



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

“Evaluación de la degradación de hidrocarburos (alcanos y alquenos) por aislados mexicanos de *Corollospora maritima*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
Biología marina

PRESENTA:

Olguin Galindo Julio César

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Patricia Vélez Aguilar
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor
Instituto de Biología, UNAM
Dr. Alfonso Vázquez Botello
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

ASESORA EXTERNA:

Dr. Allison Kathleen Walker
Acadia University

MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta investigación se realizó en el laboratorio C-121
del Instituto de Biología, y formó parte del proyecto
PAPIIT-UNAM-DGAPA IN200921

I. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para realizar mis estudios de maestría.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por la oportunidad de desarrollar mi investigación, los cursos y el apoyo constante por parte de su coordinación.

Al Instituto de Biología por permitirme el uso de su infraestructura y espacios.

Expreso mi profundo agradecimiento por la confianza, paciencia y apoyo a la Dra. Patricia Vélez Aguilar. Por creer en mí, compartirme sus conocimientos y haberme dado la oportunidad de seguir creciendo académicamente con la culminación de mi maestría.

A los miembros del Comité Tutor por sus valiosas sugerencias y consejos:

Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor

Dr. Allison Kathleen Walker

Dr. Alfonso Vázquez Botello

A los Miembros del Jurado Evaluador por sus contribuciones y comentarios al manuscrito de tesis que contribuyeron para su mejora:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Dra. Guadalupe Ponce Vélez

A mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos, además de las enseñanzas y apoyo con sus preguntas en los lab meetings. En especial a Jess, por su ayuda durante nuestro proceso de Maestría y el apoyo en el laboratorio.

A la Dra. Diana Salcedo por su disposición y colaboración con consejo y material para mi investigación.

Agradezco y reconozco la labor de las Dras. María del Carmen A. González y Patricia Vélez en el muestreo sistemático de la microbiota albergada en costas mexicanas, que culminó con la obtención de los aislados analizados en el presente trabajo.

II. DEDICATORIA

Le doy gracias a mis padres por apoyarme incondicionalmente, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida académica y personal. Además de ser inmejorables ejemplos de vida a seguir.

A mis hermanas Jessica y Sofía por ser parte importante de mi vida en todo momento y darnos tantas alegrías y unión familiar.

A Marisol por el gran apoyo que me da con la planificación de metas compartidas y sus palabras de motivación y admiración constantes.

A mis abuelos por haber sido un admirable ejemplo de vida.

A mis tíos y tías que siempre se han mantenido a la expectativa del transcurso de mis metas, y me han ayudado a corregir mis errores. En especial a mi tía Rosa, Doctora en Ciencias, que me apoyó en procesos académicos y siempre se mantuvo al tanto de mi progreso.

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS	III
II. DEDICATORIA	IV
ÍNDICE	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 RIESGO AMBIENTAL POR DERRAMES DE HIDROCARBUROS EN ECOSISTEMAS MARINOS.....	1
1.2. CONTAMINACIÓN DE PLAYAS MARINAS ARENOSAS POR HIDROCARBUROS.....	2
1.3. COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO	4
1.3.1 <i>n-Alcanos</i>	4
1.3.2. <i>Alquenos</i>	5
1.4. BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS	6
1.5. MICORREMEDIACIÓN	7
1.6. HONGOS MARINOS	9
1.6.1. <i>Especies marinas arenícolas: Corollospora maritima Werderm. (1922)</i>	10
1.6.2. <i>Micobiota en ventilas hidrotermales de mar profundo</i>	12
1.6.3. <i>Hongos marinos lignícolas: Ceriosporopsis halima</i>	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. LITORALES MEXICANOS	14
2.2. DIVERSIDAD FÚNGICA EN MÉXICO	15
2.3. EVENTOS DE CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO	16
2.4. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. GENERAL	20
5.2. ESPECÍFICOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y PRUEBAS DE VIABILIDAD	21
6.2. BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE TOLERANCIA A <i>N</i> -HEXADECANO Y 1-HEXADECENO	22
6.3. BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE USO DEL <i>N</i> -HEXADECANO Y EL 1-HEXADECENO	23
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	25
7. RESULTADOS	25
7.1. PRUEBAS DE VIABILIDAD	25
7.2. TOLERANCIA A <i>N</i> -HEXADECANO Y 1-HEXADECENO	26
7.3. USO DEL <i>N</i> -HEXADECANO Y EL 1-HEXADECENO COMO FUENTE DE CARBONO.....	29
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES	36
10. PERSPECTIVAS	37
11. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Los hidrocarburos del petróleo y sus derivados representan una amenaza latente para los ecosistemas acuáticos. Estos compuestos se adhieren a las branquias de los peces afectando su respiración, destruyen algas y fitoplancton, y afectan la alimentación y la reproducción de la vida marina. Los componentes volátiles de estas mezclas ejercen efectos en grandes áreas, mientras que los componentes pesados tienden a depositarse en los sedimentos más permeables como la arena. La micorremediación es una rama de la biorremediación que implica el uso de hongos para atrapar o degradar diferentes contaminantes en el ambiente. En particular, los hongos marinos arenícolas son microorganismos eucariontes adaptados a las condiciones ambientales fluctuantes del ecotono intermareal de las playas marinas arenosas, y tienen potencial para la micorremediación de playas contaminadas por hidrocarburos. *Corollospora maritima sensu lato*, un arenícola presente en todos los litorales mexicanos, ha mostrado ser capaz de crecer en medios suplementados con hidrocarburos. Sin embargo, aún se desconoce su habilidad para utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono, así como la posible respuesta diferencial entre los distintos linajes genéticos reportados para litorales mexicanos. En este contexto, la presente investigación se desarrolló con la finalidad de evaluar el uso potencial para la micorremediación de una serie de aislados mexicanos de *C. maritima* pertenecientes a los linajes 1 y 5, obtenidos de playas en Veracruz, Tamaulipas y Yucatán. Además, se comparó el potencial hidrocarbonoclastico de estos aislados contra el de otras tres especies marinas, dos provenientes de ventilas hidrotermales de mar profundo (Falla Transformante de Pescadero, Golfo de California) y una obtenida de madera sumergida cercana a las costas de Ensenada, Baja California. En todos los casos, se realizaron ensayos *in vitro* de tolerancia ante la presencia de *n*-hexadecano y 1-hexadeceno para la selección de las especies que mostraron mayor tolerancia a ambos hidrocarburos como única fuente de carbono. Las pruebas de tolerancia mostraron que la presencia de los hidrocarburos no disminuyó el crecimiento de los aislados, lo cual sugiere una alta tolerancia a la presencia de hidrocarburos alifáticos. Particularmente, los aislados de *C. maritima* del linaje 1 mostraron una mayor tolerancia a las concentraciones altas de ambos hidrocarburos, sugiriendo que éstos podrían favorecer su crecimiento. En los bioensayos de uso, se observó

que la producción de biomasa de los aislados evaluados aumentó hasta un 87% con la presencia de los hidrocarburos, lo que indica que aprovecharon a los dos hidrocarburos como única fuente de carbono. Por otro lado, los dos aislados de las ventilas hidrotermales mostraron una disminución en su crecimiento ante la presencia de los hidrocarburos, pero los aprovecharon como fuente de carbono logrando un aumento de hasta un 90% en su biomasa. Finalmente, *C. halima* se benefició de la presencia de los hidrocarburos tanto en las pruebas de tolerancia, como en las de uso, alcanzando un aumento del 91% de su biomasa con respecto a su control. Así, los resultados obtenidos sugieren que los aislados utilizados en esta investigación tienen el potencial de biorremediar hidrocarburos alifáticos en playas mexicanas, y que potencialmente podrían utilizar otros componentes del petróleo como fuente de carbono.

ABSTRACT

Petroleum hydrocarbons and their derivatives represent a latent threat to aquatic ecosystems. These compounds adhere to the gills of fish affecting their breathing, destroying algae and phytoplankton, and affecting the feeding and reproduction of marine life. The volatile components exert effects over large areas, and the heavy components tend to settle in more permeable sediments such as sand. Mycoremediation is a branch of bioremediation that involves the use of fungi to trap or degrade different contaminants in the environment. In particular, marine arenicolous fungi are eukaryotic microorganisms adapted to the fluctuating environmental conditions of the intertidal ecotone of sandy beaches, they have potential for mycoremediation of hydrocarbon-polluted beaches. *Corollospora maritima sensu lato*, present in all Mexican coastlines, has shown to be able to grow in media supplemented with hydrocarbons. However, its ability to use hydrocarbons as the only carbon source is still unknown, as well as the possible differential response between the different genetic lineages reported for Mexican coastlines. In this context, the present investigation was developed with the purpose of evaluating the potential use for mycoremediation of a series of Mexican isolates of *C. maritima* belonging to lineages 1 and 5, obtained from beaches in Veracruz, Tamaulipas and Yucatán. In addition, the hydrocarbonoclastic potential of these isolates was compared against that of three other marine species, two from deep-sea hydrothermal vents (Pescadero Transform Fault, Gulf of California) and one obtained from submerged wood near the coast of Ensenada, Baja California. In all cases, *in vitro* tolerance tests were carried out in the presence of hexadecane and 1-hexadecene to select the species that showed greater tolerance to both hydrocarbons as the only carbon source. The tolerance tests showed that the presence of hydrocarbons did not decrease the growth of the isolates, which suggests a high tolerance to the presence of aliphatic hydrocarbons. Particularly, the isolates of *C. maritima* from lineage 1 showed a greater tolerance to high concentrations of both hydrocarbons, suggesting that they could favor their growth. In the use bioassays, it was observed that the biomass production of the evaluated isolates increased up to 87% with the presence of hydrocarbons, that indicates that they took benefit of the two hydrocarbons as the only carbon source. On the other hand, isolates from hydrothermal vents showed a decrease in their growth in the presence of hydrocarbons, but they were able to take advantage

of them as a carbon source, achieving an increase of up to 90% in their biomass. Finally, *C. halima* benefited from the presence of hydrocarbons both in the tolerance tests and in the use tests, reaching an increase of 91% of its biomass with respect to its control. Thus, the results obtained suggest that the isolates used in this research have the potential to bioremediate aliphatic hydrocarbons on Mexican beaches, and that they could potentially use other oil components as a carbon source.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Riesgo ambiental por derrames de hidrocarburos en ecosistemas marinos

México alberga una gran diversidad de ambientes y recursos biológicos en sus litorales; incluye ecosistemas templados y subtropicales como los arrecifes coralinos, pastos marinos, lagunas costeras, estuarios y manglares. Muchos de estos ecosistemas están estrechamente interconectados promoviendo una alta producción primaria (Birket y Rapport, 1999). En este sentido, las corrientes oceánicas influyen en la distribución de las comunidades bióticas, donde la alta productividad biológica frecuentemente se origina en áreas con recambios rápidos de energía, como lo son las zonas costeras (Botello et al., 1992). Los ecosistemas marinos mexicanos albergan gigantescos depósitos de hidrocarburos y gas natural, lo que los hace altamente vulnerables a las perturbaciones antropogénicas causadas por la industria petrolera (Bakun, 1996).

La explotación, producción, refinamiento y transporte de petróleo en México constituye una de las principales actividades económicas (Colmenares, 2008). Esto representa un gran riesgo de derrames, accidentes tectónicos y operacionales. Se estima que entre 0.1 y 0.2% de la producción mundial de petróleo, finaliza vertido al mar (Botello et al., 1997). En México este porcentaje parece ser bajo, pero se calcula que puede alcanzar los 3 millones de toneladas al año, provocando daños irreversibles en los ecosistemas marinos (PEMEX, 2003). Además, en la mayoría de las cuencas hidrológicas mexicanas, los contaminantes de la industria petrolera se combinan con los contaminantes generados por otras actividades antropogénicas, creando una situación de verdadera emergencia ambiental en algunas zonas de Campeche, Tabasco y Veracruz (Vukovich, 1985).

La zona marino-costera mexicana está sujeta a un tráfico intenso de buques petroleros que movilizan entre 5 millones de barriles diarios, y donde se vierte al mar cerca de 7 millones de barriles al año por el lavado de sus tanques. Cabe mencionar, que en las costas nacionales han ocurrido derrames de grandes magnitudes. Por mencionar algunos, el 3 de junio de 1979 explotó el pozo exploratorio Ixtoc 1 en una bahía en Campeche derramando 140 millones de

galones de petróleo crudo (529 millones 957 mil 649 litros). Asimismo, el 20 de abril de 2010 ocurrió uno de los más grandes en la historia en el Golfo de México donde se vertieron 210 millones de galones de crudo (794 millones 936 mil 474 litros) al océano desde la plataforma Deepwater Horizon. Esto evidencia la alta vulnerabilidad de las costas mexicanas a la contaminación por hidrocarburos. Cuando sucede un derrame en los océanos, los hidrocarburos depositados se esparcen rápidamente debido a la diferencia de densidad en relación con el agua, impiden la entrada de luz y el intercambio gaseoso y ocasionan la solubilización de compuestos hidrosolubles (Navarro, 2010). Tan solo un litro de petróleo extendido en magnitud de 0.1 mm de espesor en las playas puede cubrir una superficie marina de 10,000 m² (McDonald et al., 2015). Estos contaminantes han impactado considerablemente hábitats marinos costeros tales como las playas marinas arenosas (Thomas, 1993). Algunos autores reportan concentraciones de hidrocarburos de 0.01 a 0.07 µg g⁻¹ en sedimentos de los sistemas costeros del Golfo y Caribe mexicano, entre los que destacan las costas de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Chiapas (Botello et al., 2001; Botello et al., 2015; Ponche y Botello, 2006; Montañón-Vera et al., 2017). Además, en litorales del Golfo de México como la Laguna de Términos en Campeche, el río Tuxpan y la laguna Ostión en Veracruz y el sistema de estuario entre Tabasco y Veracruz, se sobrepasa el límite de 70 ppm para sedimentos de hidrocarburos policíclicos permisibles (Botello et al., 1997).

1.2. Contaminación de playas marinas arenosas por hidrocarburos

Los sedimentos marinos funcionan como reservorio final para una gran variedad de contaminantes en el fondo marino, manglares y playas (Burdige, 2021). La contaminación por acumulación de hidrocarburos afecta a la fauna marina y a la vez representan un riesgo potencial para la salud humana a largo plazo (Hong et al., 1995). Estos compuestos despliegan sus efectos en grandes áreas, y los más pesados tienden a depositarse en sedimentos permeables como la arena de las playas (CDES, 1994; IARC, 1989; Erakin y Cemal, 2008).

Incluso los pequeños derrames de petróleo en el océano generan manchas que las corrientes transportan a las playas arenosas. Los derrames remotos pequeños contaminan grandes segmentos de playas a causa de sus interacciones con el medio ambiente marino y la morfología de la costa (Hunt, 1996). Estudios recientes han logrado caracterizar algunas comunidades microbianas en aglomerados de aceite sedimentario de enterrados en playa, lo que ha permitido explorar la sucesión de las poblaciones microbianas y el acoplamiento de estas en la degradación (Shin et al., 2019). Además, al comparar algunas localidades afectadas antes y después de derrames de petróleo en costas, se ha concluido que algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos hallados provocan bajas densidades de meiofauna (Veiga, Besteiro, Rubal, 2010).

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que la eliminación natural del petróleo en los sedimentos es muy lenta, y sus efectos perduran, lo cual provoca que la recuperación del ecosistema demore por años (Martinez y Gaju, 2005). En este sentido, se ha documentado que el daño biológico provocado por el petróleo y sus derivados es más grave si ocurre en un área costera como o la zona intermareal, ya que ésta representa un lugar importante de reproducción, crianza y alimentación de diversas especies marinas (Ponce y Botello, 2006).

La legislación vigente en la materia establece la integración paulatina de tratados internacionales en el tema de la contaminación al medio marino por derrames de hidrocarburos. México ha firmado buena parte de ellos, principalmente los relacionados a la contaminación, protección al ambiente y desechos de residuos tóxicos y peligrosos. Entre los tratados destaca el *Acuerdo de Cooperación sobre la Contaminación del Medio Marino por Derrames de Hidrocarburos y otras Sustancias Nocivas*, publicado en el Diario Oficial de la Federación en el año 1991. Este acuerdo se hizo reconociendo que la contaminación del medio marino por hidrocarburos o por otras sustancias nocivas danza o puede dañar las condiciones ecológicas del mar en detrimento de sus recursos naturales, además de constituir una amenaza a la salud y al bienestar público. Al interior del documento se resaltan dos fines: uno de ellos es desarrollar medidas que permitan tratar incidentes contaminantes y, el otro, es el de garantizar una respuesta adecuada en cada caso o situación. Como éste, se han redactado otros tratados internacionales, siendo uno de los más importantes el plan NEXUS

o Plan Conjunto de Contingencia entre los Estados Unidos Mexicanos y los Estados Unidos de América sobre Contaminación del Medio Marino por Derrames de Hidrocarburos y otras Sustancias Nocivas. En este tratado se describen algunos procedimientos operativos en caso de incidentes de contaminación que puedan representar una amenaza al medio marino y áreas costeras de ambos países (Roux y Flores, 2015).

1.3. Composición del petróleo crudo

Tras su extracción, el petróleo crudo presenta un gran número de componentes que varían de acuerdo a los grados API (American Petroleum Institute), considerando valores menores a 30 como pesados, y por arriba de 30 se definen como ligeros. En México, el crudo se divide en tres tipos dependiendo de su densidad: el Olmeca, el Istmo y el Maya, siendo este último el que constituye casi la mitad total de la producción y exportación centrada en el Golfo de México (Lajous, 2019). En general, los hidrocarburos conforman del 50% al 98% de la composición del petróleo crudo, y fundamentalmente se dividen en alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos y alquenos), y en menor medida de alcanos ramificados, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos conteniendo cuando menos un anillo bencénico en su estructura molecular (Viñas, 2005). En la composición elemental del crudo predomina el carbono con un 84-87%, seguido de hidrógeno con un 11-14%, y otros elementos (azufre, oxígeno, nitrógeno y metales como el níquel y el vanadio) que se encuentran a razón de menos del 10% (Clark y Brown, 1977). También comprende una fracción representativa (0-20%) de materiales de alto peso molecular constituido por moléculas mixtas de hidrocarburos con algunos compuestos polares, a los cuales se les denominan asfaltenos. Su estructura es muy compleja y está formada por 10 a 20 anillos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos y nafténicos las cuales contribuyen a las propiedades del petróleo durante su formación geoquímica (Botello et al., 2005).

1.3.1 *n*-Alcanos

Los alcanos son moléculas químicamente muy estables en las que el esqueleto carbonado se encuentra saturado de hidrógenos. De acuerdo con su solubilidad, se les puede clasificar en

lineales, ramificados y cíclicos (Kang y Park, 2009). Estos compuestos pueden contener átomos de carbono desde C_1 hasta C_{40} , y en ocasiones se han reportado cadenas con más de 60 átomos de carbono (Posthuma, 1977). El gran contenido de carbono en estos compuestos puede funcionar como fuente de energía para el crecimiento de microorganismos (Thomassin-Lacroix et al., 2002).

Los isoprenoides pristano ($C_{19}H_{40}$) y fitano ($C_{20}H_{42}$) se encuentran en la mayoría de los petróleos como componentes principales, y pueden ser considerados buenos indicadores de contaminación por petróleo (Volkman y Maxwell, 1986). Estos productos también se encuentran en los sedimentos marinos, con una abundancia relativa altamente variable. Por otra parte, el *n*-hexadecano ($C_{16}H_{34}$, Fig. 1) es un hidrocarburo líquido de cadena lineal, incoloro y altamente inflamable a altas presiones. El contacto de forma prolongada con este hidrocarburo puede llegar a provocar irritación y dermatitis en la piel, náuseas, dolor de cabeza e incluso pérdida del conocimiento. Este compuesto puede ser degradado fácilmente y prácticamente no presenta toxicidad (Van Elsas et al., 2007). En estudios de biorremediación, se ha utilizado como un sustrato selectivo para identificar organismos degradadores de alcanos (Stafford et al., 1982).



Figura 1. Estructura de *n*-hexadecano

1.3.2. Alquenos

Los alquenos destacan por tener una mayor reactividad química que los alcanos, además de ser recalitrantes. La estabilidad de la molécula depende del lugar donde se localice el enlace doble: los enlaces internos son mucho más estables que los que están en los extremos (Spormann y Widdel, 2000). En el petróleo, los alquenos se encuentran en menor porcentaje que los alcanos y pueden sufrir transformaciones geoquímicas que posteriormente ocasionan que se depositen en diversos productos (Tissot y Welte, 1984). Además, se han encontrado en cadena lineal formando parte de los sedimentos marinos de fuentes biológicas como arrecifes coralinos (Blumer et al., 1970).

El 1-hexadeceno ($C_{16}H_{32}$, Fig. 2) es un alqueno lineal con una insaturación terminal. Es abundante en mezclas comerciales de olefinas que se emplean en la producción de aceites de bronceado, ácidos grasos sintéticos y fluidos de perforación para exploración petrolera costera (Herman y Roberts, 2005). Este componente del petróleo, se utiliza como agente tensoactivo y fluido o lubricante, además actúa como monómero en polímeros como los polietilenos de baja densidad, es miscible con el éter de petróleo y alcoholes, e inmisible con el agua. Puede encontrarse en las playas derivado de los procesos para su producción en plantas petroquímicas (Scherr et al., 2012). Finalmente, se ha demostrado que este producto resiste más a la biodegradación por algunas especies fúngicas de fondo marino, en comparación con el *n*-hexadecano (Mohanty y Mukherji, 2008).

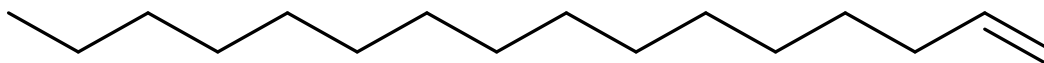


Figura 2. Estructura de 1-hexadeceno

1.4. Biorremediación de hidrocarburos

En la naturaleza ocurren procesos abióticos que influyen en el intemperismo de los hidrocarburos, como la evaporación, la disolución, la dispersión, la oxidación, la fotoquímica, la adsorción de partículas suspendidas, el hundimiento y la sedimentación. Estos procesos suceden simultáneamente y causan cambios importantes en la composición química y las propiedades físicas del contaminante original, causando modificaciones en la tasa o la efectividad de la biodegradación (Otremba y Toczek, 2002). Los esfuerzos de limpieza de ambientes contaminados por petróleo abarcan métodos convencionales como la extracción manual, el uso de productos químicos dispersantes, la quema, excavación de zanjas, entre otros procesos que generalmente son difíciles, costosos y pueden generar efectos desfavorables en los ambientes contaminados, en ocasiones irreparables (Michel et al., 2010, Porto et al., 2011).

Un método más efectivo para la remediación de ambientes contaminados por hidrocarburos es la biorremediación, que es la capacidad de los microorganismos para descomponer sus

fracciones orgánicas, utilizándolas como sustrato. Esta práctica resulta una excelente estrategia de gestión ambiental que puede contrarrestar los daños ocasionados por diversos contaminantes a los hábitats y especies contenidas en ellos. Una ventaja importante de esta técnica es su bajo costo, en relación con otros tratamientos para eliminar los contaminantes. Además, su uso se establece bajo condiciones ambientales controladas (se conoce el microorganismo a emplearse), y es una tecnología limpia, ya que los contaminantes pueden ser transformados hasta compuestos inocuos o menos dañinos (Dua et al., 2002).

Gran parte de los estudios de biorremediación con microorganismos se han enfocado en el uso de bacterias (Atlas, 1993; Chaerun et al., 2004; Ron y Rosenberg, 2014). Sin embargo, el crecimiento de estos organismos en compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos a menudo se ve comprometido por una disponibilidad limitada de sustrato. Por otra parte los hongos poseen complejos enzimáticos capaces de metabolizar moléculas complejas como los hidrocarburos encontrados en el petróleo hasta compuestos más simples (Hyde, 1990). Una ventaja de estos organismos sobre las bacterias es que forman concentraciones de biomasa importante, liberan enzimas extracelulares en los ambientes circundantes, tienen un índice de adaptación alto que les permite propagarse fácilmente en diversos medios, además de que forman hifas en formas de red lo que les permite aumentar su capacidad para degradar sustancias (Johnsen, 2005).

1.5. Micorremediación

Como ya se describió anteriormente, la micorremediación es forma de biorremediación que emplea hongos para atrapar o degradar diferentes contaminantes en el ambiente (Rhodes, 2013). El potencial degradativo de los hongos radica en la naturaleza extracelular de su sistema enzimático, principalmente compuesto por catalasas, lacasas, lignina-peroxidasas, manganeso-peroxidasas, entre otras enzimas (Morel et al., 2013). Por otro lado, las vías metabólicas de los hongos implicadas en el aprovechamiento de los hidrocarburos como alimento en condiciones aeróbicas, pueden seguir una oxidación inicial mediada por las monooxigenasas del citocromo P450 y las enzimas alcano-oxigenasas (Asemoloye, Jonathan, y Ahmad, 2019). El crecimiento apical típico de los hongos les permite penetrar

sedimentos como la arena más fácilmente que otros microorganismos. Además, gracias a una desarrollada plasticidad metabólica, los hongos pueden asimilar hidrocarburos en ambientes caracterizados por bajas concentraciones de nutrientes y pH ácido (Hyde et al., 2019). Estos organismos tienen dos métodos para actuar contra los hidrocarburos: utilizarlos como fuente de carbono y energía, y la degradación co-metabólica en presencia de un segundo sustrato que sirve como fuente de carbono y energía (Cofone et al., 1973).

Se ha sugerido que algunas especies fúngicas cuentan con la capacidad para oxidar los alcanos a alcoholes primarios y generar ácidos grasos vía aldehídos, como mecanismo para degradar los hidrocarburos saturados (Pointing, 2001). Otros hidrocarburos como el tolueno, el etilbenceno o los *n*-alquenos también pueden ser utilizados por numerosas especies fúngicas, mediante su utilización por medio de vías de oxidación como la hidroxilación mediada por una citocromo P-450 monooxigenasa, seguida de una conjugación con iones sulfato (Markovetz et al., 1968; Walker y Cooney, 1973). Los hidrocarburos alifáticos son la fracción más biodegradable en comparación con las fracciones de hidrocarburos aromáticos y polares. A su vez, la utilidad de estos compuestos como fuente de carbono para los microorganismos se dificulta a medida que las ramificaciones y los anillos aromáticos se incorporan en las estructuras (Sikkema et al., 1995; Atlas, 1995). A diferencia de las enzimas intracelulares bacterianas, las enzimas extracelulares fúngicas son capaces de migrar y metabolizar numerosos hidrocarburos (Cerniglia y Sutherland 2010). Así, los hongos pueden actuar como biocatalizadores de la descomposición del aceite al aumentar el área superficial de colonización microbiana y el acceso al oxígeno (Huettel, 2022). Cabe mencionar que se ha documentado que algunas especies de hongos marinos arenícolas, como *Corollospora lacera*, *C. maritima* y *Lulworthia* sp., pueden crecer utilizando hidrocarburos como única fuente de carbono, posiblemente por su exposición por miles de años a los hidrocarburos en las manchas superficiales y en la espuma marina (Cooney et al., 1993).

Los estudios de la biorremediación oceánica para la degradación de hidrocarburos como el pristano, el fitano, *n*-alcanos de cadenas largas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs), se han basado principalmente en la exploración de hongos de los géneros *Penicillium*, *Dendryphiella*, *Lulworthia* y *Varicosporina*, obtenidos de playas contaminadas y sustratos asociados como paneles de madera (Bartha y Atlas, 1977; Kirk, 1988; Atlas et al.,

1992; April et al., 1999; Yamada-Onodera et al., 2002; Elshafie et al., 2007; Cerniglia y Sunderland, 2010). Otros trabajos han estudiado aislados obtenidos del fondo marino, los cuales destacan por su capacidad para degradar PAHs (Passarini et al., 2001). Asimismo, algunas especies de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Acremonium* y *Penicillium* recolectados de manglares y sedimentos de altamar han mostrado la capacidad de degradar petróleo crudo (Barnes et al., 2017). En este contexto, se ha postulado que aquellos aislados fúngicos obtenidos de sedimentos contaminados por petróleo tienen la capacidad para degradar hidrocarburos. Algunos hongos filamentosos que se han aislado de estos sedimentos contaminados pertenecen a los géneros *Amorphotheca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* y *Graphium*, además de algunas levaduras como *Cándida*, *Yarrowia* y *Pichia* (Passarini et al., 2001; Chaillan et al., 2004). Recientemente se demostró que las cepas fúngicas *Aureobasidium* sp., *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* sp., *Phialocephala* sp. y *Cladosporium* sp., obtenidas de sitios aledaños a reservas de petróleo en océano profundo, poseen la capacidad de utilizar *n*-hexadecano y 1-hexadeceno como únicas fuentes de carbono mediante la regulación positiva de los transportadores transmembrana (genes HXT3, RAG1 y GHT6) (Velez, Gasca-Pineda y Riquelme, 2020), así como petróleo crudo extra pesado por *Cladosporium* sp., resultado en un 25.6% de su aprovechamiento, y un 91.3% de la fracción aromática (Romero-Hernández et al., 2021). En conjunto estos trabajos confirman que los recursos genéticos fúngicos albergados en mares mexicanos son invaluable y poseen un extraordinario potencial para la biorremediación de ambientes marinos.

1.6. Hongos marinos

Alrededor del 90% de la micobiota marina reconocida actualmente (más de 1900 especies) se ha descrito en los últimos 50 años, incluyendo taxa obligados y facultativos (Jones, Pang, Abdel-Wahab, Scholz, Hyde, et al., 2019). Esta subdisciplina de la micología ha logrado expandirse gracias a las investigaciones pioneras de Barghoorn y Linder (1944) sobre los hongos que habitan la madera sumergida en agua marina. Posteriormente, Kohlmeyer y Kohlmeyer en 1979 incluyeron dos categorías para estos organismos con base en fundamentos ecológicos: los hongo marinos estrictos y los marinos facultativos. Estos conceptos fueron redefinidos por Pang et al. en 2016 especificando que un hongo marino es:

“cualquier hongo que se recupera repetidamente de hábitats marinos porque (1) puede crecer y/o esporular (sobre sustratos) en ambientes marinos; (2) forma relaciones simbióticas con otros organismos marinos; o (3) se demuestra que se adapta y evoluciona a nivel genético o es metabólicamente activo en ambientes marinos”. Cabe destacar que la aplicación de esta distinción depende del criterio de cada investigador, particularmente con respecto a las especies saprobias aisladas de sedimentos marinos y de sustratos intermareales (Jones et al., 2009). Además, hay que considerar que al ser un grupo ecológico, no taxonómico, los hongos marinos no pueden definirse por requisitos nutricionales o fisiológicos (Kohlmeyer et al., 2004). Por lo que la definición que en este trabajo se aplica es que las especies marinas empleadas son facultativas y pueden desarrollarse en condiciones distintas a las encontradas donde fueron aislados.

En años recientes, análisis filogenéticos moleculares han rechazado la teoría de una única transición evolutiva entre ascomicetes marinos y terrestres. Sin embargo, los análisis taxonómicos han mostrado que gran parte de los ascomicetes marinos obligados formaron un clado monofilético representado por la familia *Halosphaeriaceae*, la cual comprende alrededor de 58 géneros. Esta familia de especies estrictamente marinas, ha evolucionado a partir de un ancestro terrestre (Spatafora et al., 1998).

1.6.1. Especies marinas arenícolas: Corollospora maritima Werderm. (1922)

Los hongos arenícolas se desarrollan en la transición del ambiente terrestre y el marino. Además, presentan adaptaciones morfológicas que les ayudan a su adaptabilidad a las playas, tales como la presencia de ascomas pigmentados y esporas ornamentadas con apéndices adhesivos que les permiten unirse a los sustratos permeables como la arena, y dispersarse en forma efectiva (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). Un ejemplo canónico son los representantes del género *Corollospora*, cuya distribución es cosmopolita en las costas del planeta. La principal característica de este género son sus apéndices secundarios en forma de cinta apical y ecuatorial, que están formados por la fragmentación y desprendimiento de la capa de la exospora (Fig. 3); otro rasgo distintivo son los ascomas carbonáceos, que por medio de un subículo proporcionan la capacidad de asentarse sobre granos de arena, conchas de animales marinos y otros sustratos duros (Koch, 1986; Nakagiri y Tokura, 1987). Los ciclos de vida

de este hongo comienzan con la deposición de las ascosporas en la zona intersticial de las playas. Luego algunas esporas colonizan, degradan un sustrato y forman ascomas. Finalmente las ascosporas se liberan y son dispersadas por medio de las olas y aguas costeras (González y Hanlin, 2010).

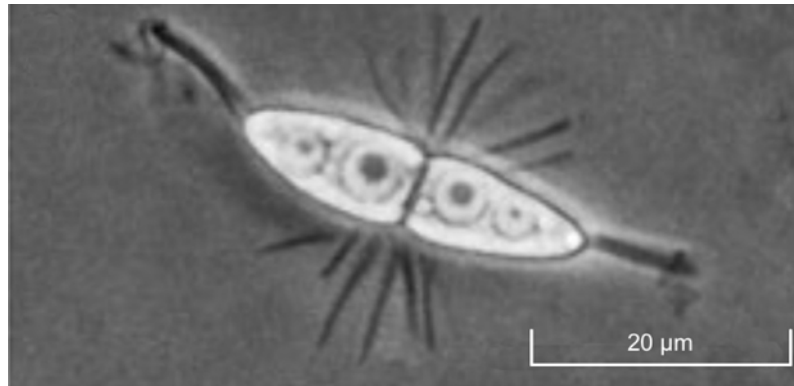


Figura 3. Ascospora de *Corollospora maritima* donde se detallan los apéndices secundarios en forma de cinta apical y los ecuatoriales espinosos (modificada de Velez et al., 2015).

Al ser un hongo marino arenícola obligado, *C. maritima* se encuentra comúnmente en las playas de arena en aguas templadas y tropicales, y se desarrolla sobre o entre los granos de arena (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). En México, este organismo se distribuye en todas las playas, desde el Golfo de México, el océano Pacífico y el Mar Caribe (González, 2001). Se ha demostrado también que pueden desarrollarse en dos condiciones fisiológicas, tanto en aguas marinas como en aguas con ausencia de salinidad (Vélez et al., 2015). Esta especie tiene una sensibilidad moderada a la perturbación antropogénica, además de ser fácil de identificar y muestrear cuantitativamente con una metodología repetible y económica (González and Hanlin, 2010). En un estudio pionero, se colectaron aislados de *C. maritima* en localidades del Golfo de México, el Mar Caribe y el Océano Pacífico, revelando la ocurrencia de 5 linajes genéticos con preferencias ambientales distintivas y una distribución geográfica superpuesta (Velez et al., 2016).

1.6.2. Micobiota en ventilas hidrotermales de mar profundo

El mar profundo se considera a partir de los 200 metros de profundidad en la columna de agua. Este ambiente incluye masas de agua y sedimentos marinos, y presenta características extremas como bajas temperaturas (excepto en zonas hidrotermales), nulo paso de luz solar, y alta presión hidrostática que aumenta conforme se extiende la profundidad (Smith et al., 2008). Las ventilas hidrotermales son sistemas extremos que presentan profundidades que van de los 500 a los 4000 metros, exhiben temperaturas muy elevadas (350-450 °C), y se ha demostrado la presencia de importantes concentraciones de hierro, magnesio, zinc, así como CO₂ magmático (Grassle, 1982; Prol-Ledesma et al., 2004; Camerlenghi, 2018).

Los ecosistemas hidrotermales de mar profundo se consideran puntos críticos de diversidad microbiana en el lecho marino y su productividad primaria se basa en la amplia gama de compuestos químicos liberados por las chimeneas polimetálicas de sulfuro o “fumadores negros” (Ramirez-Llodra et al., 2007). Los estudios de la biodiversidad en estos ambientes se han centrado en describir las comunidades fúngicas para la comprensión de su diversidad, abundancia y función. A partir de la exploración de mar profundo en sitios del Océano Pacífico oriental y la Dorsal Mesoatlántica, se ha demostrado la presencia de organismos afiliados a los órdenes *Capnodiales*, *Eurotiales*, de las clases *Dothideomycetes* y *Sordariomycetes*, y varias especies pertenecientes al género *Aspergillus* mediante análisis de secuenciación masiva de amplicones de ITS (Burgaud et al., 2009; Xu et al., 2018). Por otro lado, la caracterización fisiológica en estudios dependientes de cultivos obtenidos de colectas en la Dorsal Mesoatlántica y el Océano Pacífico occidental reveló la presencia de organismos adaptados a las condiciones de las profundidades marinas, entre las que destacan taxones de los órdenes *Eurotiales*, *Helotiales*, del género *Aspergillus* (*A. glaucus*, *A. sydowii*) y especies como *Purpureocillium lilacinum* y *Aureobasidium pullulans* (Burgaud et al., 2009). Cabe destacar que se han encontrado organismos de los phyla: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*, lo que confirma la amplia diversidad en estos ambientes (Le Calvez et al., 2009).

Por otra parte, la ventilas hidrotermales manifiestan emanación e infiltración natural de gas e hidrocarburos del lecho marino, y algunas presentan sedimentos con petróleo o mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos a causa de la alteración de las capas de materia orgánica

sedimentaria (Simoneit et al., 1992). Sin lugar a duda estos elementos influyen en la diversidad y modifican la dinámica en ciclos biogeoquímicos (Rowe et al., 2008), por lo que se espera que los hongos nativos de estos ambientes muestren una tolerancia alta y usen los hidrocarburos alifáticos como fuente de carbono para su crecimiento.

1.6.3. Hongos marinos lignícolas: Ceriosporopsis halima

Los hongos marinos lignícolas abarcan un colectivo de organismos saprobios que se desarrollan sobre diversos materiales ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina encontrados en playas, manglares, estuarios, la costa intermareal, entre otros (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). Estos restos vegetales (e.g. algas, árboles muertos, y plantas terrestres) ingresan constantemente al medio marino de diversas maneras: pueden transitar en estuarios y mares costeros como madera flotante; pueden depositarse en playas intermareales, flotar en el agua y eventualmente sumergirse en el mar; o son colonizados por los hongos lignícolas que aprovechan la lignocelulosa (un complejo de celulosa, hemicelulosa y lignina) que comprende más del 80 % de la madera (Raghukumar, 2017).

La madera flotante en las aguas costeras y oceánicas alberga una diversidad fúngica similar a la que se desarrolla en la madera de los manglares, corales, pastos intermareales y algas marinas, posiblemente debido a las adaptaciones que presentan las ascosporas que les permiten flotar en el agua, adherirse a sustratos y diseminarse (Hyde y Jones, 1989). El papel de los hongos en la degradación de la madera intermareal ha sido determinado por su capacidad para producir enzimas degradadoras de lignocelulosa (Hyde et al., 1998). Particularmente, la familia *Halosphaeriaceae* de la clase *Sordariomycetes* alberga el mayor número de especies lignícolas marinas, con más de 50 géneros en 130 especies (Raghukumar, 2017), dentro de las cuales se encuentra *Ceriosporopsis halima* (Fig. 4). Esta especie se ha aislado de trozos de madera, que a causa de las olas, se humedece constantemente sin estar directamente expuesta a los rayos del sol. Inicialmente el peritecio de este hongo está completamente sumergido y las hifas del hongo penetran gran parte del material mientras se encuentra en un estado blando y podrido. Por su parte, la pared de las ascosporas es transparente e incolora. Debido a que sus apéndices son muy elásticos y se adhieren fácilmente a cualquier material sólido, incluso al vidrio, pueden estirarse hasta una longitud

considerable (Wilson, 1954). Su distribución en México incluye los estados de Veracruz y Baja California (González, 2001, Velez, 2017).

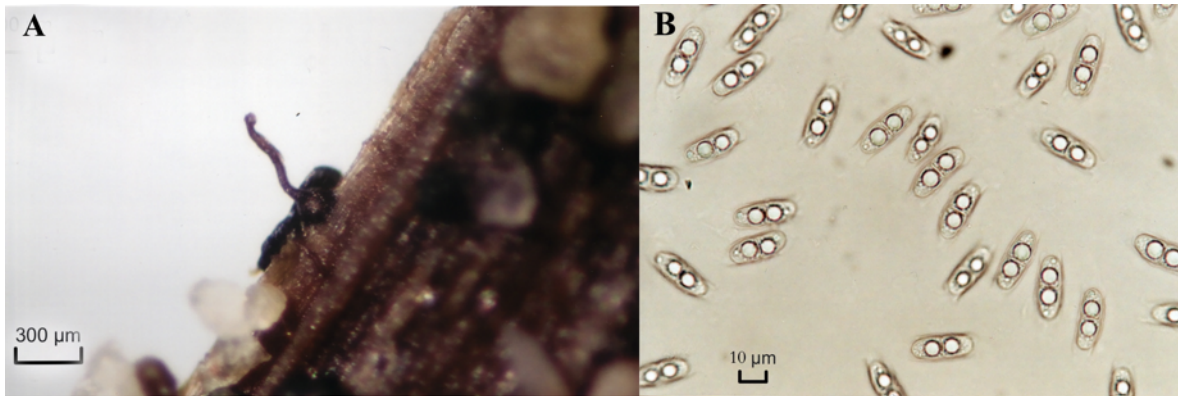


Figura 4. *Ceriosporopsis halima*: A) Restos vegetales con peritecio y B) Ascosporas hialinas de donde se detallan los apéndices gelatinosos (Velez, 2012, autoría propia).

2. ANTECEDENTES

2.1. Litorales mexicanos

Las playas constituyen uno de los principales atractivos turísticos en todo el mundo, en ellas se extiende una amplia gama de procesos geomorfológicos, hidrológicos, climáticos, biológicos y de actividades de interés humano (Houston, 2008). Particularmente, México es uno de los países con mayor extensión de litorales con cerca de 11,122 km, de los cuales el 70% corresponden al Océano Pacífico y 30% al Golfo de México y el mar Caribe en el Océano Atlántico. Además, cuenta con una superficie insular de 5,127 km². Cabe destacar, que el 53% de los estados que conforman el país tienen límites con el mar (INEGI 2001).

En particular, las costas del Pacífico tienen influencia sobre los escurrimientos continentales que generan una amplia plataforma continental de alta productividad y biodiversidad. Sin embargo, estas costas están seriamente amenazadas por las actividades antropogénicas no sustentables (Ortiz y Lanza, 2006). Por otra parte, la región del mar Caribe se caracteriza por contar con la tercera barrera arrecifal coralina más extensa del mundo, y que provee al

conjunto costero una estructura única en los componentes naturales (Estadigrafía, 1996). Finalmente, el Golfo de México es uno de los cuerpos de agua más grandes y antiguos de la Tierra. Junto al Mar Caribe, comprenden toda la cuenca del Golfo de México, la cual posee la plataforma continental más ancha del país, así como numerosas zonas de exploración y explotación petrolera. Esta región cuenta con bajas fluctuaciones de salinidad de entre 34 y 35.5 g/kg y una marea débil y tenue que controla el ritmo de los hábitats costeros, posibilitando la existencia de numerosos organismos dependientes de materia orgánica en los flujos y reflujos de las corrientes (Castro et al., 2000, Vukovich y Maul, 1985).

2.2. Diversidad fúngica en México

Los ambientes marinos son ecosistemas dinámicos que se caracterizan por fuertes cambios ambientales en temperatura, salinidad, radiación UV y disponibilidad de sustratos, estos ecosistemas albergan numerosas comunidades de hongos nativos representadas principalmente por especies marinas arenícolas y marinas facultativas (*sensu* Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). En la última revisión taxonómica de estos organismos para México se enlistan 62 especies (González et al., 2001), entre las que destacan aquellas afiliadas a la familia *Halosphaeriaceae*, y la presencia contundente de *Corollospora* (Velez et al., 2013; 2015; 2016a; González et al., 1993, 1998, 2001) y *Ceriosporopsis* (González et al., 2001; Velez et al., 2013), *Haiyanga* (Kohlmeyer 1969; González et al., 1998; Velez et al., 2013), entre otras especies autóctonas intermareales que tienen un uso potencial como bioindicadores (González y Hanlin, 2010).

Por su parte, las ventilas hidrotermales de mar profundo se descubrieron en 1977 en la Falla de las Galápagos en el Océano Pacífico (Ballard, 1977). Los primeros estudios en estos sistemas se enfocaron en comunidades procariotas (Gaill et al., 1987; Sylvan et al., 2012), y demostraron una amplia variabilidad temporal y espacial de estos organismos a causa de las condiciones ambientales extremas (Perner et al., 2007). Por otra parte, la diversidad de hongos microscópicos en estos ambientes es también muy importante. Actualmente, se han reportado representantes del phylum *Ascomycota*, particularmente asociados al género *Aspergillus* (Burgaud et al., 2010). En México, se conocen tres sitios con sistemas

hidrotermales de mar profundo, siendo el de Guaymas el más estudiado (Lara-Lara et al., 2008; Goffredi et al., 2017), y de los cuales la micobiota reportada destaca por la presencia de representantes de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, y otros del phylum *Chitridiomycota* en zonas de hipoxia (Stief et al., 2014; Velez et al., 2022).

2.3. Eventos de contaminación por hidrocarburos en México

Entre las principales causas que han provocado el deterioro ambiental de los cuerpos de agua y suelos costeros a lo largo de todo el país se encuentran el manejo inadecuado de materiales y residuos peligrosos de petróleo, el mantenimiento inadecuado o inexistente de las instalaciones petroleras, explosiones en instalaciones de alto riesgo, y derrames de hidrocarburos (Ortínez, 2003). Durante la década de los 80s, el 10% del petróleo crudo que ingresó a los océanos provino de filtraciones de petróleo natural, mientras que aproximadamente el 27% provino de la producción, transporte y refinación de este hidrocarburo. El 63% restante provino de emisiones atmosféricas, fuentes municipales e industriales y escorrentías urbanas y fluviales. También existen filtraciones de petróleo crudo y alquitrán que se producen de manera natural. Estas filtraciones son geográficamente comunes y probablemente han estado activas durante gran parte del tiempo geológico (Hunt 1996).

Sin lugar a duda el Golfo de México es una de las regiones petroleras más grandes del mundo. En especial, la porción sur correspondiente a territorio mexicano contiene más del 80% de las reservas totales del crudo (Brooks, 1990). Por otro lado, es una de las regiones marinas más ricas biológica y energéticamente del mundo, además de la mayor y más importante cuenca de agua protegida a lo largo de la costa atlántica del continente americano (Botello et al., 1992). Este litoral conforma la mayor área de perforaciones en la plataforma continental del mundo, y es de suma importancia en la producción y procesamiento del petróleo debido a la intensidad de las actividades de descarga, lavado y transporte en general. Indiscutiblemente estas acciones son la mayor fuente de contaminación por petróleo en los ambientes costeros mexicanos (Botello et al., 1992). En el año 2010 se produjo uno de los accidentes más graves por contaminantes de petróleo en la historia, causado por una

explosión en la plataforma Deepwater Horizon (DWH). Se estima que en dicho accidente se vertieron más de 800 mil litros de petróleo en el Golfo de México en un periodo de 89 días. Aún se desconocen los efectos totales sobre la diversidad marina y sus capacidades funcionales que esta catástrofe ambiental generó, en particular sobre las especies que respaldan funciones clave como el ciclo de nutrientes y la estabilidad de los sedimentos (Navarro, 2010).

En el 2012 se realizó un estudio de las comunidades microbianas que habitaron y habitan las playas antes y después del derrame de DWH, demostrando que posterior al accidente, algunos hongos proliferaron y mostrando un potencial importante para la biorremediación de las zonas afectadas (Birk et al., 2012). Como se mencionó anteriormente, el Golfo de México está cubierto por tuberías, pozos e infraestructura energética usada para la extracción de petróleo. Así, los accidentes por esta industria son inherentes, por ejemplo, a causa de sistemas tormentosos como el del huracán Ida del 5 de septiembre de 2021, en donde se descubrieron oleoductos dañados que originaron fugas de petróleo con una extensión de más de 22 km de largo (Botello et al., 2005; Tabuchi, Migliozzi, 2021).

La contaminación por hidrocarburos en el territorio mexicano ha derivado en distintos estudios sobre la composición de éstos (hidrocarburos alifáticos, aromáticos y policíclicos), su daño potencial a la salud pública y al deterioro de recursos hídricos y biológicos (Botello et al. 2002; Botello et al. 2015; Ponce y Botello, 2005; Ponce-Vélez et al. 2006). En este contexto, se han realizado trabajos de caracterización de los sitios afectados por hidrocarburos en diversas zonas petroleras de los estados de Tabasco y Veracruz, donde se examinan principalmente los ambientes y sedimentos terrestres (Gutiérrez y Zavala, 2002). A partir de estos estudios, se ha logrado el establecimiento de nuevas áreas naturales protegidas y se ha investigado el efecto de los hidrocarburos en aguas de cenotes a lo largo del estado de Quintana Roo (Medina, 2014). Además, se ha demostrado que la contaminación no se limita a la zona de producción o dispersión de los contaminantes, y que puede alcanzar incluso diversas superficies terrestres en las costas de Cancún, Playa del Carmen o la isla Holbox (León-Borges y Lizardi-Jiménez, 2017).

2.4. Importancia de los hongos en la degradación de hidrocarburos

Debido a su diversidad taxonómica, estilo de vida heterotrófico y digestión extracelular, los hongos producen una amplia variedad de enzimas que pueden aprovecharse para fines industriales, farmacéuticos y/o de biorremediación. Algunos hongos pueden romper con facilidad los enlaces C-H (Van Beilen et al., 2003) y C-C (Harvey y Thurston 2001) de los hidrocarburos. La degradación de dichos contaminantes favorece que los productos generados sean accesible como nutrientes para otros organismos, por ejemplo, algunos productos de degradación de compuestos aromáticos de alto peso molecular se vuelven sustratos disponibles para las bacterias (Cerniglia y Sutherland 2006).

Kirk y Gordon (1988) son los pioneros que comenzaron con el estudio de degradación de hidrocarburos derivados del petróleo por hongos de los géneros *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Lulworthia*, y *Varicosporina*, entre otros (Kirk, 1969; Kirk, 1983; Kirk et al., 1991). Estos autores exploraron la degradación de hidrocarburos en madera sumergida (Kirk y Gordon, 1988), abriendo el paso a investigaciones en la columna de agua y la descomposición superficial del alquitrán (Ahearn y Crow, 1986).

Por otra parte, Elshafie et al. (2007), estudiaron la diversidad fúngica presente en bolas de alquitrán en playas, y describieron especies como *Aspergillus niger*, *A. terreus* y *Penicillium chrysogenum* con potencial para biodegradar *n*-alcanos y petróleo crudo. Cooney (1992) ensayó el crecimiento de dos aislados, *Corollospora lacera* y *C. maritima*, en mezclas de varios hidrocarburos, concluyendo que los organismos pueden crecer en mezclas de hasta 10 u 11 hidrocarburos. Cabe destacar que ambos aislados co-metabolizaron los hidrocarburos de la mezcla cuando crecieron en glucosa. *C. maritima* también co-metabolizó acenaftaleno, fenantreno y dibenzotiofeno mientras crecía sobre hexadecano, pero no mientras crecía con glucosa sin alcano presente. La degradación de los hidrocarburos del petróleo típicamente ocurre más rápido en condiciones aeróbicas en comparación con condiciones anaeróbicas. Los pasos iniciales en el catabolismo de los hidrocarburos alifáticos (Singer y Finnerty, 1984), cíclicos (Perry, 1984) y aromáticos (Cerniglia, 1984) por hongos implican la oxidación del sustrato por oxigenasas, para lo cual se requiere oxígeno molecular.

No existen trabajos en México que evalúen la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en la zona intermareal por especies fúngicas, por lo que el presente trabajo es pionero en esta temática de gran relevancia para el país. Dado el riesgo ambiental generado por la industria petrolera en aguas mexicanas, es imprescindible realizar estas pruebas con hongos distribuidos en el territorio nacional que puedan derivar en su aplicación en la biorremediación de playas mexicanas en caso de contingencia.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por petróleo y sus derivados representa un grave problema ambiental para los ecosistemas costeros. Este impacto va en aumento en medida que se intensifican las actividades de perforación, refinación y transporte en aguas mexicanas. En estudios previos se demostró la capacidad que tienen algunas especies fúngicas para utilizar hidrocarburos como sustrato, en donde emplean enzimas que catalizan la bioconversión de estas sustancias mediante el rompimiento de enlaces C-C. Sin duda dicha actividad puede explotarse para la biorremediación y descontaminación de sistemas terrestres.

Debido aún no existen alternativas eficientes para erradicar el daño ambiental ocasionado por la industria petrolera en los litorales mexicanos; resulta imperante explorar la biorremediación de hidrocarburos utilizando especies fúngicas nativas de México. Algunos aislados de la especie marina arenícola *Corollospora maritima sensu lato* colectados en Virginia, Estados Unidos, han mostrado una alta tolerancia a la presencia de hidrocarburos alifáticos. Esto, sumado a su capacidad para acceder a los hidrocarburos por el movimiento de sus hifas sin estar restringidos por un entorno hidrofóbico, se ha postulado que esta especie es un candidato idóneo para realizar estudios de biorremediación de hidrocarburos en el ecotono intermareal. Así, determinar la capacidad que tienen los aislados mexicanos de *C. maritima sensu lato* para degradar hidrocarburos derivados del petróleo es fundamental para el establecimiento de su potencial para la biorremediación de playas contaminadas.

4. HIPÓTESIS

Los aislados mexicanos de *C. maritima sensu lato* tienen la capacidad de crecer en medios de cultivo se suplementados con hidrocarburos. En particular, estos organismos podrán crecer en medios que contengan *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno como única fuente de carbono. Finalmente, y en comparación con otras especies fúngicas de origen marino, las especies de *C. maritima sensu lato* degradarán mejor a los hidrocarburos, lo que confirmando su uso potencial para la biorremediación de playas contaminadas por hidrocarburos.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Evaluar la capacidad de distintos aislados mexicanos de *Corollospora maritima sensu lato* para degradar hidrocarburos derivados del petróleo (*n*-hexadecano y 1-hexadeceno).

5.2. ESPECÍFICOS

1. Confirmar la viabilidad de las especies resguardadas en la colección de cultivos del laboratorio C-121 del Instituto de Biología, UNAM: cinco aislados de *Corollospora maritima sensu lato* (pertenecientes los linajes genéticos 1 y 5) obtenidos de playas de nuestro país (Velez et al., 2016); dos aislados (*Eurotiales* sp. y *Aspergillaceae* sp.) provenientes de ventilas hidrotermales de mar profundo; y una especie marina lignícola (*Ceriosporopsis halima*).
2. Seleccionar los organismos con mayor tolerancia a la presencia del *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno mediante ensayos *in vitro* con tres concentraciones distintas de los hidrocarburos.

3. Determinar la capacidad metabólica de los aislados tolerantes utilizando una mezcla de los hidrocarburos como única fuente de carbono en dos condiciones de temperatura distintas.
4. Establecer el uso potencial para la biorremediación del *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno de los aislados de *C. maritima*, con relación a las otras especies fúngicas obtenidas de ventilas hidrotermales y playas marinas arenosas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y pruebas de viabilidad

Los aislados fúngicos de *C. maritima sensu lato* evaluados en el presente trabajo fueron colectados durante el periodo comprendido entre el 2014-2015 (Velez et al., 2016), y provienen de la colección de cultivos del laboratorio C-120, Instituto de Biología, UNAM. Conjuntamente, se analizaron otros aislados fúngicos de origen marino con la finalidad de comparar su desempeño contra *C. maritima sensu lato*.

En total se estudiaron cinco aislados de los linajes genéticos 1 y 5 de *C. maritima sensu lato* provenientes de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas (Velez et al., 2016); dos micromicetes aislados de ventilas hidrotermales al sur del Golfo de California (sitio con emanaciones naturales de hidrocarburos; Clague et al., 2018); y una especie lignícola, *Ceriosporopsis halima*, obtenida de Playa Hermosa, Ensenada (Tabla 1).

Para todos los hongos se realizaron pruebas de viabilidad para confirmar su crecimiento activo. Para ello, se utilizó el medio de cultivo agar papa dextrosa (preparado con 200 mL de caldo de papa, 20 g de dextrosa, 1000 mL agua destilada y agar (BD Bioxon) al 1.5%). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado, se incubaron por 15 días en condiciones de luz y oscuridad (12/12 h) en un ambiente con temperatura controlada (25 °C).

Tabla 1. Aislados utilizados en las pruebas de viabilidad.

Clave	Identidad taxonómica	Localidad de colecta	Año de colecta	Notas
DB8	<i>C. maritima</i>	Dzilam de Bravo, Yucatán, Mar Caribe	2014	Linaje 1
NAU3	<i>C. maritima</i>	Nautla, Veracruz, Golfo de México	2014	Linaje 1
PR9	<i>C. maritima</i>	Progreso, Yucatán, Mar Caribe	2014	Linaje 1
TU10	<i>C. maritima</i>	Tuxpan, Veracruz, Golfo de México	2014	Linaje 5
ES3	<i>C. maritima</i>	Escolleras, Tamaulipas, Golfo de México	2014	Linaje 5
I	<i>Eurotiales</i> sp.	Falla Transformante de Pescadero, sur del Golfo de California	2015	Presencia de emanaciones de hidrocarburos en el sitio de colecta; Clague et al., 2018
W	<i>Aspergillaceae</i> sp.	Falla Transformante de Pescadero, sur del Golfo de California	2015	Presencia de emanaciones de hidrocarburos en el sitio de colecta; Clague et al., 2018
<i>C. halima</i>	<i>Ceriosporopsis halima</i>	Ensenada, Baja California, Océano Pacífico	2017	Recolectado de madera sumergida cercana a la costa

6.2. Bioensayos *in vitro* de tolerancia a *n*-hexadecano y 1-hexadeceno

Se realizaron pruebas de sensibilidad para establecer los rangos de tolerancia de los aislados fúngicos ante la presencia del *n*-hexadecano (99%) y el 1-hexadeceno (94%) (Alfa Aesar). Las placas de prueba (60 x 15 mm) se prepararon añadiendo individualmente los

hidrocarburos al medio PDA en tres concentraciones (0.5%, 1% y 1.5%). Se realizaron controles de crecimiento en ausencia de los hidrocarburos. Brevemente, las cajas Petri se inocularon con 2 mm de micelio fúngico en crecimiento activo, y se incubaron a temperatura ambiente de laboratorio (23° C) durante 17 días en condiciones de luz y oscuridad (12/12 h). Se realizó un registro fotográfico de los aislados a los días 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 de crecimiento utilizando los mismos parámetros de configuración de la cámara (Nikon D5600) y mismas condiciones de luz (Fig. 5).

Las imágenes se analizaron con el programa Image J para obtener el área total de crecimiento de los aislados (Schneider et al., 2012) y se comparó contra el crecimiento de las placas control. Con el programa Excel se generó una matriz de datos a partir de la cual se calcularon las curvas de crecimiento para analizar las diferencias entre tratamientos.

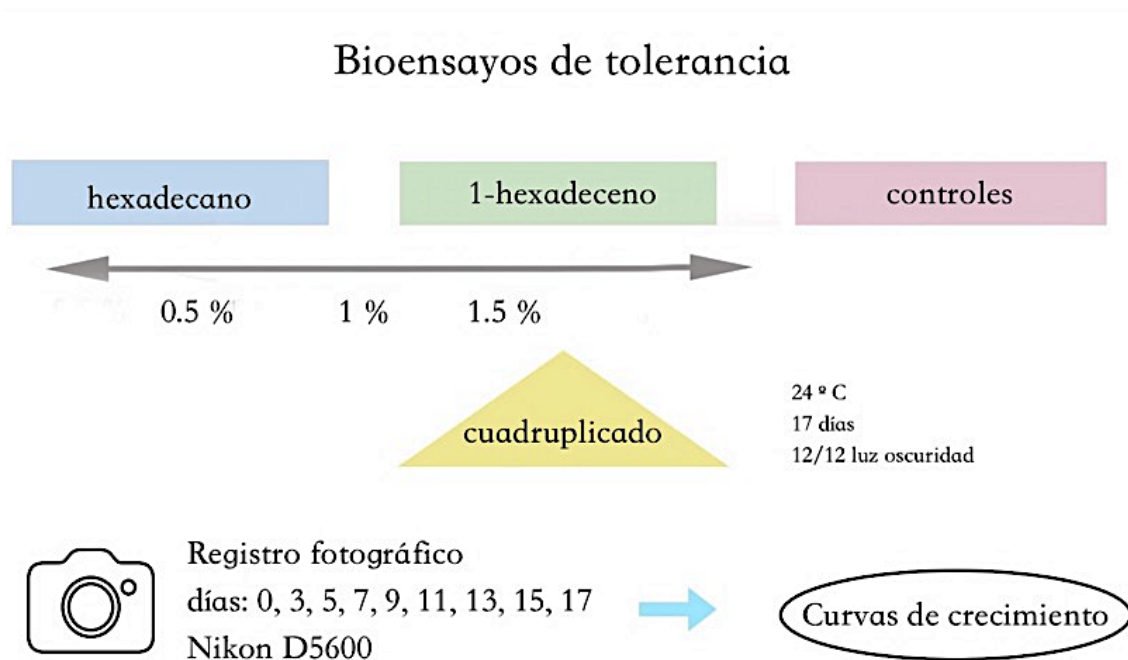


Figura 5. Esquema de la metodología experimental de los bioensayos de tolerancia.

6.3. Bioensayos *in vitro* de uso del *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno

Se seleccionaron los aislados que demostraron tolerancia ante la presencia de ambos hidrocarburos para evaluar su capacidad para utilizar dichas sustancias como única fuente de

carbono. Antes de iniciar los bioensayos de uso, se confirmó la viabilidad de los aislados en placas Petri con medio PDA. Para el ensayo, se inoculó un fragmento de 3 mm de micelio de los aislados seleccionados en tubos Falcon de 50 mL con 10 mL medio de cultivo preparado con sales de Vogel (50× Salt Solution; VBE) suplementado con *n*-hexadecano y 1-hexadeceno simultáneamente (concentración final de 30%) como única fuente de carbono. En todos los casos se prepararon controles libres de los hidrocarburos. En este experimento se consideraron ocho réplicas experimentales y tres controles para cada aislado. El experimento se realizó bajo dos temperaturas de crecimiento: TA (23 °C) y 40 °C (Fig. 6) con base en estudios donde altas temperaturas mostraron una influencia positiva hacia la degradación de petróleo crudo por especies marinas (Al-Nasrawi, 2012). Al término del experimento, la biomasa se separó y se metió en un horno a 45° C durante dos horas hasta que se secó en su totalidad. Finalmente se registró el peso seco de la biomasa en una balanza analítica. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa Graphpad Prism 9 y se obtuvieron las gráficas del uso de los hidrocarburos con Excel.

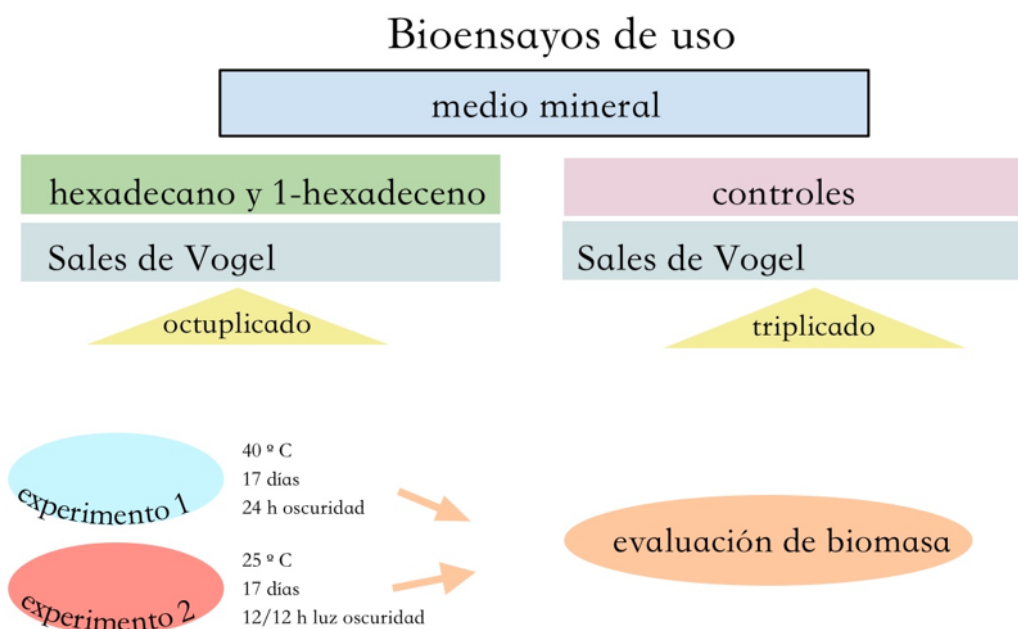


Figura 6. Resumen de la metodología utilizada en las pruebas de uso de hidrocarburos.

6.4. Análisis estadísticos

Los resultados de la prueba de uso se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico (ANOVA) con el programa Graphpad Prism 9. En este análisis se compararon los controles (sin hidrocarburo añadido) contra las muestras experimentales de los siete distintos aislados.

7. RESULTADOS

7.1. Pruebas de viabilidad

Después de un resguardo de seis años en la colección de cultivos del laboratorio C-120, los resultados de las pruebas de viabilidad indicaron que cuatro de los cinco aislados de *C. maritima sensu lato* presentaron crecimiento activo. Éstos correspondieron a los aislados obtenidos de muestras de los estados de Veracruz, Yucatán y Tamaulipas (NAU3, DB8, TU10, ES3), y pertenecientes a los linajes 1 y 5. El aislado PR9 proveniente de Yucatán (linaje 1) no fue viable, por lo que fue descartado de los experimentos subsecuentes. Por su parte, todos los aislados de referencia crecieron, y por lo tanto resultaron viables para las siguientes pruebas (Fig. 7).

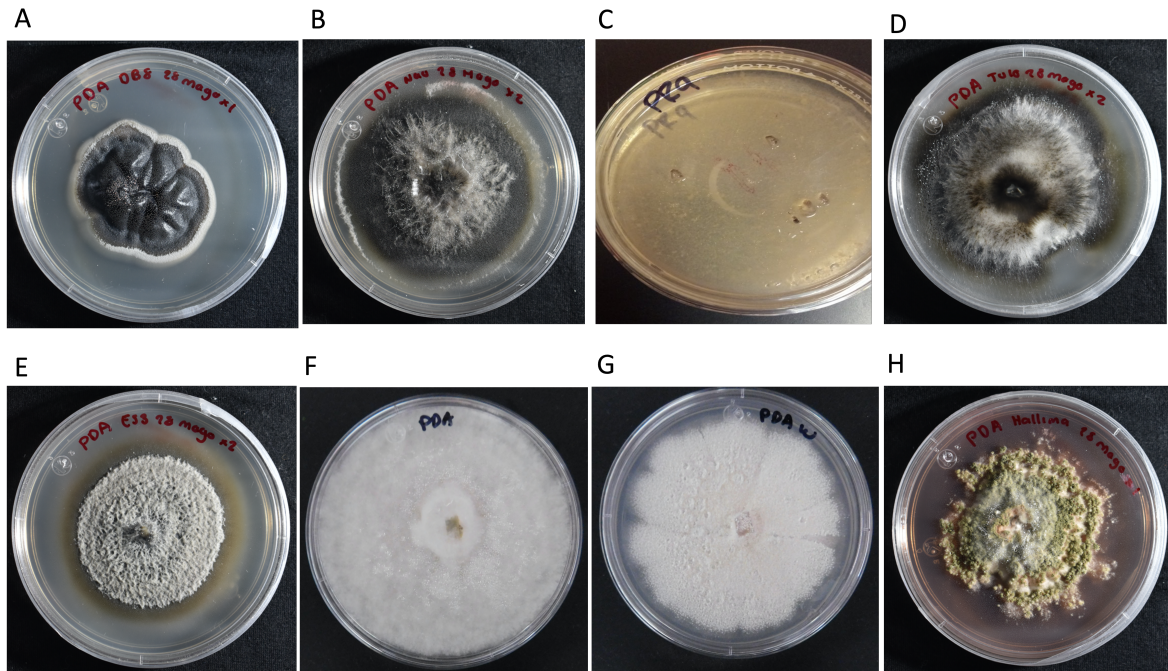


Figura 7. Crecimiento de los aislados utilizados en la presente investigación durante las pruebas de viabilidad. A, B y C) *C. maritima* linaje 1; D y E) *C. maritima* linaje 5; F) *Eurotiales* sp.; G) *Aspergillaceae* sp.; H) *Ceriosporopsis halima*.

7.2. Tolerancia a *n*-hexadecano y 1-hexadeceno

Los resultados de crecimiento (Fig. 8) sugieren que todos los organismos evaluados toleran los hidrocarburos a las tres concentraciones de prueba. Cabe mencionar que se detectaron diferencias en las tasas de crecimiento entre los distintos linajes genéticos de *C. maritima*. Por ejemplo, los aislados del linaje 1 mostraron mayor tolerancia a la concentración más alta de ambos hidrocarburos. Por otra parte, a las concentraciones de 1 y 0.5 % se observó una disminución del crecimiento del aislado DB8 en un 23% (Fig. 8a) obtenido de Yucatán. En el caso del aislado NAU3 del linaje 1 obtenido de Veracruz, los resultados fueron variables: el 1-hexadeceno disminuyó su tasa de crecimiento en la concentración de 0.5%, mientras que para las otras evaluaciones hubo una respuesta positiva de crecimiento comparando con el control (Fig. 8c). Por otro lado, los aislados del linaje 5 mostraron menor crecimiento en comparación con el control a concentraciones altas de ambos hidrocarburos. El aislado ES3 obtenido de Tamaulipas mostró una baja influencia de los hidrocarburos en el crecimiento

para todas las evaluaciones (Fig. 8b), mientras que TU10 de Veracruz fue afectado negativamente en todas las pruebas realizadas. Este fenómeno fue consistente en donde a mayor concentración del hidrocarburo, menor tasa de crecimiento (se redujo el crecimiento en un 27% a la concentración alta de hidrocarburos; Fig. 8d).

Cabe destacar que las áreas de crecimiento para *C. maritima* en sus distintos linajes fluctuaron entre 700 y 1200 mm², con excepción del aislado DB8 que mostró áreas radiales más bajas (entre 300 a 430 mm²). En cuanto al efecto de cada hidrocarburo se observó que el *n*-hexadecano inhibe el crecimiento radial de algunos aislados y logró favorecerlo en otros. Por otra parte, el 1-hexadeceno influyó negativamente en el crecimiento de todas los linajes en todas las pruebas.

Los aislados obtenidos del sistema hidrotermal de la Falla Transformante de Pescadero mostraron respuestas distintas en los bioensayos. *Eurotiales* sp., presentó una marcada diferencia en su crecimiento radial en respuesta a las diferentes concentraciones de *n*-hexadecano empleadas. El crecimiento fue menor en comparación con los controles, y varió desde una diferencia del 51% en la concentración de 1.5% de *n*-hexadecano, hasta un 17% de disminución para el tratamiento con 1% de 1-hexadeceno (Fig. 8e). En contraste, el crecimiento de *Aspergillaceae* sp. disminuyó drásticamente en un 82% con la adición de *n*-hexadecano al 1%, mientras que no mostró cambios relevantes al 0.5% y 1.5 % en las pruebas con los dos hidrocarburos (Fig. 8f). En ambos casos el *n*-hexadecano mostró mayor influencia hacia la reducción del crecimiento, sobre todo en las concentraciones de 1% y 1.5% en el caso de *Eurotiales* sp. Las áreas de crecimiento radial superaron los 3000 mm² en todas las pruebas a excepción de la prueba con la concentración de 1% en *Aspergillaceae* sp. que no sobrepasó los 1000 mm².

Por su parte, *C. halima* mostró menor desarrollo (32%) en la concentración de 1.5% de *n*-hexadecano, mientras que en la evaluación con 1-hexadeceno al 0.5%, mostró un aumento del crecimiento del 19% (Fig. 8g). Las áreas que cubrió el aislado oscilaron entre 1200 y 1500 mm² para la mayoría de las evaluaciones. Sin embargo, en el último día de la evaluación, las pruebas con las distintas concentraciones mostraron un crecimiento mayor comparado con el control, lo que sugiere un beneficio en el crecimiento por la mayoría de las concentraciones de ambos hidrocarburos.

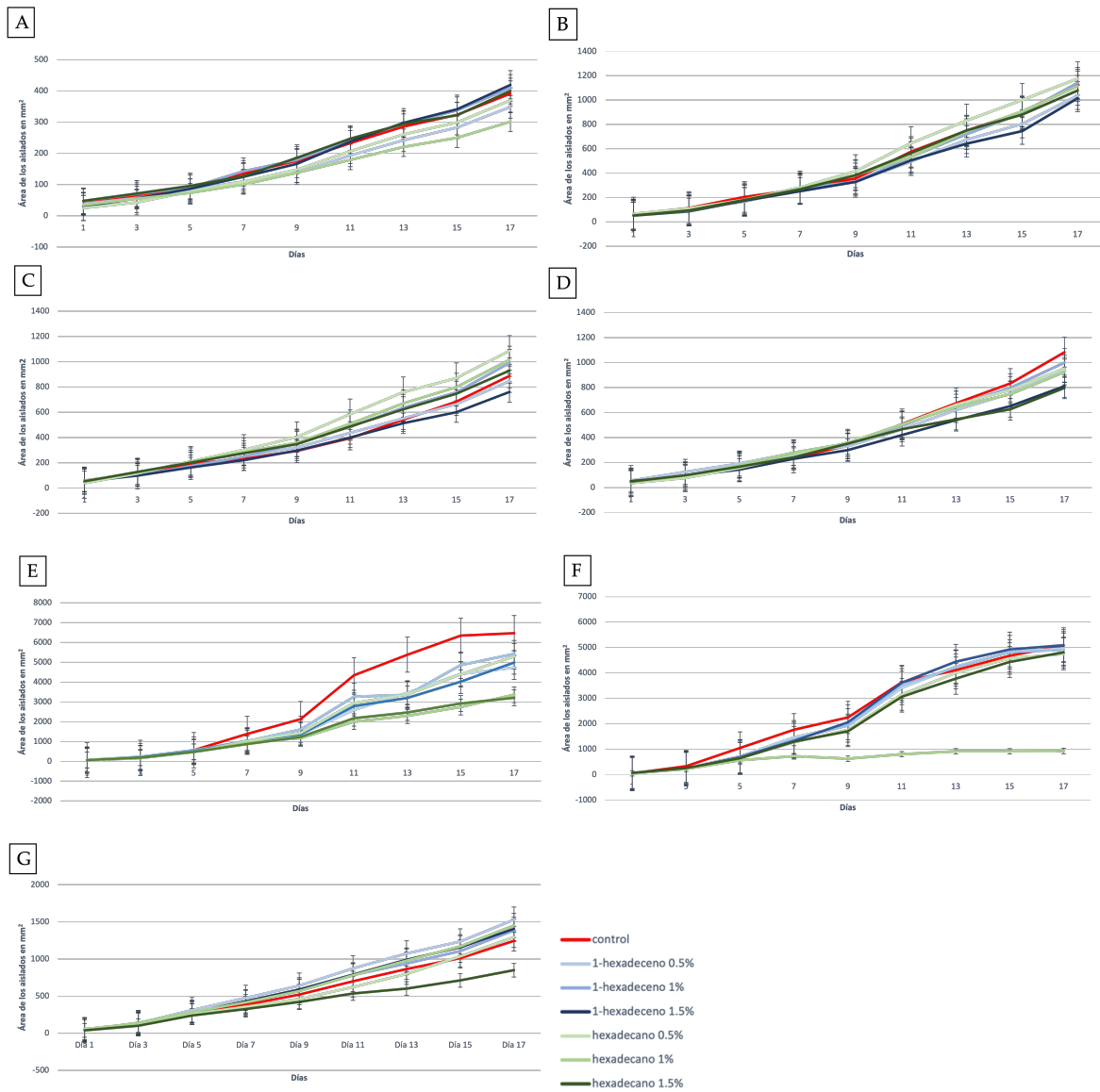


Figura 8. Curvas de crecimiento de las pruebas de tolerancia a la presencia de dos hidrocarburos. A) *C. maritima* linaje 1 (DB8); B) *C. maritima* linaje 5 (ES3); C) *C. maritima* Linaje 1 (NAU3); D) *C. maritima* linaje 5 (TU10); E) *Eurotiales* sp; F) *Aspergillaceae* sp; G) *C. halima*. Barras de error estándar en cada evaluación.

7.3. Uso del *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno como fuente de carbono

Para todas las especies evaluadas, los tubos que se incubaron a 40° C no presentaron crecimiento. Para confirmar la ausencia de hifas en el medio de cultivo, se tomaron alícuotas que fueron analizadas bajo un microscopio. Por otro lado, los tubos que se incubaron a temperatura ambiente (25° C), presentaron crecimiento cuantificable desde el día 10 y hasta el 17 posterior a la inoculación. Los controles en medio salino y el medio sin la adición de hidrocarburos como fuente de carbono, mostraron tasas de crecimiento muy bajas. Por otra parte, las réplicas obtenidas con los medios adicionados con *n*-hexadecano y 1-hexadeceno mostraron tasas de crecimiento diferenciales y mayores que los controles negativos.

El primer grupo (Fig. 9a), conformado por los distintos aislados de los linajes 1 y 5 de *C. maritima*, mostraron diferencias de 87%, 72% 64%, para los aislados DB8, TU10 y NAU3, respectivamente. El aislado ES3 no presentó diferencia significativa en su biomasa (15% de variación). Cabe destacar que la biomasa generada a los 25 días de evaluación osciló entre los 0.0003 g y 003 g. En el segundo grupo evaluado (Fig. 9b), el cual se compuso por los aislados fúngicos de los otros ambientes marinos, se mantuvo la producción de biomasa por encima de 0.1 g, alcanzando los 0.23 g para el aislado *Aspergillaceae* sp. con un porcentaje de 90 % de diferencia en el peso de biomasa. El aislado de las ventilas, *Eurotiales* sp., mostró una diferencia de 82% de la biomasa, mientras que *C. halima* tuvo la mayor tasa de crecimiento con un 91% de diferencia. Lamentablemente, ninguna de las pruebas antes descritas mostraron diferencias significativas en las pruebas ANOVA ($p < 0.05$) con relación a los controles

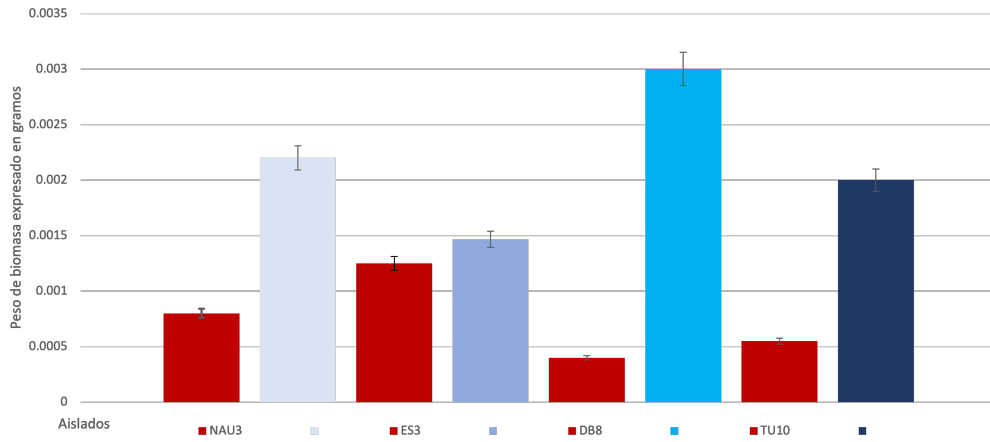
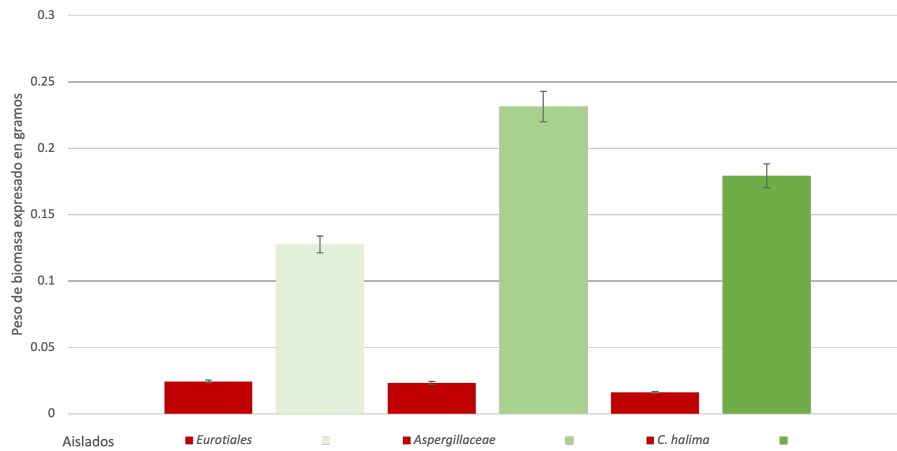
A**B**

Figura 9. Gráficos de las pruebas de uso de dos hidrocarburos. A) *C. maritima* linajes 1 y 5 en color azul; B) Aislados marinos de otros ambientes marinos en color verde. Barras rojas: controles.. Barras de error estándar en cada evaluación.

8. DISCUSIÓN

México se distingue por contar con una amplia variedad de ecosistemas marinos, los cuales sostienen una industria petrolera que aporta el 15.9% del financiamiento del gasto público de la Federación (PEMEX, 2021). Como ya se discutió anteriormente, el petróleo forma parte de los principales contaminantes que impactan las zonas costera mexicanas, especialmente en el Golfo de México (Botello et al., 1992). Los efectos negativos de este contaminante afectan a un gran número de especies marinas y terrestres, por lo que es necesaria la búsqueda de soluciones para contrarrestar las repercusiones negativas en caso de un derrame (Birkett y Rapport, 1999). Así, el trabajo de investigación realizado para esta disertación contribuye por primera vez al estudio de la biorremediación de hidrocarburos alifáticos utilizando aislados de *C. maritima sensu lato*, *Eurotiales* sp., *Aspergillaceae* sp. y *C. halima* obtenidos de ecosistemas marinos mexicanos. Algunas especies fueron capaces de utilizar los hidrocarburos *n*-hexadecano y 1-hexadeceno como única fuente de carbono, lo que permite establecer las bases para estudios futuros sobre la degradación de otros hidrocarburos, como los policíclicos y el petróleo crudo.

A partir de distintos recursos genéticos albergados en la colección del grupo de trabajo, se comprobó la viabilidad a mediano plazo (6 años) de cuatro de los cinco aislados pertenecientes a distintos linajes genéticos de *C. maritima sensu lato* (Velez et al., 2016). Esta información es fundamental ya que permitirán realizar otros estudios *ex situ* de estos hongos con fines de biorremediación. Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo resaltan la importancia de realizar un mayor número de investigaciones sobre la biodiversidad de nuestro país, con enfoques dependientes de cultivo y el resguardo adecuado de los aislados en las colecciones biológicas.

Todos los aislados viables de *C. maritima sensu lato* probados en este proyecto mostraron tolerancia a la presencia de *n*-hexadecano y 1-hexadeceno en concentraciones de 0.5%, 1%, y 1.5%. Estos resultados están en armonía con lo observado en trabajos previos donde aislados del género *Corollospora* (*C. maritima sensu lato*, *C. lacera*, y *C. intermedia*) obtenidos de la costa de Virginia, Estados Unidos, toleraron la presencia de *n*-hexadecano, tetradecano, 1-hexadeceno y pristano a las concentraciones de 1% (Kirk y Gordon, 1988), o los

realizados sobre *C. gracilis*, proveniente de una playa marina en Ensenada, que mostró tolerancia ante la presencia de 0.5%, 1%, y 1.4% de *n*-hexadecano y 1-hexadeceno (Velez et al., 2020). Este hallazgo reafirma que las especies afiliadas a *Corollospora* son capaces de crecer en presencia de hidrocarburos alifáticos, quizás debido a su adaptación metabólica durante miles de años a la presencia natural en las zonas costeras y en la espuma marina de restos orgánicos (Cooney et al., 1993).

Por otra parte, en este trabajo identificamos patrones de sensibilidad característicos de cada aislado perteneciente a los distintos linajes de *C. maritima*. Se esperaba que los aislados pertenecientes al mismo linaje presentaran respuestas de tolerancia similares ante la presencia de los hidrocarburos. Sin embargo, los dos aislados del linaje 1 mostraron respuestas opuestas. Por ejemplo, para DB8 (Yucatán) las tasas de crecimiento se redujeron con la concentración de 0.5% de ambos hidrocarburos, mientras que para NAU3 (Veracruz, zona con actividad petrolera) se vieron favorecidas. De la misma manera, TU10 del linaje 5 (Veracruz, zona con actividad petrolera) fue el más afectado con la adición de los hidrocarburos a pesar de que se recolectó de una zona costera del Golfo de México. Estos resultados sugieren que la correspondencia a un linaje genético y el origen geográfico de los aislados no influyen en su tolerancia a la presencia de los hidrocarburos. Cabe destacar, que se observaron también diferencias en las tasas de crecimiento de los aislados correspondientes a distintos linajes (e.g. DB8 duplicó las áreas de crecimiento con relación ES3). Las variaciones observadas en las áreas de crecimiento en los ensayos de tolerancia (300 - 1200 mm² a los 17 días de evaluación) podrían sugerir tasas de crecimiento distintas inherentes a cada genotipo.

En términos del origen geográfico-ecosistema de los aislados evaluados, los organismos provenientes de las ventilas hidrotermales de mar profundo (*Eurotiales* sp. y *Aspergillaceae* sp.) también mostraron respuestas variables ante la presencia de los hidrocarburos. Sin embargo, en general, la presencia de ambos compuestos redujo el crecimiento. Esta respuesta es distinta a lo que se esperaba, ya que estos hongos provienen de sedimentos colectados en áreas cercanas a emanaciones naturales de metano e hidrocarburos (Clague et al., 2018), por lo que se podría asumir que tienen la facilidad para aprovechar éstos como fuentes de nutrientes. Los resultados de estas pruebas pueden responder a la variabilidad en la activación

de procesos enzimáticos u otros factores ambientales, durante las evaluaciones en el laboratorio, tales como la salinidad, luz o temperatura que juegan un papel importante en el uso de hidrocarburos en el ambiente (Al-Hawash et al., 2018).

Por otro lado, el crecimiento de la especie lignícola *C. halima* se redujo de forma importante en presencia de la mayor concentración de hexadecano (1.5%), en comparación con los demás tratamientos. Estos resultados sugieren que *C. halima* 1) presenta una sensibilidad mayor a los alcanos alifáticos de cadena larga, o bien, 2) las concentraciones altas del hidrocarburo inhiben los procesos metabólicos de aprovechamiento del mismo. En este contexto se requiere de estudios posteriores enfocados a evaluar el crecimiento bajo otras fuentes de carbono más difíciles de degradar.

Adicionalmente pudimos identificar que los aislados de los distintos linajes de *C. maritima* no modifican significativamente su crecimiento radial con la adición de hidrocarburos alifáticos en un medio nutritivo. TU10 tuvo influencia negativa en todas sus pruebas, evidenciándose aún más a la concentración de 1.5% de ambos hidrocarburos. Por otro lado, DB8 se favoreció de la adición de altas concentraciones de los hidrocarburos, en contraste con las bajas que influyeron de manera negativa en su crecimiento.

De manera general, la presencia de los hidrocarburos en la tasa de crecimiento de los aislados de ventilas hidrotermales no mostró las respuestas esperadas, a pesar de haber obtenido estos organismos provienen de sedimentos colectados en áreas cercanas a emanaciones naturales de metano e hidrocarburos. Por ejemplo, *Eurotiales* sp. mostró tasas de crecimiento menores con la presencia de *n*-hexadecano. Del mismo modo, el crecimiento radial de *Aspergillaceae* sp. cuando se adicionó *n*-hexadecano al 1% se redujo de manera importante (20%). Es probable que en a concentración alta del hidrocarburo (1.5%) podrían activarse los mecanismos enzimáticos y esto provocaría una mayor tolerancia (Bisht et al., 2015), en contraste con una menor concentración que no requeriría de la pronta activación de los procesos enzimáticos. En general, la adición de 1-hexadeceno no afectó las respuestas de crecimiento para todos los aislados de esta región. En resumen, estos organismos con candidatos interesantes para explorar la biorremediación de alquenos.

La prueba de tolerancia contribuye a generar aproximaciones sobre las respuestas preliminares involucradas en etapas posteriores como el uso como única fuente de carbono. Se establecen las bases para dar un seguimiento a la identificación de enzimas y el estudio de la activación de los genes implicados en las respuestas observadas. Por ejemplo, la respuesta metabólica que los aislados presentan inicialmente ante la adaptación a la presencia de los hidrocarburos, o una posible toxicidad anterior a usar un contaminante como fuente de carbono. Nuestros datos sugieren que la adaptación al uso de estas fuentes de carbono es costosa ante la presencia de fuentes de carbono más lábiles en el medio, en términos metabólicos, la estrategia de estos aislados podría consistir en la preferencia de otra fuente de carbono disponible en el medio y sólo activaría mecanismos de degradación de otras fuentes de alimento al estar obligados.

Las tasas de biodegradación generalmente aumentan con el aumento de la temperatura, los ecosistemas expuestos a temperaturas bajas degradan los hidrocarburos lentamente. Otros factores como la concentración de oxígeno y nutrientes, la humedad y el pH son factores predominantes para determinar las tasas de biodegradación *ex situ* (Leahy y Colwell, 1990). En el presente trabajo, las pruebas de uso de hexadecano y 1-hexadeceno como únicas fuentes de carbono se incubaron bajo dos temperaturas distintas. La primer prueba se recreó con una temperatura de 40° C, con base en estudios previos que demuestran la optimización de procesos de degradación de petróleo crudo por hongos marinos a altas temperaturas (30 - 40° C) (Al-Nasrawi, 2012). Sin embargo, los resultados sugirieron que los aislados analizados no son viables en este escenario. Posiblemente debido a la modificación del efecto en la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Juhász y Naidu, 2000) o por la modificación en la producción enzimática de los hongos (Johnson, Jones, y Moss, 2011). En contraste, a temperatura ambiente, se observó el crecimiento de todos los aislados. Por lo que en caso de continuar con la exploración del uso potencial de este material para la micorremediación, el proceso se deberá optimizar considerando temperaturas inferiores a los 40° C.

Por un lado, *Eurotiales* sp. *Aspergillaceae* sp. y *C. halima* respondieron al uso del conjunto de hidrocarburos generando biomasa por encima de 0.1 g, hasta 0.25 g. Mientras que los aislados de *C. maritima* generaron 0.003 g de biomasa en su máximo crecimiento para el aislado DB8 obtenido de Yucatán. La comparación con sus controles demostró que todos los

aislados consiguieron utilizar hexadecano y 1-hexadeceno como única fuente de carbono en tasas de crecimiento que fluctuaron entre 15 y 87 % para *C. maritima* y de 82 a 91 % para los demás aislados de ambientes marinos.

Las tasas de crecimiento mostradas en las pruebas de tolerancia sirvieron como antecedente para comprender el comportamiento de las fases de crecimiento de cada aislado. La producción de micelio de los 7 a 25 días de evaluación en la prueba de uso mostró ampliamente que *Eurotiales* sp., *Aspergillaceae* sp. y *C. halima* explotaron la fuente de carbono. Los aislados de *C. maritima* crecieron menos en comparación con los aislados de otros ambientes marinos. En contraste DB8 mostró una disminución en su crecimiento radial en la prueba de tolerancia con la presencia de los hidrocarburos en concentraciones bajas, mientras que en la prueba de uso logró aumentar su producción de biomasa en un 87%. Además, TU10 mostró 72% de producción de biomasa, todas las concentraciones de ambos hidrocarburos influyeron negativamente en su crecimiento para la prueba de tolerancia a la presencia de hexadecano y 1-hexadeceno.

Los aislados *Eurotiales* sp., *Aspergillaceae* sp. consiguieron desarrollarse en cultivo y en distintas pruebas *in situ* en el laboratorio, a pesar de las amplias diferencias con las condiciones de los ambientes de ventilas hidrotermales de mar profundo. Estos resultados sugieren que ambos taxa podrían adaptarse a las condiciones fluctuantes de las costas, ya que crecieron en lapsos de tiempo cortos (10 días), generando micelio abundantemente en las pruebas de uso. Si bien en las pruebas de tolerancia *Aspergillaceae* sp. mostró reducciones de hasta 40% con la presencia de hexadecano, en la prueba de uso aumentó en un 91% su producción de biomasa. Como conclusión de las pruebas de uso obtuvimos que las condiciones impuestas en el segundo experimento fueron más eficientes para la biodegradación, a partir de estos resultados podemos sugerir que la activación de los mecanismos de degradación fue más eficiente.

Los resultados obtenidos apuntan a que los aislados utilizados en esta investigación tienen el potencial de bio-remediar playas mexicanas y poder usar otros componentes del petróleo como fuente de carbono. Este estudio será útil para intereses de saneamiento a ecosistemas marinos contaminados, en general para los interesados en evaluar la conservación de la zona costera. Estudios futuros deberán enfocarse en investigaciones biotecnológicas a través del

estudio de enzimas fúngicas involucradas en la degradación de cadenas largas de hidrocarburos y otros más complejos.

9. CONCLUSIONES

Los aislados mexicanos de *C. maritima sensu lato*, *Eurotiales* sp. *Aspergillaceae* sp. y *C. halima* toleran la presencia de los hidrocarburos *n*-hexadecano y 1-hexadeceno en distintas concentraciones. Así mismo, estos organismos lograron aprovechar ambos hidrocarburos como única fuente de carbono, representando organismos potencialmente útiles para la biorremediación de ambientes contaminados. Se determinó que los linajes 1 y 5 presentan tasas de crecimiento diferenciales durante el uso de los hidrocarburos como única fuente de carbono, concluyendo que las diferencias observadas en las tasas de crecimiento dependen probablemente del genotipo, más que de su localidad de origen o entidad taxonómica.

Los aislados de ventilas hidrotermales de mar profundo (*Eurotiales* sp. y *Aspergillaceae* sp.) mostraron un crecimiento abundante a lo largo de 25 días bajo los distintos medios evaluados, por lo que se reafirma su posible uso como agentes biorremediadores (particularmente de alquenos). Finalmente, *C. halima* logró beneficiarse de la presencia del *n*-hexadecano y el 1-hexadeceno, promoviéndose la generación de biomasa en los distintos experimentos. Con base en todo lo anterior, se propone a este último organismos como el mejor candidato para un uso potencial en la biorremediación, y se propone la realizaciopn de estudios adicionales para evaluar su capacidad para degradar otros componentes más pesados del petróleo.

10. PERSPECTIVAS

Actualmente no existen alternativas diseñadas para biorremediar el daño ambiental ocasionado por la industria petrolera a partir de recursos genéticos mexicanos, de ahí la importancia de implementar estrategias como las descritas en este trabajo de investigación como una alternativa apropiada, para restituir las condiciones aptas para la diversidad biológica a través de organismos nativos que hayan mostrado potencial para la degradación de hidrocarburos alifáticos.

El siguiente paso en la investigación es probar a los distintos aislados de *C. maritima sensu lato*, y las especies *Eurotiales* sp. *Aspergillaceae* sp. y *C. halima* como organismos con potencial para degradar otros contaminantes ambientales de las zonas costeras. Es necesario determinar las capacidades metabólicas de dichos organismos a la presencia de hidrocarburos complejos como benzo[a]pireno y el petróleo crudo, así como su capacidad para crecer con estas sustancias como única fuente de carbono. Además, mediante pruebas de cromatografía de gases y de lípidos acopladas a espectrometría de masas, podrán caracterizarse los productos de la degradación de los hidrocarburos por cada organismo.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahearn DG, Meyers SP. (1976). Fungal degradation of Oil in the Marine environment. In Gareth Jones (ed.) *Recent Advances in Aquatic Mycology*, 127-130.
- Ahearn DG, Crow SA. (1986). Fungi and hydrocarbons in the marine environment. *The Biology of Marine fungi*, 11-18.
- Al-Hawash AB, Dragh MA, Li S, Alhujaily A, Abbood HA, Zhang X, Fuying M. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 44:71–76.
- Al-Nasrawi H. (2012) Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. *J Bioremed Biodegrad* 3:147. doi: 10.4172/2155-6199.1000147.
- April TM, Foght JM, Currah RS. (1999). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 46:38–49.
- Asemoloye MD, Jonathan SG, Ahmad R. (2019). Synergistic plant-microbes interactions in the rhizosphere: A potential headway for the remediation of hydrocarbon polluted soils. *Int. J. Phytoremediation*. 21:71–83.
- Atlas RM, Bartha R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*. Springer. 287–338.
- Atlas RM. (1993). Bacteria and bioremediation of marine oil spills. *Oceanus*; 36: 2.
- Atlas RM. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation*. 35: 317-27.
- Bakun A. (1996). Patterns in the ocean: ocean processes and marine population dynamics. California Sea Grant, in cooperation with Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, La Paz, Mexico.
- Ballard RD. (1977). Notes on a major oceanographic find, *Oceanus*, 20 (3): 35–44.
- Barghoorn ES, Linder DH. (1944). Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia* 1: 395-467.
- Barnes NM, Khodse VB, Lotlikar NP. (2017). Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India. *3 Biotech* 8: 21.
- Bartha R, Atlas RM. (1977). The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol*. 22: 225-266.
- Biegert AC, Mayer M, Remmert J, Söding and A. Lupas. (2006). The MPI Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 34: 335-339.

- Bik HM, Halanych KM, Sharma J, Thomas WK. (2012). Dramatic Shifts in Benthic Microbial Eukaryote Communities following the Deepwater Horizon Oil Spill. *PLoS ONE* 7(6): 538-550. doi:10.1371/journal.pone.0038550.
- Birkett SH, Rapport DJ. (1999). A stress-response assessment of the Northwestern Gulf of Mexico ecosystem. In: Kumpf, H., Steidinger, K., Sherman, K. (Eds.), *The Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem: Assessment, Sustainability, and Management*. Blackwell Science, Inc, Oxford. 438-458.
- Bisht S, Pandey P, Bhargava B, Sharma S, Kumar V, Sharma KD. (2015). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Braz. J. Microbiol* 46, 1: 7-21.
- Blumer M, Mtsllinand RL, Guillard RR. (1970). A polyunsaturated hydrocarbon (3, 6, 9, 12, 15, 18-heneicosahexane) in the marine food web. *Mar. BioL*, 6: 226-235.
- Botello AV, Ponce-Vélez G, Toledo A, Díaz-González G. and Villanueva S. (1992). *Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México*, Ciencia y Desarrollo, Vol. XVIII, 102, 28-48.
- Botello AV, Villanueva FS, Díaz GG. (1997). Petroleum pollution in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Rev. Environmental Contamination Toxicology*, 153: 91-118.
- Botello AV, Calva B, Ponce-Vélez G. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from coastal lagoons of Veracruz state, Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 889-897.
- Botello AV, García-Ruelas C, Ponce-Vélez G. (2002) PAH Levels in Bivalve Mollusks from the Mexican Subtropical Pacific. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 486-493.
- Botello AV, J. von Osten JR, Gold-Bouchot G y Agraz-Hernández C. (2005). *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. 264-272.
- Botello AV, Soto LA, Ponce-Vélez G, Villanueva SF. (2015). Baseline for PAHs and metals in NW Gulf of Mexico related to the Deepwater Horizon oil spill, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 156: 124-133.
- Bovio E, Gnani G, Prigione V, Spina F, Denaro R, Yakimov R, Calogero R, Crisafi F, Varese GV. (2017). The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Science of the total environment*. 576: 310-318.
- Brooks J. (1990). Classic petroleum provinces. In: J. Brooks (Ed.). *Classic petroleum provinces*. Geological Society Special Publication 50: 1-8.

- Burdige DJ. (2021). *Geochemistry of Marine Sediments*, Princeton: Princeton University Press, 2021.
- Burgaud G, Arzur D, Durand L, Cambon-Bonavita MA & Barbier G. (2010). Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS microbiology ecology*, 73(1), 121-133.
- Burgaud G, Le Calvez T, Arzur D, Vandenkoornhuyse P, Barbier G. (2009). Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* (2009) 11(6), 1588–1600.
- Camerlenghi A. (2018). Drivers of seafloor geomorphic change. *Submarine Geomorphology*. Springer. 135–159.
- Castro R, Mascarenhas AS; Durazo R, Collins CA. (2000). Seasonal variation of the temperature and salinity at the entrance to the Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 26(4): 561-583.
- Centro de Derechos Económicos y Sociales (CDES) (1994). *Violaciones de derechos en la Amazonía ecuatoriana*. *Hombre y Ambiente* 30. Abya-Yala, Quito.
- Cerniglia CE. (1984). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microb* 30: 31-71.
- Cerniglia CE, Sutherland JB. (2006). Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation of contaminated soils. In *Fungi in Biogeochemical Cycles*. GM Gadd, ed. Cambridge: Cambridge University Press. 182-211.
- Cerniglia CE, Sutherland JB (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis KN, TJ MG, van der Meer JR, de Lorenzo V (eds) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin. 2080-2110.
- Chaerun SK, Tazaki K, Asada R, Kogure K. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30(7), 911-922.
- Chaillan FA, Le Flèche EB, Phantavong YH, Grimont PAS, Oudot J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 155: 587-595.
- Clague DA, Caress DW, Dreyer BM, Lundsten L, Paduan JB, Portner RA, Le Saout M. (2018). Geology of the Alarcon Rise, Southern Gulf of California. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 19(3), 807-837.
- Clark RC, Brown DW. (1977). Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. En: D. C. Malins (Ed.), *Effects of Petroleum on arctic and subarctic environments and organisms*. Academic Press Inc. London. 1-75.

- Cofone L, Walker JD, y Cooney JJ. (1973). Utilization of hydrocarbons by *Cladosporium resinae*. *Journal of General Microbiology* 76: 243-246.
- Colmenares F. (2008). Petróleo y crecimiento económico en México 1938-2006. *Economía UNAM*, 5(15), 53-65. Consultado el 21 de febrero de 2022.
- Comisión Intersecretarial para el Manejo Sustentable de Mares y Costas, Política Nacional de Mares y Costas de México, Diario Oficial de la Federación, México, (consultado el 15-02-2022 en www.dof.gob.mx).
- Cooney JJ, Doolittle MM, Wuertz S, Miller ME, Baisden C. (1992). Marine fungi: potential catalysts for bioremediation of oil spills. *Abstr. Annu. Mtg. Amer. SocMicrobiol.*, New Orleans, LA.
- Cooney JJ, Doolittle MM, Grahl-Nielsen O, Haaland IM & Kirk PW Jr. (1993). Comparison of fatty acids of marine fungi using multivariate statistical analysis. *Journal of Industrial Microbiology*. 12: 373-378.
- D'Souza DT, Tiwari R, Sah AK, Raghukumar C. (2006) Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 38: 504-511.
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59 (2-3): 143-152.
- Elshafie A, Alkindi A, Al-Busaidi S, Bakheit C, Albahry SN. (2007). Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine pollution bulletin*. 54 : 1692-1696.
- Enríquez D, González MC. (2000). Nuevos registros para la micobiota marina cubana, V Congreso Mar-Cuba.
- Erakin S, Cemal KG. (2008). The volatile petroleum hydrocarbons in marine algae around turkish coasts. *Acta Pharmaceutica Scientia*. 50: 3.
- Estadigrafía, S.A. (1996). Estudio: elaboración de criterios de ordenamiento ecológico para proyectos portuarios, Informe Técnico, México.
- González MC. & Herrera T. (1993). Endopsammophilous micromycetes from barra de navidad, Jalisco, México. *Revista Mexicana Micología* 9: 19-33.
- González MC, Herrera T, Ulloa M, Hanlin RT. (1998). Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience* 39: 115-121.
- Gonzalez MC, Hanlin RT, & Ulloa M. (2001). A checklist of higher marine fungi of Mexico. *Mycotaxon*, 80: 241-253.
- González MC, & Hanlin RT. (2010). Potential use of marine arenicolous ascomycetes as bioindicators of ecosystem disturbance on sandy Cancun beaches: *Corollospora maritima* as a candidate species, *Botanica Marina*, 53(6): 577-580.

- Goffriedi SK, Johnson S, Tunnicliffe V, Caress D, Clague D, Escobar E, Soto LA. (2017). Hydrothermal vent fields discovered in the southern Gulf of California clarify role of habitat in augmenting regional diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284 (1859), 20170817.
- Gutiérrez CM, Zavala CJ (2002). Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 20(2): 101-111.
- Grassle JF. (1982). The biology of hydrothermal vents: A short summary of recent findings. *Marine Technology Society. J.* 16: 33-38.
- Harvey PJ, Thurston CF. (2001). The biochemistry of lignicolous fungi. In: *Fungi in Bioremediation*. GM Gadd, ed. Cambridge: Cambridge University Press. 27-51.
- Hunt JM. (1996). *Petroleum geochemistry and geology*. W.H. Freeman, New York.
- Hong H, Xu L, Zhang L, Chen JC, Wong YS and Wan TSM. (1995). Environmental fate and chemistry of organic pollutants in the sediment of Xiamen harbor and Victoria harbor, *Marine Pollution Bulletin*. 31, 229–236.
- Houston J.R. (2008). The economic value of beaches: a 2008 update. *Shore and beach*, 76(3), 22-26.
- Huettel M. (2022). Oil pollution of beaches, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 36.
- Hyde KD. (1990). Intertidal fungi from warm temperate mangroves of Australia, including *Tunicatispora australiensis*, gen. et sp. nov. *Aust. Syst. Bot.* 3: 711-718.
- Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGY, Abeywickrama PD, Aluthmuhandiram JVS, Brahamanage RS, Brooks S. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers.* 97, 1-136.
- Hyde KD, Jones EBG (1989). Observations on ascospore morphology in marine fungi and their attachment to surfaces. *Bot Mar* 32:205-218.
- IARC. (1989). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: occupational exposures to petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels*, 45. IARC, Lyon.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2001), *Anuario estadístico del territorio mexicano*, INEGI.
- Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 133: 71-84
- Johnson R, Jones E, Moss S. (2011). Taxonomic studies of the Halosphaeriaceae: *Ceriosporopsis*, *Haligena* and *Appendichordella* gen. nov. *Canadian Journal of Botany*. 65. 931-942.
- Jones EB, Sakayaroj J, Suetrong S, Somrithipol S, Pang KL. (2009). Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity*. 35: 1-187.

- Jones EB, Suetrong S, Sakayaroj J, Bahkali A, Abdel-Wahab M, Boekhout T, Pang KL. (2015). Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*. 73. 1-72.
- Jones EB, Pang KL, Abdel-Wahab MA, Scholz B, Hyde KD, Boekhout T, Ebel R, Rateb ME, Henderson L, Sakayaroj J, Suetrong S, Dayarathne MC, Kumar V, Raghukumar S, Sridhar KR, Bahkali AHA, Gleason FH, Norphanphoun C. (2019). An online resource for marine fungi. *Fungal Diversity* 96, 347–433. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5>
- Juhasz AL, Naidu R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 1-2, 57-88.
- Kang YS, Park W (2009) Protection against diesel oil toxicity by sodium chloride induced exopolysaccharide in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *J Biosci Bioeng*. 109:118-123.
- Kirk PW. (1969). Isolation and Culture of Lignicolous Marine Fungi, *Mycologia*, 61:1, 174-177.
- Kirk PW. (1983). Direct Enumeration of Marine Arenicolous Fungi, *Mycologia*, 75:4, 670-682.
- Kirk PW, Gordon AS. (1988). Hydrocarbon Degradation by Filamentous Marine Higher Fungi. *Mycologia*, 80(6), 776.
- Kirk PW, Dyer BJ & Noé J. (1991). Hydrocarbon Utilization by Higher Marine Fungi from Diverse Habitats and Localities, *Mycologia*, 83:2, 227-230.
- Koch J (1986). Some lignicolous marine fungi from Thailand, including two new species. *Nord J Bot* 6:497-499.
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E. (1979). *Marine Mycology e The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Newell SY. (2004). Marine and estuarine mycelial eumycota and oomycota. Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Burlington: Elsevier Academic Press. 533-545.
- Lajous A. (2019). Declinación y destino de las exportaciones de petróleo crudo mexicano. *Foro Internacional*. COLMEX.
- Lara-Lara JR, et al. (2008). Los ecosistemas marinos, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 135-159.
- Leahy JG, Colwell RR. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54: 3.
- Le Calvez T, Burgaud G, Mahé S, Barbier G, Vandenkoornhuyse P. (2009). Fungal Diversity in Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. *Applied and environmental microbiology*. 75 (20): 6415-6421.

- León-Borges JA y Lizardi-Jiménez MA. (2017). Hydrocarbon pollution in underwater sinkholes of the Mexican Caribbean caused by tourism and asphalt: Historical data series and cluster analysis. *Tourism Management*, 63, 179-186.
- Markovetz AJ, Cazin J, Allen JE. (1968). Assimilation of alkanes and alkenes by fungi. *App. Microbiol.* 16: 487-489.
- Martínez-Alonso M, Gaju N. (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*. 14(2): 79-91.
- MacDonald IR, Garcia-Pineda O, Beet A, Asl SD, Feng L, Graettinger G, French-McCay D, Holmes J, Hu C, Huffer F et al. (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. *J Geophys Res Oceans*, 120: 8364-8380.
- Medina-Moreno, S. A., Jiménez-González, A., Gutiérrez-Rojas, M., y Lizardi-Jiménez, M. A. (2014). Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13, 509-516.
- Michel J, Shigenaka G, Hoff R (2010). Oil spill response and cleanup techniques. *Mar Pollut Bull* 40 (11).
- Mohanty G, Mukherji S. (2008). Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Int Biodeterior Biodegradation* 61: 240-250.
- Montaño-Vera NC, Riz-Marín AY, Cañedo-López JG, Flores-Trujillo JC, Zavala-Loria, y A. Narváez-García. (2017). Sources and distribution of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments along the coastal corridor of Laguna de Terminos. *International Journal of Advanced Research*, 51: 681-1693.
- Morel M, Meux E, Mathieu Y, Thuillier A, Chibani K, Harvengt L, Jacquot JP, Gelhaye E. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* 2013, 6, 248–263.
- Nakagiri A, Tokura R (1987). Taxonomic studies of the genus *Corollospora* (Halosphaeriaceae, Ascomycotina) with descriptions of seven new species. *Trans Mycol Soc Jpn* 28:413–436
- Navarro AG (2010). Derrame petrolero en Golfo de México y sus consecuencias en Tamaulipas. *Ciencia UAT*, vol. 5, núm. 1, julio-septiembre 2010. 8-11 Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria. México.

- Tabuchi H, Migliozi B. (24 de febrero de 2021). Oil Spill in the Gulf of Mexico: What We Know. New York times. <https://www.nytimes.com/2021/09/06/climate/oil-spill-ida-gulf-of-mexico.html>
- Ortíz BO, Ize I, Gavilán A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México Gaceta Ecológica, núm. 69, octubre-diciembre, 2003, pp. 83-92 Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Ortiz PM, Lanza EG. (2006). Diferenciación del espacio costero de México. Un inventario regional. Serie textos universitarios num. 3: 30-95.
- Otremba Z, Toczek H. (2002). Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and aquatorial factors. Polish J Environ Stud. 2002;11(5):555-559.
- Pang KL, Overy DP, Gareth JE, Calado ML, Burgaud G, Walker AK, Johnson JA, Kerr RG, Hyo-Jung, Bills GF, (2016). ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition, Fungal Biology Reviews. 30, 4: 163-175.
- Passarini MR, Rodrigues MV, Da Silva M, Sette LD. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. Mar. Pollut. Bull. 62, 364–370.
- PEMEX. (2003). Producción. Las Reservas de Hidrocarburos de México.
- PEMEX. (2021). Inauguró el Director General de PEMEX el Congreso Mexicano del Petróleo 2021. https://www.pemex.com/saladeprensa/boletines_nacionales/Paginas/2021-217_nacional.aspx
- Perry JJ. (1984). Microbial metabolism of cyclic alkanes. In: Atlas RM (ed) Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co, New York. 61–98.
- Pointing SB. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 20–33.
- Ponce-Vélez G, & Botello AV. (2005). Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México, In: 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. pp. 269-298, 696.
- Ponce-Velez G, Botello AV, Díaz-González G. (2006). Organic and inorganic pollutants in marine sediments from northern and southern continental shelf of the Gulf of Mexico. International Journal of Environment and Pollution, 26(1-3): 295-311.

- Porto ALM, Melgar GZ, Kasemodel MC, Nitschke M (2011). Pesticides in the modern world-pesticides use and management. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos.
- Posthuma J. (1977). The composition of petroleum. *Rapp. P.V. Reun. Cons. It. Explor. Mer.*, 171: 7-16.
- Prol-Ledesma RM, Canet C, Torres-Vera MA, Forrest MJ, y Armienta MA. (2004). Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 137(4), 311–328.
- Raghukumar C. (2008). Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity* 31: 19-35.
- Raghukumar C. (2017). Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems. *Marine Fungi*. Springer. India. 43-69.
- Ramirez-Llodra E, Shank TM, German CR. (2007). Biodiversity and biogeography of hydrothermal vent species: thirty years of discovery and investigations. *Oceanography* 20:30–41.
- Rhodes CJ. (2013). Applications of bioremediation and phytoremediation. *Science Progress* 96: 417-427.
- Romero-Hernández L, Velez P, Betanzo-Gutiérrez I, Camacho-López MD, Vázquez-Duhalt R, Riquelme M. (2021). Extra-Heavy Crude Oil Degradation by *Alternaria* sp. Isolated from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Appl. Sci.*, 11, 6090.
- Ron EZ & Rosenberg E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27: 191-194.
- Roux R, Flores OT. (2015). Los hidrocarburos en el Noreste de México. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Primera edición, 2015.
- Rowe GT, Wei C, Nunnally C, Haedrich R, Montagna P, Baguley JG, Bernhard JM, Wicksten M, Ammons A, Briones EE, Soliman y Deming JW. (2008). Comparative biomass structure and estimated carbon flow in food webs in the deep Gulf of Mexico, *Deep- Sea Res. II*, 55, 2699-2711.
- Scherr KE, Lundaa T, Klose V, Bochmann G, Loibner AP. (2012) Changes in bacterial communities from anaerobic digesters during petroleum hydrocarbon degradation. *J Biotechnol* 157: 564-572.
- Schneider CA, Rasband WS, and Eliceiri KW. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.

- SECTUR (Secretaría de Turismo) (2021). <https://www.datatur.sectur.gob.mx/SitePages/CompendioEstadistico.aspx>. Consultado 27/03/22.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/playas-mexicanas-sitios-de-refugio-y-proteccion-de-tortugas-marinas?idiom=es>. Consultado 27/02/22.
- Shin B, Bociu I, Kolton M. et al. (2019). Succession of microbial populations and nitrogen-fixation associated with the biodegradation of sediment-oil-agglomerates buried in a Florida sandy beach. *Sci Rep* 9, 19401.
- Sikkema J, De Bont J, Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 59: 201-22.
- Simoneit BRT, Leif RN, Sturz AA, Sturdivant AE y Gieskes JM. (1992). Geochemistry of shallow sediments in Guaymas Basin, Gulf of California: Hydrothermal gas and oil migration and effects of mineralogy. *Organic Geochemistry* 18 (6): 765-784.
- Singer ME, Finnerty WR. (1984) Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Atlas RM (ed) *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co, New York, pp 1–60.
- Smith CR, De Leo FC, Bernardino AF, Sweetman AK, y Martinez Arbizu P. (2008). Abyssal food limitation, ecosystem structure and climate change, *Trends Ecol. Evol.*, 23, 518-528.
- Spatafora JW, Volkmann-Kohlmeyer B, and Kohlmeyer J. (1998). Independent terrestrial origins of the Halosphaeriales (marine Ascomycota). *American Journal of Botany* 85: 1569-1580.
- Spormann AM, & Widdel F. (2000), Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11: 85-105.
- Stafford S, Berwick P, Hughes DW, and Stafford DA. (1982). Oil degradation in hydrocarbon- and oil-stressed environments. In *Experimental microbial ecology*. Edited by R.G. Burns and J.H. Slater. Blackwell Scientific Publishers, Oxford. pp. 591-612.
- Srief P, Fuchs-Ocklenburg S, Kamp A, Manohar CS, Houbraken J, Boekhout T, Stoeck T. (2014). Dissimilatory nitrate reduction by *Aspergillus terreus* isolated from the seasonal oxygen minimum zone in the Arabian Sea. *BMC microbiology*, 14(1), 35.
- Thomas HS. (1993). Oil Impacts on Marine Invertebrate Populations and Communities. *American Zoologist*, 33(6): 510-523.
- Tissot B & Welte D. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence*. Springer Verlag, Berlin.
- Thomassin-lacroix E, Eriksson M, Reimer K, Mohn W. (2002). Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology Biotechnology*. Quebec, Canadá. 59: 551-556.

- Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil and Gas Science and Technology* 58(4): 427-440.
- Van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JK. (2007). *Modern soil microbiology*, 2nd Ed. CRC Press, New York, pp 387-429.
- Veiga P, Besteiro C, Rubal M. (2010). Meiofauna communities in exposed sandy beaches on the Galician coast (NW Spain), six months after the Prestige oil spill: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Scientia Marina*, 74(2), 385-394.
- Velez P, González MC, Rosique-Gil E, Cifuentes J, Reyes-Montes M, Capello-García S, Hanlin RT. (2013). Community structure and diversity of marine ascomycetes from coastal beaches of the southern Gulf of Mexico. *Fungal Ecology, México*, 6: 513-521.
- Velez P, Alejandri-Ramírez ND, Gonzalez M, Estrada KJ, Sánchez-Flores A, Dinkova TD. (2015). Comparative Transcriptome Analysis of the Cosmopolitan Marine Fungus *Corollospora maritima* Under Two Physiological Conditions, *G3-Genes Genomes Genetics*.
- Velez P, Gasca-Pineda J, Nakagiri A, Hanlin RT, González MC. (2016a). Genetic diversity and population structure of *Corollospora maritima* sensu lato: new insights from population genetics. *Botanica Marina*; 59(5): 307-320.
- Velez P, Quintero C, Merino G, Gasca-Pineda J, González M. (2016b). An ISSR-based approach to assess genetic diversity in the marine arenicolous fungus *Corollospora maritima* sensu lato. *Mycoscience, México*, 57: 187-195.
- Velez P, Gasca-Pineda J, Riquelme M. (2020) Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 2020, 153, 104-816.
- Velez P, Salcedo D, Espinosa-Asuar L, Gasca-Pineda J, Hernandez-Monroy A, Soto LA. (2022). Fungal diversity in sediments from deep-sea extreme ecosystems: Insights into low- and high-temperature hydrothermal vents, and an oxygen minimum zone in the southern Gulf of California, Mexico. *Frontiers in Marine Science* 2022 in press.
- Viñas M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Volkman JK, and Maxwell JR. (1986). Acyclic isoprenoids as biological markers. In *Biological Markers in the Sedimentary Record* (ed. Johns, R.B.) pp. 1-46. Elsevier, Amsterdam.
- Vukovich FM, Maul GA. (1985). Cyclonic eddies in the eastern Gulf of Mexico, en *Journal of Physical Oceanography*. 15: 105-117.
- Walker JD, y Cooney JJ. (1973). Pathway of n-alkane oxidation in *Cladosporium resinae*. *The Journal of Bacteriology* 1152: 635-639.

- Wang C, Enfield DB. (2001). The tropical Western Hemisphere warm pool, *Geophysical Research Letters*, 28: 1635-1638.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JB. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols and Applications*.
- Wilson IM. (1954). *Ceriosporopsis halima* linder and *Ceriosporopsis cambrensis* sp.nov.: Two marine pyrenomycetes on wood, *Transactions of the British Mycological Society*, 37, (3): 272-285.
- Xu W, Gong LF, Pang KL, Luo ZH. (2018). Fungal diversity in deep-sea sediments of a hydrothermal vent system in the Southwest Indian Ridge, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 131: 16-26.