



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS  
DEGRADORAS DE HIDROCARBUROS EN SEDIMENTOS  
PROVENIENTES DEL GOLFO DE MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIÓL. LORENA ESCOBAR LIMÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**JURADO EXAMEN DE GRADO**

DRA. ROSA MARÍA PROL LEDESMA

INSTITUTO DE GEOFÍSICA, UNAM

DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

DR. JOHN SELVAMONY ARMSTRONG ALTRIN SAM

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. ADOLFO GRACIA GASCA

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**DETERMINACIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS  
DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS EN SEDIMENTOS PROVENIENTES DEL  
GOLFO DE MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIÓL. LORENA ESCOBAR LIMÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**JURADO EXAMEN DE GRADO**

DRA. ROSA MARÍA PROL LEDESMA

INSTITUTO DE GEOFÍSICA, UNAM

DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

DR. JOHN SELVAMONY ARMSTRONG ALTRIN SAM

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. ADOLFO GRACIA GASCA

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2020

## **Agradecimientos institucionales.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente, al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por la formación académica y profesional brindada.

Al Instituto de Biotecnología (UNAM) y al Laboratorio del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, por sus instalaciones, equipo y material brindado para la realización de este proyecto.

A los miembros del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), por permitirme ser parte de su proyecto de investigación, así como por sus observaciones y comentarios.

A la Dra. Katy Juárez López, por la orientación, el apoyo, las enseñanzas y el tiempo dedicado en la dirección de este proyecto de tesis. Así como, permitirme ser partícipe de su grupo de investigación.

A mi comité tutor y jurado de tesis: Dra. Rosa María Prol Ledesma, Dra. Rocio Jetzabel Alcántara Hernández, Dr. John Selvamony Armstrong Altrin Sam, Dr. Adolfo Gracia Gasca, Dr. Luis Arturo Soto González, por sus comentarios, observaciones y propuestas para mejorar este proyecto.

A la Dra. Paloma Lara Figueroa y al Dr. Alejandro Estradas Romero, por el apoyo técnico brindado en este proyecto de investigación, además de las enseñanzas, la orientación y el crecimiento profesional.

A la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología, por su apoyo en el análisis bioinformático efectuado en este proyecto de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la duración del programa de Maestría.

Al Consorcio de Investigación del Golfo de México, proyecto 201441 CONACyT-SENER-Hidrocarburos, por el apoyo económico brindado para la finalización de este trabajo.

*“Necesitamos enseñar a que la duda no sea temida, sino bienvenida y debatida. No hay problema en decir: ‘No lo sé’ ”.*

*Richard Feynman*

## Índice de Contenido

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. El petróleo y sus características. ....	1
1.2. Degradación microbiana de los hidrocarburos. ....	2
1.3. Los biosurfactantes y su papel en la degradación de hidrocarburos. ....	7
2. ANTECEDENTES .....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	11
5. OBJETIVO GENERAL.....	11
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
7. ÁREA DE ESTUDIO .....	12
8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	14
8.1. Muestreo de sedimento marino. ....	14
8.2. Desarrollo del crecimiento bacteriano de muestras provenientes de sedimento marino..	16
8.3. Determinación de curvas de reducción de Fe(III) a Fe(II) por el método de Ferrozina. ....	17
8.4. Determinación de curvas de crecimiento para aislado bacteriano.....	17
8.5. Prueba para la detección de acción biosurfactante por la técnica “oil spreading”. ....	18
8.6. Prueba para detectar formación de emulsión bacteriana. ....	18
8.7. Extracción de DNA, amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S RNA.....	19
8.8. Asignación taxonómica.....	21
8.9. Construcción de dendograma para aislado bacteriano. ....	21
8.10. Técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) para evaluar degradación de hidrocarburos. ....	21
9. RESULTADOS .....	22
9.1. Desarrollo del crecimiento bacteriano de muestras provenientes de sedimento marino..	23
9.2. Cultivos enriquecidos. ....	25
9.2.1. Determinación de curvas de reducción de Fe(III) por el método de Ferrozina. ....	25
9.2.2. Detección de acción biosurfactante por la técnica “oil spreading” en muestras bacterianas. ....	28
9.2.3. Detección de formación de emulsión bacteriana. ....	31

9.2.4.	Abundancia relativa en muestras bacterianas.....	32
9.3.	Aislamiento de <i>Pelosinus sp. A1</i> .....	37
9.3.1.	Determinación de curvas de crecimiento del aislado bacteriano <i>Pelosinus sp. A1</i> .....	41
9.3.2.	Detección de acción biosurfactante por la técnica oil spreading. ....	42
9.3.3.	Detección de formación de emulsión bacteriana. ....	44
9.3.4.	Técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) para evaluar degradación de hidrocarburos. ....	45
10.	DISCUSIÓN.....	47
11.	CONCLUSIONES .....	52
12.	PERSPECTIVAS .....	53
13.	REFERENCIAS.....	54
	APÉNDICES .....	64
	Apéndice A. Medios de cultivo requeridos para el crecimiento bacterias anaerobias.....	64
	Medio Citrato Férrico.....	64
	Medio Marino Citrato Férrico. ....	66
	Medio de cultivo Nutrient Broth Fumarate .....	68
	Apéndice B. Pruebas para Detectar Producción de Biosurfactantes. ....	70
	Técnica Oil Spreading.....	70
	Apéndice C. Pruebas para Detectar Formación de Emulsión Bacteriana. ....	71
	Técnica Porcentaje de emulsión (%E48) .....	71

## Índice de Figuras.

Figura 1. Ruta de degradación aerobia de hidrocarburos (Tomado y modificado de Díaz, 2004 y Ladino-Orjuela et al., 2016).....	3
Figura 2. Ruta de degradación anaerobia de hidrocarburos (Tomado y modificado de Holliger y Zehnder, 1996 y Ladino-Orjuela et al., 2016).....	6
Figura 3. Localización de las instalaciones de exploración y producción (recuadros anaranjados), así como, de los pozos petroleros (círculos azules) en el territorio mexicano. Tomado y modificado de CartoCrítica, 2019 ( <a href="https://cartocritica.giscloud.com/map/403485/gestin-ambiental-de-mxico">https://cartocritica.giscloud.com/map/403485/gestin-ambiental-de-mxico</a> )..	13
Figura 4. Campaña Oceanográfica Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1). Estaciones de muestreo del sedimento marino del Golfo de México durante marzo de 2016. Las marcas turquesa indican la zona de Perdido y las marcas color verde indican la zona de Coatzacoalcos. Tomado de Google Earth Pro, 2018. ....	14
Figura 5. Presencia de crecimiento en la estación A1. De izquierda a derecha: medio de cultivo NBF-mezcla queroseno:crudo sin inculo; medio de cultivo NBF con mezcla de queroseno:crudo inoculado con el organismo denominado Pelosinus sp. A1. Es posible observar el cambio de coloración en el medio líquido, de incoloro a verde amarillento. ....	25
Figura 6. Observación de reducción del medio marino citrato férrico con hidrocarburo ultraligero de las muestras A1 y D18. De izquierda a derecha: medio de cultivo sin inocular con su coloración base en café-rojizo. Triplicados de las muestras A1 y D18, la reducción de Fe(III) se puede observar debido a que las muestras perdieron coloración.....	26
Figura 7. Curvas de reducción de Fe(III) de diferentes muestras bacterianas inoculadas en medio marino citrato férrico (MMCF) con hidrocarburo ultraligero. ....	27
Figura 8. Observación de reducción del medio marino citrato férrico con hidrocarburo ultraligero de las muestras B9, D15 y N1. De izquierda a derecha: medio de cultivo sin inocular con su coloración base en café-rojizo. Triplicados de las muestras B9, D15 y N1, la reducción de Fe(III) se puede observar debido a que las muestras están perdieron coloración.....	27
Figura 9. Curvas de reducción de Fe(III) de muestras bacterianas inoculadas en medio marino citrato férrico (MMCF) con hidrocarburo ultraligero.....	28
Fig. 10. Resultados positivos de la prueba “oil spreading” para detección de biosurfactantes. ....	30
Figura 11. Emulsiones producidas por las muestras bacterianas D18 (A) y B5 (B). De izquierda a derecha: SDS 1% y 0.5%, sobrenadante concentrado y, sobrenadante diluido. ....	32
Figura 12. Gel de agarosa 0.8% que muestra la calidad de amplificación. A1_a: Consorcio A1 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero; A1_b: Consorcio A1 en MMCF con Hidrocarburo ligero; B5_a: Consorcio B5 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero; B5_b: Consorcio B5 en MMCF con Hidrocarburo ligero; D18_a: Consorcio D18 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero, D18_b: Consorcio D18 en MMCF con Hidrocarburo ligero. Cuarto carril (en medio): Marcador peso molecular.....	33

Figura 13. Abundancia relativa de los consorcios bacterianos A1, B5 y D18 a nivel de género. MMCF-Lig (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ligero), MMCF-Ult (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ultraligero). .....	35
Figura 14. Abundancia relativa (1%) de los consorcios bacterianos A1, B5 y D18 a nivel de género. MMCF-Lig (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ligero), MMCF-Ult (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ultraligero). .....	36
Figura 15. Gel de agarosa 0.8% que muestra la purificación de la PCR del aislado Pelosinus sp. A1. 1: NBF con lactato-casaminoácidos; 2: NBF con hidrocarburo ultraligero-casaminoácidos; 3: NBF con hidrocarburo ligero-casaminoácidos. ....	37
Figura 16. Dendograma del aislado bacteriano Pelosinus sp. A1 (círculos de color) y su relación con otras especies del género Pelosinus tomadas de la base de datos del NCBI. (NBF: Nutrient Broth Fumarate; Lac: lactato; cac: casaminoácidos; Lig: hidrocarburo ligero; Ult: hidrocarburo ultraligero). ....	39
Figura 17. Dendograma que muestra la relación filogenética cercana entre las cepas de Pelosinus A1 y B5 (recuadro rojo), obtenidas de sedimentos marinos del Golfo de México durante la campaña oceanográfica Metagenómica Malla Fina (MMF-1), en marzo de 2016. ....	40
Figura 18. Morfología de la bacteria Pelosinus sp. A1 obtenida por microscopía de fluorescencia. 41	
Figura 19. Espora del aislado bacteriano Pelosinus sp. A1 obtenida por microscopía de fluorescencia. La última imagen (derecha) pertenece a la publicación de Shelobolina et al. (2007). .....	41
Figura 20. Curva de crecimiento de Pelosinus sp. A1 en medio de cultivo NBF con diferentes donadores de electrones. ....	42
Figura 21. Resultados positivos de la prueba oil spreading para detección de biosurfactantes. ....	43
Figura 22. Emulsiones producidas por el aislado Pelosinus sp. A1. De izquierda a derecha: SDS 1% y 0.5%; sobrenadante concentrado y sobrenadante diluido. ....	45
Figura 23. Cromatograma que muestra como la cepa Pelosinus B5-A es capaz de llevar a cabo una degradación de hidrocarburos con 15 días de crecimiento (picos en color rojo). ....	46
Figura 24. Cromatograma que muestra como la cepa Pelosinus B5-A es capaz de llevar a cabo una degradación de hidrocarburos con 28 días de crecimiento (picos en color rojo). ....	46

## Índice de Cuadros.

Tabla 1. Registro de datos de las estaciones de muestreo generados durante la campaña oceanográfica Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1). .....	15
Tabla 2. Medios mínimos salinos y sus aceptores-donadores de electrones [Apéndice A]. .....	16
Tabla 3. Condiciones y programa para la técnica de PCR utilizados en los cultivos enriquecidos. ...	19
Tabla 4. Condiciones y programa para la técnica de PCR utilizados en el aislado bacteriano.....	20
Tabla 5. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio marino citrato férrico (MMCF) con diferentes donadores de electrones. ....	23
Tabla 6. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio citrato férrico (CF) con diferentes donadores de electrones. ....	24
Tabla 7. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio Nutrient Broth Fumarate (NBF) con diferentes donadores de electrones. ....	24
Tabla 8. Diámetros de la zona clara (mm) resultantes de la prueba de biosurfactantes en muestras bacterianas con 10 días de crecimiento.....	29
Tabla 9. Diámetros de la zona clara (mm) resultantes de la prueba de biosurfactantes en muestras bacterianas con 25 días de crecimiento.....	30
Tabla 10. Porcentaje de emulsión obtenido en las muestras bacterianas después de 45 días de crecimiento. ....	31
Tabla 11. Diámetros de la zona clara resultantes de la prueba de biosurfactantes pertenecientes a <i>Pelosinus</i> sp. A1.....	43
Tabla 12. Diámetros de la zona clara resultantes de la prueba de biosurfactantes pertenecientes a <i>Pelosinus</i> sp. A1.....	43
Tabla 13. Porcentaje de emulsión obtenido del aislado bacteriano <i>Pelosinus</i> sp. A1.....	44

## RESUMEN

Los hidrocarburos están comúnmente presentes en ambientes marinos tanto de forma natural como por fuentes antropogénicas. Estos compuestos son altamente tóxicos en diversos ecosistemas y son considerados contaminantes prioritarios. La contaminación por hidrocarburos en el ambiente marino es atenuada naturalmente por la degradación bacteriana, tanto aerobia como anaerobia. La degradación aerobia ha sido extensamente estudiada, mientras que, el conocimiento en la degradación anaerobia ha sido limitado a un pequeño número de microorganismos. El principal objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias anaerobias degradadoras de hidrocarburos presentes en sedimentos marinos del Golfo de México.

Se analizaron un total de 10 muestras de sedimento marino, distribuidas en el noroeste y sur del Golfo de México. Las muestras se cultivaron y resembraron en medios para metaloreductores y enriquecidos con distintas fracciones de petróleo. Después de seis resiembras se realizó la identificación bacteriana mediante la secuenciación masiva de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA. Los géneros dominantes fueron *Clostridium* y uno relacionado con el grupo Incertae\_Sedis, pertenecientes a la clase Clostridia.

Se aisló una cepa con una relación filogenética cercana a la especie *Pelosinus fermentans*, la cepa podría tener la capacidad de degradar hidrocarburos debido a su crecimiento en presencia de estos compuestos. *Pelosinus fermentans* no ha sido reportada en ambientes marinos ni en presencia de hidrocarburos. Por ello, se analizó la capacidad de la cepa aislada y de los cultivos enriquecidos, para producir biosurfactantes y bioemulsionantes. Los resultados positivos sugieren que estos microorganismos tienen la capacidad de mejorar la remoción del hidrocarburo y, por consiguiente, hacer disponible su degradación al reducir la tensión superficial del contaminante.

## ABSTRACT

Hydrocarbons are commonly present in marine environments by natural and anthropogenic sources. These compounds are highly toxic in various ecosystems and are considered priority pollutants. Hydrocarbon pollution in the marine environment is naturally attenuated by bacterial degradation, aerobic and anaerobic. Aerobic degradation has been extensively studied, while knowledge on anaerobic degradation has been limited to a small number of microorganisms. The main objective of this work was to isolate and identify anaerobic hydrocarbon degrading bacteria present in marine sediments of the Gulf of Mexico.

A total of 10 samples of marine sediment, distributed in the northwest and south of the Gulf of Mexico, were analyzed. The samples were grown and reseeded in media for metalloreducers and enriched with different petroleum fractions. After six reseedings, bacterial identification was performed by massive sequencing of the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. The dominant genera were *Clostridium* and one related to the Incertae\_Sedis group, belonging to the Clostridia class.

A strain with a phylogenetic relationship closely related to the *Pelosinus fermentans* species was isolated, the strain could have the ability to degrade hydrocarbons due to its growth in the presence of these compounds. *Pelosinus fermentans* has not been reported in marine environments or in the presence of hydrocarbons. As such, the ability of the isolated strain and of the enriched cultures to produce biosurfactants and bioemulsifiers. The positive results propose that these microorganisms have the ability to improve hydrocarbon removal and, consequently, make their degradation available by reducing the contaminant surface tension.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Golfo de México es una región con los más grandes reservorios de petróleo del mundo, donde la contaminación por hidrocarburos en este ambiente se debe principalmente a actividades antrópicas como relacionadas con su exploración, almacenaje, transporte, fugas y explosiones; así como también, puede darse por emanaciones naturales. La región sur del Golfo de México, especialmente la zona costera, representa una de las áreas más productivas de petróleo crudo y gas natural, por lo tanto, presenta una gran infraestructura para la explotación, la exploración y el transporte (García-Cuéllar *et al.*, 2004). La zona de aguas profundas (Provincia Salina del Istmo), también es una región productora de gas natural y petróleo crudo. En esta zona se puede encontrar desde aceite pesado a extra-pesado en la zona suroriental, y aceite super-ligero y gas no asociado en la vecindad con el Cinturón Plegado Catemaco (Yañez Silva *et al.*, 2014). El noroeste del Golfo de México, principalmente la zona de Cinturón Plegado Perdido, se han identificado emanaciones naturales de crudo y filtraciones de aceite. Aunque estos hallazgos se han registrado en territorio estadounidense, en el territorio mexicano también se han observado manchas de crudo en la superficie del mar (Ruíz *et al.*, 2003; Yañez Silva *et al.*, 2014; Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2015).

### 1.1. *El petróleo y sus características.*

El petróleo es definido como cualquier mezcla de gas natural, condensado y aceite crudo. Los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos (compuestos químicos que contienen hidrógeno y carbono, en una relación aproximada de 2:1, respectivamente), y estos representan del 50 al 98% con relación a la composición total. Otros elementos como el azufre (0-10%), el nitrógeno (0-1%) y el oxígeno (0-5%) están presentes en cantidades menores, ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales (Botello, 2005; Okoh, 2006).

Los hidrocarburos pueden ser clasificados dentro de componentes saturados de cadena lineal (alcanos), componentes cíclicos (cicloalcanos), componentes con doble enlace C-C (alquenos), componentes con triple enlace C-C (alquinos) y los hidrocarburos aromáticos mono y policíclicos (Heider *et al.*, 1999; Botello, 2005).

Los hidrocarburos aromáticos y alifáticos son los mayores constituyentes del petróleo crudo y las fuentes fósiles. Dos de los grupos más grandes de hidrocarburos aromáticos son, los componentes monocíclicos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, como el naftaleno, antraceno y fenantreno (Holliger y Zehnder, 1996).

### 1.2. *Degradación microbiana de los hidrocarburos.*

El catabolismo de los hidrocarburos se consideraba un proceso dependiente de oxígeno desde antes de la década de los 1980's. Lo anterior se basaba en que, el oxígeno molecular es incorporado a la molécula de hidrocarburo por la actividad de una enzima oxigenasa, dando paso al proceso oxidativo (Chakraborty y Coates, 2004).

Las enzimas participantes en las rutas de degradación de hidrocarburos alifáticos, como los alcanos, son las monooxigenasas; mientras que los hidrocarburos aromáticos son atacados por mono y dioxigenasas (Heider *et al.*, 1999). Las dioxigenasas catalizan la adición de dos grupos hidroxilo, mientras que, las monooxigenasas catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en el hidrocarburo (Fuentes *et al.*, 2014).

El proceso de la degradación aeróbica de hidrocarburos puede ser dividido en dos fases. Las rutas superiores, donde el primer paso es una oxidación catalizada por las monooxigenasas o las dioxigenasas, de forma que, los átomos de oxígeno se insertan en el anillo aromático. Posteriormente se producen dihidrodioles, finalizando con la formación de intermediarios centrales, que pueden ser catecoles o componentes no catecólicos. En cuanto a las rutas inferiores, se presenta la desaromatización de los intermediarios centrales, seguido de la

división del anillo hasta la formación de ácidos tricarboxílicos (Chakraborty y Coates, 2004; Ladino-Orjuela *et al.*, 2016) [Figura 1].

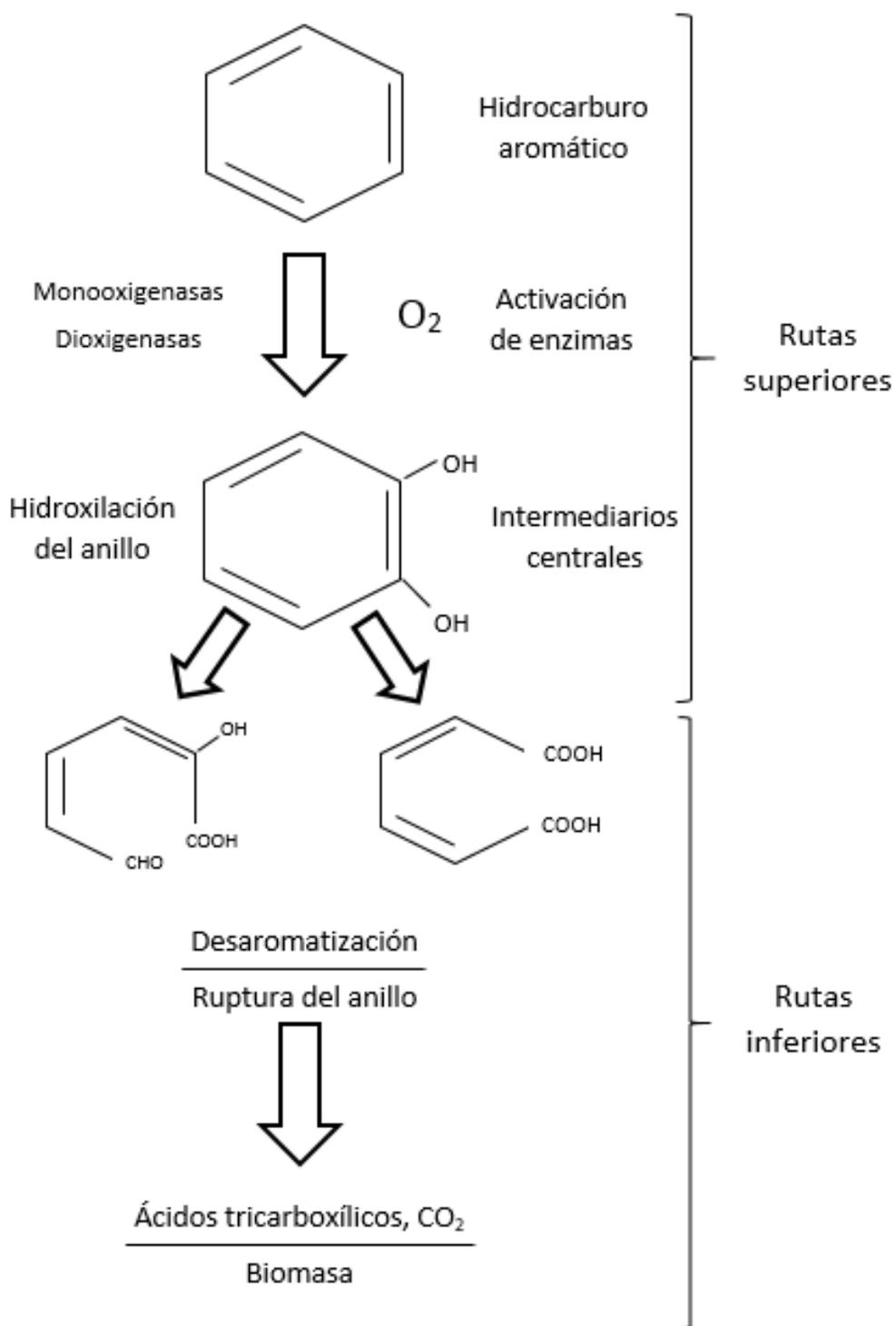


Figura 1. Ruta de degradación aerobia de hidrocarburos (Tomado y modificado de Díaz, 2004 y Ladino-Orjuela *et al.*, 2016).

Los hidrocarburos también pueden ser degradados por microorganismos anaerobios. Esto es de gran importancia con respecto a los hidrocarburos que llegan al sedimento marino donde hay una baja o nula concentración de oxígeno. Además estos organismos tienen la capacidad de degradar los compuestos del petróleo, desde los simples hasta los recalcitrantes. Las bacterias anaeróbicas tienen la capacidad de utilizar sustratos no sólo en forma pura, también en complejas mezclas de hidrocarburos, como el petróleo crudo; por lo que, resulta ser una prometedora alternativa en procesos de biorremediación (Holliger y Zehnder, 1996; Heider et al., 1999).

La biodegradación anaeróbica de hidrocarburos también puede ser dividida en rutas superiores y rutas inferiores. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, la conservación de energía es realizada por la respiración con nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), hierro (Fe(III)), manganeso (Mn(IV)) o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) que actúan como aceptores de electrones terminales (Heider et al., 1999; Spormann y Widdel, 2000; Widdel y Rabus, 2001; Okoh, 2006; Chakraborty y Coates, 2004; Ladino-Orjuela et al., 2016; Varjani, 2016). Se han aislado bacterias desnitrificantes, reductoras de sulfato y reductoras de manganeso y hierro, con la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos o alifáticos simples en condiciones anóxicas. De igual forma, se ha demostrado la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en ausencia de oxígeno, con nitrato como aceptor de electrones (Balagurusamy, 2005).

Las rutas superiores de la degradación anaerobia comienzan con la activación de los hidrocarburos, catalizada por sintasas, dehidrogenasas y carboxilasas. Posteriormente, se forman los diferentes intermediarios centrales, dentro de los más comunes se puede encontrar a benzoil-CoA. Las rutas inferiores comienzan con la desaromatización de los intermediarios centrales, siendo reacciones oxidativas o reductivas. El siguiente paso es la división del anillo, que es una reacción reductiva y; finalmente, se producen los ácidos tricarbóxicos (Chakraborty y Coates, 2004; Ladino-Orjuela et al., 2016) [Figura 2].

Se ha demostrado que tolueno, benceno, etilbenceno, xileno, hexadecano y naftaleno pueden ser oxidados bajo condiciones anaerobias (Chakraborty y Coates, 2004). La mezcla de compuestos conocida generalmente como BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xileno)

es típicamente removida en el mismo rango por ambos tipos de metabolismos: el aeróbico y el anaeróbico. Bajo el metabolismo anaeróbico estos componentes son primeramente oxidados a fenoles o ácidos orgánicos, después son transformados a grandes cadenas de ácidos grasos volátiles, y finalmente, son metabolizados a CH<sub>4</sub> o CO<sub>2</sub> (Varjani, 2016).

Por otro lado, los microorganismos anaerobios que degradan hidrocarburos pueden dividirse en dos grupos. El primer grupo incluye anaerobios facultativos, en particular microorganismos reductores de nitrato, hierro y manganeso. El segundo grupo comprende a los anaerobios estrictos, como sulfato reductores. Las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, pueden usar principalmente hidrocarburos como fuente de carbono y de electrones. Se han reportado cepas bacterianas reductoras de nitrato y de sulfato capaces de degradar anaeróbicamente alcanos y diferentes hidrocarburos monoaromáticos (Heider *et al.*, 1999; Grishchenkov *et al.*, 2000; Spormann y Widdel, 2000). En sedimentos anóxicos marinos, las reducciones de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Mn(IV) y Fe(III) son los principales procesos de aceptores de electrones terminales (Dell'Anno *et al.*, 2009).

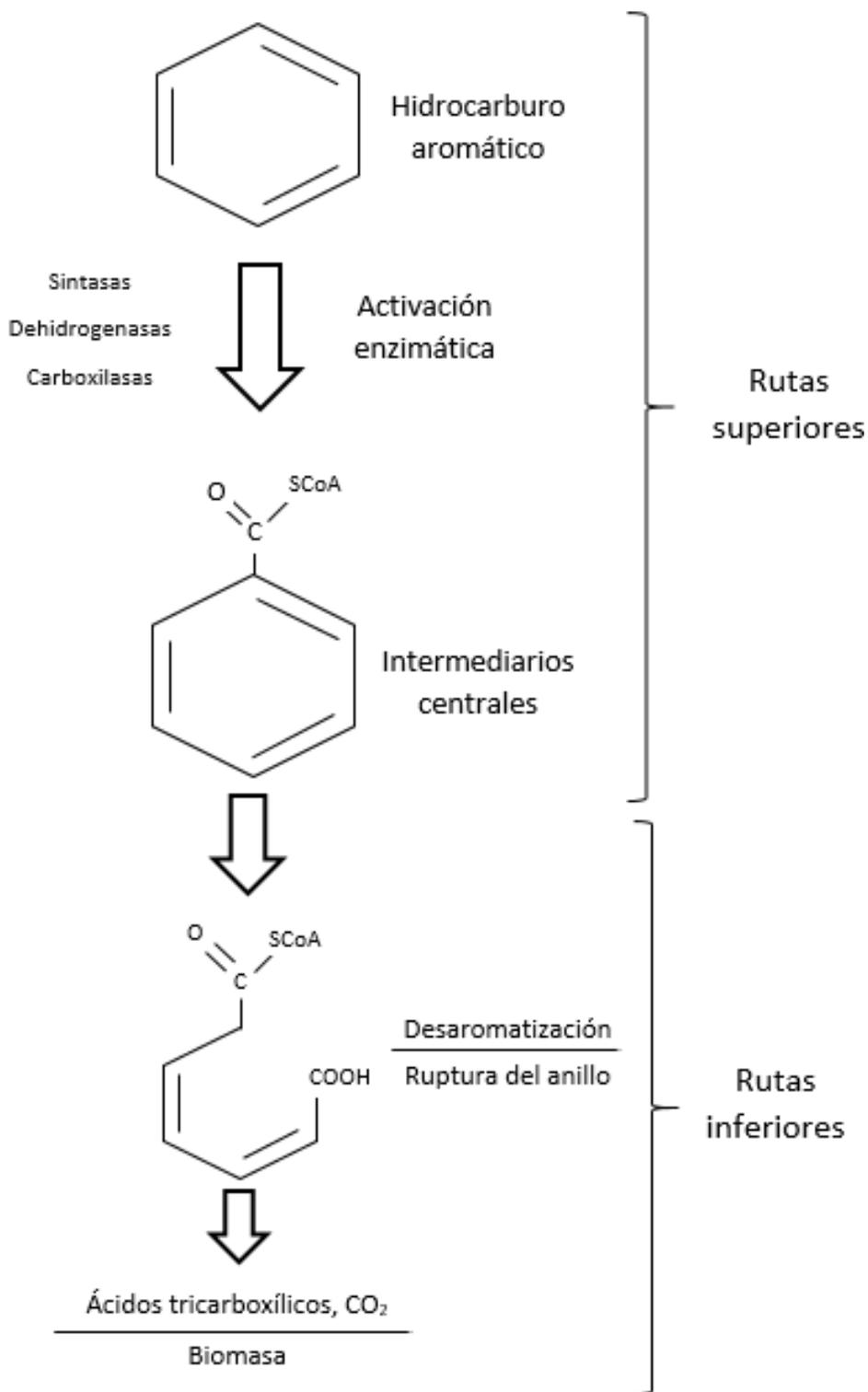


Figura 2. Ruta de degradación anaerobia de hidrocarburos (Tomado y modificado de Holliger y Zehnder, 1996 y Ladino-Orjuela et al., 2016).

### 1.3. *Los biosurfactantes y su papel en la degradación de hidrocarburos.*

La liberación de hidrocarburos al ambiente ya sea natural o antropogénica, ha creado la necesidad de buscar e implementar técnicas de biorremediación en los sistemas acuáticos y terrestres. Una técnica que parece ser prometedora en la degradación de hidrocarburos contempla el uso de compuestos de superficie activa producidos por microorganismos que favorecen su posterior degradación.

Los compuestos de superficie activa provenientes de microorganismos pueden ser divididos en dos tipos, i) los biosurfactantes que reducen la tensión superficial entre la fase aire-agua y ii) los compuestos bioemulsionantes que reducen la tensión interfacial entre líquidos inmiscibles o entre la interfase sólido-líquido. Los biosurfactantes pueden llegar a presentar actividad emulsionante, en cambio, los bioemulsionantes no necesariamente se comportan como biosurfactantes (Bodour y Miller-Maier, 1998; Youssef *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2017).

Entre los bioemulsionantes y los biosurfactantes, probablemente sean estos últimos los mayormente empleados en la investigación de la degradación de hidrocarburos, debido a que a menudo, los derrames de petróleo son tratados con surfactantes sintéticos para dispersar el petróleo y acelerar su mineralización (Batista *et al.*, 2006). Otras aplicaciones que pueden tener los biosurfactantes es la remediación de metales y compuestos orgánicos, la mejora del transporte de las bacterias y la formación de un biofilm, la reducción de la alta viscosidad del petróleo crudo, la limpieza de los tanques de almacenaje del crudo, y el incremento del flujo a través de pipas, entre otros (Bodour & Miller-Maier, 1998; Youssef *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2017).

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que se producen extracelularmente o como parte de la membrana celular del microorganismo, y que presentan una amplia variedad estructural, como glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas de ácidos grasos, lípidos neutrales, fosfolípidos, entre otros (Ayed *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2017). Los biosurfactantes al igual que sus equivalentes químicos pueden reducir la tensión superficial,

mejorando la remoción del contaminante hidrofóbico por el aumento en su solubilidad. Como consecuencia, éstos hacen más disponible su degradación. Sin embargo, a diferencia de los surfactantes, presentan una menor o nula toxicidad, son biodegradables y pueden producirse *in situ* (Youssef *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2006; Ayed *et al.*, 2015).

## 2. ANTECEDENTES

El Golfo de México se ha convertido en un foco de contaminación recurrente debido a la exploración y explotación petrolera que se practica en sus aguas. Los derrames y fugas provocados por estas actividades han alertado a la comunidad científica formulando múltiples investigaciones debido al alto impacto ambiental negativo que se provoca (Murawski *et al.*, 2019).

Lizárraga-Partida *et al.* (1982) midieron la proporción de bacterias hidrocarbonoclasticas contra las heterótrofas (HDB/HAB) después de presentarse el derrame petrolero en el pozo Ixtoc-I en 1979, y presentaron esta relación como un indicador del grado de impacto ocasionado por la presencia de hidrocarburos en el ambiente. Bozada Robles y Namihira-Santillán (2005), cuantificaron la concentración de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en sedimentos superficiales de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, después del derrame de diciembre de 2004, y mencionan que, los compuestos aromáticos de 2 y 3 anillos encontrados en el sitio, tienden a degradarse con mayor facilidad en el sedimento por diversos procesos de disipación como evaporación, dispersión o biodegradación, los cuales son bastante acentuados en la cuenca del Río Coatzacoalcos.

En el año 2010, al noroeste del Golfo de México, se presenció un derrame en la plataforma *Deepwater Horizon* (DWH), de la British Petroleum (BP). Este incidente produjo interés para conocer el impacto de los hidrocarburos en la diversidad biológica del Golfo de México, Atlas y Hazen (2011) hicieron una comparación entre el derrame del Exxon Valdez y la DWH, encontrando que, los microorganismos autóctonos fueron capaces de degradar los

compuestos hidrocarburos. Por otra parte, Kostka *et al.* (2011) caracterizaron los taxas degradadores de petróleo en la Playa Pensacola, zona que fue impactada en mayor medida por el derrame de la DWH. Posterior al derrame del 2010, Beazley *et al.* (2012) analizaron las comunidades bacterianas de las marismas y confirmaron que los grupos degradadores de hidrocarburos mantenían una relación proporcional con la concentración de hidrocarburos. Soto *et al.* (2017) evaluaron la presencia y abundancia de nemátodos en la Zona Económica Exclusiva de México, debido a que este organismo es un bioindicador de toxinas específicas como los hidrocarburos del petróleo. Salcedo *et al.* (2017) analizaron las propiedades de las comunidades macro-bentónicas, así como su variabilidad espaciotemporal dentro de aguas mexicanas del noroeste del Golfo de México, también analizaron metales traza e hidrocarburos policíclicos aromáticos en los sedimentos de las comunidades estudiadas.

Con el surgimiento de las técnicas moleculares para la extracción de DNA ambiental y la secuenciación masiva de ácidos nucleicos se ha generado una gran cantidad de datos de organismos presentes en el Golfo de México, ayudando de esta manera a ampliar las investigaciones afines al derrame de la DWH. Chakraborty *et al.* (2012) buscaron la interacción entre los microorganismos y el petróleo, los gases y el dispersante utilizado durante el derrame, así como también, mostraron la diversidad genómica de la degradación microbiana. Kimes *et al.* (2013) realizaron el análisis metagenómico y el perfil de metabolitos de muestras de sedimentos de aguas profundas después del derrame de petróleo, para conocer si la exposición a hidrocarburos resulta en una alteración de la estructura de la comunidad microbiana. King *et al.* (2013) evaluaron la composición, diversidad y estructura filogenética de la comunidad bacteriana del norte del Golfo de México, mediante la pirosecuenciación de amplicones del gen 16S rRNA. Mason *et al.* (2014), investigaron el impacto del petróleo depositado, posterior al DWH, en comunidades microbianas de sedimentos superficiales mediante secuenciación de genes de 16S rRNA, secuenciación metagenómica y experimentos de mineralización con marcaje  $^{14}\text{C}$ .

En el laboratorio donde se lleva a cabo este proyecto, anteriormente, se ha trabajado con sedimentos provenientes del Golfo de México. Ramírez *et al.* (2019) realizaron un análisis

de la diversidad bacteriana, mediante pirosecuenciación, de los sedimentos superficiales de la plataforma y el talud continental del noroeste del Golfo de México y señalaron aquellos géneros con genes involucrados en rutas metabólicas de la degradación de compuestos contaminantes. Godoy-Lozano *et al.* (2018) describieron la abundancia, riqueza y diversidad bacteriana a nivel taxonómico de género de muestras de sedimentos superficiales del suroeste del Golfo de México. Compararon sus resultados contra otras muestras de sedimento de distintos puntos geográficos del mundo, encontrando que la abundancia de los filotipos dominantes es similar pero la estructura de la comunidad es variable. También encontraron abundancias diferenciales de posibles bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras poco profundas contra muestras más profundas del suroeste del Golfo de México, sugiriendo con esto, que los hidrocarburos influyen en la estructura de la comunidad bacteriana.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México existen pocos reportes acerca de los microorganismos de sedimentos marinos con capacidades metabólicas que permitan la degradación de hidrocarburos en derrames a gran escala en aguas profundas como los que han ocurrido en años pasados (Joye, 2015; King *et al.*, 2015). La explosión de la plataforma petrolífera semisumergible Deepwater Horizon, el 20 de abril de 2010 en el Golfo de México, generó interés por entender el comportamiento y las consecuencias provocadas por los derrames petroleros. Es a partir de este desastre ambiental, que en nuestro país se conforma el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), el cual concentra diversos proyectos, incluida la presente investigación.

El actual proyecto, enfoca su importancia en conocer la diversidad bacteriana del ecosistema, principalmente de los sedimentos marinos, con capacidad de degradar hidrocarburos y minimizar los derrames petroleros. Es por ello que esta investigación busca conocer la diversidad bacteriana de los sedimentos marinos y su potencial en el catabolismo

de hidrocarburos. De igual forma, se aplicaron algunas técnicas para estudiar si la diversidad bacteriana tiene la capacidad de producir compuestos tensoactivos, tales como biosurfactantes y bioemulsionantes, los cuales ayudan en la remoción y mejoran la disponibilidad de contaminantes hidrofóbicos, como son los hidrocarburos, para las bacterias.

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- Debido a la escasa información de bacterias degradadoras de hidrocarburos en el Golfo de México (zona de Perdido y zona de Coatzacoalcos) ¿se podrán aislar e identificar las bacterias anaerobias a partir de sedimentos, capaces de degradar hidrocarburos? Esto con el fin de remediar a futuro los derrames a gran profundidad.
- ¿Qué identidad taxonómica tendrán estas cepas con potencial de degradación anaerobia de hidrocarburos?

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar bacterias anaerobias degradadoras de hidrocarburos presentes en sedimentos marinos del Golfo de México.

#### 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer la diversidad bacteriana presente en los sedimentos marinos del Golfo de México (zonas muestreadas) mediante la extracción de DNA total y la secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA.

2. Aislar bacterias anaerobias a partir de los sedimentos marinos muestreados del Golfo de México que puedan presentar capacidades para la degradación del petróleo crudo o sus fracciones.
3. Detectar la acción de producción biosurfactante y bioemulsionante de bacterias anaerobias provenientes de sedimentos marinos del Golfo de México.

## 7. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de México es una cuenca semicerrada, cuyo litoral recorre desde la península de Florida hasta la península de Yucatán con una distancia de 4,000 km, integrando una compleja combinación de hábitats.

Geológicamente, es una provincia distributiva integrada por un área sedimentaria de  $5.40 \times 10^6$  km<sup>2</sup>, la cual incluye 159,980 km de ríos, sobresaliendo el río Mississippi (Estados Unidos) y el río Grijalva-Usumacinta (México), considerados los mayores sistemas fluviales de Norteamérica; también incluye un área de acumulación de  $1.6 \times 10^6$  km<sup>2</sup>. El 36% del área total de la provincia es agua y el 64% lo constituyen formaciones rocosas continentales. La plataforma continental es casi continua y se encuentra geológica y fisiográficamente vinculada con la masa continental. Es amplia frente a las planicies costeras y relativamente estrecha a la altura de los sistemas montañosos paralelos a la costa.

En la región noroccidental del Golfo, la capa de mínimo oxígeno se encuentra a una concentración de 2.0 mL L<sup>-1</sup> entre los 200 y 600 m de profundidad. En la región del sur, el mínimo de oxígeno es de 2.4 mL L<sup>-1</sup>, a partir de los 200 m y es afectado por los giros anticiclónicos. Durante el verano, el calentamiento de las aguas superficiales alcanza sus niveles máximos, las aguas del norte alcanzan temperaturas superiores a los 28 °C, la parte central 29.7 °C y la parte suroriental alcanza los 28.9 °C; mientras que, en invierno, la temperatura de las aguas superficiales descienden hasta los 19 °C en la región noroccidental



## 8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 8.1. Muestreo de sedimento marino.

Las muestras de sedimento marino del Golfo de México fueron obtenidas en la campaña oceanográfica Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1) a bordo del Buque Oceanográfico Justo Sierra, realizada el mes de marzo de 2016. El total de puntos de muestreo utilizados en este trabajo fue de diez estaciones, que a su vez se agruparon en dos zonas, una de ellas localizada en el Noroeste del Golfo de México denominada como Zona Perdido y la otra ubicada hacia el Sureste del Golfo de México denominada Zona Coatzacoalcos. La finalidad de elegir estos puntos de muestro fue para conocer y comparar el grado de influencia de los hidrocarburos según la zona, así como su relación con las comunidades bacterianas [Figura 4].

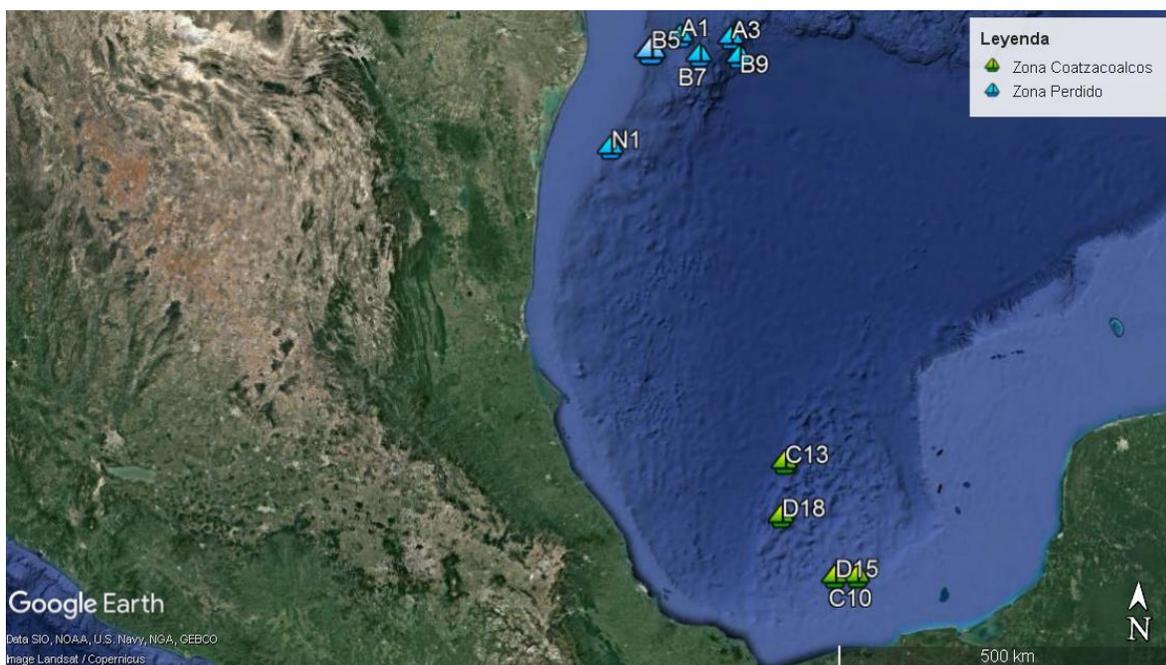


Figura 4. Campaña Oceanográfica Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1). Estaciones de muestreo del sedimento marino del Golfo de México durante marzo de 2016. Las marcas turquesa indican la zona de Perdido y las marcas color verde indican la zona de Coatzacoalcos. Tomado de Google Earth Pro, 2018.

Las estaciones de muestreo variaron con respecto a la profundidad de la columna de agua, de 550 hasta 2,946 m [Tabla 1]. Las muestras de sedimento marino fueron obtenidas con ayuda de un nucleador de caja, a una profundidad mayor de 10 cm partiendo de la superficie del sedimento, asegurando de esta forma condiciones de anaerobiosis en el muestreo.

Tabla 1. Registro de datos de las estaciones de muestreo generados durante la campaña oceanográfica Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1).

Zona	Estación	Etiqueta	Fecha	Hora (GTM)	Matris	Latitud N inicial	Longitud W inicial	Profundidad columna de agua (m)
Perdido	N1	MMF-1	04/03/2016	00:20:00	sedimento	24°26.738'	96°45.379'	606
Perdido	A1	MMF-1	04/03/2016	21:04:00	sedimento	25°52.820'	95°50.381'	879
Perdido	A3	MMF-1	05/03/2016	15:04:00	sedimento	25°52.571'	95°8.104'	2390
Perdido	B9	MMF-1	06/03/2016	11:50:00	sedimento	25°38.199'	95°1.283'	2946
Perdido	B5	MMF-1	11/03/2016	15:23:00	sedimento	25°38.389'	96°14.71'	550
Perdido	B7	MMF-1	13/03/2016	02:15:00	sedimento	25°38.506'	95°34.386'	1210
Coatzacoalcos	C10	MMF-1	24/03/2016	00:27:17	sedimento	19°10.278'	93°18.034'	717
Coatzacoalcos	C13	MMF-1	18/03/2016	01:25:00	sedimento	20°35.791'	94°18.792'	1887
Coatzacoalcos	D18	MMF-1	18/03/2016	07:12:00	sedimento	19°55.513'	94°20.348'	1320
Coatzacoalcos	D15	MMF-1	19/03/2016	07:31:00	sedimento	19°9.903'	93°36.169'	622

El procesamiento de las muestras a bordo del crucero oceanográfico se realizó con ayuda de jeringas de plástico de 5 mL que fueron clavadas en el sedimento de cada estación de muestreo, el sedimento de la jeringa fue resuspendido en botellas con solución salina anaerobia, posteriormente con la mezcla resultante, se inocularon tubos de vidrio en tres distintos medios mínimo salinos anaerobios, bajo dos condiciones, con hidrocarburo y sin hidrocarburo, como donadores de electrones [Tabla 2]. Las muestras se inocularon por duplicado y se almacenaron bajo condiciones de oscuridad, manteniéndolas a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio. Los diferentes medios de cultivo que se utilizaron para inocular las muestras de sedimento marino fueron seleccionados debido a que el

laboratorio donde se llevó a cabo este proyecto los trabajaba con anterioridad, pues sus investigaciones se han especificado en microorganismos metal-reductores [Apéndice A].

Tabla 2. Medios mínimos salinos y sus aceptores-donadores de electrones [Apéndice A].

Medio de cultivo	Aceptor de electrones	Donador de electrones	
		Con hidrocarburo	Sin hidrocarburo
Citrato férrico (CF)	Fe(III)	Queroseno : Crudo (2:1)	Lactato [0.02 M] final
Medio Marino Citrato Férrico (MMCF)	Fe(III)	[0.5 %] final	Acetato [0.02 M] final
Nutrient Broth Fumarate (NBF)	Fumarato		

## 8.2. Desarrollo del crecimiento bacteriano de muestras provenientes de sedimento marino.

Las muestras de sedimento marino se trasladaron al laboratorio perteneciente al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (UNAM) en Cuernavaca, Morelos.

En el laboratorio se llevaron a cabo las resiembras, por lo general mensuales, de cada muestra con su duplicado, utilizando los mismos medios de cultivo que se emplearon en el buque oceanográfico [Tabla 2]. Para realizar las resiembras, se utilizaron tubos de vidrio con medio de cultivo anaerobio (burbujeado con  $N_2:CO_2$ ) [Apéndice A], el inóculo fue adicionado con ayuda de jeringas previamente gaseadas con una mezcla de  $N_2:CO_2$  (en proporción 80:20). Al igual que en el muestreo, se manejaron dos condiciones de donador de electrones, la primera fue una mezcla de queroseno con petróleo crudo a una concentración final de 0.5%; mientras que, en la otra se utilizó lactato y acetato a una concentración final de 0.02 M en el medio de cultivo [Tabla 2]. Todas las muestras se incubaron a una temperatura de 30°C, bajo condiciones de oscuridad y se registró su desarrollo.

Las resiembras se realizaron aproximadamente seis veces hasta conseguir un crecimiento continuo, descartando aquellas muestras que no crecieron. Las muestras que presentaron características particulares fueron aisladas para estudiar con mayor detalle. Los donadores

de electrones posteriormente se remplazaron por distintas fracciones de hidrocarburos como fueron, hidrocarburo ultraligero (40 °API), hidrocarburo ligero (35 °API) e hidrocarburo medio (16-20 °API), la concentración final varió según el hidrocarburo.

### 8.3. *Determinación de curvas de reducción de Fe(III) a Fe(II) por el método de Ferrozina.*

Para determinar la reducción de Fe(III) en los cultivos enriquecidos se realizó la determinación de Fe(II) o reducción por el método de ferrozina (Coppi *et al.*, 2001). Las muestras fueron inoculadas en Medio Marino Citrato Férrico (MMCF) [Apéndice A] con hidrocarburo ultraligero [0.2%], como donador de electrones. La lectura del ensayo se llevó a cabo cada 24 horas durante 12 días. Con base en el resultado de las curvas de reducción de Fe(III) se cuantificó la producción de Fe(II) que se puede emplear como un método indirecto de la evaluación del crecimiento bacteriano de las muestras.

### 8.4. *Determinación de curvas de crecimiento para aislado bacteriano.*

Se construyeron curvas de crecimiento mediante densidad óptica a 600 nm (Moe *et al.*, 2012), para encontrar el sustrato más adecuado que permita un crecimiento bacteriano.

Para la determinación de las curvas de crecimiento el aislado bacteriano fue inoculado en medio de cultivo Nutrient Broth Fumarate (NBF) [Apéndice A], bajo distintas condiciones de fuentes de carbono; lactato [0.02M], acetato [0.02M], mezcla de lactato-acetato [1:1], y sin fuentes de carbono.

8.5. *Prueba para la detección de acción biosurfactante por la técnica “oil spreading”.*

Se realizó la técnica “oil spreading” (Youssef *et al.*, 2004) [Apéndice B] al cultivo celular y a los sobrenadantes de los cultivos enriquecidos de las muestras que formaron espuma después de ser agitadas, con el fin de detectar acción biosurfactante. Las muestras fueron inoculadas con distintos donadores de electrones; glucosa [1%], lactato [0.02M], casaminoácidos [0.2%], hidrocarburo ultraligero [0.2%] e hidrocarburo ligero [0.2%]. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. El fundamento de esta técnica consiste en probar si un cultivo bacteriano o su sobrenadante pueden romper la tensión superficial entre la fase líquida y el hidrocarburo, mejorar la remoción del contaminante y, por consiguiente, hacer disponible su degradación. El resultado se consideró positivo cuando se formó una zona clara sobre la superficie del petróleo y su registro se realizó con base en la medición del diámetro de dicha zona.

8.6. *Prueba para detectar formación de emulsión bacteriana.*

La técnica para detectar acción emulsionante (Batista *et al.*, 2006) [Apéndice C], fue realizada con el sobrenadante bacteriano de las muestras, así como una dilución de este (1:10). La medición de la altura de la emulsión formada en cada muestra fue tomada después de 48 horas, este dato es utilizado para obtener el porcentaje de emulsión con la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total del líquido}} (100)$$

Los porcentajes de emulsión de las muestras son comparados con los formados por el surfactante sintético Dodecilsulfato sódico, SDS [1%], si los porcentajes de emulsión de las

muestras resultan cercanos o mayores al porcentaje formado por el surfactante químico, se puede decir que el surfactante biológico es favorable para la remoción de contaminantes.

### 8.7. Extracción de DNA, amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S RNA.

Para la extracción de DNA se utilizó el kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories, Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés), se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen ribosomal 16S ARN, para obtener el mayor número de copias del fragmento indicado; en el caso del aislado bacteriano, se realizó la amplificación completa del gen ribosomal 16S RNA. La técnica fue realizada con ayuda de un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad laboratories, Inc.). Se utilizaron los oligonucleótidos 16S\_FW y 16S\_RV, para la amplificación de las regiones hipervariables V3-V4, y los oligonucleótidos 27F (**AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG**) y 1492R (**CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT**) para la amplificación de las 1500 pb. Se utilizó la polimerasa Phusion Flash II DNA contenida en la mezcla para PCR Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific) [Tabla 3 y 4].

Tabla 3. Condiciones y programa para la técnica de PCR utilizados en los cultivos enriquecidos.

Condiciones		Programa		
Reactivos	Concentraciones	Temperatura	Tiempo (min.)	Ciclos
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	25 µL	95 °C	3:00	1
Oligo 16S_RV	0.5 pm/µL	95 °C	0:25	25
Oligo 16S_FW	0.5 pm/µL	60 °C	0:25	
DNA templado	2 µL	72 °C	0:25	
Agua libre de DNA	20.5 µL	72 °C	5:00	1
		4 °C	∞	∞

Tabla 4. Condiciones y programa para la técnica de PCR utilizados en el aislado bacteriano.

Condiciones		Programa		
Reactivos	Concentraciones	Temperatura	Tiempo (min.)	Ciclos
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	25 µL	95 °C	3:00	1
Oligo 1492R	0.5 pm/µL	95 °C	0:25	25
Oligo 27F	0.5 pm/µL	60 °C	0:25	
DNA templado	0.5 µL	72 °C	0:25	
Agua libre de DNA	22 µL	72 °C	5:00	1
		4 °C	∞	∞

Se evaluó la calidad de la amplificación de los PCR mediante electroforesis de rutina usando un gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X (Tris, Ácido Acético, EDTA) y 2.5 µL de agente intercalante (Epigentek). El gel se cargó con 4 µL de muestra resultante de la amplificación, 1µL de buffer de carga y 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Para la corrida del gel, se utilizó buffer TAE 1X; así como un voltaje de 100V. Para el aislado bacteriano, se realizó una purificación de PCR por banda del gel de electroforesis utilizando GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo de fábrica. La purificación de PCR se verificó mediante electroforesis con un gel de agarosa, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

Una vez evaluada la calidad de la amplificación de los PCR, se enviaron las muestras a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los amplicones de ~450-500 bp se secuenciaron con la tecnología Illumina en formato pareado con configuración de 300 ciclos por lado. Las lecturas con calidad promedio >30 en score phred se usaron para reconstruir el amplicon mediante el programa Flash v1.2.11 (doi: 10.1093/bioinformatics/btr507). Las lecturas no sobrelapantes fueron descartadas para el análisis posterior. Por otro lado, las muestras del aislado bacteriano fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología.

#### 8.8. *Asignación taxonómica.*

Las secuencias extendidas se anotaron taxonómicamente mediante su comparación por megablast (pipeline Parallel-meta v2.4.1 doi: 10.1371/journal.pone.0089323) contra una base de datos integrada por SILVA, RDP y GreenGenes, incluida en la paquetería Metaxa2 v2.1 (doi: 10.1111/1755-0998.12399). Los conteos crudos se integraron en matrices de abundancias a diferentes niveles taxonómicos normalizando en porcentaje de abundancia relativa. Finalmente, para la visualización y exploración de la anotación taxonómica, se generaron gráficas interactivas con el paquete KronaTools v2.7 (doi: 10.1186/1471-2105-12-385) a partir de las matrices de conteos crudos.

Las secuencias obtenidas del aislado bacteriano fueron alineadas con el editor BioEdit 7.0.5.3 (mbio) por alineamiento pareado y fueron comparadas con las secuencias de la base de datos del NCBI empleando el programa nBLAST, para obtener la asignación taxonómica de la muestra bacteriana aislada.

#### 8.9. *Construcción de dendograma para aislado bacteriano.*

Se realizó un dendograma por el método Neighbour-Joining, con ayuda del programa MEGA 7.0.26, las secuencias obtenidas del aislado bacteriano se compararon y agruparon con las secuencias de la base de datos del NCBI con mayor relación de identidad.

#### 8.10. *Técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) para evaluar degradación de hidrocarburos.*

Se realizó un ensayo para medir la degradación de hidrocarburo ultraligero por la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID). Se inocularon triplicados de un aislado bacteriano en medio NBF con hidrocarburo ultraligero, así como,

triplicados de controles negativos del mismo aislado bacteriano (sin hidrocarburo). Las muestras se incubaron a 30 °C y el ensayo se realizó bajo dos tiempos, 15 y 28 días.

## 9. RESULTADOS

En la campaña oceanográfica denominada Metagenómica Malla Fina Uno (MMF-1), se tomaron muestras de columna de agua y de sedimento marino con el fin de realizar estudios metagenómicos y conocer la microbiota de distintos puntos del Golfo de México. Por otro lado, durante la misma campaña, se tomaron muestras de sedimento para enriquecer cultivos bacterianos provenientes de muestras de columna de agua y sedimento bajo condiciones aerobias, por parte de otros grupos de trabajo del consorcio CIGoM.

El grupo de trabajo al que pertenece esta investigación, se enfocó en el estudio de organismos anaerobios provenientes del sedimento superficial (aproximadamente 10 cm de profundidad). Por tanto, la primera inoculación de los medios específicos para aislar bacterias anaerobias se llevó a cabo en el buque oceanográfico (Tabla 2). Las resiembra se realizaron mensualmente y a partir de la sexta resiembra se consideró como un crecimiento continuo y positivo. Posteriormente, se realizó la extracción y secuenciación del DNA con el fin de identificar la diversidad bacteriana presente en las muestras inoculadas con los sedimentos, así como también, se probó la capacidad biosurfactante de las mismas. Estas mismas técnicas se llevaron a cabo en los aislados bacterianos, provenientes de muestras que presentaban características particulares durante su crecimiento.

9.1. *Desarrollo del crecimiento bacteriano de muestras provenientes de sedimento marino.*

Los registros finales de las resiembras bacterianas (después de aproximadamente 10 pases), pertenecientes a las muestras de sedimento obtenidas de diez puntos distintos del Golfo de México [Figura 4] e inoculadas en medios de cultivo anaerobios con diferentes aceptores de electrones [Apéndice A, Tabla 2], muestran que los medios de cultivo marino citrato férrico (MMCF) y citrato férrico (CF), presentan el mayor número de muestras con presencia de crecimiento bacteriano [Tabla 5 y 6]. Mientras que, el medio de cultivo Nutrient Broth Fumarate (NBF), presenta en mayor medida el crecimiento de los sedimentos inoculados de la estación A1 [Tabla7]. Desde las primeras resiembras los sedimentos de la estación A1 sobresalieron del resto de las muestras, particularmente porque presentó un cambio en la coloración del medio de cultivo, de incoloro a una tonalidad verde amarillenta, durante su crecimiento en medio NBF con mezcla queroseno:crudo [Figura 5]. Consecuentemente, este cultivo se purificó mediante aislados en medio sólido NBF con lactato y acetato [0.02M]. Como más adelante se detallará, el aislado bacteriano fue identificado con un 99% de identidad con la especie *Pelosinus fermentans*, por tal motivo, en el desarrollo de esta investigación se denominará como *Pelosinus sp. A1*, así como también, sus resultados se tratarán de manera individual.

Tabla 5. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio marino citrato férrico (MMCF) con diferentes donadores de electrones.

Medio de cultivo	Estaciones									
	A1	A3	B5	B7	B9	C10	C13	D15	D18	N1
MMCFLA						*				
MMCF/ULTRA.	*		*		*	*		*	*	*
MMCF/LIG.	*		*		*	*		*	*	*
MMCF/BACAF	*		*		*	*		*	*	*

Tabla 6. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio citrato férrico (CF) con diferentes donadores de electrones.

Medio de cultivo	Estaciones									
	A1	A3	B5	B7	B9	C10	C13	D15	D18	N1
CFLA	*			*		*	*	*	*	*
CF/ULTRA.			*			*		*		
CF/LIG.			*			*		*		
CF/BACAF			*			*		*		
CF/QC				*		*	*	*	*	*

Tabla 7. Presencia-ausencia de crecimiento bacteriano en medio Nutrient Broth Fumarate (NBF) con diferentes donadores de electrones.

Medio de cultivo	Estaciones									
	A1	A3	B5	B7	B9	C10	C13	D15	D18	N1
NBFLA	*		*		*				*	
NBF/ULTRA.	*									
NBF/LIG.	*									
NBF/BACAF	*									

**Simbología:** (\*) presencia, (recuadro negro) ausencia. (MMCF) medio marino citrato férrico, (CF) medio citrato férrico, (NBF) medio Nutrient Broth Fumarate, (LA) lactato y acetato, (ULTRA) hidrocarburo ultraligero, (LIG.) hidrocarburo ligero, (BACAF) hidrocarburo medio, (QC) mezcla de queroseno y petróleo crudo.



Figura 5. Presencia de crecimiento en la estación A1. De izquierda a derecha: medio de cultivo NBF-mezcla queroseno:crudo sin inocular; medio de cultivo NBF con mezcla de queroseno:crudo inoculado con el organismo denominado *Pelosinus* sp. A1. Es posible observar el cambio de coloración en el medio líquido, de incoloro a verde amarillento.

## 9.2. Cultivos enriquecidos.

### 9.2.1. Determinación de curvas de reducción de Fe(III) por el método de Ferrozina.

De las diez muestras de sedimento que se sembraron en los distintos medios de cultivo se escogieron aquellas que crecieron en Medio Marino Citrato Férrico (MMCF), debido a que este medio de cultivo tuvo un mayor número de estaciones con respuesta positiva bajo la condición de hidrocarburos como donador de electrones [Tabla 5]. Las muestras donde se determinaron las curvas de reducción de Fe(III) mediante el ensayo con ferrozina fueron A1, B5, B9, C10, D15, D18 y N1.

Las estaciones A1 y D18 presentaron una reducción de Fe(III) a Fe(II) mucho más rápida que el resto de los consorcios analizados, además de producir las concentraciones más altas de Fe(II)  $0.03 \text{ M L}^{-1}$  y  $0.039 \text{ M L}^{-1}$ , respectivamente [Figura 7]. De igual forma, estas estaciones mostraron una reducción visual del medio de cultivo a las 48 horas de haber sido inoculadas [Figura 6].

Las estaciones B9, D15 y N1 mostraron una cinética de reducción de Fe(III) mucho más lenta, al igual que concentraciones más bajas de Fe(II) [Figura 8 y 9]. La reducción de Fe(III) a Fe(II) en las estaciones B9 y D15 ocurrió a las 120 horas de haber sido inoculadas a diferencia de las muestras A1 y D18 que sucedió a las 72 horas. En la estación N1, después de 240 horas de monitoreo, no se observa reducción en el medio de cultivo y su cinética continúa en la fase exponencial [Figura 9].



Figura 6. Observación de reducción del medio marino citrato férrico con hidrocarburo ultraligero de las muestras A1 y D18. De izquierda a derecha: medio de cultivo sin inocular con su coloración base en café-rojizo. Triplicados de las muestras A1 y D18, la reducción de Fe(III) se puede observar debido a que las muestras perdieron coloración.

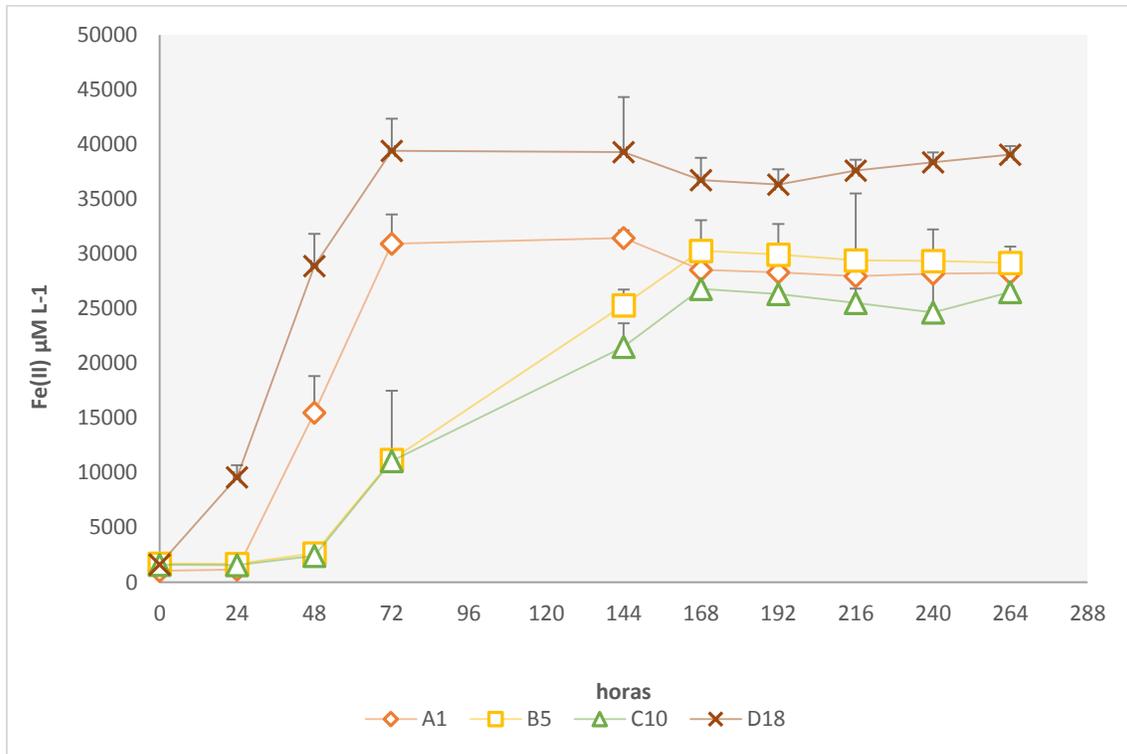


Figura 7. Curvas de reducción de Fe(III) de diferentes muestras bacterianas inoculadas en medio marino citrato férrico (MMCF) con hidrocarburo ultraligero.



Figura 8. Observación de reducción del medio marino citrato férrico con hidrocarburo ultraligero de las muestras B9, D15 y N1. De izquierda a derecha: medio de cultivo sin inocular con su coloración base en café-rojizo. Triplicados de las muestras B9, D15 y N1, la reducción de Fe(III) se puede observar debido a que las muestras están perdiendo coloración.

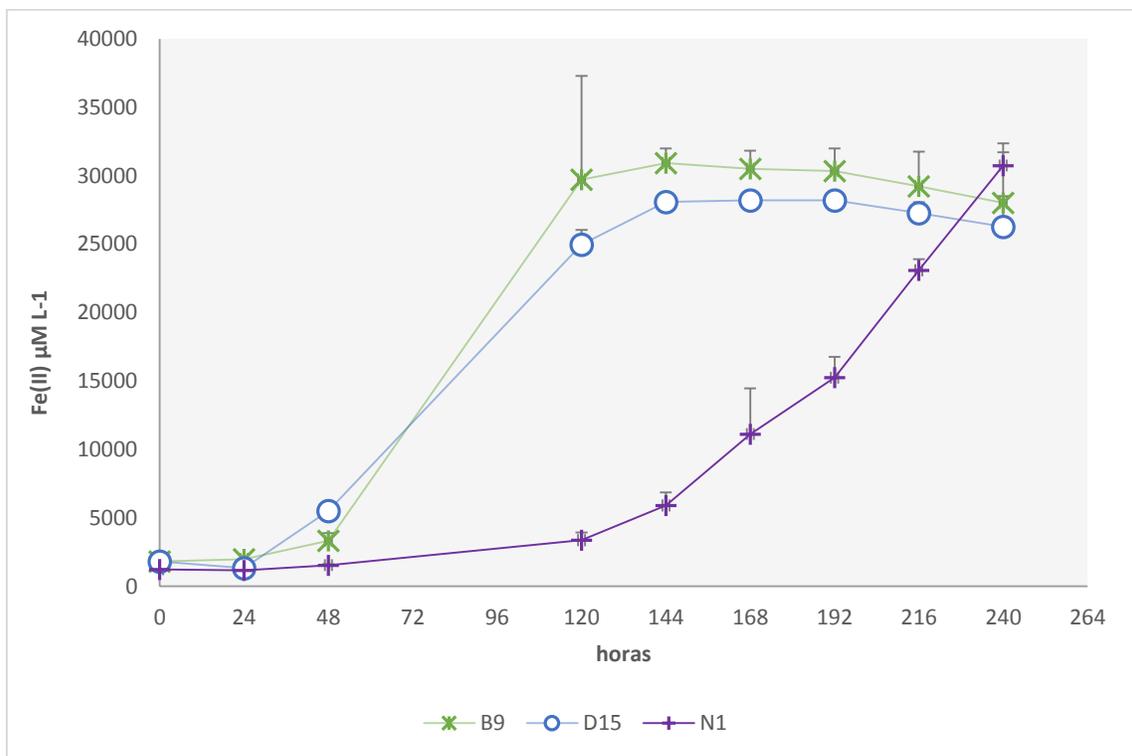


Figura 9. Curvas de reducción de Fe(III) de muestras bacterianas inoculadas en medio marino citrato férrico (MMCF) con hidrocarburo ultraligero.

### 9.2.2. Detección de acción biosurfactante por la técnica “oil spreading” en muestras bacterianas.

A partir de las siete muestras utilizadas en la determinación de curvas de reducción de Fe(III), se escogieron cuatro muestras para realizar la técnica “oil spreading” (Youssef *et al.*, 2004) [Anexo 2], debido a que formaban espuma después de ser agitadas. Las muestras utilizadas para esta técnica fueron A1, B5, B9 y D18.

Las muestras se inocularon en MMCF con glucosa, hidrocarburo ultraligero e hidrocarburo ligero; después de 10 días de crecimiento presentaron resultados positivos para la acción biosurfactante [Figura 10]. La mayoría de las muestras en su condición de cultivo celular presentaron diámetros mayores en comparación con sus sobrenadantes, particularmente,

las estaciones A1 y B9 en sus variantes con hidrocarburo mantuvieron mayores dimensiones de la zona clara [Tabla 8].

Tabla 8. Diámetros de la zona clara (mm) resultantes de la prueba de biosurfactantes en muestras bacterianas con 10 días de crecimiento.

10 días de crecimiento			
Muestra		Cultivo celular	Sobrenadante
		Diámetros de la zona clara (mm)	
<b>A1</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	3	1
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	3	1
	MMCF-Glucosa 1%	1	1
<b>B5</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	1	2
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	1	1
	MMCF-Glucosa 1%	3	1
<b>B9</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	3	1
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	3	3
	MMCF-Glucosa 1%	2	1
<b>D18</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	2	1
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	1	1
	MMCF-Glucosa 1%	---	---

Transcurridos 25 días de crecimiento los diámetros de la zona clara, tanto en la condición del cultivo celular como del sobrenadante, fueron prácticamente homogéneos, así como entre las cuatro diferentes muestras [Tabla 9].

Tabla 9. Diámetros de la zona clara (mm) resultantes de la prueba de biosurfactantes en muestras bacterianas con 25 días de crecimiento.

25 días de crecimiento			
Muestra		Cultivo celular	Sobrenadante
		Diámetros de la zona clara (mm)	
<b>A1</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	7	6
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	5	6
	MMCF-Glucosa 1%	6	6
<b>B5</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	6	5
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	4	4
	MMCF-Glucosa 1%	7	7
<b>B9</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	6	6
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	6	5
	MMCF-Glucosa 1%	5	6
<b>D18</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	5	5
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	5	5
	MMCF-Glucosa 1%	---	---



Fig. 10. Resultados positivos de la prueba "oil spreading" para detección de biosurfactantes.

### 9.2.3. Detección de formación de emulsión bacteriana.

La prueba de detección de emulsión bacteriana se realizó en las mismas muestras utilizadas para la técnica de detección de biosurfactantes (A1, B5, B9, D18), después de 45 días de crecimiento. En la mayoría de las muestras el sobrenadante diluido mantuvo porcentajes de emulsión más grandes que el sobrenadante concentrado.

Los sobrenadantes diluidos de las muestras D18 en MMCF con hidrocarburo ligero y, B5, en sus tres condiciones de ensayo, tienen un porcentaje cercano al que presenta el surfactante sintético SDS [Tabla 10] [Figura 11]. Sin embargo, es importante aclarar que las emulsiones parecen no ser tan estables, debido a que se encuentran precipitadas o floculadas a diferencia de las formadas por el surfactante sintético que se forman en la superficie.

Tabla 10. Porcentaje de emulsión obtenido en las muestras bacterianas después de 45 días de crecimiento.

<b>% DE EMULSIÓN</b>			
<b>Muestra</b>		<b>Sobrenadante concentrado</b>	<b>Sobrenadante diluido (1:10)</b>
		Porcentaje (%)	
<b>A1</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	17.86	25.00
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	17.86	17.86
	MMCF-Glucosa 1%	17.86	28.57
<b>B5</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	25.00	57.14
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	17.86	60.71
	MMCF-Glucosa 1%	17.86	57.14
<b>B9</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	25.00	42.86
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	21.43	32.14
	MMCF-Glucosa 1%	28.57	21.43
<b>D18</b>	MMCF-Ligero (60 µl)	25.00	64.28
	MMCF-Ultraligero (60 µl)	17.86	28.57
	MMCF-Glucosa 1%	---	---
<b>Dodecilsulfato sódico, SDS (1%)</b>		64.29	
<b>Dodecilsulfato sódico, SDS (0.5%)</b>		64.29	

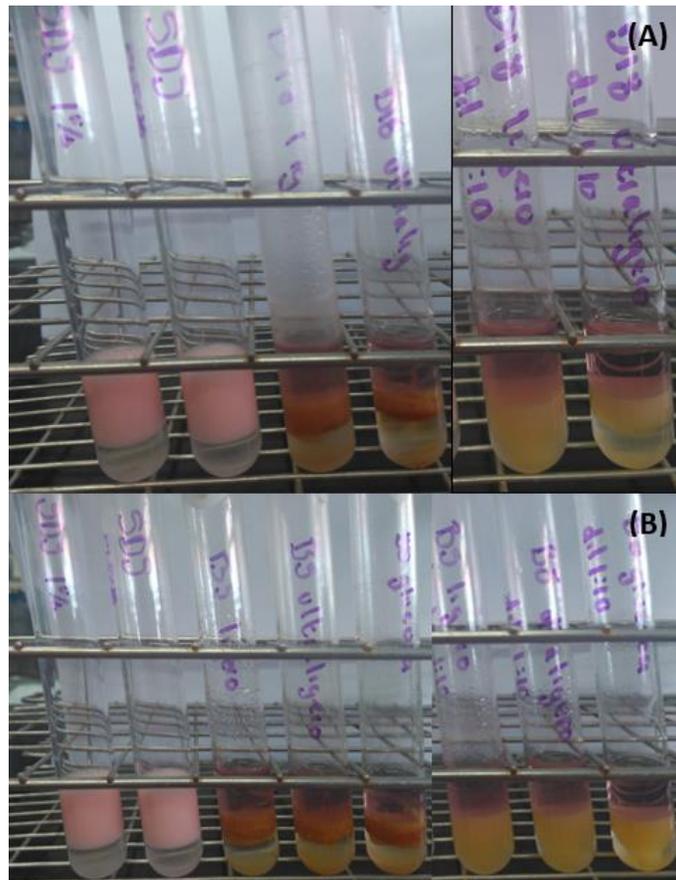


Figura 11. Emulsiones producidas por las muestras bacterianas D18 (A) y B5 (B). De izquierda a derecha: SDS 1% y 0.5%, sobrenadante concentrado y, sobrenadante diluido.

#### 9.2.4. Abundancia relativa en muestras bacterianas.

La extracción de DNA, amplificación y secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4 del gen ribosomal 16S RNA, fue realizada en las muestras A1, B5 y D18, inoculadas en Medio Marino Citrato Férrico con dos distintos hidrocarburos, como donadores de electrones, hidrocarburo ligero e hidrocarburo ultraligero [Figura 12].

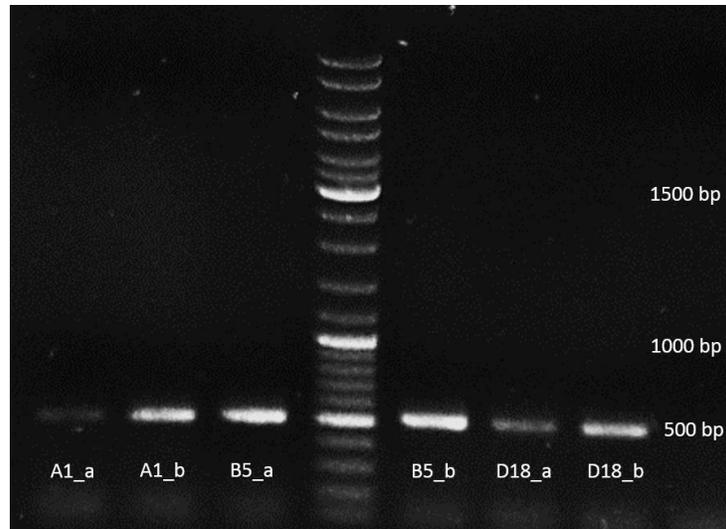


Figura 12. Gel de agarosa 0.8% que muestra la calidad de amplificación. A1\_a: Consorcio A1 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero; A1\_b: Consorcio A1 en MMCF con Hidrocarburo ligero; B5\_a: Consorcio B5 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero; B5\_b: Consorcio B5 en MMCF con Hidrocarburo ligero; D18\_a: Consorcio D18 en MMCF con Hidrocarburo ultraligero, D18\_b: Consorcio D18 en MMCF con Hidrocarburo ligero. Cuarto carril (en medio): Marcador peso molecular.

La identificación de los consorcios bacterianos reveló al filo Firmicutes como el más dominante en las tres estaciones analizadas (A1, B5, D18). El filo Proteobacteria también fue identificado en las muestras bacterianas, pero con un porcentaje bajo (<1%), en la estación A1, 0.07% (hidrocarburo ligero) y 0.1% (hidrocarburo ultraligero), B5 presentó 0.2% (hidrocarburo ligero) y 0.07% (hidrocarburo ultraligero), mientras que, la estación D18 tuvo 0.1% tanto para hidrocarburo ligero como ultraligero.

La clase Clostridia, perteneciente al filo Firmicutes, dominó en casi un 100% en las tres muestras analizadas bajo sus respectivas condiciones de hidrocarburos. La clase más dominante en el filo Proteobacteria fue  $\gamma$ -proteobacteria, representada en la estación A1 con un total de 59% (HC ligero) y 49% (HC ultraligero), en la estación B5 se presentó con 66% (HC ligero) y 63% (HC ultraligero) y, en la estación D18 dominó con un 44% (HC ligero) y 66% (HC ultraligero). Otras clases presentes fueron  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -proteobacteria con porcentajes del 4 al 30%, entre las muestras.

Dentro de Clostridia, el único orden presente en todas las muestras fue Clostridiales. El género representativo fue *Clostridium* (familias Lachnospiraceae y Clostridiaceae), así como, el grupo Incertae\_Sedis (familia Lachnospiraceae) [Figura 13 y 14].

Los órdenes con valores más altos de abundancia dentro de  $\gamma$ -proteobacteria fueron, Oceanospirales, Pseudomonadales, Chromatiales y Alteromonadales. Los géneros más dominantes dentro de estos órdenes fueron, *Halomonas* y *Alcanivorax*, dentro del orden Oceanospirales; *Pseudomonas* (Pseudomonadales); *Allochromatium* (Chromatiales); y los géneros *Idiomarina*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Marinobacter* y *Salinimonas*, perteneciendo al orden Alteromonadales.

Géneros pertenecientes a otras clases Proteobacteria, con valores representativos fueron, *Nitrosomonas* y *Achromobacter* ( $\beta$ -proteobacteria); *Desulfomicrobium* y *Desulfovibrio* ( $\delta$ -proteobacteria); y los géneros *Aquamicrobium*, *Pelagibacter*, *Nitrobacter* y *Paracoccus* ( $\alpha$ -proteobacteria) [Figura 14].

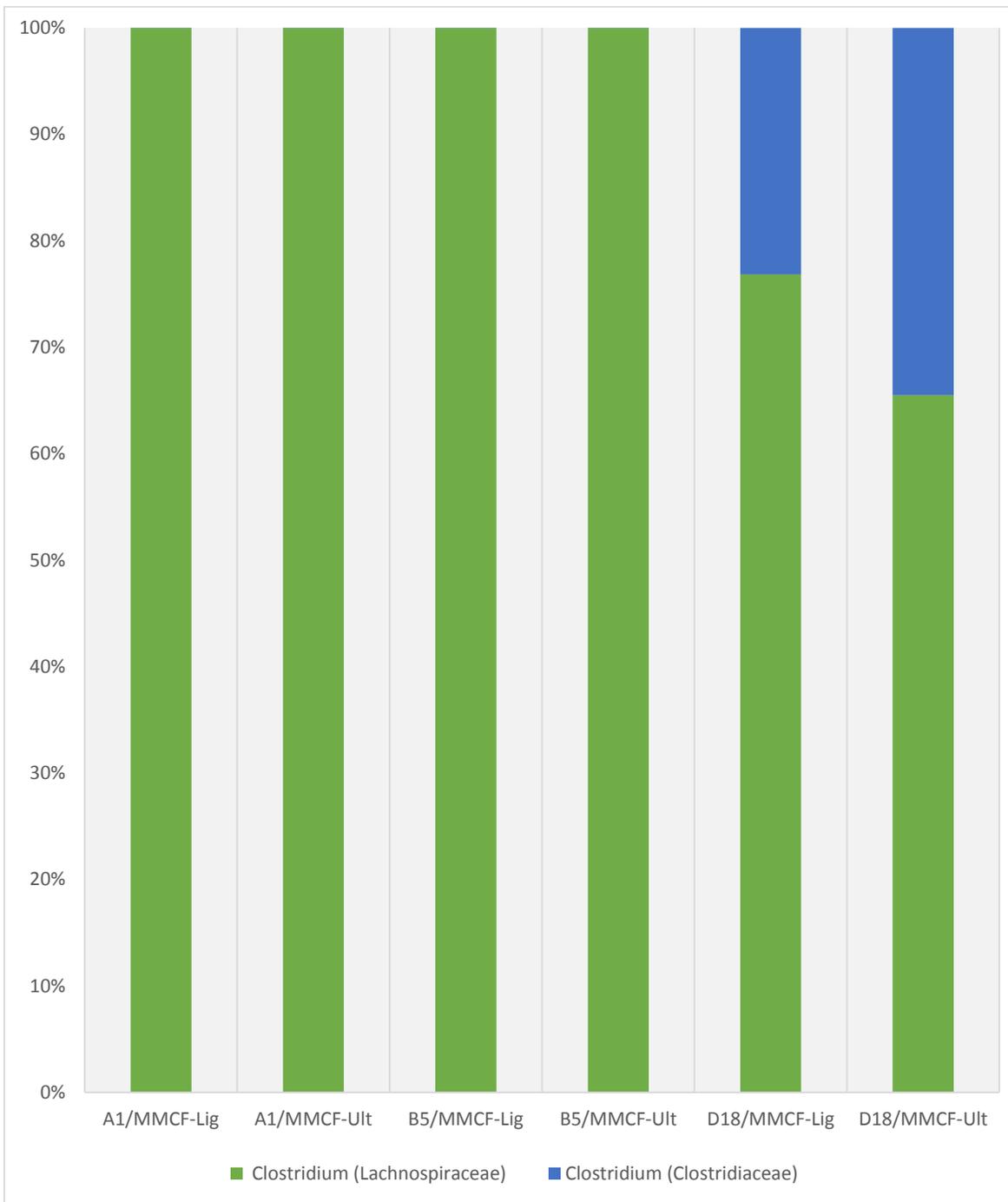


Figura 13. Abundancia relativa de los consorcios bacterianos A1, B5 y D18 a nivel de género. MMCF-Lig (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ligero), MMCF-Ult (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ultraligero).

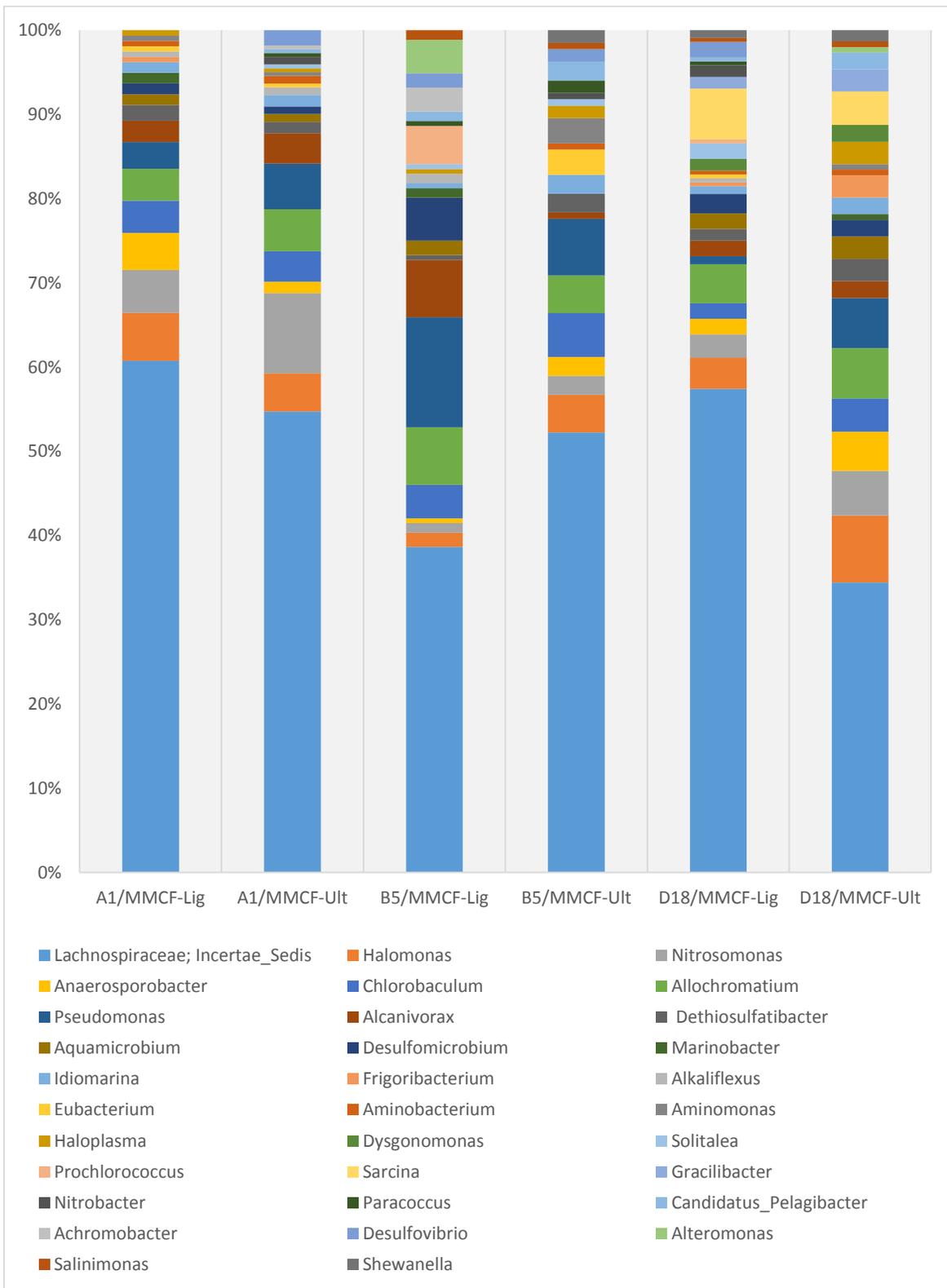


Figura 14. Abundancia relativa (1%) de los consorcios bacterianos A1, B5 y D18 a nivel de género. MMCF-Lig (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ligero), MMCF-Ult (Medio Marino Citrato Férrico-Hidrocarburo Ultraligero).

### 9.3. Aislamiento de *Pelosinus sp. A1*.

Los sedimentos provenientes de la estación A1 presentaron características particulares en su crecimiento al ser inoculados en medio NBF con mezcla queroseno:crudo [Figura 4]. Por tanto, este cultivo se purificó mediante aislados en medio sólido NBF con lactato y acetato [0.02M]. El aislado bacteriano fue identificado con un 99% de identidad con la especie *Pelosinus fermentans*. Para fines prácticos de esta investigación el aislado bacteriano fue denominado *Pelosinus sp. A1*.

Posteriormente, *Pelosinus sp. A1* fue inoculado en medio NBF con diferentes donadores de electrones como, lactato, casaminoácidos, hidrocarburo ultraligero e hidrocarburo ligero. Se realizó la extracción, amplificación y secuenciación completa del gen ribosomal 16S RNA [Figura 15], resultando en un 99% de identidad con *Pelosinus fermentans* JBW45 y con *Pelosinus sp. TM1* [Figura 16].

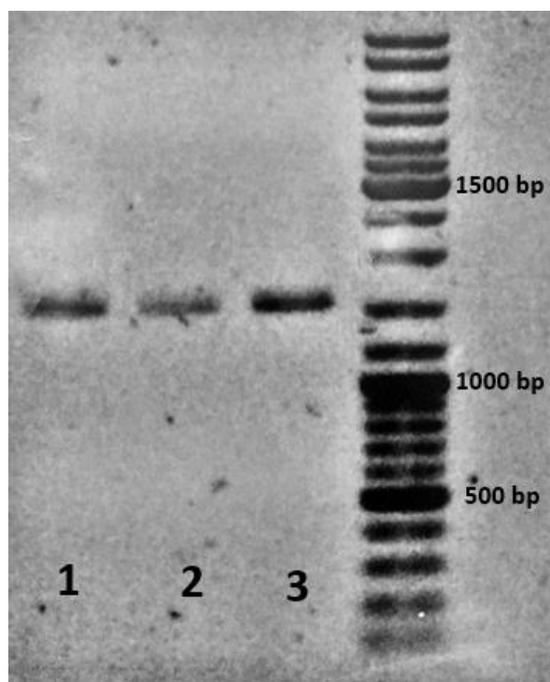


Figura 15. Gel de agarosa 0.8% que muestra la purificación de la PCR del aislado *Pelosinus sp. A1*. 1: NBF con lactato-casaminoácidos; 2: NBF con hidrocarburo ultraligero-casaminoácidos; 3: NBF con hidrocarburo ligero-casaminoácidos.

Dentro del mismo proyecto al que pertenece esta investigación, se aisló y secuenció otra cepa del género *Pelosinus*, la cual se denominó como B5-A, debido a que proviene de la estación B5 de la misma campaña oceanográfica (MMF-1). Esta cepa mantiene un 99% de identidad con la especie *Pelosinus fermentans*, al igual que *Pelosinus sp.* A1.

El aislado *Pelosinus sp.* A1 y *Pelosinus* B5-A mantienen un porcentaje de identidad alto (99%) con la especie *Pelosinus fermentans* JBW45, así como con la cepa, *Pelosinus sp.* TM1. A su vez, ambos aislados presentan una relación filogenética cercana (99% de identidad) [Figura 17].

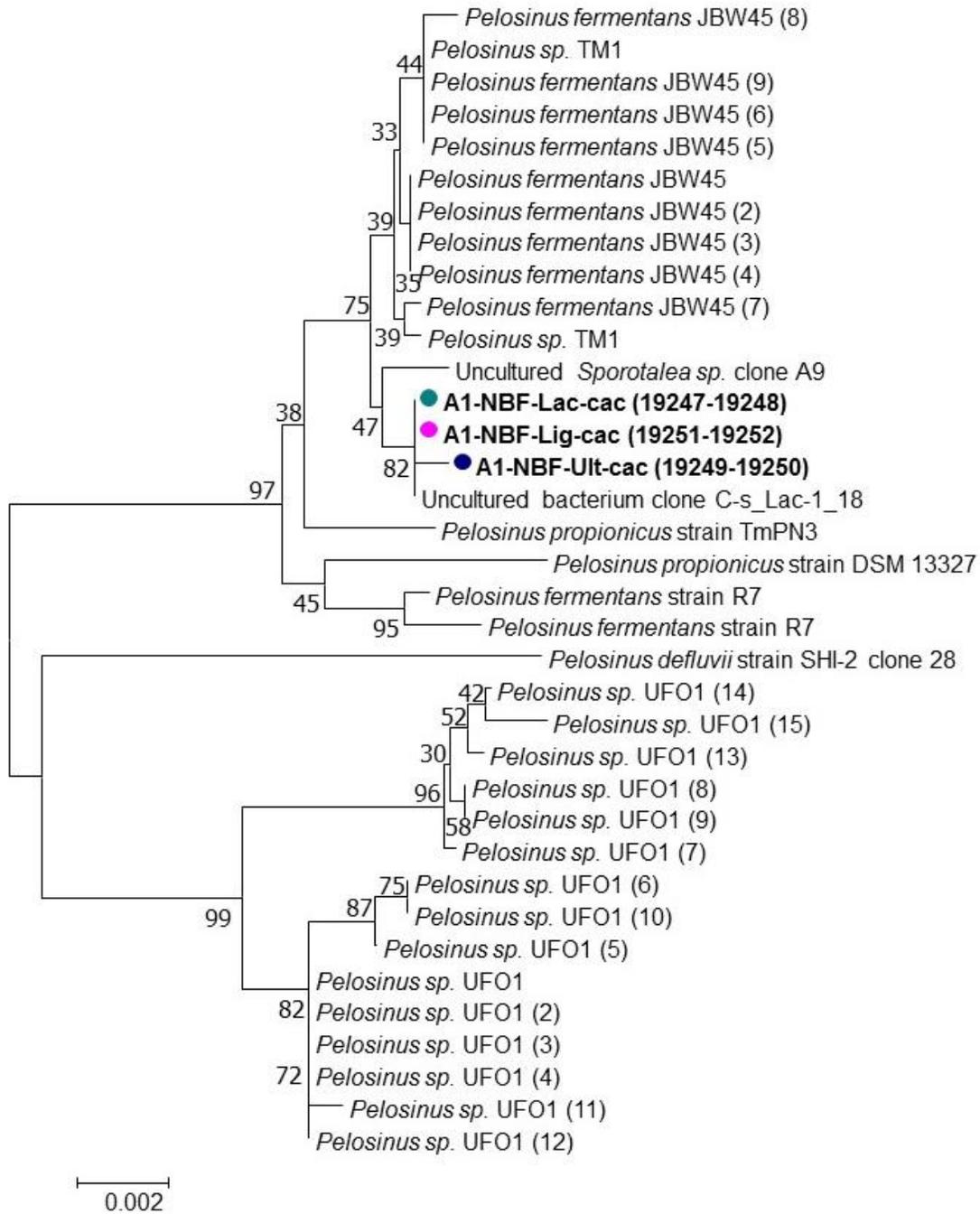


Figura 16. Dendrograma del aislado bacteriano *Pelosinus* sp. A1 (círculos de color) y su relación con otras especies del género *Pelosinus* tomadas de la base de datos del NCBI. (NBF: Nutrient Broth Fumarate; Lac: lactato; cac: casaminoácidos; Lig: hidrocarburo ligero; Ult: hidrocarburo ultraligero).

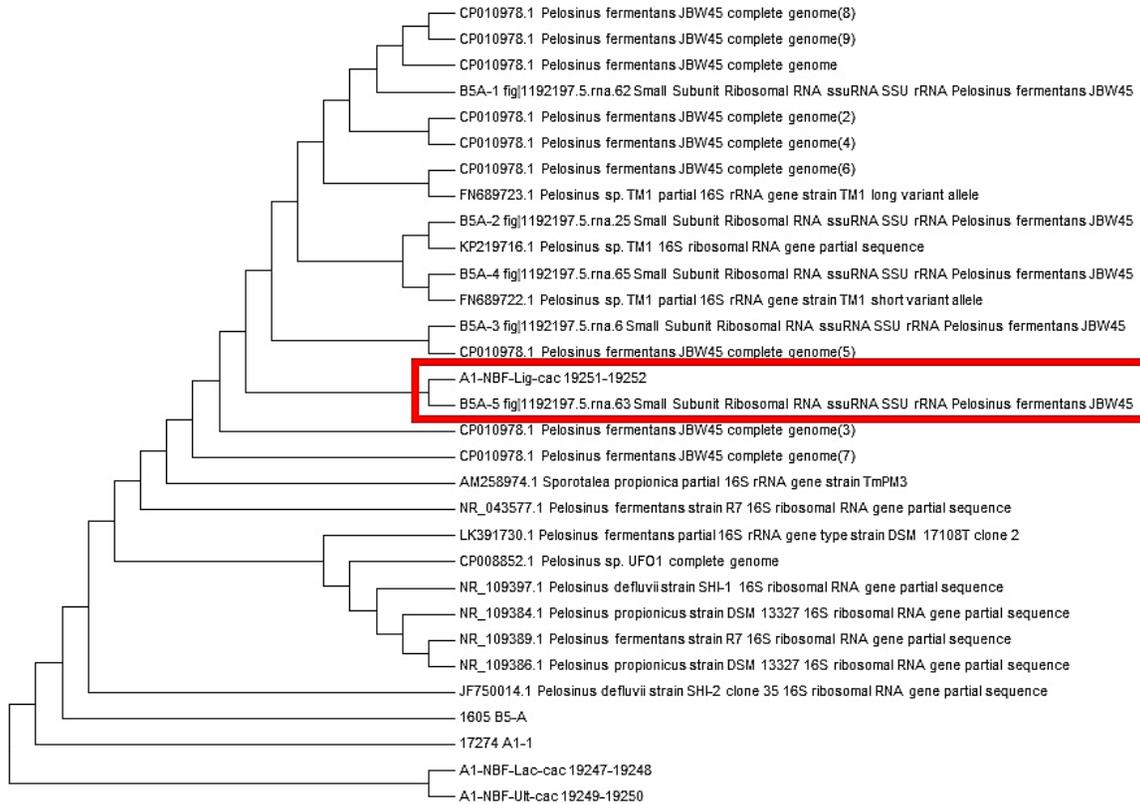


Figura 17. Dendrograma que muestra la relación filogenética cercana entre las cepas de *Pelosinus* A1 y B5 (recuadro rojo), obtenidas de sedimentos marinos del Golfo de México durante la campaña oceanográfica Metagenómica Malla Fina (MMF-1), en marzo de 2016.

Como parte de la descripción del aislado bacteriano *Pelosinus* sp. A1, se llevó a cabo microscopía de fluorescencia utilizando como marcadores de fluorescencia DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), y el marcador FM4-64 (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide). DAPI es utilizado para teñir el DNA de células vivas y fijadas, mientras que, FM4-64 es marcador de membranas vacuolares. De este modo se logró observar la morfología del microorganismo y sus esporas, como lo indican Shelobolina *et al.* (2007) [Figura 18 y 19].

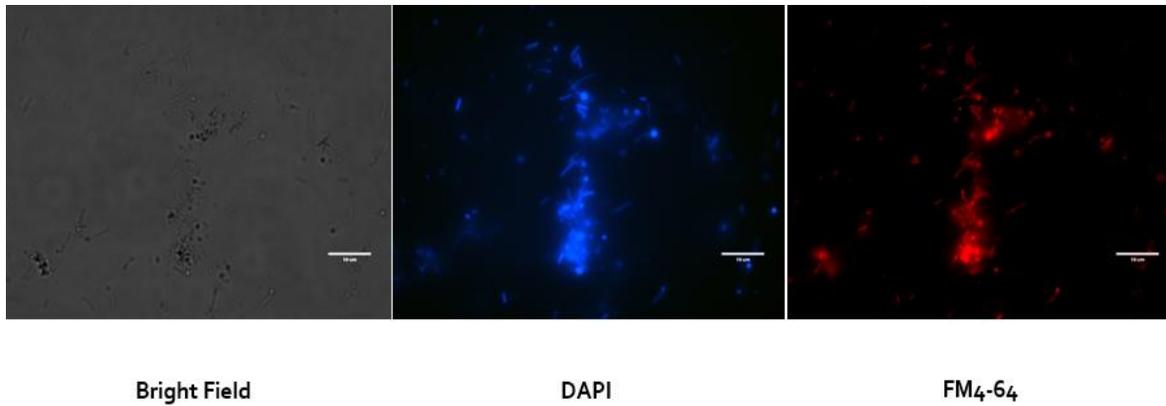


Figura 18. Morfología de la bacteria *Pelosinus sp. A1* obtenida por microscopía de fluorescencia.

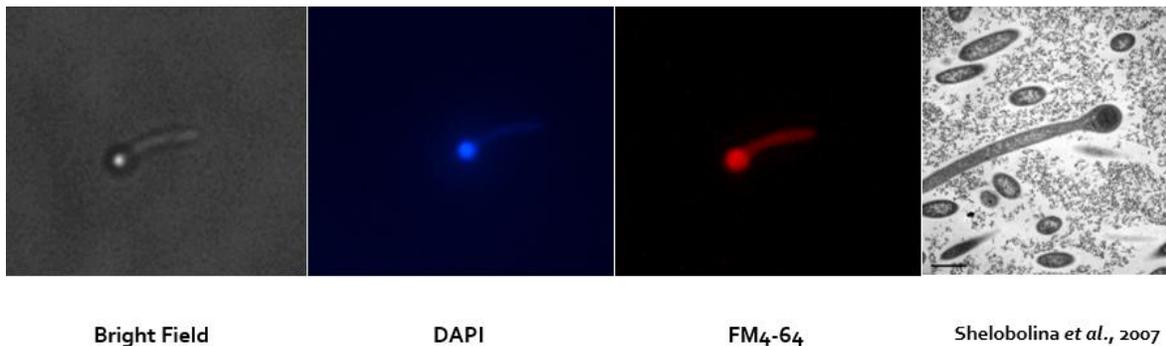


Figura 19. Espora del aislado bacteriano *Pelosinus sp. A1* obtenida por microscopía de fluorescencia. La última imagen (derecha) pertenece a la publicación de Shelobolina et al. (2007).

### 9.3.1. Determinación de curvas de crecimiento del aislado bacteriano *Pelosinus sp. A1*.

Las curvas de crecimiento del aislado bacteriano denominado *Pelosinus sp. A1*, muestran que las mejores condiciones de desarrollo para este organismo están dadas por los medios de cultivo NBF y NBF con lactato (NBFL) [Figura 20]. Al igual que *P. fermentans*, este aislado puede crecer eficientemente con sustratos como lactato y fumarato (Shelobolina et al., 2007; Moe et al., 2012; Beller et al., 2013).

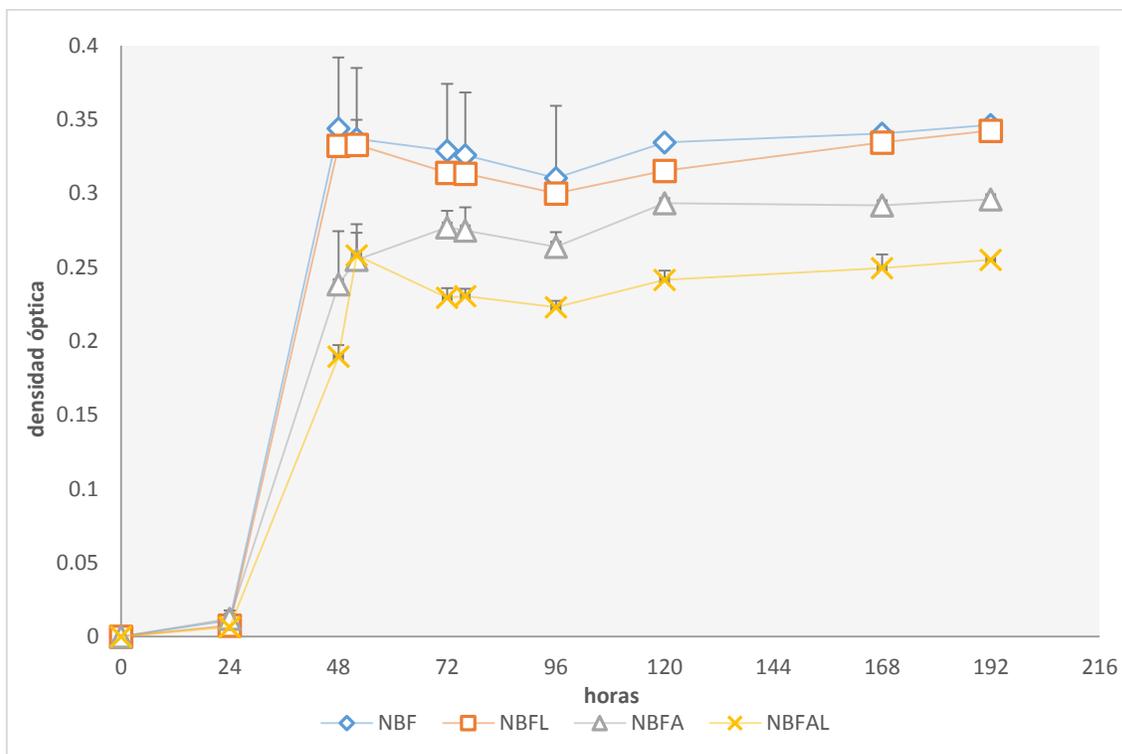


Figura 20. Curva de crecimiento de *Pelosinus sp. A1* en medio de cultivo NBF con diferentes donadores de electrones.

### 9.3.2. Detección de acción biosurfactante por la técnica oil spreading.

*Pelosinus sp. A1* presentó resultados positivos para la actividad biosurfactante después de tres días de crecimiento [Figura 21], en este tiempo los diámetros más grandes se presentaron en el sobrenadante, así como bajo las condiciones de crecimiento NBF-Ligero-Casaminoácidos y NBF-Lactato-Casaminoácidos [Tabla 11].

Tabla 11. Diámetros de la zona clara resultantes de la prueba de biosurfactantes pertenecientes a *Pelosinus sp. A1*.

03 días de crecimiento		
<i>Pelosinus sp. A1</i>	Cultivo celular	Sobrenadante
	Diámetros de la zona clara (mm)	
NBF-Lactato-Casaminoácidos	5	7
NBF-Ultraligero- Casaminoácidos	4	5
NBF-Ligero- Casaminoácidos	5	8

Después de 10 días de crecimiento los diámetros de la zona clara se homogenizaron entre el cultivo celular y su sobrenadante, así como entre las diferentes variantes del medio de cultivo [Tabla 12].

Tabla 12. Diámetros de la zona clara resultantes de la prueba de biosurfactantes pertenecientes a *Pelosinus sp. A1*.

10 días de crecimiento		
<i>Pelosinus sp. A1</i>	Cultivo celular	Sobrenadante
	Diámetros de la zona clara (mm)	
NBF-Lactato-Casaminoácidos	5	5
NBF-Ultraligero- Casaminoácidos	6	6
NBF-Ligero- Casaminoácidos	6	5



Figura 21. Resultados positivos de la prueba oil spreading para detección de biosurfactantes.

### 9.3.3. Detección de formación de emulsión bacteriana.

Transcurridos 31 días de crecimiento de las muestras de *Pelosinus sp. A1* utilizadas para acción biosurfactante, se llevó a cabo la prueba para detectar actividad emulsionante. Las pruebas con sobrenadante concentrado fueron las únicas que presentaron resultados positivos, sin embargo, los porcentajes de emulsión son bastante bajos comparados con el porcentaje del surfactante sintético [Tabla 16]. De igual manera que las emulsiones formadas por las muestras bacterianas, estas parecen no ser estables debido a que la emulsión no tiene una buena estructura (burbujas) y se mantienen en la parte media del tubo (floculadas), no en la superficie como el SDS [Figura 22].

Tabla 13. Porcentaje de emulsión obtenido del aislado bacteriano *Pelosinus sp. A1*.

% DE EMULSIÓN		
<i>Pelosinus sp. A1</i>	Sobrenadante concentrado	Sobrenadante diluido (1:10)
	Porcentaje (%)	
NBF-Lactato-Casaminoácidos	10.71	---
NBF-Ultraligero- Casaminoácidos	14.29	---
NBF-Ligero- Casaminoácidos	3.57	---
<b>Dodecilsulfato sódico, SDS (1%)</b>	64.29	
<b>Dodecilsulfato sódico, SDS (1%)</b>	64.29	

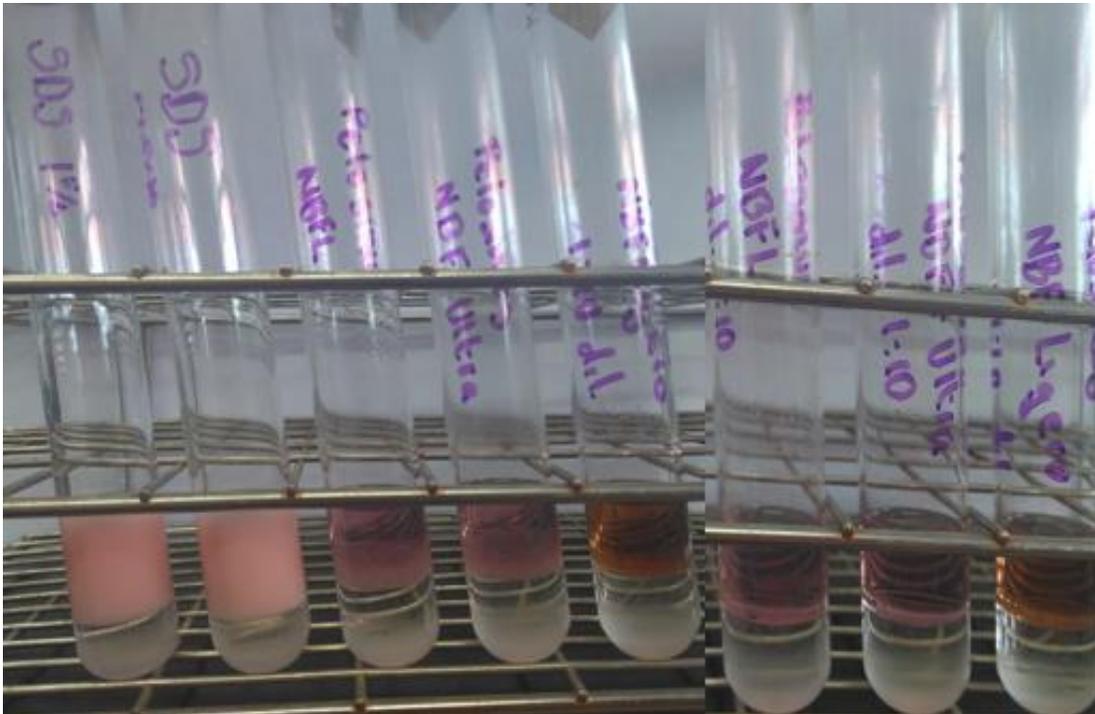


Figura 22. Emulsiones producidas por el aislado *Pelosinus* sp. A1. De izquierda a derecha: SDS 1% y 0.5%; sobrenadante concentrado y sobrenadante diluido.

#### 9.3.4. Técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) para evaluar degradación de hidrocarburos.

La secuenciación del genoma completo de *Pelosinus* B5-A mostró que esta cepa contiene genes involucrados en la degradación de hidrocarburos. Por tanto, se llevó a cabo un ensayo para medir la degradación de hidrocarburo ultraligero por la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID).

El aislado *Pelosinus* B5-A es capaz de producir una degradación biológica del hidrocarburo ultraligero bajo condiciones anaerobias. A partir de los 15 días [Figura 23] y hasta los 28 días [Figura 24], se puede observar que las muestras que contienen el inóculo bacteriano (picos rojos) disminuyen la concentración de los compuestos provenientes del hidrocarburo en contraste con los controles no inoculados, de los que se podría esperar sea una degradación abiótica.

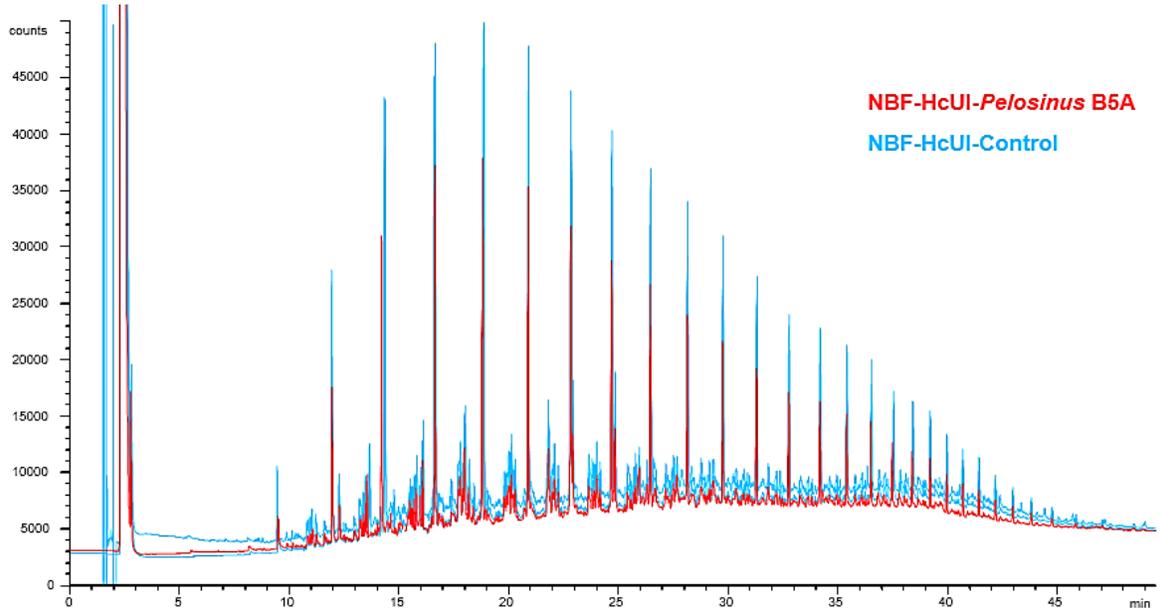


Figura 23. Cromatograma que muestra como la cepa *Pelosinus B5-A* es capaz de llevar a cabo una degradación de hidrocarburos con 15 días de crecimiento (picos en color rojo).

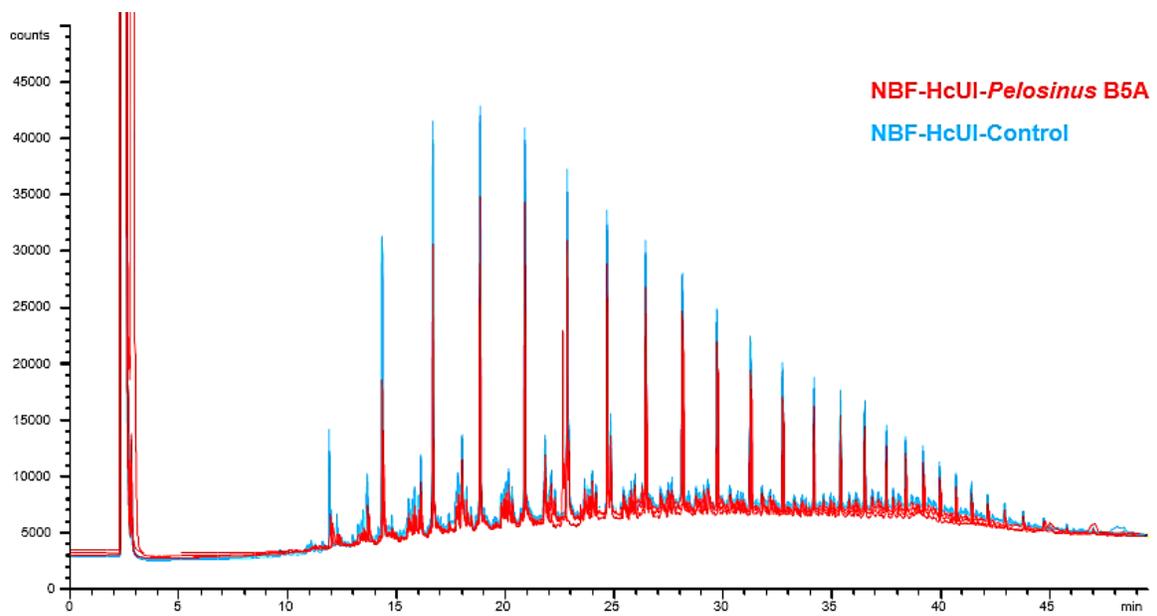


Figura 24. Cromatograma que muestra como la cepa *Pelosinus B5-A* es capaz de llevar a cabo una degradación de hidrocarburos con 28 días de crecimiento (picos en color rojo).

## 10.DISCUSIÓN

Las comunidades microbianas son un conjunto de microorganismos que se mantienen dinámicos en el ambiente, estos cambios pueden deberse a un proceso natural o debido a alteraciones por agentes externos como, productos farmacéuticos, herbicidas, plaguicidas, petróleo y sus derivados. El petróleo expuesto a un ambiente puede alterar o cambiar la estructura de una comunidad microbiana al presentarse como un agente selectivo en la ecología de los microorganismos autóctonos, cuando se presenta un derrame de hidrocarburos las especies microbianas capaces de realizar la degradación de estos compuestos aumentan su abundancia hasta agotar el recurso, posteriormente, declinan su número y dan paso a microorganismos que consumen otros sustratos (Kimes *et al.*, 2013; King *et al.*, 2015).

En los sedimentos marinos la estructura de la comunidad microbiana también puede ser variable. En el presente estudio, los sedimentos marinos provenientes de las estaciones A1, B5 y D18 muestran diferencias en la abundancia relativa, tanto en la muestra analizada directamente del sedimento obtenido con el nucleador (figuras y resultados no mostrados), como en la muestra analizada posterior a las resiembras [Figura 13 y 14].

Los resultados de las muestras analizadas directamente de los sedimentos muestran al phylum Proteobacteria como el más abundante en las estaciones A1, B5 y D18 con porcentajes del 69%, 66% y 47%, respectivamente. Mientras que, el phylum Firmicutes, sobresaliente en esta investigación, presenta porcentajes del 6% (A1), 8% (B5) y 11% (D18). Estos datos coinciden con lo reportado por Kimes *et al.* (2013), donde la clasificación filogenética de muestras de sedimento circundantes a la zona del derrame de la plataforma Deepwater Horizon reveló a Proteobacteria como dominante (60-65%), seguido por Firmicutes (9%), Bacteroidetes (11%) y Actinobacteria (7%), de igual manera Beatzley *et al.* (2012) muestran al phylum Proteobacteria y Firmicutes como dominantes en sedimentos de marismas contaminados con hidrocarburos, con porcentajes del 46% y 16%, respectivamente.

Las clases dentro de Proteobacteria que más dominaron en las tres muestras de sedimento analizadas directamente fueron  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ -Proteobacteria (en orden de dominancia), mientras que dentro de Firmicutes la dominancia fue dada por Clostridia. De acuerdo con King *et al.* (2013) y King *et al.* (2015), Thaumarchaeota, Firmicutes y Deltaproteobacteria son mayormente abundantes a profundidades mayores a 100 metros. Aunado a lo anterior, se ha encontrado la presencia del phylum Firmicutes en muestras profundas (> 500 m), además se conoce que aumenta su abundancia cuando la concentración de petróleo disminuye. Esto contrasta con otros microorganismos hidrocarbonoclasticos que, disminuyen cuando los hidrocarburos se agotan, de esta forma Firmicutes puede ser utilizado como un indicador en la finalización de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Beazley *et al.*, 2012; Chakraborty *et al.*, 2012; King *et al.*, 2013; Ramírez Ortega, 2015).

Las muestras que fueron analizadas posterior a las resiembras presentaron un alto incremento en la abundancia relativa para el phylum Firmicutes; especialmente el género *Clostridium* (> 99%), y una disminución en la diversidad y abundancia de otros grupos bacterianos [Figura 12 y 13]. De acuerdo a Mosher *et al.* (2012), utilizar compuestos específicos que estimulen a las comunidades microbianas puede afectar de forma selectiva la estructura de la comunidad, por lo que, el haber realizado las resiembras de los sedimentos en un medio de cultivo con Fe(III) como aceptor de electrones pudo alterar la estructura de los consorcios bacterianos de las muestras A1, B5 y D18, presentando el género *Clostridium* como el más abundante.

Los géneros integrantes de la clase Clostridia, como lo es *Clostridium*, son organismos anaerobios obligados y heterotróficos, tienen la capacidad de crecer en amplios rangos de temperatura y pH. Son organismos fermentadores y emplean diferentes rutas para este fin, una de las principales vías de degradación es la fermentación de butirato. Dentro de las sustancias que pueden degradar se encuentran los azúcares, polisacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, además de compuestos aromáticos y heteroaromáticos (Dürre, 2015). Se han descrito diversas especies del género *Clostridium* con la capacidad de degradar hidrocarburos clorados ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -hexaclorociclohexano), así

como solventes orgánicos clorados (tetracloroetano) (Jagnow *et al.*, 1977; Wood, 1985; Milde *et al.*, 1988). De acuerdo con la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), el género *Clostridium* presenta genes relacionados con distintas rutas de degradación de compuestos como naftaleno, cloroalcanos, nitrotolueno, compuestos aromáticos, ácidos grasos y benzoato.

Con relación a la actividad de reducir Fe(III), se han descrito algunas especies de *Clostridium* que tienen la capacidad de utilizar el Fe(III) como un receptor de electrones para llevar a cabo la fermentación bacteriana (Dobbin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). Además, en la base de datos KEEG se muestra que tiene un sistema de transporte de Fe(III) en su genoma.

El presente trabajo muestra al género *Clostridium* representado en dos distintas familias, Lachnospiraceae y Clostridiaceae, esto se debe a una cuestión de asignación taxonómica, ya que muchas de las especies pertenecientes al género *Clostridium* han sido reasignadas a otros géneros, pero han conservado en las bases de datos el nombre de *Clostridium*. En la literatura se propone un nuevo género para reasignar algunas especies de *Clostridium*, llamado *Lachnoclostridium*, en el cual se incluyen algunas especies del cluster clostria XIVa, género *Clostridium* XIVa, y el Lachnospiraceae grupo Incertae\_Sedis, el cual también es muy representativo en los consorcios bacterianos (Yutin y Galperin, 2013).

En cuanto a los grupos con bajo porcentaje de abundancia relativa se presentó el phylum Proteobacteria (menor al 1%), en las tres muestras de sedimento analizadas después de las resiembras [Figura 12]. La clase  $\gamma$ -proteobacteria se mantuvo dominante, seguida de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -proteobacteria. Se conocen muchas especies degradadoras de hidrocarburos existentes dentro de las clases Alpha y Gammaproteobacteria caracterizadas en sistemas marinos, ambas clases tienden a incrementarse en respuesta a la exposición con petróleo, además se conoce que  $\gamma$ -proteobacteria predomina en sitios marinos de gran profundidad y en presencia de hidrocarburos pesados (Chakraborty *et al.*, 2012; Kimes *et al.*, 2013; King *et al.*, 2013; King *et al.*, 2015).

Entre los géneros que se enriquecieron en la condición de bajo porcentaje de abundancia, figuran algunos con la capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo como es,

*Halomonas*, que tiene la capacidad de degradar alcanos e hidrocarburos policíclicos aromáticos con alta eficiencia a bajas temperaturas, además de ser identificados en consorcios halófilos degradadores de petróleo crudo (Siron *et al.* 1995; Michaud *et al.*, 2004; Brakstad *et al.*, 2006; McGenity, 2010; Yi-Bin *et al.*, 2014). *Shewanella*, puede degradar diésel e hidrocarburos aromáticos a temperaturas de entre 0 a 10 °C (Yi-Bin *et al.*, 2014). Se ha encontrado por análisis de secuenciación del gen 16S rRNA que *Pseudomonas*, *Alcanivorax* y *Marinobacter* son géneros oxidadores de hidrocarburos del petróleo, además el género *Pseudomonas* ha sido reportado en la degradación del tetracloroetano, mientras que *Alcanivorax* y *Marinobacter* incrementan su abundancia de manera drástica, como una respuesta a la contaminación por petróleo crudo (Atlas, 1981; Wood, 1985; Milde *et al.*, 1988; Chakraborty *et al.*, 2012; King *et al.*, 2015).

La especie *Pelosinus fermentans* fue encontrada y descrita por primera vez en arcillas de caolín por Shelobolina *et al.* (2007), posteriormente fueron descritas otras cepas del género *Pelosinus* provenientes de distintos ambientes como, acuíferos contaminados con Cr(VI), subsuelos contaminados con solventes halógenos y alcanos clorados, además de sitios contaminados con U(VI) y Fe(III) (Brown *et al.*, 2012; Moe *et al.*, 2012; Beller *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2018). Cabe destacar que, hasta el momento, no se ha reportado en la literatura la presencia de este género en sedimentos marinos, como son los del Noroeste del Golfo de México, y mucho menos, en un sitio con tendencia a la presencia de hidrocarburos.

La cepa *Pelosinus sp.* A1 mantiene una relación filogenética cercana (99%), con *Pelosinus fermentans* JBW45 y con la cepa *Pelosinus sp.* TM1. El aislado *P. fermentans* JBW45 ha sido reportado en un sitio contaminado con Cr(VI), después de estimular el área con un compuesto polilactato; mientras que la cepa *Pelosinus sp.* TM1, presenta una capacidad estable y completa para la dehalogenación de tetraclorometano (CCl<sub>4</sub>). Tanto el Cr(VI) como el CCl<sub>4</sub> son compuestos considerablemente contaminantes que afectan distintos ambientes, además de ser peligrosos para la salud humana (De León *et al.*, 2012; De León *et al.*, 2015; Penny *et al.*, 2015). Así también, tanto los metales pesados como los organoclorados son

compuestos que están presentes o se encuentran relacionados en la composición de los hidrocarburos del petróleo (Dell'Anno *et al.*, 2009; Reineke *et al.*, 2011).

Las especies de *Pelosinus* tienen la capacidad de fermentar distintos sustratos y emplearlos para su crecimiento (Shelobolina *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2011; Beller *et al.*, 2013), la cepa *Pelosinus sp.* A1, obtuvo mejores rendimientos con fumarato y lactato. El lactato es utilizado para estimular la inmovilización reductiva *in situ* de metales pesados, se ha observado que la reducción de Cr(VI) y de Fe(III) es más lenta en ausencia de lactato. Esta actividad también ha sido registrada para enriquecimientos de Acidobacteria, Firmicutes, Deltaproteobacteria y Betaproteobacteria (Mosher *et al.*, 2012; Beller *et al.*, 2013). Se ha reportado que *P. fermentans* es un organismo fermentativo capaz de reducir Fe(III), se encontró la presencia del género *Pelosinus* en los datos de abundancia de los consorcios bacterianos, los cuáles crecieron en un medio para organismos reductores de metales (medio marino citrato férrico) (Shelobolina *et al.*, 2007; Moe *et al.*, 2012; Beller *et al.*, 2013).

La producción de compuestos tensoactivos o biosurfactantes ha sido mayormente documentada en microorganismos aerobios, sin embargo, en el actual estudio se presenta la producción de estos compuestos por bacterias anaerobias. Cooper *et al.* (1980), mencionan en su investigación con *Clostridium pasteurianum*, que la tensión superficial comienza a ocurrir en la fase temprana de crecimiento exponencial y eventualmente se va reduciendo dicha tensión, además la cantidad del biosurfactante alcanza su máxima concentración en la fase exponencial, proponiendo que el biosurfactante es un producto extracelular de la bacteria. El aislado *Pelosinus sp.* A1 comienza a presentar acción biosurfactante a los tres días de crecimiento, mientras su fase exponencial de crecimiento se presenta entre los dos y tres días [Figura 20; Tabla 11]. En cambio, los consorcios bacterianos A1, B5, B9 y D18, presentaron resultados positivos de acción biosurfactante durante la fase tardía de crecimiento exponencial (10 días), considerando que la medición de concentración de Fe(II) nos proporciona una medición indirecta de crecimiento celular [Figura 7 y 9; Tabla 8]. Los mismos autores, presentan valores más altos de tensión superficial en los sobrenadantes de las muestras, concordando con los resultados de

*Pelosinus sp.* A1 y los consorcios bacterianos [Tabla 9 y 12], aunque mencionan que el cultivo celular aún contiene cantidades significativas de biosurfactante.

## 11. CONCLUSIONES

Las comunidades microbianas enriquecidas con capacidad de reducir Fe(III) empleándolo como aceptor de electrones y a los hidrocarburos como fuente de carbono y/o donador de electrones fueron diversas, la clase dominante fue Clostridia representada en mayor porcentaje por los géneros *Lachnoclostridium* y *Clostridium*, y el grupo Incertae\_Sedis. Su alta presencia parece deberse a su alta capacidad fermentativa y a su capacidad de reducir Fe(III), descrita en algunas especies de *Clostridium*. Otros géneros que se presentaron en los consorcios bacterianos, aunque en un porcentaje bajo fueron, *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Shewanella* y *Halomonas*; los cuales están descritos en la literatura como bacterias degradadoras de diversos compuestos de hidrocarburo.

*Pelosinus sp.* A1 se aisló a partir de muestras de sedimento marino (estación A1), a su vez, presentó crecimiento constante en presencia de hidrocarburos. Su aislamiento de este tipo de ambiente y condiciones no están descritos aún en la literatura.

Los ensayos para evaluar la degradación de hidrocarburos por parte del aislado *Pelosinus* B5-A, revelaron que esta cepa puede emplear los hidrocarburos como fuente de carbono y/o donador de electrones, así como degradar distintas fracciones de hidrocarburos.

*Pelosinus sp.* A1 presentó un porcentaje de identidad del 99% con la cepa *Pelosinus* B5-A, debido a que la cepa *Pelosinus* B5-A demostró la capacidad de degradar hidrocarburo se podría esperar que la cepa A1 presente resultados similares como bacteria hidrocarbonoclástica.

Los resultados positivos de las técnicas usadas para detectar acción biosurfactante y bioemulsionante en los consorcios bacterianos y en el aislado *Pelosinus sp.* A1, muestran que estos microorganismos tienen la capacidad de mejorar la remoción del hidrocarburo y,

por consecuente, hacer disponible su degradación al reducir la tensión superficial del contaminante.

## 12.PERSPECTIVAS

- Determinar la participación de genes pertenecientes a la vía de degradación del benceno en muestras del aislado *Pelosinus* B5-A, mediante ensayos de RTPCR, bajo presencia y ausencia de hidrocarburos.
- Realizar ensayos de degradación de hidrocarburos, por la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID), para la *Pelosinus sp.* A1, en muestras con hidrocarburo y sin hidrocarburo.
- Amplificar en *Pelosinus sp.* A1, los genes pertenecientes a la vía de degradación del benceno identificados en *Pelosinus* B5-A, mediante técnica de PCR; o secuenciar su genoma y analizarlo.

### 13.REFERENCIAS

**Anderson, R.T., Rooney-Varga, J., Gaw, C. V. y Lovley, D.R.** (1998). Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III)-reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* 32:1222-1229.

**Atlas, R. M.** (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180.

**Atlas, R. y Hazen, T.** (2011). Oil biodegradation and biorremediation: a tale of the two worst spills in US history. *Environment Science Technology*. 45:6709-6715.

**Ayed, H. B., Jemil, N., Maalej, H., Bayoudh, A., Hmidet, N., y Nasri, M.** (2015). Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 99. 8-14.

**Balagurusamy, N.** (2005). Anaerobic bioremediation-an untapped potential. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4(3), 273-287.

**Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R., y Totola, M. R.** (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97(6), 868-875.

**Beazley, M. J., Martinez, R. J., Rajan, S., Powell, J., Piceno, Y. M., Tom, L. M., Andersen, G. L., Hazen T. C., Van Nostrand, J. D., Zhou J., Mortazavi, B. y Sobecky P. A.** (2012). Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the Deepwater Horizon oil spill. *PloS one*, 7(11).

**Beller, H. R., Han, R., Karaoz, U., Lim, H., y Brodie, E. L.** (2013). Genomic and physiological characterization of the chromate-reducing, aquifer-derived firmicute *Pelosinus* sp. strain HCF1. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 63-73.

**Bodour, A. A., y Miller-Maier, R. M.** (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), 273-280.

**Botello, A.V.** (2005). Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p. 261-268. En: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y Agraz-Hernández, C. (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

**Bozada Robles, L. M. y Namihira-Santillán, P.E.** (2005). El derrame de petróleo del 22 de diciembre de 2004 en la cuenca baja del río Coatzacoalcos: estudio de caso, p. 681-696. En: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

**Brakstad, O. G., y Bonaunet, K.** (2006). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0–5 C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation*, 17(1), 71-82.

**Brown, S. D., Podar, M., Klingeman, D. M., Johnson, C. M., Yang, Z. K., Utturkar, S. M., ... y Palumbo, A. V.** (2012). Draft genome sequences for two metal-reducing *Pelosinus* fermentans strains isolated from a Cr (VI)-contaminated site and for type strain R7.

**Brown, S. D., Utturkar, S. M., Magnuson, T. S., Ray, A. E., Poole, F. L., Lancaster, W. A., ... y Elias, D. A.** (2014). Complete genome sequence of *Pelosinus* sp. strain UFO1 assembled using single-molecule real-time DNA sequencing technology. *Genome Announc.*, 2(5), e00881-14.

**Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., y McInerney, M. J.** (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen-and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and environmental microbiology*. 60(10). 3752-3759.

**Chakraborty, R., y Coates, J. D.** (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 437-446.

**Chakraborty, R., Borglin, S. E., Dubinsky, E. A., Andersen, G. L., y Hazen, T. C.** (2012). Microbial response to the MC-252 oil and Corexit 9500 in the Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*. 3. 357.

**Chapelle, F. H. y Lovley, D. R.** (1992). Competitive exclusion of sulfate reduction by Fe (III)-reducing bacteria: a mechanism for producing discrete zones of high-iron ground water. *Ground water*. 30(1). 29-36.

**Coates, J.D., Ellis, D. J., Roden, E., Gaw, K., Blunt-Harris, E. L. y Lovley D.R.** (1998). Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1504-1509.

**Coates, J. D., Phillips, E. J., Lonergan, D. J., Jenter, H., y Lovley, D. R.** (1996). Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1531-1536.

**Comisión Nacional de Hidrocarburos** (2015). Golfo de México – Aguas Profundas Norte. [www.cnh.gob.mx](http://www.cnh.gob.mx)

**Cooper, D. G., Zajic, J. E., Gerson, D. F., y Manninen, K. I.** (1980). Isolation and identification of biosurfactants produced during anaerobic growth of *Clostridium pasteurianum*. *Journal of fermentation technology*, 58(1), 83-86.

**Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., y Lovley, D. R.** (2001). Development of a Genetic System for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7), 3180-3187.

**Dell'Anno, A., Beolchini, F., Gabellini, M., Rocchetti, L., Pusceddu, A., y Danovaro, R.** (2009). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments: consequences on the speciation of heavy metals. *Marine pollution bulletin*, 58(12), 1808-1814.

**De León, K. B., Young, M. L., Camilleri, L. B., Brown, S. D., Skerker, J. M., Deutschbauer, A. M., ... y Fields, M. W.** (2012). Draft genome sequence of *Pelosinus fermentans* JBW45, isolated during in situ stimulation for Cr (VI) reduction.

**De León, K. B., Utturkar, S. M., Camilleri, L. B., Elias, D. A., Arkin, A. P., Fields, M. W., ... y Wall, J. D.** (2015). Complete genome sequence of *Pelosinus fermentans* JBW45, a member of a remarkably competitive group of Negativicutes in the Firmicutes phylum. *Genome Announc.*, 3(5), e01090-15.

**Dürre, Peter** (2015) Clostridia. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020370.pub2

**Dobbin, P. S., Carter, J. P., García-Salamanca San Juan, C., von Hobe, M., Powell, A. K., y Richardson, D. J.** (1999). Dissimilatory Fe (III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe (III) maltol enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, 176(1), 131-138.7

**Domingues, P. M., Almeida, A., Leal, L. S., Gomes, N. C., y Cunha, Â.** (2017). Bacterial production of biosurfactants under microaerobic and anaerobic conditions. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(2), 239-272.

**Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., y Seeger, M.** (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4781-4794.

**García-Cuéllar, J. Á., Arreguín-Sánchez, F., Hernández Vázquez, S., y Lluch-Cota, D. B.** (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la Sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29(6), 311-319.

**Godoy-Lozano, E. E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R. M., Juarez, K., ... & Pardo-Lopez, L.** (2018). Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 9, 2528.

**Grishchenkov V.G., Townsend R.T., McDonald T.J., Autenrieth R.L., Bonner J.S. y Boronin A.M.** (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process biochemistry*. 35: 889-896.

**Heider J., Spormann A.M., Beller H.R. y Widdel F.** (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 459-473.

**Holliger y Zehnder.** (1996). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Environmental biotechnology*. 7: 326-330.

**Jagnow, G., Haider, K. E. P. C., y Ellwardt, P. C.** (1977). Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Archives of microbiology*, 115(3), 285-292.

**Joye, S. B.** (2015). Deepwater Horizon, 5 years on. *Science*. 349(6248). 592-593.

**Kimes, N. E., Callaghan, A. V., Aktas, D. F., Smith, W. L., Sunner, J., Golding, B. T., Drozdowska, M., Hazen, T. C., Suflita, J. M. y Morris, P. J.** (2013). Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in microbiology*, 4, 50.

**King, G. M., Smith, C., Tolar, B., y Hollibaugh, J. T.** (2013). Analysis of composition and structure of coastal to mesopelagic bacterioplankton communities in the northern gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 3, 438.

**King G. M., Kostka J.E., Hazen T.C. y Sobecky P.A.** (2015). Microbial Responses to the Deepwater Horizon OilSpill: From Coastal Wetlands to the Deep Sea. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7:377-401.

**Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. y Huettel, M.** (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 7962-7974.

**Liu, Z., y Liu, J.** (2013). Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. *MicrobiologyOpen*, 2(3), 492-504.

**Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., y Parsons, J. R.** (2016). Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237* (pp. 105-121). Springer, Cham.

**Lizárraga-Partida, M. L., Rodríguez-Santiago, H., Romero-Jarero, J.M.** (1982). Effects of the Ixtoc I blowout on heterotrophic bacteria. *Marine Pollution Bulletin*. 13. 67-70.

**Lovley, D. R.** (2000). Fe(III) and Mn(IV) Reduction. p. 3-30. En: Dereck R. Lovley (Ed.). *Environmental Microbe-Metal Interactions*. American Society for Microbiology.

**Lovley, D. R., y Chapelle, F. H.** (1995). Deep subsurface microbial processes. *Reviews of Geophysics*, 33(3), 365-381.

**Lovley, D. R., y Phillips, E. J.** (1987). Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(11), 2636-2641.

**Lovley, D. R., y Phillips, E. J.** (1989). Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe (III)-reducing sediments. *Applied and environmental microbiology*, 55(12), 3234-3236.

**Lovley, D. R., Stolz, J. F., Nord, G. L., y Phillips, E. J.** (1987). Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, 330(6145), 252-254.

**Mason, O. U., Scott, N. M., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Bælum, J., Kimbrel, J., ... y Fortney, J. L.** (2014). Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME journal*, 8(7), 1464.

**McGenity, T. J.** (2010). Halophilic hydrocarbon degraders. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 1939-1951). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Michaud, L., Giudice, A. L., Saitta, M., De Domenico, M., y Bruni, V.** (2004). The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), 405-409. Milde,
- Milde, G., Nerger, M., y Mergler, R.** (1988). Biological degradation of volatile chlorinated hydrocarbons in groundwater. *Water Science and Technology*, 20(3), 67-73.
- Moe, W. M., Stebbing, R. E., Rao, J. U., Bowman, K. S., Nobre, M. F., da Costa, M. S., y Rainey, F. A.** (2012). *Pelosinus defluvii* sp. nov., isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater, emended description of the genus *Pelosinus* and transfer of *Sporotalea propionica* to *Pelosinus propionicus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 62(6). 1369-1376.
- Mosher, J. J., Phelps, T. J., Podar, M., Hurt, R. A., Campbell, J. H., Drake, M. M., Moberly, J. G., Schadt, C.W., Brown, S. D., Hazen, T. C., Arkin, A. P., Palumbo, A.V., Faybishenko, B. A. y Elias, D. A.** (2012). Microbial community succession during lactate amendment and electron acceptor limitation reveals a predominance of metal-reducing *Pelosinus* spp. *Applied and environmental microbiology*. 78(7). 2082-2091.
- Murawski, S. A., Ainsworth, C. H., Gilbert, S., Hollander, D. J., Paris, C. B., Schlüter, M., & Wetzel, D. L. (Eds.).** (2019). *Deep Oil Spills: Facts, Fate, and Effects*. Springer.
- Okoh A. I.** (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1(2):38-50.
- Park, H. S., Kim, B. H., Kim, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Kim, M., ..., y Chang, H. I.** (2001). A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7(6), 297-306
- Penny, C., Gruffaz, C., Nadalig, T., Cauchie, H. M., Vuilleumier, S., y Bringel, F.** (2015). Tetrachloromethane-degrading bacterial enrichment cultures and isolates from a contaminated aquifer. *Microorganisms*, 3(3), 327-343.
- Ponce Vélez, G., y Botello, A. V.** (2005). Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 269-298. En: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández

(Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

**Ramírez, D., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Estradas-Romero, A., Soto, L., & Juárez, K.** (2019). Bacterial diversity in surface sediments from the continental shelf and slope of the North West gulf of Mexico and the presence of hydrocarbon degrading bacteria. *Marine pollution bulletin*, 110590.

**Ray, A. E., Connon, S. A., Neal, A. L., Fujita, Y., Cummings, D. E., Ingram, J. C., y Magnuson, T. S.** (2018). Metal transformation by a novel pelosinus isolate from a subsurface environment. *Frontiers in microbiology*, 9.

**Reineke, W., Mandt, C., Kaschabek, S. R., & Pieper, D. H.** (2011). Chlorinated hydrocarbon metabolism. En: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000472.pub3

**Richardson, D. J.** (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146(3), 551-571.

**Rooney-Varga, J. N., Anderson, R. T., Fraga, J. L., Ringelberg, D., y Lovley, D. R.** (1999). Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3056-3063.

**Ruiz, J. P., Uritte, R., Román, E., Fkjres, H., Rodríguez, J. L., y Gómez, A. R.** (2003). El Cinturón Plegado Mexicano. Estructura y Potencial Petrolero.

**Salcedo, D. L., Soto, L. A., Estradas-Romero, A., y Botello, A. V.** (2017). Interannual variability of soft-bottom macrobenthic communities of the NW Gulf of Mexico in relationship to the Deepwater Horizon oil spill. *Marine pollution bulletin*, 114(2), 987-994.

**Shelobolina, E. S., Nevin, K. P., Blakeney-Hayward, J. D., Johnsen, C. V., Plaia, T. W., Krader, P., Woodard, T., Holmes, D. E., Gaw VanPraagh, C. y Lovley, D. R.** (2007). *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus* sp.gen. nov., sp.

nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 126-135.

**Siron, R., Pelletier, E., y Brochu, C.** (1995). Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(4), 406-416.

**Soto, L. A., Salcedo, D. L., Arvizu, K., y Botello, A. V.** (2017). Interannual patterns of the large free-living nematode assemblages in the Mexican Exclusive Economic Zone, NW Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. *Ecological indicators*, 79, 371-381.

**Spormann A. M. y Widdel F.** (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*. 11:85-105.

**Straub, K. L., Hanzlik, M., y Buchholz-Cleven, B. E.** (1998). The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of novel iron-reducing bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 21(3), 442-449.

**Snoeyenbos-West, O. L., Nevin, K. P., y Lovley, D. R.** (2000). Stimulation of dissimilatory Fe (III) reduction results in a predominance of *Geobacter* species in a variety of sandy aquifers. *Microb. Ecol*, 39, 153-167.

**Toledo Ocampo, A.** (2005). Marco conceptual: caracterización ambiental del Golfo de México, p. 25-52. En: **A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.)**. *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

**Varjani, S. J.** (2016). *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons*. *Bioresource Technology*.

**Watanabe, K., Kodama, Y., y Harayama, S.** (2001). Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 44(3), 253-262.

**Widdel, F., y Rabus, R.** (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 259-276.

**Wood, P. R., Lang, R. F., y Payan, I. L.** (1985). Anaerobic transformation, transport and removal of volatile chlorinated organics in ground water. In *Environmental science & technology* (pp. 493-511). Wiley-Interscience.

**Yañez Silva, R. L., Mendoza Montes, M., y Baez Tino, E.** (2014). Estudio y análisis de yacimientos carbonatados en la zona del Golfo de México. Tesis para obtener el título de Ingeniero Petrolero. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

**Yi-bin, W., Fang-ming, L., Qiang, L., Bi-juan, H., y Jin-lai, M.** (2014). Low-temperature degradation mechanism analysis of petroleum hydrocarbon-degrading Antarctic psychrophilic strains. *J Pure Appl Microbiol*, 8(1), 47-53.

**Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., y McInerney, M. J.** (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

**Yutin, N., y Galperin, M. Y.** (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental microbiology*, 15(10), 2631-2641

## APÉNDICES

### *Apéndice A. Medios de cultivo requeridos para el crecimiento bacterias anaerobias.*

#### Medio Citrato Férrico.

Citrato férrico	13.7 g
Hidróxido de sodio [0.15 N]	500 mL
DL-Vitaminas	10 mL
DL-Minerales	10 mL
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.25 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0.06 g
KCl	0.1 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> [1 mM]	1.0 mL

1. Pesar todos los reactivos, procurar que el citrato férrico no se exponga a la luz.
2. Prepara 500 ml de NaOH [0.15 N] y poner en hielo con anterioridad.
3. En una parrilla de calentamiento con agitación, colocar un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 1000 ml y agregar 400 ml de agua Milli Q y una barra de agitación. Es importante cubrir completamente el vaso de precipitado con papel aluminio antes de iniciar y no removerlo hasta concluir.
4. Calentar el agua hasta el punto de ebullición, una vez que empiece a burbujear se trasladara el vaso de precipitado, con ayuda de guantes o una franela, a una parrilla de agitación sin calor. Rápidamente y con precaución se verterá el citrato férrico mientras se agita.
5. Una vez que el citrato férrico se haya disuelto, se colocará sobre la parrilla de agitación un recipiente que contenga agua con hielo, y dentro de este se pondrá el

vaso de precipitado con el citrato férrico disuelto. Aún en agitación, se agregaran lentamente los 500 ml de NaOH [0.15 N] previamente preparado y enfriado.

6. Colocar un termómetro en la solución hasta que esta llegue a una temperatura de entre 20 a 25 °C, posteriormente se retira el del agua con hielo y se sigue agitando sin el termómetro.
7. Realizar la medición del pH con ayuda de un potenciómetro, llevar la solución a un pH de 7.0.
8. Sin detener la agitación, agregar en orden las soluciones y los reactivos restantes, DL-Vitaminas, DL-Minerales, NaHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, KCl y Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>.
9. Agitar por cinco minutos más para asegurar la homogenización de la mezcla.
10. Ajustar el volumen a 1000 ml.
11. Alicuotar en tubos o botellas para anaerobiosis.

#### **Burbujeo de las alícuotas en estación de gases.**

Con ayuda de las cánulas, burbujear con una mezcla de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) durante 8 minutos la fase líquida (minutos por 10 ml de medio de cultivo), terminado este tiempo colocar el tapón azul y jalar la cánula hasta que no toque el líquido (cuidando de no desprenderla de la salida de gases), burbujear la fase gaseosa por 8 minutos (minutos por 10 ml de medio de cultivo). Terminado el tiempo, jalar la cánula hasta sacarla del tubo o frasco sin quitar el tapón. Colocar un casquillo de aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

**\*NOTA:** en caso de que el medio de cultivo deba contener petróleo, colocar el petróleo antes de alicuotar si es de fracción media. Sí la fracción del petróleo es ligera o extraligera se podrá colocar después de burbujear la fase líquida y antes de comenzar la fase gaseosa.

### Medio Marino Citrato Férrico.

	Citrato férrico	13.7 g
	Hidróxido de sodio 0.15 N	500 mL
Solución A	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.20 g
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.20 g
	$\text{NaCl}$	21.0 g
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3.0 g
	$\text{KCl}$	0.5 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.15 g
Solución B	Elementos traza SL-10	1.0 mL
Solución C	$\text{NaHCO}_3$	2.50 g
	Agua milli Q	50 mL
Solución D	Solución de Vitaminas	10 mL
Solución E	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ sol.	1.0 mL
	Ditionito de sodio	10-20 mg

1. Pesar todos los reactivos, procurar que el citrato férrico no se exponga a la luz.
2. Prepara 500 ml de NaOH [0.15 N] y poner en hielo con anterioridad.
3. En una parrilla de calentamiento con agitación, colocar un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 1000 ml y agregar 400 ml de agua Milli Q y una barra de agitación. Es importante cubrir completamente el vaso de precipitado con papel aluminio antes de iniciar y no removerlo hasta concluir.
4. Calentar el agua hasta el punto de ebullición, una vez que empiece a burbujear se trasladara el vaso de precipitado, con ayuda de guantes o una franela, a una parrilla de agitación sin calor. Rápidamente y con precaución se verterá el citrato férrico mientras se agita.

5. Una vez que el citrato férrico se haya disuelto, se colocará sobre la parrilla de agitación un recipiente que contenga agua con hielo, y dentro de este se pondrá el vaso de precipitado con el citrato férrico disuelto. Aún en agitación, se agregaran lentamente los 500 ml de NaOH [0.15 N] previamente preparado y enfriado.
6. Colocar un termómetro en la solución hasta que esta llegue a una temperatura de entre 20 a 25 °C, posteriormente se retira el del agua con hielo y se sigue agitando sin el termómetro.
7. Aún en agitación constante agregar en orden las soluciones A, B, D y E. La solución C se colocará al final.
8. El pH final del medio debería ser de 7.0.
9. Agitar por cinco minutos más para asegurar la homogenización de la mezcla.
10. Ajustar el volumen a 1000 ml.
11. Alicuotar en tubos o botellas para anaerobiosis.

#### **Burbujeo de las alícuotas en estación de gases.**

Con ayuda de las cánulas, burbujear con una mezcla de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) durante 8 minutos la fase líquida (minutos por 10 ml de medio de cultivo), terminado este tiempo colocar el tapón azul y jalar la cánula hasta que no toque el líquido (cuidando de no desprenderla de la salida de gases), burbujear la fase gaseosa por 8 minutos (minutos por 10 ml de medio de cultivo). Terminado el tiempo, jalar la cánula hasta sacarla del tubo o frasco sin quitar el tapón. Colocar un casquillo de aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

**\*NOTA:** en caso de que el medio de cultivo deba contener petróleo, colocar el petróleo antes de alicuotar si es de fracción media. Sí la fracción del petróleo es ligera o extraligera se podrá colocar después de burbujear la fase líquida y antes de comenzar la fase gaseosa.

Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The prokaryotes* (pp. 3352-3378). Springer, New York, NY.

## Medio de cultivo Nutrient Broth Fumarate

Agua milli Q	8000 mL
Fumarato de sodio [1M]	40 mL
NB Sales [100X]	10 mL
NB Minerales Elixir [100X]	10 mL
DL-Vitaminas	15 mL
CaCl <sub>2</sub> [0.4 %]	10 mL
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O [1.0%]	10 mL
NaHCO <sub>3</sub>	1.8 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O	0.5 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> [1 mM]	1 mL

1. Pesar todos los reactivos.
2. En una parrilla de agitación colocar un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 1000 ml y una barra de agitación, agregar 800 ml de agua Milli Q.
3. En constante agitación, agregar uno a uno y en orden todos los reactivos listados.
4. Ajustar el volumen a 1000 ml.
5. Alicuotar en tubos o botellas para anaerobiosis.
6. No es necesario ajustar el pH, ya que por el buffer de carbonatos del medio debería quedar en un pH de 7.0.
7. Antes de inocular y de ser necesario, agregar 0.1 ml de cisteína [100 mM] por cada 10ml de cultivo y esperar a que desaparezca el tono rosado que se produzca en el medio de cultivo.

### **Burbujeo de las alícuotas en estación de gases.**

Con ayuda de las cánulas, burbujear con una mezcla de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) durante 8 minutos la fase líquida (minutos por 10 ml de medio de cultivo), terminado este tiempo colocar el tapón azul y jalar la cánula hasta que no toque el líquido (cuidando de no desprenderla de

la salida de gases), burbujear la fase gaseosa por 8 minutos (minutos por 10 ml de medio de cultivo). Terminado el tiempo, jalar la cánula hasta sacarla del tubo o frasco sin quitar el tapón. Colocar un casquillo de aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

**\*NOTA:** en caso de que el medio de cultivo deba contener petróleo, colocar el petróleo antes de alicuotar si es de fracción media. Sí la fracción del petróleo es ligera o extraligera se podrá colocar después de burbujear la fase líquida y antes de comenzar la fase gaseosa.

[www.geobacter.org](http://www.geobacter.org)

## *Apéndice B. Pruebas para Detectar Producción de Biosurfactantes.*

### Técnica Oil Spreading.

1. En una caja Petri de vidrio se colocan 50 mL de agua Milli-Q.
2. Posteriormente, en la superficie del agua colocar 20  $\mu$ L de petróleo crudo (petróleo de fracción media).
3. Finalmente, en la superficie del petróleo colocar 10  $\mu$ L de cultivo bacteriano. De igual forma, realizar con 10  $\mu$ L de sobrenadante libre de células, el cual se obtiene al centrifugar el cultivo bacteriano a 15,000g por 15 minutos.
4. Se considera positivo cuando se forma una zona clara en la superficie del petróleo (parecido a un agujero).
5. Medir el diámetro de la zona clara formada, este dato se puede comparar con un control biológico, o también, un control negativo (agua Milli-Q).

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

*Apéndice C. Pruebas para Detectar Formación de Emulsión Bacteriana.*

Técnica Porcentaje de emulsión (%E48)

1. Colocar en un tubo de ensayo 2 mL de sobrenadante bacteriano (4,000 rpm por 25 minutos), después colocar 2 mL de keroseno.
2. Vortear por dos minutos y dejar reposar.
3. Transcurridas 48 horas se debe medir la altura de la emulsión formada, así como la altura total de la mezcla. El porcentaje de emulsión se obtendrá con la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total del líquido}} (100)$$

4. Los porcentajes de emulsión de las muestras se comparan con los formados por el surfactante sintético Dodecilsulfato sódico, SDS [1%].

Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R., & Totola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource technology*, 97(6), 868-875.