscilantes entre los 4-5°C. King *et al.* (2013) presentaron una estrecha relación entre la temperatura y la rápida reacción de la comunidad degradadora de hidrocarburos. Hazen *et al.* (2010), sugieren que la degradación bacteriana se realiza a una mayor velocidad a una temperatura de aproximadamente 5°C, lo cual está relacionado directamente con la composición de los hidrocarburos (ligeros, que son más fácil de degradar). En contraste Beazley *et al.* (2012) y Liu y Liu (2013), mencionan que la degradación microbiana aumenta en los climas calurosos, especialmente las α -proteobacterias, es por eso que se esperaría una mayor concentración en la en las zonas someras.

Beazley *et al.* (2012) señalan que la concentración de oxígeno tiene una gran influencia en la composición bacteriana, ya que la tasa de degradación es mayor en condiciones aeróbicas que anaerobias. Incluso algunos ordenes como Rhodobacterales y Rhodospirillales, además de estar relacionados con la degradación de hidrocarburos, son capaces de fotosintetizar (Chakraborty *et al.*, 2012). Estos mismos autores mencionan esto como la razón por la que algunas de estas especies son abundantes tanto en zonas someras como en zonas profundas. Ziervogel *et al.* (2012), menciona que la degradación microbiana aumenta el flujo de carbono, lo cual estimula el crecimiento de las bacterias no relacionadas con este proceso, aumentando la biomasa microbiana, por el incremento de los niveles de la actividad de la peptidasa y glucosidasa, u otros nutrientes.

De acuerdo con Valentine *et al.* (2010), la presencia de propano y etano en el área próxima del derrame DWH (>800m) fueron los principales motores de la respiración microbiana, provocando la pérdida de hasta un 70% de la concentración de oxígeno. Estos autores consideran que en aguas profundas la tasa de respiración es más rápida para la degradación de hidrocarburos.

Hablando de la influencia de la profundidad, el análisis de CLUSTER apoyó esos resultados, donde la composición faunística se distribuye en dos grupos con respecto a la profundidad, separando las estaciones de la plataforma continental interna (<50m) del talud continental (>500m) (Fig. 9), lo que corrobora la importancia de la profundidad con respecto a la diversidad bacteriana. Sin embargo, con el ANOSIM, se registró que la diferencia entre estos dos grupos es grande, y que no hay diferencias estadísticas significativas ($p=0.3$). Esto puede deberse a que comparten individuos pero difieren en concentraciones, ya que los grupos que forman la mayor diferencia con respecto al análisis de SIMPER están únicamente en la zona somera o con muy baja abundancia en zonas profundas, exceptuando a *Shewanella* y en menor proporción *Propionibacterium*. A pesar de que las γ -proteobacterias dominaron en la plataforma interna y talud continental, la dinámica y características del ambiente como la presencia de contaminantes, hicieron que estos sitios se diferenciaron entre sí.

El conocimiento de la estructura en la diversidad microbiana, principalmente la respuesta de los grupos cruciales para la degradación de hidrocarburos da una visión de la

dinámica que controla el crecimiento y la actividad de los microorganismos en ambientes contaminados (Mahmoudi *et al.*, 2013). De acuerdo con Chakraborty *et al.* (2012), se han reportado aproximadamente 1600 genes aislados en sedimentos implicados en la degradación de compuestos contaminantes, como lo son alcanos, cicloalcanos, HAPs, azufre, tolueno, fenoles etilbenceno y xilenos totales (BTEX). Estos mismos compuestos fueron registrados para el interés de este estudio, ya que son conocidos por estar presentes en sitios contaminados.

Al igual que en los resultados obtenidos en este estudio, Kimes *et al.* (2013), registraron con la base de datos KEGG, genes asociados con las rutas de degradación que incluyen dicloroetano, benzoato, bifenilo, etilbenceno, fluoreno, naftaleno, antraceno, estireno y tetracloroetano. De acuerdo con estos autores, la detección de los genes que están relacionados con la biodegradación de compuestos contaminantes, soporta la premisa de que las comunidades microbianas en sedimentos de aguas profundas tienen el potencial para metabolizar la diversa variedad de compuestos orgánicos, incluyendo los del petróleo. Beazley *et al.* (2012), por su parte, reportaron genes que funcionan para degradar estos mismos contaminantes pero en zonas de marismas.

En los resultados de los genes, se determinó que los involucrados en la degradación de alcanos fueron los más comunes entre los géneros, seguido de los compuestos aromáticos y finalmente los compuestos aromáticos policíclicos. De acuerdo con Mason *et al.* (2012), cuando la proporción de genes con la capacidad de degradar tolueno y HAPs es menor que los genes degradadores de alcanos, sugieren que el sitio está enriquecido con poblaciones que tienen la capacidad de degradar alcanos. Un ejemplo de esto lo tenemos al tomar como referencia los datos de King *et al.* (2014), donde la mezcla de hidrocarburos perteneciente al derrame DWH, los compuestos principales fueron hidrocarburos saturados como alcanos y parafinas (74%), hidrocarburos aromáticos policíclicos (10%), y el resto corresponde a gases propano, butano y etano, así como otros como los BTEX. Incluso estos mismos autores realizaron un modelo del cambio en la comunidad microbiana, una vez que se acaba el sustrato principal, quedando al final los grupos que expresan la degradación de alcanos.

De acuerdo con los genes, los sitios de la plataforma interior (B-13 y B-25) tienen mayor coincidencia entre géneros que con respecto a los del talud continental (B-6 y B-9). En la plataforma interna, el género dominante fue *Desulfococcus*, Musat *et al.*, (2006) menciona que es un género perteneciente al grupo de bacterias sulfato reductoras, que pertenece al grupo de las δ -proteobacterias, lo cual refuerza la idea de que este grupo es más propenso a encontrarse cerca de la costa donde hay un fuerte impacto antropogénico y posibles filtraciones naturales. Además, se caracteriza por mayor abundancia en zonas de sedimentos arenosos, lo cual coincide con lo registrado en los reportes MARZE I y II, que sedimentos de la plataforma interna son principalmente arenas.

Para el sitio B-9 del talud continental, los géneros más representativos fueron *Shewanella* y *Clostridium*, ambos géneros registraron una gran cantidad de vías de degradación de contaminantes dentro de sus especies (ver resultados), consistente con lo antes ya mencionado de *Shewanella*. En cuanto a *Clostridium*, se conoce como un género degradador de sacarosa (Bergey's, 2009); otros trabajos lo han reportado por su capacidad de degradar compuestos contaminantes como el 2-sec-Butyl-4,6-Dinitrophenol (herbicidas) (Hammil y Crawford, 1996), petróleo (Gula *et al.*, 1982) e incluso Uranio (Francis, 1998). La idea de que el sitio B-9 presenta condiciones atípicas de contaminación, se refuerza con datos de la base KEGG, donde esta hay especies registradas para ambos géneros que se caracterizan por tener rutas metabólicas relacionadas con la degradación de compuestos contaminantes como son el naftaleno, tolueno, metano, propano, azufre, butano, compuestos aromáticos, aminobenzoate, fluorobenzoate, chloroalkane, chlorocyclohexane y dioxin.

De acuerdo con Hazen, *et al.* (2010), si un gen codifica para la degradación de varios compuestos contaminantes, significa que hay una variedad de poblaciones bacterianas que degradan estos componentes y que están experimentando una adaptación dinámica en respuesta a la contaminación, ya sea por petróleo o por algún otro compuesto. King *et al.* (2014) mencionan que los cambios en la composición y cantidad de hidrocarburos a través del tiempo y el espacio, contribuyen a la sucesión de la comunidad. Eso puede explicar porque encontramos los mismos genes expresados en sitios con diferentes características. Beazley *et al.* (2012) y Mason *et al.* (2012), coinciden en que el

aumento en los genes funcionales es evidencia de la degradación constante de hidrocarburos.

En este estudio registramos que la cantidad de géneros con la capacidad de degradar compuestos contaminantes fue menor que los géneros heterótrofos. Sin embargo, la abundancia de las secuencias se invierte. De acuerdo con Lizárraga *et al.* (1982), la distribución en la comunidad bacteriana cercana a la costa se ve influenciada fuertemente por los ríos y las características propias de los sedimentos. Estos autores mencionan que en las zonas de transición entre ríos y lagunas existe una fuerte influencia de hidrocarburos o contaminantes de origen antropogénico, a lo que atribuyen que sus resultados mostraron una baja concentración de bacterias heterótrofas, aunque no descartan que esos datos sean indicadores de altas cantidades de petróleo. En este trabajo, hay dos sitios de la plataforma continental interna que tienen influencia del Río Soto La Marina y la Laguna Madre (B-13 y B-25). Sin embargo, los sitios del talud continental (B-6 y B-9) no tienen las mismas condiciones. Lizárraga *et al.* (1986), consideran que el aumento de microorganismos degradadores de petróleo u otro contaminante es una respuesta a la entrada crónica de estos compuestos.

CONCLUSIONES

1. La diversidad bacteriana no tuvo una variación sustancial con respecto a la profundidad. Sin embargo, los índices de diversidad fueron diferentes, indicando que la estructura de la comunidad se ve afectada por otras variables físico-químicas.
2. El phylum más representativo fueron las Proteobacterias.
3. La clasificación filogenética también tuvo diferencias entre estaciones.
4. Todos los sitios presentaron una concentración elevada de γ -proteobacteria, sin embargo los géneros fueron diferentes, marcándose una separación entre estaciones de la plataforma continental y el talud continental.
5. El género más representativo de la zona de la plataforma continental interna, fue *Desulfococcus*.
6. El género más representativo para la zona profunda fue *Propionibacterium*
7. El género más importante fue *Shewanella*.
8. El sitio B-9 mostró una peculiaridad con respecto a los demás sitios, atribuible al género *Shewanella*, el cual por su dominancia y característica metabólicas, merece mayor atención para futuros estudios
9. La proporción de bacterias heterótrofas/hidrocarbonoclasticas, los géneros reportados en la literatura como heterótrofos fueron más que los relacionados con los compuestos contaminantes.
10. Las lecturas de los géneros considerados degradadores de contaminantes tuvieron una mayor abundancia,

CAPÍTULO DOS

PIGMENTOS

RESUMEN

Se analizaron e identificaron los pigmentos de catorce sitios de sedimentos superficiales provenientes de la plataforma y talud continental del NW del Golfo de México, utilizando la técnica HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Del total de las muestras solo diez tuvieron la presencia de al menos un pigmento. Se identificaron seis pigmentos, de los cuales tres son fotosintéticos y los otros tres productos de degradación de Clorofila-*a* (Feofitina-*a*, Feoforbide-*a* y Pirofeofitina-*a*). Los pigmentos con más concentración fueron el β -Caroteno y la Clorofila-*a*. Las estaciones con más abundancia fueron las cercanas a la costa (muestras P-1 y P-25) claramente influenciados por los ríos Bravo y Río Soto La Marina. De acuerdo con los resultados las variables de más importancia fueron la profundidad, temperatura y salinidad. Mientras que los hidrocarburos no mostraron relevancia en la distribución o concentración de los pigmentos.

ABSTRACT

Pigments contained in surface sediments obtained at 14 sites located on the continental shelf and upper slope of NW Gulf of Mexico were analyzed and identified using high performance liquid chromatography (HPLC). In ten of the examined samples at least one pigment was detected. A total of six pigments were identified of which, three were photosynthetic and the remaining three were chlorophyll-*a* degradation products: phaeophytin-*a*, phaeophorbide-*a* and pyropheophytin-*a*. Pigments with the highest concentration were: β -carotene and chlorophyll-*a*. Significant pigment concentration in sediments corresponded to inshore localities exposed to the river discharge influence (Bravo and Soto La Marina). Pigment composition and concentration appeared influenced by depth, temperature and salinity. However, hydrocarbons presence was not related to the distribution or concentration of pigments.

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos contenidos en sedimentos marinos han sido estudiados desde hace varios años (Palmer y Baker, 1978; Herblan, 1988; Jeffrey *et al.*, 1999; Kowalewska, 2005). La Clorofila-*a*, así como otros pigmentos están relacionados con compuestos químicos orgánicos en sistemas marinos y son de gran interés para la oceanografía, debido a que pueden ser útiles para evaluar las comunidades fototróficas y las condiciones del ambiente. Se sabe que los pigmentos pueden ser utilizados como biomarcadores en sistemas marinos y estuarinos, debido a que son producidos por una gran cantidad de organismos (macro y microorganismos) (Palmer y Baker, 1978; Kowalewska, 2005). A pesar de que la Clorofila-*a* no tiene una clasificación específica y es utilizada comúnmente para estimar biomasa en sistemas acuáticos, la amplia gama de productos de degradación que se desprenden de ésta, pueden funcionar como indicadores de procesos heterotróficos (Kowalewska, 2005). Por otro lado, los carotenoides y sus xantofilas son efectivos indicadores de diferentes clases de fitoplancton (Jeffrey *et al.*, 1999).

Los organismos capaces de producir pigmentos como las bacterias o microalgas son ubicuas, y son un componente principal en los ecosistemas bentónicos, conformando una porción importante de la biomasa del sedimento (Megharaj *et al.*, 2000). En general, se han realizado estudios sobre producción, degradación, y sedimentación de pigmentos con bacterias tanto en columna de agua como en sedimentos en diferente tipo de ambientes (Guerrero *et al.*, 1988; Nelson, 1993; Bianchi, 2000). La cualificación de pigmentos en sedimentos marinos mediante la técnica de HPLC ha sido utilizada por varios autores (Kowalewska, 1994, 1995, 1996, 2005; Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007), que han registrado una relación entre pigmentos y factores físico-químicos y biológicos. También se ha utilizado esta técnica para la medición específica de la Clorofila-*a* y así poder evaluar la eutrofización, además de utilizarla como bioindicador ambiental.

El efecto que causa el petróleo crudo por algunos de sus componentes en estos organismos puede afectar su crecimiento o actividad fotosintética (Fabregas *et al.*, 1984). Zsolnay, en sus trabajos describió en 1973 el Oeste de África, en 1977 la Corriente del Golfo y nueva Escocia y en 1979 el noroeste de África. En estos trabajos explica la posible

existencia de una relación entre la Clorofila-*a* y la concentración de hidrocarburos en condiciones normales y zonas eutróficas. Sin embargo, cuando existe una alteración por hidrocarburos de petróleo el patrón de esta relación cambia. Fabregas *et al.* (1984) mencionan que las bajas concentraciones de hidrocarburos estimulan el crecimiento de las microalgas y aumenta el contenido de Clorofila-*a*, ya que funciona como fuente de carbono. Sin embargo, en altas concentraciones resulta en un efecto inhibitor en su crecimiento y por lo tanto en el contenido de Clorofila-*a*.

Goutx y Saliot (1980) analizaron, en la Bahía de Villefranche en el mar Mediterráneo, la relación entre hidrocarburos, Clorofila-*a*, ácidos grasos disueltos y particulados con la biomasa del zooplancton, mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas. El estudio tuvo conexión con la determinación de Clorofila-*a*, zooplancton, biomasa y plancton. Los autores mostraron que los alcanos tienen una distribución relacionada con los fenómenos biológicos del sitio. La correlación que registraron entre partículas de hidrocarburos, partículas de alcanos y contenido de Clorofila-*a*, fue significativa, por lo cual plantearon la idea de que existe una contribución directa entre el fitoplancton y los hidrocarburos, además de la asociación bioquímica entre el plancton y la materia orgánica disuelta.

El objetivo de este estudio fue el identificar y cuantificar los pigmentos en sedimentos superficiales de la plataforma y talud continental en la zona NW del Golfo de México, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), para buscar una posible relación entre pigmentos e hidrocarburos.

METODOLOGÍA

Durante la campaña oceanográfica MARZEE-III a bordo del B/O “Justo Sierra” (Octubre-Noviembre, 2012), se recolectaron muestras de sedimento mediante un nucleador Reineck en catorce lugares situados en la parte NW del Golfo de México sobre la plataforma y talud continental, frente a las costas de Tamaulipas y norte de Veracruz. (Fig. 12). Para el análisis de pigmentos, se tomaron aproximadamente 5g de sedimento superficial de cada muestra, se depositaron en frascos ámbar con una capacidad de 20ml, se etiquetaron y se mantuvieron en congelación a -10°C, para evitar la descomposición pigmentaria (Tabla 6). Los parámetros físico-químicos utilizados en el presente estudio, fueron proporcionados por el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Tabla6).

Tabla 6. Parámetros físico-químicos de los sedimentos superficiales obtenidos de la plataforma y talud continental en la zona NW del Golfo de México, durante el crucero oceanográfico MARZEE-III en 2012. Pigmentos-estación (P-#)

Estación	Profundidad (m)	HAPs (μgg^{-1})	Alifáticos (μgg^{-1})	Corg %	M O %	Salinidad (UPS)	Temperatura C°
P-1	50	0.54	38.42	0.97	1.66	36.4	27.7
P-3	200	0.17	17.36	1.52	2.61	36.1	16.0
P-4	500	0.12	16.38	1.25	2.14	35.1	9.3
P-6	2181	.99	26.40	1.12	1.92	35.0	4.4
P-9	500	0.19	25.54	1.12	1.92	35.1	8.8
P-13	50	0.36	27.65	1.31	2.26	36.4	27.3
P-15	200	0.24	11.99	1.38	2.38	36.0	15.5
P-18	2622	0.57	19.77	0.93	1.59	35.0	4.4
P-20	1500	0.73	26.67	1.07	1.84	35.0	4.3
P-23	100	0.28	7.11	1.27	2.18	36.5	22.6
P-25	50	0.16	14.39	1.41	2.43	36.4	26.1
P-27	200	0.36	15.66	1.36	2.33	35.9	14.7
P-30	2286	0.05	6.13	0.78	1.50	35.0	4.3
P-32	1523	0.07	5.54	1.02	1.93	35.0	4.3

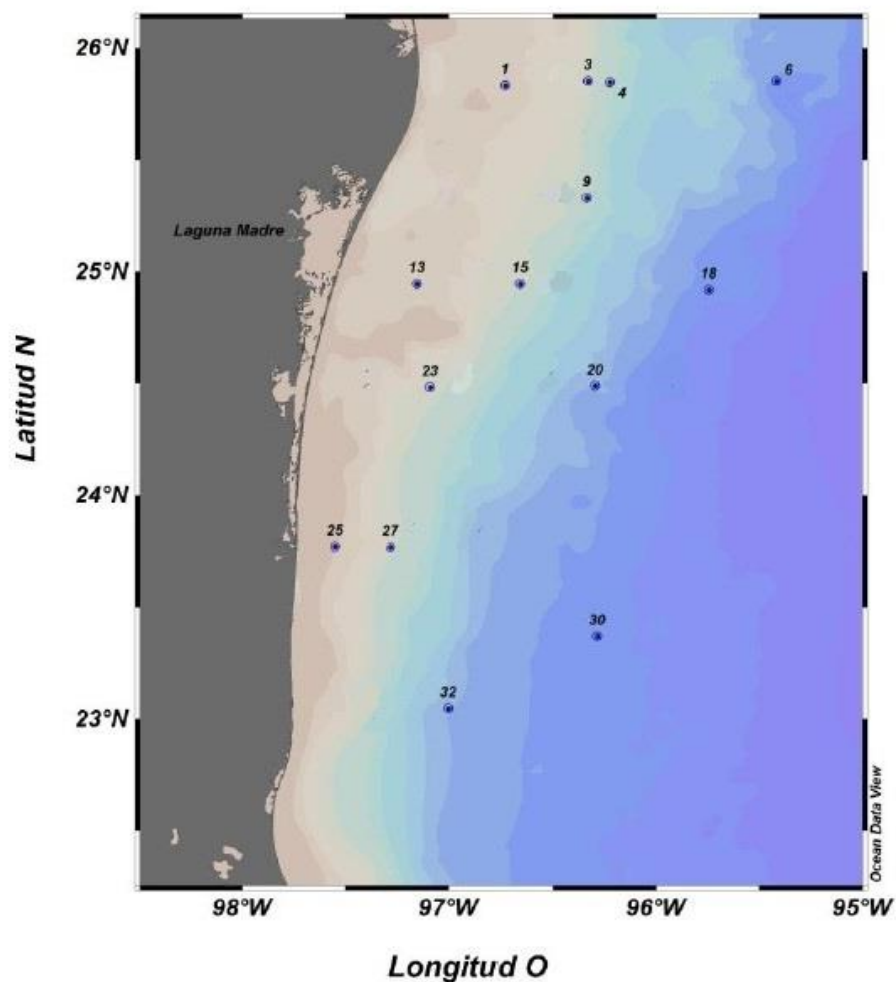


Figura 12. Ubicación de los puntos de muestreo para pigmentos al NW del Golfo de México, durante el crucero oceanográfico MARZEE-III en 2012.

Análisis de pigmentos

El análisis de pigmentos se realizó en el Laboratorio de Pigmentos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR, S.C.) en La Paz, Baja California Sur.

Para la extracción y cuantificación de los pigmentos contenidos en las muestras, se pesaron 0.5gr de sedimento y se procedió a la extracción con 4 ml de acetona grado HPLC al 100%. Las muestras se dejaron reposar por 24 h a -20°C, cubiertas con papel aluminio para protegerlas de la luz. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min a 5°C. El extracto se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio de 0.45 µm

de diámetro de poro. El volumen se recuperó en viales (Eppendorf) de 2 ml, se almacenaron a -20°C y se extrajeron 20 µl para inyectarlos en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (modelo 1100, Hewlett Packard). Para separar los pigmentos, se siguió el método propuesto por Vidussi *et al.* (1996). Utilizando una fase móvil mezclando dos soluciones:

- Solución A: Metanol grado HPLC mezclado con acetato de amonio acuoso 1 N para formar una mezcla 70:30 v/v.
- Solución B: Metanol grado HPLC.

La fase estacionaria utilizada fue una columna Hypersil C8, de 10 cm de longitud, de 0.45 cm de diámetro y rellena de partículas de sílice de 5 µm.

El equipo HPLC se configuró y se equilibró con la solución A, con un flujo de 1ml min⁻¹. Los solventes se programaron de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7. Programación de los solvente

Minuto	% Solvente A	% Solvente B
0	75	25
1	50	50
15	0	100
18.5	0	100
19	75	25

El sistema de cromatografía recomendado debe contar con un desgacificador, detector de arreglo de diodos con un rango de longitud de onda de 190-900 nm y capacidad para determinar 5 longitudes de onda fijas, una bomba cuaternaria y un automuestreador con capacidad para 100 muestras.

La identificación de los pigmentos se realizó tomando en cuenta dos criterios: 1) comparando los tiempos de retención de los picos de la muestra con los de los estándares puros y 2) por comparación de los espectros de absorción de la muestra problema con los de la biblioteca generada de los estándares. La mayoría de los pigmentos observados *in situ* se reportan en un cromatograma.

Cuantificación de pigmentos

Para cuantificar los pigmentos se preparó la curva de calibración para cada uno; esto se hizo inyectando diferentes concentraciones de los estándares (entre 3-10 ng/ μ l). La concentración de cada pigmento se calcula integrando el área bajo la curva, la cual es proporcional a la concentración de los estándares inyectados. Este procedimiento se realizó para cada uno de los pigmentos.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para identificar diferencias estadísticas significativas en el contenido de pigmentos en función de la profundidad, representado por un valor de p menor a 0.05 (Siegel, 1990).

Las hipótesis planteadas fueron:

H_0 : No hay diferencias en la concentración de pigmentos con respecto a la profundidad y las variables físico-químicas.

H_a : Al menos la concentración de un pigmento es diferente.

H_0 = No existe diferencia estadística significativa en la concentración entre pigmentos, sin ser relevante la profundidad y las variables presentes en donde fue colectada la muestra con una ($p \leq 0.05$).

H_a = Existe diferencia significativa en la concentración entre pigmentos siendo relevante la profundidad y las variables presentes en la estación donde fue colectada la muestra con una ($p \leq 0.05$).

Prueba de correlación de rangos (Sperman)

La prueba de correlación de rangos de Sperman, es una prueba no paramétrica utilizada para probar la asociación entre variables, después de realizar una prueba de Shapiro-Wilks para conocer la normalidad de los datos. En este trabajo se utilizó para comparar la concentración de los pigmentos por estación con la profundidad y variables químicas del sitio (Siegel, 1990).

H_0 : No existe correlación entre los pigmentos y la profundidad o las variables químicas

H_a : Al menos un pigmento tiene correlación con la profundidad o las variables químicas

RESULTADOS

El análisis de pigmentos realizado a las catorce muestras que se obtuvieron en la zona de estudio mediante la técnica de HPLC, solo en diez de ellas se registró al menos un pigmento. Las cuatro muestras restantes fueron sitios ubicados en el talud continental (Estación P-6, P-18, P-30 Y P-32).

Se registró la presencia de seis pigmentos cuyas concentraciones se muestran en el Tabla 8. Tres de estos pigmentos son fotosintéticos (pigmentos que se pueden encontrar en microorganismos, y que tienen poder de retención en la energía lumínica para utilizarla en la fotosíntesis (Balech, 1977) y fueron: Zeaxantina, Clorofila-*a* y β -Caroteno (Fig. 13). Los otros tres pigmentos (producto de la degradación de la Clorofila-*a*) fueron: Feofitina-*a*, Feoforbide-*a* y Pirofeofitina-*a* (Fig. 13).

Tabla 8. Concentración de los pigmentos registrados en las estaciones obtenidas del NW del Golfo de México. La concentración se expresa en ng/g.

ESTACIÓN	Feoforbide- <i>a</i>	Zeaxantina	Clorofila- <i>a</i>	Feofitina- <i>a</i>	Pirofeofitina- <i>a</i>	β -Caroteno
P-1	203	128	205	52	70	157
P-3	-	10	-	42	23	46
P-4	-	-	-	-	-	44
P-9	-	-	-	-	-	22
P-13	-	-	-	120	-	168
P-15	70	80	132	21	21	19
P-20	-	-	-	14	-	-
P-23	-	23	-	53	35	63
P-25	378	197	363	113	118	217
P-27	29	-	13	35	26	24

En general en las catorce muestras, los pigmentos con mayor abundancia fueron β -Caroteno (22.76%), Clorofila-*a* (21.38%) y Feoforbide-*a* (20.33 %). Los de menor concentración fueron Feofitina-*a* (13.59%), Zeaxantina (13.52%) y Pirofeofitina-*a* (8.73 %). La estación que tuvo mayor diversidad pigmentaria notoriamente fue la P-25 (41.57%), seguida de la P-1 (24.36%) y la P-13 (17.08%), situadas en la zona de la plataforma continental. Hubo poca concentración en la P-23 (5.25%), P-27 (3.80), P-3

(3.37%), P-15 (1.83%) y P-4 (1.30%), ubicadas en esta misma plataforma pero más alejadas de la costa; y las que tuvieron una concentración mínima de pigmentos fueron la P-9 (.65%) y la P-20 (.42%) situadas en el talud continental (Fig. 14).

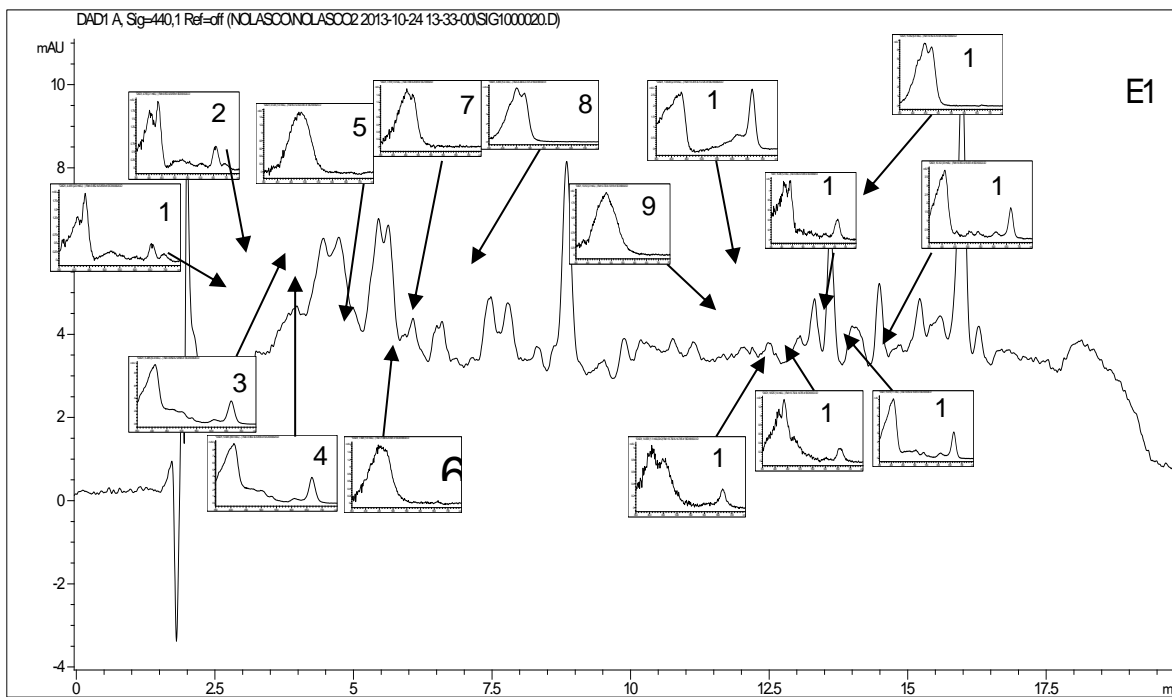


Figura 13. (Cromatograma (lecturas a 440 y 667 nm) indicando pigmentos identificados y estándares de comparación.

El β -Caroteno se detectó en nueve de las diez estaciones que registraron pigmentos, exceptuando a la P-20 perteneciente al talud continental. La Feofitina-*a* se identificó en ocho de estos. Mientras que la Pirofeofitina-*a* y Zeaxantina, se registraron en cinco y cuatro estaciones respectivamente, pertenecientes a la plataforma continental interna. La Clorofila-*a* y Feoforbide-*a* solo se registraron en cuatro estaciones.

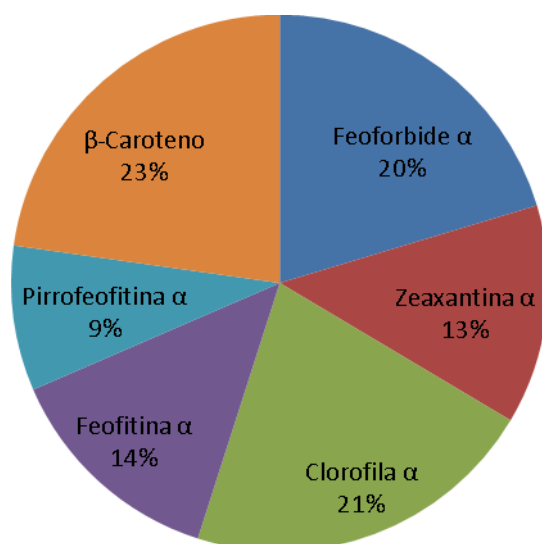


Figura 14. Porcentajes totales de cada pigmento en todas las estaciones con concentraciones en ng/g.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal-Wallis demostró que existen diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre las concentraciones por pigmento y las profundidades. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las variables ambientales (HAPs, HAs, materia orgánica, carbón orgánico, temperatura y salinidad) (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de las diferencias estadísticas significativas entre pigmentos y profundidad.

PIGMENTO	p	X ²
Feoforbide-a α	0.0184	11.59
Zeaxantina	0.0137	12.32
Clorofila-a	0.0184	11.59
Feofitina-a	0.0113	12.32
Pirofeofitina-a	0.0464	9.64
β-Caroteno	0.0167	12.32

Prueba de correlación de rangos (Sperman)

Puesto que los datos mostraron una distribución no normal, se realizó la prueba de correlación de rangos de Sperman. Solo se registró correlación con la profundidad y

temperatura para todos los pigmentos. Mientras que la Zeaxantina, Feofitina-*a*, Pirofeofitina-*a* y β - Caroteno, tuvieron correlación con la salinidad (Anexo 2). No se presentó ninguna correlación con alguna de las otras variables químicas antes mencionadas.

Para las variables que presentaron correlación, se realizaron pruebas de correlación lineal (R^2) donde solamente hubo una relación directa en las concentraciones de Pirofeofitina-*a*, Zeaxantina y β -Caroteno con respecto a la temperatura (Tabla 10).

Tabla 10. Coeficiente de correlación lineal

VARIABLES (Concentraciones)	COEFICIENTE DE CORRECLACIÓN LINEAL (R^2)
Profundidad-Feoforbide- <i>a</i>	0.1141
Profundidad- Zeaxantina	0.196
Profundidad- Clorofila- <i>a</i>	0.1295
Profundidad-Feofitina- <i>a</i>	0.3082
Profundidad- Pirofeofitina- <i>a</i>	0.2823
Profundidad- β - Caroteno	0.3789
Salinidad- Zeaxantina	0.3059
Salinidad-Feofitina	0.579
Salinidad- Pirofeofitina	0.4139
Salinidad- β - Caroteno	0.3774
Temperatura-Feoforbide- <i>a</i>	0.3075
Temperatura- Zeaxantina	0.5201
Temperatura- Clorofila- <i>a</i>	0.3634
Temperatura-Feofitina- <i>a</i>	0.7012
Temperatura- Pirofeofitina- <i>a</i>	0.9661
Temperatura- β - Caroteno	0.6606

DISCUSIÓN

Se han descrito cerca de 13 tipos de Clorofilas y 500 carotenoides, muchos de ellos restringidos a las zonas marinas (Repeta y Simpson, 1991; Jeffrey *et al.*, 1997). Los pigmentos cumplen una serie de funciones que los vuelve indispensables para los organismos en ambientes marinos y terrestres, como son la captación de luz en los organismos fotosintéticos, la producción fotoautotrófica, además de desempeñar un papel importante en la producción primaria (Herblan, 1988).

La Clorofila-*a*, ha sido objeto de investigación por muchos años, debido a su abundancia y funcionalidad de marcador en diferentes procesos ocurridos en el ambiente marino, como la eutrofización o la presencia de fitoplancton (Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007). Este pigmento, se ubicó únicamente en cuatro sitios dentro de plataforma continental interna (estaciones P-1, P-13 y P-25 y P-27) con profundidades menores a 200m, las cuales presentaron concentraciones considerablemente menor (<13ng/g). Estos mismos autores mencionan que la Clorofila-*a* es un marcador de material vegetal fresco proveniente de la costa influenciados por la descarga de ríos, y que prevalece gracias a que esta zona generalmente está enriquecida con nutrientes, tiene una mejor penetración de luz y condiciones de oxígeno.

Varios son los autores que coinciden en que, en los sedimentos alejados de la costa, la cantidad de pigmentos y sus concentraciones disminuyen como consecuencia de factores abióticos (temperatura, luz y oxígeno) y bióticos (microorganismos u organismos heterótrofos) que influyen en el proceso de depositación y degradación (Yentsch, 1965; Schwartz y Von Elbe, 1983; Herblan, 1988; Heaton *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1997; Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007). La Clorofila-*a* en específico sufre procesos de degradación debido a la combinación de estos factores extremos. A los productos resultantes de estos procesos se les conoce como cloropigmentos o productos de degradación, y hay dos vías principales para llegar a ellos. De acuerdo con Kowalewska (2005), cuando estos productos están contenidos en sedimentos funcionan como indicador del estado trófico de los cuerpos de agua o de las condiciones del ambiente, principalmente de las condiciones de oxígeno, la actividad de los organismos y el flujo de carbono. Los

productos de degradación de la Clorofila-*a* más conocidos, son Feofitina-*a*, Pirofeofitina-*a* y Feoforbide-*a*, los cuales fueron registrados en este estudio (Tabla 8).

La primera vía de la degradación de la Clorofila-*a*, produce Feofitina-*a* al perder un magnesio y cambia el color verde característico por un color pardo oliváceo (Yentsch, 1965; Herblan, 1988; Kowalewska, 2005; Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007). La Feofitina-*a* fue registrada en ocho estaciones, P-1, P-13 y P-25 (50m), P-3, P-13, P-23 y P-27 (200m) dentro de la plataforma interna, y la P-20 del talud continental (1500m). Este pigmento se considera poco estable, aunque puede ser abundante en sedimentos con buenas condiciones ambientales, además de ser considerado un marcador de descomposición vegetal (Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007) lo que explica porque las estaciones cercanas a la costa son las de mayor concentración. Al igual que como lo reportan Szymczak-Zyla *et al.*, (2006) y Szymczak-Zyla y Kowalewska (2007), es común encontrar la Feofitina-*a* en los mismos sitios que la Clorofila *a* y a mayores profundidades, pero en menores concentraciones.

Al ser un pigmento poco estable, la Feofitina-*a* continúa su descomposición, y pierde un grupo carboxilo; esto da como resultado otro pigmento de degradación llamado Pirofeofitina-*a*, el cual a diferencia de la Feofitina-*a* se considera un producto final, debido a que no sigue otro paso de degradación. Este pigmento se caracteriza por encontrarse en sedimentos viejos, poco oxigenados y con alto contenido de carbón orgánico (Yentsch, 1965; Schwartz y Von Elbe, 1983, Herblan, 1988; Kowalewska, 2005; Szymczak-Zyla y Kowalewska, 2007). Este pigmento se identificó en seis estaciones dentro de la plataforma interna (P-1 y P-25 (50m), y P-3, P-15, P-23 y P-27 (200m)), teniendo una relación directa con la Clorofila-*a* y más estrechamente con la Feofitina-*a*, ya que incluso la concentración es muy similar a este último, lo cual coincide con trabajos como el de Szymczak-Zyla y Kowalewska (2007).

En la segunda vía de degradación se obtiene Feoforbide-*a*, que resulta de la Clorofila-*a* al perder un fitol para dar Clorofilide la cual rápidamente pierde un magnesio. De acuerdo con Szymczak-Zyla y Kowalewska (2007), la Feoforbide-*a* también se considera un producto final y se encuentra en sedimentos antiguos. Al igual que otros

productos de degradación de la Clorofila-*a*, se considera un marcador vegetal además de un buen indicador de la actividad de los organismos del sitio. Este pigmento se registró en las mismas estaciones que la Clorofila-*a*, dentro de la plataforma continental (P-1, P-13, P-25 y P-27), y en concentraciones similares, que son mayores a los otros pigmentos de degradación, lo cual puede ser por las características que presentan los sedimentos en esos sitios favoreciendo su acumulación.

El β -caroteno se encuentra en casi todas las algas excepto en Cryptophytas y Rhodophytas, además es producido por una gran variedad de organismos autótrofos y heterótrofos (Jeffrey y Vest, 1997). Sus colores pueden ser amarillos, naranjas o rojos, y es considerado el carotenoide más abundante en la naturaleza (Britton, 1995). Debido a su abundancia, estuvo presente en nueve de las diez estaciones de este estudio dentro de la plataforma continental interna (P-1, P-3, P-4, P-9, P-13, P-15, P-23, P-25 y P-27) y fue el pigmento con mayor porcentaje de concentración (23%). Además, de acuerdo con Kowalewska y Konat (1997) este pigmento se preserva mejor en sedimentos con bajas concentraciones de oxígeno como las reportadas para el Golfo de México (Rabalais *et al.*, 2001 y Rabalais *et al.*, 2002). Incluso Bianchi *et al.* (2000), lo ha reportado como un buen indicador de biomasa especialmente en sedimentos recientes, ya que en sedimentos antiguos es difícil su conservación.

La Zeaxantina (pigmento liposoluble de color amarillo) pertenece al grupo de las xantofilas presentes de manera natural en bacterias, algas, plantas superiores, animales y en algunos grupos del fitoplancton tales como Bacillariophyta, Dinophyta, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae y Raphidophyceae (Jeffrey y Vest, 1997). Estos autores sugieren que este pigmento tiene propiedades foto-adaptativas por lo que su concentración en una célula puede ser constante a pesar de los cambios de luz. En este estudio se registró en cinco estaciones de la plataforma continental interna (P-1, P-3, P-13, P-23 y P-25) profundidades menores a los 200m. De acuerdo con Bianchi *et al.*, 2000, este pigmento puede ser indicador de la abundancia de cianobacterias y picocianobacterias, en sedimentos antiguos y recientes.

La distribución registrada en los pigmentos es consistente con lo reportado por otros autores Yentsch, (1965); Kowalewska, (2005); Szymczak-Zyla y Kowalewska, (2007)

quienes afirman que la concentración de pigmentos disminuye con relación a la distancia de la costa y aumenta la profundidad. Yentsch (1965) propuso una equivalencia en porcentajes de concentración de pigmentos y definió que la costa contiene el 81% de los pigmentos, mientras en zona profundas solo el 27%. Esto es coincidente con nuestros resultados ya que de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, la profundidad es la única variable que presenta diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a la concentración de los pigmentos. Los sitios cercanos a la costa exhiben más pigmentos y mayor concentración a diferencia de los sitios de la zona profunda. Esto fue corroborado con la prueba de Spearman que mostró la correlación positiva entre la profundidad y la temperatura.

Con lo que respecta a las estaciones, más cercanas a la costa (P-1 y P-25) fueron las de mayor relevancia, lo cual es coincidente con la profundidad (~50m), además de tener las temperaturas más elevadas ($>26^{\circ}\text{C}$). Ambas estaciones presentan la influencia de las descargas de los ríos Bravo (P-1) y Soto La Marina (25); en esta área las condiciones hidrodinámicas son severas y con una mayor tasa de sedimentación. De acuerdo con Szymczak-Zyla y Kowalewska (2007) tales condiciones son favorables para la acumulación de los pigmentos. Es importante mencionar que estas estaciones también tienen un alto contenido de carbono orgánico y granos finos de sedimentos ($<0.063\text{mm}$, que va de los limos-arenas).

Biggs (1992), mediante la cuantificación de clorofilas, nitratos, productividad primaria y fosfatos, determinó que el Golfo de México es una zona oligotrófica y biológicamente pobre, en especial después de la plataforma continental interna (100m de profundidad). En este estudio la distribución de los pigmentos fue normal pero la concentración de pigmentos fue baja, siendo esto consistente con lo mencionado por dicho autor

CONCLUSIÓN

1. La cantidad de pigmentos registrados en este estudio coincide con las características oligotróficas reportadas para el Golfo de México.
2. La mayor concentración de pigmentos se localizó en las estaciones P-1 y P-25, estaciones influenciadas por los ríos Bravo y Soto La Marina, respectivamente, debido al aporte de materia orgánica, la renovación constante de sedimentos, entre otras.
3. La concentración de los pigmentos disminuye con la profundidad y la distancia de la costa, lo que se considera una distribución normal
4. La estación P-13, a pesar de estar cerca de la costa, con la misma profundidad y con influencia de la Laguna Madre, no registró la misma variedad y concentración de pigmentos que los sitios antes mencionados.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

La información obtenida en este estudio es relevante para trabajos futuros, ya que sienta bases en el conocimiento de la diversidad bacteriana y la composición pigmentaria en los sedimentos del NW del Golfo de México, y puede ser útil para conocer los cambios que se presenten en el sitio; además de saber si estos cambios son causados de forma natural o antropogénica.

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis, las perspectivas de trabajos futuros indican que es necesario dar seguimiento a los aspectos de la comunidad bacteriana y la presencia de pigmentos. En primer plano, se recomienda tomar en cuenta condiciones como la temporalidad anual, para saber si existen diferencias principalmente entre secas y lluvias. En segundo, las variables hidrográficas que marquen diferencias importantes entre plataforma interna y externa. Finalmente, incluir el análisis de otros compuestos contaminantes además de los ya considerados para este proyecto como lo son alcanos y parafinas, e incluso gases (propano, butano y etano), ya que podrían resultar de interés para tener un panorama más completo de la actividad microbiana, las condiciones del sitio y los factores que pueden influir en la distribución de los pigmentos.

LITERATURA CITADA

BACTERIAS

- Acosta A., R. Rosselló, y S. Marqués. 2013. Diversity of benzylsuccinate synthase-like (bssA) genes in hydrocarbon-polluted marine sediments suggests substrate-dependent clustering. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 3667–3676.
- Aguirre R. 2004. La observación de impactos en el Golfo de México mediante imágenes de satélite. En: *Diagnostico Ambiental del Golfo de México Volumen II* (M. Caso, I. Pisanty y E. Ezcurra) INE-Semarnat México. 626pp.
- Anderson C., Al-Ahmad A., Elamin F., Jonas D., Mirghani Y., Schilhabel M., Karygianni L., Hellwig E. y Rehman A. 2013. Comparison of the Bacterial Composition and Structure in Symptomatic and Asymptomatic Endodontic Infections Associated with Root-Filled Teeth Using Pyrosequencing. *Microbial Composition of Endodontic Infections*. 82(10): 4068-4079
- Atlas R. y T. Hazen 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history. *Environment Science Technology*, 45:6709-6715.
- Beazley M., R. Martinez, S. Rajan, J. Powell, et al. 2012. Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the Deepwater Horizon oil spill. *PLoS One*, 7;7
- Beltrán, J., A., Villasol, A., V. Botello y F. Palacios. 2005. Condición Actual del ambiente marino-costero de la región del Gran Caribe. En: Botello A. V., J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernandez (eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias*. Segunda edición. Universidad Autónoma de Campeche, UNAM e Instituto Nacional de Ecología. Pp. 1-24.
- Botello, A.V., G. Ponce-Vélez, C. García-Ruelas, A. Montes-Nava, G. Díaz-González, S. Villanueva-Fragoso, F. Rivera-Ramírez, M. Morales-Villafuerte. 2011. Informe final del proyecto "Marco ambiental de las condiciones oceanográficas en el sector NW de la ZEE de México en el Golfo de México (MARZEE)", Etapa 1. México, D.F. Junio, 2011.
- Bracho, M., L. Diaz y L. Soto. 2004. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo, estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(3): 175-185.
- Breese, K., M. Boll, J. Alt-Morbe, H. Schagger, y G. Fuchs. 1998. Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *European Journal of Biochemistry*. 256: 148-154.
- Callaghan, A., B. Wawrik, S. Ni Chadhain, L. Young, y G. Zylstra. 2008. Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 366: 142-148.

- Callaghan, A., I. Davidova, K. Savage-Ashlock, V. Parisi, L. Gieg, J. Suflita, J. Kukor, y B. Wawrik. 2010. Diversity of benzyI- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science & Technology*. 44: 7287-7294.
- Campbell B., A. Summers, M. Porter y K. Takai. 2006. The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 458-468.
- Chakraborty, R., S. Borglin, E. Dubinsky, G. Andersen, T. Hazen. 2012. Microbial response to the MC-252 oil and Corexit 9500A in the Gulf of Mexico. *Frontiers Microbiology*, 3: 1–6.
- Chon, K., J. Chang, E. Lee, J. Ryu, J. Cho. 2011. Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (narG), nitrite (nirS), and nitrous oxide (nosZ) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands. *Ecological Engineering*. 37 (1): 64-69.
- Coschigano P., T. Wehrman y L. Young. 1998. Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:1650-1656.
- Desai A y V. Pranav .2006. Petroleum and hydrocarbon microbiology. *Applied microbiology*. Report of Department of Microbiology. M.S. University of baroda, Vadodara, India, p 22
- Díaz, A. S., L. Rentería, J. Cortez, A., y E. Palacios. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53.
- Echeverri G. 2009. Bacterias marinas biodegradadoras de petróleo: alternativa de solución al problema ambiental en zonas costeras. *Revista del centro de investigación y proyección social*. 7: 1-230.
- Egland, P., D. Pelletier, M. Dispensa, J. Gibson, y C. Harwood. 1997. A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 6484-6489.
- Emerson D, J. Rentz, T. Lilburn, R. Davis, H. Aldrich, C. Chan y C. Moyer. 2007. A novel lineage of Proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS ONE* 2: e667
- Espina S & C Vanegas. 1996. *Ecotoxicología y Contaminación*. En: Vazquez Botello A, JL Rojas Galviz, JA Benitez & D Zarate Lomelí (eds). Golfo de Mexico, Contaminación e Impacto: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5: 69-106. Universidad Autónoma de Campeche, México.
- Francis A. 1998. Bioremediation of uranium contaminated soils and wastes. International conference and workshop: Uranium-mining and hydrogeology. Freiberg in Sachsen (Germany), pp. 340-346.
- Ghosh A, N. Dey, A. Bera, A. Tiwari, KB. Sathyaniranjana, K. Chakrabarti, y D. Chattopadhyay. 2010. Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. *Saline Systems*, 6:1.
- Gruhl E., H. Russell, D. Bryant, M. Kanaga y M. Hart. 1982. Isolation and Screening of Clostridia for Possible Use in Microbially Enhanced Oil Recovery. Proc. Int. Conf. *Microbial Enhanced Oil Recovery*.

- Guan, J., B. Zhang, S. Mbadanga, J. Liu, J. Gu, y B. Mu. 2014. Functional genes (dsr) approach reveals similar sulphidogenic prokaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*. 98(4): 1871-1882
- Hammill, T., y R. Crawford. 1996. Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:1842–1846.
- Hazen, T., A. Dubinsky, T. DeSantis, G. Andersen, Y. Piceno, N. Singh, J. Jansson, A. Probst, S. Borglin, J. Fortney, W. Stringfellow, M. Bill, M. Conrad, L. Tom, K. Chavarria, R. Alusi, R. Lamendella, D. Joyner, C. Spier, J. Baelum, M. Auer, M. Zemla, R.,Chakraborty, E. Sonnenthal, P. D'Haeseleer, H. Holman, S. Osman, Lu, Z., J. Van Nostrand, Y. Deng, J. Zhou, O. Mason. 2010. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, 330:204-207.
- Hendrickx, B., H. Junca, J. Vosahlova, A. Lindner, I. Ruegg, M. Bucheli-Witschel, F. Faber, T. Egli, M. Mau, D. Pieper, E. Top, W. Dejonghe, L. Bastiaens, y D. Springael. 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods* 64: 250-265.
- Hood, M., W. Bishop, F. Bishop, S. Meyers, y T. Whelan III. 1975. Microbial indicators of oil-rich salt marsh sediments. *Applied Microbiology*. 30:982-987.
- King, G.M., C. Smith, B. Tolar y J. Hollibaugh. 2013. Analysis of composition and structure of bacterioplankton communities in the northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 3:438.
- King G. M., Kostka J., Hazen T.,y Sobecky P. 2014. Microbial Responses to the *Deepwater Horizon* Oil Spill: From Coastal Wetlands to the Deep Sea. *Marine Science*. 7:1-15.
- Kimes NE, Callaghan AV, Aktas DF, Smith WL, Sunner J, Golding B et al., 2013. Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in Microbiology* 4: 50.
- Kostka, J.E., O.Prakash, W. Overholt, S. Green, G. Freyer, A. Canion, J. Delgardio, N. Norton, T.Hazen y M. Huettel. 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: 7962–7974.
- Leahy, J. y R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Review*, 54: 305-315.
- Liu, Z., y J. Liu. 2013. Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oils pill. *Microbiology Open*. 2: 492–504
- Lizárraga-Partida, M.L., Rodríguez-Santiago, H., Romero-Jarero, J.M., 1982. Effects of the Ixtoc I blowout on heterotrophic bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 13, 67-70

- Lizárraga-Partida, M., J. Porras-Aguirre, F. Izquierdo-Vicuña, M. Rosano- Hernández. 1986. Bacteriology of the southern Gulf of Mexico area and channel of Yucatán. *Ciencias Marinas*, 12: 21-34.
- Lizárraga-Partida, M. 1996. Microbiología del petróleo en el sur del Golfo de México. 265-278. In: A.V. Botello, J. Rojas-Galaviz, J. Benítez, D. Zárate-Lomelí (Eds.) *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 666p.
- Mahmoudi N, T. Porter, A. Zimmerman, R. Fulthorpe, G. Kasozi, B. Silliman, G. Slater. 2013. Rapid degradation of Deepwater Horizon spilled oil by indigenous microbial communities in Louisiana saltmarsh sediments. *Environmental Science and Technology* 47: 13303–13312
- Mason OU, T. Hazen, S. Borglin, P. Chain, E. Dubinsky, J. Fortney, J. Han, H. Holman, J. Hultman, R. Lamendella, *et al.*, 2012. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *International Society for Microbial Ecology*. 6:1715-1727.
- Mbadanga, S., L. Wang, L. Zhou, J. Liu, J. Gu, B. Mu. 2010. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65: 1-13.
- Mironov, O. 1969. Black Sea microorganisms growing on hydrocarbons. *Microbiology*. 38:608-610.
- Monreal M. A., Salas D. y Velasco H. 2004. La hidrodinámica del Golfo de México. *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. Instituto Nacional de Ecología*, 627. pp. 47-68.
- Musat N, H. Halm, B. Winterholler, P. Hoppe, S. Peduzzi. 2008. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:17861–66.
- Nõlvak H, T. Sildvee, M. Kriipsalu, J. Truu. 2012. Application of microbial community profiling and functional gene detection for assessment of natural attenuation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Boreal Environment Research*.17:113
- Paul J, D. Hollander, P. Coble, K. Daly, S. Murasko, D. English, J. Basso, J. Delaney, L. McDaniel y C. Kovach. 2013. Toxicity and mutagenicity of Gulf of Mexico waters during and after the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Science and Technology* 47: 9651–9659.
- Palmer, S. E., y E. W. Baker. 1978. Copper porphyrins in deep-sea sediments: a possible indicator of oxidized terrestrial organic matter. *Science*, 201: 49-51.
- Rees G., D. Baldwin, G. Watson, S. Perryman, D. Nielsen. 2004. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:339–347
- Reuss, N. 2005. Sediment pigments as biomarkers of environmental change. Tesis de doctorado, Faculty of Science University of Copenhagen. 33pp.

- Rosano-Hernández M., L. Fernández-Linares y B. Xoconostle-Cáceres. 2009. Bacterial diversity of marine seeps in the southeastern Gulf of Mexico. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(9):683-689.
- Rosano-Hernández, M., H. Ramírez-Saad, y L. Fernández-Linares. 2012. Petroleum-influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: diversity and bacterial community structure assessment. *Journal of Environmental Management*. 95: S325–S331.
- Saito, A., T. Iwabuchi, y S. Harayama. 1999. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere*. 38:1331–1337.
- Soto, L. y A. Botello. 2011. Informe final del proyecto "Marco ambiental de las condiciones oceanográficas en el sector NW de la ZEE de México en el Golfo de México (MARZEE)", Etapa 1. México, D.F. Junio, 2011.
- Stingley R., A. Khan, y C. Cerniglia. 2004. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322:133–146.
- Turner, W., and D. G. Ahearn. 1970. Ecology and physiology of yeast of an asphalt refinery and its watershed, p. 113-123. In D. G. Ahearn (ed.), *Recent trends in yeast research*. Georgia State University, Atlanta.
- Valentine D., J. Kessler, M. Redmond, S. Mendes, M. Heintz, C. Farwell, L. Hu, F. Kinnaman, S. Yvon-Lewis, M. Du, E. Chan, F. Garcia Tigreros, C. Villanueva. 2010. Propane respiration jump-starts microbial response to a deep oil spill. *Science*. 330: 208-211.
- Vos, P.; G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K. Schleifer, W. Whitman. 2009. [1984(Williams & Wilkins)]. George M. Garrity, ed. *The Firmicutes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3 (2nd ed.). New York: Springer. British Library no. GBA561951.
- Walker, J., y R. Colwell. 1973. Microbial ecology of petroleum utilization in Chesapeake Bay.. In API/EPA/USCS conference on prevention and control of oil spills. *American Petroleum Institute, Washington, D.C.* Pp 685-691.
- Wang Z., J. Li, A. Hesham, S. He, Y. Zhang, Z. Wang, y M. Yang. 2007. Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Science of the Total Environment*. 373:356–362.
- Wang, X., C. Chi, Y. Nie, Y. Tang, Y. Tan, G. Wu y X. Wu. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology*. 102: 7755-7761.
- Wang, W. y Z. Shao. 2012. Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 94: 437-448.
- Whyte, L., A. Schultz, B. Van Beiden, A. Luz, V. Pellizari, D. Labbé, y C. Greer. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 41: 141-150.
- Yakimov M., L. Giuliano, G. Gentile, E. Crisafi, T. Chernikova, W. Abraham, H. Lunsdorf, K. Timmis, P. Golyshin. 2003. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel

hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:779-785.

- Yáñez-Arancibia, A., A. Lara-Domínguez, P. Sánchez-Gil, J. Day. 2004. Interacciones ecológicas estuario-mar: Marco conceptual para el manejo ambiental costero. In: Caso, M., Pisanty, I., Ecurra, E.(Eds.) *Diagnóstico Ambiental del Golfo de México*, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología A.C., Harte *Research Institute for Gulf of Mexico Studies*. 1: 431-490.
- Zhao J., D. Manno, C. Beaulieu, L. Paquet, J. Hawari. 2005. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary*. 55:1511–1520.
- Ziervogel, K., L. McKay, B. Rhodes, C. Osburn, J. Dickson-Brown, C. Arnosti. 2012. Microbial activities and dissolved organic matter dynamics in oil-contaminated surface seawater from the Deepwater Horizon oil spill site. *PLoS One*. 7(4), e34816.

PIGMENTOS

- Balech, E. 1977. Introducción al fitoplancton marino. Universidad de Buenos Aires (Ed). Argentina, 211.
- Bianchi, T. S., B. Johansson, y R. Elmgren. 2000. Breakdown of phytoplankton pigments in Baltic sediments: effects of anoxia and loss of deposit-feeding macrofauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 251, 161-183.
- Biggs, D. C., 1992. Nutrients, plankton and productivity in a warm-core ring in the western Gulf of México. *Journal of Geophysical Research*. 97(2): 2143-2154.
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9:1551–8.
- Fábregas, J., C. Herrero, M. Veiga. 1984. Effect of oil and dispersant on growth and chlorophyll a content of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47 (2), 445-447.
- Goutx, M. y A. Saliot. 1980. Relationship between dissolved and particulate fatty acids and hydrocarbons, chlorophyll a and zooplankton biomass in Villefranche Bay, Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*. 8: 299-318.
- Guerrero, F., V. Rodríguez, B. Bautista, F. Jiménez-Gómez. 1988. Procesos de formación pérdida de fitopigmentos en sistemas pelágicos: evaluación en condiciones de laboratorio. *Investigación pesquera*. 52:437-449.
- Heaton, J. W. y Marangoni, A. G. 1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 8-15.
- Herbland, A. 1988. The deep phaeopigment maximum In the ocean: reality or illusion? In: Rothschild, B. J. (Ed.). *Toward a theory on biological-physical interactions in the world ocean*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 157-172.
- Jeffrey, S. W. y M. Vest. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, and S.W. Wright (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, UNESCO, Paris, 37-84.

- Kowalewska, G. 1994. Steryl chlorin esters in sediments of the southern Baltic Sea. *Netherland Journal of Aquatic Ecology*, 28: 149–156.
- Kowalewska, G. 1995. A HPLC method of determination of chlorophylls c in samples of the marine environment. *Chemia Analityczna*. Warsaw, 40: 697–704.
- Kowalewska, G., A. Witkowski, B. Toma. 1996. Chlorophylls c in bottom sediments as markers of diatom biomass in the southern Baltic Sea. *Oceanologia*, 38 (2): 227–249.
- Kowalewska, G. y J. Konat. 1997. Distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the southern Baltic Sea. *Oceanologia* 39 (1), 83–104.
- Kowalewska, G. 2005. Algal pigments in sediments as a measure of eutrophication in the Baltic environment. *Quaternary International*, 130: 141-151.
- Megharaj M, I. Singleton, NC. McClure y R. Naidu. 2000. Influence of petroleum hydrocarbon contamination and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38:439-445
- Nelson, J.R. 1993. Rates and possible mechanism of light dependent degradation of pigments in detritus derived from phytoplankton. *Journal of Marine Research*. 51: 155-179
- Palmer, S. E., y E. W. Baker. 1978. Copper porphyrins in deep-sea sediments: a possible indicator of oxidized terrestrial organic matter. *Science*, 201: 49-51.
- Rabalais NN, R. Turner, y W. Wiseman. 2001. Hypoxia in the Gulf of Mexico. *Journal of Environmental Quality*. 30: 320–29
- Rabalais, N. N., R. Turner, y W. Wiseman. 2002. Gulf of Mexico hypoxia, aka “the dead zone.” *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:235–263.
- Repeta D. J. y D. Simpson. 1991. The distribution and recycling of chlorophyll, bacteriochlorophyll and carotenoids in the Black Sea. *Deep-Sea Research*. 38(2): 969-984
- Schwartz, S. y Von Elbe, J. H. 1983. Kinetics of Chlorophyll Degradation to Pyropheophytin in Vegetables. *Journal of Food Science*, 48: 1303-1306.
- Siegel S. 1990. Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. 3 Editorial México: Trillas.
- Szymczak-Zyla, M., B. Wawrzyniak-Wydrowska, G. Kowalewska. 2006. Products of chlorophyll a transformation by selected benthic organisms in the Odra Estuary (Southern Baltic Sea). *Hydrobiologia* 554, 155–164.
- Szymczak-Zyla M., G. Kowalewska. 2007. Chloropigments a in the Gulf of Gdansk (Baltic Sea) as markers of the state of this environment. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 512–528.
- Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailiau y J.C. Marty. 1996. A rapid method for the determination of phytoplankton pigments in natural waters including the separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18: 2377-2382.
- Yentsch, C.S. 1965. Distribution of chlorophyll and phaeophytin in the open ocean. *Deep Sea Research*, 12: 653-666.
- Zsolnay, A. 1973. Hydrocarbon and chlorophyll: a correlation in the upwelling region off West Africa. *Deep Sea Reserch*. 20: 923-925.

- Zsolnay, A. 1977. Hydrocarbon content and chlorophyll correlation in the waters between Nova Scotia and the Gulf Stream. *Deep Sea Reserch.* 24:199-207.
- Zsolnay, A. 1979. A confirmation of the correlation between hydrocarbons and Chlorophyll a in the Upper Euphoric Zone. *Marine Pollution Bulletin.* 10: 107-108.

Anexo 1

Genes identificados en la degradación de compuestos contaminantes en la base de datos KEGG,

GEN	COMPUESTO QUE DEGRADA	REFERENCIA
<i>ali</i>	Degradación de hidrocarburos alicíclico	Egland, et al., 1997
<i>hba</i>	Degradación de ácido hidroxibenzoico	
<i>dsr</i>	Degradadoras de azufre	Guan, et al., 2014
<i>narG</i>	Degradación de nitrato	Chon, et al., 2011
<i>nirS</i>	Degradación de nitrito	
<i>nirK</i>		
<i>nosZ</i>	Degradación de óxido nitroso	
<i>tbmD</i>	Degradación de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, hidrocarburos aromáticos	Hendrix, et al., 2006
<i>tmoA</i>		
<i>xyIM</i>		
<i>xyIA</i>		
<i>todC1</i>		
<i>xyIE</i>		
<i>xyIE2</i>		
<i>cdo</i>		
<i>assA</i>	Degradación anaeróbica de hidrocarburos	Callaghan, et al., 2008
<i>assB</i>		Acosta et al., 2013
<i>BSS</i>	Catalización de hidrocarburos aromáticos	Callaghan, et al., 2008
<i>bad</i>	Degradación de ácido benzoico	Breese, et al., 1998
<i>nid</i>	Degradación de Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Stingley, et al., 2004
<i>nahAC</i>		Wang, et al., 2007
<i>nahC</i>		
<i>phd</i>	Degradación de fenantrenos	Saito, et al., 1999
<i>Pmo</i>	Bifenilo monooxigenasa	Mason, et al., 2012
<i>bphA</i>		Wang, et al., 2007
<i>ASS</i>	Catalización de n-alcanos	Callaghan, et al., 2010
<i>MAS</i>		Mbadinga, et al., 2011
<i>alma(C32+)</i>	Degradación de N-Alcanos monooxigenasa	Wang & Shao 2012
<i>alkB1</i>		Whyte et al., 2002

<i>alkB2</i>		
<i>alkB</i>		
<i>alkM</i>		
<i>cyp 153 (C5-C6)</i>		Wang et al., 2011
<i>LmPH</i>	Degradación de Fenol	Nolvak, <i>et al.</i> , 2012
<i>Tud</i>	Tolueno	Coschigano, <i>et al.</i> , 1998
<i>BssA</i>		

Anexos 2

Prueba de correlación de rangos (Sperman)

	Profundidad	Feoforbide- α	Zeaxantina	Clorofila- α	Feofitina- α	Pirrofeofitina- α	β -Caroteno	HAP'S	Alifáticos	CO	MO	Salinidad	Temperatura
Profundidad	1	-0.672	-0.888	-0.672	-0.854	-0.759	-0.854	0.196	0.261	-0.185	-0.261	-0.873	-0.981
Feoforbide- α	-0.672	1	0.674	0.788	0.519	0.401	0.556	-0.006	0.215	0.096	0.128	0.325	0.655
Zeaxantina	-0.888	0.674	1	0.539	0.825	0.658	0.721	0.092	-0.122	0.096	0.122	0.828	0.897
Clorofila- α	-0.672	0.788	0.539	1	0.547	0.458	0.611	0.089	0.27	0.068	0.073	0.298	0.627
Feofitina- α	-0.854	0.519	0.825	0.547	1	0.698	0.64	0.127	-0.265	0.372	0.419	0.825	0.842
Pirrofeofitina- α	-0.759	0.401	0.658	0.458	0.698	1	0.562	-0.109	-0.5	0.24	0.304	0.779	0.745
β -Caroteno	-0.854	0.556	0.721	0.611	0.64	0.562	1	-0.416	-0.132	0.143	0.204	0.722	0.853
HAP'S	0.196	-0.006	0.092	0.089	0.127	-0.109	-0.416	1	0.482	-0.091	-0.223	-0.169	-0.18
Alifáticos	0.261	0.215	-0.122	0.27	-0.265	-0.5	-0.132	0.482	1	-0.228	-0.357	-0.496	-0.21
CO	-0.185	0.096	0.096	0.068	0.372	0.24	0.143	-0.091	-0.228	1	0.975	0.302	0.26
MO	-0.261	0.128	0.122	0.073	0.419	0.304	0.204	-0.223	-0.357	0.975	1	0.359	0.317
Salinidad	-0.873	0.325	0.828	0.298	0.825	0.779	0.722	-0.169	-0.496	0.302	0.359	1	0.899
Temperatura	-0.981	0.655	0.897	0.627	0.842	0.745	0.853	-0.18	-0.21	0.26	0.317	0.899	1