



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS CON  
 LA CAPACIDAD DE DEGRADAR HIDROCARBUROS BAJO CONDICIONES  
 ANÓXICAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
 MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
 BIOL. EMMANUEL ALVIZO TINOCO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ  
[Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM](#)

Ciudad de México., Abril, 2019



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.

*Con cariño para mis padres, familia, novia y amigos*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Katy Juárez López, por sus enseñanzas, consejos y apoyo, que contribuyeron en mi formación académica, profesional y personal.

A la Dra. María del Refugio Trejo Hernández, miembro de mi comité tutorial, por permitirme realizar el análisis de hidrocarburos en sus instalaciones y por contribuir al desarrollo general del proyecto.

A la Dra. Liliana Pardo López, miembro de mi comité tutorial, por sus consejos, observaciones y propuestas que ayudaron al desarrollo del proyecto.

A la Dra. Areli del Carmen Ortega Martínez de la universidad Veracruzana, por su ayuda en la toma de muestras y por facilitarnos el acceso al sitio de estudio.

Al M.B. Daniel Morales Guzmán y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su apoyo en el análisis de hidrocarburos.

A los miembros de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM, especialmente al Dr. José Fernando García Guevara, a la Dra. Grisel Alejandra Escobar Zepeda, a la Dra. Elizabeth Ernestina Godoy Lozano, a la Dra. Luciana Raggi Hoyos y a la Dra. Leticia Vega Alvarado, por su apoyo en el análisis bioinformática realizado en el proyecto.

A los miembros de mi jurado, la Dra. Marcela Ayala Aceves, la Dra. Esperanza Martínez Romero, al Dr. Luis Caspeta Guadarrama, al Dr. Adrián Ochoa Leyva y a la Dra. Cinthia Ernestina Núñez López, por sus comentarios, observaciones y correcciones que contribuyeron al mejoramiento de mi trabajo escrito.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Dr. José Alberto Hernández, Dra. Paloma Lara, Dra. Getzabet González, M.C. Alan Brito, M.C. Lorena Escobar,

M.C. Fanny Flores, M.C. Xadeni Burgos, Biol. Adrián Martínez y al Q.B. Manuel Huerta, por sus recomendaciones y ayuda en el proyecto.

A todos los miembros del laboratorio 9 del instituto de biotecnología UNAM, por todo el apoyo y tiempo compartido a lo largo de estos años.

A los miembros de Consorcio de Investigación del Golfo de México, por sus consejos y apoyo en los experimentos.

A los técnicos del laboratorio 9, Corina Mondragón y Antonio Dorantes por su ayuda en el laboratorio.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por otorgar financiamiento al proyecto DGAPA-UNAM, PAPIIT IN210017.

Al Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM). Fondo sectorial CONACyT-SENER-Hidrocarburos proyecto 201441.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado de la UNAM por otorgarme recursos económicos para la asistencia a un congreso nacional.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
HIDROCARBUROS Y CONTAMINACIÓN: .....	2
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS .....	4
BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA .....	6
• Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos.....	7
• Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	8
• Degradación anaerobia de alcanos .....	10
MICROORGANISMOS ANAEROBIOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS .....	10
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
MICROORGANISMOS HIERRO-REDUCTORES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS .....	12
MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS .....	13
<b>SITIO DE ESTUDIO</b> .....	<b>15</b>
PROBLEMÁTICA AMBIENTAL .....	15
DERRAME DE PETRÓLEO OCURRIDO EN EL RÍO COATZACOALCOS .....	16
<b>JUSTIFICACIÓN:</b> .....	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS:</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVO:</b> .....	<b>19</b>
OBJETIVOS PARTICULARES: .....	19
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>20</b>
1.-ANÁLISIS DE SEDIMENTOS .....	20
1.1-Toma de muestras: .....	20
1.2.-Determinación de hidrocarburos totales en sedimentos .....	21
1.3.-Determinación de metales en sedimentos .....	21
1.4.-Extracción de ADN total de sedimentos .....	21
1.5.-Análisis de diversidad microbiana de sedimentos y consorcios enriquecidos .....	22

2.-ENRIQUECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS HIERRO-REDUCTORES. ....	24
2.1.-Enriquecimiento de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo.....	24
2.2.-Enriquecimiento de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo y queroseno. ....	25
2.3.-Ensayo de degradación de petróleo bajo condiciones hierro-reductoras. ....	25
2.4.-Ensayo de degradación de petróleo y queroseno bajo condiciones hierro-reductoras. ....	26
2.5.-Análisis de hidrocarburos .....	26
2.6.- Medición de reducción de Fe(III) .....	29
2.7.-Cuantificación de citrato y acetato.....	30
2.8.-Extracción de ADN total de consorcios microbianos hierro-reductores.....	31
2.9.-Análisis de diversidad microbiana de consorcios hierro-reductores.....	31
3.-ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS SULFATO-REDUCTORES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS .....	32
3.1.-Enriquecimiento de consorcios bacterianos sulfato-reductores .....	32
3.2.-Extracción de ADN de consorcios sulfato-reductores .....	33
3.3.-Análisis de diversidad microbiana de consorcios sulfato-reductores.....	33
4.-ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>DESULFUROMONAS PALMITATIS</i> .....	34
4.1.-Enriquecimiento de <i>Desulfuromonas palmitatis</i> .....	34
4.2.-Aislamiento de <i>Desulfuromonas palmitatis</i> .....	35
4.3.-Extracción de ADN de <i>Desulfuromonas palmitatis</i> .....	35
4.4.-Identificación de <i>Desulfuromonas palmitatis</i> .....	35
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
TEMA 1: ANÁLISIS DE SEDIMENTOS DEL RÍO COATZACOALCOS .....	39
TEMA 2: ENRIQUECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIO HIERRO-REDUCTOR DEGRADADOR DE PETRÓLEO .....	51
TEMA 3: ENRIQUECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIO HIERRO-REDUCTOR DEGRADADOR DE PETRÓLEO & QUEROSENO .....	65
TEMA 4: ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS SULFATO-REDUCTORES .....	75
TEMA 5: ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE <i>DESULFUROMONAS PALMITATIS</i> .....	84
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>89</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>

# RESUMEN

En la actualidad, la cuenca baja del Río Coatzacoalcos es considerada una de las zonas más contaminadas de México; esto debido a la alta actividad industrial y al gran crecimiento poblacional en la región, aunado a un derrame petrolero en el año 2011, que contaminó cerca de 9 km del río.

En el presente trabajo, se analizaron los sedimentos más próximos al área donde ocurrió el derrame petrolero, en los cuales se encontraron altas concentraciones de hidrocarburos, mercurio; así como distintos grupos microbianos con la capacidad de degradar compuestos halogenados, hidrocarburos y algunos con la capacidad de metilar mercurio.

A partir de los sedimentos contaminados, realizamos el enriquecimiento de dos consorcios microbianos hierro-reductores capaces de degradar distintos hidrocarburos del petróleo. A su vez, fueron seleccionados 8 consorcios microbianos, en los cuales se identificaron bacterias fotótrofas anoxigénicas del azufre y bacterias sulfato-reductoras que han sido implicadas en procesos de degradación de hidrocarburos.

Por último, se aisló una cepa con parentesco a la especie *Desulfuromonas palmitatis*, con la posible capacidad de degradar hidrocarburos.



# INTRODUCCIÓN

## Hidrocarburos y contaminación:

Los hidrocarburos son moléculas formadas por átomos de carbono e hidrógeno sin grupos funcionales polares. La electronegatividad similar entre el carbono y el hidrógeno, los hace compuestos altamente persistentes. Por lo que son considerados los contaminantes orgánicos de mayor impacto (Mean & Log., 2007).

Los hidrocarburos derivados del petróleo son los más comunes en ambientes contaminados. El petróleo está constituido por una mezcla compleja de diversos hidrocarburos alifáticos y aromáticos cuyo origen es resultado del entierro, diagénesis y catagénesis de biomasa ancestral (Atlas & Philip., 2005).

En el petróleo, los hidrocarburos alifáticos son los más abundantes, mientras que bencenos y alquil-bencenos con uno o dos grupos metilo o etilo (tolueno, etilbenceno y *m*-, *p*- y *o*-xileno) son los hidrocarburos aromáticos mayormente representados en la mayoría de aceites crudos y refinados (Atlas & Philip., 2005; Mean & Log., 2007).

El benceno puede estar unido a otras moléculas de benceno por enlaces covalentes simples, formando hidrocarburos aromáticos policíclicos, presentes en menor cantidad, pero con gran importancia debido a su alta toxicidad y persistencia (Neff., 1979). Además, el crudo puede contener hidrocarburos con heteroátomos como oxígeno, azufre, nitrógeno y/o diferentes metales. Dentro de estos se encuentran las porfirinas (asociadas a níquel o vanadio), ácidos

nafténicos y moléculas de gran peso molecular denominadas asfáltenos (Hunt., 1996).

En el año 1984, Tisot & Welte analizaron 527 muestras de petróleo crudo y determinaron que, en promedio, las muestras contenían una concentración de 58.2% de hidrocarburos alifáticos, 28.6% de hidrocarburos aromáticos y un 14.2% de compuestos polares, no obstante, estos porcentajes pueden variar ampliamente entre las distintas muestras de petróleo.

En el mundo, actualmente se generan dos billones de toneladas de petróleo crudo por año. Desafortunadamente, durante su extracción, almacenamiento y transporte, ocurren derrames que liberan al océano más de 150 millones de litros de petróleo por año (Etkin., 1999; Gertler *et al.*, 2010). Sumado a esto, también ocurren actos de negligencia o crímenes ambientales que liberan una gran cantidad de hidrocarburos a los océanos. Por ejemplo, en el año 2010 ocurrió un derrame en la planta *Deepwater Horizon* al sur de Luisiana U.S., en el que se liberaron  $7.8 \times 10^8$  litros de petróleo crudo al Golfo de México. Este derrame es considerado el segundo más grande de la historia solamente superado por el ocurrido en Kuwait en 1991, en el que se liberaron  $1.2 \times 10^9$  litros de petróleo crudo al océano como consecuencia del incendio de 700 pozos petroleros (Al-Ghadban *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2014).

La liberación de tales cantidades de petróleo al ambiente genera graves problemas en diversos ecosistemas. Por lo tanto, existe una creciente demanda en el desarrollo y optimización de tecnologías que desempeñen un papel central en los planes de contingencia en respuesta a derrames petroleros, ya que los procesos de remediación actuales (físicos y/o químicos) resultan muy costosos y poco eficientes (Paul *et al.*, 2013; Genovese *et al.*, 2014; Bao *et al.*, 2012).

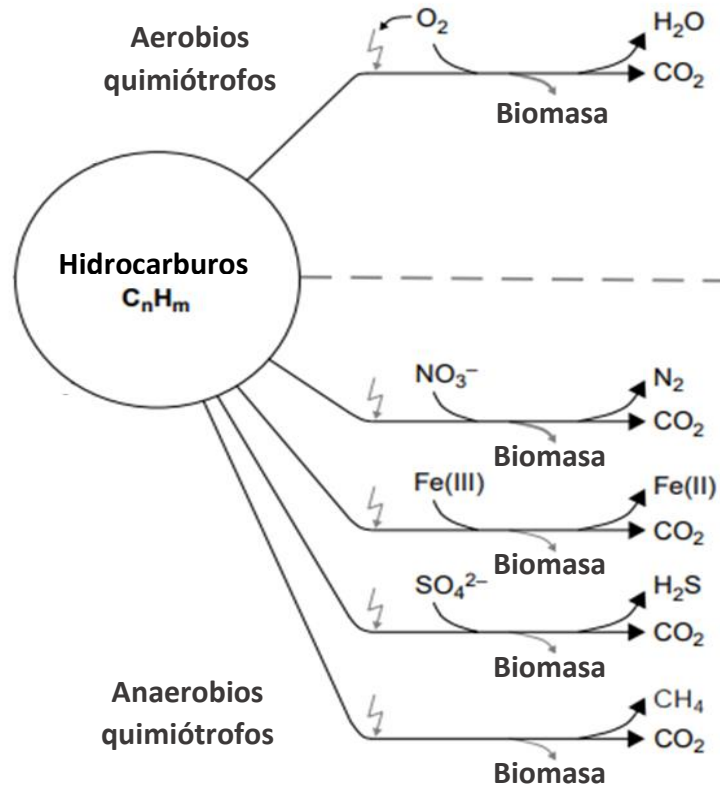
## Biodegradación de hidrocarburos

Los hidrocarburos presentes en el petróleo en algún momento fueron lípidos y ácidos grasos provenientes de plantas, animales y microorganismos que pasaron a formar compuestos altamente reducidos, almacenando una gran cantidad de energía. Por lo tanto, no es de sorprenderse que muchos microorganismos tengan la capacidad de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y/o energía (Yakimov *et al.*, 2007).

Microorganismos como bacterias, hongos y algas tienen la capacidad de degradar hidrocarburos. Sin embargo, las bacterias son reconocidas como los primeros y más activos agentes degradadores en ambientes contaminados con petróleo (Varjani *et al.*, 2017).

El uso de microorganismos en procesos de biorremediación, ofrece técnicas de bajo costo y alta eficiencia generalmente sin producir contaminantes secundarios (Yakimov *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2017; Das & Chandran., 2011). Las bacterias pueden metabolizar hidrocarburos en condiciones aerobias y/o anaerobias (Figura 1). Sin embargo, la naturaleza poco reactiva de estos compuestos dificulta su degradación, ya que para la activación y ruptura de los enlaces polares C-H debe ser superada una gran barrera energética (Rabus *et al.*, 2016).

En presencia de oxígeno, los microorganismos pueden degradar completamente la mayoría de los hidrocarburos presentes en el petróleo (Das & Chandran., 2011). Las bacterias aerobias insertan moléculas de oxígeno al esqueleto hidrocarbonado utilizando oxigenasas o dioxigenasas, para posteriormente, transformarlos en intermediarios del metabolismo central como acetyl-CoA, succinato o piruvato (Kanaly & Harayama., 2000).



**Figura 1.** Metabolismos involucrados en la degradación de hidrocarburos. En la figura se muestran los principales aceptores finales de electrones y los subproductos generados por la degradación de hidrocarburos (Widdel & Rabus., 2001).

En comparación con los procesos de degradación aerobios, las vías de degradación anaerobias han sido menos estudiadas (Bian *et al.*; 2015). Actualmente, se sabe que la mayor parte del petróleo degradado, es resultado de la actividad de bacterias anaerobias presentes en ambientes subsuperficiales (Jaekel., 2011). Por lo tanto, los procesos de degradación anaerobios tienen un papel fundamental en la remediación de aguas y suelos contaminados con hidrocarburos.

## Biodegradación anaerobia

En ambientes contaminados con petróleo el oxígeno suele ser limitado. En los suelos, los hidrocarburos sellan herméticamente los poros impidiendo la penetración de oxígeno. Los hidrocarburos de mayor complejidad quedan absorbidos en la parte superficial del suelo, mientras que los de menor complejidad y mayor polaridad, son desplazados a mayores profundidades contaminando aguas subterráneas (Vodyanitskii., 2011).

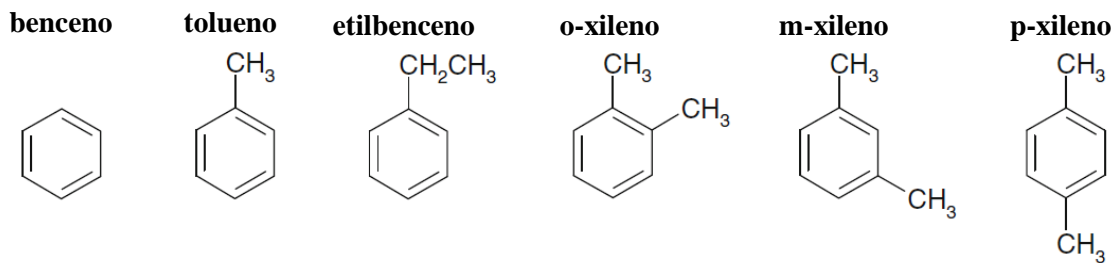
Por otra parte, en ambientes acuáticos, las manchas de petróleo pueden perjudicar el intercambio gaseoso, disminuyendo la oxigenación de aguas subyacentes. Un ejemplo es el ya mencionado derrame petrolero en la planta *Deepwater Horizon*, el cual ha generado una de las mayores zonas de hipoxia marina en el mundo (Anderson & Lovley., 2000; Whitehead., 2013).

En condiciones anóxicas, las bacterias han desarrollado distintas estrategias para superar la naturaleza apolar de los hidrocarburos, a través de la inserción de distintos grupos funcionales. Debido a que la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo o carboxilo en compuestos orgánicos, es un prerequisite para su introducción hacia vías oxidativas del metabolismo central (ejemplo;  $\beta$ -oxidación, ciclo de Krebs) (Spormann & Widdel., 2000).

- Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos

La contaminación por los hidrocarburos monoaromáticos benceno, tolueno, ethilbenceno y xileno (BTEX) (Figura 2), es de especial preocupación debido a su toxicidad y movilidad en el ambiente. En suelos y sedimentos contaminados con petróleo, se ha observado un aumento de estos compuestos en estratos inferiores, contaminando los mantos freáticos y aumentando la pluma de contaminación (Weelink *et al.*, 2010).

Dentro de los BTEX, el benceno es el hidrocarburo de mayor preocupación, debido a que es un compuesto muy estable, carcinogénico y uno de los contaminantes orgánicos de mayor prevalencia en aguas subterráneas (Anderson & Lovley., 1997). El tolueno y el xileno no son carcinogénicos, sin embargo, el tolueno puede potenciar otros compuestos cancerígenos (Dean., 1978).



**Figura 2.** Principales hidrocarburos aromáticos presentes en extractos crudos de petróleo (Weelink *et al.*, 2010).

Dentro de los hidrocarburos aromáticos, la degradación anaerobia de tolueno ha sido la más estudiada. La activación del tolueno es realizada por la enzima bencilsuccinato sintasa (Bss), que cataliza la adición de fumarato al grupo metilo para formar bencilsuccinato. Posteriormente, este compuesto es activado como un tioéster-CoA el cual será transformado a benzoil-CoA (Weelink *et al.*,

2010; Lueders., 2017). Dicho compuesto es un importante intermediario en el que convergen diversas vías de degradación de hidrocarburos aromáticos.

El benzoil-CoA, es desaromatizado mediante una benzoil-CoA reductasa generando 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA. A continuación, el anillo es abierto, produciendo la molécula alifática 3-hidroxi pimelil-CoA que será oxidada a acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, a través de la  $\beta$ -oxidación (Lueders., 2017; Nzila., 2018).

Al igual que en la degradación de tolueno, la degradación anaerobia de xileno y etilbenceno se da principalmente por la adición de fumarato a través de la enzima Bss. Sin embargo, la activación del benceno es realizada por tres mecanismos distintos: hidroxilación, carboxilación o metilación. Estos tres procesos, inducen la formación de fenol, tolueno o benzoato respectivamente, para ser canalizado hacia la vía de degradación de benzoil-CoA (Lueders., 2017; Nzila., 2018).

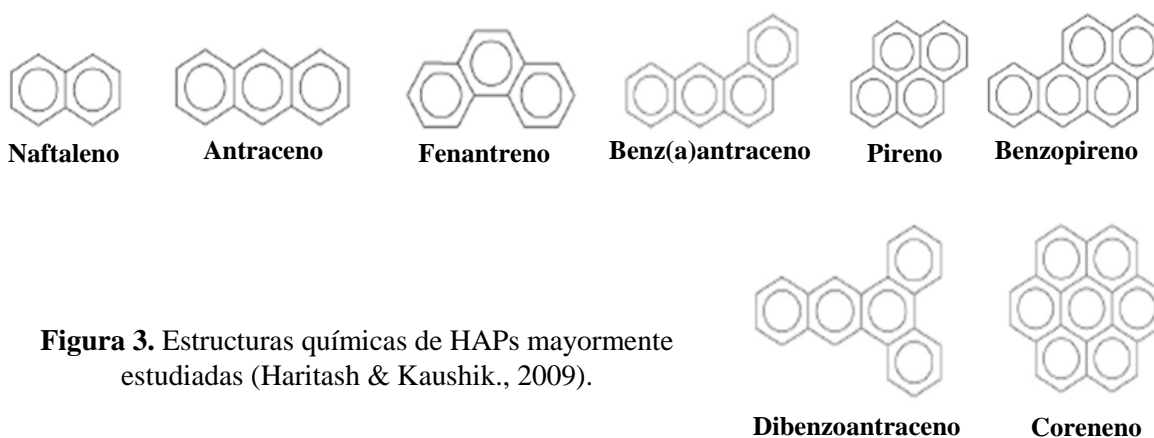
- Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), son compuestos formados por la fusión de dos o más anillos de benceno (Figura 3). Estos compuestos son ubicuos en la naturaleza, altamente recalcitrantes, resistentes a la biodegradación, potencialmente bioacumulables y con actividad carcinogénica (Haritash & Kaushik., 2009).

Estudios han demostrado la degradación anaerobia de HAP de dos a tres anillos, sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de degradación anaerobia de HAPs de alto peso molecular (Haritash & Kaushik., 2009; Folwell *et al.*, 2016; Nzila., 2018).

La degradación anaeróbica de naftaleno es iniciada por carboxilación o metilación. La activación por carboxilación, es realizada por una naftaleno carboxilasa que produce el compuesto 2-acido-naftóico que posteriormente será transformado a 2-naftoil-CoA (Nzila., 2018). El compuesto 2-naftoil-CoA es un importante intermediario en la degradación anaerobia de HPAs, en el convergen diferentes vías de degradación para la reducción y ruptura del anillo que llevará a la formación de un compuesto alifático que será degradado vía  $\beta$ -oxidación (Haritash & Kaushik., 2009).

Por otro lado, la activación por metilación es mediada por una naftaleno methyl transferasa que genera 2-metilnaftaleno al que se le adicionará una molécula de fumarato para formar 2-naftoil-CoA (similar a la oxidación de tolueno), para posteriormente seguir con los pasos de degradación previamente descritos. La activación de fenantreno y antraceno se da por hidroxilación, caboxilación y metilación, a través de procesos muy similares a la degradación de naftaleno (Haritash & Kaushik., 2009; Folwell *et al.*, 2016;).



**Figura 3.** Estructuras químicas de HAPs mayormente estudiadas (Haritash & Kaushik., 2009).



- Degradación anaerobia de alcanos

Los hidrocarburos alifáticos son los mayores constituyentes del petróleo crudo y gas natural (Atlas & Philip., 2005; Bian *et al.*, 2015).

Los alcanos gaseosos (de 1 a 4 carbonos) tienen una gran solubilidad en agua, sin embargo, alcanos líquidos y sólidos son muy hidrofóbicos, lo cual dificulta su acceso a la célula. Los microorganismos, facilitan la difusión de estos compuestos habilitando estructuras hidrofóbicas en la superficie celular o produciendo moléculas anfifílicas tensoactivas también conocidas como biosurfactantes (Widdel & Grundmann., 2010).

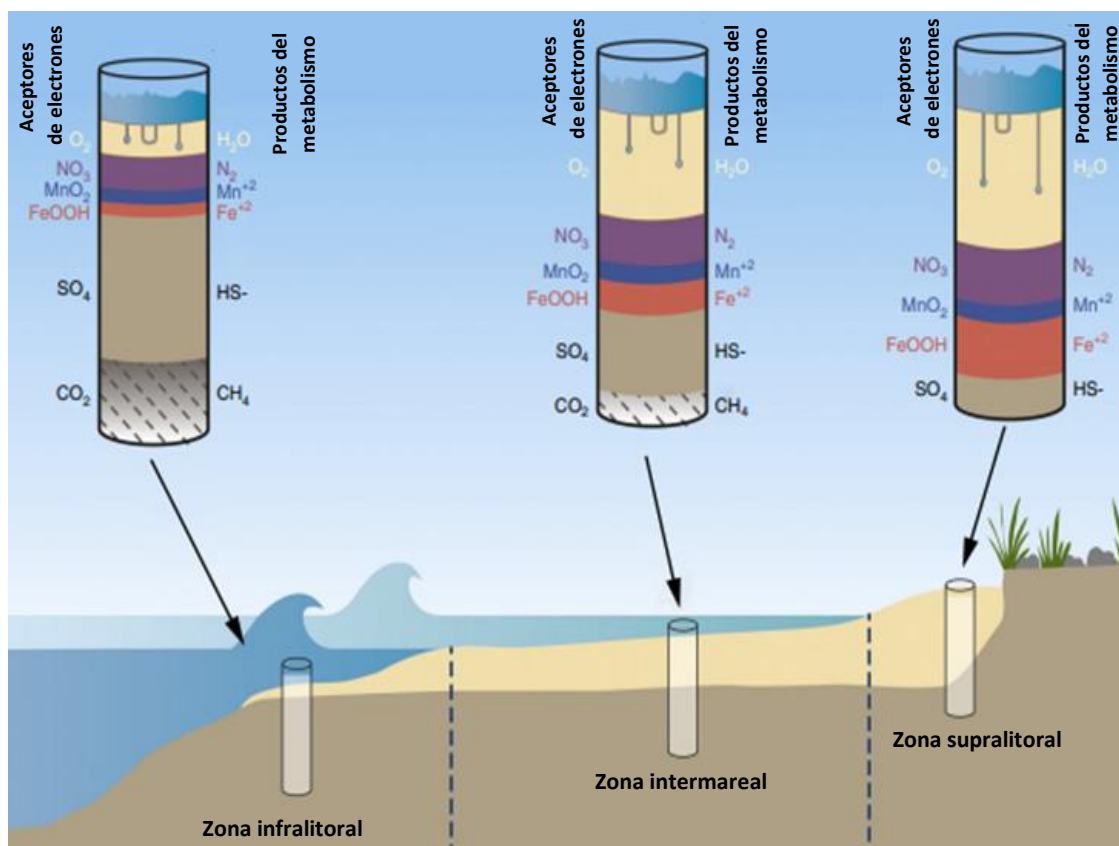
La vía anaerobia de oxidación de alcanos mejor documentada es iniciada por la enzima alquil succinato sintasa, que cataliza la adición de fumarato al alcano, formando 2-(1-metil alquil) succinato que a continuación, será transformado a un éster CoA (4-metilalcanoil-CoA) y degradado por  $\beta$ -oxidación (Wilkes *et al.*, 2016; Bian *et al.*, 2015).

## Microorganismos anaerobios involucrados en la degradación de hidrocarburos.

Existen grupos de microorganismos fisiológicamente distintos (fermentativos, hierro-reductores, nitrato-reductores, sulfato-reductores, clorato-reductores y metanógenos) con la capacidad de degradar hidrocarburos bajo condiciones anóxicas (Bian *et al.*, 2015).

Los procesos de degradación anaerobios se desarrollan mediante la utilización de distintos aceptores finales de electrones. La presencia o ausencia de estos elementos depende de la composición fisicoquímica, el área geográfica y la profundidad de suelos, sedimentos y cuerpos de agua (Figura 4).

Los aceptores finales de electrones más comunes en ambientes anóxicos son:  $\text{NO}_3^- > \text{Mn}^{4+} > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2$  (orden dado de acuerdo a su potencial redox). Por lo tanto, los principales grupos involucrados en la degradación anaerobia de hidrocarburos son: bacterias nitrato-reductoras, hierro y manganeso reductoras, sulfato-reductoras y organismos metanógenos (Zwolinski *et al.*, 2000; Vincent, *et al.*, 2017; Vodyanitskii., 2011).



**Figura 4.** Principales aceptores finales de electrones presentes en sedimentos costeros (Acosta-González & Marqués., 2016).

# ANTECEDENTES

En el presente trabajo nos enfocamos en analizar las comunidades microbianas de sedimentos contaminados con hidrocarburos del Río Coatzacoalcos, para enriquecer distintos consorcios microbianos hierro y sulfato-reductores con la capacidad de degradar hidrocarburos bajo condiciones anóxicas.

En los siguientes apartados se describe de manera general, los principales linajes involucrados en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones hierro y sulfato-reductoras.

## Microorganismos hierro-reductores degradadores de hidrocarburos

El Fe(III) y Mn (IV), generalmente son los aceptores finales de electrones más abundantes en suelos, sedimentos y acuíferos. Debido a ello, en estos ambientes los microorganismos hierro-reductores tienen gran importancia en la degradación de distintos contaminantes, así como en la especiación del hierro y otros nutrientes (Lovley., 2000; Vodyanitskii., 2011).

En ambientes hierro-reductores contaminados con hidrocarburos se ha observado la predominancia de bacterias del género *Geobacter* (Kunapuli *et al.*, 2010). Las bacterias pertenecientes a este linaje son anaerobios estrictos, con metabolismos muy versátiles que han sido relacionadas con la degradación de múltiples hidrocarburos aromáticos (Zhang *et al.*, 2012). Se ha reportado que géneros del mismo orden (Desulfuromonadales) como *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa* y *Pelobacter*, están relacionados con oxidación de compuestos aromáticos en ambientes hierro-reductores (Zwolinski *et al.*, 2000).

Actualmente, existen pocos aislados con la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos mediante la oxidación de Fe(III) y no se ha reportado

la degradación de alcanos en estas condiciones (Kunapuli *et al.*, 2010; Mbadinga *et al.*, 2011).

El conocimiento actual de los microorganismos hierro-reductores implicados en la degradación de hidrocarburos es limitado y no refleja la importancia de este grupo en ambientes contaminados (Kunapuli *et al.*, 2010). Por lo tanto, el presente trabajo contribuirá a un mejor entendimiento de la diversidad y fisiología de los microorganismos involucrados en estos ambientes.

## Microorganismos sulfato-reductores degradadores de hidrocarburos

Los microorganismos sulfato-reductores son un grupo metabólicamente versátil, capaz de utilizar sulfato y oxianiones de azufre como aceptores finales de electrones (Widdel & Bak., 1992).

En ambientes anaerobios marinos, los procesos de degradación de hidrocarburos por sulfato-reductores son los más importantes y mejor documentados (Kniemeyer *et al.*, 2003; Cravo-Laureau *et al.*, 2005).

Existe una gran abundancia de microorganismos sulfato-reductores nativos de ambiente ricos en hidrocarburos como yacimientos de petróleo, ventilas hidrotermales, depósitos de combustibles y sitios contaminados con hidrocarburos (Magot *et al.*, 2000).

Análisis filogenéticos realizados en ambientes anóxicos contaminados con hidrocarburos, han mostrado una prevaencia de la clase delta-proteobacteria. Distintas familias de esta clase tienen la capacidad de oxidar completamente diferentes hidrocarburos en anaerobiosis, por ejemplo, las familias *Desulfobacteraceae*, *Syntrophobacteraceae* y *Desulfohalobiaceae* (Mbadinga *et al.*, 2011).

La diversidad de sulfato-reductores no se limita a miembros de la clase *Deltaproteobacteria*. La familia *Peptococcaceae*, perteneciente al *phylum Firmicutes* también cuenta con representantes sulfato-reductores con la habilidad de degradar hidrocarburos (Magot *et al.*, 2000). Otro grupo importante de sulfato-reductores es el género *Archaeoglobus* y el orden *Thermococcales*, pertenecientes al dominio Arquea, estos organismos hipertermófilos se encuentran normalmente en ventilas hidrotermales o yacimientos de petróleo (Stetter *et al.*, 1987; Magot *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008).

# SITIO DE ESTUDIO

El sitio de estudio pertenece al Río Coatzacoalcos, el cual nace en la sierra Atravesada en el estado de Oaxaca, formando parte de la vertiente del Golfo de México. El Río Coatzacoalcos es la cuarta corriente más caudalosa del país y alimenta principalmente el sur del estado de Veracruz.

La zona en la que desemboca el río es una de las regiones petroleras más antiguas de México, actualmente, existen más de 65 instalaciones químicas, petroquímicas, refinerías, tanques de almacenamiento marítimo y terrestre, terminales de bombeo y venta, campos petrolíferos y una extensa red de oleoductos (Morales-Mora *et al.*, 2014).

## Problemática ambiental

El área industrial de Coatzacoalcos alberga un complejo petroquímico con gran importancia en México y América Latina. Desde el establecimiento del complejo industrial en 1960, el estuario de Coatzacoalcos ha experimentado un gran crecimiento poblacional acompañado de un rápido aumento en los niveles de contaminación en el área. Actualmente, la cuenca baja del río es considerada uno de los sitios más contaminados de México (González-Mille *et al.*, 2010).

Estudios previos en Coatzacoalcos, han reportado altas concentraciones de hidrocarburos, compuestos halogenados y mercurio como consecuencia de la operación de una planta de cloro álcali y un incinerador de residuos dentro del complejo petroquímico “Pajaritos”. Además, de la refinería Lázaro Cárdenas ubicada en el poblado de Minatitlán cerca de la ciudad de Coatzacoalcos (Figura 5) (IPEN Mercury-Free Campaign Report).

Por otra parte, también se han encontrado altas concentraciones de metales pesados (Ni, Co, Cd, Cu, Cr y Pb) e hidrocarburos en la zona (Gonzalez-Mille *et al.*, 2013; Ruelas-Inzunza *et al.*, 2009; Morales-Mora *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Mapa de la cuenca baja el Río Coatzacoalcos. En color amarillo se delimita el área abarcada por la petroquímica Pajaritos y la refinería Lázaro Cárdenas (Imagen modificada de IPEN Mercury-Free Campaign Report)

## Derrame de petróleo ocurrido en el Río Coatzacoalcos

El 31 de diciembre del año 2011, ocurrió un derrame petrolero debido a un acto vandálico en el oleoducto Nueva Teapa – Poza Rica, cerca del municipio de Coatzacoalcos en la zona conocida como “El Polvorín”.

La cantidad de hidrocarburo derramado, así como las áreas afectadas varían entre los distintos medios de comunicación, sin embargo, el Ing. Juan Rafael Elvira Quesada titular de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), informó que la cantidad de petróleo vertido fue el equivalente a 240000 litros de petróleo crudo, los cuales afectaron un área de 30 mil metros cuadrados de suelo natural con vegetación rastrera, herbácea, arbustiva y arbórea, así como nueve kilómetros del Río Coatzacoalcos.

La SEMARNAT, Petróleos Mexicanos (PEMEX) y el gobernador del estado de Veracruz Javier Duarte de Ochoa, informaron sobre la limpieza total del río, recuperando 270000 litros de hidrocarburo emulsionado. Sin embargo, diversas fuentes locales, así como pobladores de la zona, informan que actualmente el río sigue contaminado con hidrocarburos (Figura 6).



**Figura 6.** Lancheros y pescadores realizando limpieza del Río Coatzacoalcos (fotografías de Xantal en el 2012, periódico “El Universal”)



## JUSTIFICACIÓN:

El conocimiento fundamental de los procesos anaeróbicos de degradación de hidrocarburos es necesario para generar estrategias de biorremediación. Actualmente, la alta actividad petrolera pone en riesgo diversos ambientes, por ello, es de gran importancia realizar estudios sobre diversidad microbiana, así como el aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Esto con la finalidad de tener mayor comprensión de los mecanismos de depuración en ambientes anaerobios, así como el mejoramiento de técnicas de biorremediación.

## HIPÓTESIS:

En el análisis de sedimentos contaminados del Río Coatzacoalcos, se encontrarán bacterias con la capacidad de degradar hidrocarburos. A través del enriquecimiento de comunidades microbianas hierro y sulfato reductoras, serán seleccionadas distintas poblaciones bacterianas con la capacidad de degradar hidrocarburos bajo condiciones anóxicas.

## OBJETIVO:

Seleccionar y caracterizar a partir de sedimentos contaminados del Río Coatzacoalcos, distintos consorcios bacterianos que en condiciones anóxicas tengan la capacidad de degradar hidrocarburos.

### Objetivos particulares:

1. Determinar la concentración de hidrocarburos, metales y la composición microbiana de sedimentos contaminados del Río Coatzacoalcos.
2. Enriquecer consorcios hierro y sulfato reductores degradadores de hidrocarburos a partir de sedimentos del Río Coatzacoalcos.
3. Identificar y caracterizar microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en los consorcios bacterianos enriquecidos.
4. Evaluar la degradación de hidrocarburos por parte de los consorcios enriquecidos.

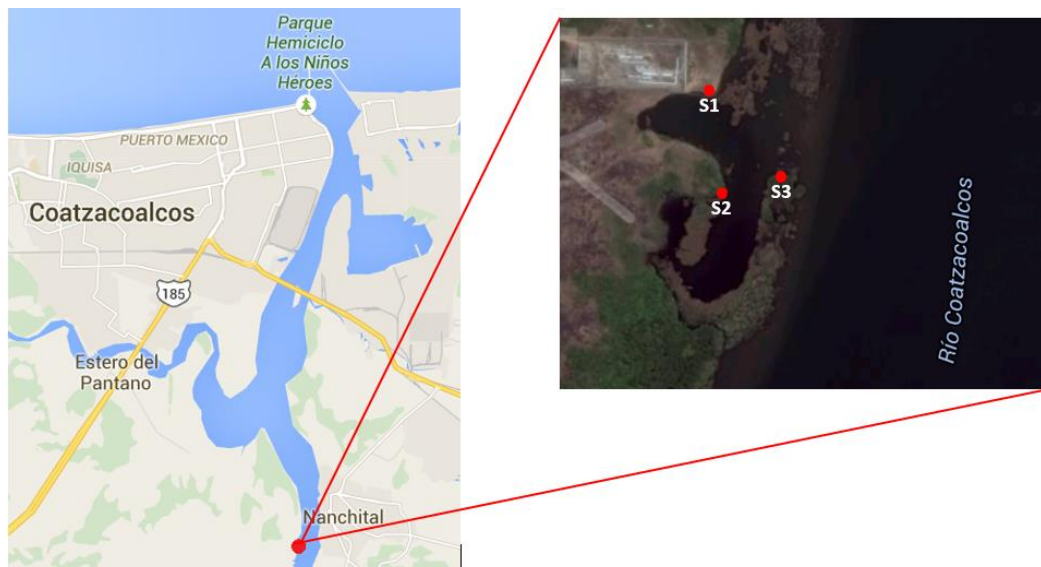
# METODOLOGÍA

## 1.-Análisis de sedimentos

### 1.1-Toma de muestras:

La toma de muestras se realizó en tres sitios (S1, S2 y S3) de la zona más cercana al derrame petrolero ocurrido en el Río Coatzacoalcos en el en el año 2011 (Figura 7). Se utilizó un nucleador de 1.5 m para coleccionar muestras de sedimentos subsuperficiales a una profundidad de 50 cm en el sedimento localizado a 1 metro de profundidad en el río.

Por cada sitio muestreado se coleccionaron 50 gr de sedimento, los cuales fueron almacenados en tubos falcón adicionados con 5 ml de un estabilizador y protector de RNA (*RNAlater*<sup>®</sup>). Posteriormente, los sedimentos se almacenaron a -70 °C hasta su uso.



**Figura 7.** Sitios de muestreo en el Río Coatzacoalcos. sitio 1 ( $18^{\circ}03'46.1''N$ ,  $94^{\circ}25'07.9''W$ ) (S1), sitio 2 ( $18^{\circ}03'43.3''N$ ,  $94^{\circ}25'08.3''W$ ) (S2) sitio 3 ( $18^{\circ}03'42.8''N$ ,  $94^{\circ}25'06.8''W$ ) (S3).

### 1.2.-Determinación de hidrocarburos totales en sedimentos

La determinación de hidrocarburos totales fue realizada en la empresa canadiense *Actlabs*. Los hidrocarburos totales fueron extraídos a partir de 1 gramo de sedimento, utilizando 1 ml de solución hexano:diclorometano 2:1. Las muestras fueron sonicadas durante 20 minutos y posteriormente centrifugadas. Los extractos obtenidos fueron analizados por gravimetría.

### 1.3.-Determinación de metales en sedimentos

La determinación de metales se realizó en la empresa canadiense *Actlabs*. Los metales fueron extraídos mediante una digestión con cuatro ácidos distintos (ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido perclórico y ácido nítrico). Posteriormente, la concentración de 58 metales se determinó por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

### 1.4.-Extracción de ADN total de sedimentos

El ADN total fue extraído a partir de 1 gr de sedimento, utilizando el *kit PowerMax® Soil DNA Isolation Kit*, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

## 1.5.-Análisis de diversidad microbiana de sedimentos y consorcios enriquecidos

- Amplificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S

A partir del ADN obtenido de los sedimentos y de los consorcios enriquecidos, la región V3-V4 del gen ADNr 16S fue amplificada por PCR (Polimerase Chain Reaction).

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 50  $\mu$ l, utilizando 25  $\mu$ l de la mezcla maestra PCR *Thermo Scientific Phusion Flash (Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix)*, 12.5  $\mu$ l de agua, 1.5  $\mu$ l de ADN total y 2.5  $\mu$ l de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*. Ambos con una concentración de 10  $\mu$ M (Tabla 1).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S (Illumina, Inc., 2014)

Oligonucleótido	Blanco	Secuencia
341F	Región V3 del gen ADNr 16S	5-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3
785R	Región V4 del gen ADNr 16S	5-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 25 repeticiones de los ciclos de amplificación (30 segundos a 98 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C) y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

- **Secuenciación Masiva de amplicones**

Los amplicones obtenidos por PCR, fueron purificados de banda y posteriormente secuenciados en las instalaciones de la **Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA**. Dentro del Instituto de Biotecnología UNAM, utilizando el sistema *Genome Analyzer GAIIx* de la compañía *Illumina*.

- **Análisis de las secuencias**

El análisis de las secuencias fue realizado mediante el programa *Quantitative Insights into Microbial Ecology 2* (QIIME2) (Caporaso *et al.*, 2010).

La demultiplexación inicial de las secuencias se realizó mediante el *pipeline* q2-DEMUX dentro de QIIME2. Basándonos en el análisis de calidad, las secuencias *forward* fueron truncadas a un tamaño de 260 pb y las secuencias *reverse* a 245 pb.

Posteriormente, las secuencias fueron filtradas, procesadas y se eliminaron quimeras mediante el programa DADA2 incorporado en QIIME2.

Las secuencias con un 99% de similitud fueron agrupadas en variantes de secuencias de amplicon (por sus siglas en ingles ASV), utilizando el programa DADA2. La asignación taxonómica se realizó mediante el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) utilizando, como referencia la base de datos SILVA 132.

Los análisis de diversidad *alfa* y las gráficas taxonómicas de barras apiladas se generaron utilizando las herramientas disponibles en QIIME2.

## 2.-Enriquecimiento y caracterización de consorcios hierro-reductores.

### 2.1.-Enriquecimiento de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo.

1. Fueron inoculados 2.5 ml de sedimento proveniente del sitio 1 (Figura 7) en 10 ml de medio de cultivo anaerobio citrato férrico (CF) (Lovley & Phillips, 1988). El cultivo fue suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM e incubado a 30 °C en oscuridad durante 30 días.
2. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de medio CF, suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM e incubado a 30 °C en oscuridad durante 15 días.
3. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de medio CF. Se adicionó como única fuente de carbono, petróleo crudo al 1% (petróleo mediano, proveniente de la planta petrolífera *Bacab alfa* en Campeche). El cultivo fue incubado a temperatura ambiente y en agitación durante 30 días.
3. Posteriormente, el consorcio fue preservado a -70 °C en viales anaerobios suplementados con dimetilsulfóxido al 10%.

## 2.2.-Enriquecimiento de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo y queroseno.

1. Se sembraron 200  $\mu$ l del consorcio degradador de petróleo (inciso 2.1) en 10 ml de medio CF suplementados con petróleo y queroseno (2:1) al 0.5%. Los cultivos fueron incubados a 30 °C en oscuridad durante 30 días.
2. Se sembraron 200  $\mu$ l del cultivo anterior en 10 ml de medio CF suplementados con petróleo y queroseno (2:1) al 0.5%. Los cultivos fueron incubados a 30 °C en oscuridad durante 15 días.
3. Posteriormente, el consorcio fue preservado a -70 °C en viales anaerobios suplementados con dimetilsulfóxido al 10%.

## 2.3.- Ensayo de degradación de petróleo bajo condiciones hierro-reductoras.

La capacidad de degradar hidrocarburos del consorcio descrito en el inciso 2.1, fue evaluada mediante el siguiente ensayo:

1. Un total de 25 botellas con 20 ml de medio de cultivo CF adicionado con petróleo crudo al 0.1%, fueron inoculadas con 0.4 ml del consorcio previamente incubado durante 24 horas. Los cultivos inoculados junto con 15 controles abióticos (medio de cultivo sin inóculo) fueron incubados a 30 °C en agitación a 150 rpm.
2. A los tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 días, fueron sacrificados 5 medios de cultivo inoculados con el consorcio y 3 controles abióticos (por cada tiempo), para la cuantificación y análisis de hidrocarburos totales (descripción en el inciso 2.5).



## 2.4.-Ensayo de degradación de petróleo y queroseno bajo condiciones hierro-reductoras.

La capacidad de degradar hidrocarburos del consorcio descrito en el inciso 2.2, fue evaluada mediante el siguiente ensayo:

1. En 3 botellas con 10 ml de medio de cultivo CF suplementado con una mezcla de petróleo y queroseno (2:1) al 0.5%, fueron resembrados 0.2 ml del consorcio previamente incubado durante 24 horas.
2. Los cultivos anteriores junto con 3 controles abióticos (medio de cultivo sin inóculo) fueron incubados a temperatura ambiente en oscuridad durante 18 meses.
3. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos junto con los controles fueron sacrificados para la cuantificación de hidrocarburos totales (descripción en el inciso 2.5).

## 2.5.-Análisis de hidrocarburos

- Extracción de hidrocarburos totales de medio de cultivo.
  1. Se adicionó directamente al medio de cultivo 1 volumen de diclorometano, seguido de una agitación vigorosa.
  2. Se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos y a continuación se separó la fase acuosa de la fase orgánica.
  3. Se realizó una segunda extracción a la fase acuosa repitiendo el inciso 1.

4. Los extractos obtenidos fueron filtrados a través de un embudo de vidrio con sulfato de sodio y se concentraron en viales previamente tarados.
5. El diclorometano se evaporó a temperatura ambiente y posteriormente se realizó un análisis gravimétrico y cromatográfico.

La técnica de extracción utilizada está basada en modificaciones al método de la EPA 418.1 (EPA., 1991).

- **Fraccionamiento de hidrocarburos totales**

1. Con 1 ml de hexano se precipitó y eliminó la fracción asfáltica del petróleo total y se concentró el malteno.
2. El malteno fue fraccionado utilizando una columna cromatográfica de 30 cm de longitud por 3 cm de diámetro interno. Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice previamente lavado con tres volúmenes de acetona, hexano y diclorometano. Posteriormente, fue secado y activado a 180 °C durante 20 minutos. La columna fue empacada con 7 gr de gel de sílice y coronada con 1.5 gr de sulfato de sodio anhidro.
3. La columna fue adicionada con 21 ml de hexano, cubriendo en su totalidad el gel de sílice y el sulfato de sodio.
4. El malteno fue diluido en 1 ml de hexano y posteriormente fue adicionado a la columna.
5. Para obtener las distintas fracciones de hidrocarburos, el malteno fue eluido utilizando tres volúmenes (21 ml) de cada uno de los siguientes solventes: hexano (hidrocarburos saturados), hexano: benceno 1:1 (hidrocarburos aromáticos), diclorometano (resinas no ácidas), metanol (resinas ácidas) y cloroformo (remanentes en la columna).

6. Cada fracción eluida fue evaporada a presión reducida.
7. La concentración de cada fracción se determinó por gravimetría y cromatografía de gases.

El fraccionamiento se llevó a cabo según lo descrito por (Machin-Ramirez *et al.*, 2008).

- **Análisis de hidrocarburos mediante cromatografía de gases**
  1. Las muestras de petróleo total o fracción fueron disueltas en 1 ml de diclorometano.
  2. Se inyectó 1  $\mu$ l de la solución anterior de manera automatizada en un cromatógrafo de gases (*Hewlett-Packard* modelo HP-5890) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de goma HP-metil-silicio.
  3. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 29 ml/min.
  4. La temperatura inicial fue de 90 °C con un gradiente inicial de 2 °C/min hasta llegar a la temperatura de 150 °C. El inyector se mantuvo a una temperatura de 270°C.
  5. El segundo gradiente fue de 150 a 280 °C, con un aumento de 10 °C/min. La temperatura del detector fue de 300 °C.
  6. Los espectros cromatográficos obtenidos, fueron alineados y analizados con la librería *GCalignR* para el *software R* y mediante el programa *OpenChrom*<sup>®</sup>.

- Identificación de hidrocarburos alifáticos

La identificación de hidrocarburos alifáticos se realizó integrando las áreas de los espectros obtenidos por cromatografía de gases (GS-FID) contra el estándar de 18 componentes *Aliphatics Fractionation Check Mix* (marca RESTEK), (Wang *et al.*, 1994). La comparación de los tiempos de retención e integración de las áreas, se realizó utilizando la librería *GCalignR* para el *software R* y el programa *OpenChrom*<sup>®</sup>.

## 2.6.- Medición de reducción de Fe(III)

La capacidad de los consorcios de reducir Fe(III) en medio CF fue evaluada indirectamente cuantificando la generación de Fe(II) por el método colorimétrico de la ferrozina (Stookey., 1970).

- Elaboración de una curva patrón

1. Se elaboraron soluciones *stock* de sulfato de hierro etilendiamonio a diferentes concentraciones (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, y 40 Mm) en HCl al 0.5N.
2. Cada una de las soluciones *stock* fueron diluidas 1:50 en HCl al 0.5N, quedando a una concentración final de 0.02 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM y 0.8 mM.
3. Se tomaron 50  $\mu$ l de las soluciones anteriores y se diluyeron en 2.450  $\mu$ l de solución de Ferrozina (Ferozina 2 mM en HEPES 50 mM).
4. El cambio de color en la solución de ferrozina fue medida utilizando un espectrofotómetro a una absorbancia de 562 nm. Con los resultados obtenidos se elaboró una curva patrón.

- Ensayos de reducción de Fe(III)
  1. Los consorcios enriquecidos fueron inoculados por triplicado en medios de cultivo CF, suplementados con el hidrocarburo predeterminado durante el ensayo (inciso 2.3 y 2.4).
  2. Se colectaron 100  $\mu$ l de muestra de los consorcios a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas), utilizando una estación de gaseo, con la finalidad de evitar la contaminación de los cultivos con oxígeno.
  3. Los 100  $\mu$ l de cultivo colectados en cada tiempo fueron digeridos en 900  $\mu$ l de HCl al 0.5N durante 15 min.
  4. 50  $\mu$ l de la solución digerida, fue diluida en 2.45 ml de solución de Ferrozina.
  5. El cambio de color en la solución de ferrozina fue medida utilizando un espectrofotómetro a una absorbancia de 562 nm. Con los resultados obtenidos, se calculó la concentración total de Fe(II) utilizando la curva patrón previamente elaborada (Inciso 6.1).

## 2.7.-Cuantificación de citrato y acetato

Se evaluó el consumo de citrato y la subsecuente generación y degradación de acetato en medio CF por parte de los consorcios enriquecidos. La cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (por sus siglas en inglés *HPLC*), utilizando una columna *Aminex* HPX-87H de 300 x 7.8 mm. Como fase móvil se utilizó ácido sulfúrico al 0.01 N, a un flujo de 0.6 ml/min a temperatura ambiente.

- Ensayo de consumo de citrato y acetato
  1. El consorcio enriquecido fue inoculado por triplicado en medio de cultivo CF suplementado con petróleo crudo al 0.1%, como se describe en el inciso 2.3.
  2. Se colectaron 500  $\mu$ l de los cultivos inoculados con el consorcio a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas, así como a los 15, 30, 60 y 90 días), utilizando una estación de gaseo para evitar la contaminación de los cultivos con oxígeno.
  3. Las muestras colectadas fueron centrifugadas a 10000 X G, y posteriormente, el sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de 0.2 mm.
  4. Se inyectaron 200  $\mu$ l de las muestras anteriores en el *HPLC* de manera automatizada, con las condiciones previamente descritas en el inciso 2.7.

## 2.8.-Extracción de ADN total de consorcios microbianos hierro-reductores.

La extracción de ADN, se realizó a partir de una pastilla de células obtenida de la centrifugación a 10000 X G de 5 ml de medio de cultivo. Se utilizó el kit *PowerMax® Soil DNA Isolation Kit*, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

## 2.9.-Análisis de diversidad microbiana de consorcios hierro-reductores

La metodología empleada para el análisis de diversidad microbiana de los consorcios enriquecidos se describe detalladamente en el inciso 4.

### 3.-Enriquecimiento de consorcios sulfato-reductores degradadores de hidrocarburos

#### 3.1.-Enriquecimiento de consorcios bacterianos sulfato-reductores

1. Fueron inoculados con 2.5 ml de sedimento de cada sitio muestreado, 10 ml de los cultivos Manganeso (Mn) (Lovley & Phillips., 1988), citrato de sodio (CNa) (Schwarz, & Oesterhelt, 1985) y medio mínimo para el crecimiento de shewanella (Sh) (Tang *et al.*, 2006).

Todos los cultivos fueron suplementados con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM e incubados a temperatura ambiente durante 1 año.

2. Los cultivos anteriores fueron resembrados a medio marino sulfato-reductor (MMS) (Widdel & Bak., 1992). Se tomaron 200 µl de los cultivos incubados durante 1 año y se inocularon en 10 ml de MMS, suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente en presencia de luz solar durante 30 días.
3. Se resembraron 200 µl de los cultivos anteriores a 10 ml de MMS, adicionados con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente en presencia de luz solar durante 20 días.

4. De los cultivos anteriores, fueron seleccionados aquellos que presentaron un mayor crecimiento y se resembraron por triplicado en medio de cultivo MMS, cada replica fue adicionada con un diferente tipo de petróleo (extra ligero, ligero y mediano). Todos los cultivos fueron suplementados con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM e incubados a temperatura ambiente en presencia de luz solar durante 30 días.
5. Los consorcios enriquecidos fueron almacenados a -70 °C en viales anaerobios al 10% de dimetilsulfóxido.

### 3.2.-Extracción de ADN de consorcios sulfato-reductores

La extracción de ADN se realizó utilizando el *MasterPure™ DNA Purification Kit* (marca Epicentre), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

### 3.3.-Análisis de diversidad microbiana de consorcios sulfato-reductores

La metodología referente al análisis de diversidad microbiana de los consorcios enriquecidos se describe detalladamente en el inciso 1.5.



## 4.-Enriquecimiento, aislamiento e identificación de *Desulfuromonas palmitatis*

### 4.1.-Enriquecimiento de *Desulfuromonas palmitatis*

1. Se inocularon 2.5 ml de sedimento proveniente del sitio 2 en 10 ml de medio de cultivo manganeso (Mn) suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. El cultivo fue incubado a temperatura ambiente durante 1 año.
2. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de medio marino sulfato-reductor (MMS), suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. El cultivo fue incubado a temperatura ambiente en presencia de luz solar durante 30 días
3. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de MMS suplementado con lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. El cultivo fue incubado a 30 °C en oscuridad durante 15 días
4. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de MMS suplementado con petróleo extra ligero al 0.1% como única fuente de carbono. El cultivo fue incubado a 30 °C en oscuridad durante 3 meses.
5. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de MMS, sin cloruro de sodio, suplementado con petróleo extra ligero al 0.1%, lactato y acetato de sodio a una concentración final de 20 mM. El cultivo fue incubado a 30°C en oscuridad durante 15 días.
6. Se resembraron 200 µl del cultivo anterior en 10 ml de medio NBAF (Coppi *et al.*, 2001), adicionado con lactato a una concentración final de 20 mM.

#### 4.2.-Aislamiento de *Desulfuromonas palmitatis*

1. El consorcio enriquecido en medio de cultivo NBAF (inciso 5.1), fue resembrado en NBAF sólido al 2.5% de *Bacto*®Agar en botellas anaerobias selladas herméticamente. Los cultivos fueron incubados a 30 °C en oscuridad durante 15 días.
2. Se seleccionaron colonias bacterianas aisladas con fenotipo rosa y se realizaron diluciones seriadas 1X10, 1X100, 1X1000 y 1X10000. Cada dilución fue sembrada en NBAF sólido al 2.5% de *Bacto*®Agar dentro de una cámara anaeróbica marca *ThermoForma* modelo 1025.
3. Una vez observada una sola morfología, las colonias bacterianas fueron resembradas a medio NBAF líquido para su posterior identificación.

#### 4.3.-Extracción de ADN de *Desulfuromonas palmitatis*

La extracción de ADN se realizó a partir del cultivo descrito en el inciso 5.2, utilizando el *MasterPure*™ DNA Purification Kit (marca Epicentre), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

#### 4.4.-Identificación de *Desulfuromonas palmitatis*

- Amplificación del gen ADNr 16S

La identificación se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen completo ADNr 16S a partir del ADN obtenido del aislado (véase en inciso 5.3).

El gen fue amplificado por PCR. Todas las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 50  $\mu$ l, utilizando 25  $\mu$ l de la mezcla maestra *Thermo Scientific Phusion Flash*, 12.5  $\mu$ l de agua, 1.5  $\mu$ l de ADN total y 2.5  $\mu$ l de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*. Ambos con una concentración de 10  $\mu$ M (Tabla 2).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen completo ADNr 16S

Oligonucleótido	Blanco	Secuencia
27F	ADNr 16S	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	ADNr 16S	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Las condiciones de la PCR, consistieron en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, 25 repeticiones de los ciclos de amplificación (30 segundos a 98 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C) y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

- Generación de clonas del gen ADN<sub>r</sub> 16S
  1. Los fragmentos obtenidos por *PCR* fueron ligados en el vector *pJET1.2* utilizando el *Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit* siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.
  2. Los productos de la ligación fueron electroporados en células electrocompetentes de *Escherichia coli* cepa *xlblue*.
  3. En una celda de electroporación se colocaron 5 µl de la ligación junto con 50 µl de las células electrocompetentes. Las células fueron electroporadas con un pulso de 1.8 V.
  4. Las células transformadas fueron suspendidas en 1 ml de medio de cultivo *Luria-Bertani* (LB) y posteriormente incubadas a 37 °C durante 1 hora.
  5. Se inocularon 20 µl del cultivo anterior en placas de medio sólido LB suplementados con ampicilina (200 ug/ml), las placas fueron incubadas a 37 °C durante 12 horas.
  6. Las colonias obtenidas fueron resembradas en medio LB líquido suplementado con ampicilina (200 ug/ml) y posteriormente incubadas 37 °C durante 12 horas.
  7. Se realizó la extracción ADN plasmídico utilizando el *Hig Pure Plasmid Isolation Kit* de *Roche* siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

- Secuenciación de clonas del gen ADNr 16S

Las clonas del gen ADNr 16S fueron secuenciadas en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando un secuenciador *Perkin Elmer (Applied Biosystems)*, por el método *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence – Based Sequencing*.

- Identificación de secuencias

A partir de los datos obtenidos de la secuenciación (Apéndice 4.3.3), fueron comparadas nuestras secuencias con aquellas depositadas en la base de datos *Genbank*, a través de un alineamiento básico local y herramientas de búsqueda (BLAST) disponible *online* de forma gratuita en la página del Centro Nacional Estadounidense para la información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/>).

Posteriormente, se seleccionaron las secuencias con mayor identidad y cobertura. Las secuencias seleccionadas fueron alineadas contra las secuencias obtenidas del aislado por medio del programa *ClustalW*.

Se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético mediante el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud, realizando un “*bootstrap*” de 1000 réplicas. La distancia de las réplicas fue calculada por medio del modelo Kimura 2 parámetros.

# RESULTADOS

En los siguientes apartados se describen y discuten los resultados obtenidos en el presente trabajo. Debido a su temática, los resultados fueron divididos en 5 temas, los cuales se presentan en los siguientes incisos junto con la discusión correspondiente a cada uno de ellos.

## Tema 1: Análisis de sedimentos del Río Coatzacoalcos

### **Muestreo en el Río Coatzacoalcos**

Se colectaron muestras de sedimentos de tres sitios distintos de la zona más cercana al derrame ocurrido en diciembre del año 2011 (**S1**, **S2** y **S3**); esto con la finalidad de analizar la composición de los sedimentos del Río Coatzacoalcos (Figura 7).

Por cada sitio, se obtuvieron 50 gr de sedimento para el análisis de los hidrocarburos totales, la composición de metales y el análisis de diversidad microbiana (descripción del muestreo en metodología inciso 1).

## **Hidrocarburos totales en sedimentos del Río Coatzacoalcos**

Se determinó la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en los sedimentos de los tres sitios muestreados (Figura 7), (descripción en metodología inciso 1.2). La concentración de HTP de cada sitio se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración de HTP en sedimentos del Río Coatzacoalcos

<b>HTP (ppm)</b>	
<b>Sitio1</b>	<b>500.21</b>
<b>Sitio2</b>	<b>21.8</b>
<b>Sitio3</b>	<b>73.5</b>

## **Metales pesados en sedimento del Río Coatzacoalcos**

Fue determinada la concentración de 58 metales distintos en sedimentos de los tres sitios muestreados (Figura 7), (descripción en metodología inciso 1.3). La concentración total de los metales analizados se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Concentración de metales en sedimentos del Río Coatzacoalcos

Elemento	B	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	Cd	V	Cr	Mn	Fe	Hf	Ni	Er	Be	Ho	Hg	Ag	Lu
Unidad	Ppm	Ppm	%	%	%	%	%	ppm	Ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Límite de detección	1	0.5	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1	1	0.5	1	0.01	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1	10	0.05	0.1
Sitio 1	< 1	10	0.85	0.16	3.57	2	0.37	< 0.1	34	40.8	300	2.42	1	10	0.7	0.4	0.2	120	0.09	< 0.1
Sitio 2	< 1	26.1	1.02	0.81	7.47	2.04	0.54	0.1	65	53.4	562	3.01	2	27.2	1.6	0.9	0.6	120	0.05	0.2
Sitio 3	< 1	24.9	0.99	0.68	6.58	1.87	0.47	< 0.1	61	67.8	358	2.89	1.8	25.4	1.4	0.8	0.5	120	0.06	0.2

Elemento	Ga	As	Rb	Y	Zr	Nb	Mo	In	Sn	Sb	Te	Ba	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Gd	Tb
Unidad	Ppm	Ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Límite de detección	0.1	0.1	0.2	0.1	1	0.1	0.05	0.1	1	0.1	0.1	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sitio 1	4.9	3.8	42.7	8.6	44	11.7	2.24	< 0.1	1	0.5	< 0.1	521	8.8	26.8	2.9	14.2	2.6	1.3	0.2
Sitio 2	13.2	1.8	62.9	19.7	96	12.7	1.92	< 0.1	2	0.7	< 0.1	397	16.6	51.2	5.9	30	5.5	3	0.6
Sitio 3	13.7	1.8	61.4	17.7	81	12.8	1.62	< 0.1	2	0.8	< 0.1	157	15.5	46.9	5.5	27.3	5.1	2.7	0.5

Elemento	Ta	Sr	W	Re	Tl	Pb	Th	U	Cs	Co	Eu	Bi	Se	Zn	Dy	Cu	Ge	Tm	Yb
Unidad	Ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Límite de detección	0.1	0.2	0.1	0.001	0.05	0.5	0.1	0.1	0.05	0.1	0.05	0.02	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
Sitio 1	0.6	111	0.4	0.002	0.27	9.3	2.7	0.8	0.65	4.5	0.51	0.09	0.3	36.4	1.1	19	< 0.1	0.1	0.8
Sitio 2	0.7	115	0.7	0.002	0.46	17.1	5	1.5	2.28	10.5	1.04	0.23	0.5	78.7	2.6	32.7	< 0.1	0.2	1.8
Sitio 3	0.7	105	0.8	0.003	0.48	12.8	4.7	1.7	2.14	8.9	0.96	0.17	0.5	72.5	2.4	28.8	< 0.1	0.2	1.6



## Diversidad microbiana en sedimentos de los sitios muestreados

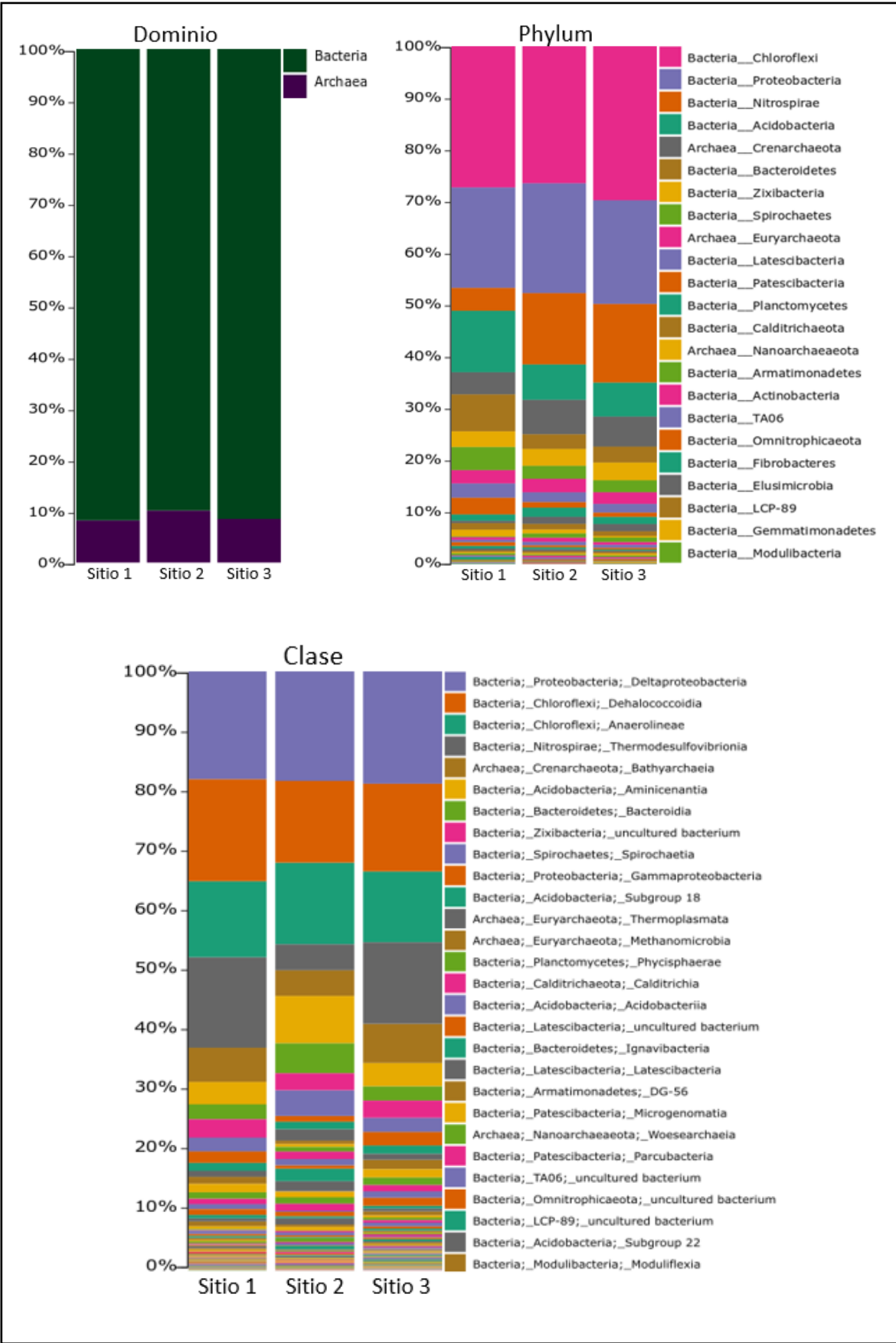
La diversidad microbiana de los sedimentos del Río Coatzacoalcos, fue analizada a través de la amplificación e identificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S (véase en metodología inciso 1.5).

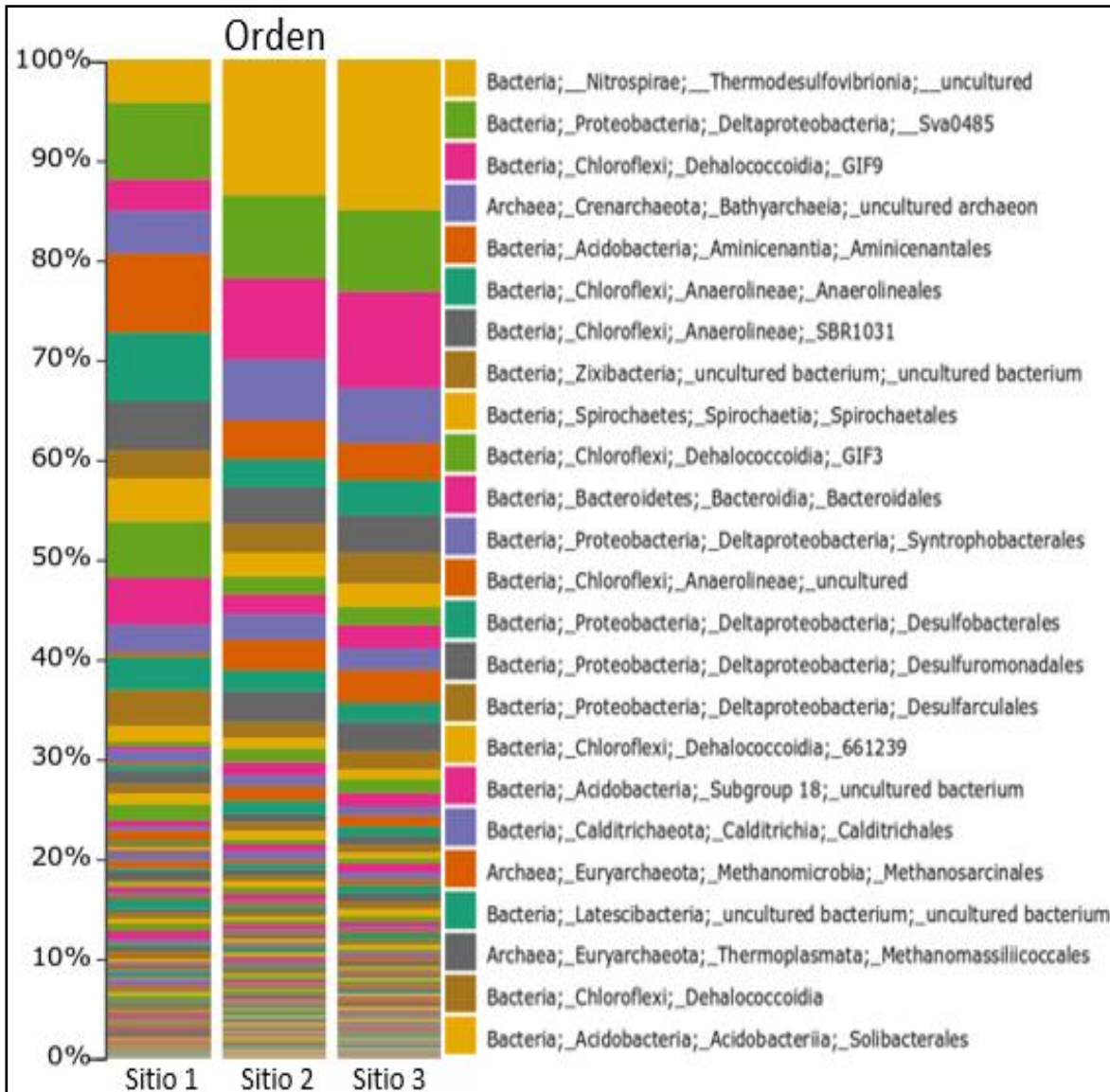
El total de lecturas obtenidas del análisis de secuencias, así como la diversidad *alfa* de cada sitio, se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Número de lecturas y diversidad *alfa* de sedimentos del Río Coatzacoalcos

	Total de lecturas	Diversidad $\alpha$
Sitio 1	11308	8.4372
Sitio 2	18230	8.8833
Sitio 3	15569	8.5708

En general, la composición microbiana de los tres sitios fue similar. En promedio, el 91% de las secuencias perteneció al dominio bacteria y el 9% al dominio arquea (Figura 8, Tabla 6). Se identificaron un total de 42 diferentes *phyla*, 35 pertenecientes al dominio bacteria y 7 al dominio arquea (Figura 8). En la Figura 8, se observan los grupos microbianos más abundantes en los tres sitios a diferentes niveles taxonómicos (Dominio, *phylum*, clase y orden). Mientras que, en la Tabla 6, se muestran los taxones con lecturas mayores al 2% del total de secuencias asignadas y su metabolismo principal en ambientes contaminados. Los porcentajes mostrados en la tabla, representan los valores máximos y mínimos de lecturas identificadas para cada taxón en los tres sitios.





**Figura 8.** Diversidad microbiana encontrada en los sedimentos de los sitios 1, 2 y 3 a diferentes niveles taxonómicos (Dominio, *Phylum*, Clase y Orden), representada mediante gráficas de barras a piladas.

**Tabla 6.** Diversidad microbiana encontrada en los sedimentos del Río Coatzacoalcos a diferentes niveles taxonómicos. Los porcentajes mostrados en la tabla representan los valores máximos y mínimos de lecturas identificadas para cada taxón en los tres sitios.

Dominio	Phylum	Clase	Orden	Metabolismo
Bacteria (91%)	<i>Chloroflexi</i> (26 al 30%)	<i>Dehalococcoidia</i> (13-17%)	Bacterias no cultivables	Degradadores de compuestos halogenados (Biderre-Petit <i>et al.</i> , 2016)
		<i>Anaerolineae</i> (12-13.6%)	Secuencias no asignadas	Degradadores de hidrocarburos (Liang, 2015)
	<i>Proteobacteria</i> (19-21%)	<i>Deltaproteobacteria</i> (18-19%),	<i>Syntrophobacterales</i> (2-3%)	Degradadores de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas (Vigneron <i>et al.</i> , 2017; Rabus <i>et al.</i> , 2016)
			<i>Desulfobacterales</i> (2-3.5%)	Metiladores de mercurio y degradadores de hidrocarburos aromáticos (Vigneron <i>et al.</i> , 2017; Macalady <i>et al.</i> , 2000)
			<i>Desulfuromonadales</i> (2-3%)	Metiladores de mercurio y degradadores de compuestos aromáticos (Kerin <i>et al.</i> , 2006; Zwolinski <i>et al.</i> , 2000)
			<i>Desulfarculales</i> (2-4%)	Sulfato-reductora implicada en procesos metanogénicos (An <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Nitrospira</i> (4-15%)	<i>Thermodesulfovibronia</i> (4-15%)	Bacterias no cultivables	-----
	<i>Acidobacteria</i> (6-11%)	<i>Aminicenantia</i> (3-8%)	<i>Aminicenantales</i> (3-7%)	Bacterias degradadoras de organoclorados (Xu <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Bacteroidetes</i> (3-7%)	<i>Bacteroidia</i> (2-5%)	<i>Bacteroidales</i> (2-5%)	Fermentadores involucrados en la degradación de hidrocarburos (Rabus <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Spirochaetes</i> (2-4%)	<i>Spirochaetia</i> (2-4%)	<i>Spirochaetales</i> (2-4.5%)	Fermentadores involucrados en la degradación de hidrocarburos (Rabus <i>et al.</i> , 2016)
Arquea (9%)	<i>Crenarchaeota</i> (4-6.6%)	<i>Bathyarchaeia</i> (4-6.5%)	Bacterias no cultivables	Algunos representantes metanogénicos (Evans <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Euryarchaeota</i> (2-2.2%)	<i>Methanomicrobia</i> (0.5-1.5%)	<i>Methanosarcinales</i> (0.5-1.5%)	Linaje de organismos metanogénicos (Fournier & Gogarten., 2008)
		<i>Thermoplasmata</i> (1-2%)	<i>Methanomassiliicoccales</i> (1-1.5%)	Linaje de rganismos metanogénicos (Lino <i>et al.</i> , 2013)

## Discusión

Mediante el análisis de los sedimentos del Río Coatzacoalcos, se pudo constatar que la concentración más alta de hidrocarburos en los tres sitios muestreados, fue la proveniente del sitio 1 (Tabla 3). No existe actualmente una norma que establezca límites permisibles de hidrocarburos en sedimentos, sin embargo, la concentración de hidrocarburos totales en el sitio 1 (500 ppm) superó el límite máximo permisible de hidrocarburos para suelos de uso agrícola y residencial según la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Limite permisible de hidrocarburos en suelo, según la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003

Uso de suelo		
Agrícola	Residencial	Industrial
200 ppm	200 ppm	5000 ppm

A través del análisis de diversidad, se observó la presencia de microorganismos con potencial en la degradación de distintos contaminantes (Tabla 6). Posiblemente relacionados con los altos niveles de hidrocarburos en la zona. Los *phyla* mayor representados fueron *Chloroflexi* y *Proteobacteria*, las sumas de las lecturas de ambos *phyla* representaron del 45 al 51% del total de secuencias asignadas (Figura 8, Tabla 6).

Dentro del *phylum Chloroflexi* las clases *Dehalococcoidia* (abundancia del 13 al 17% del total de secuencias asignadas) y *Anaerolineae* (12-13.6%) fueron predominantes (Tabla 6). Su abundancia puede estar relacionada con la presencia de compuestos halogenados e hidrocarburos en los sedimentos, ya que todas las bacterias cultivadas pertenecientes al grupo *Dehalococcoidia* son

respiradoras obligadas de compuestos halogenados (Biderre-Petit *et al.*, 2016). Mientras que bacterias pertenecientes a la clase *Anaerolineae*, están involucradas en procesos de degradación anaerobia de hidrocarburos en reservorios de petróleo y ambientes contaminados (Liang., 2015).

Dentro del *phylum Proteobacteria* (19-21%), la clase *Deltaproteobacteria* fue la más abundante (18-19%) (Tabla 6). Se ha observado la prevaencia de este grupo en ambientes contaminados con hidrocarburos (Mbadinga *et al.*, 2011). A su vez, análisis de diversidad de emanaciones naturales de petróleo, han mostrado que la principal degradación de hidrocarburos de alto peso molecular es realizada por este linaje (Vishnivetskaya *et al.*, 2011).

Dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, los ordenes *Desulfuromonadales* (2-3%), *Desulfobacterales* (2-3.5%) y *Syntrophobacterales*(2-3%) fueron los más representativos (Tabla 6).

Distintos microorganismos pertenecientes al orden *Desulfuromonadales* tienen la capacidad o han sido asociados en procesos de degradación de hidrocarburos en ambientes anóxicos (*Geobacter*, *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa* y *Pelobacter*) (Zwolinski *et al.* 2000). A su vez, se ha observado que miembros de los linajes *Desulfobacterales* y *Syntrophobacterales*, son los principales degradadores de hidrocarburos aromáticos en emanaciones naturales de petróleo y junto con el orden *Desulfuromonadales*, participan en la oxidación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas, a través de la activación inicial de los hidrocarburos y en su conversión a productos de fermentación (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y/o Acetato) (Vigneron *et al.*, 2017; Rabus *et al.*, 2016; Rotaru *et al.*, 2014). La degradación de hidrocarburos acoplada a procesos metanogénicos, contribuye a la eliminación de petróleo en ambientes anóxicos. Este proceso

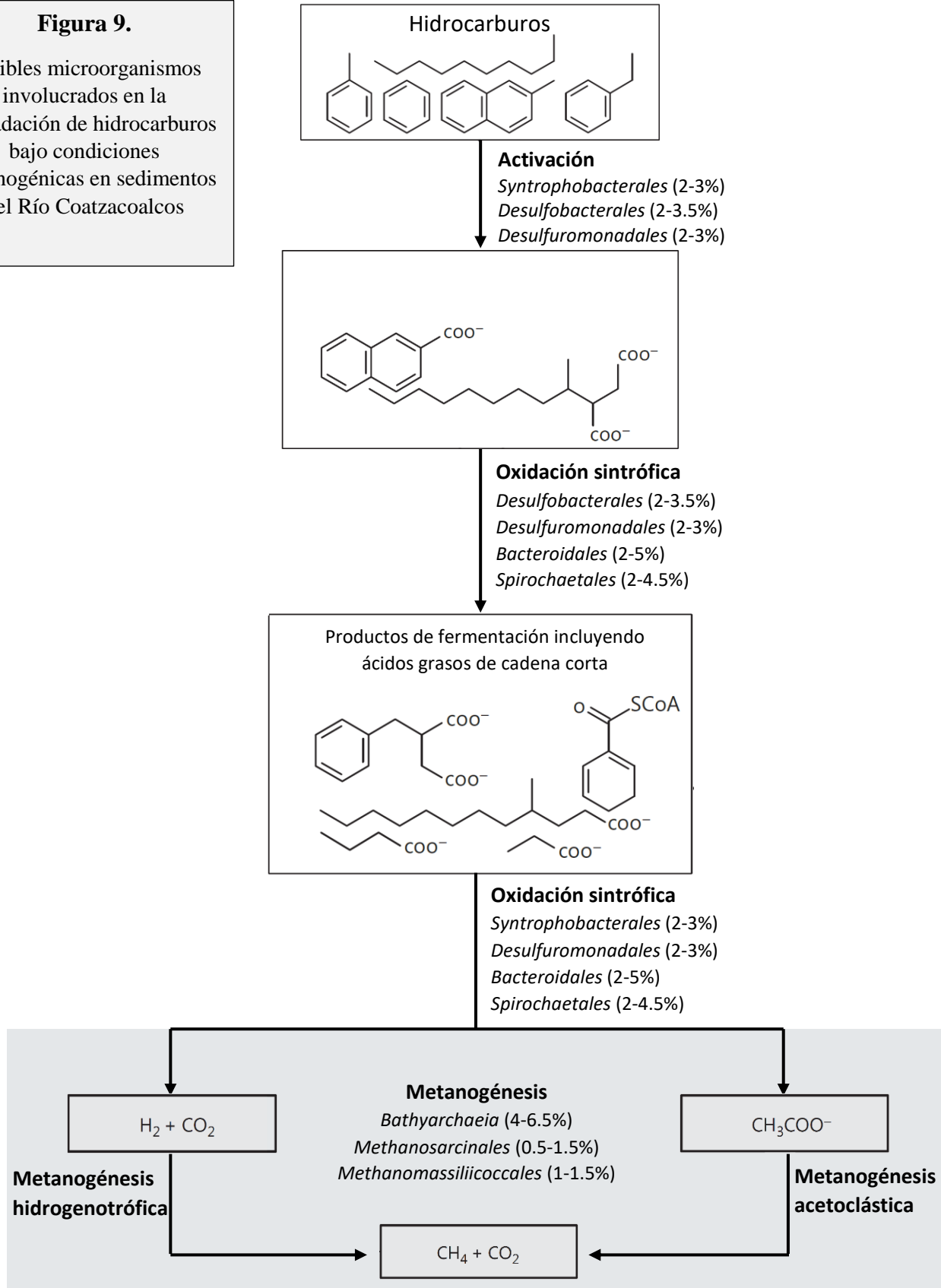
ocurre mediante una serie de pasos que requiere estrechas relaciones sintróficas entre arqueas metanógenas y bacterias fermentadoras (Zengler *et al.*, 1999).

En los sedimentos fueron identificados grupos de arqueas metanogénicas de los ordenes *Methanosarcinales* (0.5-1.5%), *Methanomassiliicoccales* (1-1.5%) y la clase *Bathyarchaeia* (4-6.6%) (Tabla 6). Distintos microorganismos de estos grupos, están involucrados en la mineralización de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas y han sido identificados en depósitos petroleros, emanaciones naturales de hidrocarburos y acuíferos contaminados (Liu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017; Magot *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2005; Dojka *et al.*, 1998).

Por otra parte, fueron identificados los órdenes *Bacteroidales* (3-5%) y *Spirochatales* (2-4.5%), ambos grupos son organismos fermentadores que pueden encontrarse en sintrofia con arqueas metanogénicas (Rabus *et al.*, 2016). Las bacterias fermentadoras pueden transformar a los hidrocarburos en sustrato para la metanogénesis hidrogenotrófica ( $H_2 + CO_2$ ) o acetoclástica (acetato) (Gieg *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2016). En la Figura 9, se muestra un esquema general de los posibles microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas en los sedimentos muestreados.

**Figura 9.**

Posibles microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas en sedimentos del Río Coatzacoalcos





Por otra parte, mediante el análisis mineralógico se observó que la composición de los sedimentos en los tres sitios fue similar (Tabla 4). La concentración de la mayoría de los metales se encontró por debajo del límite máximo permisible para metales pesados en lodos y biosólidos según la NOM-004-SEMARNAT-2002. No obstante, la concentración de mercurio en los tres sitios (120 ppm) superó el límite establecido por la norma (57 ppm). Aunado a esto, fueron identificados los órdenes *Desulfobacterales* (2-3.5%), *Syntrophobacterales* (2-3%), *Desulfarculales* (2-4%), *Desulfuromonadales* (2-3%), *Methanosarcinales* (0.5-1.5%) y *Methanomassiliicoccales* (1-1.5%) (Tabla 6). Todos ellos son grupos microbianos con la capacidad de metilar mercurio aumentando su solubilidad lipídica y toxicidad (Kerin *et al.*, 2016; Gilmour *et al.*, 2018).

El mercurio es un contaminante de gran preocupación a nivel mundial debido a su toxicidad, movilidad y persistencia (Feng *et al.*, 2009). Este metal es bioacumulable en peces y fauna marina, generando graves problemas en el humano debido a su biomagnificación. El mercurio en humanos puede generar, pérdida de memoria, Alzheimer, déficit de atención, hipoestesia, disartria, ataxia, disrupción del sistema motor, disminución de la fertilidad, deterioro de la audición y visión, disminución de la fuerza muscular, alteraciones en el sistema cardiovascular, disminución de la inmunidad general del cuerpo, exacerbación de enfermedades autoinmunes como el lupus, esclerosis múltiple y tiroiditis, estrés oxidativo y daño mitocondrial, entre otros trastornos (Zahir *et al.*, 2005).

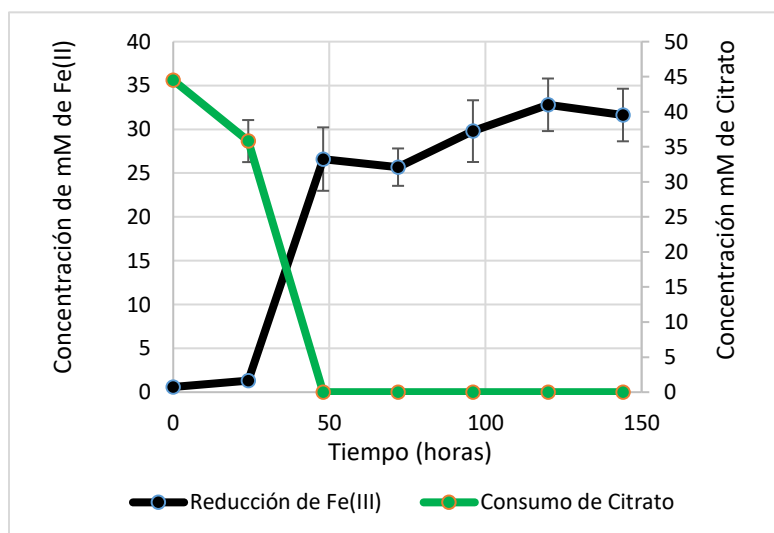
Las altas concentraciones de mercurio en la cuenca baja del Río Coatzacoalcos se deben principalmente a la petroquímica Pajaritos, la cual pone en grave riesgo a la población de comunidades aledañas, así como a la flora y fauna de la zona (IPEN Mercury-Free Campaign Report).

## Tema 2: Enriquecimiento y caracterización de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo

A partir de los sedimentos provenientes del sitio 1 (Figura 7), fue enriquecido un consorcio hierro-reductor degradador de hidrocarburos en medio Citrato Férrico (CF) (Fe(III) 50 mM) (Lovley & Phillips., 1988) (véase en metodología inciso 2.1).

El consorcio fue caracterizado en medio CF al 0.1% de petróleo crudo. El medio de cultivo contiene citrato como fuente de carbono y Fe(III) como aceptor final de electrones, por lo tanto, se decidió observar su consumo mediante un ensayo de degradación de citrato y reducción Fe(III) (descripción del ensayo en metodología inciso 2.6 y 2.7).

El consorcio oxidó 35 mM de citrato a través de la reducción de 40 mM de Fe(III) a las 48 horas de incubación (Figura 10). Como subproducto de la degradación de citrato se generó acetato, el cual fue consumido en su totalidad después de 60 días de incubación.



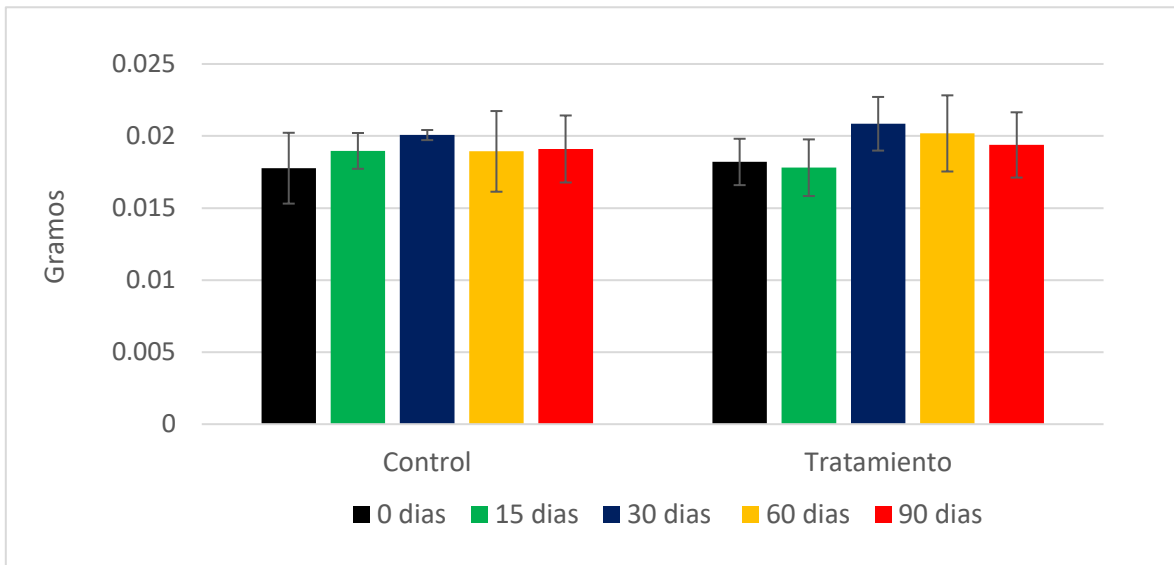
**Figura 10.** Oxidación de citrato acoplado a la reducción de Fe(III) por parte del consorcio enriquecido durante el ensayo de degradación de hidrocarburos.

Fue evaluada la capacidad del consorcio para degradar hidrocarburos en un periodo de 90 días. El ensayo consistió en 5 réplicas del consorcio y 3 controles abióticos incubados a 30 °C en medio CF, suplementando al 0.1% de petróleo crudo. La degradación de hidrocarburos por parte del consorcio fue estimada por gravimetría y cromatografía de gases a los 0, 15, 30, 60 y 90 días (descripción del ensayo inciso 2.3)

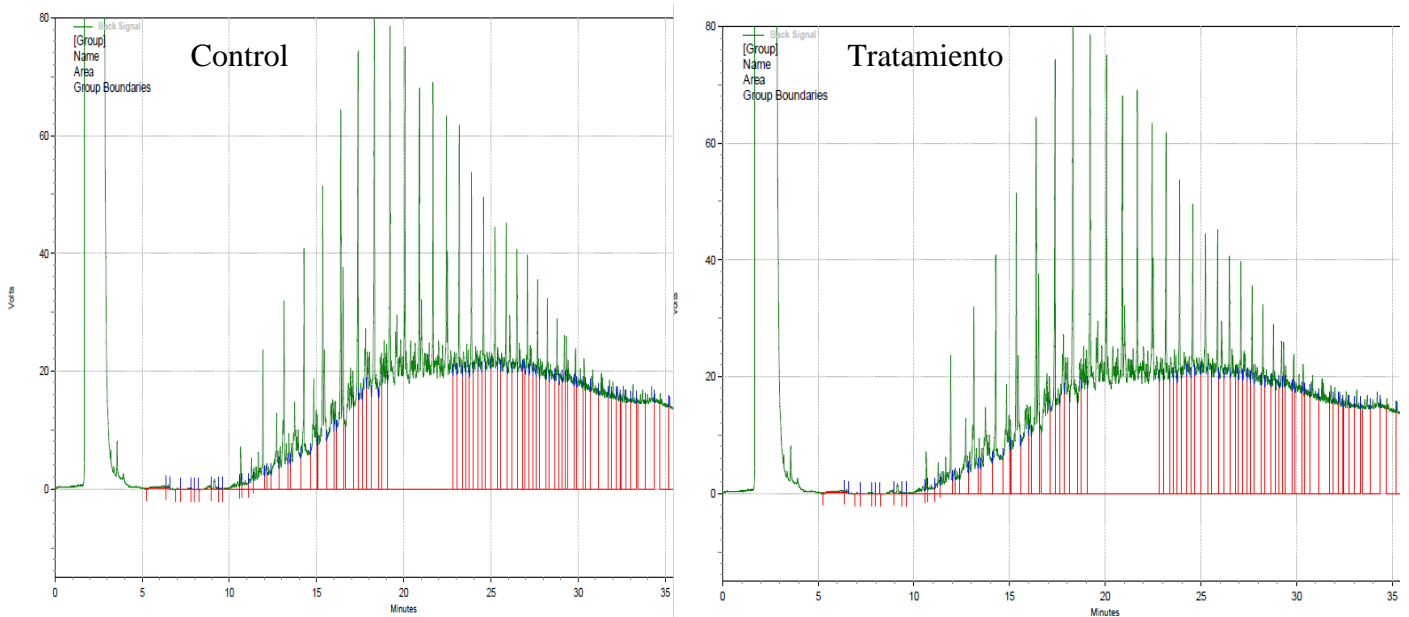
Pasados 30 días de incubación, visualmente se apreció una disminución del petróleo suspendido en el cultivo (Figura 11). Sin embargo, en el análisis gravimétrico y cromatográfico no se observó una diferencia significativa en la concentración de los hidrocarburos totales a los 15, 30, 60 y 90 días incubación (Figuras 12 y 13) (descripción del análisis en metodología inciso 2.5).



**Figura 11.** Medios de cultivo CF adicionados con petróleo crudo. De lado izquierdo se muestra un medio de cultivo sin inóculo incubado durante 30 días a 30 °C, de lado derecho se muestra un cultivo inoculado con el consorcio enriquecido e incubado durante 30 días a 30 °C, en el que se observó la precipitación del Fe(III) y la aparente eliminación del petróleo crudo.



**Figura 12.** Análisis gravimétrico de hidrocarburos totales a los distintos tiempos (0, 15 días, 30 días, 60 días y 90 días) de la cinética de degradación de petróleo.



**Figura 13.** Cromatogramas obtenidos del petróleo crudo tratado con el consorcio durante 3 meses y un control abiótico incubado en las mismas condiciones.

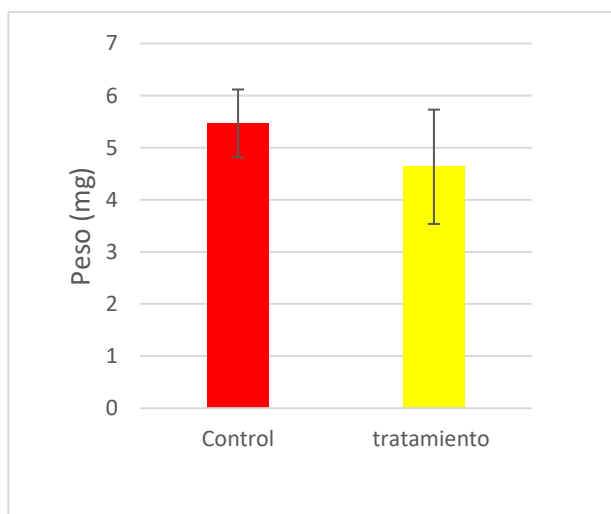
## Fraccionamiento de hidrocarburos totales

Con la finalidad de realizar un análisis a mayor profundidad del petróleo crudo, se decidió fraccionar el hidrocarburo tratado a lo largo de 90 días y tres controles abióticos (detalles del fraccionamiento en metodología inciso 2.5).

Por cada muestra se obtuvieron 5 fracciones distintas del petróleo. La fracción 1 está constituida por hidrocarburos alifáticos, la fracción 2 por hidrocarburos aromáticos, la fracción 3 por resinas no ácidas, la fracción 4 por resinas ácidas y la fracción 5 por residuos remanentes en la columna. Todas las fracciones fueron analizadas por gravimetría y cromatografía de gases. Los resultados del análisis son descritos a continuación:

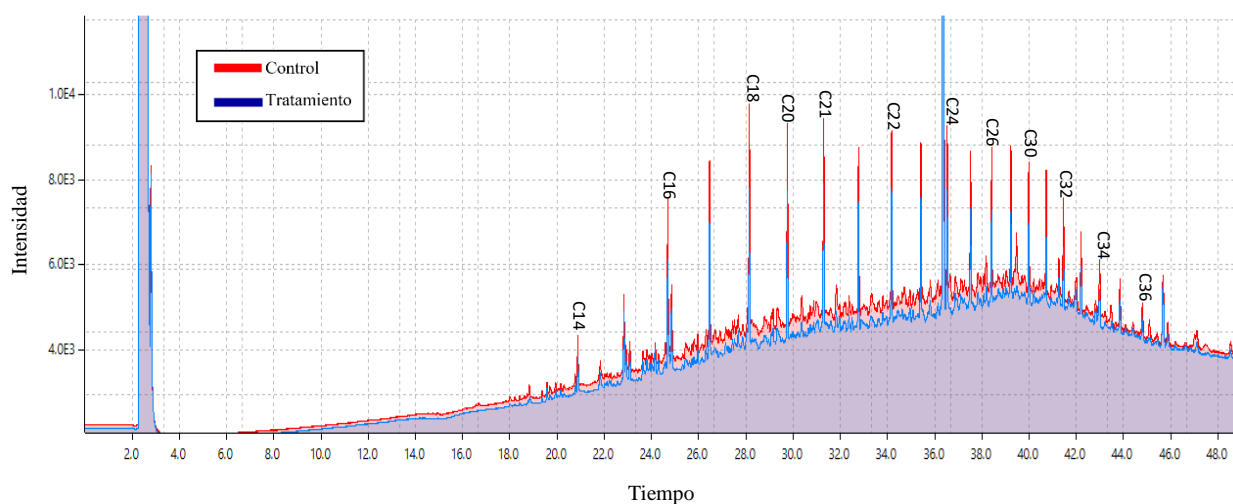
- **Fracción 1: hidrocarburos alifáticos**

Mediante el análisis gravimétrico de la fracción alifática del petróleo, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de hidrocarburos de las muestras tratadas vs los controles abióticos (Figura 14) (descripción del análisis en metodología inciso 2.5).



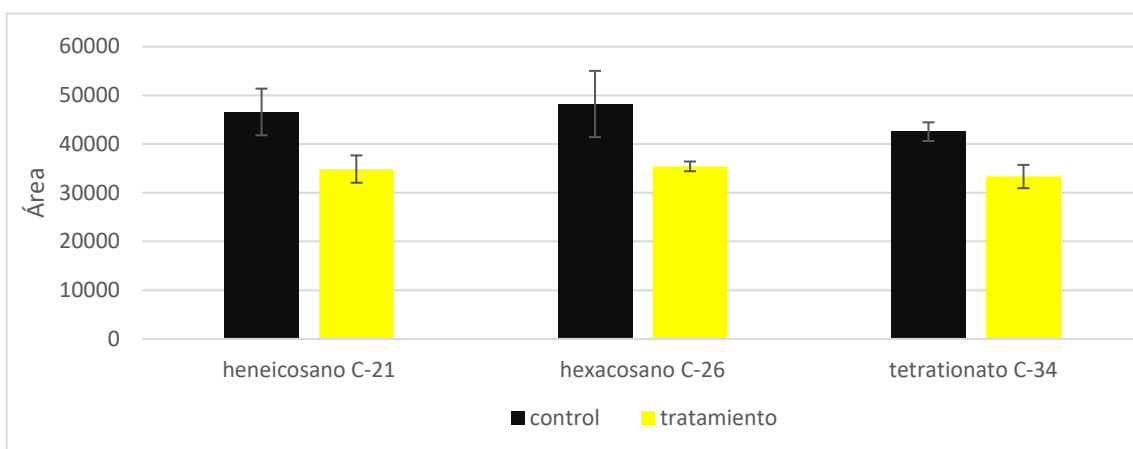
**Figura 14.** Análisis gravimétrico de la fracción alifática

A través del análisis cromatográfico se detectaron 102 hidrocarburos distintos, de los cuales 13 fueron identificados (tetradecano C-14, hexadecano C-16, octadecano C-18, eicosano C-20, heneicosano C-21, docosano C-22, tetracosano C-24, hexacosano C-26, triacontano C-30, dotriacontano C-32, tetratationato C-34, hexatriacontano C-36) (Figura 15), utilizando estándares externos (descripción de la identificación de hidrocarburos alifáticos en metodología inciso 2.5).



**Figura 15.** Espectros cromatográfico de la fracción alifática. En color azul se muestra el cromatograma del petróleo tratados durante 3 meses con el consorcio enriquecido. En color rojo se muestra el espectro del control abiótico incubado durante el mismo tiempo. Los caracteres C14 a C36 indican el número de carbonos de cada hidrocarburo alifático identificado.

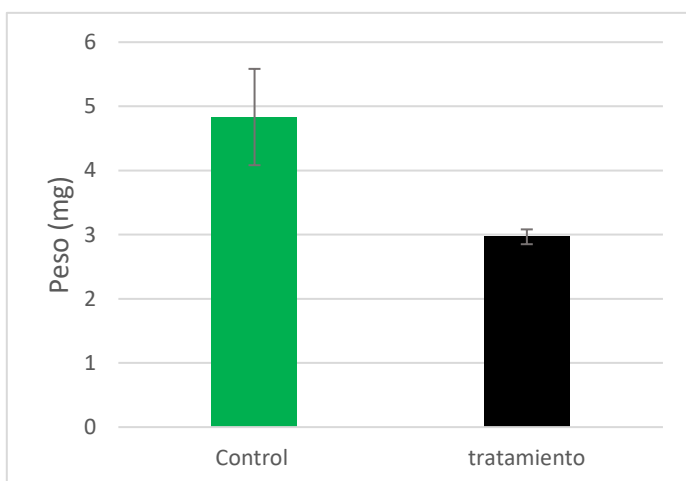
En el análisis de los hidrocarburos identificados, se observó una tendencia a la baja en las concentraciones de heneicosano, hexacosano y tetratationato (Figura 16), sin embargo, estadísticamente no existe una diferencia significativa entre las muestras tratadas vs los controles abióticos (prueba t de student,  $\alpha= 0.05$ , análisis realizado en el programa STATGRAPHICS 18).



**Figura 16.** Área bajo la curva de heneicosano, hexacosano y tetracionato obtenida del espectro cromatográfico de la fracción alifática de los controles abióticos y las muestras tratadas durante 3 meses.

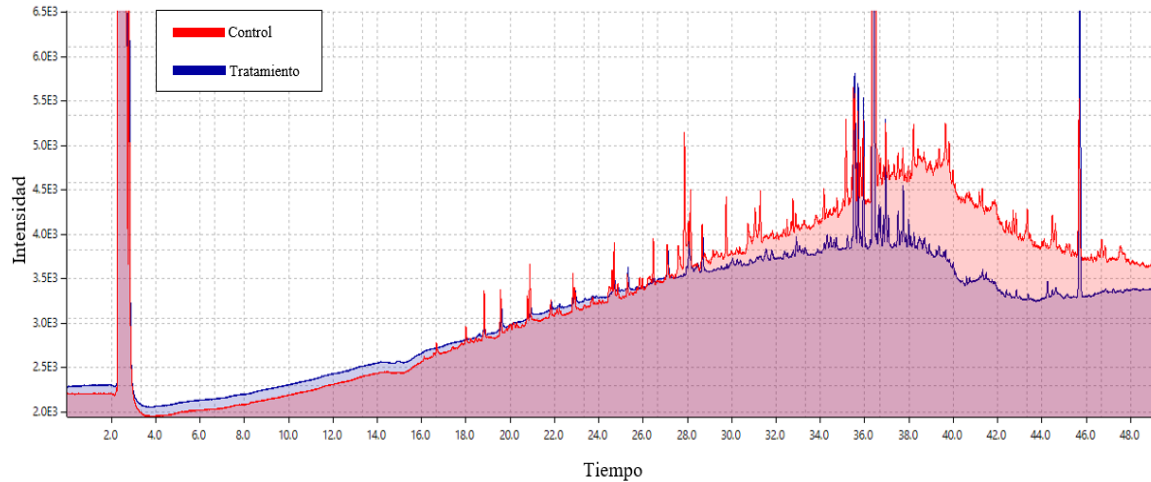
- **Fracción 2: hidrocarburos aromáticos**

En el análisis gravimétrico de la fracción aromática se observó la disminución significativa del 37% del peso total de las muestras tratadas vs los controles abióticos (Figura 17) (prueba t de student  $\alpha= 0.05$ , análisis realizado en el programa STATGRAPHICS 18). A su vez, mediante el análisis cromatográfico se identificó la eliminación de 24 de los 144 hidrocarburos aromáticos detectados entre un tiempo de retención de 30 a 42 minutos (Figuras 18 y 19).

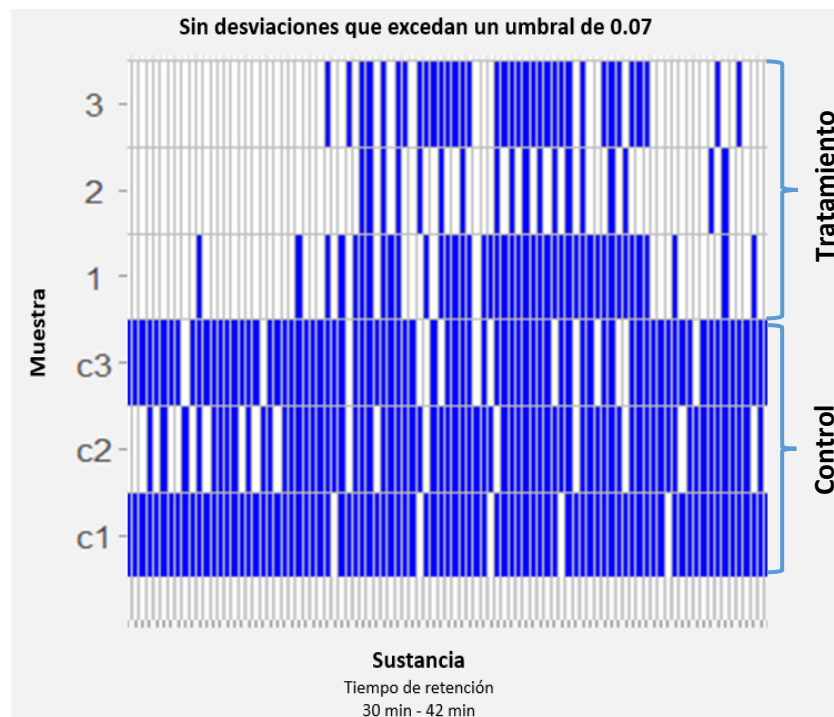


**Figura 17.**

Análisis gravimétrico de la fracción aromática.



**Figura 18.** Espectros cromatográficos de la fracción aromática. En color azul se muestra el espectro cromatográfico del petróleo tratado durante 3 meses con el consorcio enriquecido. En color rojo se muestra el espectro cromatográfico del control abiótico.

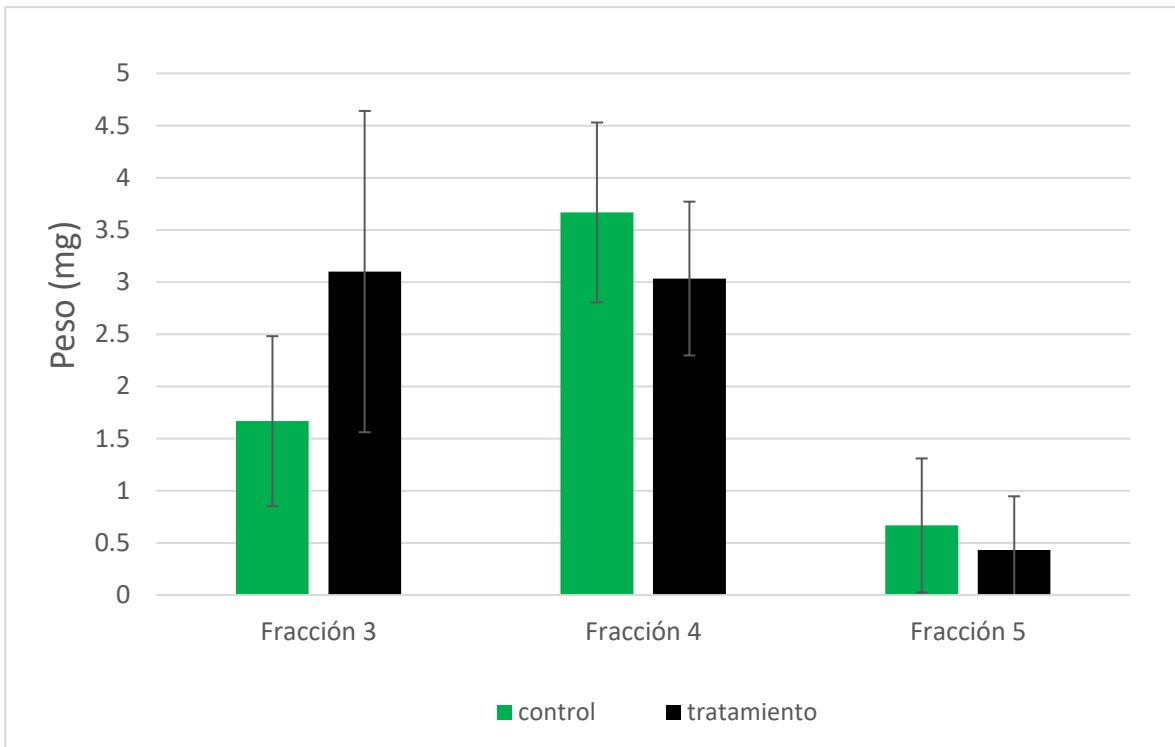


**Figura 19.** Mapa de calor obtenido del alineamiento de los cromatogramas pertenecientes a las muestras control y tratamiento de la fracción aromática. En el eje de las Y se observan las diferentes réplicas del tratamiento (1, 2 y 3) y los controles abióticos (c1, c2 y c3). En el eje de las X, se esquematizan como rectángulos las diferentes sustancias identificadas entre 30 minutos y 42 minutos de retención. Los rectángulos sombreados en color azul indican presencia, mientras que los blancos indican ausencia del compuesto.



- Fracción 3, 4 y 5

En el análisis gravimétrico no se observaron diferencias significativas en las fracciones de resinas no ácidas (fracción 3), resinas ácidas (Fracción 4) ni en los residuos remanentes en la columna (fracción 5) (Figura 20). A su vez, mediante el análisis cromatográfico no fue detectada la disminución ni la aparición de hidrocarburos específicos.



**Figura 20. A)** Análisis gravimétrico de las fracciones 3 (resinas no ácidas), 4 (resinas ácidas) y 5 (residuos remanentes en la columna), obtenidas mediante el fraccionamiento del petróleo total tratado y de los controles abióticos.

## Análisis de diversidad microbiana del consorcio hierro-reductor degradador de petróleo crudo.

Con la finalidad de conocer las comunidades microbianas enriquecidas y posiblemente involucradas en la degradación de hidrocarburos, se analizó la diversidad del consorcio al inicio (tiempo 0) y al final del ensayo (90 días) de degradación, mediante la extracción de ADN y la amplificación e identificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S (procedimiento descrito en metodología inciso 2.8 y 1.5).

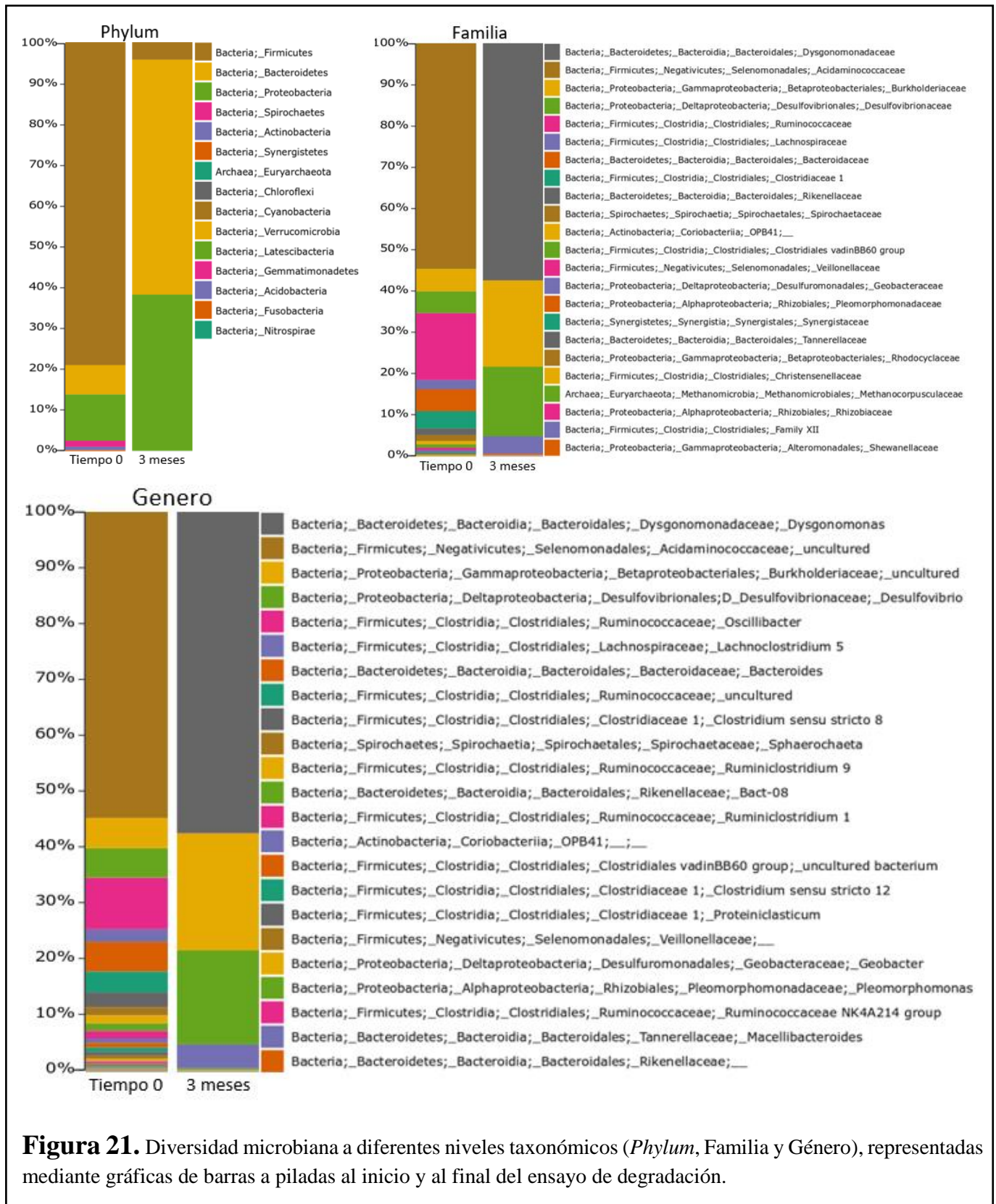
El total de lecturas obtenidas a partir del análisis de secuencias, así como la diversidad *alfa* a los diferentes tiempos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Número de lecturas y diversidad *alfa* obtenidas del consorcio enriquecido al inicio y final del ensayo de degradación de petróleo

<b>Tiempo</b>	<b>Total de lecturas</b>	<b>Diversidad <math>\alpha</math></b>
<b>Inicial</b>	36 028	3.010
<b>Final</b>	43 673	1.7547

Se observaron diferencias en la composición microbiana del consorcio al inicio y al final del ensayo. Al tiempo 0 los *phyla* mayor representados fueron *Firmicutes* (78.8%), *Proteobacteria* (11%), *Bacteroidetes* (7%), *Spirochaetes* (1.5%) y el *phylum Euryarchaeota* (0.06%) perteneciente al dominio arquea. Mientras que al final del ensayo los *phyla* más abundantes fueron *Bacteroidetes* (57.4%), *Proteobacteria* (38.16%) y *Firmicutes* (4.2%).

En la Figura 21, se observan los grupos microbianos más abundantes a diferentes niveles taxonómicos al inicio y al final del ensayo. Por otra parte, en la Tabla 9, se muestran los taxones con lecturas mayores al 1% del total de secuencias asignadas y su metabolismo principal en ambientes contaminados.



**Figura 21.** Diversidad microbiana a diferentes niveles taxonómicos (*Phylum*, Familia y Género), representadas mediante gráficas de barras a piladas al inicio y al final del ensayo de degradación.

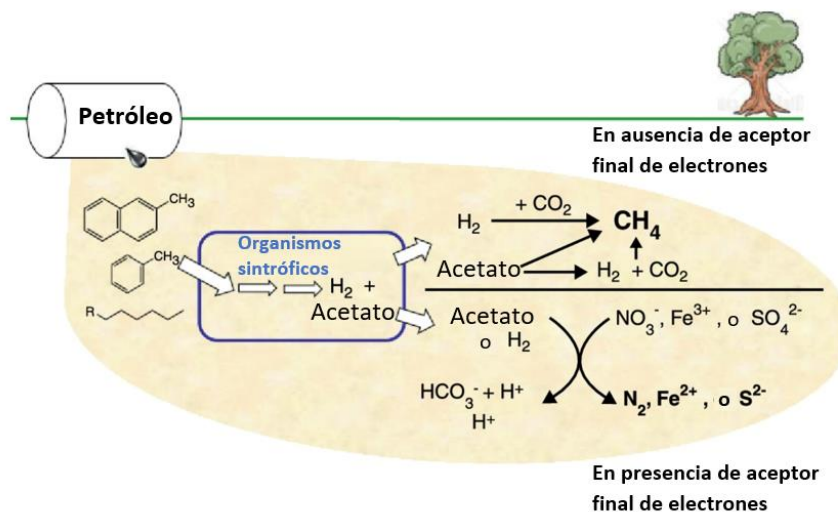
**Tabla 9.** Diversidad microbiana del consorcio al inicio y final del ensayo de degradación de petróleo. Los porcentajes mostrados en la tabla representan la proporción de lecturas identificado de cada linaje.

<b>Tiempo</b>	<b>Dominio</b>	<b>Phylum</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Actividad</b>
Inicial	Bacteria (99.93%)	<i>Firmicutes</i> (78.8%)	<i>Acidaminococcaceae</i> (54.62%)	Secuencias no asignadas	Bacteria fermentadora (Buckel <i>et al.</i> , 1981)
			<i>Ruminococcaceae</i> (16.2%)	<i>Ruminiclostridium</i> (1.41%)	Bacteria fermentadora (Nazina <i>et al.</i> , 2018)
			<i>Lachnospiraceae</i> (2.25%)	<i>Lachnoclostridium</i> (2.232%)	Bacterias fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)
			<i>Clostridiaceae</i> (4.13%)	<i>Clostridium</i> (2.66%)	Bacterias fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)
		<i>Proteobacteria</i> (11%)	<i>Burkholderiaceae</i> (5.4%)	Secuencias no asignadas	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Castorena <i>et al.</i> , 2006)
			<i>Desulfovibrionaceae</i> (5.2%)	<i>Desulfovibrio</i> (5.26%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Miralles <i>et al.</i> , 2007)
			<i>Geobacteraceae</i> (0.41%)	<i>Geobacter</i> (0.4%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Kunapuli <i>et al.</i> , 2010)
		<i>Bacteroidetes</i> (7%)	<i>Bacteroidaceae</i> (5.33%)	<i>Bacteroides</i> (5.33%)	Bacterias fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)
			<i>Rikenellaceae</i> (1.6%)	Secuencias no asignadas	Bacterias fermentadoras (Su <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Spirochaetes</i> (1.5%)	<i>Spirochaetaceae</i> (1.5%)	<i>Sphaerochaeta</i> (1.43%)	Bacterias fermentadoras (Nakagawa <i>et al.</i> , 2012)
Aquea (0.061%)	<i>Euryarchaeota</i> (0.06%)	<i>Methanocorpusculaceae</i> (0.06%)	<i>Methanocorpusculum</i> (0.06%)	Arqueas metanógenas (Demirel <i>et al.</i> , 2008)	
Final	Bacteria (99.99%)	<i>Bacteroidetes</i> (57.4%)	<i>Dysgonomonadaceae</i> (57.4%)	<i>Dysgonomonas</i> (57.38%)	Bacterias fermentadoras (Kita <i>et al.</i> , 2015)
		<i>Proteobacteria</i> (38.16%)	<i>Burkholderiaceae</i> (21%)	Secuencias no asignadas	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Castorena <i>et al.</i> , 2006)
			<i>Desulfovibrionaceae</i> (17%)	<i>Desulfovibrio</i> (16.8%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Miralles <i>et al.</i> , 2007)
		<i>Pleomorphomonadaceae</i> (0.2%)	Secuencias no asignadas	-----	
<i>Firmicutes</i> (4.2%)	<i>Lachnospiraceae</i> (4.7%)	<i>Lachnoclostridium</i> (4.27%)	Bacterias Fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)		

## Discusión

El consorcio enriquecido tuvo la capacidad de oxidar completamente el citrato acoplado a la reducción de 45 mM de Fe(III) a las 48 horas de incubación en medio CF (Figura 10). La reducción total del hierro en el medio de cultivo, pudo haber limitado la degradación de hidrocarburos debido a la ausencia de un aceptor final de electrones. Sin embargo, después de 90 días de incubación se observó un descenso del 37% en la concentración de compuestos aromáticos y la eliminación total de 24 de estos hidrocarburos (Figura 17 y 19).

La falta de un aceptor final de electrones, posiblemente fue compensada con la atmósfera de CO<sub>2</sub> presente en el cultivo CF (Lovley & Phillips., 1988), ya que arqueas del género *Methanocorpusculum* identificadas en el consorcio (Tabla 9), pueden respirar CO<sub>2</sub> mediante metanogénesis (Figura 9) (Demirel et al., 2008). La degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas, es un proceso que puede contribuir a la mineralización de estos compuestos cuando aceptores finales de electrones como el Fe(III) son limitados (Figura 22) (Jiménez et al., 2016).



**Figura 22.** Principales aceptores de electrones en ambientes anóxicos involucrados en la degradación de hidrocarburos (Gieg *et al.*, 2014)

Como se mencionó anteriormente, la degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas ocurre mediante una serie de pasos que requiere estrechas relaciones sintróficas entre bacterias fermentadoras y arqueas metanogénicas (Zengler *et al.*, 1999). Dentro del consorcio, fueron identificados los géneros *Bacteroides* (5.3%), *Clostridium* (2.6%), *Lachnoclostridium* (2.2%) y *Desulfovibrio* (16.8%) (Tabla 9). Todos ellos son grupos bacterianos fermentadores involucrados en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas (Fuertez *et al.*, 2018; Meyer *et al.*, 2013).

Por otra parte, fueron identificados los géneros *Geobacter* (0.4%), *Desulfovibrio* (16.8%) y la familia *Burkholderiaceae* (21%), todos ellos relacionados con la degradación de hidrocarburos bajo condiciones anóxicas (Zhang *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2013; Miralles *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 1996).

Bacterias del género *Geobacter*, pueden oxidar completamente distintos hidrocarburos aromáticos y son consideradas las principales degradadoras de estos compuestos en ambientes hierro-reductores (Kunapuli *et al.*, 2010). Aunado a esto, se ha observado que miembros de este linaje pueden transferir directamente electrones a organismos metanogénicos (Rotaru *et al.*, 2014;).

Es posible que bacterias del género *Geobacter* sean las responsables de la oxidación de hidrocarburos aromáticos en los tiempos iniciales del ensayo mediante la reducción de Fe(III) y posteriormente a través de la transferencia de electrones a miembros del género *Methanocorpusculum*. Esto explicaría la ausencia de degradación en la fracción alifática, debido a que actualmente no existen reportes de que *Geobacter* degrade alcanos. Además, la degradación de hidrocarburos alifáticos bajo condiciones hierro-reductoras no ha sido reportada (Kunapuli *et al.*, 2010; Mbadanga *et al.*, 2011).

La baja abundancia de los géneros *Geobacter* y *Methanocorpusculum* puede deberse a la variación de las poblaciones microbianas en el consorcio (Figura 21, Tabla 9), por lo tanto, será necesario realizar un análisis de diversidad a diferentes tiempos.

Al final del ensayo, se observó un enriquecimiento del género *Desulfovibrio* (del 5.6% al 16.8% del total de secuencias asignadas) y de la familia *Burkholderiaceae* (del 5.4% al 21%) (Tabla 9). Representantes de ambos grupos tienen la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos policíclicos (Tanase *et al.*, 2013; Castorena *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2013; Miralles *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 1996). El aumento de la abundancia de estos grupos, podría ser un indicativo de que la degradación de hidrocarburos comienza en los tiempos finales del ensayo, sin embargo, será necesario realizar un ensayo de mayor duración y analizar la composición microbiana junto a la degradación de hidrocarburos con la finalidad de identificar la actividad de ambos linajes.

En la Figura 23, se muestra un esquema general de los posibles microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas en el consorcio hierro-reductor.



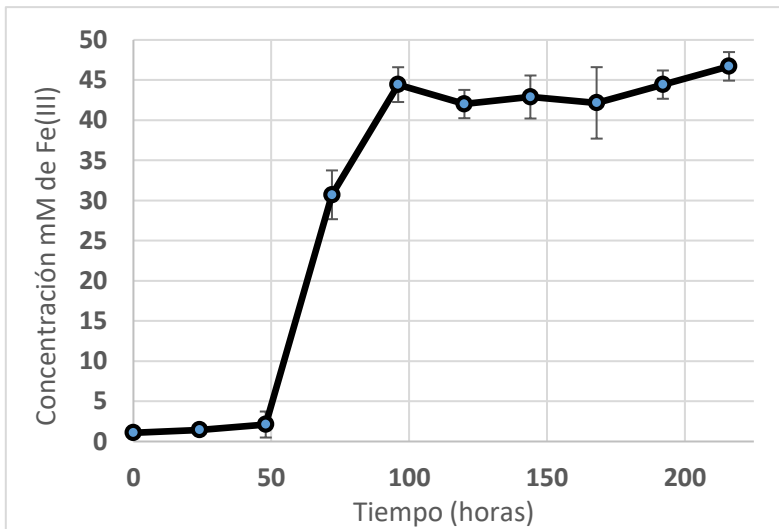
**Figura 23.** Posibles microorganismos involucrados en los diferentes pasos de degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas en el consorcio enriquecido

### Tema 3: Enriquecimiento y caracterización de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo & queroseno

A partir de sedimentos provenientes del sitio 1 (Figura 7), fue enriquecido un consorcio hierro-reductor degradador de petróleo crudo y queroseno en medio de cultivo Citrato Férrico (CF) (descripción en metodología inciso 2.2).

El consorcio fue caracterizado en medio CF, suplementado con una mezcla de petróleo crudo: queroseno 2:1 al 0.5%, durante un tiempo de incubación de 18 meses (descripción de los ensayos en metodología inciso 2.4 y 2.6). Lo anterior con la finalidad de observar una mayor degradación de hidrocarburos con respecto al consorcio descrito en el tema 2.

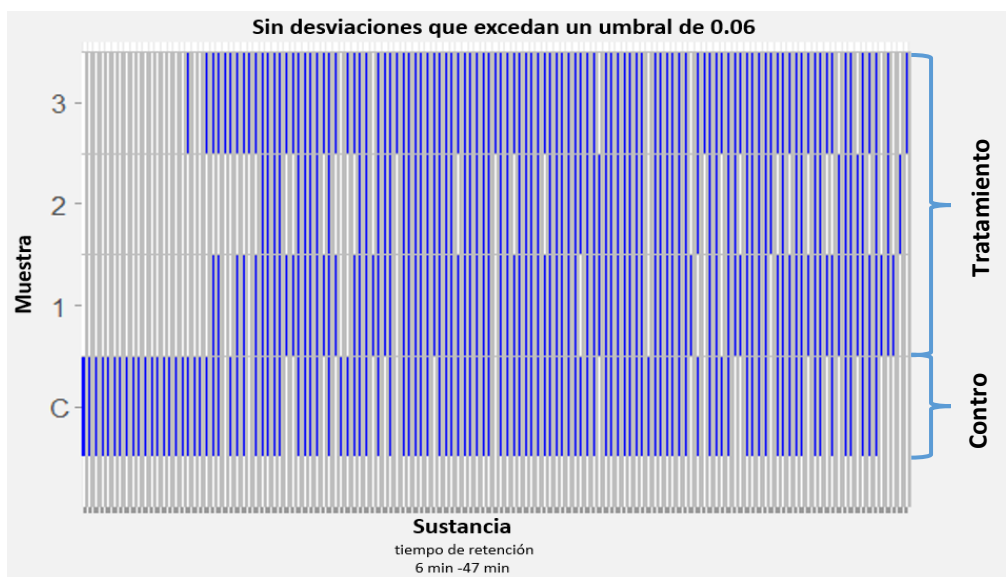
Al transcurrir 96 horas de incubación, el consorcio redujo completamente el Fe(III) presente en el cultivo (Figura 24).



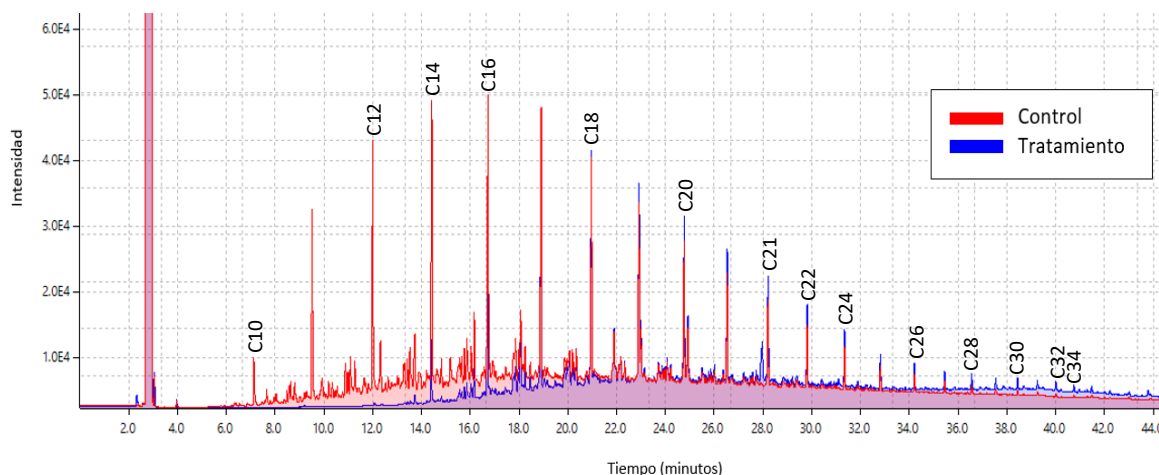
**Figura 24.**  
Reducción de Fe(III)  
por parte del consorcio  
enriquecido.



Al final del ensayo el consorcio degradó distintos hidrocarburos de la mezcla petróleo: queroseno. Mediante el análisis cromatográfico se identificaron un total de 351 compuestos, de los cuales 60 fueron degradados completamente después de 18 meses de incubación (Figuras 25 y 26).



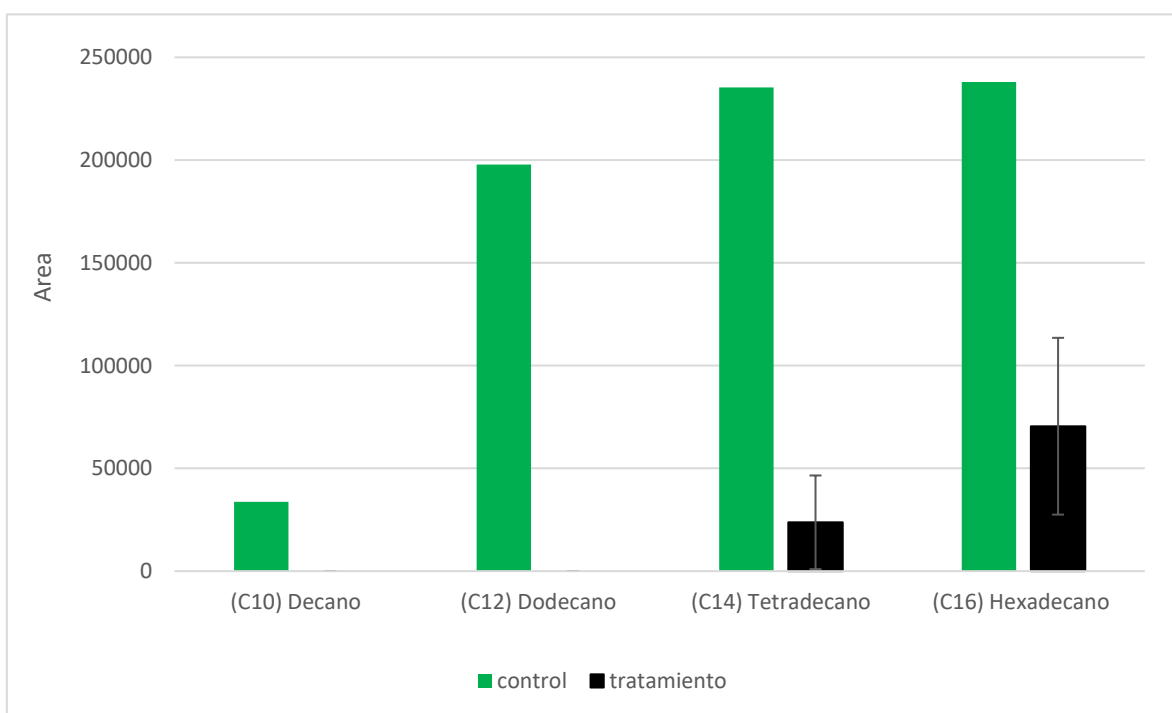
**Figura 25.** Mapa de calor obtenido del alineamiento de los cromatogramas pertenecientes a las muestras control y a los tratamientos de petróleo & queroseno. En el eje de las Y, se observan las diferentes réplicas del tratamiento (1, 2 y 3) y el control (C). En el eje de las X, se esquematizan como rectángulos las diferentes sustancias identificadas entre 6 minutos y 47 minutos de retención. Los rectángulos sombreados en color azul indican presencia, mientras que los blancos indican ausencia del compuesto.



**Figura 26.** Espectros cromatográficos de la mezcla petróleo & queroseno. En color rojo se muestra el espectro cromatográfico de un control abiótico. En color azul se muestra el espectro cromatográfico de la mezcla petróleo & queroseno tratado durante 18 meses con el consorcio. Los caracteres C10 a C34 indican el número de carbonos de cada hidrocarburo alifático identificado.

Utilizando estándares externos, fueron identificados un total de 14 hidrocarburos distintos (decano C-10, Dodecano C-12, tetradecano C-14, hexadecano C-16, octadecano C-18, eicosano C-20, heneicosano C-21, docosano C-22, tetracosano C-24, hexacosano C-26, octacosano C-28, triacontano C-30, dotriacontano C-32, tetracionato) (Figura 26), (descripción de la identificación de hidrocarburos alifáticos en metodología inciso 2.5).

En las muestras tratadas se observó la degradación total de decano y dodecano, junto a la disminución del 90% de tetradecano y el 70% de hexadecano (Figura 27).



**Figura 27.** Área bajo la curva de los hidrocarburos decano, dodecano, tetradecano y hexadecano, obtenida del espectro cromatográfico del petróleo y queroseno tratados con el consorcio durante 18 meses y sus respectivos controles abióticos.

## Análisis de diversidad microbiana de consorcio hierro-reductor degradador de petróleo & queroseno

Con la finalidad de conocer las comunidades microbianas enriquecidas y posiblemente involucradas en la degradación de hidrocarburos, se analizó la diversidad del consorcio a través de la extracción de ADN, amplificación e identificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S (procedimiento descrito en metodología inciso 2.8 y 1.5).

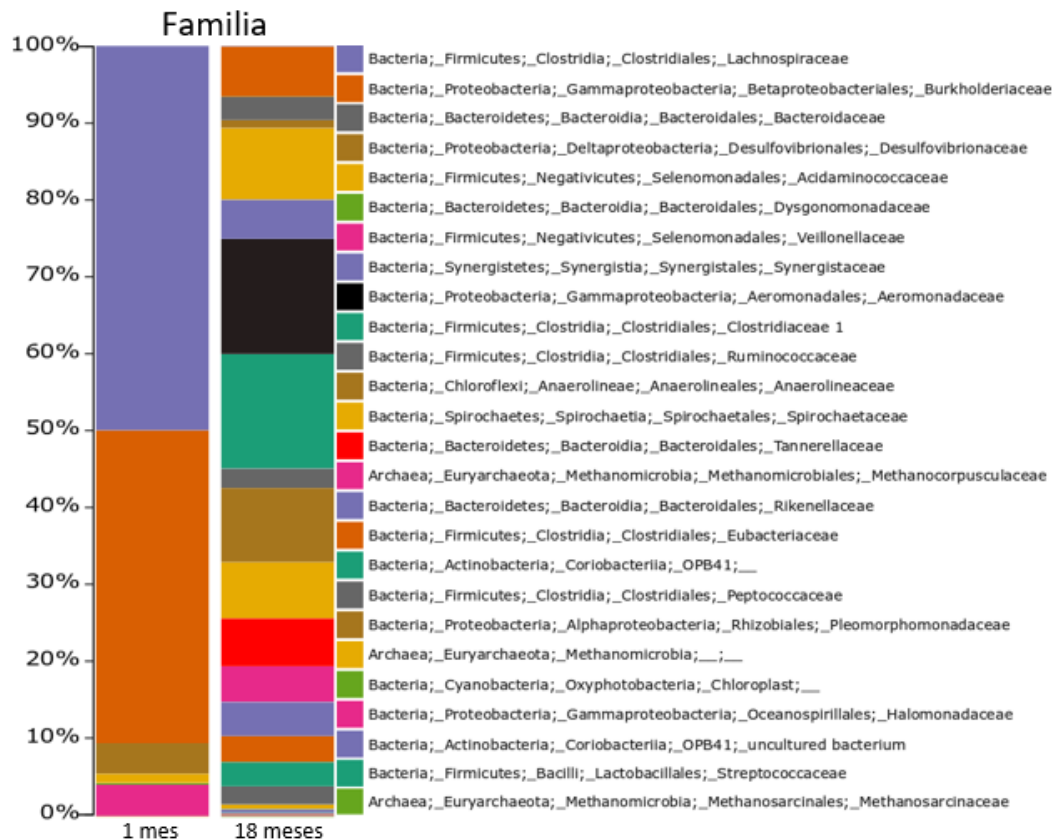
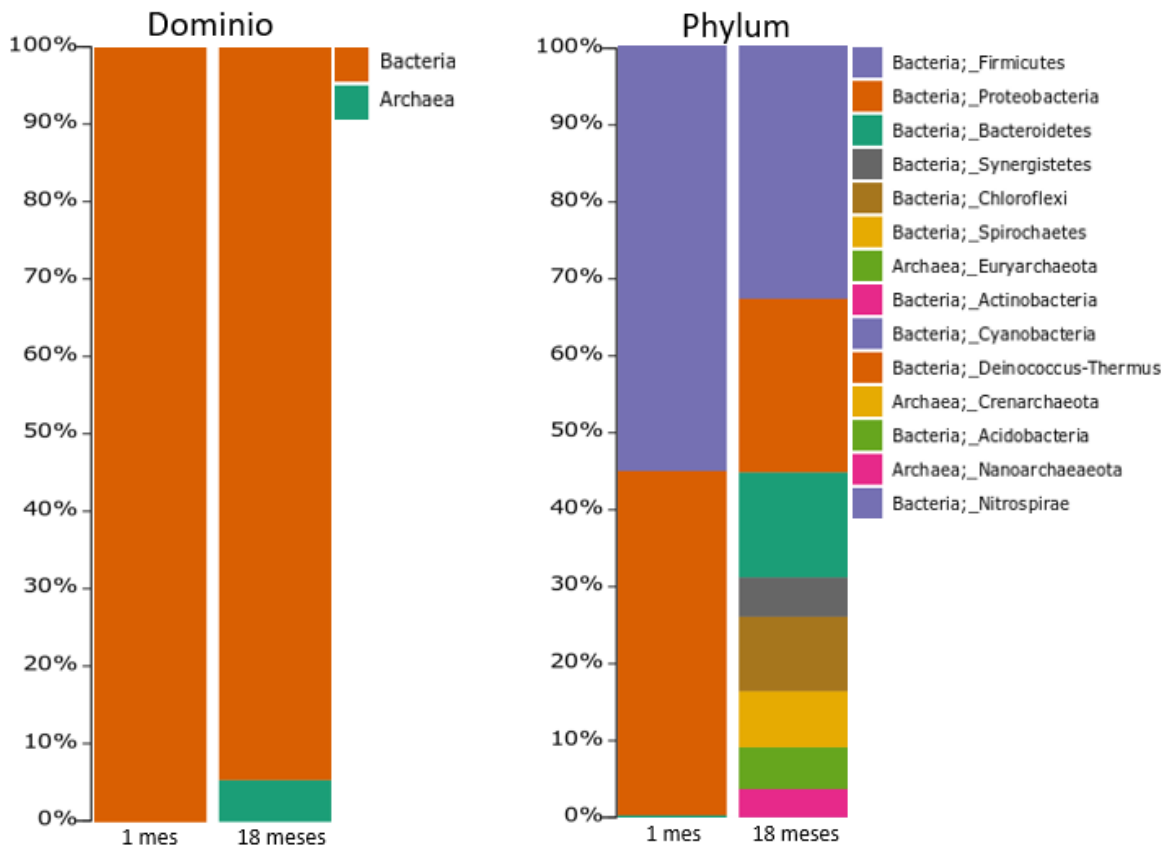
Al transcurrir 1 mes de incubación, se evaluó la composición microbiana del consorcio ya que probablemente a este tiempo el citrato es completamente degradado dejando como única fuente de carbono y energía la mezcla de petróleo: queroseno (Figura 10). Por otra parte, la diversidad microbiana fue evaluada a los 18 meses de incubación, con la finalidad de identificar a los microorganismos responsables de la degradación de hidrocarburos durante tiempos prolongados.

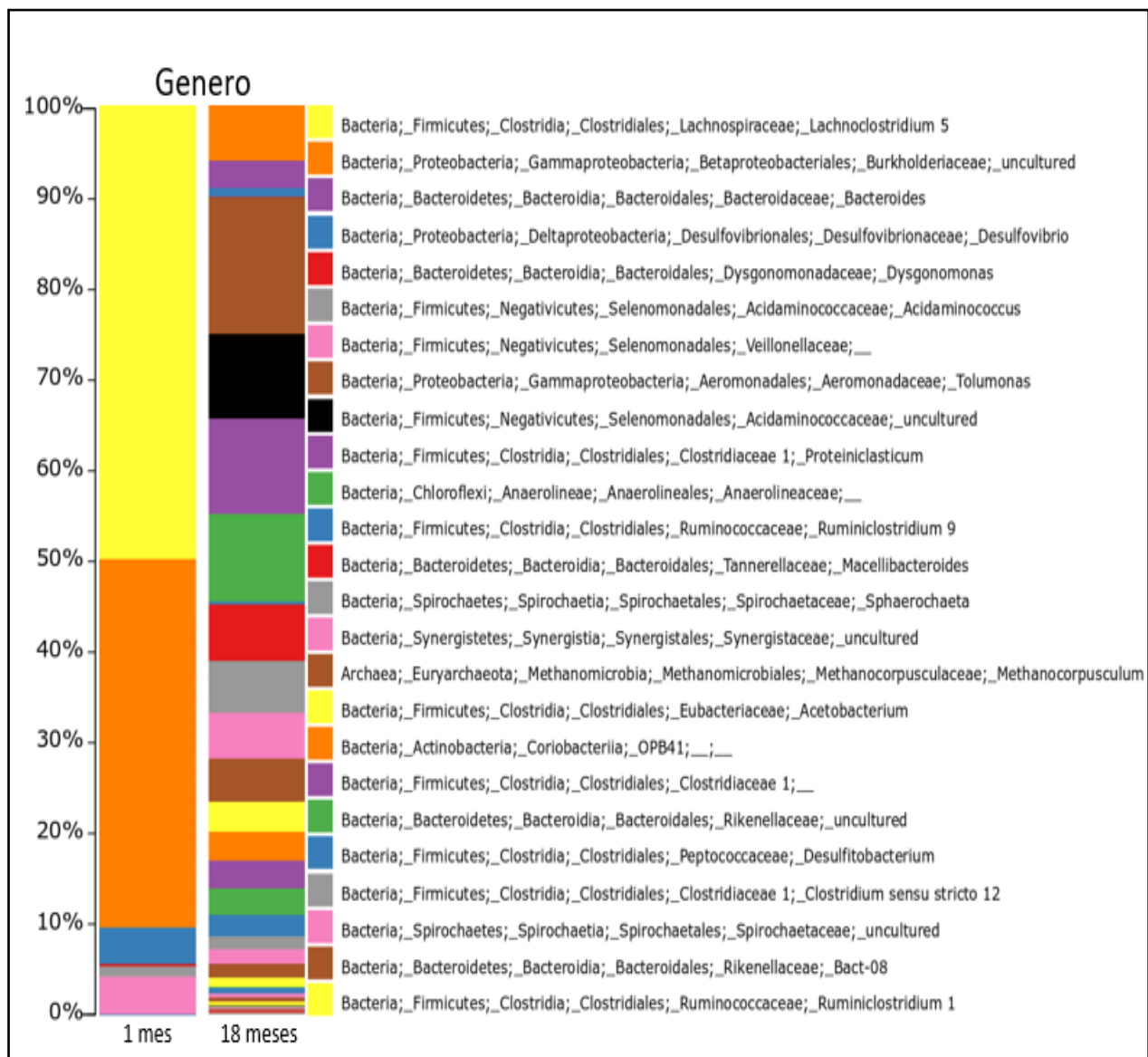
El total de lecturas obtenidas del análisis de secuencias, así como la diversidad *alfa* a los diferentes tiempos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Número de lecturas y diversidad *alfa* obtenidas del consorcio enriquecido al inicio y final del ensayo de degradación de petróleo & queroseno.

<b>Tiempo</b>	<b>Total de lecturas</b>	<b>Diversidad <math>\alpha</math></b>
<b>Inicial</b>	70560	2.4621
<b>Final</b>	40450	4.5413

En la Figura 28, se observan los grupos microbianos más abundantes a diferentes niveles taxonómicos al inicio y al final del ensayo. Mientras que, en la Tabla 11, se muestran los taxones con lecturas mayores al 1% del total de secuencias asignadas y su metabolismo principal en ambientes contaminados.





**Figura 28.** Diversidad microbiana a diferentes niveles taxonómicos (Dominio, *Phylum*, Familia y Género), representadas mediante graficas de barras a piladas a 1 mes y a 18 meses de incubación en el ensayo de degradación, representadas mediante graficas de barras a piladas.

**Tabla 11.** Diversidad microbiana del consorcio enriquecido al inicio y final del ensayo de degradación de petróleo & queroseno. Los porcentajes mostrados en la tabla representan la proporción de lecturas identificado de cada linaje.

Tiempo	Dominio	Phylum	Familia	Género	Actividad
Inicial	Bacteria (99.99%)	Firmicutes (55.1%)	Lachnospiraceae (49.87%)	Lachnoclostridium (49.87%)	Bacterias Fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)
			Veillonellaceae (4.062%)	Secuencias no asignadas	-----
			Acidaminococcaceae (1.188%)	Acidaminococcus (1.18%)	Bacteria Fermentadora (Buckel <i>et al.</i> , 1981)
		Proteobacteria (44.6%)	Burkholderiaceae (40.556%)	Bacteria no cultivable (40.55)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Castorena <i>et al.</i> , 2006)
			Desulfovibrionaceae (3.9%)	Desulfovibrio (3.9%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Miralles <i>et al.</i> , 2007)
Bacteroidetes (0.25%)	Dysgonomonadaceae (0.25%)	Dysgonomonas (0.25%)	Bacterias fermentadoras (Kita <i>et al.</i> , 2015)		
Final	Bacteria (94.5%)	Firmicutes (32.8%)	Clostridiaceae (14.89%)	Proteinielasticum (10.4%)	Bacterias proteolíticas (Zhang <i>et al.</i> , 2010)
			Acidaminococcaceae (9.323%)	Secuencias no asignadas	Bacteria Fermentadora (Buckel <i>et al.</i> , 1981)
			Eubacteriaceae (3.33%)	Acetobacterium (3.3%)	Bacterias acetogénicas (Kryachko <i>et al.</i> , 2012)
			Peptococcaceae (2.33%),	Desulfitobacterium (2.33%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Kunapuli <i>et al.</i> , 2010)
		Proteobacteria (22.4%)	Aeromonadaceae (14.9%)	Tolomonas (15%)	Bacteria generadora de tolueno (Fischer-Romero <i>et al.</i> , 1996)
			Burkholderiaceae (6.52%)	Bacterias no cultivables	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Castorena <i>et al.</i> , 2006)
			Ruminococcaceae (2.489%)	Secuencias no asignadas	Bacterias Fermentadoras (Fowler <i>et al.</i> , 2016)
			Desulfovibrionaceae (1%)	Desulfovibrio (1%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Miralles <i>et al.</i> , 2007)
		Bacteroidetes (13.6%)	Tannerellaceae (6.2%)	Macellibacterioide (6.2%)	Bacterias fermentadora (Zhang <i>et al.</i> , 2017)
			Rikenellaceae (4.42%)	Bacterias no cultivables (2%)	Bacterias Fermentadoras (Su <i>et al.</i> , 2014)
			Bacteroidaceae (3%)	Bacteroides (3%)	Bacterias Fermentadoras (Fuertez <i>et al.</i> , 2018)
		Synergistetes (5%)	Synergistaceae (5%)	Bacterias no cultivables (5%)	Bacterias Fermentadoras (Fowler <i>et al.</i> , 2016)
		Chloroflexi (9.6%)	Anaerolineaceae (9.65%)	Bacterias no cultivables (9%)	Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Liang <i>et al.</i> , 2015)
		Spirochaetes (7.2%)	Spirochaetaceae (7.25%)	Sphaerochaeta (5.7%)	Bacterias Fermentadoras (Nakagawa <i>et al.</i> , 2012)
	Actinobacteria (3.6%)	Bacteria no cultivable (3.6%)	Bacteria no cultivable (3.6%)	-----	
	Arquea (5.5%)	Euryarchaeota (5.43%)	Methanocorpusculum (4.667%)	Methanocorpusculum (4.66%)	Arqueas Metanógenas (Demirel <i>et al.</i> , 2008)
			Methanomicrobia (0.613%)	Arquea no cultivable (0.613%)	Arqueas Metanógenas (Vanwonterghem <i>et al.</i> , 2016)
Methanosarcinaceae (0.153%)			Methanosarcina (0.153%)	Arqueas Metanógenas (Vanwonterghem <i>et al.</i> , 2016)	

## Discusión

Durante el ensayo el consorcio tuvo la capacidad de reducir totalmente el Fe(III) en el medio de cultivo CF después de 96 horas de incubación. Posiblemente la reducción del hierro este acoplada a la oxidación de citrato, de igual manera que el consorcio descrito en el tema 2.

A pesar de que el principal aceptor final de electrones fue consumido, el consorcio tuvo la capacidad de degradar un total de 60 hidrocarburos diferentes.

La mineralización de hidrocarburos probablemente estuvo acoplada a procesos metanogénicos, debido a que al final del ensayo se observó un aumento en la abundancia de arqueas metanogénicas de los géneros *Methanocorpusculum* (4.66%), *Methanosarcina* (0.153%) y de la familia *Methanomicrobia* (0.613%) (Tabla 11).

Acompañado del incremento de las poblaciones de organismos metanógenos, se observó el enriquecimiento del género *Desulfitobacterium* (2.3%) y de la familia: *Anaerolineaceae* (9%), ambos linajes con la capacidad de degradar hidrocarburos. Miembros del género *Desulfitobacterium* pueden respirar compuestos halogenados y degradar hidrocarburos aromáticos bajo condiciones hierro-reductoras (Kunapuli *et al.*, 2010). En cambio, bacterias no cultivables de la clase *Anaerolineae* están implicadas en procesos de degradación de alcanos en asociación con arqueas metanogénicas (Liang., 2015).

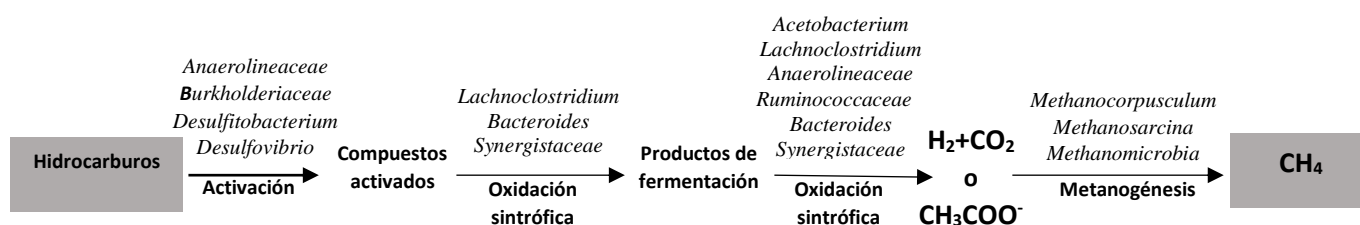
Al final del ensayo, también incrementó la abundancia de los géneros *Bacteroides* (3%), *Sphaerochaeta* (5.7%) y de las familias *Ruminococcaceae* (2.4%) y *Synergistaceae* (5%), todos grupos de bacterias fermentadoras involucradas en la degradación de hidrocarburos bajo condiciones

metanogénicas (Nakagawa *et al.*, 2012; Fowler *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2016).

El incremento de la diversidad microbiana al final del ensayo (Tabla 10), puede estar relacionado con el enriquecimiento de los organismos metanógenos, ya que gracias a ellos es posible realizar la oxidación de hidrocarburos mediante la reducción de la atmosfera de CO<sub>2</sub> presente en el cultivo CF.

Posiblemente, los microorganismos degradadores enriquecidos al final del ensayo se encuentran en simbiosis con bacterias fermentadoras, las cuales pueden participar en la degradación de hidrocarburos activados y en su conversión a sustratos (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y/o acetato), que son aprovechados por los géneros *Methanocorpusculum*, *Methanosarcina* y por miembros de la familia *Methanomicrobia* para la generación de metano (Shen *et al.*, 2016; Siegert *et al.*, 2011; Vanwonterghem *et al.*, 2016).

En la Figura 29, se muestra un diagrama con los posibles grupos implicados en los diferentes pasos de degradación de hidrocarburos al final del ensayo.



**Figura 29.** Posibles microorganismos involucrados en los diferentes pasos de degradación de hidrocarburos bajo condiciones metanogénicas en el consorcio enriquecido



Al inicio del ensayo predominaron bacterias pertenecientes a la familia Burkholderiaceae (40.556%) y a los géneros *Lachnoclostridium* (49.87%) y *Desulfovibrio* (3.9%). La presencia de bacterias de la familia Burkholderiaceae y del género *Desulfovibrio* al inicio y al final del ensayo, probablemente se deba a que ambos grupos están involucrados en la activación inicial y en la degradación de hidrocarburos en los tiempos finales. Debido a que ambos grupos, han sido asociados con la degradación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos policíclicos (Tanase *et al.*, 2013; Castorena *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2013; Miralles *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 1996).

## Tema 4: Enriquecimiento de consorcios sulfato-reductores

A partir de sedimentos de los sitios 1, 2 y 3 (Figura 7), se enriquecieron distintos consorcios en medios de cultivo manganeso (Mn) (Lovley & Phillips., 1988), medios citrato de sodio (CNa) (Schwarz & Oesterhelt., 1985) y medios mínimos para el crecimiento de *Shewanella* (Sh) (Tang *et al.*, 2006).

Posteriormente, los consorcios fueron resembraron en medio marino sulfato-reductor (MMS) (Widdel & Bak., 1992) y se incubaron a temperatura ambiente en presencia de luz solar. Al transcurrir 1 mes, se observó la generación de densos agregados verdes acompañados de la formación de precipitados color negro.

Los cultivos fueron resembrados nuevamente en MMS y se incubaron durante 20 días a temperatura ambiente en presencia de luz solar. Los cultivos con mayor densidad celular fueron seleccionados (descripción detallada del enriquecimiento y selección en metodología inciso 3).

En la Tabla 12, se muestra el sitio de procedencia, el medio de cultivo empleado en el primer enriquecimiento y el número de resiembras en MMS de los consorcios seleccionados.

**Tabla 12.** Consorcios enriquecidos en MMS con mayor densidad celular

Sitio de Procedencia	Cultivo de Procedencia	Número de resiembras en MMS
1	Mn	2
1	Sh	2
3	CNa	2
3	Mn	2

Fue evaluado el crecimiento de los consorcios seleccionados en cultivos MMS suplementados con tres diferentes tipos de petróleo (extra ligero, ligero y mediano) (descripción en metodología inciso 3.1).

Se observaron diferencias en el crecimiento y en la coloración de los consorcios adicionados con diferentes tipos de petróleo después de 6 meses de incubación a temperatura ambiente en presencia de luz solar (Figura 30) (Tabla 13).



**Figura 30.** Consorcios enriquecidos en medio MMS adicionados con diferentes petróleos.

**A)** Enriquecimiento con petróleo extra ligero (1MMS).

**B)** Enriquecimiento con petróleo ligero (2MMS)

**C)** Enriquecimiento con petróleo mediano (8MMS)

**Tabla 13.** Características y procedencia de consorcios enriquecidos con diferentes petróleos en MMS

Sitio de Procedencia	Cultivo de Procedencia	Tipo de petróleo	Características del crecimiento	ID
Sitio 1	Medio de cultivo Mn	Extra ligero	Formación de densos agregados color rosa	1 MMS
		Ligero	Crecimiento escaso	-----
		Mediano	Crecimiento escaso	-----
Sitio 1	Medio de cultivo Sh	Extra ligero	Formación de densos agregados color verde en contacto con el petróleo	2 MMS
		Ligero	Formación de densos agregados color pardo	3 MMS
		Mediano	Formación de densos agregados color pardo	4 MMS
Sitio 3	Medio de cultivo CNa	Extra ligero	Formación de densos agregados color verde	5 MMS
		Ligero	Crecimiento escaso	-----
		Mediano	Formación de densos agregados color verde	6 MMS
Sitio 3	Medio de cultivo Mn	Extra ligero	Crecimiento escaso	-----
		Ligero	Formación de densos agregados con tonalidades verdes y amarillas	7 MMS
		Mediano	Formación de densos agregados color rosa	8 MMS

Los consorcios con mayor crecimiento fueron seleccionados (1 MMS, 2 MMS, 3 MMS, 4 MMS, 5 MMS, 6 MMS, 7 MMS y 8 MMS) (Tabla 5), para el posterior análisis de diversidad microbiana.

## Diversidad microbiana de los consorcios sulfato-reductores enriquecidos

Con la finalidad de conocer las comunidades microbianas enriquecidas en los consorcios sulfato-reductores, se analizó la diversidad de los consorcios después de 6 meses de incubación a través de la extracción de ADN, amplificación e identificación de la región V3-V4 del gen ADNr 16S (procedimiento descrito en metodología inciso 3.2 y 1.5). El número de lecturas y las diversidades *alfa* de los consorcios se muestra en la Tabla 14.

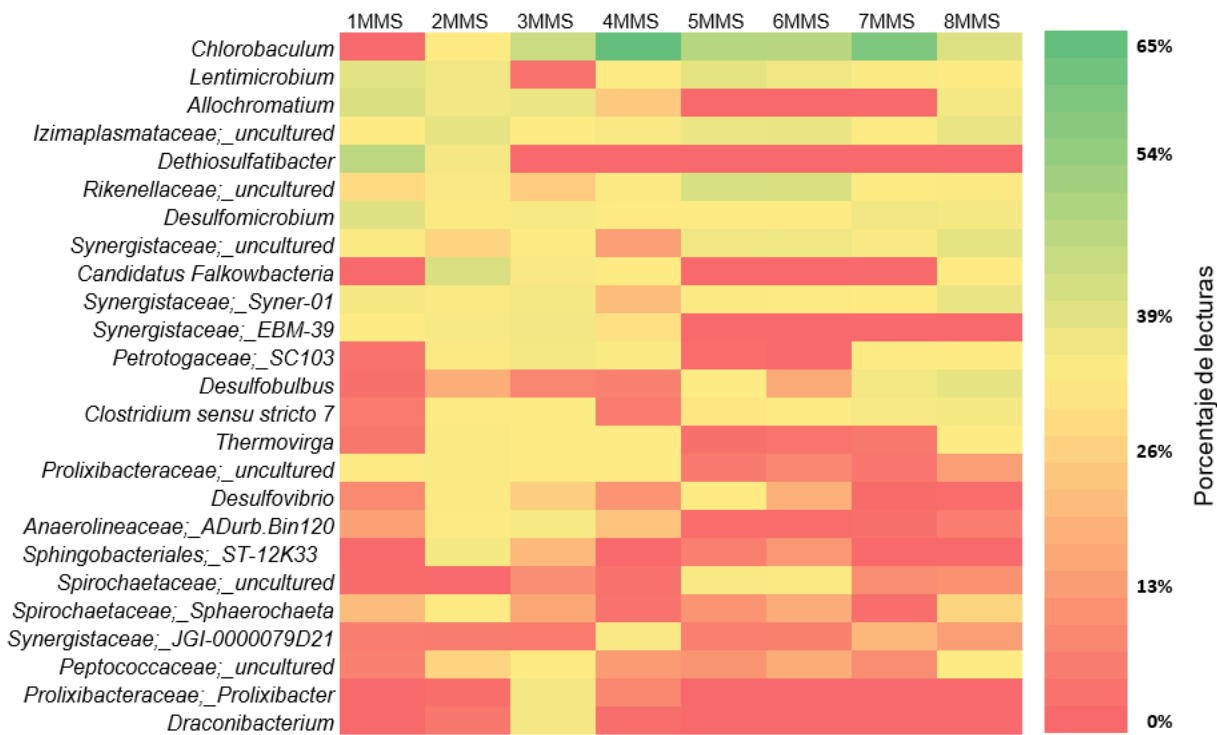
Fueron identificados microorganismos pertenecientes al dominio bacteria y arquea, sin embargo, la abundancia del dominio arquea fue menor al 0.1% del total de secuencias asignadas en todos los cultivos.

Se observó el enriquecimiento de distintos grupos microbianos, no obstante, las poblaciones bacterianas identificadas variaron de acuerdo al sitio, medio de cultivo y petróleo adicionado (Tabla 13). Se detectaron un total de 30 diferentes *phyla*, 29 pertenecientes al dominio bacteria y 1 perteneciente al dominio arquea (Figura 32).

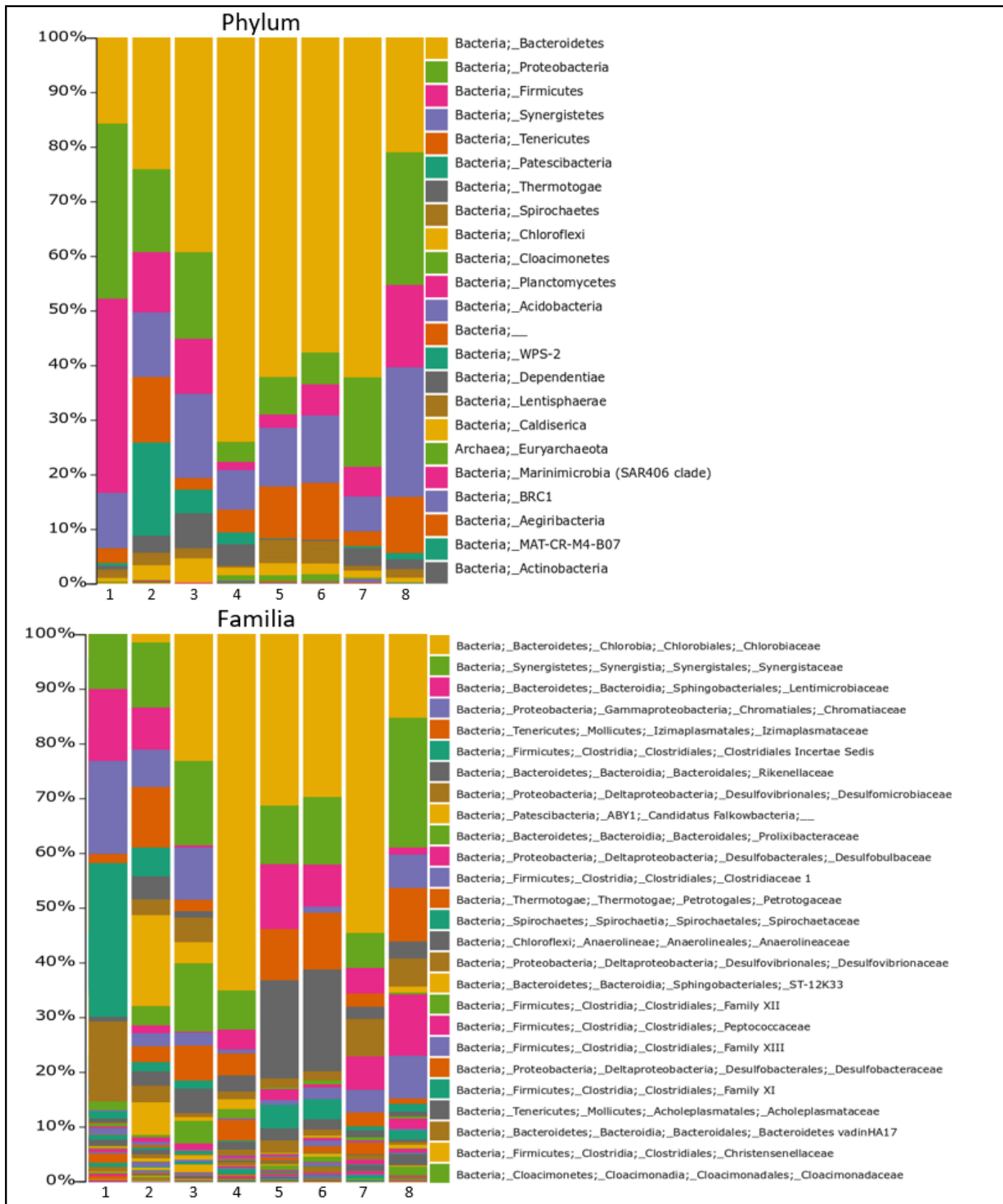
En la Figura 32, se observan los grupos microbianos más abundantes a diferentes niveles taxonómicos (*phylum*, familia y género). Por otra parte, en la Figura 31 se muestra en forma de un mapa de calor el porcentaje total de lecturas obtenidas de los géneros más abundantes identificados en los 8 consorcios. La suma total de las abundancias de los taxones mostrados en la Figura 31 representa más del 80% del total de secuencias asignadas.

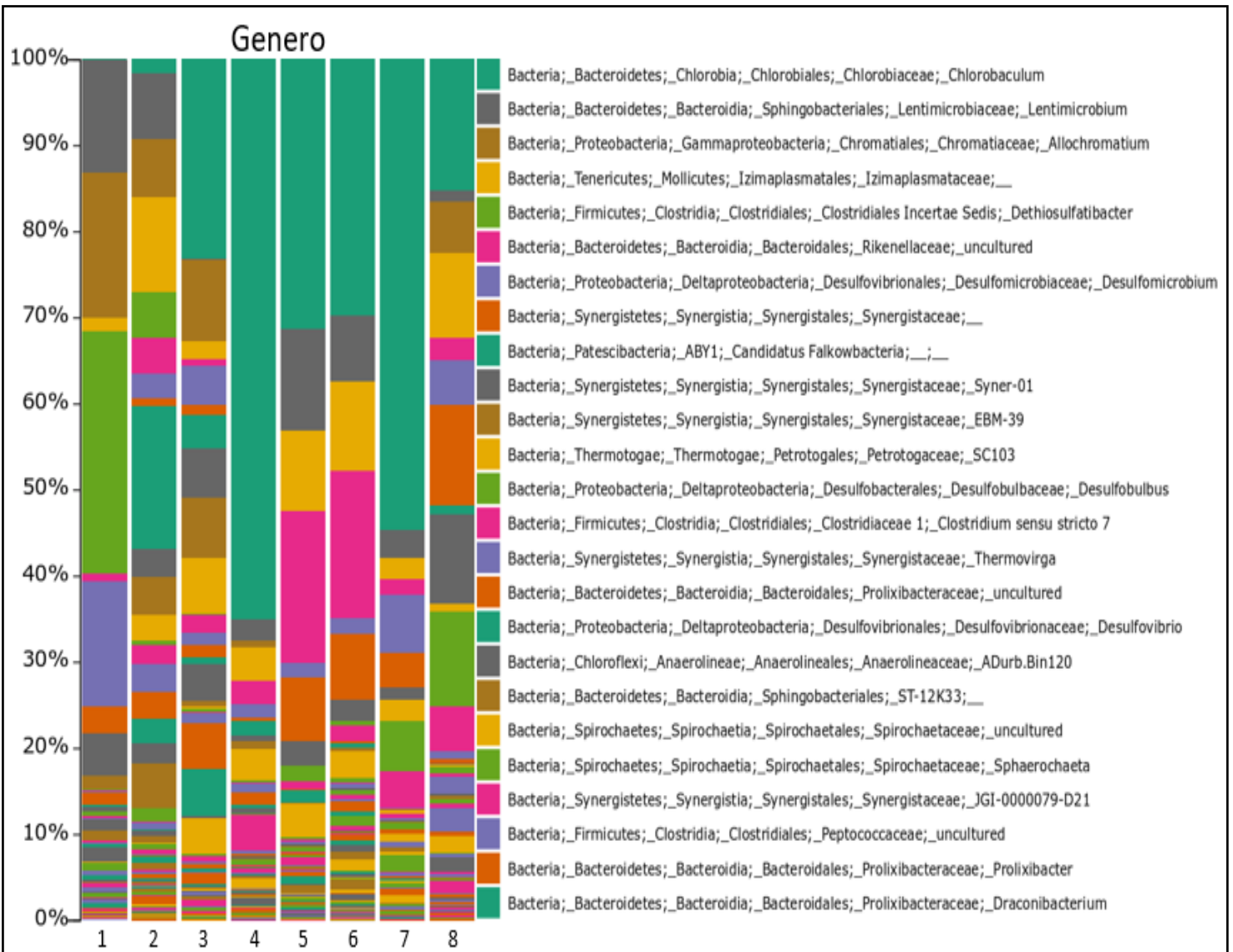
**Tabla 14.** Número de lecturas obtenidas de los diferentes consorcios enriquecidos

Cultivo	Lecturas	Diversidad $\alpha$
1 MMS	58196	3.7754
2 MMS	37573	4.9961
3 MMS	36446	4.8608
4 MMS	38342	2.7131
5 MMS	36770	4.2541
6 MMS	30061	4.5037
7 MMS	36231	4.3878
8 MMS	30989	5.0323



**Figura 31.** En el mapa de calor, se muestra el porcentaje total de lecturas obtenidas de los microorganismos más abundantes en los 8 consorcios enriquecidos. Del lado derecho de la figura, se muestra una barra con el patrón de colores asignado a los diferentes porcentajes de lecturas. En la parte superior, se observa el nombre de los consorcios seleccionados.





**Figura 32.** Diversidad microbiana a diferentes niveles taxonómicos (*Phylum*, Familia y Género), representadas mediante gráficas de barras apiladas de los diferentes consorcios enriquecidos, 1 (1MMS), 2 (2MMS), 3 (3MMS), 4 (4MMS), 5 (5MMS), 6 (6MMS), 7 (7MMS), 8 (8MMS).



## Discusión

Los microorganismos más abundantes en los consorcios enriquecidos fueron bacterias verdes (*Chlorobaculum*) y púrpuras del azufre (*Allochromatium*) (Figuras 31 y 32). Dichos microorganismos tienen la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica mediante la oxidación de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) acoplado a la reducción de CO<sub>2</sub> (Tang *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2009).

Actualmente, no existen bacterias púrpuras o verdes del azufre aisladas con la capacidad de degradar hidrocarburos, sin embargo, se han reportado que bacterias fotótrofas anoxigénicas de la especie *Blastochloris sulfoviridis* tienen la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos (Zengler *et al.*, 1999; Sasikala & Ramana., 1997). Aunado a esto, en consorcios fotótrofos aerobios se ha observado que cianobacterias pueden actuar directamente en la degradación de hidrocarburos o de manera indirecta facilitando la floculación de bacterias e hidrocarburos, proporcionando soporte de adherencia y aumentando la tasa de degradación de petróleo (Al-Hasan *et al.*, 1998; Radwan *et al.*, 2002; Chavan & Mukherji., 2008). Este proceso es similar al observado en el consorcio MMS2 (Figura 30B).

Dentro de los consorcios también fueron identificados 10 distintos géneros de bacterias sulfato-reductoras (*Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Desulfosarcina*, *Desulfatitalea*, *Desulfofustis*, *Desulfocarbo*, *Desulfomonile* y *Desulfocurvus*), de los cuales 8 géneros han sido involucrados en procesos de degradación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, aromáticos policíclicos y compuestos organoclorados (Tabla 15).

**Tabla 15.** Bacterias reductoras de sulfato involucradas en procesos de degradación de hidrocarburos

Género	Actividad	Cita
<i>Dethiosulfatibacter</i>	Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos	Muangchinda <i>et al.</i> , 2013
<i>Desulfomicrobium</i>	Involucrado en consorcio degradador de alcanos	Miralles <i>et al.</i> , 2007
<i>Desulfovibrio</i>	Involucrado en consorcio degradador de alcanos e hidrocarburos aromáticos	Miralles <i>et al.</i> , 2007; Davis <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfuromonas</i>	Involucrada en degradación de tolueno	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Desulfosarcina</i>	Involucrado degradación de alcanos	Kleindienst <i>et al.</i> , 2014
<i>Desulfatitalea</i>	Degradación de Tolueno y ácidos grasos de cadena larga	Higashioka <i>et al.</i> , 2013
<i>Desulfocarbo</i>	Degradación de compuestos aromáticos	An <i>et al.</i> , 2014
<i>Desulfomonile</i>	Degradación de compuestos aromáticos organoclorados	El Fantroussi <i>et al.</i> , 1997

Las bacterias sulfato-reductoras degradadoras de hidrocarburos más abundantes en los consorcios pertenecieron a los géneros *Dethiosulfatibacter* y *Desulfomicrobium* (Figura 31). Se ha observado que bacterias del género *Dethiosulfatibacter*, tienen un papel importante en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos acuáticos, mientras que bacterias pertenecientes del género *Desulfomicrobium* están implicadas en procesos de degradación de alcanos en sedimentos marinos (Muangchinda *et al.*, 2013; Miralles *et al.*, 2007).

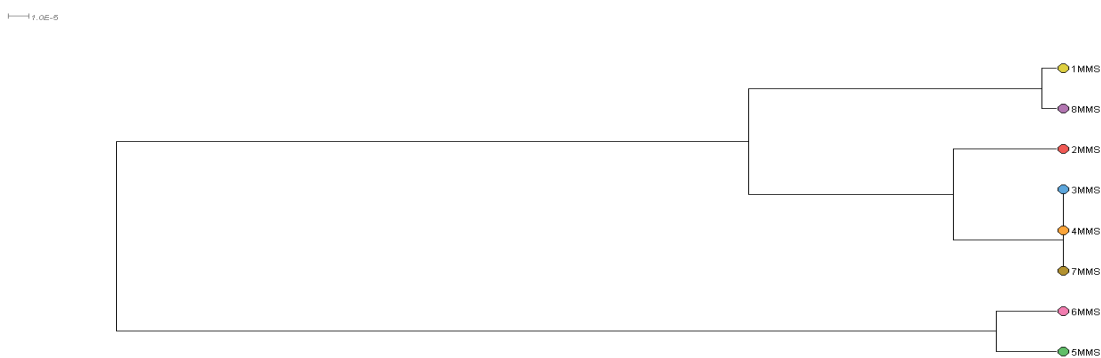
La presencia de bacterias sulfato-reductoras y bacterias verdes y púrpuras del azufre les confiere características novedosas a los consorcios. Las bacterias sulfato-reductoras a través de la respiración de  $\text{SO}_4$ , pueden generar  $\text{H}_2\text{S}$ , que es oxidado por bacterias verdes y púrpuras del azufre para generar nuevamente sulfato (Tang *et al.*, 2009). El recambio de aceptor y donador de electrones

puede permitir una constante degradación del petróleo en el consorcio (Tang *et al.*, 2009).

No existen reportes actuales acerca del enriquecimiento de consorcios fotótrofos sulfato-reductores con la capacidad de degradar hidrocarburos. Por lo tanto, el presente trabajo representa uno de los primeros estudios sobre este tipo de microorganismos y sus interacciones.

Por otra parte, se observó que la abundancia de los diferentes grupos microbianos fue distinta en todos los consorcios enriquecidos (Figuras 31 y 32). Esto puede atribuirse a los diferentes sitios de procedencia, medios de cultivo y petróleos adicionados durante el enriquecimiento.

En la Figura 33, se observa un mayor parentesco entre los consorcios provenientes de un mismo tipo de medio de cultivo, a pesar de que estos provienen de diferente sitio y fueron adicionados con distintos tipos de petróleo (Tabla 13). La única excepción a lo antes mencionado es el consorcio 7MMS, que se agrupa con los consorcios 4 MMS y 3 MMS. Por lo tanto, la primera resiembra en diferentes tipos de medio de cultivo tuvo un efecto considerable en la composición microbiana de los distintos consorcios.



**Figura 33.** Cladograma de los diferentes consorcios enriquecidos, elaborado utilizando el estadístico Bray-Curtis y el algoritmo para análisis filogenéticos UPGMA mediante el programa MEGAN Community Edition 6.1.2.2

## Tema 5: Enriquecimiento y aislamiento de

### *Desulfuromonas palmitatis*

A partir de sedimentos provenientes del sitio 2 (Figura 7), fue enriquecido un consorcio con la capacidad de crecer en medio marino sulfato-reductor (MMS) adicionado con petróleo extra ligero como única fuente de carbono (descripción en metodología inciso 4.1), sin embargo, al ser resembrado el consorcio no tuvo la capacidad de crecer nuevamente.

Debido a que el consorcio proviene de sedimentos de río, se decidió disminuir la concentración de cloruro de sodio del medio de cultivo con la finalidad de observar un mejor crecimiento microbiano. Por lo tanto, se realizaron resiembras en medios de cultivo MMS a tres diferentes concentraciones de cloruro de sodio (21 gr/L, 10.5 gr/L y 0 gr/L) (descripción en metodología inciso 4).

En los medios de cultivo MMS sin cloruro sodio, se observó un mejor crecimiento, acompañado de un cambio en la composición del petróleo y una tonalidad rosácea en el cultivo. La coloración observada en el medio es característica del género *Geobacter*, rasgo generado por la gran abundancia de citocromos en este linaje (Seeliger *et al.*, 1998). Este género es de interés en biorremediación debido a su capacidad de utilizar múltiples aceptores finales de electrones y degradar distintos hidrocarburos aromáticos (Zwolinski *et al.*, 2000). Por lo tanto, se decidió resembrar el consorcio a medio *Nutrient Broth Acetate-Fumarate* (NBAF) (cultivo utilizado para el crecimiento de *Geobacter*) (Coppi *et al.*, 2001) (Descripción en metodología inciso 4.1).

## Aislamiento de *Desulfuromonas palmitatis*

El consorcio enriquecido en NBAF fue resembrado a NBAF sólido en el cual se observó el crecimiento de colonias color rosa características del género *Geobacter* (Figura 34). Dichas colonias fueron aisladas y posteriormente resembradas a medio NBAF líquido para su posterior identificación (descripción detallada del aislamiento en metodología inciso 4.2).



**Figura 34.** *Desulfuromonas palmitatis*. Colonias aisladas en medio NBAF sólido

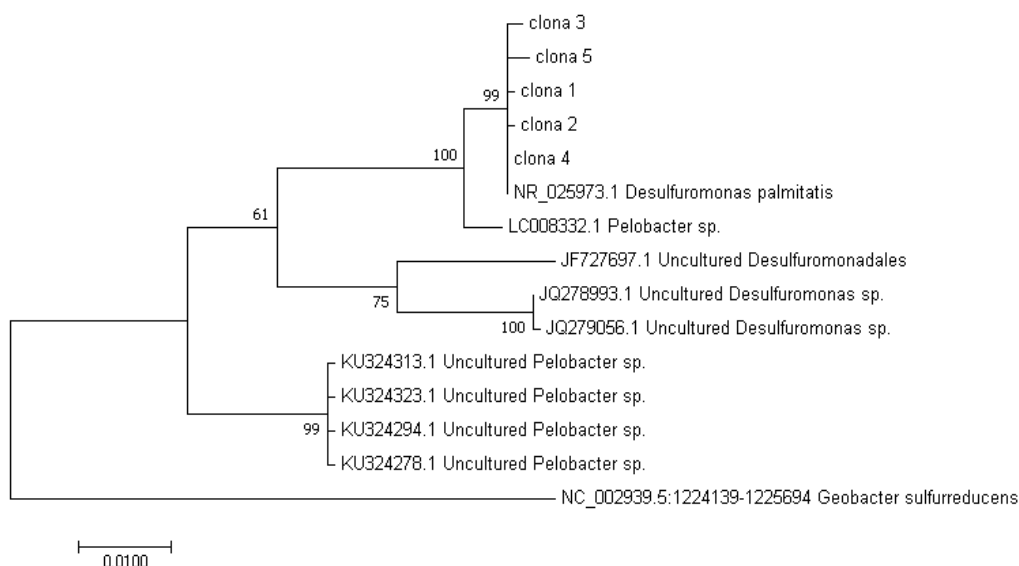
## Identificación de *Desulfuromona palmitatis*

La cepa aislada *Desulfuromonas palmitatis* fue identificada mediante la amplificación, clonación y secuenciación del gen completo ADNr 16S, como se describe en metodología inciso 4.4.

Se obtuvieron un total de 5 secuencias clonadas del gen ADNr 16S todas con una cobertura del 100% y una identidad del 99% contra *Desulfuromonas palmitatis* cepa SDBY1. Las 5 secuencias fueron alineadas y comparadas contra las secuencias con mayor *score* obtenidas del *BLAST* (Tabla 16) para la generación de un cladograma (Figura 35) (descripción en metodología inciso 4.4).

**Tabla 16.** Secuencias más cercanas al gen ADNr 16S de la cepa aislada comparadas en la base de datos *GeneBank*.

Gen alineado	Secuencia más cercana	Identidad	Cobertura	Score total
ADNr 16S	NR_025973.1 <i>Desulfuromonas palmitatis</i> sp. SDBY1 gen ARN ribosomal 16S	99%	100%	2436
	JX391495.1 Bacteria no cultivable clona N0059 del gen ARN ribosomal 16S	99%	100%	2434
	LC008332.1 <i>Pelobacter</i> sp. AOP6 gen ARN ribosomal 16S	99%	100%	2400
	AB668494.1 Bacteria no cultivable clona 21ARB6 del gen ARN ribosomal 16S	99%	100%	2400
	JQ278993.1 <i>Desulfuromonas</i> sp. clona sz-15 gen ARN ribosomal 16S	96%	100%	2163
	JF727697.1 Desulfuromonadales clona bac766 gen ARN ribosomal 16S	96%	100%	2146
	JQ279056.1 <i>Desulfuromonas</i> sp. clona sz-288 gen ARN ribosomal 16S	96%	100%	2144
	KU324323.1 <i>Pelobacter</i> sp. clona HYIII59_Bac16s_AQDS03_03_01C gen ARN ribosomal 16S	95%	100%	2123
	KU324278.1 <i>Pelobacter</i> sp. clona HYIII45_Bac16s_AQDS02_C01 16S gen ARN ribosomal 16S	95%	100%	2123



**Figura 35.** Relación filogenética inferida a partir del gen ADNr 16S de la cepa aislada contra las secuencias más parecidas de la base de datos de *GenBank*. El árbol se elaboró por medio del programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) con 1000 réplicas de *Bootstrap*. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Geobacter sulfurreducens* NC\_002939.5:1224139-122569.

## Discusión

A partir de sedimentos provenientes del sitio 2 (Figura 7), se logró aislar una nueva cepa bacteriana con parentesco a *Desulfuromonas palmitatis* SDBY1 y a *Pelobacter sp* AOP6 (Tabla 16). En el cladograma mostrado en la Figura 35, se observa el agrupamiento de las 5 secuencias obtenidas del aislado con la secuencia de *Desulfuromonas palmitatis* cepa SDBY1 y una clara diferenciación con *Pelobacter sp*. AOP6. Las secuencias pertenecientes al género *Pelobacter* forman un grupo parafilético, esto probablemente debido a una mala anotación en las secuencias, por lo tanto, será importante realizar la identificación del aislado mediante otros marcadores moleculares como el citocromo tipo-c, ausente en bacterias del género *Pelobacter* (Coates *et al.*, 1995).

La cepa aislada resulta de interés debido a que actualmente sólo existe un aislado reportado de esta especie. Aunado a esto, nuestro aislado fue enriquecido en medio sulfato-reductor con petróleo extra ligero como única fuente de carbono, por lo tanto, el aislado podría tener la capacidad de degradar algún o algunos de los hidrocarburos presentes en el petróleo, característica que no ha sido reportada anteriormente en esta especie.

Por otra parte, el alto número de citocromos multi-hemo presentes en el género *Desulfuromonas* les confiere una gran flexibilidad respiratoria, capacidad que puede ser aprovechada para la producción de bioelectricidad y reducción de metales pesados. Esta cualidad puede ser utilizada en procesos de biorremediación y en la generación de energías alternas (Kim *et al.*, 2014; Löffler *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2011).

# CONCLUSIONES GENERALES

Los sedimentos analizados provenientes del Río Coatzacoalcos se encontraron contaminados con altas concentraciones de hidrocarburos, mercurio y con compuestos halogenados. El análisis de diversidad microbiana permitió identificar diferentes linajes con la capacidad de degradar hidrocarburos, compuestos halogenados y algunos con la capacidad de metilar mercurio.

A partir de dichos sedimentos se enriquecieron dos consorcios hierro-reductores con la capacidad de degradar hidrocarburos bajo condiciones anóxicas. El primer consorcio eliminó cerca del 37% de la fracción aromática del petróleo crudo en un lapso de 3 meses. Los microorganismos posiblemente implicados en la degradación directa pertenecen a los géneros *Geobacter*, *Desulfovibrio* y a la familia *Burkholderiaceae*. La mineralización de algunos hidrocarburos, probablemente estuvo acoplada a procesos metanogénicos mediados por arqueas del género *Methanocorpusculum*. El segundo consorcio hierro-reductor aislado, tuvo la capacidad de degradar decano, dodecano, tetradecano y hexadecano así como otros 58 hidrocarburos no identificados de una mezcla petróleo: queroseno. La mineralización de hidrocarburos posiblemente fue realizada bajo condiciones metanogénicas por bacterias de los géneros *Desulfotobacterium*, *Desulfovibrio* y de las familias *Anaerolineaceae* y *Burkholderiaceae* en simbiosis con arqueas de los géneros *Methanocorpusculum*, *Methanosarcina* y de la familia *Methanomicrobia*.

También se seleccionaron 8 diferentes consorcios enriquecidos, a partir de medios para organismos sulfato-reductores. En el análisis de diversidad, se identificaron diferentes bacterias sulfato-reductoras degradadoras de hidrocarburos y bacterias verdes y púrpuras del azufre. Los microorganismos



identificados en los consorcios tienen la capacidad de completar el ciclo del azufre en presencia de hidrocarburos. Dicha cualidad, permite un recambio continuo de aceptor final de electrones que puede favorecer una degradación constante de hidrocarburos en el cultivo. Actualmente, no existen reportes de algún consorcio aislado con estas características, por lo tanto, este trabajo es uno de los primeros estudios acerca de estos microorganismos y su posible aplicación en procesos de biorremediación.

Por último, se aisló una cepa con una identidad del 99% contra *Desulfuromonas palmitatis*. Actualmente, solo existe un aislado perteneciente a esta especie. Es por ello, que la caracterización de esta cepa será de interés debido al potencial uso de este linaje en procesos de biorremediación

# PERSPECTIVAS

- Analizar el crecimiento microbiano de los consorcios hierro-reductores mediante un conteo celular con microscopia de fluorescencia.
- Analizar la degradación de hidrocarburos a diferentes tiempos en los ensayos de mineralización de hidrocarburos bajo condiciones hierro-reductoras, utilizando estándares internos.
- Identificar los microorganismos implicados en la degradación de hidrocarburos a los diferentes tiempos de los ensayos de degradación.
- Identificar los hidrocarburos aromáticos degradados por los consorcios hierro-reductores.
- Cuantificar la generación de metano en los consorcios hierro-reductores.
- Evaluar la capacidad de degradar hidrocarburos de los consorcios fotótrofos sulfato-reductores enriquecidos.
- Identificar las bacterias responsables de la degradación de hidrocarburos en los consorcios fotótrofos sulfato-reductores.
- Cuantificar la reducción de sulfato y la oxidación de sulfuro a diferentes tiempos en los consorcios fotótrofos sulfato-reductores.
- Identificar mediante otros marcadores moleculares al microorganismo aislado.
- Evaluar la capacidad de degradar hidrocarburos del microorganismo aislado.

# LITERATURA CITADA

- 1) Acosta-González, A., & Marqués, S. (2016). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current opinion in biotechnology*, 38, 24-32.
- 2) Al-Ghadban, A. N., Abdali, F., & Massoud, M. S. (1998). Sedimentation rate and bioturbation in the Arabian Gulf. *Environment international*, 24(1-2), 23-31.
- 3) Al-Hasan, R. H., Al-Bader, D. A., Sorkhoh, N. A., & Radwan, S. S. (1998). Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Marine Biology*, 130(3), 521-527.
- 4) Alves, A. S., Paquete, C. M., Fonseca, B. M., & Louro, R. O. (2011). Exploration of the 'cytochromome' of *Desulfuromonas acetoxidans*, a marine bacterium capable of powering microbial fuel cells. *Metallomics*, 3(4), 349-353.
- 5) An, T. T., & Picardal, F. W. (2014). *Desulfocarbo indianensis* gen. nov., sp. nov., a benzoate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from water extracted from a coal bed. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(8), 2907-2914.
- 6) An, T. T., & Picardal, F. W. (2015). Draft genome sequence of *Desulfocarbo indianensis* SCBM, a new genus of sulfate-reducing bacteria, isolated from water extracted from an active coalbed methane gas well. *Genome announcements*, 3(5), 970-15.

- 7) Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (1997). Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation. *Advances in microbial ecology*, 289-350.
- 8) Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (2000). Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environmental science & technology*, 34(11), 2261-2266.
- 9) Atlas, R. M., & Philp, J. (2005). Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. *ASM Press*.
- 10) Bao, M. T., Wang, L. N., Sun, P. Y., Cao, L. X., Zou, J., & Li, Y. M. (2012). Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 64(6), 1177-1185.
- 11) Bell, T. H., Yergeau, E., Maynard, C., Juck, D., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2013). Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *The ISME journal*, 7(6), 1200.
- 12) Bian, X. Y., Mbadinga, S. M., Liu, Y. F., Yang, S. Z., Liu, J. F., Ye, R. Q. & Mu, B. Z. (2015). Insights into the anaerobic biodegradation pathway of n-alkanes in oil reservoirs by detection of signature metabolites. *Scientific reports*, 5, 9801.
- 13) Biderre-Petit, C., Dugat-Bony, E., Mege, M., Parisot, N., Adrian, L., Moné, A., Denonfoux, J., Peyretailade, E., Debros, D., Boucher, D., & Peyret, P. (2016). Distribution of *Dehalococcoidia* in the anaerobic deep water of a remote meromictic crater lake and detection of *Dehalococcoidia*-derived reductive dehalogenase homologous genes. *PloS one*, 11(1), 45558.

- 14) Buckel, W., Dorn, U., & Semmler R. (1981). Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. *European journal of biochemistry*, 118(2), 315-321.
- 15) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequence data. *Nature methods*, 7(5), 335.
- 16) Castorena, G., Mugica, V., Le Borgne, S., Acuña, M. E., Bustos-Jaimes, I., & Aburto, J. (2006). Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 739-745.
- 17) Chan, L. K., Morgan-Kiss, R. M., & Hanson, T. E. (2009). Functional analysis of three sulfide: quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. *Journal of bacteriology*, 191(3), 1026-1034.
- 18) Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H., & Bao, M. (2017). Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PloS one*, 12(3), 174445.
- 19) Coates, J. D., Lonergan, D. J., Philips, E. J., Jenter, H., & Lovley, D. R. (1995). *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov., a marine dissimilatory Fe (III) reducer that can oxidize long-chain fatty acids. *Archives of microbiology*, 164(6), 406-413.
- 20) Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., & Lovley, D. R. (2001). Development of a Genetic System for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3180-3187.

- 21) Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R., & Hirschler-Réa, A. (2005). Anaerobic n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3458-3467.
- 22) Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*.
- 23) Davis, J. B., & Yarbrough, H. F. (1966). Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Chemical Geology*, 1, 137-144.
- 24) Dean, B. J. (1978). Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 47(2), 75-97.
- 25) Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 173-190.
- 26) Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., & Pace, N. R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3869-3877.
- 27) El Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., & Agathos, S. N. (1997). Introduction and PCR detection of *Desulfomonile tiedjei* in soil slurry microcosms. *Biodegradation*, 8(2), 125-133.
- 28) Etkin, D. S. (1999). Historical overview of oil spills from all sources (1960-1998). *International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, 1999 1097-1102.

- 29) Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434-438.
- 30) Fischer-Romero, C., Tindall, B. J., & Jüttner, F. (1996). *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 183-188.
- 31) Folwell, B. D., McGenity, T. J., Price, A., Johnson, R. J., & Whitby, C. (2016). Exploring the capacity for anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and naphthenic acids by microbes from oil-sands-process-affected waters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 214-221.
- 32) Fournier, G. P., & Gogarten, J. P. (2008). Evolution of acetoclastic methanogenesis in *Methanosarcina* via horizontal gene transfer from cellulolytic Clostridia. *Journal of bacteriology*, 190(3), 1124-1127.
- 33) Fowler, S. J., Toth, C. R., & Gieg, L. M. (2016). Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments. *Frontiers in microbiology*, 7, 562.
- 34) Fuertez, J., Córdoba, G., McLennan, J. D., Adams, D. J., & Sparks, T. D. (2018). Potential application of developed methanogenic microbial consortia for coal biogasification. *International Journal of Coal Geology*, 188, 165-180.
- 35) Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Cappello, S., Russo, D., Calogero, R., Yakimov, M. M., (2014). Effective bioremediation strategy

- for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation. *Frontiers in microbiology*, 5, 162.
- 36) Gertler, C., Yakimov, M. M., Malpass, M. C., Golyshin, P. N. (2010). Shipping-related accidental and deliberate release into the environment. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 243-256.
- 37) Gieg, L. M., Fowler, S. J., & Berdugo-Clavijo, C. (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 21-29.
- 38) Gilmour, C. C., Bullock, A. L., McBurney, A., Podar, M., & Elias, D. A. (2018). Robust Mercury Methylation across Diverse Methanogenic Archaea. *MBio*, 9(2), 2403-17.
- 39) Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'reilly, S. E., Hao, X., & Zhao, D. (2014). A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine pollution bulletin*, 79(1-2), 16-33.
- 40) Gonzalez-Mille, D. J., Espinosa-Reyes, G., Rivero-Pérez, N. E., Trejo-Acevedo, A., Nava-Montes, A. D., & Ilizaliturri-Hernández, C. A. (2013). Persistent organochlorine pollutants (POPs) and DNA damage in giant toads (*Rhinella marina*) from an industrial area at Coatzacoalcos, Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(11), 1781.
- 41) González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., & Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19(7), 1238-1248.



- 42) Greene, A. C. (2014). The family *Desulfuromonadaceae*. *The Prokaryotes*, 143-155.
- 43) Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), 1-15.
- 44) Higashioka, Y., Kojima, H., Watanabe, M., & Fukui, M. (2013). *Desulfatitalea tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from tidal flat sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 761-765.
- 45) Hunt, J. M. (1996). *Petroleum geochemistry and geology*. New York: WH Freeman.
- 46) IPEN Mercury-Free Campaign Report (2013). Chemical and petrochemical industry site: Coatzacoalcos region in Mexico. Mercury levels in fish in the Coatzacoalcos River. Prepared. Ecología y Desarrollo Sostenible en Coatzacoalcos, A.C. and Centro de Análisis y Acción en Tóxicos y sus Alternativas, Arnika Association (Czech Republic. Mexico City.
- 47) Jaekel, U., (2011). Anaerobic oxidation of short-chain and cyclic alkanes by sulfate-reducing bacteria. Bremen, Alemania. Tesis de doctorado., Universidad de Bremen.
- 48) Jiménez, N., Richnow, H. H., Vogt, C., Treude, T., & Krüger, M. (2016). Methanogenic hydrocarbon degradation: evidence from field and laboratory studies. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), 227-242.
- 49) Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2059-2067.

- 50) Kerin, E. J., Gilmour, C. C., Roden, E., Suzuki, M. T., Coates, J. D., & Mason, R. P. (2006). Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7919-7921.
- 51) Kim, S. J., Park, S. J., Cha, I. T., Min, D., Kim, J. S., Chung, W. H., Chae, J. C., Jeon, C. O., & Rhee, S. K. (2014). Metabolic versatility of toluene-degrading, iron-reducing bacteria in tidal flat sediment, characterized by stable isotope probing-based metagenomics analysis. *Environmental microbiology*, 16(1), 189-204.
- 52) Kita, A., Miura, T., Okamura, Y., Aki, T., Matsumura, Y., Tajima, T., Kato J. & Nakashimada, Y. (2015). *Dysgonomonas alginatilytica* sp. nov., an alginate-degrading bacterium isolated from a microbial consortium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3570-3575.
- 53) Kleindienst, S., Herbst, F. A., Stagars, M., Von Netzer, F., Von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F., Lueders, T., & Knittel, K. (2014). Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *The ISME journal*, 8(10), 2029.
- 54) Kniemeyer, O., Fischer, T., Wilkes, H., Glöckner, F. O., & Widdel, F. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 760-768.
- 55) Kryachko, Y., Dong, X., Sensen, C. W., & Voordouw, G. (2012). Compositions of microbial communities associated with oil and water in a mesothermic oil field. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(3), 493-506.

- 56) Kunapuli, U., Jahn, M. K., Lueders, T., Geyer, R., Heipieper, H. J., & Meckenstock, R. U. (2010). *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 686-695.
- 57) Lee, H. S., Kang, S. G., Bae, S. S., Lim, J. K., Cho, Y., Kim, Y. J., Jeon, J. H., Cha, S. S., Kwon, K. K., Kim, H. T., Park, C. J., Lee, H. W., Kim, S., Chun, J., Colwell, R. R., Kim, S. J., & Lee, J. H. (2008). The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydrotrophic metabolism. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7491-7499.
- 58) Li, P., Feng, X. B., Qiu, G. L., Shang, L. H., & Li, Z. G. (2009). Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. *Journal of hazardous materials*, 168(2-3), 591-601.
- 59) Li, X. X., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Zhou, L., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2017). Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 170-185.
- 60) Liang, B., Wang, L. Y., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). *Anaerolineaceae* and *Methanosaeta* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *Amb Express*, 5(1), 37.
- 61) Lino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K. I., Igarashi, Y. & Haruta, S. (2013). Candidatus *Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic

- digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes and environments*, 28(2), 244-250.
- 62) Liu, R., Zhang, Y., Ding, R., Li, D., Gao, Y., & Yang, M. (2009). Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(5), 400-407.
- 63) Löffler, F. E., Sun, Q., Li, J., & Tiedje, J. M. (2000). 16S rRNA Gene-Based Detection of Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1369-1374.
- 64) Lovley, D. R. (2000). Environmental microbe-metal interactions. *ASM*.
- 65) Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1472-1480.
- 66) Lueders, T. (2017). The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. *FEMS microbiology ecology*, 93(1).
- 67) Macalady, J. L., Mack, E. E., Nelson, D. C., & Scow, K. M. (2000). Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted Clear Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1479-1488.
- 68) Machin-Ramirez, C., Okoh, A. I., Morales, D., Mayolo-Deloisa, K., Quintero, R., & Trejo-Hernández, M. R. (2008). Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. *Chemosphere*, 70(4),

- 737-744. Magot, M., Ollivier, B., & Patel, B. K. (2000). Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77(2), 103-116.
- 69) Mbadanga, S. M., Wang, L. Y., Zhou, L., Liu, J. F., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2011). Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 1-13.
- 70) Mean, H. F. G., & Log, K. (2007). Sediment Toxicity of Petroleum Hydrocarbon Fractions. Massachusetts Department of Environmental Protection Office of Research and Standards
- 71) Meyer, B., Kuehl, J., Deutschbauer, A. M., Price, M. N., Arkin, A. P., & Stahl, D. A. (2013). Variation among *Desulfovibrio* species in electron transfer systems used for syntrophic growth. *Journal of bacteriology*, 195(5), 990-1004.
- 72) Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Bertrand, J. C., & Cuny, P. (2007). Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. *Chemosphere*, 68(7), 1327-1334.
- 73) Morales-Mora, M. A., Rodríguez-Pérez, B., Martínez-Delgadillo, S. A., Rosa-Domínguez, E., & Nolasco-Hipólito, C. (2014). Human and ecotoxicological impacts assessment from the Mexican oil industry in the Coatzacoalcos region, as revealed by the USEtox™ model *Environmental Science and Pollution Research*, 21(16), 9819-9831.
- 74) Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., & Pinyakong, O. (2013). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from D on H oi L ot, S amut S ongkram

- Province, Thailand. *Journal of applied microbiology*, 114(5), 1311-1324.
- 75) Nakagawa, T., Sato, S., Yamamoto, Y., & Fukui, M. (2002). Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Research*, 36(11), 2813-2823.
- 76) Nazina, T. N., Sokolova, D. S., Babich, T. L., Semenova, E. M., Borzenkov, I. A., Bidzhieva, S. K. & Tourova, T. P. (2018). Phylogenetic Diversity of Microorganisms from the Sludge of a Biogas Reactor Processing Oil-Containing and Municipal Waste. *Microbiology*, 87(3), 416-424.
- 77) Neff, J. M. (1979). Sources, fates and biological effects. In *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. Applied Science Publishers London.
- 78) Nzila, A. (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. *Environmental Pollution*, 239, 788-802.
- 79) Paul, J. H., Hollander, D., Coble, P., Daly, K. L., Murasko, S., English, D., Kovach, C. W., (2013). Toxicity and mutagenicity of Gulf of Mexico waters during and after the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental science & technology*, 47(17), 9651-9659.
- 80) Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R. U., Buckel, W., Einsle, O., & Krüger, M. (2016). Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), 5-28.

- 81) Radwan, S. S., Al-Hasan, R. H., Salamah, S., & Al-Dabbous, S. (2002). Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(1), 55-59.
- 82) Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Liu, F., Markovaite, B., Chen, S., Nevin, K., & Lovley, D. (2014). Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and environmental microbiology*, (1), 895.
- 83) Ruelas-Inzunza, J., Páez-Osuna, F., Zamora-Arellano, N., Amezcua-Martínez, F., & Bojórquez-Leyva, H. (2009). Mercury in biota and surficial sediments from Coatzacoalcos estuary, Gulf of Mexico: distribution and seasonal variation. *Water, air, and soil pollution*, 197(1-4), 165-174.
- 84) Sasikala, C., & Ramana, C. V. (1997). Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Advances in microbial physiology. Academic Press*, 339-377.
- 85) Schwarz, E., & Oesterhelt, D. (1985). Cloning and expression of *Klebsiella pneumoniae* genes coding for citrate transport and fermentation. *The EMBO journal*, 4(6), 1599-1603.
- 86) Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., & Schink, B. (1998). A Periplasmic and Extracellular c-Type Cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* Acts as a Ferric Iron Reductase and as an Electron Carrier to Other Acceptors or to Partner Bacteria. *Journal of bacteriology*, 180(14), 3686-3691.
- 87) Shen, L., Zhao, Q., Wu, X., Li, X., Li, Q., & Wang, Y. (2016). Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: from

- cultures to bioreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1358-1367.
- 88) Siegert, M., Cichocka, D., Herrmann, S., Gründger, F., Feisthauer, S., Richnow, H. H., Springael, D., & Krüger, M. (2011). Accelerated methanogenesis from aliphatic and aromatic hydrocarbons under iron- and sulfate-reducing conditions. *FEMS microbiology letters*, 315(1), 6-16.
- 89) Spormann, A. M., & Widdel, F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11(2-3), 85-105.
- 90) Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M., & Neuner, A. (1987). Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*, 236(4803), 822-824.
- 91) Stookey, L. L. (1970). Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical chemistry*, 42(7), 779-781.
- 92) Su, X. L., Tian, Q., Zhang, J., Yuan, X. Z., Shi, X. S., Guo, R. B., & Qiu, Y. L. (2014). *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family *Rikenellaceae* isolated from a reed swamp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 2986-2991.
- 93) Tanase, A. M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., & Stoica, I. (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 150-154.
- 94) Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in



- petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73-94.
- 95) Tang, Y. J., Laidlaw, D., Gani, K., & Keasling, J. D. (2006). Evaluation of the effects of various culture conditions on Cr (VI) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a novel high-throughput mini-bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1), 176-184.
- 96) Tissot, B., & Welte, D. (1984). Petroleum formation and occurrence. Second Revised and Enlarged Edition. Springer-Verlag
- 97) Van der Zaan, B. M., Saia, F. T., Stams, A. J., Plugge, C. M., de Vos, W. M., Smidt, H., Langenhoff A. M. & Gerritse, J. (2012). Anaerobic benzene degradation under denitrifying conditions: Peptococcaceae as dominant benzene degraders and evidence for a syntrophic process. *Environmental microbiology*, 14(5), 1171-1181.
- 98) Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota*. *Nature microbiology*, 1(12), 16170.
- 99) Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- 100) Vigneron, A., Alsop, E. B., Cruaud, P., Philibert, G., King, B., Baksmaty, L., Lavallée, D., Lomans, B., Kyrpides, N., Head, I & Tsesmetzis, N. (2017). Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Scientific reports*, 7(1), 16015.
- 101) Vincent, S. G. T., Reshmi, R. R., Hassan, S. J., Nair, K. D., & Varma, A. (2017). Predominant terminal electron accepting processes during organic matter degradation: spatio-temporal changes in

- Ashtamudi estuary, Kerala, India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 198, 508-517.
- 102) Vishnivetskaya, T. A., Mosher, J. J., Palumbo, A. V., Yang, Z. K., Podar, M., Brown, S. D. & Brandt, C. C. (2011). Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams. *Applied and environmental microbiology*, 77(1), 302-311.
- 103) Vodyanitskii, Y. N. (2011). Iron compounds and oil biodegradation in overmoistened contaminated soils: a review of publications. *Eurasian soil science*, 44(11), 1250.
- 104) Wang, Z., Fingas, M., & Li, K. (1994). Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, part II. *Journal of chromatographic science*, 32(9), 367-382.
- 105) Weelink, S. A., Van Eekert, M. H., & Stams, A. J. (2010). Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(4), 359-385.
- 106) Whitehead, A. (2013). Interactions between oil-spill pollutants and natural stressors can compound ecotoxicological effects. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 635-647.
- 107) Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The prokaryotes*, 3352-3378
- 108) Widdel, F., & Grundmann, O. (2010). Biochemistry of the anaerobic degradation of non-methane alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 909-924.

- 109) Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259-276.
- 110) Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T., & Rabus, R. (2016). Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), 138-151.
- 111) Xu, G., Lu, Q., Yu, L., & Wang, S. (2019). Tetrachloroethene Primes Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in a River Sediment Microcosm. *Water research*.
- 112) Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 257-266.
- 113) Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K., Yanagida A., Katsuragi T., Kanagawa T., Kurane R., & Tani, Y. (2005). Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(2), 143-149.
- 114) Zahir, F., Rizwi, S. J., Haq, S. K., & Khan, R. H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(2), 351-360.
- 115) Zellner, G., Stackebrandt, E., Messner, P., Tindall, B. J., de Macario, E. C., Kneifel, H., Sleytr U. B. & Winter, J. (1989). *Methanocorpusculaceae* fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov. *Archives of microbiology*, 151(5), 381-390.
- 116) Zengler, K., Heider, J., Rosselló-Mora, R., & Widdel, F. (1999). Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new

- strain of *Blastochloris sulfovirens*. *Archives of microbiology*, 172(4), 204-212.
- 117) Zengler, K., Richnow, H. H., Rosselló-Mora, R., Michaelis, W., & Widdel, F. (1999). Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 401(6750), 266.
- 118) Zhang, B., Xu, X., & Zhu, L. (2017). Structure and function of the microbial consortia of activated sludge in typical municipal wastewater treatment plants in winter. *Scientific reports*, 7(1), 17930.
- 119) Zhang, K., Song, L., & Dong, X. (2010). *Proteiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9), 2221-2225.
- 120) Zhang, T., Bain, T. S., Nevin, K. P., Barlett, M. A., & Lovley, D. R. (2012). Anaerobic benzene oxidation by *Geobacter* species. *Applied and environmental microbiology*, 2-469.
- 121) Zwolinski, M. D., Harris, R. F., & Hickey, W. J. (2000). Microbial consortia involved in the anaerobic degradation of hydrocarbons. *Biodegradation*, 11(2-3), 141-158.